

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“UROPORFIRINÓGENO DECARBOXILASA:
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y SU APLICACIÓN
COMO BIOMARCADOR”**

Autor: Lic. Rosa Gabriela Chaufan

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires
Área: Química Biológica

Directora: Dra. María del Carmen Ríos de Molina

Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo
Departamento de Química Biológica

2006

*A mis cuatro hombres,
Nico mi príncipe,
Fede mi angelito
Norber, el incondicional,
y Gustavo el amor de mi vida.*

Remontar

el barrilete en esta tempestad

sólo hará entender

que ayer no es hoy

que hoy es hoy

y que no soy actor de lo que fui.

Spaghetti del rock, Divididos.

INDICE

	Nº
Resumen	1
Summary	2
Abreviaturas y anglicismos	3
Introducción general	5
1. Biosíntesis del hemo	5
2. Porphirinas y Porfirias	10
3. Porfiria Cutánea Tarda (PCT)	15
4. El hexaclorobenceno	16
Hipótesis	18
Objetivos de la investigación	19
Materiales y Métodos	20
1. Preparación del extracto enzimático de hígado de rata (UROD-hr) control y porfíricas por hexaclorobenceno (HCB)	20
1. a. <i>Inducción de la porfiria en ratas</i>	20
1. b. <i>Purificación enzimática de la UROD-hr</i>	20
1. b. 1. Fraccionamiento salino	20
1. b. 2. Tratamiento con gel de fosfato <i>en batch</i>	20

1. b. 2. a. <i>Preparación del gel</i>	20
1. b. 2. b. <i>Gel de fosfato en batch</i>	21
1. b. 2. <i>Cromatografía de afinidad</i>	21
1. b. 2. a. <i>Columna de afinidad</i>	21
1. b. 3. b. <i>Intercambio aniónico (columna Mono Q)</i>	22
1. b. 4. <i>Tamizaje molecular</i>	22
1. b. 4. a. <i>Columna de Sephadex G-75</i>	22
1. b. 4. b. <i>Columna Superdex 75</i>	23
2. a. <i>Preparación del extracto enzimático de hepatopáncreas de cangrejos</i> <i>(UROD-hc)</i>	23
2. b. <i>Purificación enzimática de la UROD-hc</i>	26
2. b. 1. <i>Fraccionamiento salino y columna de tamizaje molecular</i>	26
3. <i>Preparación del extracto enzimático de glándula digestiva de</i> <i>lapas antárticas (UROD-gdl)</i>	26
3. a. <i>Purificación enzimática de la UROD-gdl</i>	27
4. <i>Determinación de la actividad UROD.</i>	28
4. a. <i>Preparación del urogen para ser usado como sustrato de la UROD</i>	28
4. b. <i>Valoración de la concentración de sustrato incubado</i>	28
4. c. <i>Condiciones de incubación</i>	29
4. d. <i>Esterificación y pasaje a cloroformo</i>	29
4. e. <i>Medición de los productos de la reacción</i>	30

4. e. 1. Medición de porfirinas metil-éster por HPLC en fase directa	30
4. e. 2. Medición de porfirinas libres en HPLC en fase reversa	30
5. Determinación de proteínas	31
6. Electroforesis	31
7. Inmunodetección por <i>Western blot</i> .	31
8. Obtención de anticuerpos anti-UROD de ratas en conejo:	32
9. Determinación del contenido de HCB	32
10. Determinación de glutatión (GSH)	33
11. Determinación de la actividad Superóxido dismutasa (SOD)	34
12. Determinación de malóndialdehído (MDA)	34
13. Análisis estadístico de los resultados	35
CAPÍTULO I: <i>Estudios comparativos entre UROD provenientes</i>	
<i>de ratas normales y porfíricas por hexaclorobenceno</i>	36
I. 1. Introducción	36
I. 2. Resultados	39
I. 2. 1. Actividad UROD	39
I. 2. 1. a. <i>Estudios de saturación.</i>	39
I. 2. 1. b. <i>Efecto del pH y la temperatura de incubación sobre la actividad UROD de ambas fuentes.</i>	42
I. 2. 1. c. <i>Estabilidad de la enzima bajo diferentes condiciones de almacenamiento</i>	47
I. 2. 2. Ensayos de caracterización química	48

I. 2. 3. Ensayos antigénicos	51
I. 2. 4. Estudios cinéticos de competencia con dos sustratos	51
I. 3. Discusión	57
I. 3. 1. Actividad UROD	57
I. 3. 2. Ensayos de caracterización química	59
I. 3. 3. Ensayos antigénicos	62
I. 3. 4. Estudios cinéticos de competencia con dos sustratos	63
CAPÍTULO II: <i>Purificación de la UROD proveniente de ratas porfíricas por HCB</i>	67
II. 1. Introducción	67
II. 2. Resultados	72
II. 2. 1. Estudios iniciales con ratas porfíricas	72
II.2. 1. a <i>Puesta a punto de los primeros pasos de purificación</i>	72
II. 2. 2. Purificación de la enzima proveniente de ratas porfíricas	75
1. Acortamiento del tiempo y manipulación de las muestras, con posterioridad a la purificación	80
2. Mejoramiento del método de detección de la actividad enzimática por HPLC	81
3. Mejoramiento del rendimiento del método de purificación	82
4. Reemplazo de solventes orgánicos	82
5. Mejoramiento de la reproducibilidad de los perfiles de elusión cromatográficos	82
Perfiles de las columna de intercambio iónico Mono Q	86
Perfiles de las columnas de temizaje molecular Sephadex 75	88

SDS/PAGE	91
Perfil de la columna de intercambio iónico 15Q	94
II. 3. Discusión	97
CAPÍTULO III: <i>La Uroporfirinógeno decarboxilasa como indicador de contaminación ambiental</i>	101
III.1. Introducción	101
III. 2. Resultados	106
III. 2. 1. Actividad UROD en distintos organismos	106
III. 2. 1. a. <i>Actividad UROD en hepatopáncreas de C. granulatus.</i>	106
III. 2. 1. b. <i>Actividad UROD en glándula digestiva de Nacella concinna.</i>	115
III. 2. 1. c. <i>Actividad UROD en peces antárticos</i>	122
III. 2. 2. Efecto de la contaminación sobre la actividad UROD	124
III. 2. 2. a. <i>Efecto del diesel sobre la UROD de lapas (Nacella concinna)</i>	124
III. 2. 2. b. <i>Efecto del HCB sobre una cadena trófica acuática.</i>	125
III. 2. 2. b. 1. <i>Determinación de la actividad UROD</i>	125
III. 2. 2. b. 2. <i>Determinación del contenido de MDA</i>	128
III. 2. 2. b. 3. <i>Determinación del índice hepatosomático</i>	129
III. 2. 2. b. 4. <i>Determinación del GSH intracelular y de la actividad SOD</i>	130
III. 2. 2. b. 5. Análisis histológicos	131
III. 3 Discusión	135
	135

III. 3. 1. Actividad UROD en distintos organismos	138
III. 3. 3. a. Efecto de la contaminación sobre la actividad UROD	141
III. 3. 3. b. Otros posibles modelos para estudios de la contaminación	142
Conclusiones Generales y Perspectivas	147
Trabajos Publicados	148
Bibliografía	160
Agradecimientos	

UROPORFIRINÓGENO DECARBOXILASA: ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y SU APLICACIÓN COMO BIOMARCADORA

RESUMEN

La síntesis del hemo se produce en ocho pasos y el quinto está catalizado por la enzima citosólica Uroporfirinógeno decarboxilasa. Esta enzima cataliza la descarboxilación secuencial de los cuatro grupos acéticos del uroporfirinógeno, primer sustrato, a grupos metílicos dando como producto final el coproporfirinógeno. La deficiencia enzimática, por motivos genéticos o exposición a agentes químicos, es responsable de la porfiria más común en humanos, la Porfiria Cutánea Tarda. Entre los agentes químicos más relacionados con este tipo de porfiria figura el hexaclorobenceno.

En este trabajo de Tesis se han abordado diferentes estudios relacionados a la bioquímica de la Uroporfirinógeno decarboxilasa: 1. Se estudiaron comparativamente las características bioquímicas, cinéticas y la reactividad antigénica, entre la enzima proveniente de hígados de ratas normales y tratadas con hexaclorobenceno; 2. Se describió por primera vez la purificación de la enzima proveniente de hígados de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno abordando diferentes protocolos de purificación y 3. Se determinó por primera vez la actividad UROD en peces antárticos, en cangrejos (*Chasmagnathus granulatus*) y en lapas (*Nacella concinna*). Con relación a esto último se diseñó una cadena trófica compuesta por algas verdes y cangrejos y se determinó la transferencia del hexaclorobenceno a través de ella. Se midieron los daños producidos en el último eslabón de la cadena trófica (cangrejo) y se propuso utilizar la medición de la actividad Uroporfirinógeno decarboxilasa como marcador temprano de contaminación ambiental.

Palabras claves: Uroporfirinógeno decarboxilasa, hexaclorobenceno, purificación, cinética enzimática, estrés oxidativo.

UROPORPHYRINOGEN DECARBOXYLASE: BIOCHEMICAL STUDIES AND ITS APPLICATION AS BIOMARKER

SUMMARY

The synthesis of the heme is produced in eight steps and the fifth is catalyzed by the cytosolic enzyme uroporphyrinogen decarboxylase. This enzyme catalyzes the sequential decarboxylation of the four acetic groups of the uroporphyrinogen, first substrate, to methyl groups giving as final product the coproporphyrinogen. A reduction in this enzyme activity in humans can be due to exposure to chemical agents or by inheriting mutations and is responsible for the most common porphyria in humans, the Porphyria Cutanea Tarda. Among the chemical agents most related to this type of porphyria figures the hexachlorobenzene.

In this work of Thesis they have broached different studies related to the biochemical of the uroporphyrinogen decarboxylase: 1. It was studied comparatively the biochemical characteristics, kinetic and the antigenic reactivity, between the enzyme from livers of normal rats and treated with hexachlorobenzene; 2. It was described for the first time the purification of the enzyme from livers of rats intoxicated with hexachlorobenzene broaching other protocols of purification, and 3. It was determined for the first time the presence of the enzyme in Antarctic fishes, crabs (*Chasmagnathus granulatus*), and limpets (*Nacella concinna*). In relation to this work, one troffic chain was designed compound around green algae and crabs and it was determined the transfer of the hexachlorobenzene from one side to the other. It was measure the impairments originated in the last link of the troffic chain (crab) and it is proposed to utilize the activity of the enzyme uroporphyrinogen decarboxylase as earlier bookmark of environmental pollution.

keywords: Uroporphyrinogen decarboxylase, hexachlorobenzene, purification, enzyme kinetic, oxidative stress.

Abreviaturas y anglicismos

ALA: ácido δ -aminolevúlico

ALA-D: δ -aminolevúlico dehidrasa

ALA-S: δ -aminolevúlico sintetasa

En batch: procedimiento en el cual las muestras se procesan todas juntas.

BBM: medio basal de Bold para microalgas

Buffer PBS-Tween: buffer salino con Tween 20 al 0,1 %

buffer: amortiguador de pH

CG: cromatografía gaseosa

C. granulatus: cangrejo *Chasmagnathus granulatus*

C. kessleri: alga verde unicelular *Chlorella kessleri*

CGL: cromatografía gas-líquido

DMSO: dimetilsulfóxido

DTNB: ácido 5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)

EDTA: ácido etiléndiamino tetracético

FAD: flavin adenosina dinucleótido

FPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HAP: hidrocarburos aromáticos polihalogenados

HCB: 1,2,3,4,5,6- γ -hexaclorociclohexano (hexaclorobenceno)

loop: rulo, lazo o vuelta que se produce en una cadena polipeptídica

N. concinna: lapa *Nacella concinna*

NBT: cloruro de nitro- azul-tetrazolio

PBG: porfobilinógeno

PBG-D: protoporfirinógeno deaminasa

PCT: Porfiria Cutánea Tarda

PCTa: Porfiria Cutánea Tarda adquirida

PCTf: Porfiria Cutánea Tarda familiar

PHE: Porfiria Hepato Eritropoyética

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPO: protoporfirinógeno oxidasa

Scavenger: atrapante

SDS/PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SDS: dodecil sulfato de sodio

Succinil CoA: succinil coenzima A

TBA: 4,6-dihidroxipirimida -2-tiol (ácido tiobarbitúrico)

TCDD: 2,2,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina

uro: uroporfirina

UROD: uroporfirinógeno decarboxilasa

UROD_N: uroporfirinógeno decarboxilasa proveniente de rata normal

UROD_P: uroporfirinógeno decarboxilasa proveniente de rata porfírica por HCB

UROD-gdl: Uroporfirinógeno decarboxilasa de glándula digestiva de lapas

UROD-hc: Uroporfirinógeno decarboxilasa de hepatopáncreas de cangrejos

Urogen: uroporfirinógeno

Western blot: Técnica que se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos (Inmunodetección).

Introducción General

Introducción General

1. Biosíntesis del hemo

Los tetrapirroles comprenden un grupo de productos naturales muy diversos, los cuales comparten inicialmente un camino biosintético en común (Figura 1). Estos compuestos forman parte de las hemoproteínas, las cuales están involucradas en muchas facetas del metabolismo celular, incluyendo la cadena de transporte de electrones en la respiración y en la fotosíntesis, reacciones biosintéticas redox dependientes y respuestas al estrés oxidativo. De esta manera, el grupo hemo es esencial para la vida y es sintetizado por casi todos los tipos celulares. Los citocromos son las hemoproteínas predominantes en los procesos redox en casi todos los organismos (animales y plantas) y poseen hemo como cofactor. Por otra parte, la clorofila (presente en las plantas y bacterias fotosintéticas) también es una hemoproteína que contiene magnesio en su centro activo (a diferencia del hierro en los citocromos). Otra sustancia importante es la vitamina B₁₂, la cual presenta la misma estructura base pero con cobalto en su centro activo. Existe otro grupo de tetrapirroles, no acomplexados a metales, en el cual están incluidos los pigmentos biliares, biliverdina y bilirrubina (productos de degradación del hemo en animales) y las ficobilinas de las plantas. El camino biosintético del hemo, clorofila y demás hemoproteínas, es un proceso multipasos y es una ruta metabólica muy conservada en la evolución (Beale, 1990; Whitby *et al.*, 1998). En particular, en eucariotas, el hemo es la piedra angular de la vida aeróbica tal como la conocemos, por ser el transportador de oxígeno en la hemoglobina.

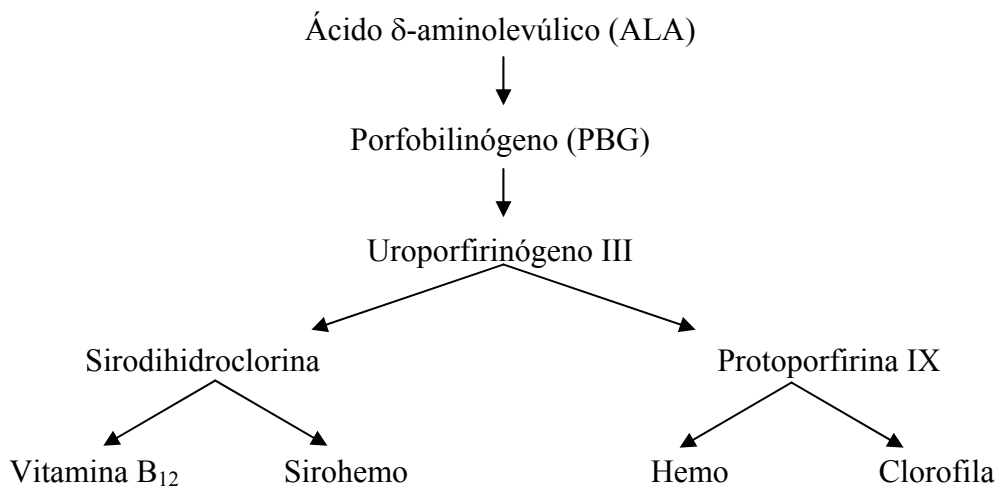


Figura 1: Esquema de formación de los tetrapirroles

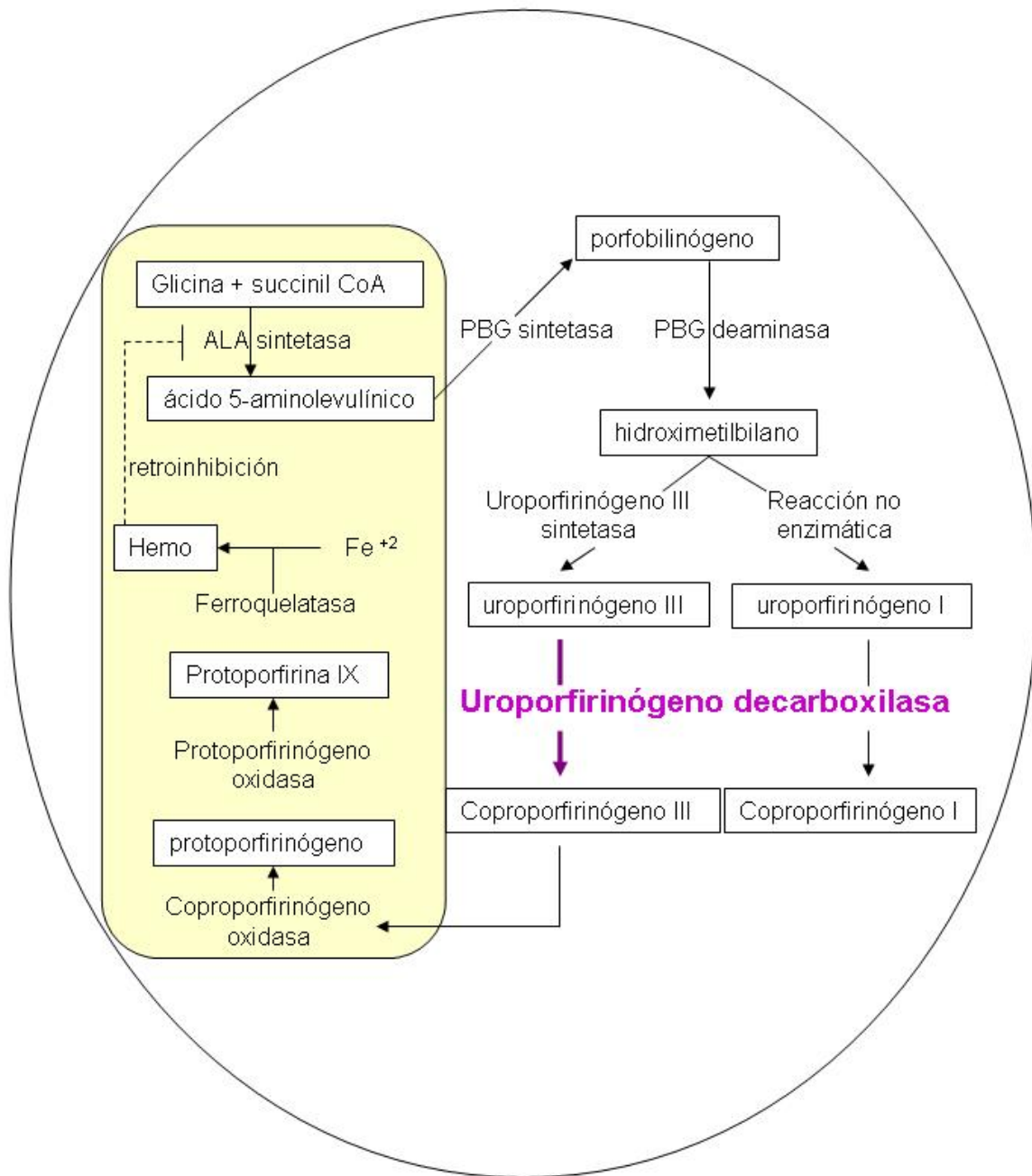


Figura 2: Esquema de la síntesis del hemo.

La síntesis de hemo se produce en ocho pasos como se describe en la Figura 2. El primer paso es la condensación de la glicina con el succinil CoA para dar como producto el ácido δ -aminolevúlico (ALA) con la pérdida de una molécula de dióxido de carbono. Esta reacción está catalizada por la enzima mitocondrial δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) (E.C. 2.3.1.37). Esta enzima es soluble, forma un homodímero de aproximadamente 100 kDa y es dependiente de fosfato de piridoxal (Dailey, 1997). Este primer paso es el paso velocidad limitante en la formación del hemo y como tal está estrictamente regulado por el producto final, el hemo, que actúa tanto inhibiendo (Whiting y Elliot, 1972; Scholnick *et al.*, 1972) como reprimiendo esta vía (Granick *et al.*, 1975; Whiting y Granick, 1976). En animales superiores existen dos tipos de isoenzimas, una tejida no específica (ALAS-N) la cual se expresa ubicuamente y otra específica de tejido eritroide (ALAS-E) (Fujita *et al.*, 1991; Harigae *et al.*, 1998). El gen de la enzima humana ALAS-N ha sido localizado en el cromosoma 3p21, mientras que el de la ALAS-E está en la subregión distal de la banda X p11.2 (Harigae *et al.*, 1998).

El siguiente paso es la condensación de dos moléculas de ALA para generar porfobilinógeno (PBG) y está catalizado por la enzima citosólica δ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), también llamada PBG sintetasa (E.C. 4.2.1.24). Esta enzima está formada por ocho subunidades idénticas, las cuales contienen sitios de pegado a metales. El tipo de metal varía según el organismo. En mamíferos y levaduras hay ocho iones de zinc, por molécula de enzima, de los cuales sólo requiere cuatro para su máxima actividad. En algas y plantas está reportado que contienen 16 iones magnesio por molécula de enzima y en bacterias la enzima utiliza zinc y magnesio (Jaffe, 1995). El gen de la enzima ALA-D humana ha sido localizado en el cromosoma 9 en la banda q34 (Doss *et al.*, 2000).

El siguiente paso es la condensación “cabeza - cola” de cuatro moléculas de PBG para dar un compuesto intermediario muy inestable y lineal, el hidroximetilbilano. Esta reacción es catalizada por la enzima citosólica Porfobilinógeno deaminasa (PBGD, E.C. 4.3.1.8) la cual ya ha sido cristalizada (Hadener *et al.*, 1993; Hart y Battersby, 1985; Louie *et al.*, 1992). Esta es una enzima monomérica, la cual necesita de un cofactor que ella misma sintetiza (Hart *et al.*, 1986; Shoolingin-Jordan, 1995; Warren y Jordan, 1988) llamado “sebador o primer”. Este sebador es un dipirrilmetano formado por dos moléculas de PBG unidas a un residuo cistina de la enzima. El gen de la PBGD humana ha sido localizado en la banda q24 del cromosoma 11 (Doss *et al.*, 2000).

Luego, el intermediario lineal formado puede ciclarse enzimáticamente (por medio de la uroporfirinógeno III sintetasa o cosintetasa, E.C. 4.2.1.75), formando así el uroporfirinógeno III (urogen III). En ausencia de la enzima Uroporfirinógeno III sintetasa el hidroximetilbilano puede ciclarse espontáneamente formándose el uroporfirinógeno I (urogen I). La diferencia entre estos dos isómeros es que el anillo D, en la serie III, está invertido (Figura 3) (Phillips *et al.*, 2003). Sólo un grupo de investigadores propuso la existencia de un cofactor, el folato, el cual sería el responsable de la inversión o rearrreglo del anillo D (Kohashi *et al.*, 1984). El gen de la Uroporfirinógeno III sintetasa humana ha sido localizado en la banda q25 del cromosoma 10 (Doss *et al.*, 2000).

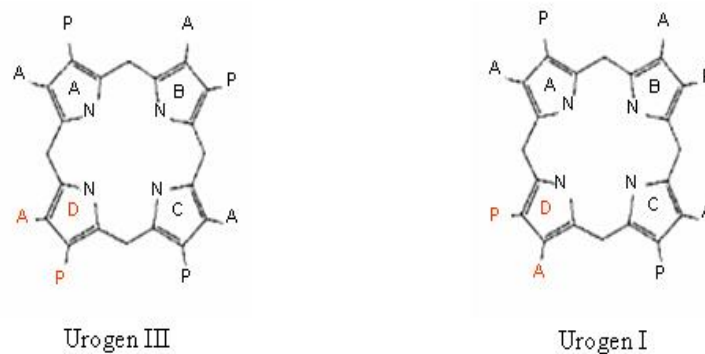


Figura 3: Diferencias entre los porfirinógenos de la serie I y la serie III. Se puede ver que aquel perteneciente a la serie III posee el anillo D invertido.

Tanto el urogen I como el III son sustrato naturales de la Uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD, E.C. 4.1.1.37). Los restantes isómeros, en total 4, no se encuentran en la naturaleza. Con el isómero I y con el III se obtienen, como producto final, coproporfirinógeno (coprogen) I o III, respectivamente. La UROD cataliza la descarboxilación secuencial de los cuatro grupos acéticos a grupos metílicos. En el caso del isómero III, empieza por el anillo D y en el sentido de las agujas del reloj (Jackson *et al.* 1976) (Figura 4). En cambio, se vio que dicha descarboxilación es al azar en el caso del isómero I cuando se trabaja a altas concentraciones de sustrato (Jackson *et al.* 1976; Jones y Jordan 1993). Tanto en la descarboxilación del urogen I como en la del urogen III la enzima no utiliza ningún cofactor. El gen de la UROD, presente en una simple copia en el genoma humano, está compuesto por 10 exones localizados en el cromosoma 1. Por medio de la técnica de hibridación *in-situ* se vio que la UROD humana está en la banda 1p34 (Romeo *et*

al., 1986). En estudios más recientes Whitby *et al.*, (1998) han informado que la proteína recombinante humana de 48kDa comprende un dominio simple que contiene una estructura de barril (β/α)₈ con el sitio activo en una profunda hendidura formada por *loops* de las cadenas c-terminales de dicho barril. En esta hendidura se vio que existen residuos conservados, los cuales forman una cadena invariante de Arg 37, Arg 41, His 39 con función de unión al sustrato y otra cadena de Asp 86, Tyr 164, Ser 219 con función de unión al sustrato y catálisis. Este mismo grupo de trabajo ha informado que, en solución, la proteína es un dímero con una Kd de 0,1 μ M (Whitby *et al.* 1998).

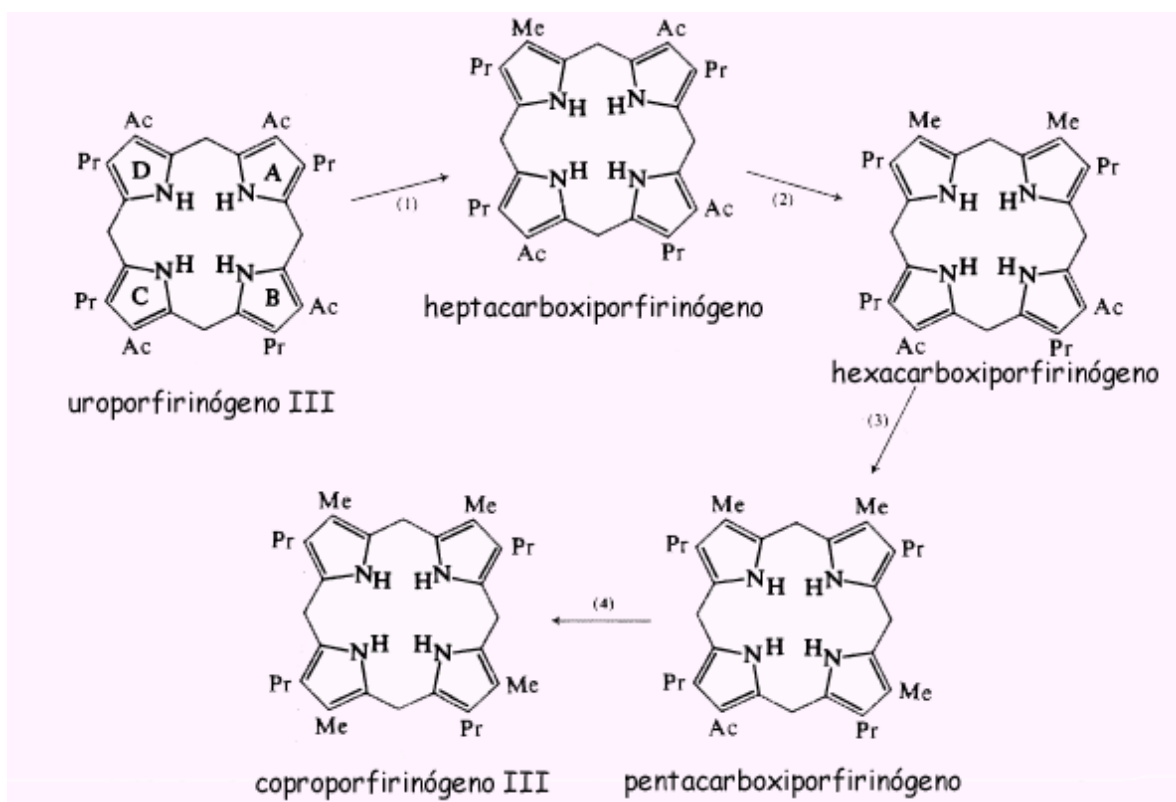


Figura 4: Esquema de la decarboxilación secuencial del urogen III a coprogen III. Los números del 1 al 4 indican los cuatro pasos de decarboxilación. Ac: acetato, Pr: propionato y Me: metilo.

A continuación, el coproporfirinógeno III (pero no el isómero I) es decarboxilado oxidativamente por la Coproporfirinógeno Oxidasa (CPO, E.C. 1.3.3.3) para dar protoporfirinógeno IX. Esta enzima, homodimérica, está localizada en la mitocondria en el espacio intramembrana. El gen de la CPO está codificado en el cromosoma 3 en la banda q12 (Doss *et al.*, 2000).

El siguiente paso es la conversión del protoporfirinógeno IX en protoporfirina IX. Esta oxidación está catalizada por la Protoporfirinógeno oxidasa (PPO, E.C. 1.3.3.4). En eucariotas, esta enzima es un homodímero que contiene FAD y está pegada a la membrana mitocondrial interna, mientras que en bacterias es citoplasmática y está pegada a la membrana celular. Para catalizar la oxidación del porfirinógeno a porfirina, la enzima utiliza tres moléculas de oxígeno molecular, el cual se reduce a peróxido de hidrógeno. En organismos anaerobios y facultativos el paso de la PPO está catalizado por un complejo proteico multimérico conectado a la cadena respiratoria (Dailey, 1997). El gen de la PPO está localizado en el cromosoma 1 en la banda q23 (Doss *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1995).

El último paso en el camino biosintético del hemo es la inserción del ión ferroso en la protoporfirina IX para dar protohemo IX (hemo). Este paso está catalizado por una enzima asociada a la membrana mitocondrial interna llamada Ferroquelatasa (E.C. 4.99.1.1) la cual ha sido caracterizada y cristalizada (Burden *et al.*, 1999). En estos estudios se ha comprobado que la enzima de mamíferos está asociada a la membrana interna mitocondrial, contiene un grupo [2Fe-2S] sensible a óxido nítrico y es un homodímero. A partir de estudios mecanísticos se ha propuesto que primero la enzima se uniría al hierro y luego tomaría a la protoporfirina como sustrato. La unión del metal ocurre cuando el tetrapirrol está curvo y una vez formado el hemo, queda planar y es liberado de la enzima (Dailey, 1997). En eucariotas esta enzima está codificada en el núcleo, sintetizada en el citoplasma y luego trasladada a mitocondria. Como las tres últimas enzimas del camino del hemo están asociadas a membrana, está postulado que en estos pasos estaría involucrado un complejo multi-enzimático aunque no trabajaría formando un canal o “channeling” (Proulx *et al.*, 1993). El gen de la Ferroquelatasa está codificado en el cromosoma 18q21 (Doss *et al.*, 2000).

2. Porfirinas y Porfirias

Los intermediarios fisiológicos del camino del hemo son los porfirinógenos, tetrapirroles cíclicos hidrogenados en los átomos de carbono de los puentes que unen los anillos pirrólicos. En tanto que, las porfirinas, tienen estos carbonos insaturados, lo que les confiere la particularidad de tener dobles ligaduras resonantes, adoptando una estructura casi planar y la capacidad de fluorescer frente a la luz ultravioleta, características no compartidas por los porfirinógenos. Por otra parte las porfirinas no son sustrato de las enzimas del camino

del hemo, salvo la protoporfirina IX, en tanto que los porfirinógenos son los sustratos naturales.

Las porfirias son enfermedades metabólicas provocadas por alteraciones en el camino biosintético del hemo, las cuales están caracterizadas por la acumulación y/o excreción incrementada de porfirinas o de sus precursores. Las porfirias son desórdenes metabólicos que pueden tener un carácter hereditario en el hombre (Elder, 1982), pero también pueden ser causados por exposición a agentes químicos, tanto en el hombre como en animales de experimentación (De Matteis *et al.*, 1981). La expresión clínica de dichos desórdenes puede ser variada, presentando desde cuadros de fotosensibilidad a crisis de abdomen agudo, pasando por desórdenes hemolíticos, neuropatías o hepatopatías. Cada tipo de porfiria está caracterizado por la deficiencia de una o más de las enzimas participantes en la biosíntesis del hemo. Pueden ser clasificadas en hepática, eritropoyéticas o hepatoeritropoyéticas según el órgano en el cual se manifiesta la sobreproducción de porfirinas o precursores (Tabla 1) (Nordmann *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 2000). Desde un punto de vista clínico, se pueden clasificar en: a) agudas, caracterizadas por ataques de abdomen agudo, síntomas cardiovasculares y neurológicos y b) no agudas, caracterizadas principalmente por fotosensibilidad (Doss 1982; Elder, 1982).

El diagnóstico de la porfiria manifiesta requiere de estudios metabólicos. La sola deficiencia enzimática no es causante de la enfermedad. Se ha propuesto que es necesaria la exposición a factores desencadenantes para que se manifieste el fenotipo tanto de la PCT familiar (PCTf) como de la adquirida (PCTa) (Elder, 1982). La deficiencia de la actividad enzimática, en PCTf, sólo refleja que el paciente lleva una mutación en dicha enzima (Doss *et al.*, 2000) y no necesariamente que manifieste el fenotipo PCT.

<i>Porfirias</i>	<i>Deficiencia enzimática</i>	<i>Localización celular</i>	<i>Agudas</i>	<i>Modo de transmisión genética</i>	<i>Expresión fenotípica</i>	<i>Expresión clínica</i>	<i>Manifestación bioquímica</i>		
							<i>orina</i>	<i>heces</i>	<i>sangre</i>
<i>Eritropoyéticas</i>									
<i>Porfiria Congénita Eritropoyética</i>	Uroporfirino III sintetasa	citoplasmática	No	Autosómica recesiva	médula ósea	fotosensibilidad	uro I copro I	copro I	uro, copro, proto-Zn y proto
<i>Protoporfiria Eritrohepática y Eritropoyética</i>	Ferroquelatasa	mitocondrial	No	Autosómica dominante	hígado y médula ósea	fotosensibilidad	copro	proto	proto
<i>Hepáticas</i>									
<i>Porfirias hepáticas agudas</i>									
<i>Porfiria ALA-D</i>	ALA dehidrasa	citoplasmática	Si	Autosómica recesiva	hígado	fotosensibilidad y viceroneurológica	ALA y copro	----	proto-Zn

<i>Porfiria Aguda Intermitente</i>	PBG deaminasa	citoplasmática	Si	Autosómica dominante	hígado	fotosensibilidad y viceroneurológica	ALA, PBG, uro y copro	Proto (?)	----
<i>Coproporfiria Hereditaria</i>	Coproporfirinógeno oxidasa	Espacio intermembrana	Si	Autosómica dominante	hígado	fotosensibilidad y viceroneurológica	ALA, PBG y copro	copro III	----
<i>Porfiria Variegata</i>	Protoporfirinógeno oxidasa	mitocondrial	Si	Autosómica dominante	hígado	fotosensibilidad y viceroneurológica	ALA, PBG y copro	Proto y copro	----
<i>Porfirias hepáticas crónicas</i>									
<i>Porfiria Cutánea Tarda Adquirida</i>	Uroporfirinógeno decarboxilasa	citoplasmática	No	Se desconoce	ubicua	fotosensibilidad	uro y hepta	isocopro	----
<i>Porfiria Cutánea Tarda hereditaria</i>	Uroporfirinógeno decarboxilasa	citoplasmática	No	Autonómica dominante	hígado	fotosensibilidad	uro y hepta	isocopro	---

<i>Porfiria</i> <i>Hepatoeritropoyética</i>	Uroporfiri- nógeno decarboxilasa	citoplasmática	No	Autosómica recesiva	Hígado y médula ósea	fotosensibilidad y vecero neurológica	uro y hepta	isocopro	proto-Zn
--	--	----------------	----	------------------------	-------------------------	---	----------------	----------	----------

Tabla 1: Clasificación de porfirias según el órgano en el cual se manifiesta la sobreproducción de porfirinas o precursores.

3. *Porfiria Cutánea Tarda (PCT)*

La Porfiria Cutánea Tarda (PCT) es una porfiria de tipo hepática, resultante de la disminución de la actividad de la UROD. Es la porfiria de mayor frecuencia en el hombre y se manifiesta por lo general en personas adultas, después de la pubertad. El paciente con PCT presenta un cuadro dermatológico con fotosensibilidad cutánea, ampollas localizadas en zonas expuestas por depósitos de porfirinas en zonas subdérmica, oscurecimiento de la piel por depósitos de hierro, tendencia a esclerosis, hipertrichosis y orina color roja debido a altas concentraciones de porfirinas altamente carboxiladas (uro y hepta). El cuadro dermatológico puede ir o no acompañado de lesiones hepáticas. El término de PCT se usa para describir un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por presentar actividad UROD disminuida. Se pueden diferenciar 4 tipos de PCT: PCTa adquirida o esporádica, PCTf de tipo familiar o hereditaria, PCT tipo III y Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE). La PCTa es la más común entre los pacientes con PCT. En este caso la disminución de la actividad UROD está restringida sólo al hígado y no existen mutaciones en el locus de la UROD, por lo que no se encuentra historia familiar del desorden. Si bien el defecto enzimático del hígado no está relacionado con mutaciones en el locus de la UROD, se sospecha que debe existir algún tipo de modificación genética, que justifique la mayor predisposición de algunos individuos a adquirir porfiria (Elder, 1998a). Por otra parte, entre un 20-50 % de los pacientes con PCT presentan PCTf, en la cual la deficiencia en la actividad enzimática está presente en todos los tejidos (a diferencia de la PCTa en la que sólo está afectada la UROD hepática) y se hereda con carácter autosómico dominante (heterocigota para la mutación) (Elder 1998b). La PCT tipo III tiene características bioquímicas indistinguibles a las del tipo PCTa, pero presenta heredabilidad o historia familiar del desorden. Se piensa que en estos casos la contribución heredable está por fuera del locus de la UROD (Elder 1998b).

En el cuarto tipo de PCT, la PHE, el defecto se hereda en forma homocigota. Los pacientes con PHE presentan una disminución de la actividad UROD de al menos un 75 % en todos los tejidos y la sobreproducción de porfirinas está asociada a lesiones cutáneas severas desde edades tempranas (Elder 1998a).

Otra de las características importantes en este grupo de enfermedades es la relación entre la actividad enzimática y la cantidad de proteína activa. Se denomina CRIM (cross reactive immunological material) al cociente entre la actividad enzimática y el material o proteína con capacidad inmunológica. En este sentido si el valor de inmunoreactividad de la

enzima es normal y la actividad está disminuida el cociente es menor a 1 y se dice que el CRIM es negativo. Este es el caso de la UROD hepática de los pacientes con PCTa lo cual sugiere la presencia de un inhibidor de la actividad enzimática (Garey *et al.*, 1993). En cambio en los pacientes con PCTf tanto la actividad enzimática como la concentración de proteína inmunológicamente activa están disminuidas un 50 % en eritrocitos, lo cual indica una ausencia casi total de producto enzimático de uno de los alelos (Doss *et al.*, 2000). En este caso se dice que el CRIM es igual a 1.

Un factor adquirido, normalmente asociado a la PCT, es la siderosis hepática alcohólica (Elder, 1998b), sin embargo la simple ingestión de alcohol, en personas que no presentan los desarreglos hereditarios específicos de PCT, no sería desencadenante de porfiria. Existen trabajos con ratas tratadas crónicamente con alcohol en las que se ha logrado detectar una disminución en la actividad de la UROD hepática y abre un interrogante sobre la capacidad porfirinogénica del alcohol “per se” (Ríos de Molina *et al.*, 2002).

La manifestación de la enfermedad también suele estar asociada a factores toxicológicos tales como la ingestión de estrógenos, sulfonamidas, hipoglucemiantes orales y barbituratos o la exposición a hidrocarburos aromáticos polihalogenados tales como el hexaclorobenceno y el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y a hidrocarburos aromáticos no-halogenados policíclicos tales como 3-metilcolantreno (De Matteis, 1998; Poland y Knutson, 1982). En estos casos sólo la UROD hepática se ve disminuida. Se ha observado que el desarrollo de este tipo de PCT tóxica está influenciado por la susceptibilidad individual o predisposición genética de cada individuo (Elder, 1998a; Vilas *et al.*, 1999) y en algunos casos se ha encontrado una relación dosis respuesta frente a la exposición de dichos químicos porfirinogénicos (Doss *et al.*, 2000).

3. El hexaclorobenceno

El hexaclorobenceno (HCB) (C_6Cl_6) es un compuesto orgánico clorado, usado antiguamente como fungicida en el tratamiento de semillas, prohibido en la actualidad desde 1970 a nivel mundial. Puede ser producido en forma directa o como un producto lateral en muchos procesos industriales, como por ejemplo en la industria del caucho, la fundición del aluminio y la manufactura de la tinta. De esta manera, cantidades considerables de HCB son generadas como desechos de productos industriales y posteriormente arrojadas al medio ambiente. Su distribución en el medio ambiente es fácil debido a su alta capacidad de volatilización y a su alta resistencia a la degradación. Dada su estabilidad química, se lo puede encontrar fácilmente distribuido a lo largo de cadenas tróficas como por ejemplo en

ecosistemas acuáticos y en pájaros depredadores. De esta manera, en zonas contaminadas, la mayor fuente de HCB en la población general es la dieta diaria. En el hombre y en mamíferos, se localiza en tejido adiposo, en la leche materna y en sangre (Michielsen *et al.*, 1999). Se ha visto también que el HCB produce inmunotoxicidad tanto en animales de experimentación (Michielsen *et al.*, 1999; Mylchreest y Charbonneau, 1997; Schielen *et al.*, 1995) como en humanos (Thomas, 1995).

No existe información acerca de la vida media de eliminación del HCB en humanos. Estudios en animales de experimentación muestran que la excreción del HCB es por vía fecal y el tiempo de vida media varía en los diferentes animales. Así, en ratas y conejos la vida media es de 1 mes, mientras que en monos aumenta a 2 ó 3 años (Rozman *et al.*, 1981). Se ha visto también, en animales, que una parte del HCB ingerido es metabolizado y el resto es almacenado en tejido adiposo o excretado vía fecal. El HCB es metabolizado por el sistema enzimático citocromo P-450, por medio de una dehalogenación oxidativa dando como productos finales mayoritarios pentaclorofenol y 1 - 4 tetraclorohidroquinona (Michielsen *et al.*, 1999 y Barber *et al.*, 2005).

Entre los años 1955 a 1959 en el sudeste de Turquía unas 3.000 – 5.000 personas manifestaron porfiria hepática por el consumo de pan elaborado a partir de semillas de trigo contaminado con HCB. Se comprobó que esta porfiria hepática, también llamada Porfiria Turca, tenía grandes semejanzas a la PCTa. Desde entonces, distintos grupos de trabajo han tratado de inducir porfiria en animales administrándoles HCB. Así, Ockner *et al.* (1961) fueron los primeros en comprobar que el HCB produce, en animales, una porfiria experimental semejante a la PCTa humana aunque con trastornos neurológicos, constituyéndose en un buen modelo experimental para su estudio (De Matteis *et al.*, 1961; Ockner y Schmid, 1961; San Martín de Viale *et al.*, 1970).

Hipótesis

- ✓ La inducción de porfiria por hexaclorobenceno en ratas produce modificaciones conformacionales en la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa, las cuales son responsables de la disminución de su actividad.
- ✓ El hexaclorobenceno administrado a ratas podría producir cambios en los determinantes antigénicos y en la cinética de la reacción de la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa.
- ✓ La enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa presente en invertebrados sería sensible a contaminantes ambientales.
- ✓ El hexaclorobenceno puede ser transferido a través de una cadena trófica produciendo disminución de la actividad de la Uroporfirinógeno decarboxilasa y estrés oxidativo en el último eslabón de la misma.
- ✓ Se propone a la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa como herramienta para la determinación de contaminación ambiental.

Objetivos

1. Determinar si la inducción de porfiria en ratas por hexaclorobenceno produce cambios conformacionales, cambios en los determinantes antigénicos y en la cinética de la reacción en la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa. Estos cambios serían responsables de la disminución de su actividad.
2. Optimizar las condiciones de purificación de la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa hepática proveniente de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno para luego analizar su composición aminoacídica.
3. Determinar la presencia de la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa en cangrejos, lapas y peces antárticos.
4. Determinar si la transferencia de hexaclorobenceno a través de una cadena trófica produce disminución de la actividad de la Uroporfirinógeno decarboxilasa y estrés oxidativo en el último eslabón de dicha cadena.
5. Proponer la medición de la actividad Uroporfirinógeno decarboxilasa, ajustando su condiciones de ensayo óptimas a cada sistema, como indicador de contaminación ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación del extracto enzimático de hígado de rata (UROD-hr) control y porfiricas por hexaclorobenceno (HCB)

1. a. Inducción de la porfiria en ratas

Se trabajó con ratas hembras de la cepa Wistar, alimentadas con Purina dieta 3 y agua *ad libitum*. El tratamiento de los animales fue llevado a cabo en conformidad con las guías internacionales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, USA, 1996, and The Council of the European Communities Directive, 86/609/ECC).

La porfiria en estos animales fue inducida administrándoles diariamente, por sonda gástrica, HCB suspendido en agua (40 mg/ml) con ayuda de Tween 20 0,5 % (v/v), en una proporción de 1 gr/Kg peso. El desarrollo de porfiria fue seguido por la observación espectroscópica de las bandas de absorción de las orinas en la zona visible (2 bandas en el verde y una en el rojo).

Los homogenatos fueron preparados en KCl 0,154 M, 1:5 (P/V) conteniendo PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) y benzamidina 0,2 mM y centrifugados por 20 minutos a 11.000 x g. El sobrenadante se usó como fuente enzimática en el siguiente paso de purificación, tanto en el caso de los hígados normales como en el de los porfiricos. Cada hígado fue procesado individualmente.

1. b. Purificación enzimática de la UROD-hr

1. b. 1. Fraccionamiento salino

El sobrenadante de homogenato fue precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el rango 35-70 % para la normal y para la porfirica en 35-70 % y 40-70 %, analizando la actividad tanto del precipitado como del sobrenadante, previamente dializados.

1. b. 2. Tratamiento con gel de fosfato *en batch*

1. b. 2. a. *Preparación del gel*

150 ml de CaCl_2 0,6 M fueron diluidos en aproximadamente 1.600 ml de agua corriente agregándoles luego, con agitación, 150 ml de Na_3PO_4 0,4 M. En el momento en que

precipitó el gel, se llevó la suspensión a pH 7,4 con ácido acético diluido. Esta suspensión se lavó 3 ó 4 veces, por decantación, con grandes volúmenes de agua corriente (15-20 l). Finalmente el precipitado se lavó con agua destilada, separándolo por centrifugación.

La concentración de gel se expresó en mg/ml de suspensión. Para ello se determinó su peso seco secando un volumen conocido de gel, a 100°C en estufa, hasta peso constante.

1. b. 2. b. *Gel de fosfato en batch*

El precipitado del paso anterior fue resuspendido en el menor volumen posible de buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 5 mM y luego fue pasado a través de una columna de Sephadex G-25 (2,2 cm x 30 cm). Se juntaron los eluidos sulfato-negativos en una probeta y se trataron con gel de fosfato, en las condiciones que se indican a continuación.

La suspensión de gel de fosfato en agua fue centrifugada durante 5 minutos a 2.000 x g, descartando el sobrenadante. Sobre el gel se agregaron los eluidos de las columnas de Sephadex G-25, en una relación 2:1 (p/p) (mg de proteína/gr de gel de fosfato), en los mismos tubos de la centrífuga. La homogeneización se realizó manualmente, en frío, durante 20 minutos. Luego se centrifugó la mezcla de “gel + proteínas” por 5 minutos a 10.000 x g, descartando el sobrenadante. A continuación se realizó la desorción de las proteínas utilizando alícuotas de buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 67 mM pH 6,8, de forma tal que quedara una relación mg de proteína adsorbida : ml totales de eluyente de 30:1 (p:v) (las condiciones óptimas de absorción y desorción habían sido puestas a punto anteriormente en este laboratorio).

1. b. 3. Cromatografía de afinidad

1. b. 3. a. *Columna de afinidad*

La columna de afinidad usada fue AH Sepharose 4B (0,5 cm x 21,5 cm) la cual tenía inmovilizada uro III como ligando. Para su preparación se pesó la cantidad de AH Sepharosa 4B necesaria para dar una relación de 1 gr de polvo seco por 4 ml de gel hinchado. El gel fue lavado con NaCl 0,5 M (200ml/gr) por 15 minutos en un filtro de vidrio. Se removió la sal con agua destilada ajustada a pH 5. El ligando, uro III, se disolvió por separado, en agua destilada al mismo pH. Se agregó la solución del ligando a la del gel, manteniendo el pH en el rango de 4,5-6,0, llegando a una concentración final de 2:1. La mezcla se agitó a temperatura ambiente usando un agitador cabeza-cola. Luego se agregó la carbodiimida, en forma de

polvo, hasta una concentración de 0,1 M. En todo momento se mantuvo el pH en el rango de 4,5-6,0 ajustándolo con NaOH diluido en caso necesario y se mantuvo a 40 °C en oscuridad por 24 horas para completar la reacción. Luego se realizaron 3 lavados sucesivos con 10 volúmenes de buffer Tris- ClH 0,1 M conteniendo 0,5 M ClNa pH 8,1; 10 volúmenes de buffer Acetato de sodio 0,1 M conteniendo 0,5 M NaCl pH 4,6 y 10 volúmenes de agua destilada.

La columna fue equilibrada con buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 5 mM pH 6,8. Una vez sembrada con los eluidos del gel de fosfato (paso anterior) se lavó con el mismo buffer de siembra hasta obtener en el eluido una $A_{280} \leq 0,1$. Luego se conectó un gradiente de KCl (0-0,5 M) en el mismo buffer y leyó la absorbancia de los eluidos a 280 nm para graficar el perfil de elución proteica. Una vez seleccionados los tubos a incubar, se determinó la concentración proteica de los mismos por el método de Bradford. Posteriormente, los tubos correspondientes a cada pico activo se juntaron por separado y se concentraron con $(NH_4)_2SO_4$ en el rango 0-70 % de saturación y se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

1. b. 3. b. *Intercambio aniónico (columna Mono Q)*

El precipitado de los eluidos del gel de fosfato fue resuspendido en buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 5 mM pH 6,8 y desalado por medio de una columna de Sephadex G-25 (2,2 x 30 cm), como se describió anteriormente. Los eluidos de las columnas de Sephadex G-25, libres de sulfatos, se sembraron en una columna de intercambio aniónico (Mono Q HR 5/5) conectada a un aparato de FPLC y previamente equilibrada con buffer bis-Tris propano 20 mM. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente de 0-0,35 M de KCl en el mismo buffer. Los eluidos correspondientes al rango del gradiente entre 0,125-0,210 M de KCl se concentraron con $(NH_4)_2SO_4$ en el rango 0-70 % de saturación y se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

1. b. 4. Tamizaje molecular

1. b. 4. a. *Columna de Sephadex G-75*

Armado de las columnas de Sephadex G-75 y G-25: Se calculó la cantidad de gramos de resina necesaria para obtener columnas de aproximadamente 110 ml de volumen total. El gel seco se hidrató en agua destilada durante 24 horas y luego la suspensión se desaireó

mediante bomba de vacío por 30 minutos. Después de armar las columnas con el volumen deseado de gel, las mismas fueron equilibradas con el buffer de elución.

Antes de pasar las muestras por las columnas de Sephadex G-75 y Superdex 75 (esta última conectada a un aparato de FPLC), se realizó la curva de calibración de cada una de ellas, empleando los siguientes marcadores de pesos moleculares: blue dextran (aprox. 1.000 kDa), albúmina bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo c (12,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa).

Los eluidos correspondientes a los picos de actividad de la columna de afinidad (paso anterior de purificación, 1.b.3.a) que fueron concentrados con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, fueron disueltos en el menor volumen posible de buffer $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,134 M pH 6,8 y sembrados sobre una columna de Sephadex G-75 (1,5 cm x 30 cm) equilibrada y eluída con el mismo buffer. Los eluidos correspondientes a los picos de actividad se guardaron a -20°C hasta su posterior uso.

1. b. 4. b. *Columna Superdex 75*

Los tubos correspondientes al rango del gradiente entre 0,125-0,21 M de ClK de la columna MonoQ (paso anterior de purificación, 1.b.3.b) fueron juntados y sembrados sobre la columna de Superdex 75 equilibrada con buffer $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,134 M pH 6,8, y eluída con el mismo buffer.

2. a. *Preparación del extracto enzimático de hepatopáncreas de cangrejos (UROD-hc)*

Cangrejos machos adultos con un tamaño de caparazón aproximado de 28-30 mm fueron recolectados manualmente en la zona de la playa del Faro San Antonio ($36^\circ 18' \text{ S } 56^\circ 48' \text{ O}$), cercano a la zona sur del estuario del Río de la Plata, Argentina (Figura 5). Se considera que la contaminación en estas zonas es mínima (Comisión Administradora del Río de la Plata 1989, Colombo *et al.*, 2003). Una vez en el laboratorio, los animales fueron mantenidos en contenedores de vidrio con agua salina artificial (2 ‰ de salinidad, sal HW-Marinemix adicionada al agua previamente dechlorada). El agua fue cambiada dos veces a la semana, después de alimentar a los animales (Maciel *et al.*, 2004). Los animales fueron mantenidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, con un fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad (Figura 6).

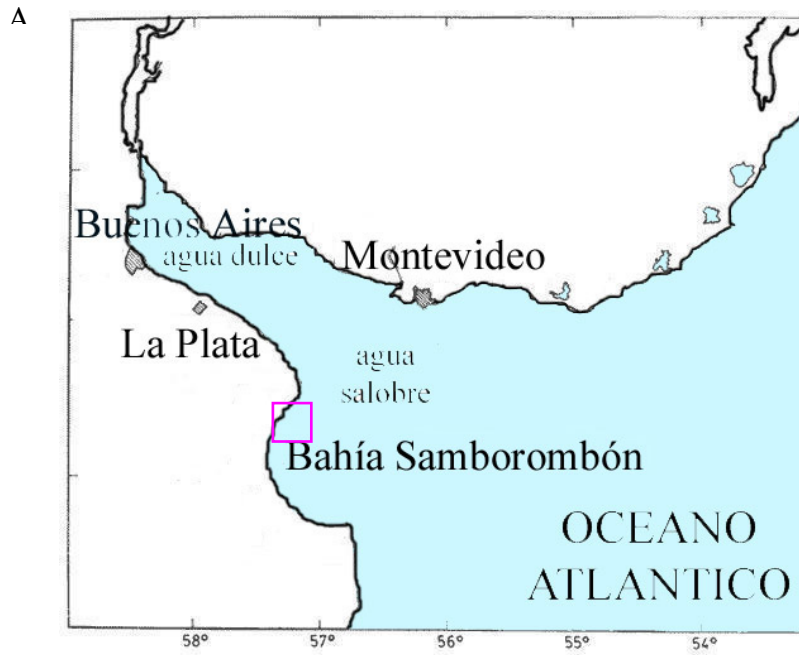


Figura 5: A. Mapa de la zona de recolección de los cangrejos, playa del Faro San Antonio (zona recuadrada), Bahía Samborombón, Provincia de Buenos Aires. B. Detalle del cangrejal.

Los cangrejos fueron sacrificados por punción del ganglio torácico. Luego se les removió el caparazón y el hepatopáncreas, así visible, fue disectado, pesado y homogeneizado. Para los ensayos de caracterización enzimática se reunieron de 5 a 7 hepatopáncreas de cangrejos. En cambio, para los ensayos de contaminación con HCB se trabajó cada cangrejo por separado. Una vez aclimatados por 15 días a las condiciones de laboratorio (luz y temperatura), los cangrejos fueron distribuidos individualmente, al azar, en dos lotes: control y HCB. Los animales del lote control fueron alimentados con alimento balanceado de conejo embebido con una suspensión de algas verdes *Chlorella kessleri* crecidas por tres días en un medio BBM (medio basal de Bold para microalgas). Los animales del lote HCB fueron alimentados con el alimento balanceado de conejo embebido en una suspensión de las mismas algas verdes pero crecidas por 3 días en el medio BBM adicionado con HCB (Muñoz *et al.*, 1996; Kong *et al.*, 1998; Juárez, 2003) (Figura 6). Estas algas fueron cultivadas y cedidas gentilmente por la Dra. Juárez, del Departamento de Biología y Biodiversidad, FCEyN, UBA.

Todos los ensayos, tanto los de puesta a punto de la actividad UROD como los de otras actividades enzimáticas, se realizaron sobre sobrenadantes de 11.000 x g de homogenato de hepatopáncreas.



Figura 6: Distribución de los animales en contenedores de vidrio por separado, dentro de la cámara con control de luz (fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad) y temperatura (20 ± 2 °C).



2. b. Purificación enzimática de la UROD-hc

A partir de hepatopáncreas de cangrejo se prepararon homogenatos en KCl 0,154 M, 1:5 (p/v) los cuales contienen los inhibidores de proteasas PMSF 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM. Los homogenatos así preparados se centrifugaron por 20 minutos a 11.000 x g y los sobrenadantes fueron usados como fuente enzimática.

2. b. 1. Fraccionamiento salino y columna de tamiz molecular

El sobrenadante de 11.000 x g se precipitó con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 35-70 % saturación. El precipitado fue resuspendido en el menor volumen posible de buffer $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 mM pH 6,8, conteniendo EDTA 0,1 mM, PMSF 0,5 mM, y benzamidina 0,2 mM. La solución resultante se sembró sobre una columna Superdex 75, conectada a un FPLC, se equilibró y se eluyó con el mismo buffer (pero sin PMSF).

3. Preparación del extracto enzimático de glándula digestiva de lapas antárticas (UROD-gdl)

Las lapas antárticas, *Nacella concinna* (Patellidae), fueron recolectadas a mano, de la costa rocosa cercana a la estación antártica argentina Jubany en las islas King George, Islas

Shetland del Sur (Figura 7). Los animales fueron mantenidos en acuarios de 20 l con agua de mar aireada a $1 \pm 0,5$ °C y fotoperíodo natural (Ansaldo *et al.* 2005).

Para los ensayos de caracterización enzimática se juntaron las glándulas digestivas de 5-7 lapas. En tanto que, para los ensayos de contaminación con Diesel, se trabajó cada lapa por separado. Una vez aclimatadas por una semana a las condiciones de laboratorio de la base, las lapas fueron distribuidas al azar en tres grupos, cada uno en un acuario por separado: control, 0,05% diesel y 0,1% de diesel. El diesel fue agregado al agua de los acuarios y preparado según Cajaraville *et al.* (1992). Luego de 24 y 48 horas las lapas fueron sacrificadas y la glándula digestiva congelada a -20 °C para su transporte hacia nuestro laboratorio, para la posterior medición de la actividad UROD.

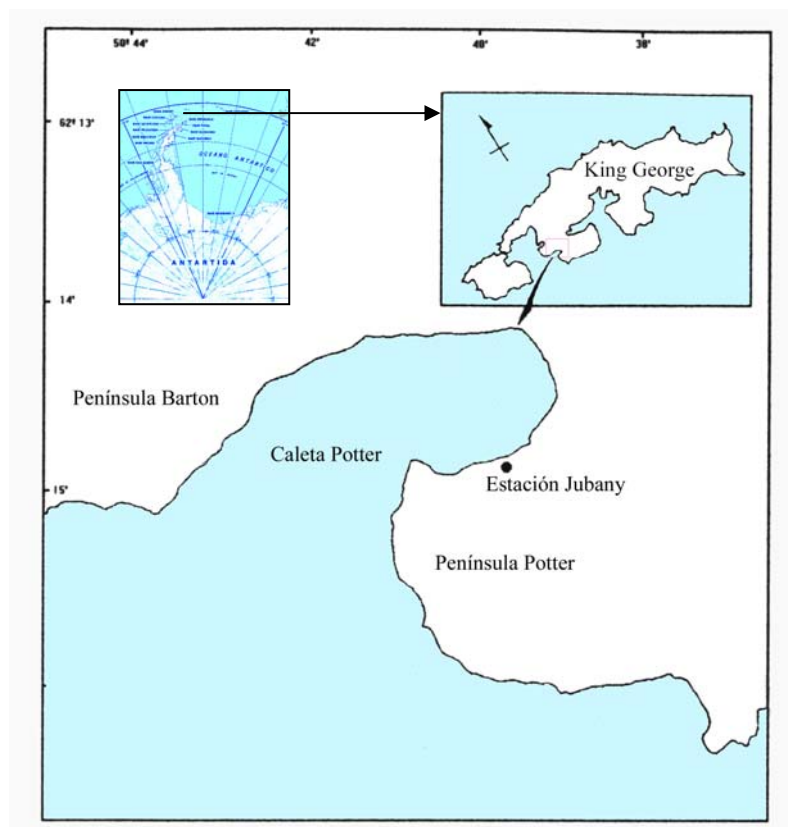


Figura 7: Mapa de la isla King George, perteneciente a las islas Shetland del Sur y ampliación de la zona de recolección de las lapas, cercana a la estación antártica argentina Jubany.

Los ensayos, tanto de puesta a punto como de medición de la actividad UROD de lapas controles y tratadas se realizaron sobre muestras de sobrenadante de 11.000 x g de homogenato preparado según se describe a continuación.

3. a. Purificación enzimática de la UROD-gdl

A partir de la glándula digestiva de las lapas antárticas se preparó un homogenato en KCl 0,154 M, 1:5 (p/v) conteniendo PMSF 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM como inhibidores de proteasas. El homogenato así preparado fue centrifugado por 20 minutos a 11.000 x g y el sobrenadante se usó como preparación enzimática.

4. Determinación de la actividad UROD.

4. a. Preparación del urogen para ser usado como sustrato de la UROD

Se partió de uroporfirina (uro) libre o de uro metil éster. En este último caso se saponificó el éster con HCl 25 %, dejándolo 24 horas en oscuridad. Luego se ajustó al pI (\approx pH 4,5) con NaOH, se dejó precipitar la porfirina, manteniéndola en frío y oscuridad, hasta que se observa un precipitado amarronado bien definido. El precipitado se lavó con agua ajustada al pH de precipitación y se separó por centrifugación a 7.000 x g por 10 minutos. Luego de extraer el sobrenadante con pipeta, el precipitado se colocó en un desecador al vacío, hasta su completo secado.

La uro libre, disuelta en NaOH 0,025 N y colocada en un tubo con tapa esmerilada, fue puesta en contacto con amalgama de sodio al 3 %, en una proporción de 1 gr/ml, en oscuridad y bajo luz roja. Se agitó hasta que la solución no presentó fluorescencia bajo la luz UV, se filtró a través de una placa filtrante y la solución final se ajustó a pH 7,0 con H₃PO₄ 40 % (p/v). Todas estas operaciones se realizaron bajo flujo de nitrógeno para minimizar la reoxidación del porfirinógeno. En estas condiciones estuvo lista para ser usada como sustrato.

Cuando se usó pentagen como sustrato (por ejemplo en los ensayos de competencia, Capítulo I) el procedimiento para obtener el sustrato reducido a partir del oxidado fue el mismo.

4. b. Valoración de la concentración de sustrato incubado

Debido a la pérdida por filtración y a la dilución al llevar a pH, la solución del sustrato debe revalorarse, para utilizar su valor en los cálculos de actividad. A tal fin, una alícuota de la solución remanente se diluyó con HCl 5 % y se dejó reoxidar al aire y a la luz hasta el día siguiente. Al cabo de este tiempo, se ajustó a un volumen definido en matraz aforado y se determinó la longitud de onda del pico Soret, característico de cada porfirina. Para ello se hizo un barrido del espectro entre 400 y 410 nm, se determinó la concentración

espectrofotométricamente, leyendo la absorbancia a esa longitud de onda, que para la uro fue a 405,5 y para la penta a 402,0 nm.

4. c. Condiciones de incubación

En los ensayos de caracterización se tomó como criterio, salvo indicación, el incubar la máxima cantidad de enzima que permita el sistema, en tanto que para los eluidos de columnas se aplicó aproximadamente igual cantidad de proteínas en cada ensayo. En todos los casos se incubó, en tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml: hasta 0,4 ml de muestra, GSH 1 mM, EDTA 0,1mM, buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 67 mM pH 6,8, y el sustrato reducido en una relación urogen III/proteína particular para cada etapa de purificación, en un volumen total de 1 ml. Las incubaciones se realizaron a 37° C durante 20 minutos, en oscuridad y aerobiosis pero con cámara de aire pequeña y sin agitación, lo que minimiza la redisolución de oxígeno (recordar que todos los pasos previos se realizaron bajo nitrógeno). Finalizada la reacción se colocaron los tubos en hielo, permitiendo la entrada de oxígeno a los mismos y se desproteinizaron con HCl concentrado en c.s.p. 5 % de concentración final. Una vez precipitadas las proteínas y oxidados los porfirinógenos, los tubos se centrifugaron a 11.000 x g y se trabajó el sobrenadante de dos formas: a) se recogió el sobrenadante en un tubo limpio y seco, el cual fue guardado en el freezer hasta la cuantificación de porfirinas libres por HPLC en fase reversa, o b) el sobrenadante se pasó a un erlenmeyer, el cual se puso en un desecador con vacío hasta llevar el extracto a sequedad, para posteriormente esterificar las porfirinas y determinar los metil éster por HPLC en fase directa.

4. d. Esterificación y pasaje a cloroformo

Sobre la muestra seca de porfirinas libres, se agregó una mezcla de MeOH: H_2SO_4 (19:1), dejando la preparación durante 24-48 horas en oscuridad, a temperatura ambiente, para que ocurra la esterificación.

A la muestra suspendida en la mezcla esterificante, se le agregó una alícuota de cloroformo y luego se llevó el pH a 4,5 con acetato de sodio saturado. Se separó la fase clorofórmica y se continuó extrayendo la fase acuosa hasta fluorescencia negativa bajo luz UV. Los extractos clorofórmicos, libres de agua (para ello se rompe la emulsión con NaCl 7 % y se filtra la muestra a través de papel embebido en cloroformo), se concentraron a baño de María y presión reducida, por medio de bomba de agua, hasta sequedad.

4. e. Medición de los productos de la reacción

4. e. 1. Medición de porfirinas metil-éster por HPLC en fase directa

El extracto de porfirinas de cada incubado se disolvió en cloroformo y se sembraron 25 µl en una columna de fase directa de µPoracyl anexada a un aparato de HPLC, con integrador incorporado. Se usó un detector de absorbancia visible con filtro a 405 nm. Las muestras se eluyeron con acetato de etilo:n-heptano (50:50, v/v) a un flujo de 1 ml/min. Para realizar los cálculos de los nmoles detectados se utilizaron los coeficientes determinados previamente en este laboratorio (Billi de Catabbi *et al.*, 1991), considerando la concentración de porfirinas como el área bajo la curva de retención vs nmoles de porfirinas. Los valores para cada uno de los sustratos y producto final son: uro 0,77; hepta 1,05; hexa 1,0; penta 1,1 y copro 1,25 nmoles/área.

4. e. 2. Medición de porfirinas libres en HPLC en fase reversa

El sobrenadante de porfirinas libres se sembró en una columna de fase reversa de µBondapak C₁₈ anexada a un aparato de HPLC, con integrador incorporado. Se usó un detector de fluorescencia con longitud de onda de excitación a 404 nm y de emisión a 618 nm. Las muestras se corrieron en buffer acetato de amonio 1 M pH 5,16 y se eluyeron a un flujo de 1 ml/min, con un gradiente de acetonitrilo de 10% - 30% (Lim *et al.*, 1983). Se usó el siguiente programa:

Tiempo (min)	Buffer	Acetonitrilo
0	90	10
15	70	30
25	70	30

Para realizar los cálculos de los nmoles detectados se utilizaron los coeficientes determinados previamente en este laboratorio, considerando la concentración de porfirinas como el área bajo la curva de retención vs nmoles de porfirinas. Los valores para cada uno de los sustratos

y producto final son: uro $4,8 \times 10^{-4}$, hepta $4,7 \times 10^{-4}$ hexa $3,4 \times 10^{-4}$, penta $3,4 \times 10^{-4}$ y copro $4,4 \times 10^{-4}$ nmoles/área.

5. Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron según el método de Bradford (1976) usando como patrón una solución de albúmina bovina de 0,1 mg/ml.

6. *Electroforesis*

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, en minigeles armados en celdas de $10 \times 10 \times 0,15$ cm según lo descrito por Schägger *et al.*(1987) para proteínas de bajo peso molecular. La concentración total de acrilamida en el gel separador fue del 10 % y en el gel concentrador del 4 %. Las muestras se trataron con igual volumen de buffer de tratamiento de la muestra (Tris- ClH 0,125 M, glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (p/v)) y se calentaron a baño de María por 3 minutos. Las corridas se realizaron a 80 V durante el pasaje de la muestra por el gel concentrador y de 100 V en el separador. Los geles fueron teñidos con una solución conteniendo azul brillante de Coomassie R-250 al 0,4 % (p/v), metanol al 45 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v). Para la posterior decoloración se usó una solución acuosa de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

7. Inmunodetección por *Western blot*

Las proteínas se transfirieron de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa, en una celda BIO-RAD, con ánodo de titanio recubierto de platino, para transferencias semi-húmedas. Las transferencias se llevaron a cabo en buffer Tris-glicina pH 9,2, durante 15 a 30 minutos, a un voltaje constante de 15 V y una corriente límite de 5,5 mA/cm².

Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios inespecíficos con 5% de leche descremada y se mantuvieron toda la noche a 4°C. Luego se incubaron durante dos horas y media con el primer anticuerpo, en buffer PBS-Tween (buffer fostato salino con Tween 20, 0,1 % (v/v) con agitación). Se realizaron una serie de cinco lavados con buffer PBS-Tween y luego se incubaron por una hora, con agitación, con el segundo anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con biotina (1:1000) (SIGMA). Se repitieron los lavados y se volvió a incubar por una hora con el complejo ExtrAvidina conjugada a peroxidasa (SIGMA). El

revelado se realizó con DAB (diaminobenzidina), sustrato de peroxidasa (SIGMA FAST™). Para detener la reacción se lavó con agua destilada.

El anticuerpo anti UROD de rata en conejo fue obtenido inoculando un conejo con una preparación enzimática de UROD proveniente del pico de mayor actividad de la segunda columna de Sephadex G-75 (según se describe a continuación) que fue homogéneo en SDS-PAGE. La dilución del primer anticuerpo fue dosada por el método de Elisa indirecto (1:500).

8. Obtención de anticuerpos anti-UROD de rata en conejo

Para obtener anticuerpos anti-UROD, se inmunizó un conejo macho por vía subcutánea con una preparación de enzima/adyuvante de Freund (incompleto, exceptuando la primer inyección) (1:1, v/v 1,0 ml final). La preparación enzimática de UROD provenía del pico de mayor actividad de la segunda columna de Sephadex G-75 que contenía 120 µg de proteína / ml. Se repitió la operación a los dos meses. Al mes y medio de la última inoculación se extrajo una muestra de sangre para verificar la presencia de anticuerpos. Para este fin se realizaron una serie de ensayos de migración bidireccional sobre porta objetos (Ouchterlony), los cuales dieron positivos. Esto corroboraba la presencia de anticuerpos anti UROD de rata en la sangre del conejo. Los anticuerpos fueron detectados por ensayos de migración bidireccional (Ouchterlony) y dosados por el método de Elisa indirecto (puesto a punto en el laboratorio). Al alcanzar un título máximo de anticuerpo se extrajo sangre total por punción cardíaca, sacrificando finalmente al animal. La sangre se incubó a 37°C por una hora y luego se mantuvo a 4°C 30 minutos. Una vez formado el coágulo, se centrifugó a 2.000 rpm por 15 minutos y se separó el sobrenadante (suero límpido). El suero se guardó congelado, fraccionado en alícuotas de 1 ml para ser usado como anticuerpo policlonal anti UROD en estudios posteriores.

9. Determinación del contenido de HCB

Se determinó el contenido de HCB en muestras de hepatopáncreas de cangrejos alimentados con algas controles y contaminadas con HCB.

Las muestras de los extractos de hepatopáncreas, previo al análisis por CGL, fueron evaporadas y vueltas a suspender en DMSO (dimetilsulfóxido), para purificarlas a través de una columna de florisil, equilibrada con DMSO y eluída con hexano (para eliminar los restos lipídicos).

El contenido de HCB se determinó por cromatografía gas-líquido (CGL) en extractos hexano-éter obtenidos a partir de hepatopáncreas de cangrejos. Para tal fin se usaron homogenatos de hepatopáncreas de *C. granulatus* en agua (1:10) (Lamparski *et al.*, 1980). Los homogenatos fueron tratados con una solución H₂SO₄ 50 % (v/v), en una proporción de 3:1 antes de la extracción. A continuación se realizaron dos extracciones consecutivas con una mezcla *n*-hexano - dietil éter (70:30). La fase orgánica fue transferida a un tubo de vidrio para luego ser inyectada en el cromatógrafo gaseoso (GLC) o guardada a -20 °C para su posterior determinación.

La separación y determinación de concentración de HCB fueron realizadas, por CGL con un equipo Hewlett-Packard modelo 5840 A, equipado con un detector con captura electrónica ⁶³Ni. La columna de gas, de 2 m largo x 2 mm de diámetro interno, fue empaquetada con 3 % OV-17 en Chromosorb WAW/DMCS, 80-100 mesh. Las condiciones de operación fueron: temperatura de la columna 175 °C, temperatura del inyector 300 °C, temperatura del detector 250 °C, velocidad de transporte de nitrógeno 40 ml/min. Los cromatogramas fueron analizados usando un integrador.

10. Determinación de glutatión (GSH)

Se determinó el contenido de GSH en las muestras de hepatopáncreas de cangrejos por el método de Anderson (1985) con algunas modificaciones. Se incubaron 100 µl del sobrenadante de 11.000 x g del homogenato con 75 µl de ácido sulfosalicílico por 10 minutos. La mezcla fue centrifugada por 15 minutos a 8.000 x g. Luego se incubaron 130 µl del sobrenadante con 970 µl de una mezcla de reacción conteniendo: buffer K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,143 M pH 7,5 (conteniendo EDTA 6,3 mM) y ácido 5, 5'- ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 6 mM. Los niveles de GSH fueron estimados espectrofotométricamente, realizando lecturas de absorbancias del TNB a 412 nm. Se realizó una curva de calibración desde 0 a 50 nmoles de GSH. Los resultados fueron expresados como nmol de grupos tioles (equivalentes de GSH) por gramo de tejido.

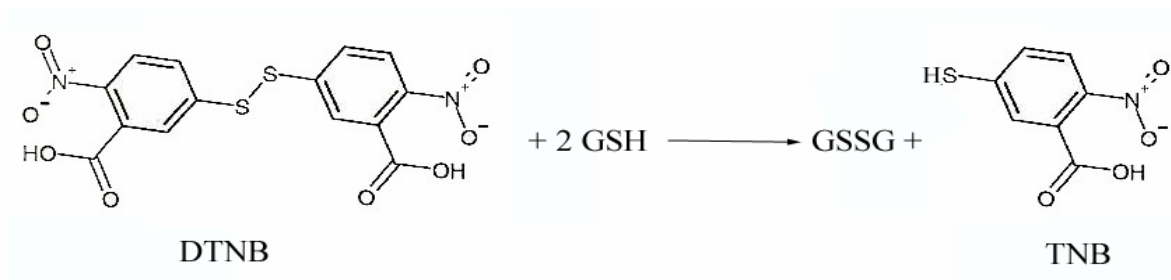
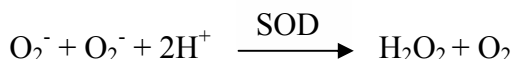


Figura 8: Reacción de reducción del DTNB por GSH para dar un compuesto coloreado (TNB) que absorbe a 412 nm.

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad SOD se determinó en las muestras de hepatopáncreas de cangrejos alimentados con algas libres y contaminadas con HCB, por el método de Beauchamp y Fridovich (1971). La mezcla de ensayo contenía: 10, 12,5, y 15 μ l de muestra (sobrenadante 11.000 x g), EDTA 0,1 mM, DL-metionina 13 mM, 75 μ M NBT, riboflavina 2 μ M en 50 mM de buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,9 en un volumen final de 3 ml. Las muestras se expusieron por 10 minutos una luz de dos tubos fluorescentes de 20W, colocados a 20 centímetros de distancia, y luego se mantuvieron en oscuridad hasta el momento de leer su absorbancia a 560 nm. Los resultados fueron expresados como unidades enzimáticas por mg de proteínas. Se define una unidad SOD como la cantidad de enzima que es capaz de inhibir un 50 % la velocidad de oxidación de la riboflavina.



12. DETERMINACIÓN DE MALÓNDIALDEHIDO (MDA)

Se determinó el MDA como índice de peroxidación lipídica en las muestras de hepatopáncreas de cangrejos alimentados con algas control y contaminadas con HCB.

El MDA fue determinado por el método del TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA)). La reacción se realizó usando como fuente enzimática sobrenadante de 11.000 x g de hepatopáncreas de *C. granulatus* (Beuge y Aust, 1978). La solución de TBA contiene: TBA 0,375 % p/v, TCA 15 % p/v y HCl 0,25 N. Esta solución debe calentarse levemente para ayudar a la disolución del TBA. Se le agrega hidroxibutileno butilado (BHT) 680 μ M, para prevenir la formación de radicales adicionales durante el ensayo. La incubación se realiza a 95-100 $^{\circ}$ C por 15 minutos, luego se enfrían los tubos en hielo y se

centrifugan a 10.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se lee a 535 nm. La concentración de reactivos que reaccionan con el TBA fue estimado usando el coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA ($156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto del control.

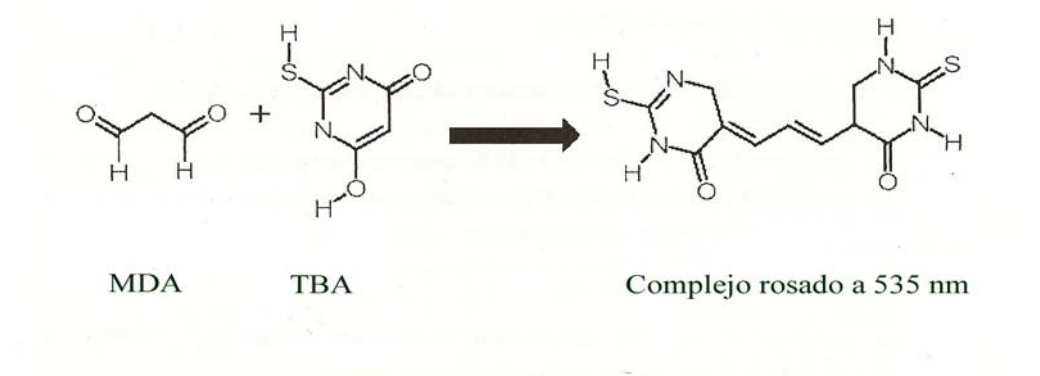


Figura 9: Reacción de MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar un complejo rosado que absorbe a 535 nm.

15. Análisis estadístico de los resultados

Los valores fueron expresados como la media \pm DE. El análisis estadístico entre los grupos de cangrejos tratados con algas libres y contaminadas con HCB o dentro del grupo fue llevado a cabo usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida del test de Tukey's post hoc. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$.

Capítulo I:
Estudios comparativos entre la UROD
proveniente de ratas normales y porfíricas por
hexaclorobenceno

I. 1. Introducción

Numerosos grupos de investigación se han abocado al estudio de la UROD proveniente de diferentes fuentes: levaduras (Felix y Brouillet, 1990), algas (Juknat *et al.*, 1989, Juárez, 2003), tabaco y cebada (Chem y Miller, 1974; Mock *et al.*, 1995), aves (Kawanishi *et al.*, 1983; Tomio *et al.*, 1970) y mamíferos (Phillips *et al.*, 1997; Ríos de Molina *et al.*, 1999). En todos estos casos se ha establecido que existe una única enzima que cataliza las cuatro descarboxilaciones desde el urogen hasta coprogen (figura 4 en Introducción General). El mecanismo de descarboxilación de la UROD es todavía desconocido, sin embargo estudios cinéticos tempranos sugerían la existencia de diferentes sitios activos para la primera y segunda etapa respectivamente (de Verneuil *et al.*, 1980; de Verneuil *et al.*, 1983; Straka y Kushner 1983; Tomio *et al.*, 1970.). Estos resultados son controvertidos ya que no se encontraron dominios repetitivos en la secuencia aminoacídica. García *et al.*, (1973) realizaron estudios con diferentes sustratos y observaron que tanto el urogen como el pentagen inhiben su propia descarboxilación y, además, el heptagen inhibe la descarboxilación del urogen, mientras que el urogen inhibiría la del heptagen.

Como se comentó en la Introducción General, estudios más recientes hablan de la UROD como un homodímero con una constante de disociación (K_d) de 0,1 μM , determinada por análisis de equilibrio de sedimentación (Phillips *et al.*, 1997). Por estudios de cristalografía se ha visto que el sitio activo de uno de los monómeros está adyacente al del otro monómero en el dímero, creando entre los dos un único sitio activo. Esto crearía un espacio suficiente para acomodar dos moléculas de sustrato o albergar intermediarios de la reacción entre dichos monómeros (Whitby *et al.*, 1998).

A partir de los incidentes ocurridos en Turquía (comentados en la Introducción General), distintos grupos de trabajo han tratado de inducir porfiria en animales administrándoles HCB. Trabajando con este objetivo, Ockner y colaboradores, en 1961, fueron los primeros en comprobar que el HCB produce en animales una porfiria experimental semejante a la PCT humana, pero con trastornos neurológicos, constituyéndose así en un buen modelo experimental para su estudio (De Matteis *et al.*, 1961; Ockner y Schmid 1961; San Martín de Viale *et al.*, 1970).

Se sabe que el HCB se metaboliza vía tres caminos distintos: un camino oxidativo que da lugar a compuestos fenólicos, un camino de conjugación con glutatión que lleva a la

formación de tiofenoles y tioanisoles y un camino con menor rendimiento que produce bencenos clorinados. La metabolización ocurre principalmente en el hígado, aunque Mehendale *et al.*, 1975 también la detectaron en preparaciones de pulmón, riñón e intestino delgado (Newhook y Dormer, 1997 y citas de allí). Sin embargo, aún se plantea si el HCB actúa directamente, a través de alguno de sus metabolitos, por la generación de radicales libres o por combinación de algunas de estas vías. Se ha visto que tanto el HCB como la tetraclorodibenzodioxina o TCDD (otro hidrocarburo aromático polihalogenado, HAPs) inactivan a la enzima, disminuyendo su actividad enzimática sin alterar la cantidad de proteína inmunorreactiva. Algunos autores (Billi de Cattabi *et al.*, 1994; Ríos de Molina *et al.*, 1980) proponen la presencia de un inhibidor, en las preparaciones provenientes de ratas porfíricas por HCB que se pegaría a la UROD disminuyendo así su actividad enzimática. También se ha visto que la reacción antígeno-anticuerpo no es afectada por la presencia de altas concentraciones de porfirinas presentes en los homogenatos de los animales tratados (Elder y Sheppard, 1982). Estos últimos autores mostraron que los homogenatos provenientes de los animales tratados con HCB tienen material que compite con la enzima activa de homogenatos controles para la captación del sustrato; este material podría ser enzima con poca actividad o no activa. Se ha propuesto que los HAPs producirían alguno de los siguientes efectos: a) inhibición directa de la UROD por los HAPs (Kawanishi *et al.*, 1981), b) inactivación de la enzima por los metabolitos de los HAPs (Sinclair y Granick 1974), c) inactivación de la UROD por radicales de oxígeno generados por la acción tóxica del hierro dependiente de HAPs (Sweeney y Jones, 1981) y/o d) interferencia en la síntesis de la UROD (Elder y Sheppard 1982).

En el presente capítulo, presentaremos los resultados de un estudio comparativo de las propiedades de la enzima de ratas intoxicadas con HCB respecto del control, proveniente de ratas sin tratamiento.

Entre estas propiedades estudiamos la existencia de uno o más sitios activos en la UROD, usando un método de competencia entre sustratos (Cárdenas 2001; Chevillard *et al.* 1993). Este es un método cinético que ayuda a establecer cuándo dos reacciones catalizadas por la misma enzima están ocurriendo en el mismo o en distinto sitio activo. Se sabe que el tratamiento con HCB modifica las propiedades fisicoquímicas de la enzima (Chaufan *et al.*, 2001) y por lo tanto podría perturbar la interacción entre los sitios activos de los monómeros. Por esta razón se quiso estudiar el número de sitios que intervienen en la decarboxilación catalizada por la enzima proveniente de ratas normales y de ratas tratadas con HCB, usando

como sustrato el urogen (primer sustrato) y el pentagen (último sustrato) lo cual contribuiría también a aclarar si el mecanismo de decarboxilación para estos dos sustratos extremos es el mismo o no.

I. 2. Resultados

I. 2. 1. Actividad UROD

En primer lugar decidimos poner a punto las determinaciones de la actividad UROD en muestras provenientes de ratas normales y porfíricas por HCB. A tal efecto realizamos las determinaciones que se describen a continuación.

I. 2. 1. a. Estudios de saturación

Para poder determinar la concentración de sustrato y la concentración de proteína, óptimos, a ser usados, realizamos estudios de saturación, tiempo y concentración proteica sobre la UROD de "muestras provenientes de ratas normales" y "muestras provenientes de ratas porfíricas por HCB" (UROD_N y UROD_P respectivamente).

En todos los casos se mide, como actividad enzimática, la primera etapa de decarboxilación del urogen, la cual representa la formación de todos los intermediarios.

La curva de la actividad en función de la concentración de sustrato, en el caso de la UROD_N, mostró un aumento de la actividad específica, alcanzando una meseta con una concentración de sustrato urogen III 14 μM . Con este resultado se asume que se llega a la velocidad máxima (V_{max}) en este sistema a esa concentración de sustrato (Figura 1). En el caso de la UROD_P, se puede ver que no se llega a un valor de V_{max} en el rango de concentración de sustrato empleada (hasta urogen III 24 μM) (Figura 1) aunque estaría funcionando a una velocidad cercana a la V_{max} .

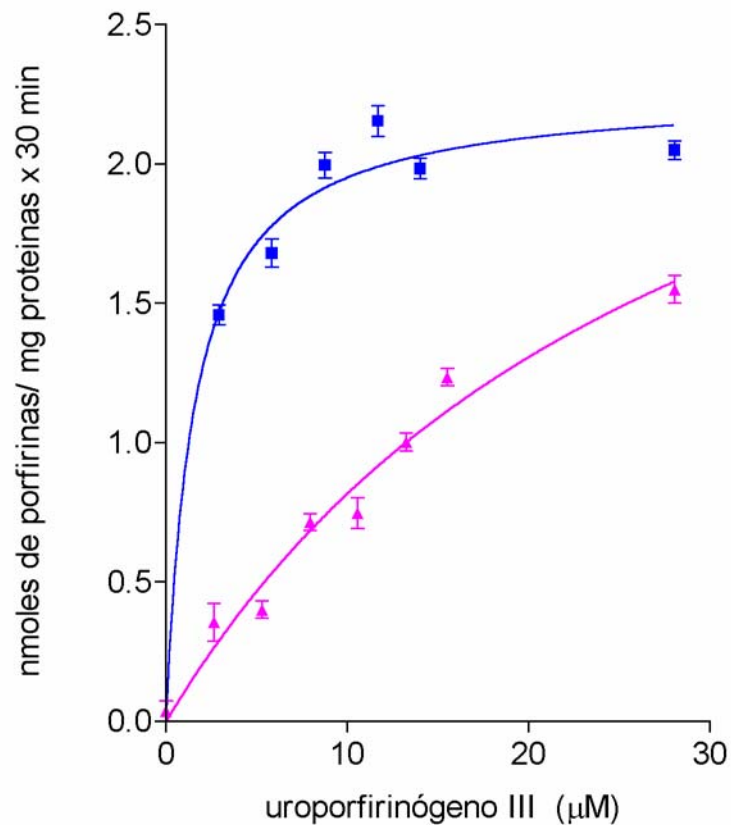


Figura 1: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad UROD. Los resultados se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos, usando como fuente enzimática eluïdos de gel de fosfato y urogen III como sustrato. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formados por mg de proteínas en 30 minutos. La línea azul representa la actividad de la UROD_N y la línea rosa la actividad de la UROD_P.

Los estudios de la actividad UROD en función de la concentración de proteínas, como se observa en la figura 2, mostraron un comportamiento dual. La actividad aumentó hasta concentraciones de proteínas de 0,3 mg/ml. A mayores concentraciones de proteínas ambas preparaciones sufren una brusca caída de su actividad. Sobre la base de estos resultados se decidió analizar este efecto mediante el gráfico de actividad en función de la relación sustrato/proteína, para poder determinar una relación para la cual la velocidad de la reacción sea constante en un rango relativamente amplio (Figura 3). De esta manera se encuentra que la relación para la UROD_N es de 25 nmol de urogen III/mg de proteína. En el

caso de la UROD_P no se llega a un valor constante por lo cual decidimos aplicar la misma relación que en la normal, para estar en las mismas condiciones de relación sustrato/proteína que esta última y en una zona muy cercana a la saturación.

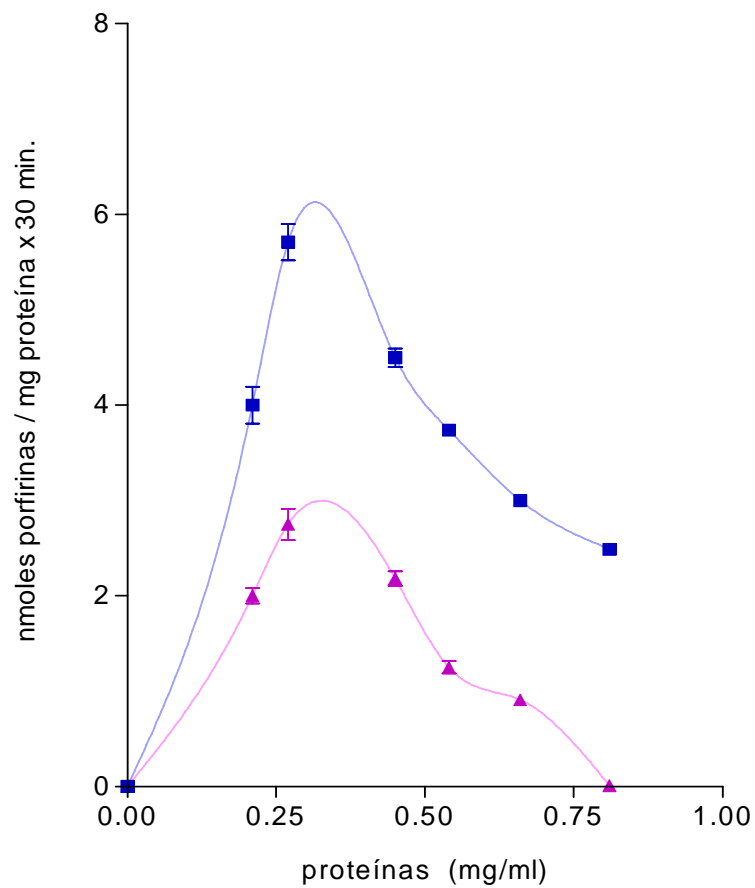


Figura 2: Efecto de la concentración de proteína incubada sobre la actividad UROD. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1. La línea azul representa la actividad de la UROD_N y la línea rosa la actividad de la UROD_P.

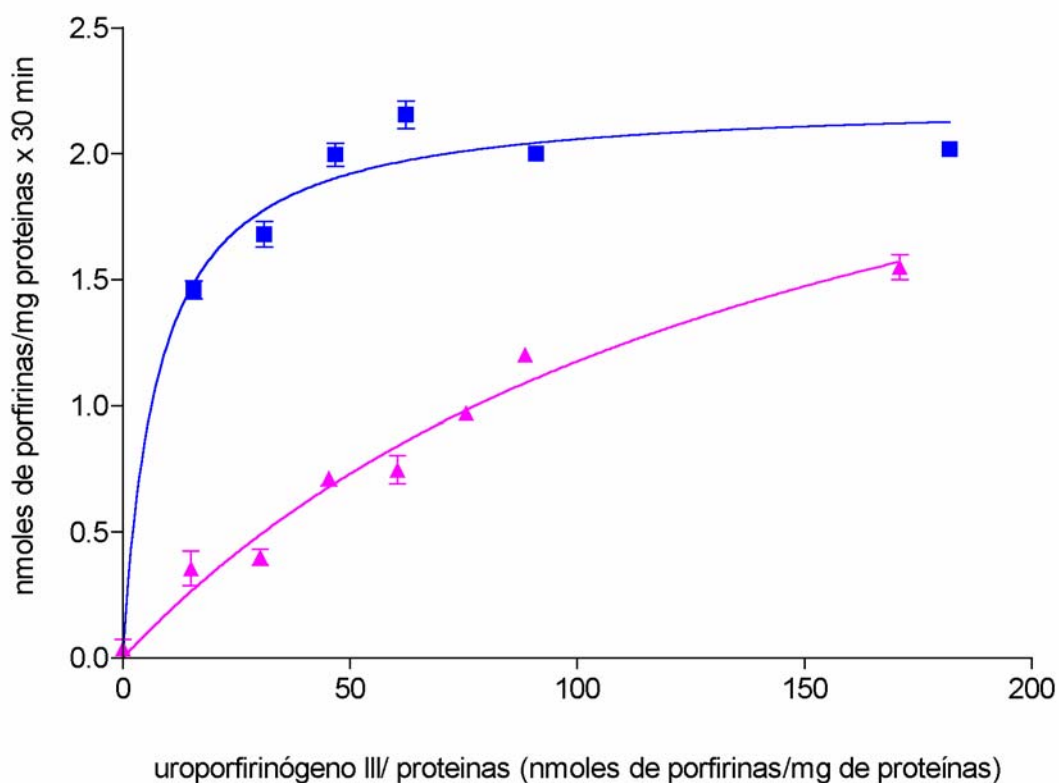
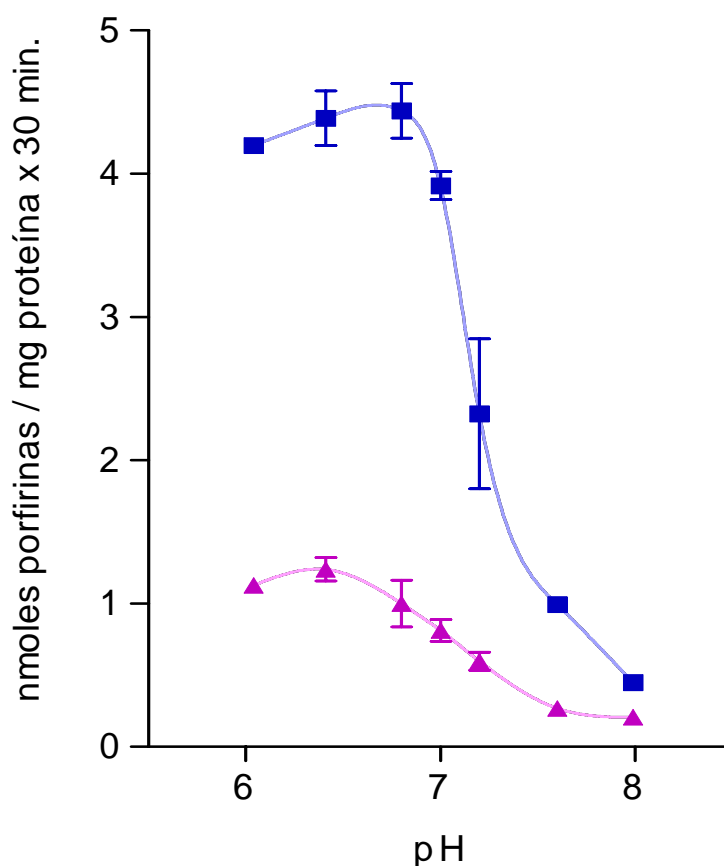


Figura 3: Gráfico de actividad UROD en función de la relación sustrato/proteína. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1. La línea azul representa actividad de la UROD_N y la línea rosa la actividad de la UROD_P.

Se realizaron ensayos de actividad enzimática a distintos tiempos de incubación (0 - 30 minutos) y observamos que tanto en el caso de la UROD_N como de la UROD_P las velocidades fueron constantes en el rango de tiempo empleado (datos no mostrados).

I. 2. 1. b. *Efecto del pH y la temperatura de incubación sobre la actividad UROD de ambas fuentes.*

Para poder determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática y comparar la respuesta de ambas preparaciones, realizamos incubaciones a diferentes valores de pH, en el



rango pH 6 – pH 8 (Figura 4). La curva de la UROD_P mostró un máximo a pH 6,4 mientras que la UROD_N tuvo su máxima actividad a pH 6,8

Figura 4: Efecto del pH sobre la actividad UROD. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1. La línea azul representa la actividad de la UROD_N y la línea rosa la actividad de la UROD_P.

Por otra parte realizamos ensayos de actividad enzimática a distintas temperaturas, entre 28 - 74 °C (Figura 5). Estos estudios mostraron que existió un aumento de la actividad enzimática para ambas preparaciones en función de la temperatura hasta los 50 °C y luego hubo una fuerte disminución a 74 °C. La pendiente (entre 50 y 70 °C) fue diferente para cada una de las preparaciones, siendo más pronunciada en el caso de la UROD_N.

Según la ecuación de Arrhenius

$$\log K = C - E_a / (2,303 \times R \times T)$$

donde K es igual a $1/v_i$ y R es una constante igual a 8,3149 J/mol °K. De esta manera se despeja la E_a (energía de activación).

Los valores de E_a calculados a partir de la ecuación de Arrhenius fueron 8,272 kJ/mol y 10,854 kJ/mol para la UROD_N y la UROD_P, respectivamente (Figura 6).

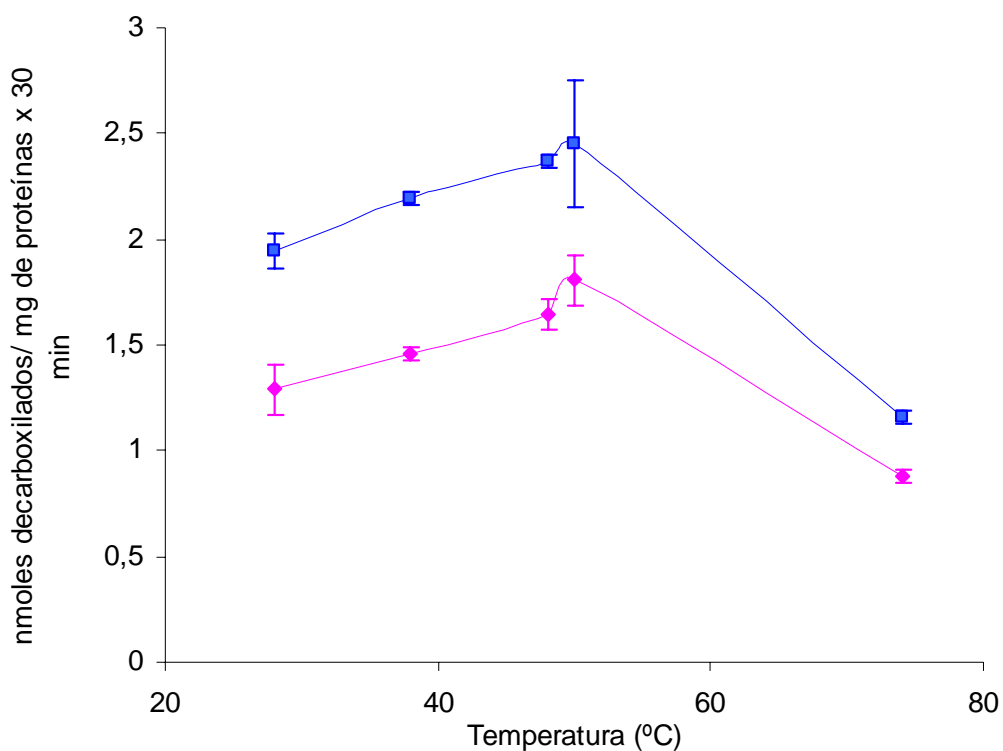


Figura 5: Efecto de la temperatura sobre la actividad UROD. La UROD_N (línea azul) y la UROD_P (línea rosa) fueron incubadas a 28, 38, 48, 50 y 74 °C como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1. Se usaron como preparaciones enzimáticas los eluidos de gel de fosfato. La actividad fue expresada como los nmoles de urogen III decarboxilados por mg de proteína en 30 minutos.

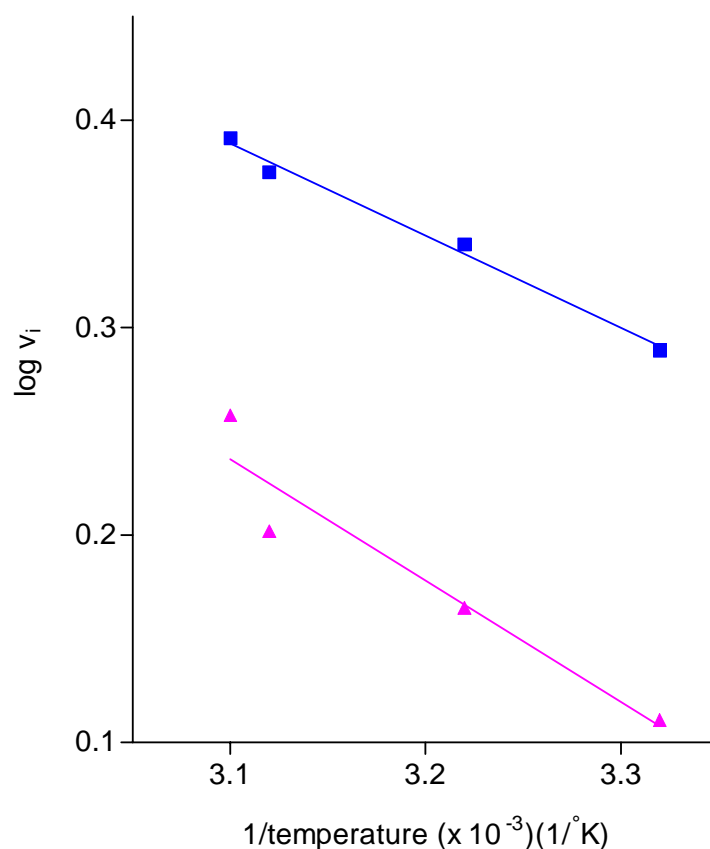


Figura 6: Gráfico de Arrhenius. La UROD_N (línea azul) y la UROD_P (línea rosa) fueron incubadas a 28, 38, 48, 50 y 74 °C como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1. Se expresa v_i como los nmoles de uroporfirinógeno III decarboxilado por mg de proteína en 30 minutos. La energía de activación fue calculada en base a la pendiente entre 28 y 50 °C del gráfico de temperatura (figura 5). En el rango seleccionado, las relaciones para ambas muestras fue lineal y están descripta por las siguientes ecuaciones: $y = -0,4321x + 1,7261$ (r^2 0,992) para la UROD_N, $y = -0,5668x + 1,9903$ (r^2 0,90998) para la UROD_P. La ecuación de Arrhenius es: $\log K = C - E_a / (2,303 \times R \times T)$, donde $K = 1 / v_i$ y $R = 8,3149 \text{ J / mol K}$.

A continuación se define el Índice de Reactividad (IR) como el cociente entre el logaritmo de la velocidad y la eficiencia (calculada como porcentaje, a partir del valor de máxima actividad). De esta manera la actividad se independiza de la eficiencia del sistema y

por lo tanto, cuando dos sistemas trabajan bajo el mismo mecanismo, el valor de IR es constante. Los IR, calculados sobre la base de los datos obtenidos de la Figura 5, fueron 4×10^{-3} para la UROD_N y para el caso de la UROD_P varía desde 1,5 a $2,6 \times 10^{-3}$, a medida que la temperatura aumenta desde 28 a 50 °C (Figura 7).

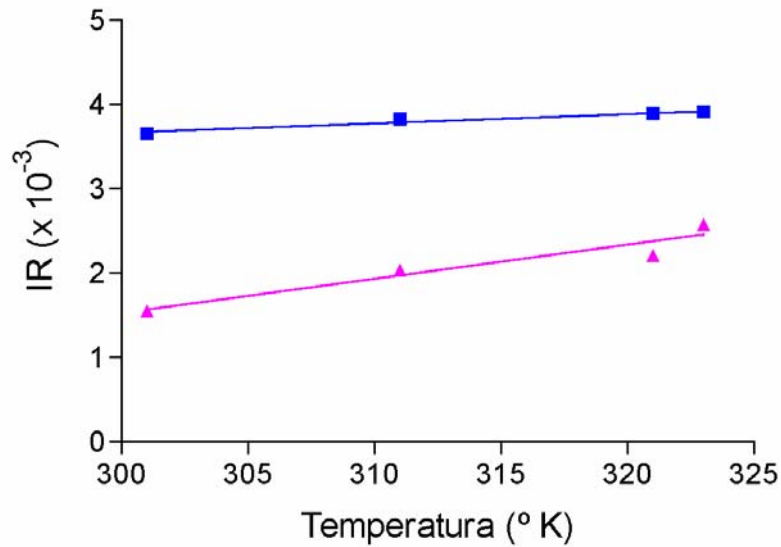


Figura 7: Índice de reactividad (IR) en función de la temperatura absoluta (°K). El IR fue definido como el cociente entre el logaritmo de la velocidad y la eficiencia (calculada como porcentaje, a partir del valor de máxima actividad). La línea azul representa los resultados correspondientes a la UROD_N y la línea rosa a la UROD_P.

I. 2. 1. c. Estabilidad de la enzima bajo diferentes condiciones de almacenamiento

Para determinar la forma más adecuada de almacenamiento, realizamos ensayos en los cuales medimos la estabilidad de la enzima, guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, como precipitado salino o en solución. De esta manera probamos la actividad UROD de eluidos de gel de fosfato proveniente de ratas normales y porfíricas por HCB, guardados en solución a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 8, EG_N y EG_P) y los mismo eluidos previamente precipitados con sulfato de amonio al 70 %, guardados también a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 8, SA_N y SA_P).

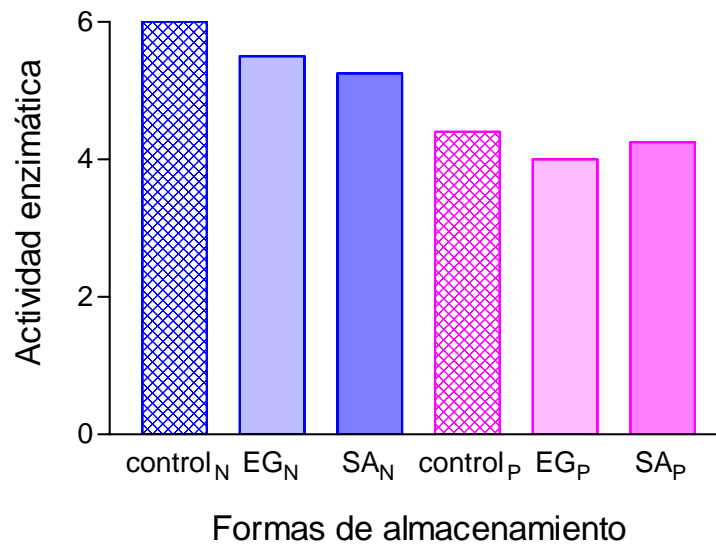


Figura 8: Estabilidad de la enzima bajo diferentes formas de almacenamiento. EG_N y EG_P eluidos de gel de fosfato proveniente de ratas normales y porfíricas por HCB, guardados en solución a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. SA_N y SA_P eluidos de gel de fosfato previamente precipitados con sulfato de amonio al 70 %, guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La actividad fue expresada como los nmoles de urogen III decarboxilados por mg de proteína en 30 minutos.

Como puede verse no se encontraron diferencias significativas entre la actividad de la misma muestra almacenada bajo diferentes condiciones. Por lo tanto, si el preparado se usa al poco tiempo de ser obtenido, no es necesario guardarlo como precipitado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

I. 2. 2. *Ensayos de caracterización química*

Siguiendo los ensayos de caracterización enzimática, realizamos estudios comparativos de la actividad enzimática de ambas fuentes frente al efecto de los metales y reactivos de grupo S-S y -SH. Los metales y reactivos utilizados fueron Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} ; GSH, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol (β -Me) como agentes protectores de grupos SH y cistina como agente oxidante de grupos SH. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 9.

Como se puede ver, las actividades enzimáticas de ambas preparaciones fueron inhibidas, en diferente grado, por la mayoría de los metales ensayados (Cu^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2}). El Zn^{+2} no afectó la actividad enzimática, mientras que tanto el Cu^{+2} como el Hg^{+2} fueron los que presentaron mayor poder inhibitorio. Este poder inhibitorio, con todos los metales, fue dosis-dependiente. Por otra parte, los resultados mostraron que la actividad de la UROD_P fue menos sensible que la actividad de la UROD_N a la acción inhibitoria de ciertos metales, particularmente del Cu^{+2} y del Pb^{+2} .

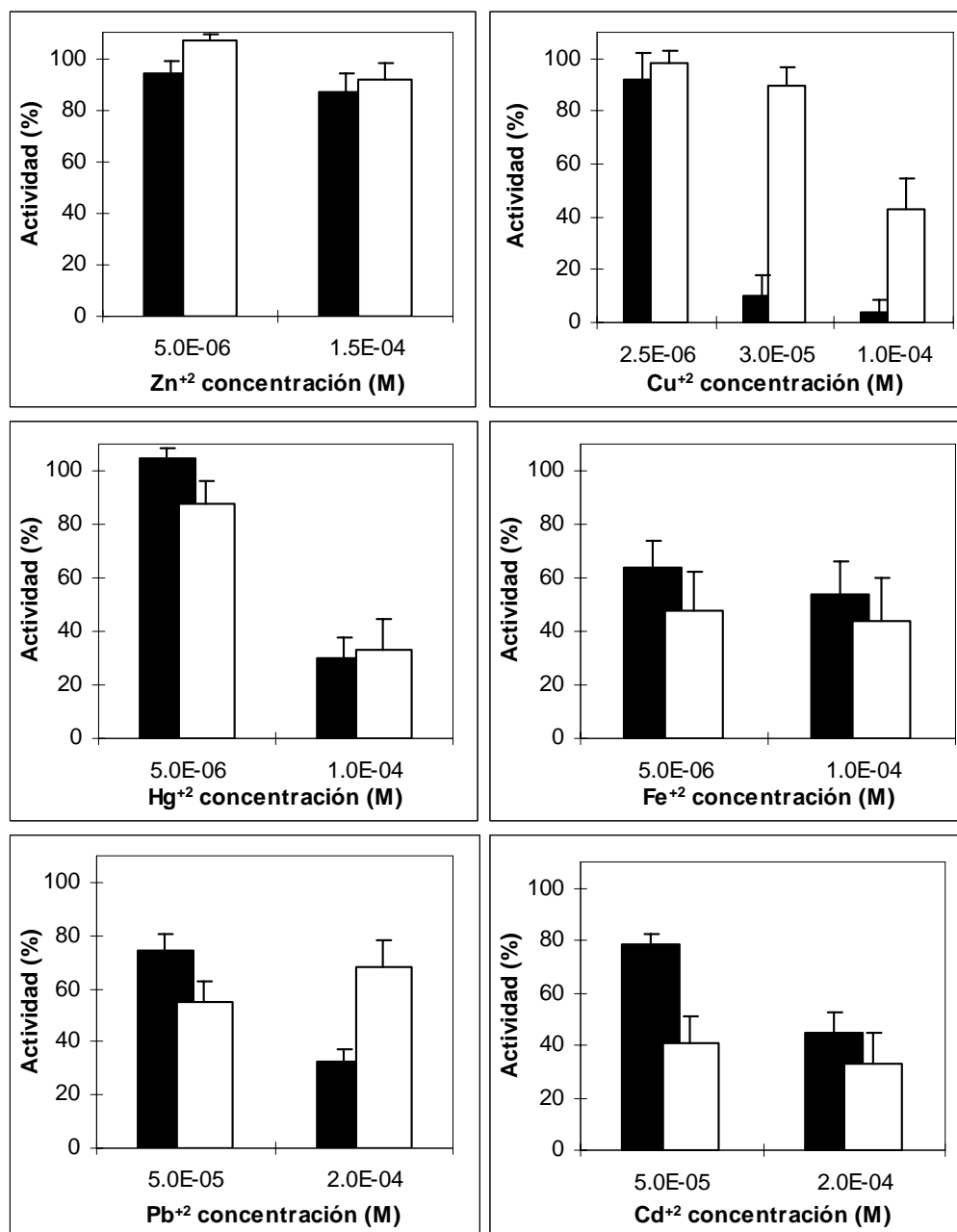


Figura 9: Efecto de los metales sobre la actividad UROD. Los ensayos fueron llevados a cabo como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 1, excepto que tanto el GSH y el EDTA fueron omitidos en el medio de incubación. Los metales fueron agregados al medio de incubación como soluciones acuosas, a una concentración tal de alcanzar las concentraciones indicadas en la figura. La actividad fue expresada como el porcentaje respecto del control (ensayo sin agregado). Las barras negras representan la actividad de la UROD_N y las barras blancas la de la UROD_P.

Los estudios realizados usando agentes protectores de grupos tiólicos mostraron que tanto el DTT como el GSH no afectaron significativamente la actividad enzimática de ambas preparaciones, a las concentraciones ensayadas (Tabla 1).

Agente	Concentración (mM)	Actividad	
		Normal (%)	Porfírica (%)
ninguno	---	100	100
GSH	0.20	105	109
	4.00	91	123
DTT	0.20	110	98
	1.00	88	81
β -Me	0.15	79	79
	1.00	60	80
Cistina	0.05	55	40
	0.50	45	57
	1.00	76	70

Tabla 1: Efecto de agentes protectores de grupos tiólicos sobre la actividad UROD. Los ensayos se llevaron a cabo como se indica en Materiales y métodos y en la figura 7.

El β -Me tuvo un efecto inhibitorio variable tanto en su concentración como sobre la fuente enzimática sobre la que actúa. A 1 mM produjo una inhibición del 40 % sobre la actividad de la UROD_N y un 20 % sobre la actividad de la UROD_P. La actividad enzimática de ambas preparaciones disminuyó en presencia de cistina, presentando un comportamiento bifásico, que pasa por un mínimo de aproximadamente 40% de actividad, tendiendo luego a normalizarse pero sin llegar al 100 % de actividad enzimática, aún frente a las mayores concentraciones ensayadas. Este número varía en cada una de las fuentes, con diferentes dosis de reactivo (para la UROD_P con 0,05 mM y para la UROD_N 0,5 mM de cistina)

I. 2. 3. Ensayos antigénicos

Para determinar si la intoxicación crónica con HCB afectaba los determinantes antigénicos de la enzima realizamos ensayos de Western blot usando como fuente enzimática preparaciones correspondiente a los primeros pasos de purificación, provenientes de ratas normal y porfírica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.

Tanto la UROD_N como la UROD_P presentan la misma inmunorreactividad frente al anticuerpo policlonal anti UROD de hígado de rata obtenido en conejo. La masa molecular de las bandas inmunorreactivas se estimó mediante el empleo de la curva de calibración correspondiente. En los dos casos (UROD_N y UROD_P) se vio una única banda de alrededor de 65 kDa. Estos resultados podrían confirmar que la intoxicación crónica con HCB no afecta los determinantes antigénicos de la enzima.

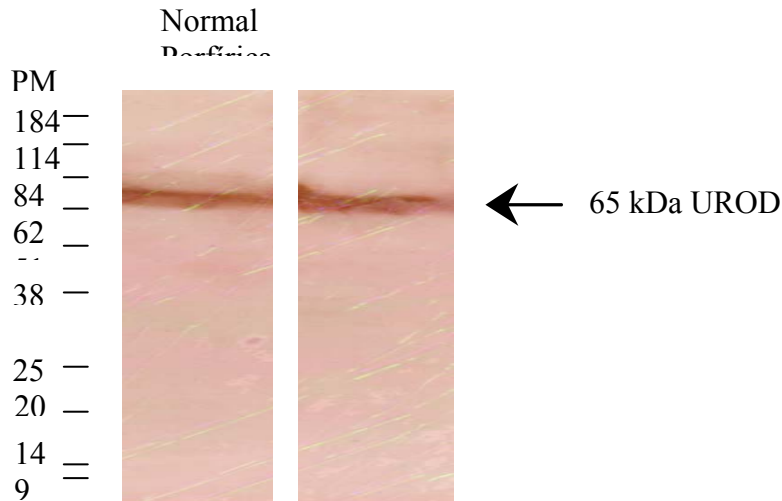


Figura 10: *Western blot* del sobrenadante de homogenato de dos muestras, UROD_N y UROD_P, respectivamente. Los extractos enzimáticos fueron sujetos a SDS/PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membranas de nitrocelulosa y reveladas con el anticuerpo policlonal anti –UROD de hígado de rata normal, producido en conejo. El peso molecular de las bandas obtenidas fue de 65 kDa, en ambos casos, según la curva de calibración respectiva.

I. 2. 4. Estudios cinéticos de competencia con dos sustratos

Para poder comenzar con el estudio cinético de competencia con dos sustratos, en primer lugar, se eligieron las concentraciones de referencia para cada uno de los sustratos (a_0 para urogen y b_0 para pentagen)). Cada una de estas concentraciones fueron las necesarias

para que cada uno de los sustratos presente la misma velocidad a $p = 0$ y $p = 1$, respectivamente, siendo p la mezcla entre sustratos.

De esta manera se graficó la actividad en función del sustrato (urogen o pentagen), con la UROD_N (Fig 11 a v b) y UROD_b (Fig 12 a v b) respectivamente

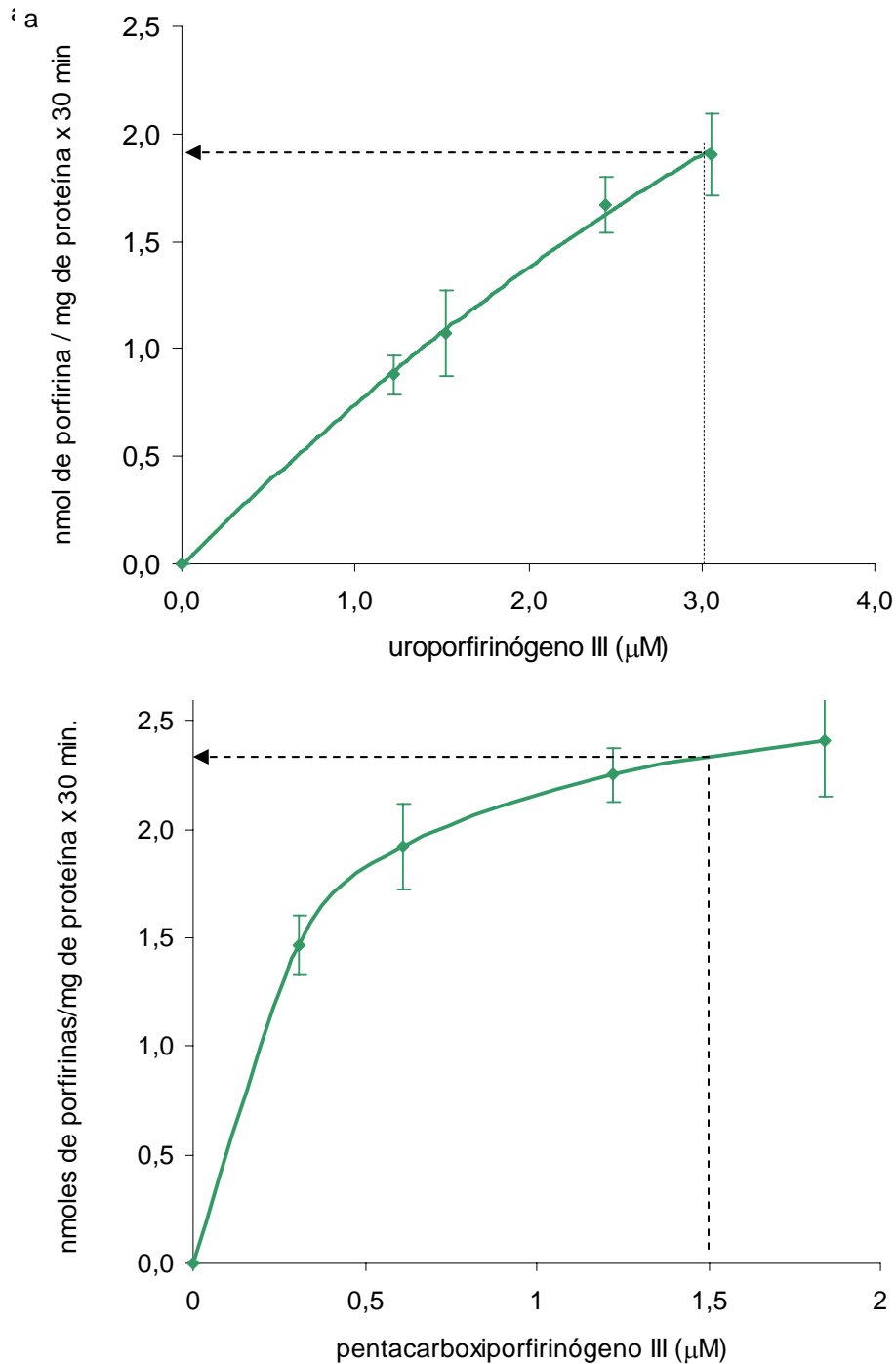


Figura 11: Curvas de referencia para la elección de la concentración de ambos sustratos a) urogen y b) pentagen, usando como fuente enzimática elúidos de gel de fosfato de una muestra de hígado de rata normal. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. La actividad fue expresada como la decarboxilación de urogen III ó pentagen III por mg de proteína en 30 minutos.

La línea de puntos marca las coordenadas que corresponden a la concentración de cada sustrato a la cual se obtiene igual velocidad inicial.

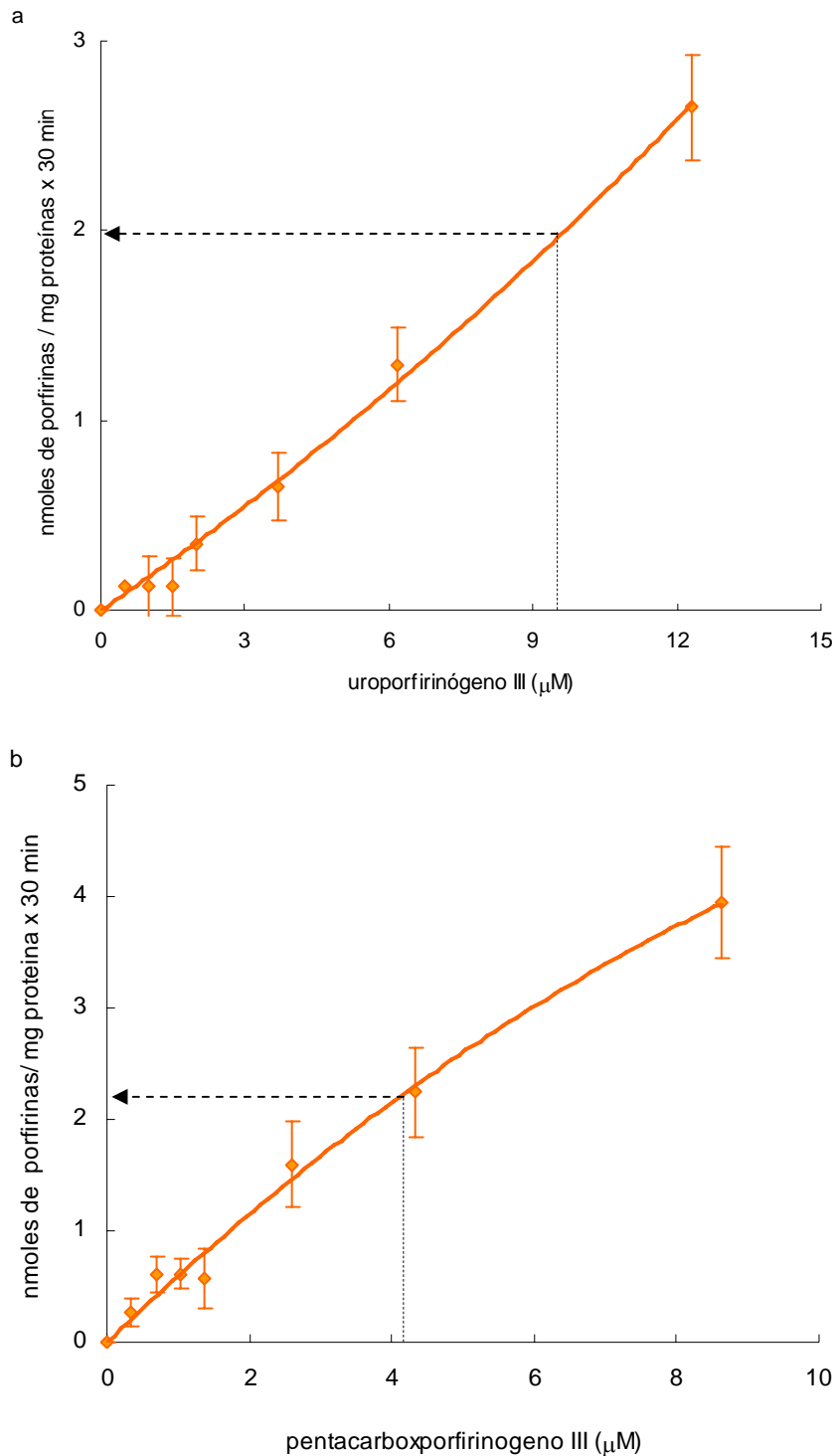


Figura 12: Curvas de referencia para la elección de la concentración de ambos sustratos a) urogen y b) pentagen, usando como fuente enzimática elúidos de gel de fosfato de UROD_p. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. La actividad fue expresada como la decarboxilación de urogen III ó pentagen III por mg de proteína en 30 minutos. La línea de puntos

marca las coordenadas que corresponden a la concentración de cada sustrato a la cual se obtiene igual velocidad inicial.

Basándonos en estos resultados determinamos las concentraciones de referencia para cada sustrato: para la UROD_N 3,21 μM de urogen y 1,52 μM de pentagen y para la UROD_P 9,51 μM de urogen y 4,15 μM de pentagen. En cada punto de la curva, correspondiente a la UROD_N, la concentración de urogen será de $(3,21 \times p)$ μM y la concentración de penta será de $1,52 \times (1 - p)$ μM. Mientras que en el caso de la UROD_P la concentración de urogen será $(9,51 \times p)$ μM y la concentración de pentagen será $4,15 \times (1 - p)$ μM, en cada punto de dicha curva. En ambos casos se obtiene, con estas concentraciones de sustrato, una actividad de aproximadamente 2 nmoles de porfirinas por mg de proteína en los 30 minutos de incubación.

Luego se realizaron los ensayos de competencia entre sustratos para ambas preparaciones enzimáticas como se describe en Materiales y Métodos (Figura 11 y 12).

Para poder analizar estos resultados tuvimos que tener en cuenta que el método aplicado propone que si los dos sustratos actúan en el mismo sitio activo, el gráfico de competencia nos arroja una línea horizontal, tal que la velocidad es independiente de p (mezcla entre sustratos). En contraste con lo anterior, si las dos reacciones ocurren en sitios separados e independientes, se obtiene una curva con un máximo. Por otra parte, si las reacciones son separadas con inhibición cruzada el gráfico arroja una curva con máximo o mínimo, dependiendo si los valores de las constantes de Michaelis para cada sustrato sean mayores o menores a sus constantes de inhibición en la otra reacción.

El gráfico de competencia para la UROD_N (Figura 13) nos arrojó una línea horizontal, lo cual nos estaría diciendo que las descarboxilaciones tanto de urogen como de pentagen ocurren en el mismo sitio.

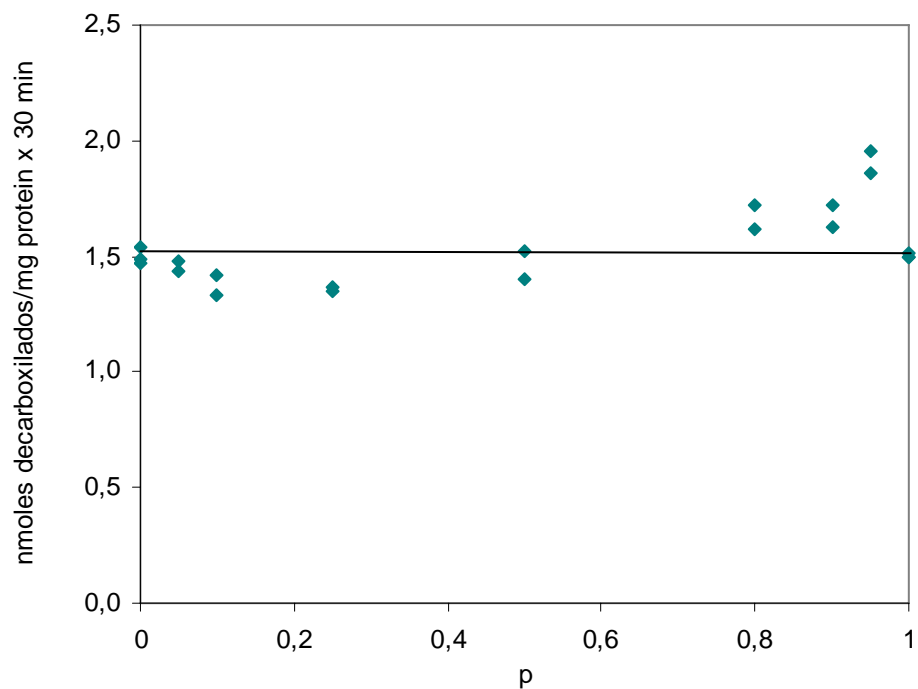


Figura 13: Gráfico de competencia entre sustratos, usando como fuente enzimática elúidos de gel de fosfato de hígado de rata normal. Las concentraciones de sustrato fueron $1,52 \times (1 - p) \mu\text{M}$ de pentagen III y $3,21 \times p \mu\text{M}$ de urogen III. Los ensayos se realizaron usando 0,2 mg de proteína. La velocidad total de mezclas de sustratos (urogen III y pentagen III) fue graficada en función de p en el rango de 0 a 1, como se describe en Materiales y Métodos. La velocidad total fue expresada como nmoles de producto formado por mg de proteína en 30 minutos y corresponde a la suma de hepta- y coproporfirinógeno formado (no detectando los otros intermediarios). Los puntos representan los valores individuales y los ensayos se realizaron por duplicado.

En cambio, en el gráfico correspondiente a la UROD_p (Figura 14) se observa claramente un mínimo. Este resultado estaría indicando que la decarboxilación en este caso estaría ocurriendo en sitios diferentes, con inhibición cruzada.

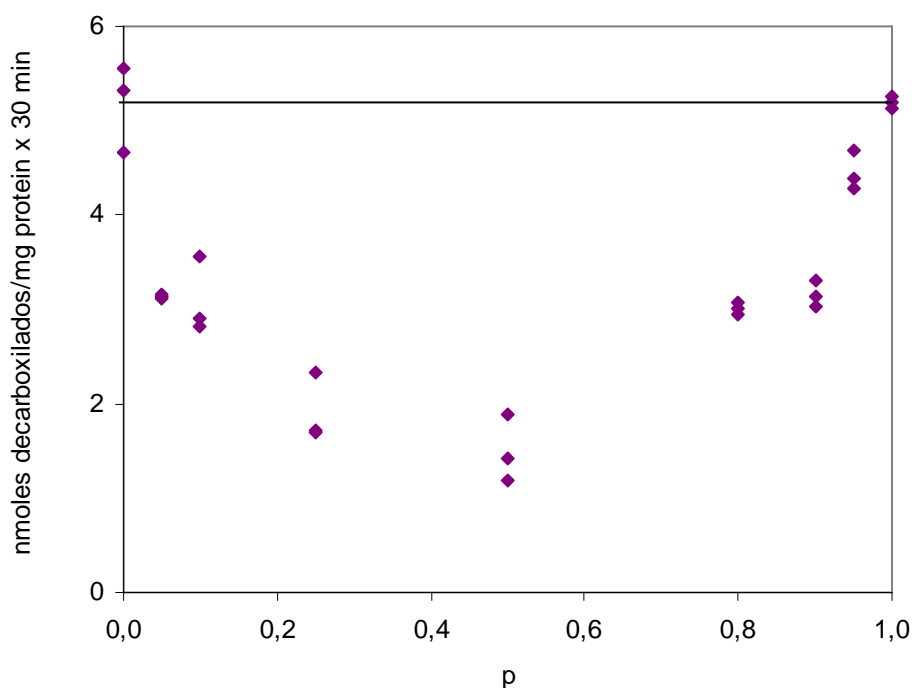


Figura 14: Gráfico de competencia entre sustratos, usando como fuente enzimática elúidos de gel de fosfato de hígado de rata porfírica. Las concentraciones de sustrato fueron $4,15 (1 - p) \mu\text{M}$ de pentagen III y $9,51 p \mu\text{M}$ de urogen III. Los ensayos se realizaron usando $0,2 \text{ mg}$ de proteína. La velocidad total de mezclas de sustratos (urogen III y pentagen III) fue graficada en función de p en el rango de 0 a 1, como se describe en Materiales y Métodos. La velocidad total fue expresada como nmoles de producto formado por mg de proteína en 30 minutos y corresponde a la suma de hepta- y coproporfirinógeno formado (no detectando los otros intermediarios). Los puntos representan los valores individuales y los ensayos se realizaron por duplicado.

I. 3. **Discusión**

I. 3. 1. Actividad UROD

El análisis comparativo de las condiciones óptimas de ensayo para una apropiada determinación de la actividad enzimática UROD reveló diferencias entre los requerimientos de la enzima proveniente de ambas fuentes, hígado de rata normal e hígado de rata porfirica por HCB.

Debido a estas diferencias, decidimos trabajar bajo diferentes condiciones con sendos sistemas. Con la UROD_N: usamos una concentración de sustrato igual o mayor a 10 μ M de urogen III y/o respetamos una relación de sustrato/proteína mayor o igual a 25 nmol de urogen III/mg de proteína, necesaria para alcanzar una velocidad constante. De esta manera nos aseguramos de estar trabajando a saturación.

Con UROD_P: utilizamos la máxima concentración de proteína que admite el sistema para aumentar la sensibilidad del mismo y, de acuerdo con este valor, calculamos la cantidad de sustrato para obtener una relación de 25 nmoles de uroporfirinógeno III/mg de proteína. De esta manera nos aseguramos que la enzima está lo más saturada posible (aunque no estemos trabajando a saturación ya que a mayores concentraciones de sustrato queda gran cantidad de sustrato remanente, lo cual, además de producir inhibición por sustrato, baja la sensibilidad del sistema) y está en una relación enzima/sustrato similar a la usada con la normal, que se toma como referencia.

Con respecto al efecto de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática, ambas preparaciones tuvieron un comportamiento similar, con un máximo de actividad a 0,3 mg/ml y luego una disminución de la misma a mayor concentración de proteína. Esto podría deberse a una disminución de la relación sustrato/proteína, la cual vimos que afectaba la actividad enzimática, también reportado por otros autores (Straka y Kushner, 1983), o por algún efecto causado por el aumento en la cantidad de proteínas del medio. Una posibilidad sería la formación de especies multiméricas (Kawanishi *et al.*, 1983; Ríos de Molina *et al.*, 1996) lo que provocaría un impedimento estérico para la entrada del sustrato al sitio activo y por lo tanto disminuiría su actividad enzimática.

Con respecto al tiempo de incubación, tanto la UROD_N como la UROD_P, presentaron velocidades constantes en el rango utilizado, lo cual indica que las enzimas trabajan a la velocidad inicial durante los 30 minutos de incubación. Sin embargo al realizar las curvas de saturación se

comprobó que la UROD_p no estaba saturada ya que no llega a la meseta de velocidad constante. La aparente saturación a la que habría llegado el sistema anteriormente, se debería a que, debido a la baja actividad del sistema porfírico, la curvatura se hace indistinguible de la recta. Dado que la reacción total es una serie de reacciones en cadena, es posible que la falta de saturación de la primera etapa se compense con el aumento de actividad de los pasos intermedios de la segunda etapa y de allí que la actividad de la UROD_p parezca constante al realizar el gráfico en función del tiempo.

Los valores de energía de activación (8,272 y 10,854 kJ/mol) para ambas preparaciones (UROD_N y la UROD_p, respectivamente) están en el orden de lo determinado por García *et al.* (1973) para eritrocitos de pollo (40,0 kJ/mol). El hecho que los valores de energía de activación obtenidos de la ecuación de Arrhenius fueron ligeramente diferentes para ambas preparaciones, siendo mayores para la UROD_p nos hace pensar que estarían involucrados dos mecanismos diferentes. Por esta razón decidimos analizar el dato del índice de reactividad: este valor fue constante para la UROD_N, mientras que para la UROD_p los valores se alinean con una pendiente positiva (por debajo de los de la normal). Esto indicaría que la UROD_N estaría trabajando por un único mecanismo en todo el rango de temperaturas ensayadas, mientras que la UROD_p trabajaría por un mecanismo un tanto diferente que la normal a bajas temperaturas y podría ir sufriendo alteraciones conformacionales hacia el estado normal a medida que la temperatura, y por lo tanto la energía cinética, aumentan. Estudios de dicroísmo circular aclararían, posiblemente, esta situación, al poner en evidencia las modificaciones estructurales entre sendas muestras y en función de la temperatura.

La brusca caída de la actividad enzimática hacia pH alcalinos (> 7,2) de ambas preparaciones podría indicar la importancia de grupos cargados positivamente para la actividad enzimática. Hacia valores ácidos la actividad enzimática fue más constante (al igual que lo informado por Straka y Kushner, 1983) lo que parecería indicar que la actividad UROD tiene una menor dependencia de grupos cargados negativamente. La actividad de la UROD_N y la actividad de la UROD_p, en función del pH de incubación, mostró un comportamiento semejante, pero con valores diferentes para los pH óptimos, correspondiendo los menores a la UROD_p. Esto podría deberse a la acción del inhibidor, propuesto para las preparaciones de hígados porfíricos, el cual bloquearía parte de las cargas positivas de los grupos básicos en el centro activo, como ya fue sugerido por Billi de Catabbi *et al.* (1994). Ambos hallazgos, la brusca caída hacia pH alcalinos de ambas preparaciones y el corrimiento del pH óptimo a valores más ácidos para el caso de la porfírica, estarían de acuerdo con trabajos anteriores de nuestro grupo (Ríos de Molina *et al.*,

1980), que indican que las sustancias halladas como inhibidores en general están cargadas negativamente.

I. 3. 2. *Ensayos de caracterización química*

Al analizar la acción de los diferentes metales vimos que el Cu^{+2} es uno de los metales que más afectó tanto a las UROD_N como a las UROD_P . Esto podría estar relacionado a que dicho metal fue el único de los ensayados con un electrón desapareado en el último nivel energético (Figura 15) y quizás tendría un efecto semejante al inhibidor cargado negativamente que se ha propuesto anteriormente (Ríos de Molina *et al.*, 1980).

Por otra parte vimos que, dentro del grupo II B de metales de transición de la tabla periódica, a medida que aumenta el radio atómico en su estado solvatado ($\text{Hg}^{+2} < \text{Cd}^{+2} < \text{Zn}^{+2}$) disminuye el efecto de dicho metal sobre la UROD ($\text{Hg}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Zn}^{+2}$). Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la UROD_P por lo que se deduce que grupos reactivos similares estarían involucrados en el centro y/o sitio activo de ambas preparaciones enzimáticas.

Por otra parte tanto el Pb^{+2} como el Fe^{+2} producen un descenso de la actividad tanto de la UROD_N como de la UROD_P . Estos resultados coinciden con los obtenidos por Straka y Kushner (1983) en preparaciones normales, los cuales observan una actividad de 14 % y de 55 % en presencia de Pb^{+2} y Fe^{+2} respectivamente, utilizando hígado bovino como fuente enzimática y concentraciones de metales aún más elevadas (10 mM). La acumulación de hierro quizás sea uno de los factores primarios en el desencadenamiento de la porfiria, ya que como se sabe, durante el desarrollo de la PCT se produce tempranamente una ferremia, lo cual podría provocar la primera inhibición de la UROD (Figura 16).

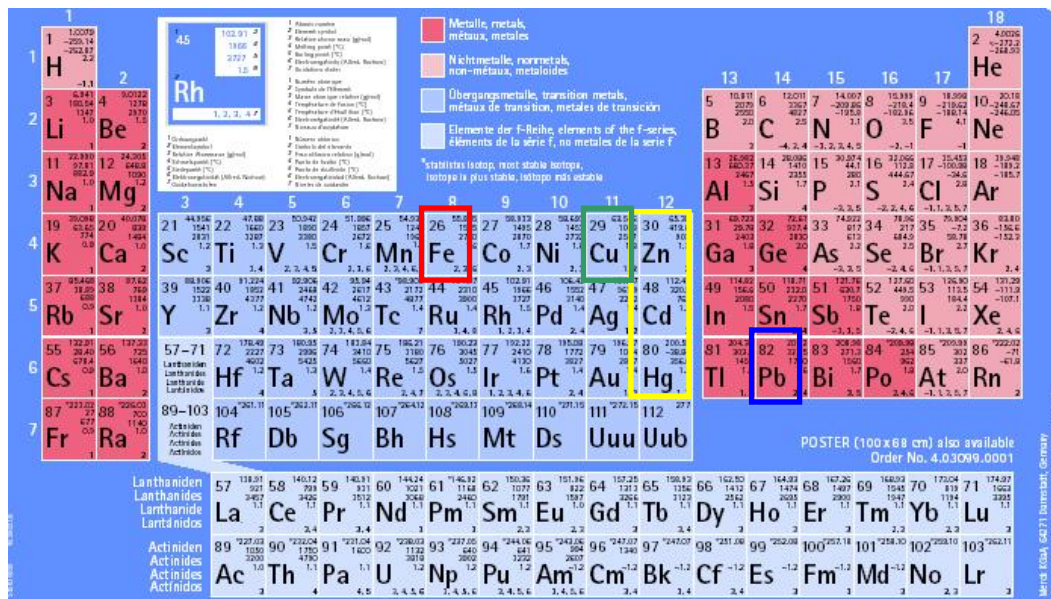


Figura 15: Tabla periódica de elementos. Se indica en un rectángulo amarillo los elementos del grupo II B, en azul al plomo y en verde al cobre y en rojo al hierro.

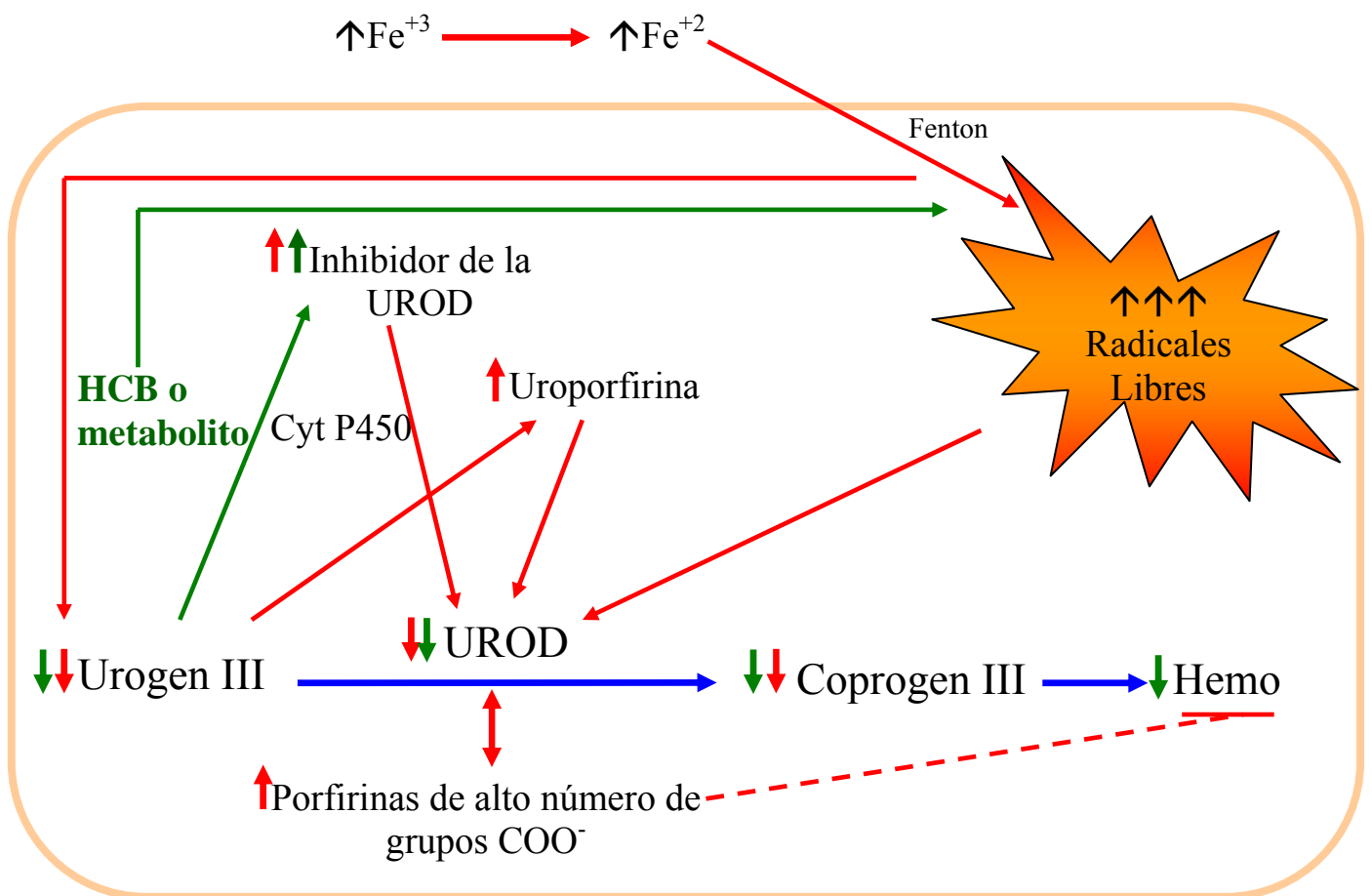


Figura 16: Esquema que describe la secuencia de eventos que podrían ocurrir luego de la acumulación de hierro producida por un cuadro de porfiria: aumento de hierro, aumento de radicales libres y descenso del sustrato (reducido) urogen, aumento de inhibidores de UROD o estabilización de un determinado estado de inhibición de la UROD, descenso de la actividad UROD, aumento masivo de porfirinas altamente carboxiladas y disminución del producto final del camino, el hemo. Con flechas azules se describen los eventos que se producen en una situación normal, con flechas verdes los eventos desencadenados por el HCB y en rojo los desencadenados por acumulación de hierro

Estos resultados estarían indicando que la enzima proveniente de ratas porfíricas es menos sensible que la enzima proveniente de ratas normales a la acción inhibitoria de ciertos metales, particularmente Cu^{+2} y Pb^{+2} , y concuerdan con resultados previos (Billi de Catabbi *et al.*, 1991) quienes informan que la enzima de animales porfíricos por HCB está más protegida que la normal frente a la acción de diferentes agentes químicos tales como dietilpirocarbonato, fenil glioxal y azul de metileno. Ambos resultados sugieren que posiblemente el inhibidor de la UROD, al unirse al sitio activo (Billi de Catabbi *et al.*, 1999), bloquearía en parte el acceso de los metales y de las drogas al mismo y de esta forma protegería la actividad enzimática, y/o produciría un cambio alostérico que afectaría el sitio de unión de los metales, diferente al sitio activo. Esta misma unión del inhibidor podría ser también la responsable de la protección a la inactivación térmica que se logra a temperaturas mayores de 50 °C, al dejar quizás menos expuesto el sitio activo.

El estudio realizado con reactivos tiólicos parecería indicar que la actividad enzimática no es dependiente de dichos grupos tiólicos. La cistina produce un efecto bifásico en la actividad UROD por la intervención de los grupos disulfuros afectando el centro o el sitio activo, quizás actuando por dos mecanismos distintos: uno podría ser por variación del estado de oxidoreducción del sistema; y el otro por un efecto directo sobre la enzima. Una respuesta dual, similar a ésta, fue la encontrada en estudios realizados con UROD de eritrocitos (García *et al.*, 1973) en el cual se menciona que la actividad no desaparece completamente en presencia de cistina, lo cual podría estar indicando que las cistinas son importantes, pero no esenciales para la actividad UROD como lo ha reportado Wyckoff *et al.* (1996) para la enzima recombinante de humanos. Al analizar la actividad de la UROD_P, en cambio, sólo se vio un efecto inhibitorio a bajas concentraciones del reactivo que luego se revierte. Esto podría deberse a una mayor exposición de los grupos S-S o a una mayor dependencia de la actividad UROD_P al potencial de reducción del sistema.

I. 3. 3. *Ensayos antigénicos*

Los resultados de la inmunodetección podrían indicar que la intoxicación crónica con HCB no afecta los determinantes antigénicos de la enzima ya que la UROD_P pudo ser revelada con el anticuerpo anti-UROD normal dando el mismo *Rf* que la UROD_N. Las intensidades de las bandas en el *Western blot* fueron muy similares, lo que podría indicar que la intoxicación crónica con HCB no altera la cantidad de proteína en la rata porfírica. Esto concuerda con resultados

previos realizados con ratas de diferentes cepas y forma de administración del fungicida (Elder y Sheppard 1982; Mylchreest *et al.*, 1997).

En el caso de la UROD_P se vio que el HCB produce una disminución en la actividad enzimática respecto de la UROD_N pero sin alterar el valor de inmunoreactividad (proteína inmunológicamente activa). Por lo tanto en este caso el CRIM es negativo. Esto mismo se observa en pacientes con PCTa lo cual sugiere la presencia de un inhibidor de la actividad enzimática (Garey *et al.*, 1993). En cambio en los pacientes con PCTf tanto la actividad enzimática como la concentración de proteína inmunológicamente activa está disminuida un 50 % en eritrocitos (Doss *et al.*, 2000) es decir que son CRIM positivo.

En resumen, los resultados presentes muestran que el tratamiento con HCB podría afectar a la UROD desde un punto de vista molecular y/o conformacional. Una posibilidad es que los cambios conformacionales se produzcan a través de la unión de su inhibidor a su centro activo. Así, este cambio podría estar protegiendo a la enzima, presente en rata porfírica, contra la inactivación térmica e inhibición por metales, produciría disminución del índice de reactividad, aumentaría la energía de activación y disminuiría el pH óptimo bloqueando las cargas positivas de la enzima, sin afectar sus determinantes antigénicos.

I. 3. 4. *Estudios cinéticos de competencia con dos sustratos*

La aplicación de gráficos de competición en el estudio de fracciones crudas es importante debido a que: a) durante los pasos de purificación, es necesario establecer tempranamente si actúan una o más enzimas, b) algunas enzimas parecen cambiar su especificidad por el sustrato a lo largo del proceso (Watanuki *et al.*, 1978).

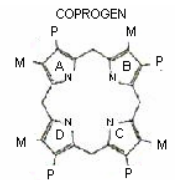
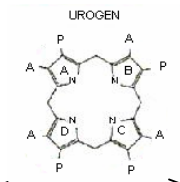
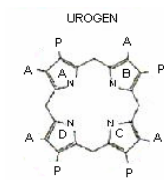
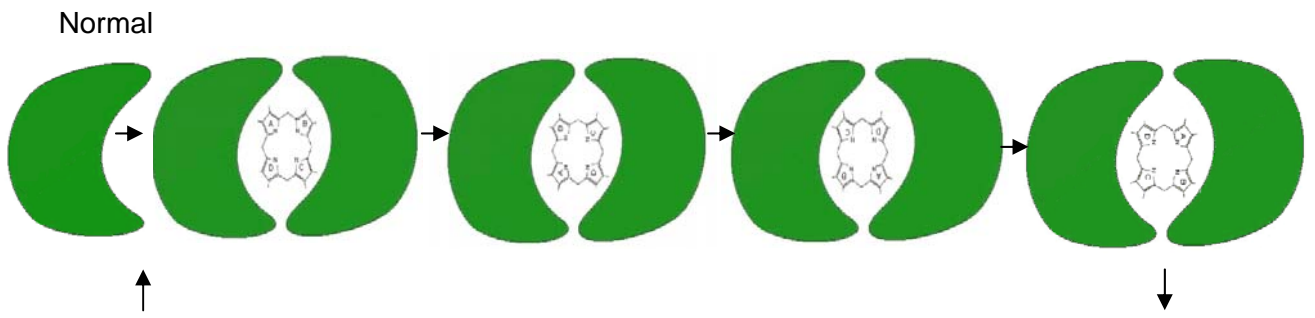
Los gráficos de competición aquí presentados sugieren que en la enzima proveniente de ratas normales existiría un único sitio activo. En tanto que en la proveniente de ratas porfíricas el urogen y el pentagen se decarboxilarían en sitios distintos, con inhibición cruzada. Estos resultados podrían sugerir la existencia de variaciones conformacionales y mecanísticas provocadas por el HCB *in vivo*. La interpretación de estos resultados concuerda con los resultados obtenidos a partir del cálculo del IR. Dado que cuando dos sistemas trabajan bajo el mismo mecanismo, el valor de IR es constante, los resultados encontrados con la UROD_N (valor constante de IR a todas las temperaturas ensayadas) sugerirían que la enzima proveniente de ratas normales trabaja siempre por el mismo mecanismo. En tanto que la UROD_P posee un IR que

aumenta en función de la temperatura (siendo siempre su valor absoluto inferior al normal) por lo que esta enzima actuaría por un mecanismo diferente a bajas temperaturas y luego sufriría cambios conformacionales acercándose al mecanismo normal a medida que aumenta la temperatura y, por lo tanto, la energía del sistema (Chaufan *et al* 2001).

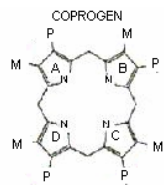
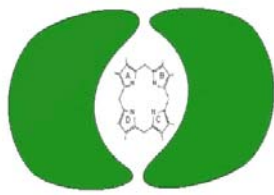
Los resultados aquí obtenidos para la UROD_N se pueden explicar en base a la estructura propuesta por Whitby *et al* (1998) quienes sugieren que la UROD existiría como un dímero con un sitio activo por monómero. En este caso, cada sitio estaría localizado adyacente al otro generando una única hendidura formando un único sitio. Dicha hendidura podría albergar dos moléculas de sustratos o intermediarios de la reacción, los cuales pueden pasar de un monómero a otro. Se podría especular que la enzima normal necesita este sitio único, formado por los 2 monómeros debido a su necesidad de rotar el sustrato, después de que ocurre la primera decarboxilación. En tanto que en la proveniente de ratas porfíricas, al estar alterada la estructura de uno o de los dos monómeros (por la presencia del HCB o algún metabolito inhibidor), se formarían sitios defectuosos, que podrían resultar en la detección de 2 sitios no equivalentes para los 2 sustratos ensayados y en una menor actividad total.

En trabajos realizados por García *et al.* (1973) con UROD de eritrocitos de pollo y usando como sustratos urogen y heptacarboxiporfirinogeno (heptagen) proponen que el heptagen inhibe la decarboxilación del urogen y que el urogen podría inhibir la decarboxilación del heptagen. Tanto estos resultados como los presentados en esta Tesis están de acuerdo con los observados por de Verneuil *et al.* (1980) quienes sugirieron que los sustratos menos carboxilados pueden ocupar competitivamente el sitio de los más carboxilados, actuando de esta manera como inhibidores competitivos.

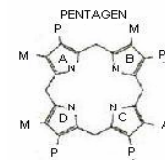
En el caso de la enzima proveniente de hígado de ratas porfíricas, a causa de la acción del inhibidor (Billi *et al.*, 1999) se produciría un cambio conformacional que haría actuar a los dos sitios en forma independiente. Otra posibilidad sería que en el hígado de los animales porfíricos existiría un aumento de una de las isoformas propuestas por Ríos de Molina *et al.*, 1996, que normalmente es minoritaria y de esta manera se formaría un heterodímero con diferente afinidad por cada sustrato.



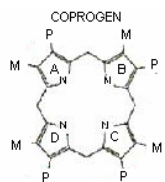
Porfírica



activa



inactiva



activa

Figura 17: Modelo de decarboxilación para la UROD_N y UROD_P. Se indican las alteraciones conformacionales que podrían sufrir uno o ambos monómeros y las consecuencias en el patrón de decarboxilación y especificidad por los sustratos. Figura en verde monómero normal y figura en azul monómero alterado como consecuencia del tratamiento con HCB. A: resto acetilo = -CH₂COOH. P: resto propionilo = -CH₂CH₂COOH. M: resto metilo = -CH₃.

Capítulo II:
Purificación de la UROD proveniente de ratas
porfíricas por hexaclorobenceno

II. 1. Introducción

La UROD ha sido purificada a homogeneidad de diversas fuentes y se ha determinado su peso molecular por diversas técnicas, siendo los datos a este respecto muy variados. Se han reportado pesos moleculares de 41 kDa para la enzima de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides* (Jones y Jordan, 1993), entre 38 y 46 kDa (según el método¹) para la de levadura *Sccharomyces cerevisiae* (Felix y Brouillet, 1990), 57 kDa para la de hígado bovino (Straka y Kusher, 1983), 79 kDa para la de eritrocitos de pollo (Kawanishi *et al.*, 1983) y para la de eritrocitos humanos se reportaron pesos moleculares de 39,5 kDa y 58 kDa (Elder *et al.*, 1983) y de 52-54 kDa y 35 kDa en el caso de considerarlas isoenzimas (Mukerji y Pinstone, 1992).

Estimaciones basadas en cromatografías de exclusión sugieren que la proteína humana, la bovina y la bacteriana son monoméricas (Elder *et al.*, 1983; de Verneuil *et al.*, 1983, Juknat *et al.*, 1989; Straka y Kushner 1983). Sin embargo, Kawanishi *et al.*, 1983 y Seki *et al.*, 1986 sugirieron que la UROD de eritrocitos de pollo es un dímero. Estas y otras diferencias están resumidas en la Tabla 1.

El gen de la UROD humana codifica para una proteína citosólica de 367 residuos con un peso molecular de 40,8 kDa (Romeo *et al.*, 1986). La comparación de la secuencia de la UROD, proveniente de 12 especies diferentes, incluyendo bacterias, levaduras y mamíferos, mostraron una identidad del 10 % y una similitud del 33 %, con un alto grado de residuos conservados cerca de la zona animo terminal (Wyckoff *et al.*, 1996). La UROD recombinante de sangre humana ha sido expresada en *Escherichia coli* con una cola de histidina y purificada a homogeneidad, dando un valor de peso molecular de 43,3 kDa. Estudios realizados por equilibrio de sedimentación y dicroísmo circular revelaron que la enzima es dimérica, con una constante de dimerización (Kd) de 0,1 μ M (Phillips *et al.*, 1997).

Estructuralmente hablando, la UROD pertenece a la familia de las TIM barrel o barril α 8/ β 8 (Whitby *et al.*, 1998), estructura caracterizada por primera vez en la

¹ Dependiendo del método que se emplee para la determinación de la masa molecular relativa, los valores van a variar. En este sentido los métodos que se utilizan normalmente son PAGE nativa, SDS/PAGE y tamiz molecular, arrojando este último un valor mayor al anterior.

triosafosfato isomerasa (TIM) de allí su nombre. La UROD adopta un plegamiento de barril $(\alpha/\beta)_8$ distorsionado, con dimensiones de $\sim 40 \times 45 \times 65 \text{ \AA}$ que contiene una profunda hendidura en su extremo carboxi-terminal, en la cual se encuentra su sitio activo. En su estado cristalino la proteína está en forma de dímero, lo cual representa, probablemente, su estructura en solución. El dímero, así formado, tiene dos centros activos adyacentes, los cuales forman una única y extensa hendidura dividida por una serina (Ser172), que está ubicada casi en el medio de dicha hendidura. El tamaño de la hendidura ($\sim 15 \times 15 \times 7 \text{ \AA}$) es lo suficientemente grande para albergar dos moléculas de sustrato o dos intermediarios de la reacción, en el sitio activo. Esta disposición quizás es la necesaria para su función enzimática y sugiere la posibilidad de colaboración entre los sitios adyacentes (Martins *et al.*, 2001; Whitby *et al.*, 1998). Los residuos centrales del barril se disponen en cuatro capas, las cuales contienen predominantemente residuos hidrofóbicos. La UROD posee una densidad de carga total significativamente negativa (43 Asp/Glu y 36 Arg/Lys por monómero). Sin embargo el sitio activo presenta una densidad de carga positiva, por el gran número de residuos de arginina, lo cual contribuye a la unión con el sustrato (cargado negativamente) (Phillips *et al.*, 2003) (Figura 1).

En la actualidad existe un gran número de trabajos acerca de la purificación, aislamiento y secuenciación de la UROD proveniente de sangre humana pero poco con respecto a la proveniente de hígado de ratas y menos aún de ratas contaminadas con HCB. El objetivo de este capítulo es la purificación de la enzima hepática proveniente de ratas intoxicadas con HCB, para comprobar si el tratamiento afecta estructural y/o cinéticamente a la UROD.

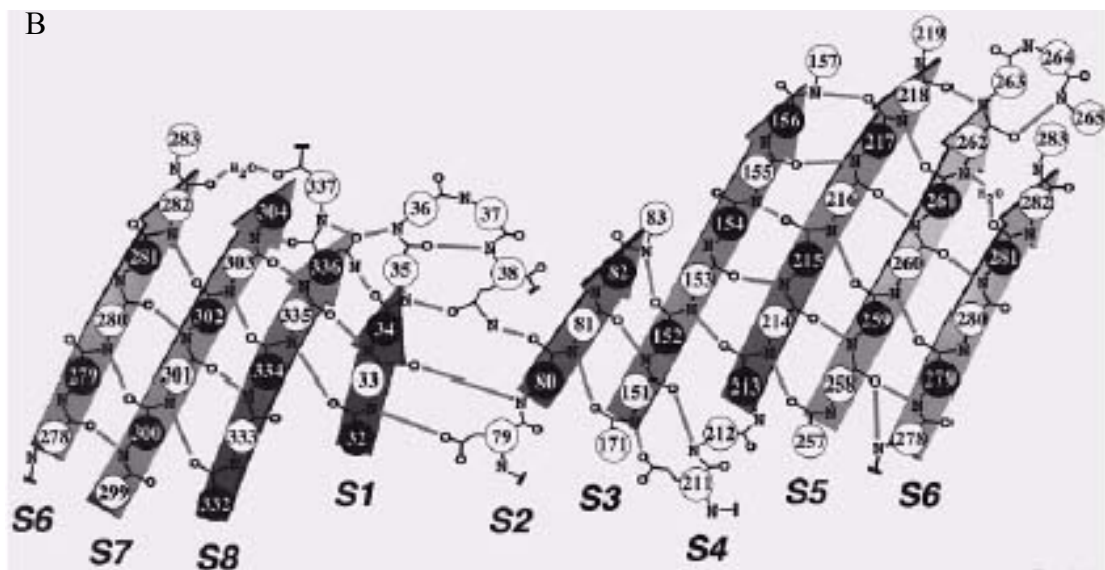


Figura 1: A. Vista desde el extremo carboxi-terminal del barril $(\alpha/\beta)_8$. En el centro y en rojo se observa la estructura de barril formada por las hojas β , las cuales forman la hendidura del centro activo. B. Representación esquemática de las hojas β . Las hojas β son representadas como flechas y están nombradas desde la más próxima al extremo amino-terminal (S1) al carboxi terminal (S8). (Extraído de Whitby *et al.*, 1998).

Autores	Fuente enzimática	Pesos molecular	Estructura cuaternaria	Parámetros cinéticos*	Otras características
Jones y Jordan 1993	Bacterias (<i>R. sphaeroides</i>)	41 kDa	Monómero	Km 6,0 μ M	Inhibición por uro y urogen. pH óptimo 6,8. Decarboxilación al azar al aumentar la concentración de sustrato. Importancia de residuos cisteína y arginina en el sitio o centro activo. Alto grado de similitud con otras especies en los 29 primeros aminoácidos del N-terminal
Felix y Brouillet (1990)	Levaduras (<i>S. cerevisiae</i>)	38 kDa en SDS/PAGE 46 kDa en tamiz molecular	Monómero	Km 6 nM	Inhibición por metales: Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} . Inhibición por agentes SH. pH óptimo 5,7 para urogen I y III
Tomio <i>et al.</i> , 1970	Eritrocitos de pollo	Banda única en geles de poliacrilamida en disco nativos			pH óptimo a 7,0. Acumulación de heptaporfirinógeno en todos los pasos de purificación. Inhibición de la actividad en presencia de NaCl. Inactivación por calentamiento con urogen I, III y heptagen III como sustrato. Diferentes sitios activos para la primera y segunda etapa con ν distintas ($\nu_1 > \nu_2$).
García <i>et al.</i> , 1973	Eritrocitos de pollo			Saturación 3 μ M Amas 22 nmoles/h/ mg prot	Dos sitios de decarboxilación. Tanto urogen como pentagen inhiben su propia decarboxilación. Cisteína inhiben la decarboxilación a bajas y altas concentraciones y GSH sólo a bajas.
Kawanishi <i>et al.</i> , 1983	Eritrocitos de pollo	79 kDa en tamiz molecular 39,7 kDa en SDS/PAGE	Dímero		Inhibición por agentes SH. Inhibición por PBC más sensible la segunda etapa que la primera y mayor que el HCB.
Ríos de Molina <i>et al.</i> , 1996, 1999	Hígado de rata	isoformas de 45,30 y 17 kDa	Monómeros	Km 0,14 y 0,75 mM para 45 y 30 kDa	En tamizaje molecular se observan 4 picos con actividad enzimática correspondiente a 90, 45, 30 y 17 kDa. La de 45 kDa es siete veces más eficiente con urogen III que con pentagen III mientras que la de 30 kDa es sólo dos veces más eficiente con uro III que con penta III.
Smith y Francis (1979, 1981)	Hígado de rata			Km 2,7 μ M V _{máx} 46,6 pmol/min/ mg prot	La velocidad de decarboxilación del urogen III es mayor a la del urogen I. La decarboxilación de urogen es más rápida que la de heptagen lo que sugiere dos sitios separados o diferentes enzimas. Todas las porfirinas inhiben la decarboxilación del urogen a coprogen
Straka y Kushner (1983)	Hígado bovino	57 kDa	Monómero	Km 0,46 μ M V _{máx} 25 nmol/h/mg prot	Dos sitio activos no interactivos. Inhibición por metales: Fe^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} . Inhibición por agentes sulfidrílicos. La formación de producto es afectada por la relación [sustrato]/[enzima]
Elder <i>et al.</i> , 1983	Eritrocitos humanos	39,5 kDa en SDS/PAGE 58 kDa en tamiz molecular	Monómero con más de un tipo de centro activo		La inmunoprecipitación y la inmunoelectroforesis cruzada indican que las muestras de eritrocitos e hígado son muy similares, pero no idénticas. Las diferencias pueden reflejar modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas por proteólisis u oxidación de los grupos tiónicos, más que diferencias en la estructura primaria.
de Verneuil <i>et al.</i> , 1983	Eritrocitos humanos	46 kDa en SDS/PAGE 58 kDa en tamiz molecular	Monómero	Km 0,35 μ M	Inhibición por metales: Cu^{+2} , Hg^{+2} y Pt^{+2} , pero no por Fe^{+2} o Fe^{+3} sugiriendo que el rol de dichos metales en la patología no es por inhibición enzimática. Sensible a modificaciones sulfidrílicas. Con uro III y penta III pH óptimo 6,8, siendo 6,2 y 5,8 con uro I y con penta I respectivamente. La decarboxilación ocurre en dos o más

					sitios catalíticos. Abundancia en aminoácidos aromáticos (~ 10%)
Mukerji y Pimstone (1992)	Eritrocitos humanos	Dos isoformas de: 52-54 kDa y 35 kDa en SDS/PAGE	complejo funcional	Km 0,25 μ M y 0,53 μ M respectivamente	Tienen diferente composición aminoacídica. Tienen diferente afinidad por el sustrato: la de 52 kDa es más activa para la decarboxilación del anillo D del uro III.
Mock <i>et al.</i> , 1995	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	43kDa a partir del cDNA			Tiene 33 % de similitud con secuencias de otros organismos. Pose un extremo N-terminal de 39 residuos aminoacídicos de extensión muy similar a la secuencia de tránsito hacia cloroplastos.
Martins <i>et al.</i> , 2001	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	82 kDa	Homodímero		Dependencia de fuerza iónica para la dimerización. Un centro catalítico por monómero. El Asp82 (localizado en un entorno hidrofóbico) orienta al anillo pirrólico a la protonación en la posición α por la Tyr159 y la Arg32 (con cadena lateral cargada positivamente) actúa como grupo guía ayudando a la inserción del sustrato en el sitio catalítico hidrofóbico.

- Con uro III como sustrato

II. 2. Resultados

II. 2. 1. Estudios iniciales con ratas porfíricas

II.2. 1. a *Puesta a punto de los primeros pasos de purificación*

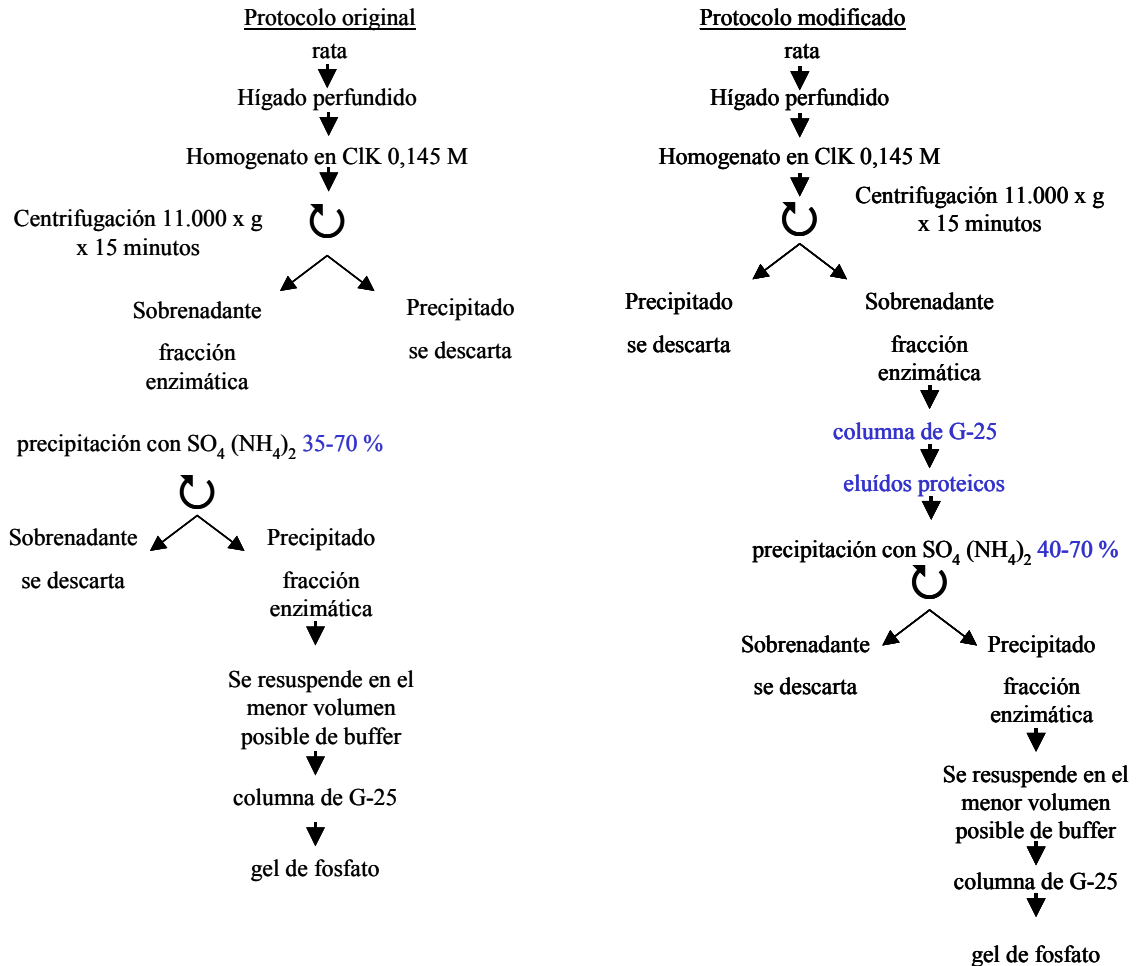


Figura 1: Esquemas de los protocolos de purificación usados para la UROD proveniente de ratas normales (protocolo original) y la modificación realizada para comenzar la purificación de la enzima proveniente de ratas porfíricas por HCB (protocolo modificado). En azul se remarcan las diferencias entre ambos protocolos.

En primer lugar se utilizó el mismo protocolo que se usaba para la purificación de la UROD_N, pero con algunas modificaciones debido a las características de las muestras provenientes de ratas porfíricas. Como es sabido, las ratas porfíricas por HCB acumulan porfirinas en el hígado, las cuales se sabe que afectan la actividad enzimática, por lo tanto se decidió eliminar la mayor cantidad de porfirinas libres. En el protocolo

modificado se muestran (en azul) los cambios realizados para la purificación de la enzima proveniente de ratas porfíricas. Como puede verse se incluyó una columna de tamiz molecular G-25 luego de la centrifugación a 11.000 x g, la cual separaba las porfirinas libres de las proteínas.

Al mirar a la luz UV las proteínas precipitadas en el rango de 40-70% de sal, se observó que aún presentaban fluorescencia rosada, lo cual indicaba la existencia de porfirinas que coprecipitaban junto a las proteínas. Por esta razón se decidió volver a cambiar el protocolo de cómo se observa en el esquema 2.

De esta manera se lavan las proteínas con una solución al 70% en sulfato de amonio despegándoles las porfirinas adsorbidas en ellas. Al comparar este último precipitado con el anterior (protocolo modificado, fracción enzimática) a la luz UV se ve que en este último caso la fluorescencia es marcadamente menor. Sin embargo aún quedan porfirinas asociadas a las proteínas. Por esa razón se hicieron las determinaciones de porfirinas para poder calcular la cantidad que se estarían incluyendo en el medio de incubación al determinar actividad enzimática. Los resultados indicaron que el contenido en porfirinas de las muestras que se usan como preparación enzimática es menor al 1 % de la cantidad de nmoles de urogen que se usan como sustrato, por lo que se concluyó que no afectarían los resultados.

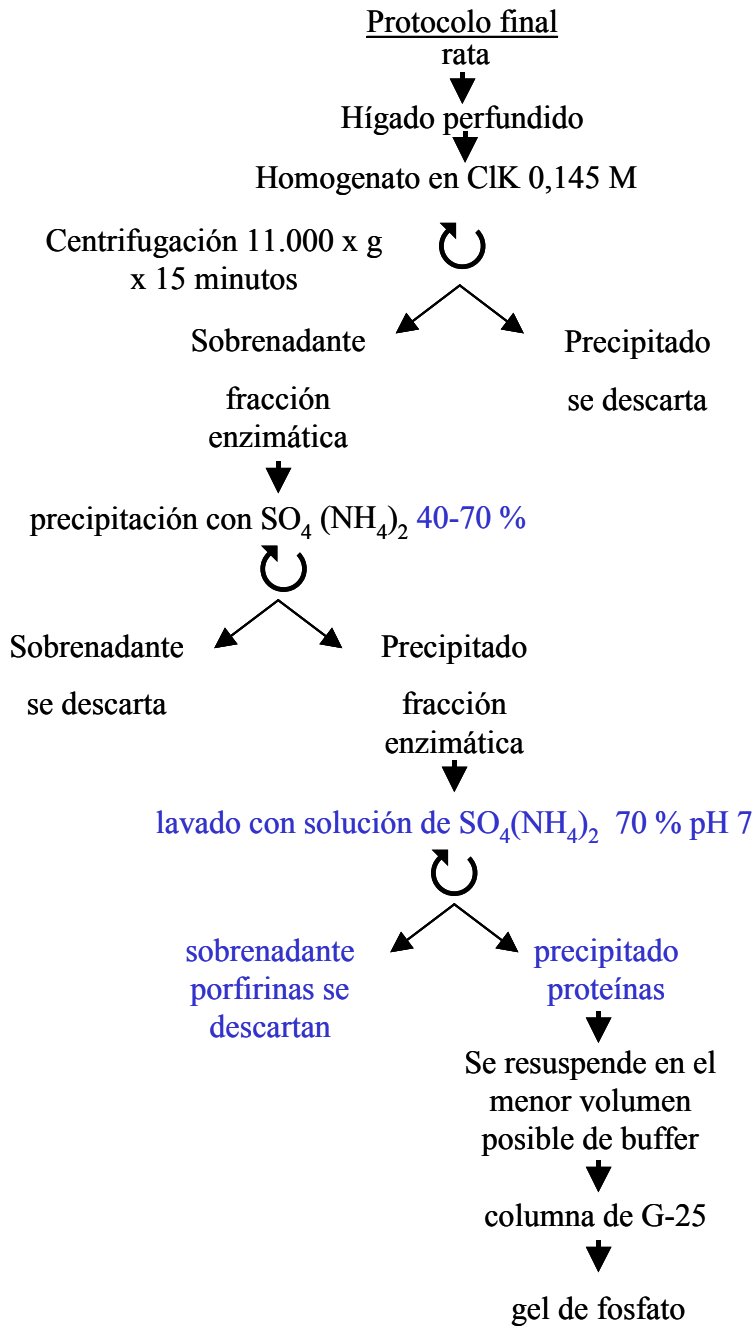
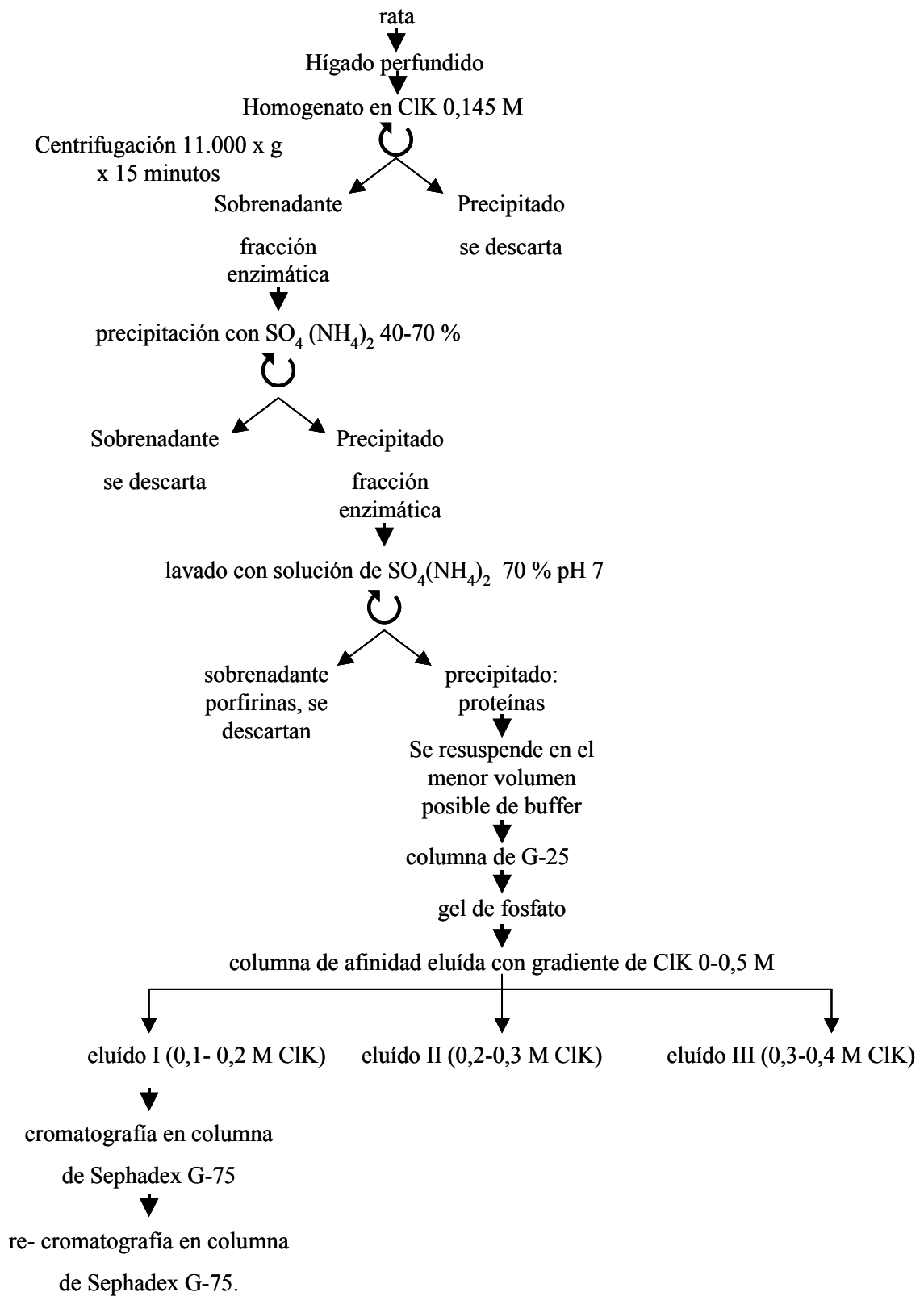


Figura 2: Segundo esquema de purificación utilizado para la purificación de la enzima UROD proveniente de hígado de ratas tratadas con HCB.

II. 2. 2. Purificación de la enzima proveniente de ratas porfíricas

Se comenzó con la purificación de la enzima proveniente de ratas porfiricas siguiendo el siguiente protocolo general de purificación:



El conjunto de los eluidos del gel de fosfato desorbido con buffer fosfato 67 mM, pH 6,8, se sembró sobre una columna de afinidad conteniendo uro III como ligando (Materiales y Métodos). El perfil de elución se muestra en la figura 3.

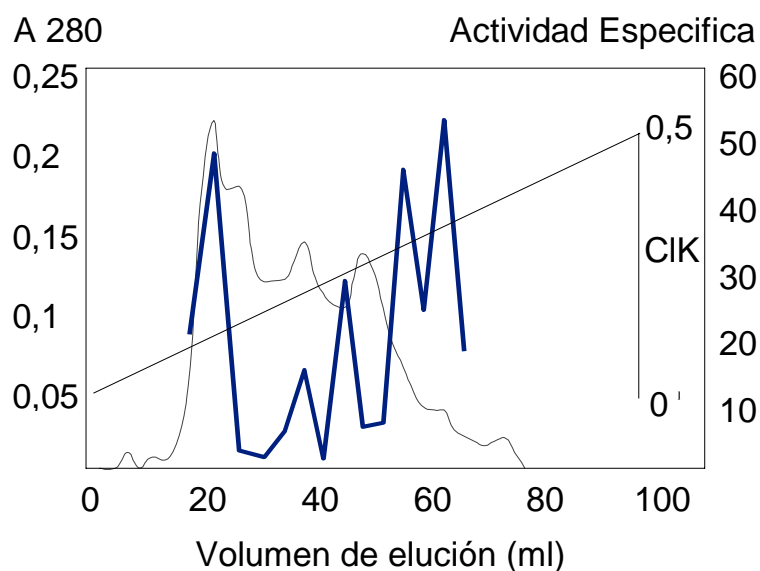


Figura 3. Perfil de elución de la columna de afinidad conteniendo uro III como ligando. El gradiente salino es de 0-0,5 M. El conjunto de proteínas eluidas en el rango 0,1-0,2 M de CIK se precipitaron para ser trabajadas posteriormente. La línea fina indica la absorbancia a 280 nm, mientras que la gruesa muestra la actividad específica, expresada en nmoles de porfirinas / mg de proteínas x 30 minutos.

Las proteínas fueron eluidas con un gradiente salino de CIK 0-0,5 M y agrupadas según la fuerza iónica del eluyente, de la siguiente manera:

- 0,1-0,17 M CIK: eluido I
- 0,17-0,27 M CIK: eluido II
- 0,27-0,37 M CIK: eluido III

Las proteínas, así agrupadas, fueron precipitadas con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 40-70 %, y se guardaron en el freezer hasta su utilización. Se continuó trabajando con el eluido I, el

cual se resuspendió en un pequeño volumen de buffer fosfato 0,134 M, para luego ser sembrado en una columna de Sephadex G-75 (2 x 30 cm), figura 4.

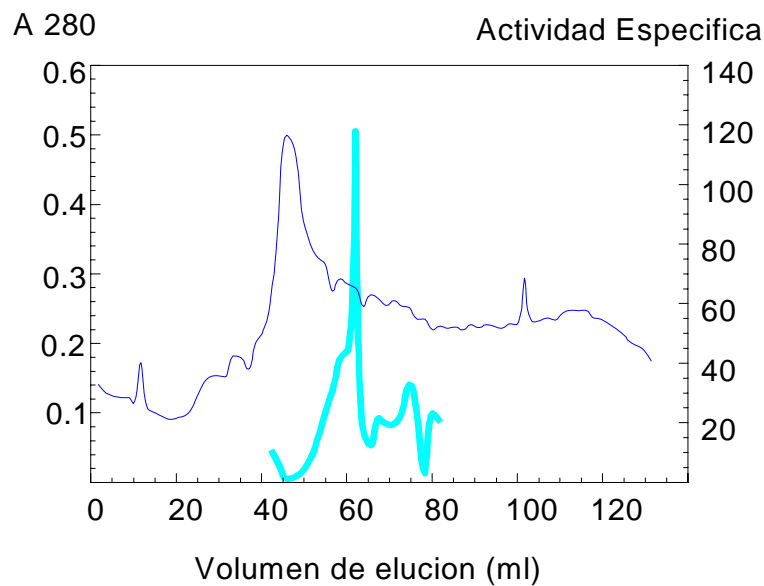


Figura 4: Perfil de elución de la columna de Sephadex G-75 sembrada con el eluido I de la columna de afinidad. La línea fina indica la absorbancia a 280 nm, mientras que la gruesa muestra la actividad específica.

La Figura 4 muestra el perfil de la columna de Sephadex G-75, la cual fue sembrada con el eluido I de la columna de afinidad. Según la calibración previa de la columna de tamizaje molecular, se pudieron estimar los pesos moleculares relativos de los picos de actividad eluidos de dicha columna. El pico de mayor actividad UROD correspondiente a 45 kDa se resembró en la misma columna de G-75, previamente lavada y equilibrada, a los fines de obtener una mayor purificación de la enzima.

Esta misma operación se realizó con el eluido II de dicha columna de afinidad (0.2-0.3 M ClK) (datos no mostrados).

A partir del gráfico de actividades de la figura 4, se seleccionaron los tubos que tenían actividad máxima y que correspondían a masas moleculares de 45 kDa y 30kDa, que se guardaron a -20°C para su posterior caracterización electroforética. Los tubos restantes se agruparon en dos lotes que comprendían: lote I, muestras correspondientes a proteínas de masa molecular mayor a 45 kDa y lote II, eluidos que contienen proteínas de masas moleculares menor o igual a 17 kDa. Estos eluidos así agrupados y los picos de 40 kDa y 30 kDa anteriores fueron concentrados mediante membranas de corte 10.000 y 30.000 y medias su actividad enzimática (Figura 5).

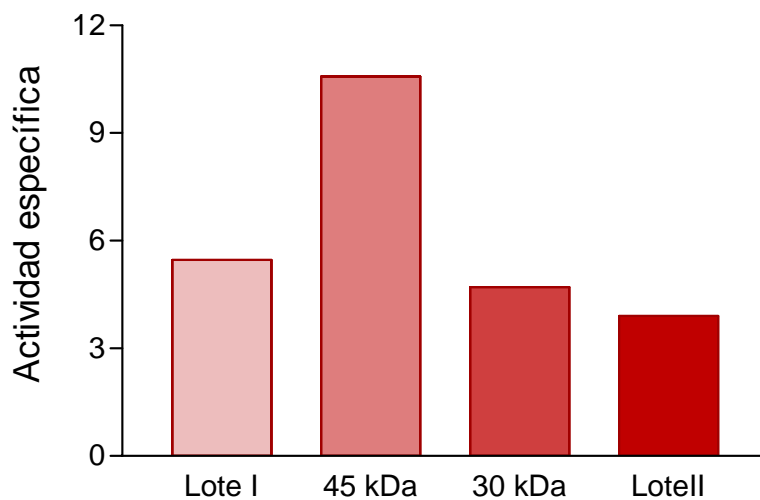


Figura 5: Actividad específica de cada uno de los lotes y de los picos de 45 y 30 kDa.

Una vez concentrados se realizó una electroforesis desnaturizante de las muestras de 45 kDa, 30 kDa y lote II seguida de una inmunodetección por Western blot, según se describe en materiales y métodos. Los resultados de la electroforesis se muestran en la figura 6.

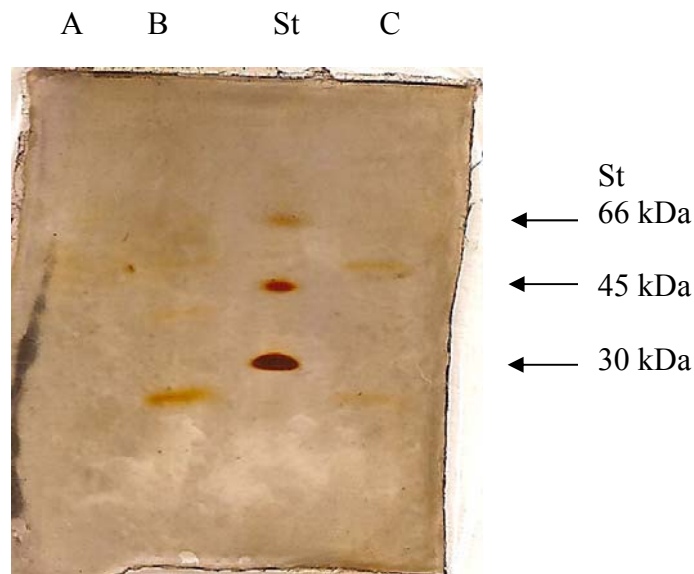


Figura 6: gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS y calor revelado con plata. Calle A, 17.000; calle B, 30.000; calle St, estándares de peso molecular y calle C, 45.000.

La figura 6 muestra una corrida en un gel de poliacrilamida con SDS de los picos correspondientes a los pesos moleculares 17, 30 y 45 kDa, que se sembraron en las calles A, B y C respectivamente, siendo la calle St la correspondiente a los estándares de peso molecular. Teniendo en cuenta los pesos moleculares de los estándares, se estimaron los correspondientes a las distintas bandas obtenidas dando, para la calle C proteínas de pesos moleculares 53.200, 36.800 y 24.200, y para la calle B 50.500, 38.800 y 22.900. En la calle A no se observaron bandas, lo cual pudo deberse a la poca cantidad de proteína sembrada (aproximadamente 1 μ g), lo cual no es detectado por el método de tinción con plata. En el caso de las calles B y C, se sembraron aproximadamente 1,82 μ g y 1,86 μ g respectivamente, casi el doble de lo sembrado en la calle A. Al revelar el Western blot con el anticuerpo anti-UROD no se visualizaron bandas. Esto puede deberse a la poca cantidad de la proteína presente en esta etapa de purificación (últimos pasos) y/o a la baja sensibilidad del método de revelado.

Teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido en ambas columnas de tamizaje molecular y que estos mismos resultados se repetían (aunque en menor grado) en el caso de la purificación de la enzima proveniente de ratas normales se decidió cambiar de procedimiento.

Dada la necesidad de medir actividad UROD de las muestras provenientes de hígado de ratas porfíricas, la cual es muy inferior a la normal, se decidió cambiar el método de detección de los productos de la reacción enzimática por uno más sensible. Al consultar la bibliografía, se decidió ajustar a las condiciones del laboratorio, el método propuesto por Lim *et al.*, (1983), para porfirinas libres el cual emplea un detector de fluorescencia.

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de la purificación era el de poder secuenciar la enzima, el inconveniente del bajo rendimiento en la purificación era sumamente preocupante. Por esta razón se decidieron hacer las siguientes modificaciones:

1. Acortamiento del tiempo y manipulación de las muestras, con posterioridad a la incubación enzimática.
2. Mejoramiento del método de detección de la actividad enzimática.
3. Mejoramiento de rendimiento del método de purificación.
4. Reemplazo de solventes orgánicos por acuosos, con menor grado de contaminación ambiental.
5. Mejoramiento de la reproducibilidad de los perfiles de elución cromatográficos.

1. Acortamiento del tiempo y manipulación de las muestras, con posterioridad a la incubación enzimática.

Anteriormente, las muestras que habían sido incubadas, una vez desproteinizadas y oxidados los porfirinógenos, se filtraban y los extractos se ponían a secar en desecador al vacío (por dos o más días hasta sequedad), se esterificaban las porfirinas con una

mezcla de metanol : ácido sulfúrico (1:20) y se dejaban por 24-48 horas en oscuridad, a temperatura ambiente, para que ocurriera la esterificación de las porfirinas. Sobre la muestra suspendida en la mezcla esterificante, se agregaba una alícuota de cloroformo y la mezcla se neutralizaba con acetato de sodio saturado hasta llegar a pH 4,5. Se separaba la fase clorofórmica y se continuaba extrayendo la fase acuosa con cloroformo hasta fluorescencia negativa bajo luz UV. Los extractos clorofórmicos, libres de agua se concentraban a baño María y presión reducida hasta sequedad. Luego se disolvía en cloroformo el extracto de porfirinas de cada incubado y se sembraban en un aparato de HPLC. Todo este procedimiento insumía aproximadamente 15 días para una experiencia estándar de 20 tubos. Actualmente se reemplazó el sistema de identificación y cuantificación de las porfirinas presentes en el extracto final mediante el empleo de una columna de HPLC que permite separar las porfirinas libres. De esta forma se evita el secado, la esterificación y el pasaje a cloroformo y así el tiempo de tratamiento se reduce de 15 a 1 o 2 días. La eliminación de esta manipulación innecesaria tiene dos ventajas adicionales: la eliminación del uso de solventes orgánicos (que se analiza en el punto 4) y la reducción del lapso de tiempo que debe transcurrir entre una experiencia y la siguiente (que antes era mayor o igual a 15 días con la consiguiente pérdida de la actividad) lo que ahorra tiempo y mejora la recuperación de la actividad.

2. Mejoramiento del método de detección de la actividad enzimática por HPLC.

Anteriormente se detectaba la actividad enzimática por medio de un HPLC con detector UV-visible, el cual se ha sustituido por otro de fluorescencia. Esta sustitución se realizó aprovechando el hecho que las porfirinas, productos de la reacción enzimática oxidados, son fotosensibles y emiten fluorescencia al ser excitados con la luz. Al medir fluorescencia se aumenta la sensibilidad del método lo cual nos permite detectar picos menores, que en el caso de las muestras de animales porfiricos es crucial, dada la menor actividad que presentan.

3. Mejoramiento del rendimiento del método de purificación.

Se cambió la columna de afinidad por una columna de intercambio iónico Mono Q conectada a un aparato de FPLC. La columna de afinidad que se usaba en el protocolo anterior tenía la desventaja de que se perdía gran parte de la actividad enzimática en la siembra y el lavado anterior a la conexión del gradiente. Por otra parte se tardaban entre

2 y 2,5 horas en correr la totalidad del gradiente. En el caso de la columna Mono Q se tarda aproximadamente 30 minutos en correr todo el gradiente, con lo que se preserva la estabilidad de la enzima y se obtiene mejor recuperación. Si bien también se pierde menor actividad en la siembra y en el lavado el rendimiento aún es bajo, por lo que se continuaron ajustando las condiciones, como se describe más abajo. Por otra parte también se mejoró la reproducibilidad de los perfiles de elución de la columna, dada la automatización tanto de la siembra como de la aplicación del gradiente.

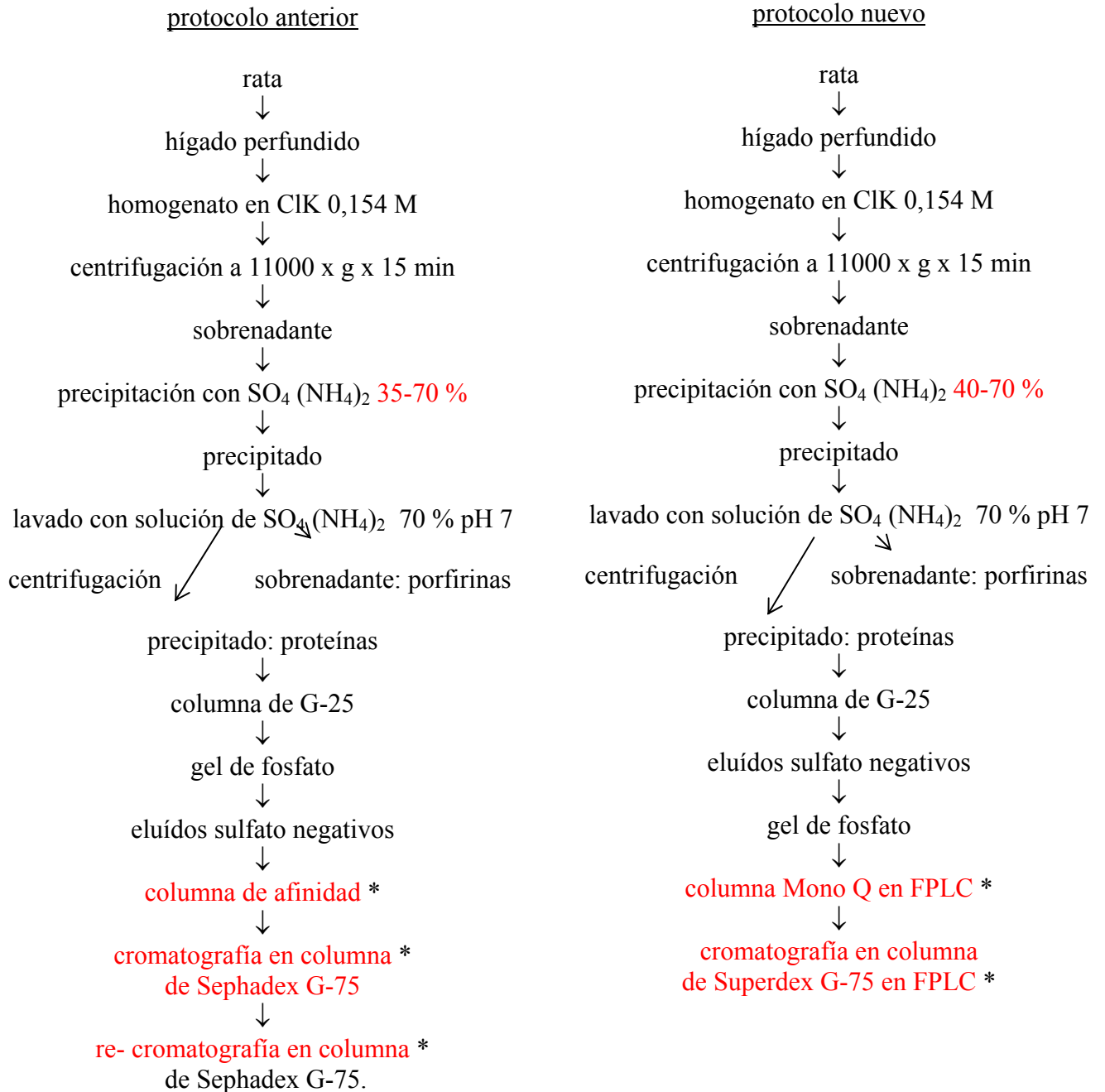
4. Reemplazo de solventes orgánicos por acuosos con menor grado de contaminación ambiental.

Este punto fue muy importante teniendo en cuenta que antes se usaban numerosos solventes orgánicos volátiles, tanto en el pasaje a cloroformo como en el método cromatográfico. La columna que se usaba anteriormente funcionaba con una mezcla de acetato de etilo y n-heptano. Actualmente las muestras se corren en buffer acetato de amonio 1M con un gradiente de 10% a 30% de acetonitrilo, que no produce contaminación del ambiente de trabajo.

5. Mejoramiento de la reproducibilidad de los perfiles de elución cromatográficos.

Como se ha dicho anteriormente la nueva columna de HPLC tiene incorporado un detector de fluorescencia el cual permite detectar menores concentraciones de porfirinas y también da una mejor reproducibilidad de los perfiles de elución de los cromatogramas.

En el siguiente esquema se marcan los principales cambios en el protocolo. El esquema de la derecha es el que se aplicó en el resto del trabajo. De esta manera se diseñó un nuevo protocolo para la enzima de ambas fuentes, sendos protocolos se esquematizan seguidamente:

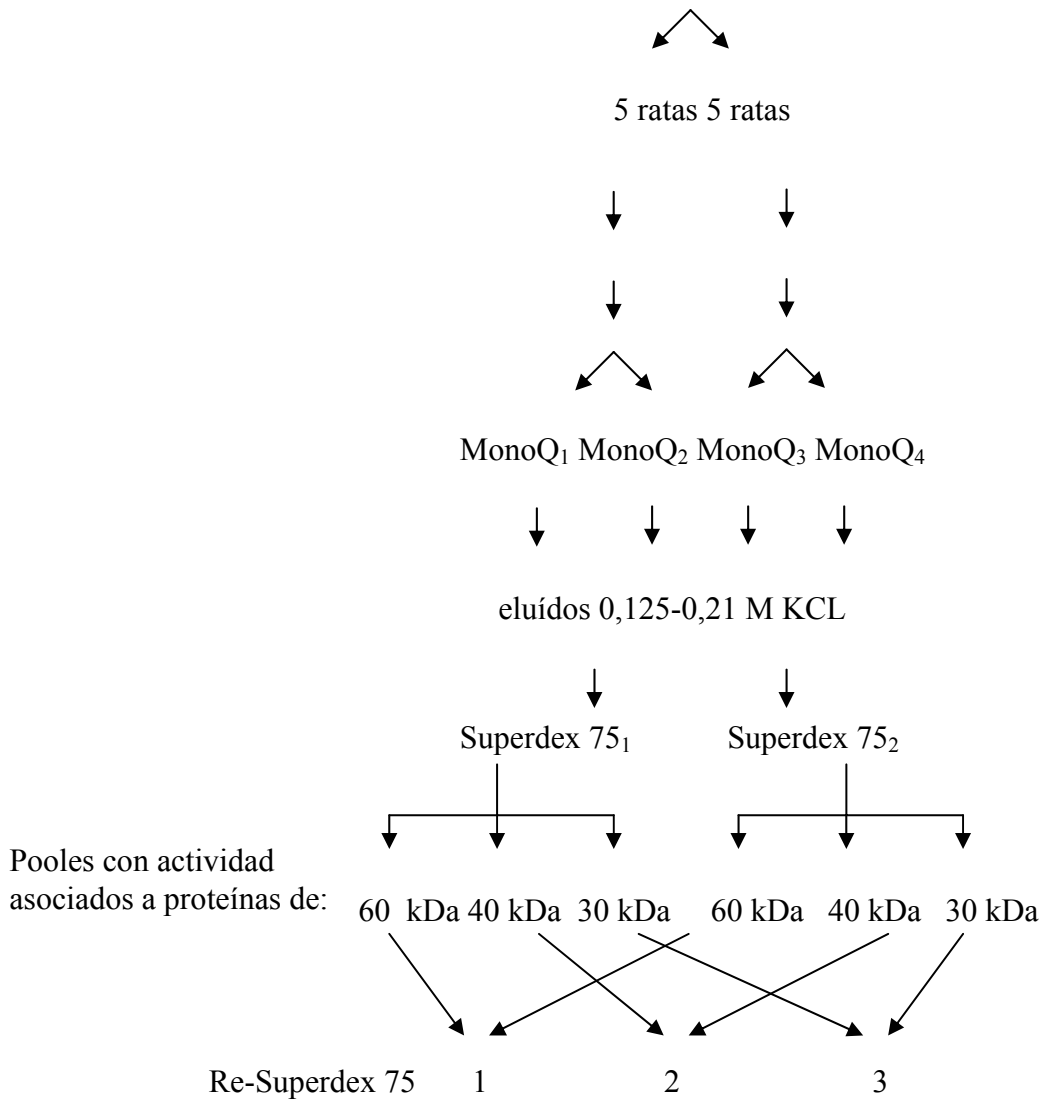


*En todos estos pasos se determina actividad enzimática.

Una vez realizados los cambios de procedimiento pertinentes se continuó con la purificación de la enzima proveniente de ratas porfirica por HCB.

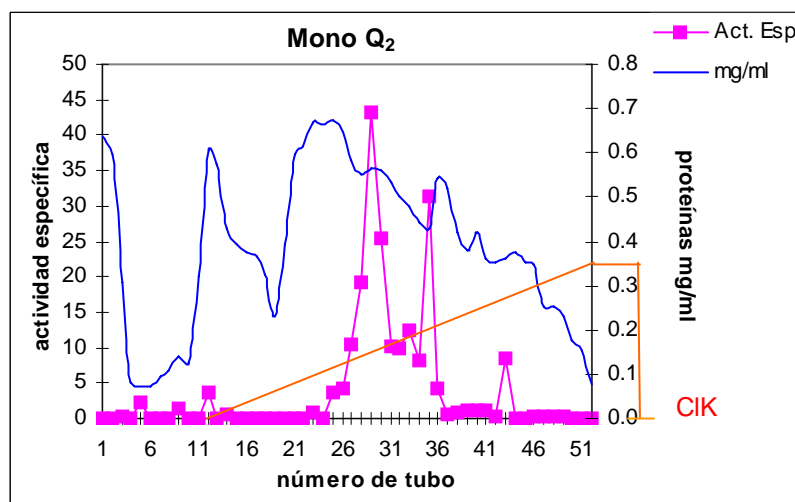
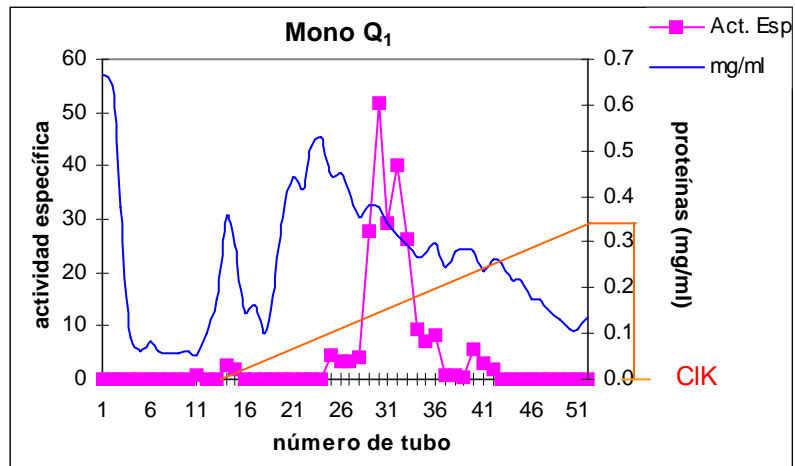
Como fue dicho anteriormente, se decidió cambiar el protocolo de purificación para lo cual se reemplazaron las columnas de afinidad y tamizaje molecular (Sephadex G-75), por sendas columnas de FPLC, de intercambio aniónico (Mono Q) y de tamizaje molecular (Superdex 75) respectivamente. De esta manera se agilizó marcadamente el esquema general de purificación, obteniéndose resultados más favorables en cuanto a rendimiento y reproducibilidad de los perfiles y condiciones de elución. Para lograr una mayor masa de enzima pura, se continuó aplicando el siguiente esquema de trabajo:

10 ratas hembras Wistar porfiricas por HCB



Después de realizar dos columnas consecutivas de intercambio iónico e incubar todos los eluidos separadamente, se determinó a que concentración del gradiente salina asociada la actividad enzimática. De esta manera se estandariza el rango en el cual sale asociada la actividad y al realizar las siguientes columnas de intercambio iónico se juntaron los tubos correspondientes al rango de gradiente que tuvo actividad en la incubación previa, para tener menor pérdida de tiempo y de material.

Por lo tanto, en los dos primeros casos, el eluido del gel de fosfato precipitado con sulfato de amonio (rango 0-70 % de saturación) fue desalado sobre una columna de Sephadex G-25. Los eluidos sulfato negativos se juntaron y se sembraron sobre dos columnas de MonoQ. Los perfiles de dichas columnas se muestran en las figuras 7 y 8.



Figuras 7 y 8: perfiles de elución de dos columnas de intercambio aniónico (MonoQ). Las columnas fueron sembradas con los eluidos sulfato negativo, de sendas columnas de Sephadex G-75, según se describe en Materiales y Métodos. Las muestras fueron sembradas en buffer bis-Tris propano 20 mM y eluidas con un gradiente salino de 0-35 M de ClK, en el mismo buffer. La línea azul indica el perfil proteico, determinado por el método de Bradford, y la línea rosa el perfil de actividad enzimática medido usando uro III como sustrato y expresado en nmoles de urogen decarboxilado / mg de proteína x 30 minutos.

Teniendo en cuenta que la actividad salía asociada a las proteínas que eluían siempre en el mismo rango de concentración de KCl, se realizaron otras dos columnas más sin determinar actividad enzimática (incubación) y se juntaron los eluidos de dicho rango

salino (eluidos entre 0,125-0,21 M KCl de las columnas Mono Q 3 y Mono Q 4) (datos no mostrados).

El conjunto de proteínas eluidas en el rango de 0,125-0,21 M de las columnas MonoQ 1 y MonoQ 2 fueron sembradas sobre una columna de FPLC de tamizaje molecular Superdex 75₁ mientras que los eluidos de las columnas MonoQ 3 y MonoQ 4 fueron precipitados con sulfato de amonio (rango 0-70% de saturación) y mantenidos a -20 °C hasta ser sembradas sobre otra columna Superdex 75₂.

El perfil de elución típico de una de las columnas de tamizaje molecular se muestra en la figura 9.

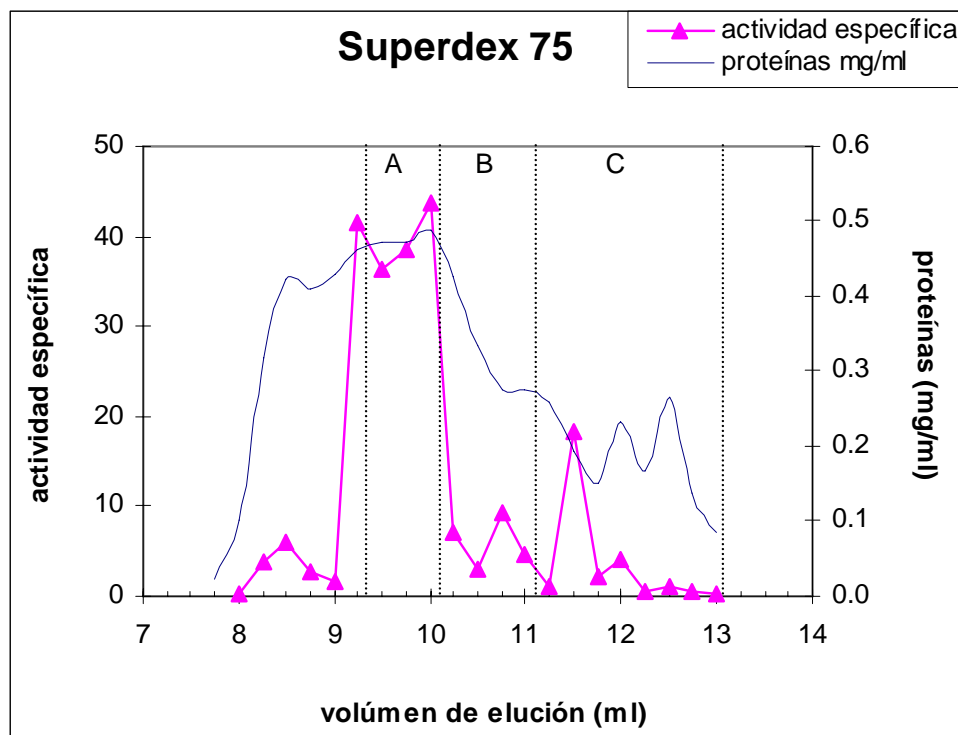
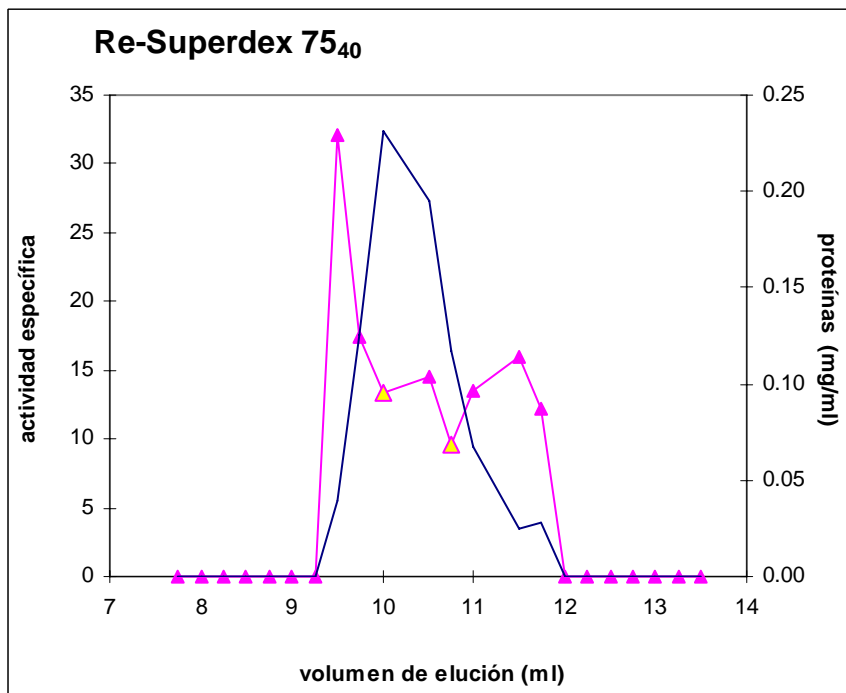
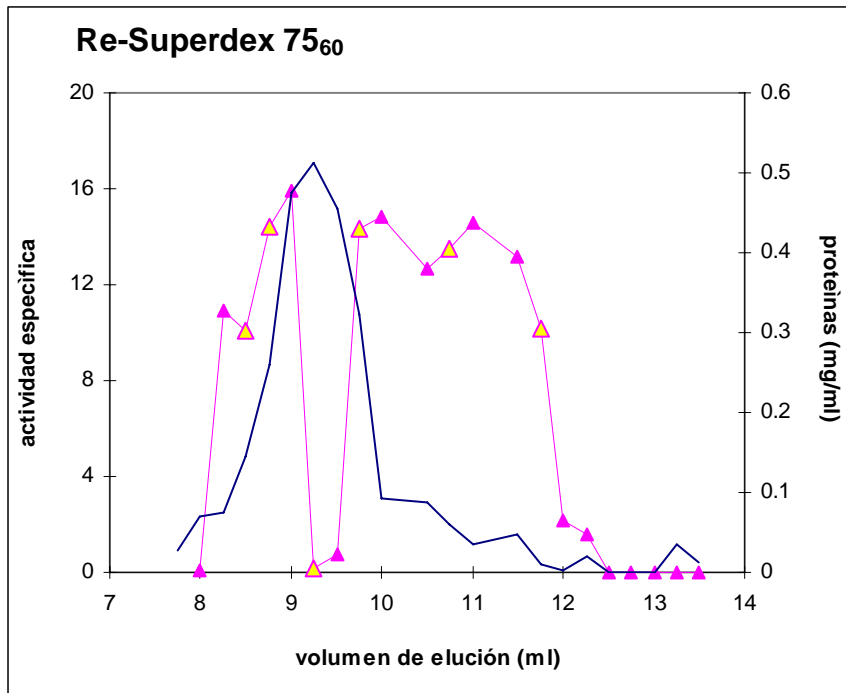


Figura 9: Perfil de elución típico de una de las columnas de tamiz molecular Superdex 75 conectadas a un equipo de FPLC. Las columnas fueron sembradas con los eluidos de las columnas Mono Q (entre 0,125 – 0,21 M ClK). Las proteínas fueron sembradas y eluidas en buffer fosfato 0,134 M, pH 6,8. En línea azul se grafica el perfil de elución de proteínas determinado por el método de Bradford y en rosa el perfil de actividad enzimática determinado usando uro III como sustrato y expresado en nmoles de urogen decarboxilado / mg de proteína x 30 minutos, según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los pesos moleculares estimados fueron determinados a partir de una curva de calibración, cuya ecuación fue $y = -1,4873 x + 6,606$, donde y es $\log PM$ y x es Ve/Vo .

Los tubos de ambas columnas, correspondientes a los picos de actividad con peso molecular alrededor de 60 kDa ^(A), 40 kDa ^(B) y 30 kDa ^(C), se juntaron, cada grupo por separado y se concentraron por medio de membranas de corte 10.000 (Amicon®). Luego cada grupo se resembró sobre una columna de Superdex 75 (60, 40 y 30) dando los perfiles de elución que se muestran en las siguientes figura.



Figuras 10 y 11: perfiles de elución de 2 re-cromatografías en tamiz molecular Superdex 75 conectadas a un equipo de FPLC. Las columnas denominadas 60 y 40 fueron sembradas con los picos de actividad de 60 kDa y 40kDa, respectivamente. Las proteínas fueron sembradas y eluidas como se describe en la figura 9. En línea azul se grafica el perfil de elución de proteínas determinado por el método de Bradford y en rosa el perfil de actividad enzimática determinado usando uro III como sustrato y expresado en nmoles de urogen decarboxilado / mg de proteína x 30 minutos, según se describe en la sección de Materiales y Métodos. En color amarillo se

marcan los eluidos que luego fueron sembrados sobre las SDS/PAGE. Los pesos moleculares estimados fueron determinados a partir de una curva de calibración, cuya ecuación fue $y = -1,4873 x + 6,606$, donde y es $\log PM$ y x es V_e/V_o .

Como se puede ver en la figura 10 el pico de proteína eluye alrededor de los 9,5 ml y esto corresponde a proteínas de 65 kDa, indicando quizás una especie dimérica. Por otra parte se ve que la actividad está distribuida a lo largo de casi toda la elución. Esto puede deberse posiblemente a una degradación de la enzima, manteniendo algunas especies activas.

La figura 11 representa la re-cromatografía del concentrado de los eluidos activos de alrededor de 40 kDa. En este caso la actividad sale asociada a proteínas de peso molecular 65,6 kDa, 42,6 kDa y 27,6 kDa. La existencia del primer pico puede deberse a una asociación proteica, y estaría indicando que la especie dimérica tiene mayor actividad que la proteína de 40 kDa, mientras que el pico de 27,6 kDa puede ser un producto de degradación del de 42,6 kDa, que aún mantiene actividad.

También se realizó la re-cromatografía del pico de 30 kDa en la que sólo se obtuvo dos tubos con actividad, en una zona intermedia entre 30 y 45 kDa (datos no mostrados). Este corrimiento posiblemente se deba al desplazamiento del equilibrio monómero \leftrightarrow dímero producido por la gran dilución de la proteína.

A continuación se corrieron geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la siembra de cada una de las columnas arriba mencionadas y sus perfiles electroforéticos se muestran en la figuras 12 y 13.

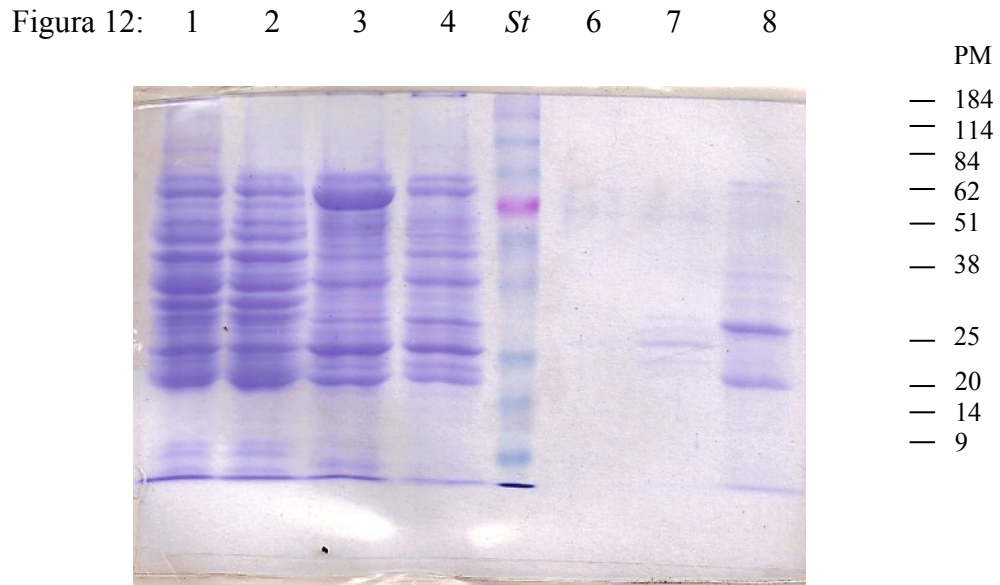


Figura 12: SDS/PAGE teñido con colorante de Coomassie. Las calles 1 y 2 corresponden a las siembras de las columnas de Mono Q 1 y 2 respectivamente. Las calles 3 y 4 corresponden a las siembras de las columnas de Superdex 1 y 2 respectivamente. La calle *St* corresponde a la siembra de los estándares de peso molecular. Las calles 6, 7 y 8 corresponden a las siembras de las re-cromatografías de los pools de 60, 30 y 40 kDa respectivamente.

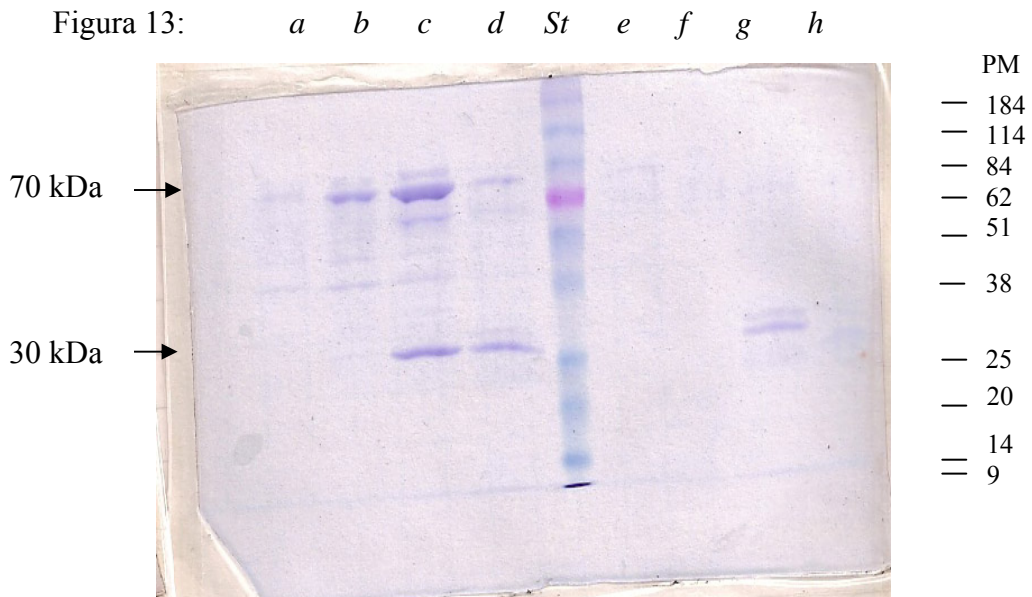


Figura 13: SDS/PAGE teñido con colorante de Coomassie. Las calles *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f* corresponden a los tubos de la re-cromatografía de 60 kDa que salen asociados a volúmenes de

elución de 8,5, 8,75, 9,25, 9,75, 10,75 y 11,75 ml de elución respectivamente, marcadas en dicha columna con color amarillo. Las calles *g* y *h* corresponden a los tubos de la re-cromatografía de 40 kDa que salen asociados a volúmenes de 10 y 12 ml respectivamente, marcados en la columna en color amarillo. La calle *St* corresponde a la siembra de los estándares de peso molecular.

Como se puede ver en la figura 12, las 4 calles a la izquierda de la calle de los estándares corresponden a muestras en un estado de purificación intermedio (calle 1 y 2 siembras de Mono Q₁ y Mono Q₂, calle 3 y 4 siembras de Superdex 1 y 2). Por esta razón se ven varias bandas proteicas que se tiñen con el colorante de Coomassie. Hacia la derecha en las calles 6, 7 y 8, las muestras son mucho más puras con menos bandas proteicas. En la calle 6 se ven dos bandas tenues de 60 kDa y 27 kDa. En la calle 7 se ven una banda alrededor de 65 kDa y varias bandas de peso molecular entre 32,6 kDa y 22,7 kDa. La calle 8 correspondiente a la siembra de la Superdex 75₆₀ se ven tanto bandas con pesos moleculares que rondan los 75 kDa, como bandas con pesos moleculares que rondan los 45 kDa y 35 kDa. Esto puede deberse, como se dijo anteriormente, por un lado a asociaciones proteicas (equilibrio monómero ↔ dímero), por el otro lado a la degradación de la proteína de 45 kDa que generaría una especie de 35 kDa, con actividad enzimática.

En la figura 13 se observa otro gel en el cual se sembraron los eluidos, marcados en amarillo, de las figuras 10 y 11 (Re-Superdex 75₆₀ y Re-Superdex 75₄₀). En las calles *a* y *b* se ven bandas dentro del rango de 71 kDa y 41 kDa, enriqueciéndose más en las de alto peso molecular en la calle *b*. En la calle *c* se ven más número de bandas proteicas siendo las mayoritarias las de alrededor de 71 kDa y 30 kDa, mientras que en la calle *d* las bandas mayoritarias rondan los 30 kDa y las de alto peso molecular son mucho más tenues. Este efecto se debe a que en la calle *c* se sembró el eluido correspondiente al pico proteico de la columna y en las calles adyacentes los correspondientes a las bajadas de ambos lados (ver figura 10, eluidos en amarillo). También podría explicarse como un equilibrio dímero ↔ monómero que mantiene actividad a lo largo de la columna de tamiz molecular y se ve reflejado en el SDS/PAGE en bandas entre 70 kDa y 30 kDa, respectivamente. Por otro lado en las calles *e* y *f* se observan bandas de aproximadamente 70 kDa que corresponderían a especies multiméricas (al menos dos de peso molecular cercano). Nuevamente estos datos avalan la hipótesis de que las especies monoméricas tienen gran tendencia a asociarse cuando están muy diluidas. Por

último en las calles *g* y *h* (que corresponden a los eluidos marcados de la recromatografía de 40 kDa) se ven bandas de aproximadamente 30 kDa.

Paralelamente se sembraron las mismas muestras corridas en las calles *c*, *d*, *g* y *h* sobre otro gel de SDS/PAGE al que se le realizó la transferencia a membrana de PVDF (datos no mostrados) y se mandó a analizar al LANAIS de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Los resultados tanto el *Western blot* como el análisis de aminoácidos fueron negativos, debido a la muy baja cantidad de proteína, posiblemente agravado por una mayor degradación de la muestra al momento del ensayo.

Se decidió armar una nueva columna de intercambio iónico con una resina de similares características a la anterior (SOURCE™ 15Q) pero de mayores dimensiones (7,5 cm x 1 cm y volumen total de 8.5 ml, mientras que la columna Mono Q anterior era de 5 cm x 0.5 cm y volumen total de 1 ml) de manera tal de poder sembrar mayor cantidad de muestra en un solo paso. En este sentido hemos realizado una primera experiencia, en la que se ha sembrado las muestras provenientes de 15 ratas intoxicadas con HCB realizando el protocolo nuevo desarrollado en la página 83, pero suplantando la columna Mono Q por la 15Q (de mayores dimensiones). La figura 14 muestra el perfil de actividad enzimática, donde se puede ver que la UROD eluyó en el rango de 0,22 – 0,26 M KCl (Figura 14).

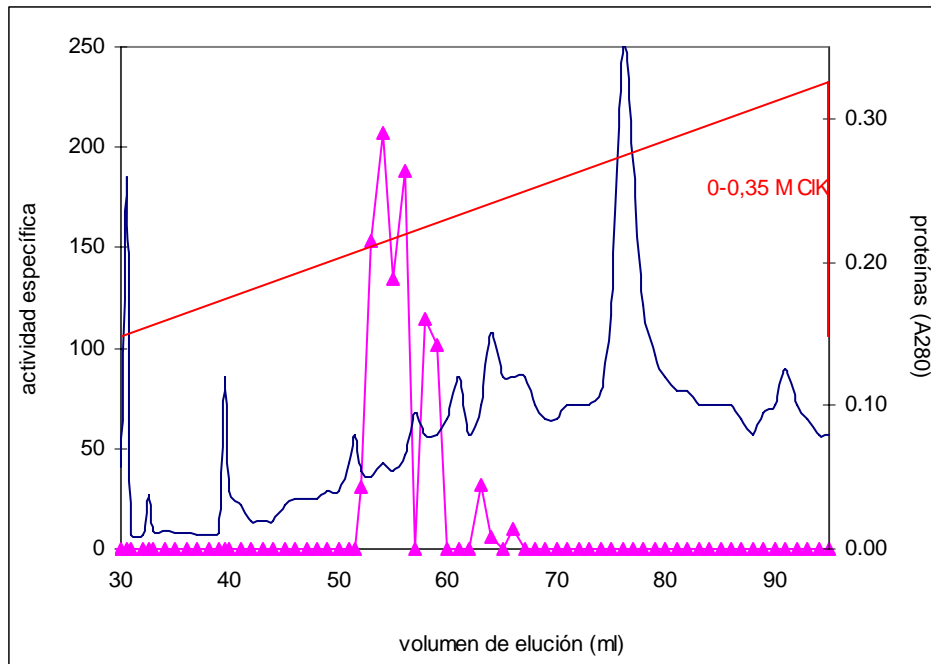


Figura 14: Perfil de elución de la columna de intercambio iónico 15Q. La columna fue sembrada con los eluidos sulfato negativo, de sendas columnas de Sephadex G-25, según se describe en Materiales y Métodos, igual que se realizó para la columna Mono Q. La muestra fue sembrada en buffer bis-Tris propano 20 mM y eluía con un gradiente salino de 0-0,35 M de ClK, en el mismo buffer. La línea azul indica el perfil proteico, determinado por el método de Bradford, y la línea rosa el perfil de actividad enzimática medido usando uro III como sustrato y expresado en nmoles de urogen decarboxilado / mg de proteína x 30 minutos.

Por otra parte, se envió al mismo centro, una muestra en solución, conteniendo el eluido de una re-cromatografía correspondiente a 29 kDa (35 kDa en gel de poliacrilamida) de una muestra proveniente de un hígado normal (trabajo realizado en colaboración con la Dra. M. Corvi). En la tabla 1 se presentan los datos de la composición porcentual informada y los datos obtenidos de la literatura. Como puede verse, la composición de nuestra muestra tiene un porcentaje de aminoácidos muy similar a las informadas por Mukerji y Pimstone (1992) y casi igual al contenido en aminoácidos aromáticos, importantes para la actividad enzimática, informados por de Verneuil *et al.* (1983) (7,2 vs 7,6) (cita tabla 1).

aminoácidos		Romana <i>et al.</i> (1987)	Nosotros 35 kDa	Mukerji y Pinstone (1992) 35kDa	de Verneuil <i>et al.</i> (1983) 46 kDa
		Valor %			
M	Metionina	1,8	1,7	1,3	2,4
E	Acido glutámico	6,9	10,3	13,0	13,9
A	Alanina	10,9	9,2	8,25	9,75
N	Asparragina	2,5	0	10,2	7,8
G	Glicina	7,6	8,8	7,6	7,6
P	Prolina	5,8	4,8	2,9	6,7
L	Leucina	12,4	5,5	9,8	11,5
Q	Glutamina	4,4			
F	Fenilalanina	4,7	2,9	2,5	4,6
K	Lisina	5,1	8,1	6,0	3,8
D	Acido aspártico	5,1	26,5		
T	Treonina	5,1	2,95	6,0	4,6
R	Arginina	7,6	5,5	4,5	6,1
W	Triptofano	0,7			

Y	Tirosina	3,3	3,3	3,5	3,0
C	Cisteína	1,8	0	5,1	1,9
S	Serina	3,4	4,05	8,6	3,7
V	Valina	5,1	2,4	5,4	33
H	Histidina	2,5	2,4	1,6	2,4
I	Isoleusina	2,9	1,5	3,8	4,5

Tabla 1: Comparación de la composición aminoacídica de la enzima UROD proveniente de ratas normales con su homóloga de eritrocitos informada por Mukerji y Pimstone (1992), Romana *et al.* 1987 y De Verneuil *et al.*, 1983. ND indica no detectable y en color celeste se marcaron los aminoácidos que presentaron similar número de residuos / mol de UROD (se consideraron valores similares aquellos en que la diferencia de porcentaje es < 18 %).

II. 3. Discusión

En este trabajo de Tesis se describe por primera vez la purificación de la UROD proveniente de hígado de ratas intoxicadas con HCB. Se han probado diferentes protocolos de purificación maximizando así el rendimiento y la purificación de la enzima de esta fuente. La obtención de la enzima pura y su caracterización ayudará a esclarecer el mecanismo por el cual, en patologías como la Porfiria Cutánea Tarda, se produce el descenso de la actividad enzimática.

Se realizó una serie de modificaciones al protocolo original (utilizado para la enzima proveniente de hígado de ratas normales) con el fin de separar las porfirinas libres y asociadas a proteínas, presentes en los hígados tratados con HCB, mayoritariamente uro y hepta, ya que se sabe por datos bibliográficos que las porfirinas inhiben la actividad enzimática. Para tal fin se implementaron lavados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, centrifugaciones diferenciales y columna de tamizaje molecular (Sephadex G-25). Después de aplicar esta serie de procedimientos se llega a la conclusión que el mínimo de fluorescencia, asociado a proteínas, que se sigue observando bajo luz UV es despreciable frente a la cantidad de nmoles de urogen que se emplean en las mediciones de actividad y por lo tanto, no afectan al resultado final.

La columna de tamizaje molecular, Sephadex G-75, presentó un pico mayoritario asociado a una masa molecular relativa de 45 kDa. Al sembrar tanto este pico como los adyacentes en un SDS/PAGE se visualizaron 3 bandas reveladas con plata, lo que sugiere la coexistencia de especies de masa moleculares diferentes. Una de ellas corresponde, probablemente, a una especie dimérica y la de menor peso a un producto de hidrólisis de la especie de 45 kDa, que retiene actividad enzimática. Asumiendo que este tipo de especies también tiende a dimerizarse, se puede explicar el desdoblamiento en dos bandas de masa molecular relativa muy cercana, detectadas en el revelado de la SDS/PAGE, para la especie de 70 kDa.

Si bien con el protocolo de purificación se pudo lograr un pico mayoritario en el último paso de purificación (columna de tamizaje molecular) la reproducibilidad del perfil de elución era muy dificultosa. Por esta razón se decidió emplear columnas asociadas a un aparato de FPLC. Se suplantaron así las columnas empleadas (afinidad y

tamiz) por una columna de intercambio iónico (MonoQ) y otra de tamizaje molecular (Superdex 75).

Comparando los perfiles de actividad entre la columna de afinidad y su reemplazo (la columna MonoQ) se observa que ahora la actividad sale asociada en un rango de gradiente menor, lo cual nos beneficia a la hora de elegir qué sembrar en el paso posterior (columna de tamizaje molecular). Con el protocolo anterior se había separado el eluido de la columna de afinidad en tres partes para no perder eluidos activos. Esto se evita con este nuevo protocolo, ya que la actividad sale ahora asociada a un pico y siempre en el mismo rango de gradiente, 0,125-0,210 M ClK, lo cual facilita y agiliza el procedimiento de purificación.

En la columna de tamizaje molecular Superdex 75 se ven dos picos mayoritarios de actividad con masa molecular relativa de 60 kDa. Esto coincide con los datos obtenidos por otros autores los cuales postulan que la proteína nativa tiene una masa molecular de 58 kDa (de Verneuil *et al.*, 1983) o de 66 kDa (Phillips *et al.*, 1997), valores intermedios entre los reportados para el monómero (45 kDa) y para el dímero (90 kDa). Esto podría explicarse como consecuencia del comportamiento de una proteína dimérica. En este caso, si la dimerización es reversible, a medida que la proteína va atravesando la columna va experimentando equilibrios entre su forma dimérica y monomérica y por tal razón los picos de actividad se irán corriendo en función del tiempo y el grado de dilución (Akers y Tompson, 1965; Phillips *et al.*, 1997). De esta manera se registran valores de actividad enzimática asociados a especies de alto peso molecular (dímero) y a especies de peso molecular menores (monómero) y según los tratamientos aplicados, los pesos moleculares estimados fluctuarán entre los valores del dímero y monómero ya mencionados.

También se observan que los picos son asimétricos, perfiles que se repiten al realizar las re-cromatografías. Esto también se puede explicar por el modelo de equilibrio dímero \leftrightarrow monómero propuesto por Graziano en su tesis de licenciatura, en el cual en la re-siembra de picos de actividad se observa una variación en el volumen de elución a medida que se alcanza dicho equilibrio. Este tipo de comportamiento también es observado por Phillips *et al.* quienes describieron el comportamiento de disociación de especies multiméricas de la UROD a través de una columna de tamizaje molecular o filtración en gel (Akers y Tompson, 1965; Graziano, 2006; Phillips *et al.*, 1997).

Al analizar la SDS/PAGE de la re-Superdex 75₆₀ (Figura 13) se ve un corrimiento hacia valores de mayor peso molecular (calles *a*, *b* y *c*, 73 kDa) y valores de menor peso molecular (calles *c* y *d*, 37 kDa) que corresponderían al dímero y monómero, respectivamente. También se detectaron especies de masa molecular relativa intermedias, posiblemente por asociación del monómero con productos de hidrólisis de diferentes masa molecular. El valor correspondiente al monómero se asemeja a los propuestos para la UROD recombinante de sangre humana, para el cual se estimó un valor de 43,3 kDa a partir de su secuencia aminoacídica (Phillips et al., 1997).

De esta manera se podría concluir que la enzima proveniente de hígado de ratas porfiricas por HCB también es un dímero en solución, el cual se mantiene en un equilibrio con su monómero, manteniendo ambos actividad enzimática, aunque mucho menor que en el caso de la proteína proveniente de hígado de ratas normales.

Si bien hemos logrado mejorar el procedimiento de purificación de la enzima proveniente de ratas intoxicadas con HCB, su inestabilidad y su menor actividad, hicieron muy dificultoso obtener una cantidad apreciable de enzima pura y activa para poder ser analizada por actividad y secuenciación.

Al enviar la muestra a secuenciar resultó insuficiente la masa obtenida. En un futuro, se continuará intentando lograr una mayor cantidad de masa de enzima activa tratando de acortar aún más el tiempo de manipulación de la muestra. De esta manera podremos corroborar los resultados obtenidos tanto de la elución de la columna de tamiz como los arrojados por el SDS/PAGE, en el cual la proteína se comporta como un dímero en solución.

La columna de intercambio iónico de mayor capacidad que hemos preparado nos permitió una buena resolución y con una actividad UROD asociada a un acotado rango de gradiente.

Por otra parte, de nuestro trabajo realizado con ratas normales con la Dra. Corvi (quien realizó el trabajo de purificación de la enzima de esta fuente) pudimos comprobar que la misma presenta alta similitud en el porcentaje de aminoácidos con respecto a las isoformas caracterizadas por Mukerji y Pinston (1992). Dado que en este trabajo de Tesis se ha aplicado un esquema similar al utilizado para purificar la enzima proveniente de ratas normales esperamos, en el futuro, poder alcanzar la masa necesaria

de UROD proveniente de ratas porfíricas, para realizar un estudio de aminoácidos similar al informado para las ratas normales y, en lo posible, enviar a secuenciar dichas especies.

Por otra parte también sería importante disponer de mayor cantidad de enzima pura para volver a determinar alguna de las características cinéticas, bajo iguales condiciones de sustrato y proteína, ya que como hemos intuido por nuestros resultados y recientemente lo verificara el Lic. Martín Graziano en su tesis de licenciatura, la actividad UROD depende del equilibrio monómero \leftrightarrow dímero, el cual a su vez depende de la concentración de la enzima (Graziano, 2006).

Los datos de purificación obtenidos hasta el momento no nos permiten inferir la presencia de un inhibidor en la muestra presente en ratas porfíricas, dado que aunque existiera y no lo hubiéramos separado durante la purificación, este hecho no se ha visto reflejado en un aumento de la actividad total, dada la pérdida de la actividad provocada por la inestabilidad de la enzima. Creemos, por lo tanto, que sería importante llegar a secuenciarla para determinar si se ha producido una alteración en la estructura primaria debido al tratamiento con HCB, posiblemente produciendo productos de hidrólisis que afectan el sitio y/o el centro activo.

Teniendo en cuenta los datos aportados en el capítulo anterior sobre las diferencias cinéticas presentadas por esta enzima, respecto de la proveniente de ratas control, no podemos descartar la posibilidad de la existencia de un inhibidor, la cual justificaría las diferencias encontradas. Este inhibidor debería estar fuertemente unido a la enzima proveniente de ratas porfíricas por HCB ya que la actividad se encuentra disminuida respecto del valor control, aún en los últimos pasos de purificación. Es posible también que el inhibidor pueda llegar a provocar las alteraciones conformacionales y funcionales encontradas en la UROD proveniente de esta última fuente.

***Capítulo III:
La Uroporfirinógeno decarboxilasa como
indicador de contaminación ambiental***

III. 1. Introducción

Un problema actual muy importante es la contaminación de cuerpos de agua por compuestos orgánicos extremadamente tóxicos como herbicidas, pesticidas e hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAPs). Los HAPs ingresan en los ecosistemas acuáticos por diferentes fuentes y pueden persistir en ellos por varios años. Entre estos compuestos, el HCB, es uno de los 12 contaminantes orgánicos catalogado entre los COPs (Contaminantes Orgánicos Persistentes) por el Convenio de Estocolmo, que entró en vigencia el 17/05/04 (USEPA, 2006). Este convenio fue firmado por 50 países que se comprometieron a eliminar la producción de COPs y reducir su emisión al ambiente.

El HCB puede persistir, con una vida media de 6 años, en aguas superficiales y 11 años en aguas profundas (Cox, 1998). Se ha reportado la presencia de HCB en altas concentraciones (14 µg/L) en ríos de áreas industriales de Europa, Estados Unidos y América del Sur, como resultado de efluentes industriales y vertidos de la actividad agrícola. También se ha visto que el HCB puede permanecer como residuo en sedimentos. Casos de este tipo fueron los hallados por ejemplo, en el río Nilo, con un rango de 3.8-4.5 ng/g ps, con valores más altos rondando los 5-60 ng/g ps en las bahías costeras de la misma zona (Barber *et al.*, 2005). La exposición e ingestión de HCB en humanos y animales daña el hígado, la tiroides, el riñón, el sistema nervioso, el sistema endocrino, el sistema inmune, afectando la reproducción y el desarrollo y provocando efectos mutagénicos y carcinogénicos (Elder, 1998a). Es importante, por lo tanto, estudiar el efecto de este tipo de xenobióticos en distintas cadenas tróficas, para tener un panorama más completo sobre el alcance de sus efectos, al estar presente en diferentes cuerpos de aguas.

Se ha informado que la bioacumulación de HAPs en algas es muy rápida, por lo que cumplirían el papel principal en la persistencia y entrada de estos xenobióticos en la cadena alimentaria del ecosistema acuático. La bioacumulación de HCB en las algas es 570 veces el nivel de exposición y en aves acuáticas (tope de la cadena), 25 millones de veces más altas que en el agua.

El género *Chlorella* constituye una de las microalgas más ampliamente distribuidas en la naturaleza y forma parte del fitoplancton en diversos ambientes acuáticos. Este tipo de

microalgas unicelulares es sensible a los xenobióticos. Además, por poseer un ciclo de vida relativamente corto y por ser fácilmente manipulable en cultivos de laboratorio se usa en pruebas de toxicidad (Caux *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1996).

Una manera de seguir el efecto de estos contaminantes puede ser determinar su efecto sobre el camino metabólico del hemo, estudiando la variación de la actividad de alguna de las enzimas que lo conforman. Las hemoproteínas están ampliamente distribuidas a lo largo de diferentes grupos de animales y forman parte de un gran número de funciones biológicas. Algunos ejemplos de este tipo de proteínas son los pigmentos respiratorios hemocianina y hemoglobina, las enzimas como la catalasa y peroxidasa y proteínas de transporte de electrones del tipo de los citocromos. Por esta razón, la síntesis del hemo es un proceso esencial y muy conservado a lo largo de la evolución. La UROD, una enzima de esta vía, fue extensamente estudiada en el hombre (Elder 1998), en animales vertebrados (Marks *et al.*, 1987; Straka y Kushner 1983; Wang *et al.*, 1998), en levaduras (Felix y Brouillet, 1990), en algas (Juárez, 2003; Juknat *et al.*, 1989) y en plantas (Mock *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta el momento, no se conocen trabajos sobre sus características bioquímicas en tejido de invertebrados.

Chasmagnathus granulatus es un cangrejo de estuario extensamente distribuido en hábitats de salinidad cambiante, a lo largo de las costas de Brasil, Uruguay y Argentina (Boschi, 1964; Spivak, 1997). En algunos de estos hábitats pueden estar sujetos a polución por parte de la agricultura, la industria o por aguas domiciliarias (Comisión Administradora del Río de la Plata 1989, Ronco *et al.*, 1996). Por su dieta omnívora-oportunista, en la cual se incluyen algas, vegetación palustre, restos de peces, crustáceos y moluscos (Botto e Irigoyen, 1979), es de esperar la transferencia de tóxicos desde estos organismos a los cangrejos. Teniendo en cuenta que el hepatopáncreas es considerado el principal órgano detoxificador en los cangrejos (Pinho *et al.*, 2003), sería de interés determinar la presencia de la enzima UROD y cómo es afectada su actividad bajo la exposición a HCB.

La lapa *Nacella concinna* es un molusco gasterópodo ampliamente distribuido a lo largo de las costas antárticas (Cadeé, 1999). Por tener un hábitat intertidial, este molusco es particularmente accesible a contaminantes ambientales del tipo de derrames de diesel. Las lapas no son filtradoras, como otros bivalvos ya ampliamente estudiados como especies

centinelas debido a su capacidad de acumular contaminantes. Sin embargo, viven en aguas superficiales y se alimentan con algas las cuales, por flotación, son fácilmente accesibles a los contaminantes, que terminan acumulándose en ellas. Los hidrocarburos son capaces de penetrar en las lapas, por difusión, hasta el sistema digestivo. La glándula digestiva es el órgano de almacenaje y detoxificación de xenobióticos en moluscos (Livingstone, 1991). Por lo tanto, las enzimas de este órgano estarían relacionadas, directa o indirectamente, con procesos de detoxificación. Algunas de ellas pueden ser buenos biomarcadores para una detección temprana de contaminación, derivada de la actividad humana.

Las aguas del continente Antártico se consideran no contaminadas y representan una vasta reserva natural. Sin embargo la actividad humana concentrada tanto en estaciones de trabajo como en los cruceros turísticos puede producir contaminación, especialmente por combustibles y aguas residuales de las bases científico-militares. El diesel es el combustible usado comúnmente en estas zonas y por esta razón es esperable encontrar derrames involuntarios. Aunque no es considerado un combustible pesado, es capaz de permanecer en la superficie, llegando así hasta las costas y de esta manera es un riesgo de contaminación directa sobre los organismos costeros.

Los peces antárticos han sufrido alteraciones estructurales y funcionales durante el proceso de enfriamiento del Océano Austral, que les permitieron sostener actividades metabólicas comparables a las que poseen los peces de aguas templadas (Ansaldo, 2001; Detrich, 1998). Por otra parte se ha observado que los peces antárticos utilizan preferentemente ácidos grasos poliinsaturados como combustible (Crockett y Sidell, 1993) lo cual puede tener implicaciones en los mecanismos de defensas ante factores tóxicos ambientales. En los peces de la familia Channichthyidae, conocidos como peces de hielo, la carencia de eritrocitos funcionales ha sido el cambio evolutivo más sorprendente (Ansaldo, 2001). Esta pérdida está asociada a un descenso del hematocrito y de la concentración de hemoglobina (característica de los peces de esta familia). Se ha postulado que esto se debería, en parte, a la baja demanda metabólica y a la alta solubilidad del oxígeno en aguas de mar y en plasma, lo que supliría la necesidad de transporte del oxígeno a través de la hemoglobina (Ansaldo, 2001). Los peces del suborden Notothenioidei constituyen el 34,7 % del total de peces antárticos (Ansaldo, 2001). Este grupo constituye un importante

recurso económico ya que varias de estas especies son explotadas comercialmente, dentro de los cuales figuran los analizados en este trabajo de Tesis: la trama jaspeada (*Notothenia rossii*), la merluza negra (*Dissostichus eleginoides*), y los peces de hielo (*Champscephalus gunnari*, *Chaenocephalus aceratus* y *Pseudochaenichthys georgianus*) (Ansaldo, 2001).

La proteína de transporte respiratorio tanto en *C. granulatus*, en *N. concinna*, y en los peces de hielo es la hemocianina la cual se caracteriza por presentar dos átomos de cobre en su centro activo (a diferencia de la hemoglobina que posee hierro). A diferencia de la hemoglobina los átomos de cobre no están unidos a una porfirina sino a grupos prostéticos compuestos por péptidos de histidina.

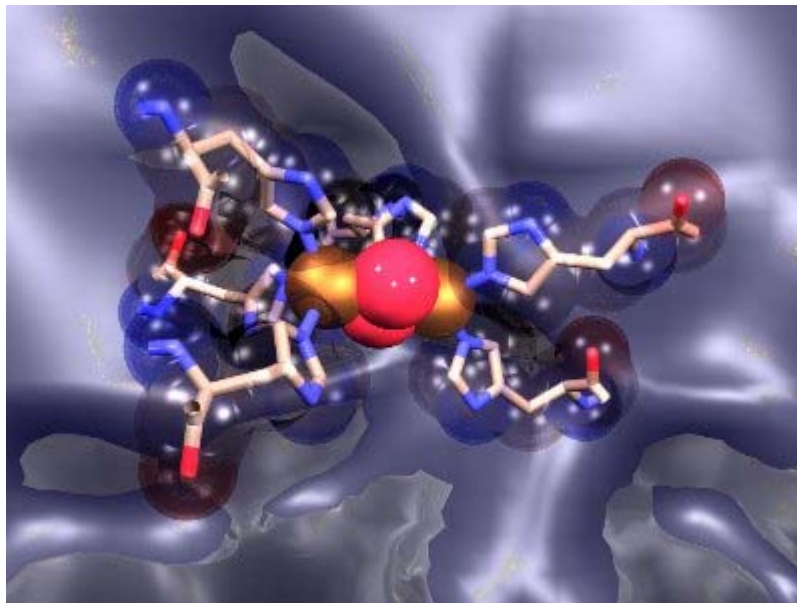


Figura 1: Esquema del centro activo de la hemocianina. En el centro y en rojo se encuentran los átomos de cobre.

De todos modos se sabe que estas especies poseen un activo camino metabólico del hemo, ya que necesitan fabricar hemoproteínas del tipo de las catalasas y los citocromos,

importantes para el sistema de defensa antioxidante y para el metabolismo general. Así, estas especies podrían ser buenos candidatos para el estudio de los efectos de los contaminantes medioambientales tales como los HAPs y/o metales pesados dada la alta sensibilidad de varias enzimas del camino metabólico del hemo a este tipo de tóxicos.

En nuestro laboratorio, hemos realizado la caracterización bioquímica de la UROD de cangrejos, de lapas antárticas y de 5 especies de peces antárticos. Estos resultados nos permitirán proponer nuevos modelos experimentales que servirán en el futuro para realizar estudios ecotoxicológicos.

III. 2. Resultados

III. 2. 1. Actividad UROD en diferentes organismos

III. 2. 1. a. Actividad UROD en hepatopáncreas de *C. granulatus*.

Para determinar las condiciones óptimas de ensayo medimos la actividad UROD de hepatopáncreas de cangrejos (UROD-hc) en sobrenadante de 11.000 x g. Todos los ensayos se realizaron, por duplicado o triplicado, sobre dos muestras, provenientes de 5 - 7 hepatopáncreas de cangrejos cada una.

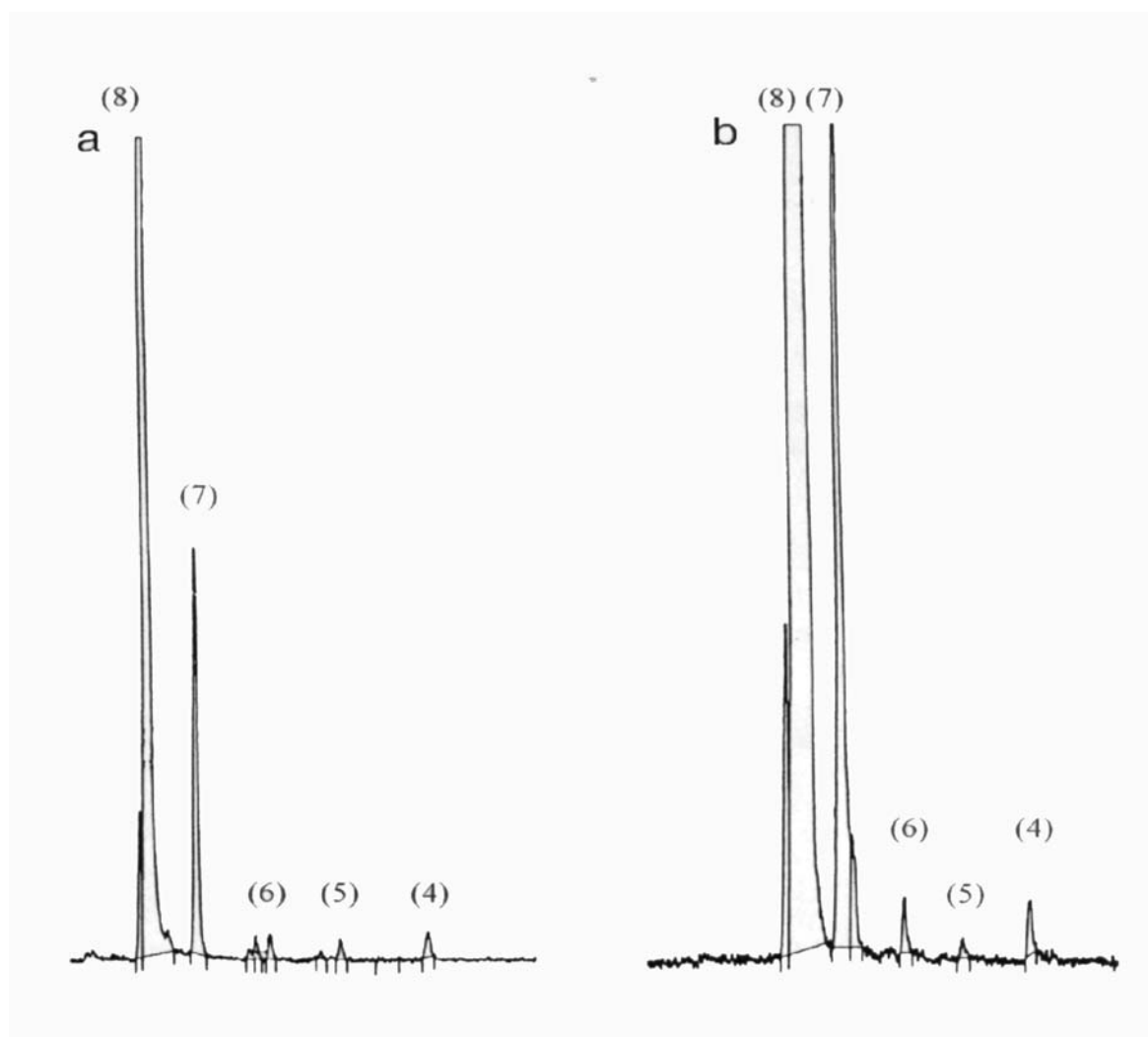


Figura 2: Perfil cromatográfico de los productos de reacción de una muestra proveniente de a) hígado de rata y b) hepatopáncreas de cangrejos, usando en ambos casos Urogen III como sustrato.

La incubación y la separación se realizaron como se detallan en Materiales y Métodos. Se usó una columna de μ Bondapak C18 (30 cm x 3.9 mm) la cual se eluyó con un gradiente de 15 minutos desde 10 % a 30 % de acetonitrilo en buffer acetato de amonio 1 M, pH 5,16, a una velocidad de 1 ml/min, igual al empleado con las muestras de hígado de rata (Capítulo I y II). El detector de fluorescencia fue programado para trabajar con una longitud de onda de excitación de 404 nm y una longitud de onda de emisión de 618 nm. En ambos casos se ve el sustrato remanente, uroporfirina (8), y los diferentes productos de la reacción hepta- (7), hexa- (6), penta- (5) y copro- (4) porfirina.

Los productos finales de la reacción catalizada por la UROD-hc fueron similares a los ya informados para la enzima proveniente de hígado de rata (Figura 2): el sustrato remanente (8COOH), el producto final (4COH) y los compuestos intermediarios de 7-, 6- y 5-COOH. El perfil cromatográfico de los productos de reacción muestra una prevalencia del intermediario 7-COOH por sobre los de 6- y 5-COOH igual a lo ya informado para hígado de rata.

Por otra parte, para determinar las condiciones óptimas de ensayo de actividad UROD-hc se realizaron curvas de actividad en función de las siguientes variables: concentración de proteína, tiempo y concentración de sustrato.

En todos los casos se expresa, como actividad enzimática, la primera etapa de decarboxilación de urogen, la cual representa la formación de todos los intermediarios.

Los estudios de actividad UROD-hc en función de la concentración de proteína incubadas mostraron que la actividad aumentó en forma lineal hasta los 3 mg de proteína en el medio de incubación (Figura 3). Sobre la base a estos resultados se decidió seguir trabajando entre 2,5 y 3,0 mg de proteína, lo cual nos permite medir una buena actividad con buena resolución.

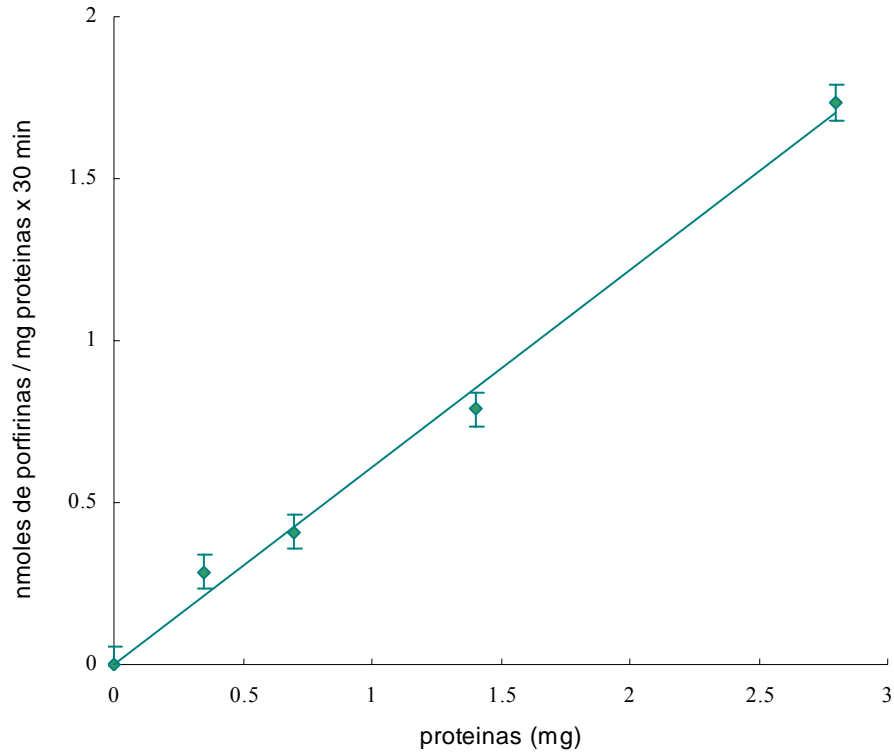


Figura 3: Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad UROD-hc. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos usando como fuente enzimática el sobrenadante de 11.000 x g (primeros pasos de purificación). La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas (hepta- + hexa- + penta- + coproporfirina) por mg de proteína en 30 minutos. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

La actividad en función del tiempo de incubación fue lineal hasta los 30 minutos de incubación (datos no mostrados). Por esta razón se decidió de aquí en adelante incubar por 30 minutos ya que se obtenía una buena resolución, manteniendo la velocidad inicial.

La curva de la actividad en función a la concentración de sustrato mostró un aumento de la actividad específica alcanzando una meseta entre 12 y 16 μ M de urogen III (Figura 4). Con este resultado se asume que entre 12 y 16 μ M estaríamos trabajando a una concentración de sustrato cercana a la saturación.

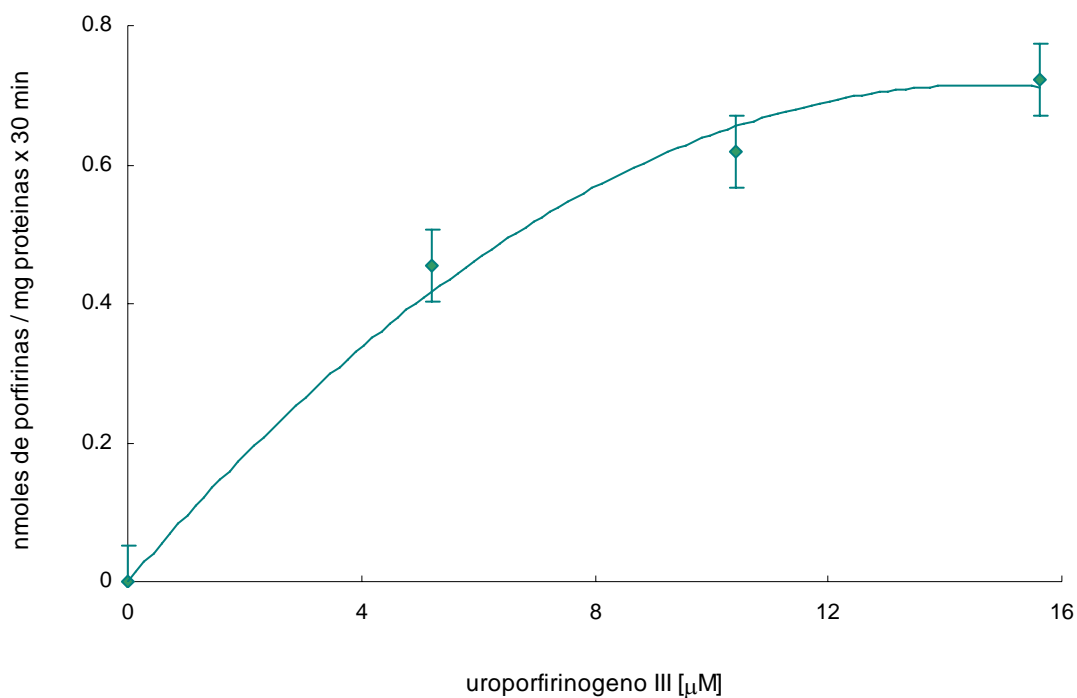


Figura 4: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad UROD-hc. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 2. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en 30 minutos. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Para determinar el pH óptimo de la enzima de esta fuente se realizó una curva entre pH 6,0 y pH 8,0. La actividad UROD-hc alcanzó un máximo a pH 7,2 dando una curva aproximadamente simétrica, tanto para valores más ácidos como para los alcalinos (Figura 5).

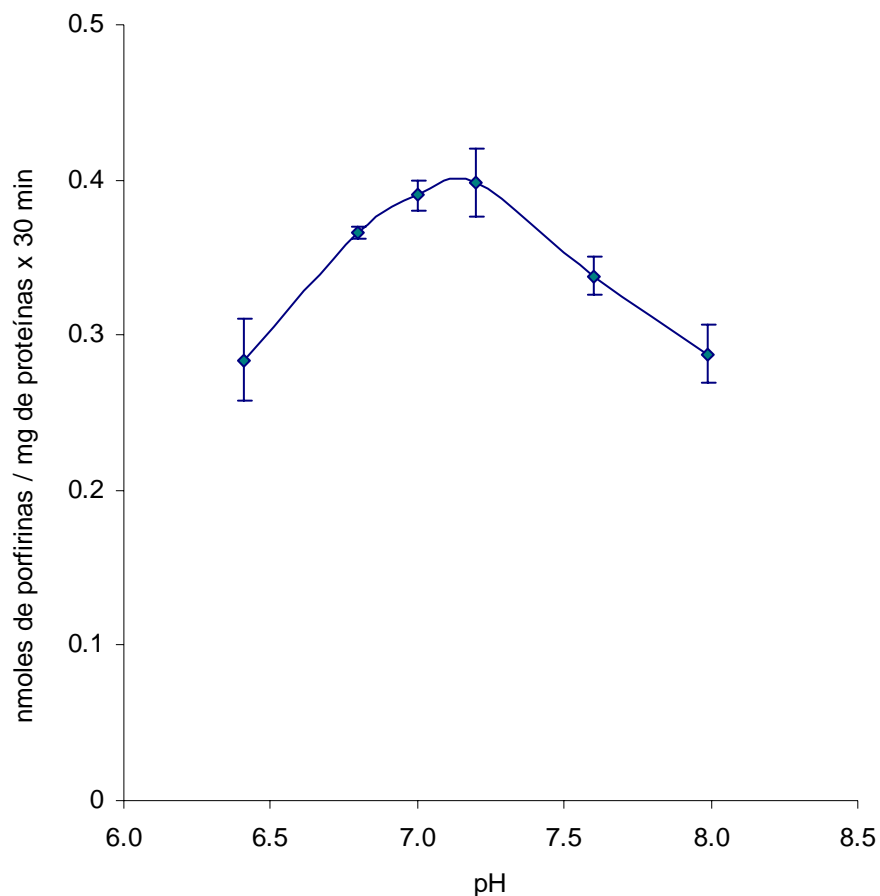


Figura 5: Efecto del pH sobre la actividad UROD-hc. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 2. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en 30 minutos. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

En base a los resultados obtenidos con los ensayos de actividad en función a la concentración de sustrato se determinaron los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ bajo las condiciones óptimas de ensayo. Estos resultados se comparan con los ya obtenidos, en nuestro laboratorio, para hígado de rata normal (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros cinéticos de la UROD de hígado de rata y hepatopáncreas de cangrejo

Fuente	Km (μM)	V_{max}/Km ($\text{U}^* \mu\text{M}^{-1}$)	Energía de activación
Hígado de rata	$1,5 \pm 0,5$	14,4	$5,41 \pm 0,67$ kJoules mol^{-1}
Hepatopáncreas de cangrejo	$10,5 \pm 0,8$	0,12	$51,5 \pm 8,0$ Joules mol^{-1}

*Unidad de actividad enzimática (U) = cantidad de enzima que cataliza la formación de 1nmol porfirinas / mg proteínas x 30 min.

A continuación se realizaron ensayos para determinar el comportamiento de la enzima con respecto a la variación de la temperatura de incubación (0 – 70 °C), observando que la actividad aumenta hasta los 47 °C y luego decae a 53 °C (Figura 6).

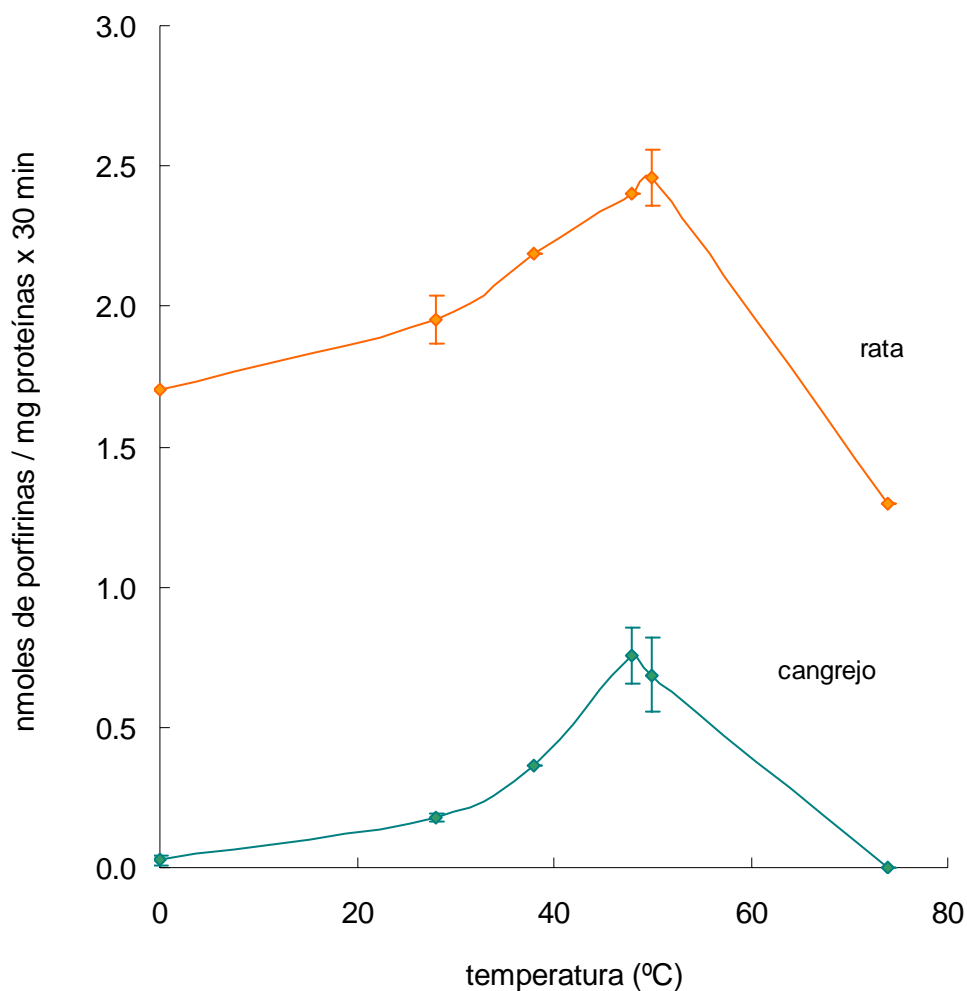


Figura 6: Efecto de la temperatura sobre la actividad UROD-hc comparada con los datos ya obtenidos de hígado de rata normal. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 2. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por miligramo de proteína en el transcurso de los 30 minutos de reacción. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Con estos resultados y aplicando la ecuación de Arrhenius, se calculó la Energía de activación del sistema, pero sólo de la primer etapa, bajo la hipótesis de que la reacción catalizada es una serie de reacciones elementales, por lo que no se puede aplicar este tratamiento a los valores correspondientes a la segunda etapa, partiendo del primer sustrato (urogen).

Con los datos que se obtienen del gráfico de las inversas y despejando E_a de la ecuación de Arrhenius, descrita en el Capítulo I, se obtiene que la $E_a = -$ pendiente $\times 2,303 \times R$

De esta manera se calcula la E_a para la UROD-hc obteniendo un valor de 51,5 Joules/mol (Figura 7).

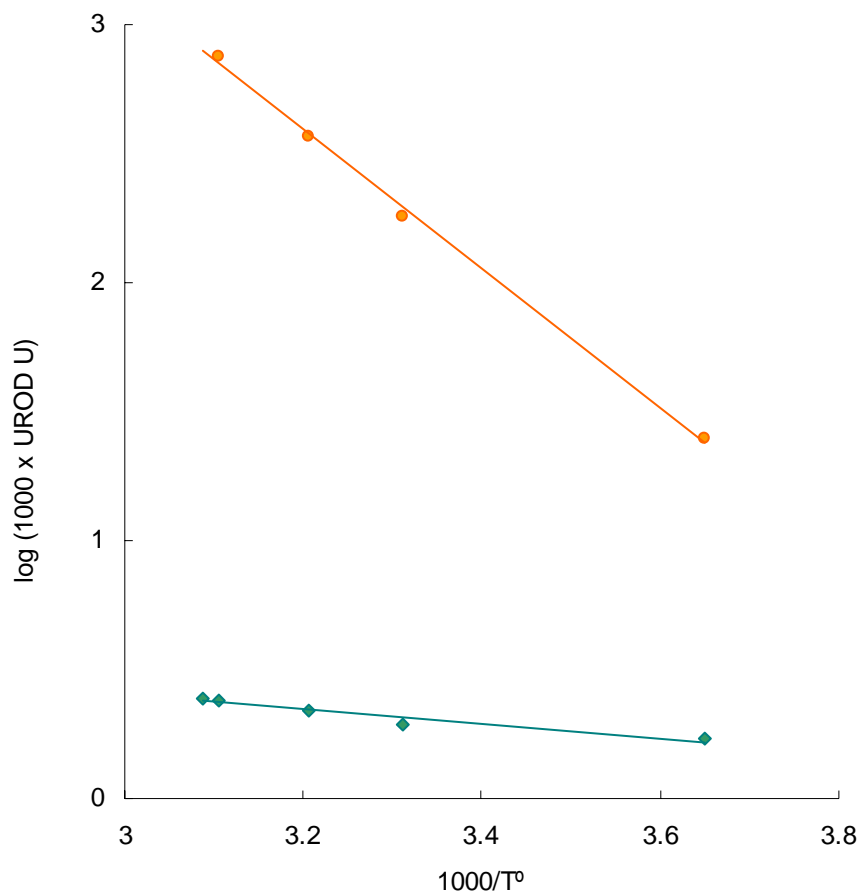


Figura 7: Gráfico de Arrhenius. La línea naranja muestra el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción para la UROD-hr mientras que la línea verde muestra el mismo efecto sobre la UROD-hc. La energía de activación se calculó a partir de la ecuación de la recta obtenida entre 26 y 47 °C para UROD-hc y 26 y 53 °C para la UROD-hr ($r^2 = 0,998$ para la enzima de hepatopáncreas de cangrejo y $r^2 = 0,945$ para la enzima de hígado de rata).

Teniendo en cuenta nuestra experiencia con la enzima proveniente de hígado de rata, en la cual podrían coexistir monómeros con distintas masas moleculares aparentes, se llevó a cabo un tamizaje molecular a través de una columna de Superdex 75.

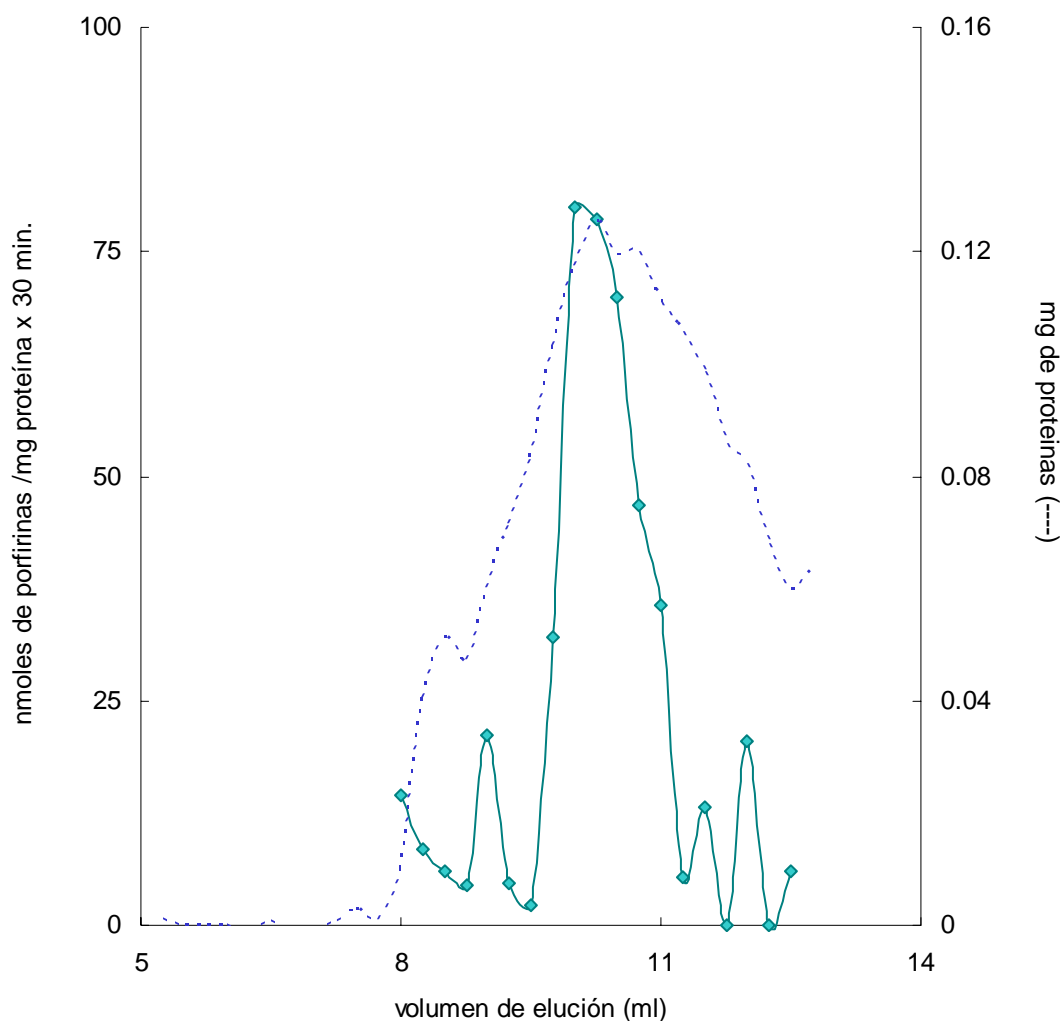


Figura 8: Perfil de elución de una columna de tamizaje molecular, Superdex 75. El precipitado de sulfato de amonio del paso anterior de purificación fue resuspendido y eluido a través de una columna de Superdex 75 (1 cm x 30 cm) equilibrada y eluida en buffer fosfato de potasio 5 mM, pH 6,8, conteniendo PMSF 0,5 mM, EDTA 0,1 M y benzamidina 0,2mM. La columna fue previamente calibrada con los siguientes estándares de peso molecular: aprotinina (6,5 kDa), citocromo c (12,4 kDa), anhídasa carbónica (29,9 kDa) y seroalbúmina bovina (67 kDa). La línea continua verde

corresponde al perfil de actividad UROD-hc, mientras que la línea azul punteada corresponde al perfil proteico.

Como se ve en la figura 8 el perfil cromatográfico reveló un pico mayoritario con actividad UROD, de masa molecular aparente de $48,0 \pm 3,0$ kDa.

III. 2. 1. b. *Actividad UROD en glándula digestiva de Nacella concinna.*

Para poder medir la actividad UROD en glándula digestiva de la lapa *Nacella concinna* (UROD-gdl), determinamos las condiciones óptimas de ensayo en sobrenadantes de 11.000 x g, de homogenato total. Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado. Los productos finales de la reacción UROD-gdl fueron similares a los ya informados para la enzima proveniente de hígado de rata y de hepatopáncreas de cangrejo: el sustrato remanente (8COOH), el producto final (4COH) y los compuestos intermediarios de 7-, 6- y 5-COOH. El perfil cromatográfico de los productos de reacción también muestra una prevalencia del intermediario de 7-COOH por sobre los de 6- y 5-COOH de la misma forma a lo ya informado tanto para hígado de rata como por lo detectado por nosotros en hepatopáncreas de cangrejos (datos no mostrados).

Para determinar las condiciones óptimas de ensayo de UROD-gdl, igual que en el caso de UROD-hc, se realizaron curvas de actividad en función de las siguientes variables: tiempo, concentración de sustrato y de proteína.

En todos los casos, al igual que en el caso de UROD-hc se expresa, como actividad enzimática, la primera etapa de decarboxilación de Urogen, que representa la formación de todos los intermediarios (heptacarboxi- + hexacarboxi- + pentacarboxi-+ coproporfirina).

Los estudios de actividad UROD-gdl a diferentes tiempos de incubación (0 – 90 minutos) mostraron que la actividad fue lineal durante los primeros 30 minutos de incubación (Figura 9). Por esta razón se decide de aquí en adelante realizar los ensayos de actividad incubando 30 minutos.

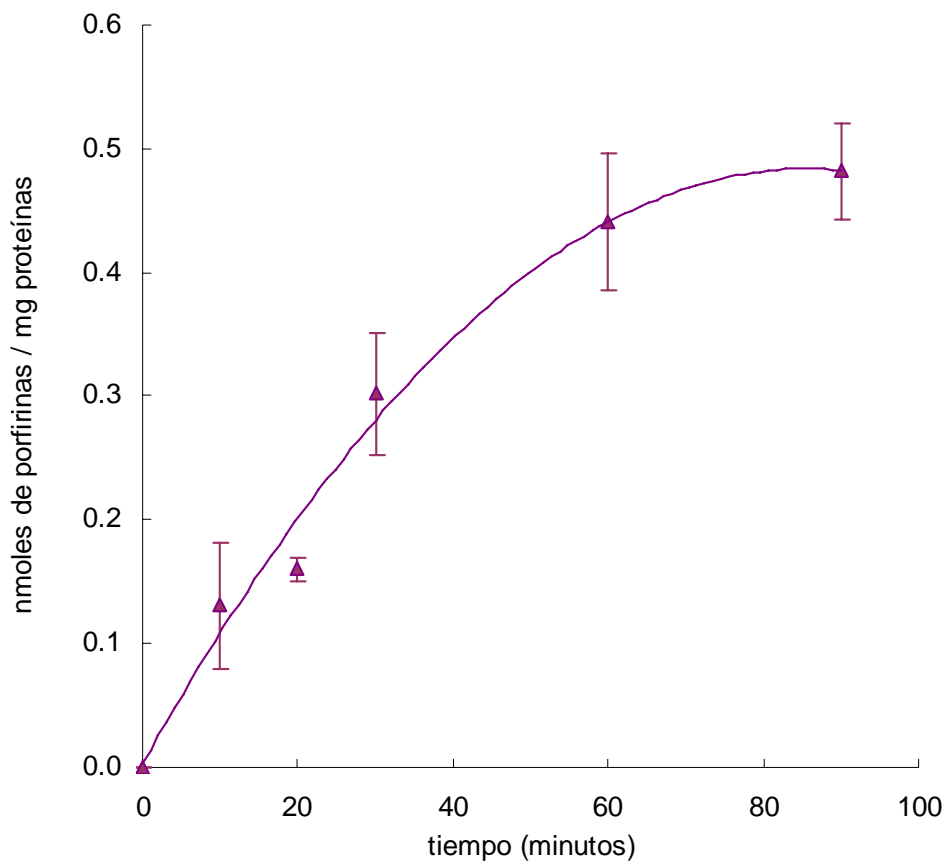


Figura 9: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad UROD-gdl. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando como fuente enzimática el sobrenadante de 11.000 x g (primeros pasos de purificación). La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas (hepta- + hexa- + penta- + coproporfirina) por mg de proteína en el tiempo de reacción (0, 10, 20, 30, 60, 90 minutos para cada caso). Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

El gráfico de actividad UROD-gdl en función de la concentración de proteínas incubadas mostró que la actividad se incrementó en forma lineal hasta los 2 mg/ml de proteínas incubadas (Figura 10). Por lo tanto se decidió seguir trabajando con valores de proteínas cercanos a los 2 mg/ml, con lo que se obtenía mayor porcentaje de transformación y resultados más precisos.

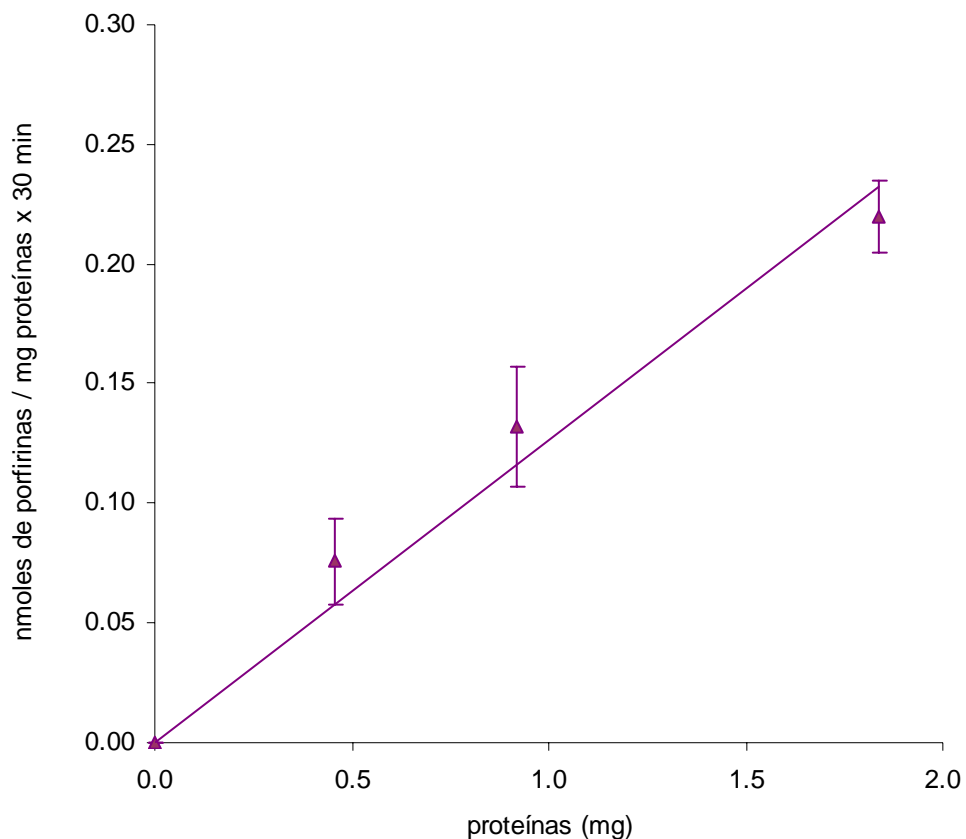


Figura 10: Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad UROD-gdl. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 9. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en 30 minutos de reacción. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Los estudios de actividad en función de la concentración de sustrato mostraron que la enzima de esta fuente llega a una meseta entre 4 y 6 μ M de urogen III (Figura 11).

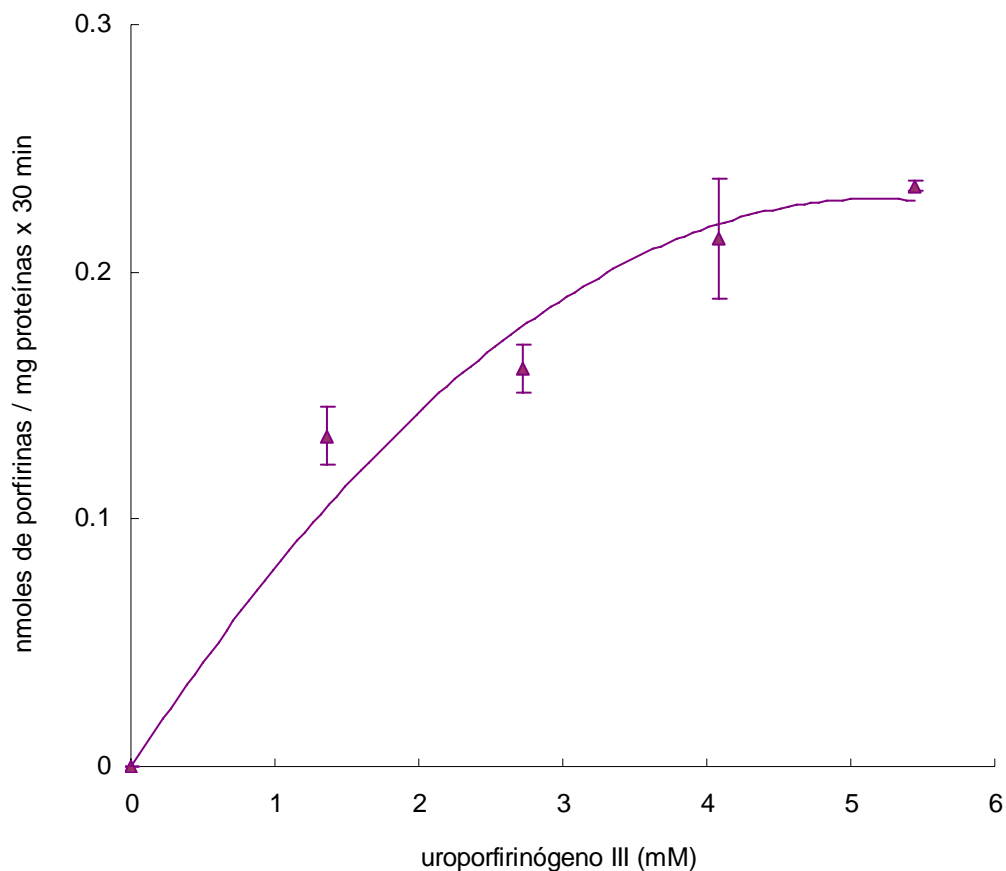


Figura 11: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad UROD-gdl. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 9. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en el transcurso de los 30 minutos de reacción. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Para determinar el pH óptimo de la reacción enzimática se realizaron ensayos de actividad UROD-gdl en función del pH. Los ensayos se realizaron entre valores de 5,5 y 8 de pH como se ve en la figura 12.

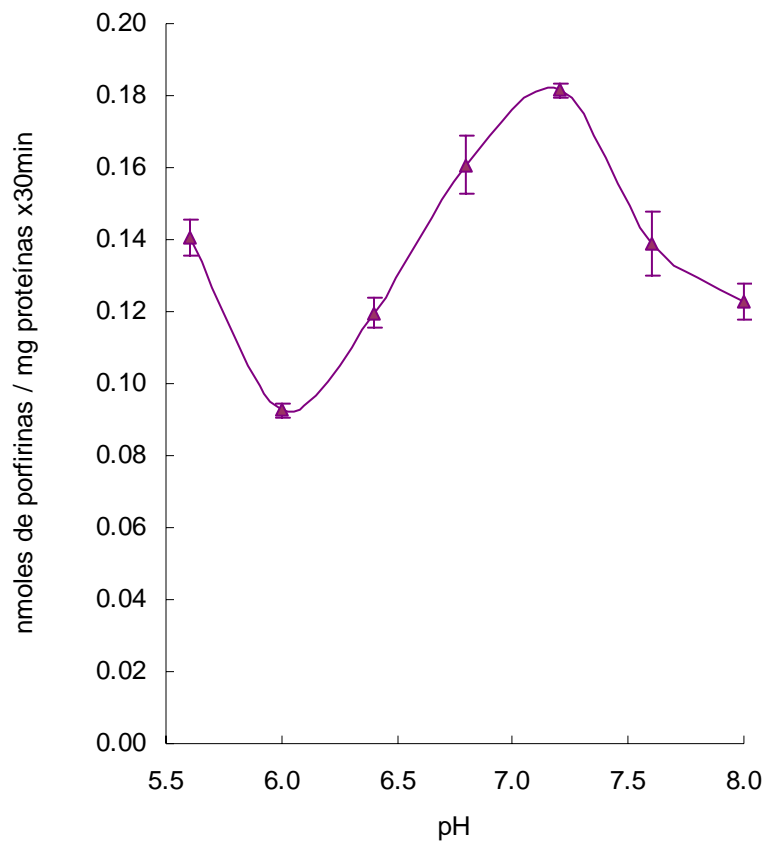


Figura 12: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de UROD-gdl. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 9. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en 30 minutos. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Como se puede ver en la Figura 12 la máxima actividad enzimática se obtiene a pH 7,2.

Los ensayos llevados a cabo a diferentes temperaturas de incubación (0, 6, 18, 21 y 46 °C) mostraron que la actividad aumentó hasta la máxima temperatura ensayada. (Figura 13).

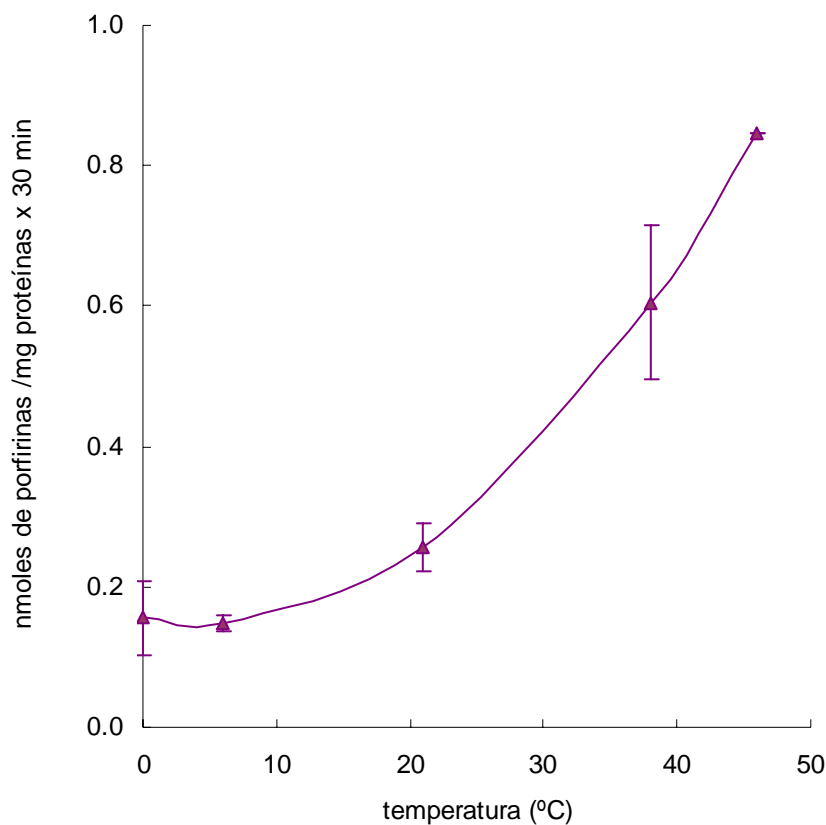


Figura 13: Efecto de la temperatura sobre la actividad UROD-gdl de *N. concinna*. Los ensayos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos y en la figura 9. La actividad fue expresada como nmoles de porfirinas formadas por mg de proteína en 30 minutos. Los datos fueron expresados como la media \pm DS.

Con estos resultados y aplicando la ecuación de Arrhenius (Figura 14), se calculó la Energía de activación del sistema, siguiendo con el mismo criterio que se usó para la UROD-hc.

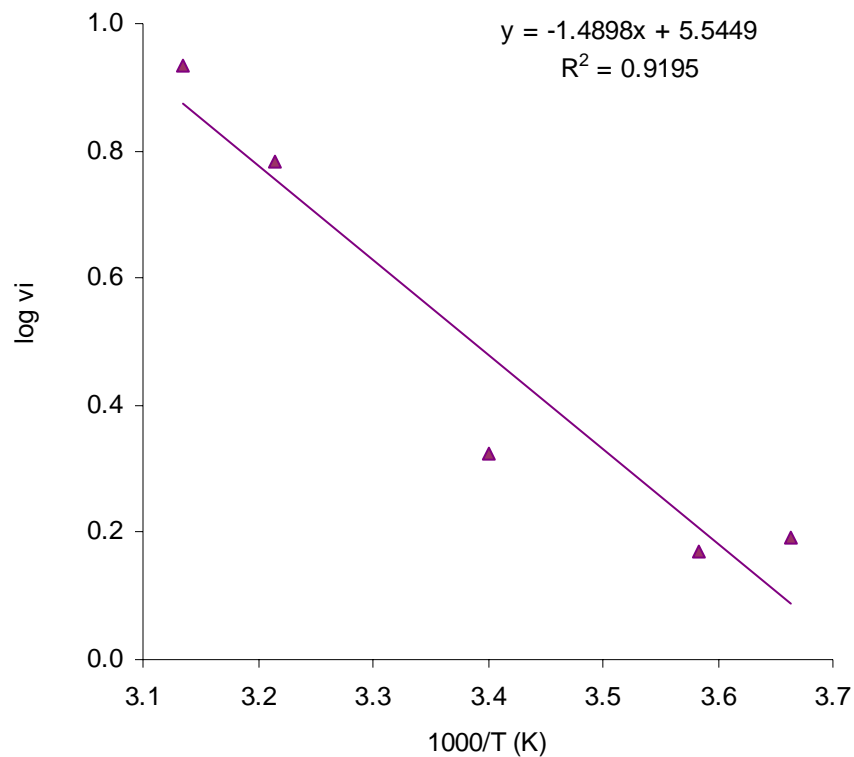


Figura 14: Gráfico de Arrhenius de los log de v_i (nmoles de porfirinas/ mg de proteína x 30 minutos) en función de la inversa de las temperaturas absolutas (°K). La energía de activación se calculó a partir de la pendiente de la curva obtenida del gráfico 13 entre 0 y 46 °C. En el rango seleccionado la relación es lineal ($r^2 = 0,9195$) y está descrita por la ecuación $y = -1,4898x + 5,5449$.

La Energía de activación para la UROD-gdl fue de 28,53 J/mol.

	PM (kDa)	pH óptimo	Energía de activación (J/mol)
Cangrejos	48 ± 3	7,2	51,5
Lapas	n.d.	7,2	28,52

Todas las determinaciones se realizaron sobre sobrenadante de 11.000 x g de homogenato total de hepatopáncreas (cangrejos) o glándula digestiva (lapa).

III. 2. 1. c. Actividad UROD en peces antárticos

Se determinó la actividad UROD en peces antártico del suborden Notothenioidei, de aguas cercanas a las islas Georgias del Sur. Empleamos ejemplares machos y hembras, de *Champsocephalus gunnari*, *Pseudochaenichthys georgianus* y *Chaenocephalus aceratus* (familia Channichthyidae, carentes de glóbulos rojos) y *Dissostichus eleginoides* y *Notothenia rossii* (familia Nototheniidae, que poseen glóbulos rojos).

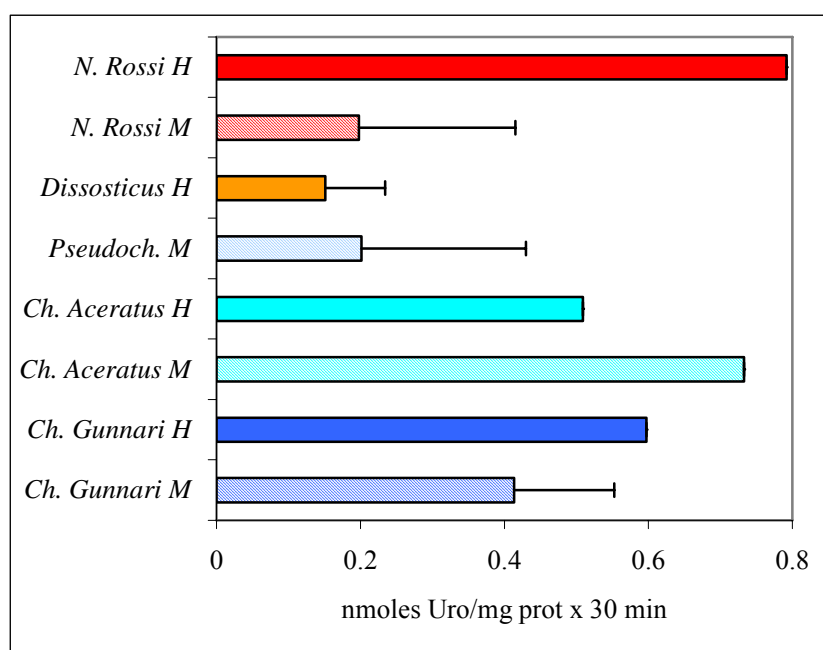


Figura 15: Determinación de la actividad UROD en peces con y sin glóbulos rojos. Las barras representan la actividad promedio de 2-3 peces, expresada como nmoles de Uroporfirinógeno decarboxilados/mg de proteína x 30 min. Las barras rayadas corresponden a machos y las llenas a hembras. Las barras rojas corresponden a los peces con glóbulos rojos y las celestes y azules a los que carecen de glóbulos rojos.

En estos animales se determinaron la concentración de lípidos totales, para utilizar la variación de este parámetro en futuros trabajos, como índice de peroxidación lipídica producida por el estrés oxidativo.

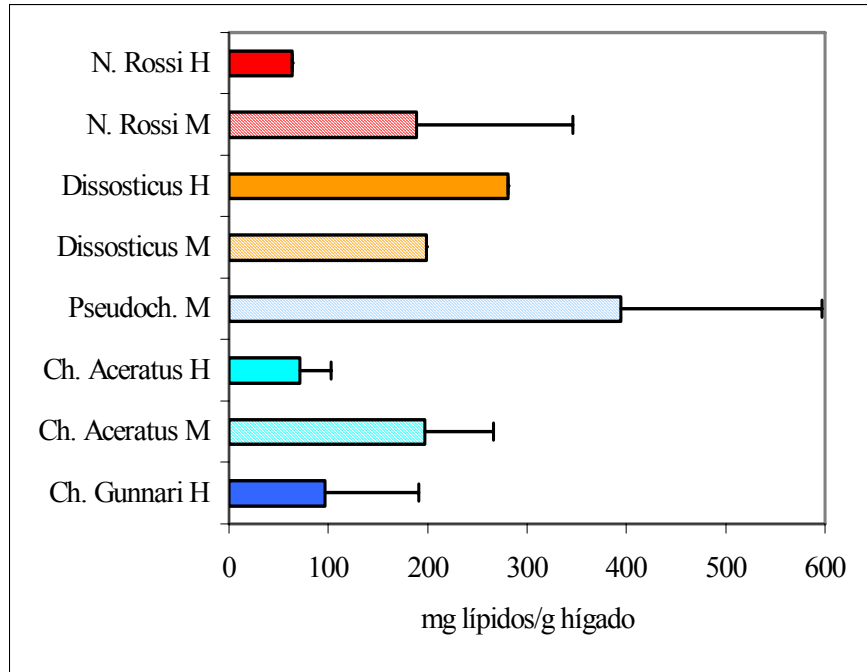


Figura 16: Determinación de lípidos totales en peces con y sin glóbulos rojos. Las barras representan los mg de lípidos/g de hígado promedio de 2-3 peces. Las barras rayadas corresponden a machos y las llenas a hembras. Las barras rojas corresponden a los peces con glóbulos rojos y las celestes y azules a los que carecen de glóbulos rojos.

III. 2. 2. Efecto de la contaminación sobre la actividad UROD

III. 2. 2. a. Efecto del diesel sobre la UROD de lapas (*Nacella concinna*)

Una vez que se pusieron a punto las condiciones óptimas de trabajo para la medición de la actividad UROD, tanto de hepatopáncreas de cangrejo como de glándula digestiva de lapas, se armaron dos tipos de protocolos diferentes para medir el efecto de la contaminación sobre la UROD de ambos sistemas.

Teniendo en cuenta, como ya se ha mencionado en la Introducción, que existen zonas en el continente Antártico que son afectadas por la contaminación de derrames de combustible, se diseñó un protocolo de contaminación con diesel al 0,05 y 0,1% como se describe en Materiales y Métodos. Se eligieron esas concentraciones de tóxico ya que se sabe que están por debajo de la dosis letal 50 y por lo tanto no hay gran mortandad de animales.

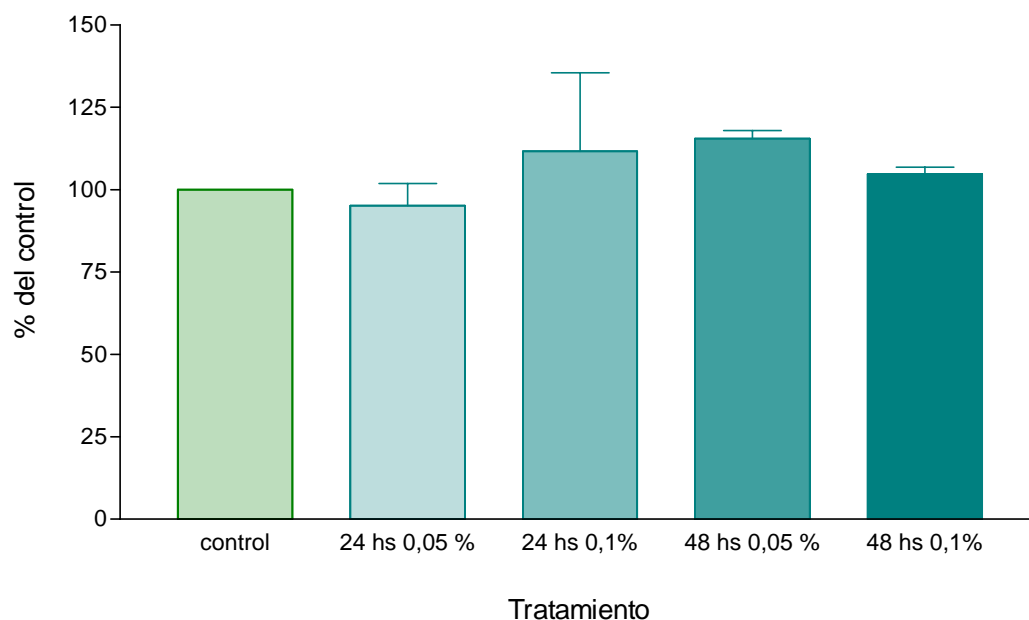


Figura 17: Actividad UROD-gdl de *N. concinna* a diferentes tiempos y tratadas con concentraciones de 0,05 % y 0,1 % de diesel. Los datos son expresados como % del control ($n = 3$).

Los ensayos de lapas contaminadas con diesel no mostraron diferencias significativas en la actividad UROD con las diferentes concentraciones de combustible ni en el tiempo ensayado.

III. 2. 2. b. *Efecto del HCB sobre una cadena trófica acuática.*

Por otra parte se diseñó una cadena trófica de dos eslabones en la cual participan algas verdes (*Chlorella kessleri*) y cangrejos (*Chasmagnathus granulatus*) respetando el protocolo que se describe en Materiales y Métodos.

Para poder relacionar los efectos del HCB a través de la cadena se midió su acumulación en extractos de hepatopáncreas de *C. granulatus*.

De esta manera se detectó 0 – 2,0 ng HCB/mg de proteína en hepatopáncreas a las primeras 2 semanas de tratamiento con algas expuestas durante 3 días con HCB y un aumento a 1,4 – 8,2 ng HCB/mg de proteína en hepatopáncreas durante las siguientes 2 semanas. Esto indicaría que el HCB captado por el alga sería luego transferido al cangrejo. Los niveles de HCB en los correspondientes controles (cangrejos alimentados con algas no contaminadas) fueron cero.

Luego de comprobar que el HCB se transfería a través de la cadena trófica, se midió la actividad UROD como parámetro de daño metabólico, MDA como parámetro de peroxidación lipídica, peso de hepatopáncreas / tamaño del caparazón como índice hepatosomático, contenido de GSH y actividad superóxido dismutasa (SOD) para evaluar las modificaciones en el equilibrio óxido reducción provocado por el HCB en el hepatopáncreas de *C. granulatus*.

III. 2. 2. b. 1. Determinación de la actividad UROD

Se determinó la actividad UROD de todos los animales. Los cangrejos que fueron alimentados con algas contaminadas con HCB presentaron una actividad normal (similar a los controles) durante la primera y segunda semana de tratamiento (Figura 17 a). A partir de la 3er semana los cangrejos se comportaron de dos formas diferentes, pudiéndolos separar en 2 grupos: a) “respondedores”, en los cuales se observa una caída de la actividad UROD

del 30-45% y b) “no respondedores”, los cuales mantuvieron una actividad UROD normal (Figura 17 b). Hasta la cuarta semana de tratamiento se siguieron distinguiendo estos dos grupos de animales y, en los respondedores, la disminución de la actividad UROD continuó siendo estadísticamente significativa (* $p < 0.05$). En cambio, la actividad UROD de los animales controles, los cuales fueron alimentados con algas no contaminadas, fue homogénea a lo largo del tratamiento (actividad UROD-hc control: $0,7 \pm 0,08$ nmoles de porfirinas / mg de proteínas / hora) (Figura 17 a).

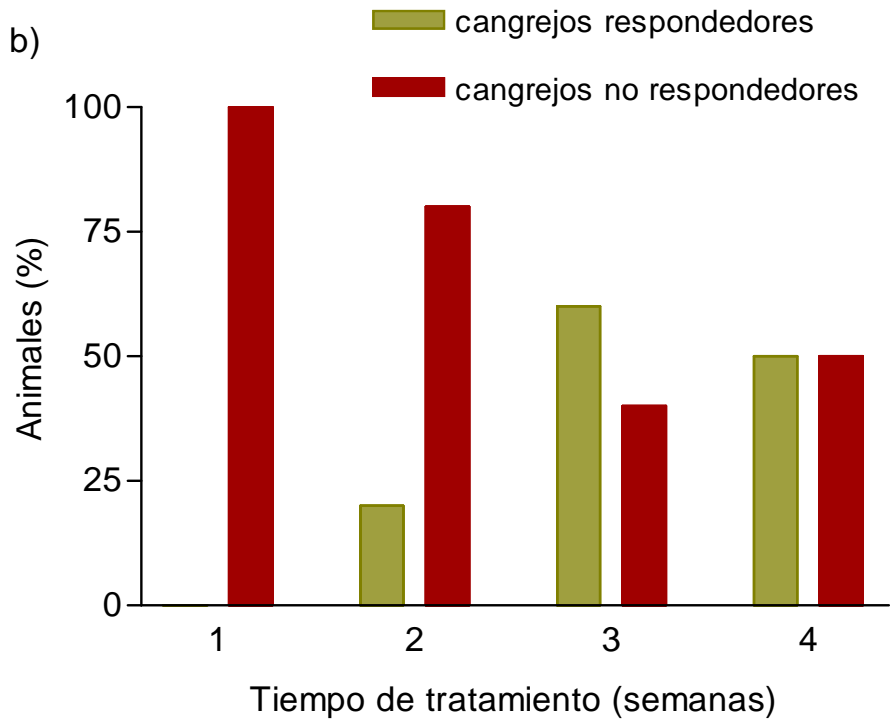
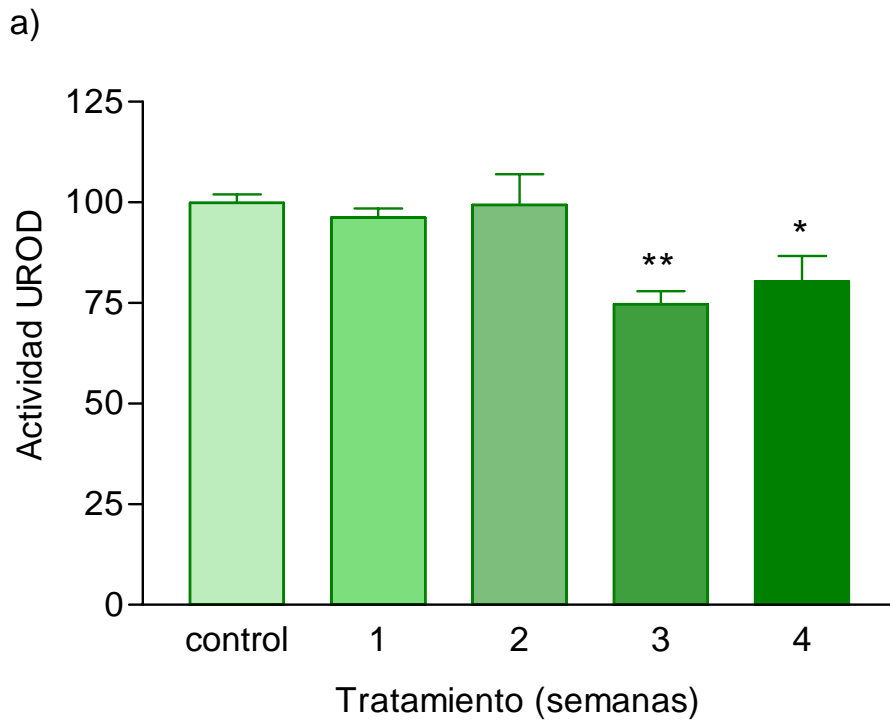


Figura 17: Actividad UROD-hc a diferentes tiempos de exposición al HCB. a) Se midió la actividad UROD como porcentaje respecto del control (UROD de animales controles: $0,7 \pm 0,08$ nmoles de porfirinas / mg de proteínas / hora). Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n = 4). Diferencias significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. b) Animales “respondedores” y “no respondedores”. Los datos representan el porcentaje de animales con actividad UROD disminuida (respondedores) y con actividad UROD normal (no respondedores) respecto del total de animales alimentados con algas expuestas al HCB.

III. 2. 2. b. 2. Determinación del contenido de MDA

Para determinar el daño producido por el HCB a los lípidos de membrana se midió el contenido de MDA como indicador de peroxidación lipídica en sobrenadante de 11.000 x g de hepatopáncreas de cangrejos.

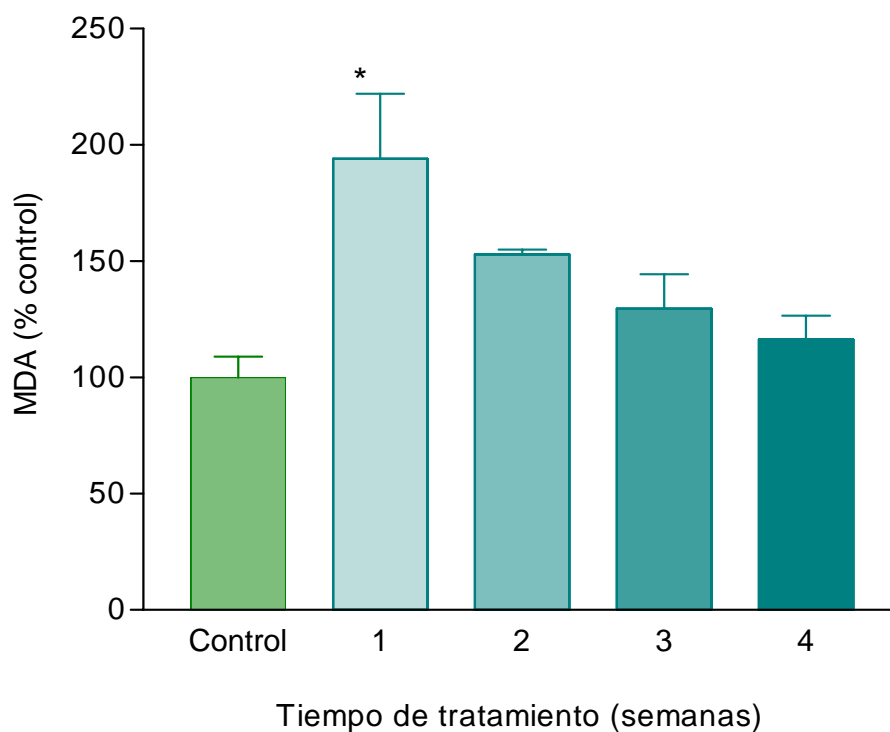


Figura 18: Determinación del contenido de MDA a diferentes tiempos de exposición al HCB. Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n = 4). * Diferencias significativas: (* $p < 0,05$) respecto del control (cangrejos alimentados con algas control).

El HCB produjo un aumento significativo (* $p < 0,05$) de los niveles de MDA ($194 \pm 40 \%$), con respecto al control, en la primer semana de tratamiento el cual fue decayendo a la 2da semana ($151 \pm 10 \%$), llegando a los valores normales a la 4ta semana ($116 \pm 21 \%$) (Figura 18). El valor control ($100 \% = 4,94 \pm 0,29$ nmoles de MDA / mg de proteína) fue homogéneo a lo largo del tratamiento. Esto indicaría que el HCB que se transfiere del alga al cangrejo provoca daño oxidativo a cortos tiempos de exposición. El efecto sobre los lípidos se revirtió a mediano plazo, a las dosis del tóxico aquí empleadas.

III. 2. 2. b. 3. Determinación del índice hepatosomático

Como parámetro morfométrico, se analizó la variación en el índice hepatosomático (peso del hepatopáncreas de *C. granulatus* / tamaño del caparazón) (Sloof *et al.*, 1983). El tratamiento afectó significativamente el índice hepatosomático de los cangrejos tratados desde la tercera semana, disminuyendo su valor a un 20 % del control (* $p < 0,05$) (Figura 19).

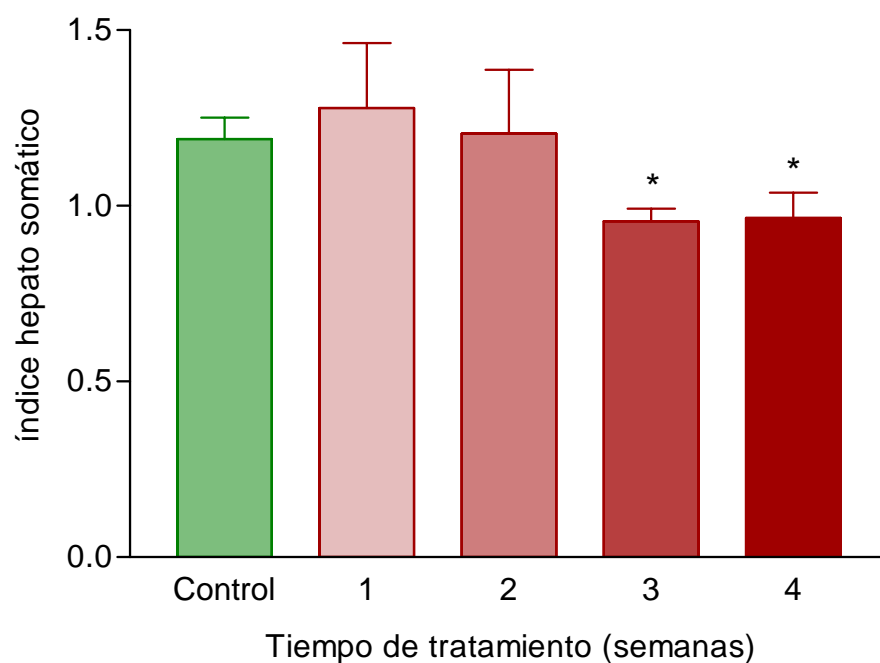


Figura 19: Variación en el índice hepatosomático de *C. granulatus* a diferentes tiempos de exposición al HCB. Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n = 4). * Diferencias significativas: (* $p < 0,05$) respecto del control (cangrejos alimentados con algas control).

III. 2. 2. b. 4. Determinación del GSH intracelular y de la actividad SOD

Para poder estimar si el HCB estaría modificando el balance oxidantes/antioxidantes intracelular se determinaron los niveles de GSH intracelular y actividad SOD.

Se midieron los niveles de GSH intracelular en sobrenadante de 11.000 X g de homogenato de hepatopáncreas de cangrejo. En los cangrejos alimentados con algas contaminadas con HCB se observa una disminución en los niveles de GSH ($40 \pm 8 \%$) a la primer semana de tratamiento ($p < 0,05$). Esto se revierte a la segunda semana llegando a valores parecidos a los obtenidos con los cangrejos controles. Luego de las tercera y cuarta semana el nivel de GSH vuelve a bajar ($70 \pm 11 \%$), respecto de los correspondientes controles ($p < 0,001$).

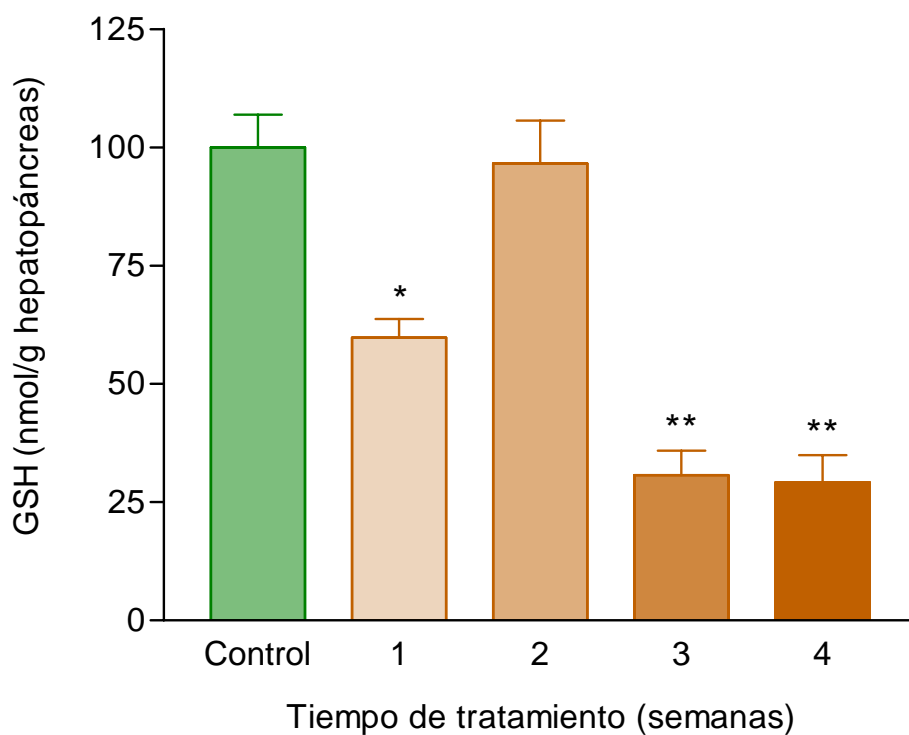


Figura 20: Niveles intracelulares de GSH (como indicador de poder reductor intracelular) de *C. granulatus* a diferentes tiempos de exposición al HCB. Los datos son expresados como la media \pm D.E. ($n = 4$). * Diferencias significativas: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ respecto del control (cangrejos alimentados con algas control).

Como se dijo anteriormente, se midió también la actividad SOD en sobrenadantes de 11,000 x g de homogenato de hepatopáncreas de cangrejo. Esta enzima es capaz de dismutar el H₂O₂, presente en las células, a H₂O y O₂.

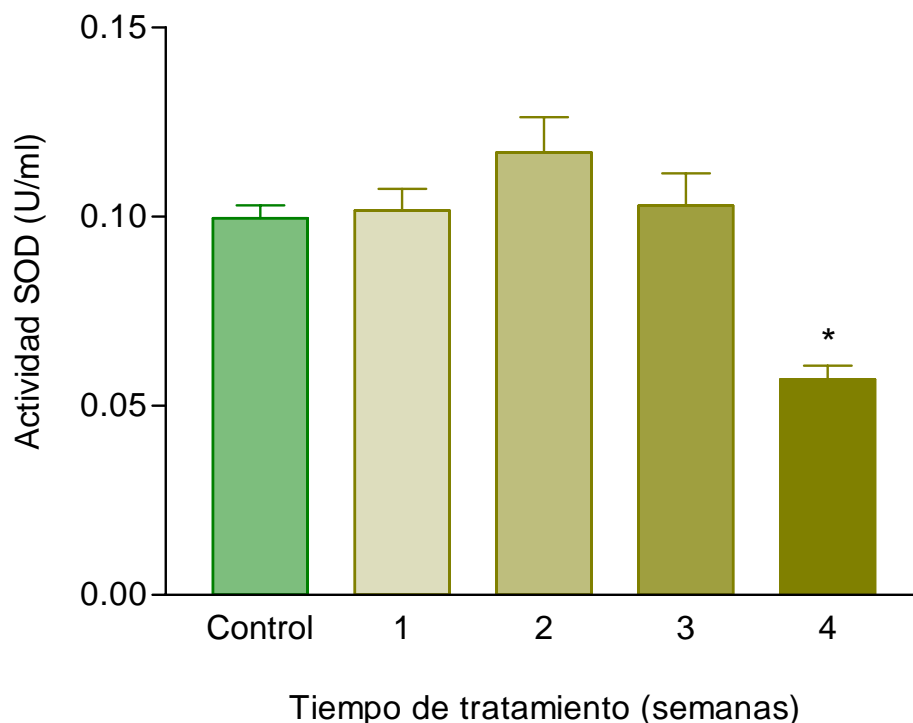


Figura 21: Efecto de la actividad SOD de *C. granulatus* a diferentes tiempos de exposición al HCB. Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n = 4). * Diferencias significativas (* p < 0,01) respecto del control (cangrejos alimentados con algas control).

Los cangrejos alimentados con algas contaminadas con HCB aumentaron sus niveles de SOD en un $17,0 \pm 0,2$ % a la segunda semana de tratamiento, disminuyendo un 40 ± 7 % por debajo de los valores normales a la cuarta semana de tratamiento (* p < 0,01).

III. 2. 2. b. 5. Análisis histológicos

Se realizaron análisis histológicos para determinar si el HCB alteraba la estructura del hepatopáncreas. Los análisis histológicos revelaron desorganización en los túbulos de los hepatopáncreas, variación en el diámetro de las células secretoras del epitelio tubular (células B del hepatopáncreas) con un aumento significativo (p < 0,05) en el grupo HCB

respecto del control (Figura 22 c y a respectivamente) ($150,5 \pm 4,0 \mu\text{m}$ vs $83,2 \pm 4,1 \mu\text{m}$) y un pequeño aumento, pero no significativo, en el número de células B del grupo HCB respecto del control (Figura 22 c y a respectivamente) luego de finalizar el tratamiento (cuarta semana) ($10,5 \pm 1,5$ vs $7,3 \pm 1,2$ células por túbulo). Además, como se muestra en la Figura 22c, los túbulos de los hepatopáncreas de los cangrejos alimentados con algas expuestas al HCB mostraron delaminación del epitelio y se observan depósitos de tipo melanina en el tejido conectivo que sostiene estos túbulos (Figura 22e). Todas estas modificaciones indican la existencia de daño histológico.

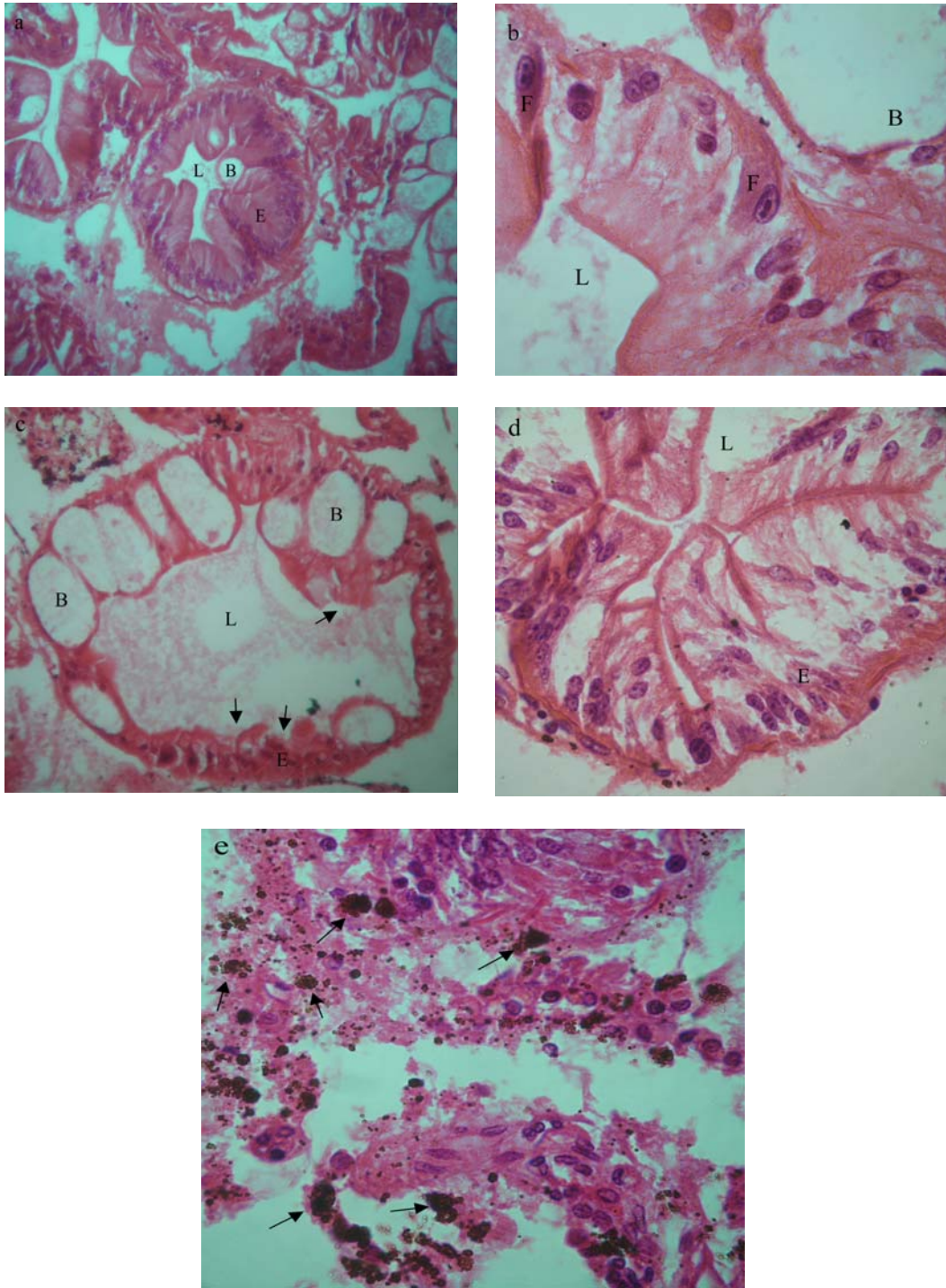


Figura 22: Análisis histológicos. Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de *Chasmagnathus granulatus*. a) cangrejos control alimentados con algas no contaminadas. b) Detalle de túbulos controles. c) túbulos de cangrejos alimentados por cuatro semanas con algas contaminadas con HCB. Se observan un mayor número de células B. Las flechas indican delaminación del epitelio. d) Detalle de túbulos tratados con HCB. e) Detalle del tejido conectivo

del hepatopáncreas de cangrejos tratados con HCB. Las flechas indican depósitos de tipo melanina entre los túbulos. Las letras mayúsculas representan: células secretoras (B), epitelio (E), célula fibrilar (F), lumen (L). Las observaciones se realizaron con microscopio óptico con un aumento de 200 x (a y c) y 600 x (b, d y e).

III. 3 **Discusión**

En este trabajo de Tesis se determina, por primera vez, la actividad UROD tanto en el cangrejo *C. granulatus*, como en la lapa *N. concinna* y en los peces antárticos del suborden Notothenioidei (familia Channichthyidae, peces de hielo, carentes de glóbulos rojos y familia Nototheniidae, que poseen glóbulos rojos), especies acuáticas que podrían ser usadas en modelos de contaminación ambiental y/o para determinar límites de toxicidad de contaminantes de ambientes acuáticos.

Se midió presencia de UROD en los peces antárticos y se describe la purificación y caracterización de la enzima proveniente de hepatopáncreas de cangrejos y glándula digestiva de lapa. Se determinaron las condiciones óptimas para realizar los ensayos enzimáticos y se aplicaron los primeros protocolos para determinar su posible rol como biomarcador de contaminación.

A tal efecto se determinó el efecto del Diesel (contaminante común en zonas de derrames) sobre la actividad UROD-gdl a diferentes concentraciones y el efecto del HCB sobre una cadena trófica de dos eslabones (algas contaminadas con HCB y cangrejos alimentados con dichas algas).

III. 3. 1. *Actividad UROD en distintos organismos.*

Tanto la UROD-hc como la UROD-gdl presentaron un perfil cromatográfico similar al que normalmente se obtiene de la enzima proveniente de hígado de rata, con una prevalencia del intermediario de 7 -COOH por sobre los de 6 y 5 -COOH. Este perfil cromatográfico sugiere que el pasaje de 7 -COOH a 6 -COOH es el paso de velocidad limitante, como ya fue reportado por la misma enzima de otras fuentes, hígado de rata (Ríos de Molina *et al.*, 1987), hígado bovino (Straka y Kushner 1983), eritrocito de pollo (García *et al.*, 1973) y algas verdes *Chlorella kessleri* (Juárez, 2003). Por lo general los picos de las porfirinas se ven desdoblados en dos (Figura 1a) y sería quizás por la presencia de metales en el medio, lo que genera metaloporfirinas, que eluyen de la columna con un tiempo de

retención ligeramente mayor (Lim *et al.*, 1983). Los picos de 6- y 5-COOH aparecen en una concentración baja y constante comparados tanto con el pico del sustrato y el del producto final. Este hallazgo nos hizo suponer que deben actuar por un mecanismo similar a la UROD de hígado de rata y que posiblemente serían tan sensibles a los contaminantes como aquellas.

A continuación se decidió realizar el análisis de las condiciones de ensayo más adecuadas para la determinación de la actividad enzimática de ambas fuentes. Al analizar el valor de la actividad en función a la concentración de proteína incubada se ve que en ambos casos la actividad aumenta en forma lineal hasta 3 mg de proteína y 2mg/ml en el caso de la UROD-gdl. Esto difiere a lo informado en el Capítulo I para las enzimas UROD_N y UROD_P, en donde se observa una caída de la actividad enzimática a altas concentraciones de proteína.

En estos casos se podría concluir que en las condiciones ensayadas para los sistemas de la UROD-hc y la UROD-gdl el sustrato se mantendría saturante aún a la mayor concentración de proteína ensayada o que la UROD de estas especies tiene menor tendencia a formar especies multiméricas por lo que no cae su actividad a altas concentraciones de proteína.

El efecto del pH sobre la actividad UROD de ambas preparaciones arrojó un valor óptimo a 7,2 con una curva simétrica a ambos lados, en el caso de la UROD-hc. Este valor es mayor al determinado para la enzima de hígado de rata (6,8). Teniendo en cuenta que el valor de pH interno reportado para los cangrejos de esta especie es de 7,75 (Luquet y Ansaldo, 1997) y para las lapas es de 7,20-7,36 dependiendo de la temperatura (Abele *et al.*, 1998) era de esperar un valor de pH óptimo para la UROD de estos individuos mayor al obtenido en hígado de rata. El pH óptimo obtenido para la UROD-hc y UROD-gdl fue superior al informado en literatura para la enzima humana (de Verneuil *et al.*, 1983), de pollo (Kawanishi *et al.*, 1983), de hígado bovino (Straka y Kushner, 1983) y de algas verdes (Juárez, 2003) que rondan en un rango de pH entre $6,8 \pm 0,5$.

Al realizar los estudios de la actividad UROD-hc en función a la concentración de sustrato se ve un aumento de la actividad específica hasta llegar a valores entre 12 y 16 μM

de urogen III. A esta concentración de sustrato la enzima alcanza su velocidad máxima. Estos valores serían similares al encontrado en la literatura para la enzima de *Rhodobacter sphaeroides* (12 μM) (Jones y Jordan 1993) y para la de hígado de rata, aquí informada (14 μM) (Capítulo I). En el caso de la UROD-gdl se ve un aumento de la actividad específica tendiendo a llegar a una zona de saturación a partir de 6 μM de sustrato, no pudiendo realizar ensayos a mayores concentraciones de sustrato por impedimentos metodológicos. Los datos existentes en bibliografía respecto de las concentraciones de saturación enzimática son muy variados desde 0,5 μM para la enzima de *Euglena gracilis* (Junknat *et al.*, 1989) pasando por 5 μM para la de hígado bovino (Straka y Kushner 1983) y 6 μM para la de hígado de rata (Ríos de Molina *et al.*, 1987) hasta 20 μM para *Rhodopseudomonas palustri* (Koopmann *et al.*, 1986).

Tanto los valores de K_m como el cociente V_{max}/K_m para la UROD-hc variaron en un orden de magnitud a los obtenidos para la enzima proveniente de hígado de rata (al aumentar el K_m disminuye el cociente V_{max}/K_m , para la UROD-hc). Teniendo en cuenta que el cociente entre $V_{\text{máx}}/K_m$ nos da una idea de la eficiencia del sistema, estos datos nos estarían indicando que la enzima de hepatopáncreas de cangrejos tiene menor afinidad por el sustrato y es menos eficiente para realizar la reacción que la de hígado de rata. Esto puede deberse al menor requerimiento por parte de estos organismos de hemo como grupo prostético, ya que el transporte de oxígeno lo hacen a través de la hemocianina que presenta péptidos de histidina como grupo prostético.

Teniendo en cuenta que tanto el cangrejo como la lapa son invertebrados ectotérmicos (que no regulan su temperatura interna) y que el pico máximo de actividad se obtiene cercano a los 50 °C se decide seguir trabajando a 37 °C, por ser ésta la temperatura estándar para ensayos enzimáticos.

Al analizar el efecto de la temperatura en función de la actividad enzimática se vio que esta aumenta en ambos sistemas igual que en el caso de la de hígado de rata. Al calcular el valor de energía de activación, en base a la ecuación de Arrhenius, se observó que para UROD-hc fue casi 2-3 órdenes menor (51,5 J/mol) que el obtenido para la enzima de hígado de rata (8,3 kJ/mol) y similar a la obtenida para la UROD-gdl (28,3 J/mol). Esta

similitud en el valor de energía de activación entre la UROD-hc y la UROD-gdl estaría diciendo que el mecanismo de reacción en estos organismos serían similares, pero que, requieren mayor energía para llevarse a cabo que en el caso de la UROD de hígado de rata, quizás por tratarse de organismos ectodérmicos, los cuales no regulan su temperatura interna fuera de ciertos rangos y están adaptados, en el caso de las lapas, a temperaturas bajas.

El perfil obtenido en la columna de tamizaje molecular Superdex 75 para la UROD-hc reveló un pico mayoritario simétrico, con actividad enzimática de masa molecular aparente de 48 ± 3 kDa, sugiriendo la presencia de una única especie proteica en hepatopáncreas de cangrejos. Este valor fue similar al obtenido para la misma enzima proveniente de otras fuentes enzimáticas (Elder *et al.*, 1983; Felix y Brouillet, 1990; Jones y Jordan, 1993; Straka y Kushner, 1983).

En el caso de los peces antárticos se ha detectado actividad UROD, tanto en aquellos que contienen glóbulos rojos como en los peces de hielo, que carecen de glóbulos rojos. Por tal motivo pensamos que la determinación de la actividad UROD serviría como un parámetro útil para detectar contaminación, al igual que la UROD de otros sistemas experimentales, sensibles a contaminación con hidrocarburos clorados y/o metales pesados. Dado el importante contenido lipídico que presentan estos peces, su determinación y caracterización en animales expuestos a contaminación sería otro elemento importante a evaluar bajo condiciones de contaminación.

III. 3. 3. a. *Efecto de la contaminación sobre la actividad UROD en C. granulatus.*

Como pudo verse en los resultados de esta sección, el HCB que se acumula en las algas expuestas al xenobiótico por tres días, luego se trasfiere a los cangrejos provocando, en estos últimos, daños metabólicos. Estos efectos involucran una disminución de la actividad UROD, un aumento de la peroxidación lipídica (evidenciada por los niveles de MDA), alteraciones en la morfología del hepatopáncreas y modificaciones en la actividad SOD y en los niveles de GSH.

La actividad UROD disminuyó durante el tratamiento con HCB realizado por cuatro semanas y observamos que dentro de la población de animales tratados existieron dos respuestas diferentes al tratamiento: “animales respondedores” y “animales no respondedores” al tratamiento. Los animales respondedores fueron aquellos que tuvieron una disminución de la actividad UROD y los no respondedores fueron aquellos en los cuales la actividad UROD fue similar a los controles, aún en las últimas semanas de tratamiento. Este efecto ya fue descrito por otros autores (Ríos de Molina et al., 2002; Vilas et al., 1999) trabajando con ratas. Los resultados citados de estos autores, más los aquí presentados, sugieren que la diferente susceptibilidad al HCB es un factor común en varias especies animales. Esta observación, la cual nos permite distinguir entre dos subpoblaciones de animales funcionalmente diferentes, tendría que ser comprobada con otros estudios, por ejemplo estudios genéticos del *pattern* de la expresión de las isoenzimas del citocromo P 450, necesarias para la metabolización del HCB o de otros genes que permitan justificar la diferente susceptibilidad detectada.

Las alteraciones en el epitelio hepático indicarían daño del tejido causado por estrés oxidativo luego de la ingestión de las algas contaminadas con el HCB. Las mismas observaciones histopatológicas fueron observadas en hepatopáncreas de la misma especie tratadas con microcistina² por una semana (Guzman y Solter, 1999; Pinho *et al.*, 2003). Pinho *et al.* (2003) también han encontrado depósitos del tipo de melanina entre los túbulos de los hepatopáncreas, los cuales suelen aparecer como una reacción a la respuesta inmune, actuando como atrapante (*scavenger*) de especies reactivas de oxígeno (Söderhäll y Cerenius, 1992; Nappi y Vass, 1993). De esta manera el HCB altera la morfología del hepatopáncreas de *C. granulatus* de una forma similar al observado para la microcistina. Por otra parte, Saravana Bhavan y Geraldine (2000) trabajando con camarones de la especie *Macrobrachium malcolmsonii* expuestos a endosulfán encontraron que se generan alteraciones en la histoarquitectura del hepatopáncreas, por ejemplo engrosamiento de la lámina basal y necrosis de los túbulos del hepatopáncreas. Estos autores dicen que estas alteraciones afectan la supervivencia y el crecimiento de *M. malcolmsonii*. Aunque, en este

² Microcistina: hepatotoxina producida por cianobacterias, encontrada por primera vez en *Microcystis aeruginosa*. Es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasas 1 y 2A cuya estructura corresponde a un heptapéptido cíclico.

trabajo de Tesis se ha encontrado que el HCB tiene un efecto sobre la estructura del hepatopáncreas, no hemos encontrado diferencias significativas entre la supervivencia de los animales alimentados con algas controles y los animales alimentados con algas contaminadas con HCB (datos no mostrados).

Al medir las defensas antioxidantes generadas en el cangrejo ante la exposición al tóxico, se vio una disminución del nivel de GSH a la primera semana de tratamiento que coincide con el aumento en los niveles de MDA. El efecto sobre el GSH se revierte a la segunda semana volviendo a manifestarse a la tercera y cuarta semana. Esto podría deberse a que en una primera etapa existe un consumo de GSH para recuperar los componentes celulares que sufren oxidación desencadenada por el tóxico. Posteriormente, al continuar el efecto prooxidante del tratamiento, se activarían las defensas enzimáticas antioxidantes, que involucrarían a las enzimas responsables de la síntesis del GSH, determinando un aumento en los niveles del mismo. Sin embargo, si la exposición continúa a largo plazo (últimas semanas de tratamiento), la acumulación del tóxico dentro del organismo provoca un efecto prooxidante difícil de revertir y tan grande que desplaza el equilibrio redox intracelular, provocando la caída en los niveles de GSH observada. Esto podría deberse a que el tóxico provoque una caída de los valores basales de GSH que luego se revierta como defensa antioxidante, pero finalmente, a las últimas semanas de tratamiento, la acumulación del tóxico dentro del cangrejo vuelva a producir una disminución de los niveles reductores del sistema (posiblemente disminuyendo su síntesis) (Figura 20). Estos efectos se correlacionan con la disminución de la actividad SOD por debajo de los valores normales a la cuarta semana de tratamiento (* $p < 0.01$).

De esta manera podría decirse que *C. granulatus* cuenta con mecanismos de detoxificación (repuesta antioxidante y metabolización del contaminante) que permiten la disminución de las especies reactivas de oxígeno generadas por la exposición al tóxico. Sin embargo, luego de una exposición a largo plazo (más de 3 semanas de tratamiento) el equilibrio oxidante/antioxidante se desplazaría hacia el primero, con el consecuente daño a proteínas (disminución del GSH reducido por disminución de su síntesis y la baja actividad SOD por pérdida de función).

Por otra parte, se pudo comprobar, al igual que lo informado en el Capítulo I, que la enzima UROD de *C. granulatus* es sensible al HCB, detectándose una caída en su actividad con niveles bajos de HCB. Podemos establecer, entonces, que la determinación de la actividad UROD puede constituir una herramienta útil para evaluar la contaminación con HCB a lo largo de una cadena trófica y predecir efectos negativos sobre los distintos eslabones en ecosistemas acuáticos.

III. 3. 3. b. *Otros posibles modelos para estudios de contaminación*

Hemos podido determinar actividad UROD en otras dos especies acuáticas, las lapas y los peces antárticos. Al analizar algunas características de la UROD de sendas fuentes, pudimos comprobar que las mismas no difieren marcadamente de las anteriormente estudiadas por nosotros, por lo que creemos que serían igualmente sensibles al efecto de diferentes tipos de contaminantes. Por esta razón la medición de la actividad UROD sería una herramienta importante para la detección de contaminantes en ambientes acuáticos.

Al estudiar el efecto del diesel sobre la actividad UROD-gdl no se obtuvieron diferencias en la actividad enzimática en presencia del combustible, a las diferentes dosis empleadas. Sin embargo, Ansaldo *et al.* (2005), en los mismos ejemplares, encontraron alteraciones de algunos parámetros indicadores de estrés oxidativo a mayores tiempos de exposición que los aquí informados. A pesar de que el diesel parece ocasionar daño metabólico, éstos no se reflejaron en caída de la actividad UROD-gdl. Ello pudo deberse a que no encontramos las condiciones óptimas de ensayo del tóxico y/o a la falta de sensibilidad de esta enzima en las condiciones de tratamiento aquí ensayadas (en especial el tiempo de exposición).

Por otra parte decidimos determinar la presencia de la UROD en peces antárticos. Hasta el momento sólo pusimos a punto la técnica y detectamos actividad UROD tanto en peces con glóbulos rojos como en los peces de hielo (que carecen de glóbulos rojos). De esta manera estos resultados nos abren un abanico de posibilidades para el estudio de la contaminación en zonas antárticas, usando como herramienta la disminución de la actividad UROD para la detección temprana de contaminación en estos ambientes.

Conclusiones Generales y Perspectivas

Conclusiones Generales y Perspectivas

De todo lo expuesto en los tres capítulos de esta Tesis se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ❖ El HCB, administrado crónicamente a ratas, provoca una caída en la actividad de la UROD hepática, que estaría relacionada a modificaciones conformacionales de la enzima.
- ❖ Los determinantes antigénicos de la UROD no se vieron alterados con el tratamiento con HCB. Esto fue comprobado al revelar la enzima proveniente de ratas porfíricas con el anticuerpo anti-UROD de rata normal.
- ❖ La intoxicación crónica con HCB no altera la cantidad de proteína inmunológicamente activa, ya que las intensidades de las bandas en el *Western blot* fueron muy similares. A este respecto se determina que en el caso de la UROD_P el valor de CRIM es negativo, ya que el HCB produce una disminución en la actividad enzimática respecto de la UROD_N pero sin alterar el valor de inmunoreactividad (proteína inmunológicamente activa).
- ❖ Las modificaciones conformacionales determinan que la UROD, proveniente de ratas porfíricas por HCB, presente una cinética diferente de la normal. Así, si bien esta última presenta un sitio activo único, que se formaría en la zona de yuxtaposición del sitio activo de cada uno de los monómeros, la UROD_P presenta dos sitios cinéticamente distinguibles. Estos sitios muestran inhibición cruzada por urogen III y pentagen III (el primero y el último sustrato fisiológico, respectivamente).
- ❖ La caída de actividad presentada por la UROD_P estaría entonces determinada, no sólo por la acción de un inhibidor, como se ha propuesto hasta el momento, sino también por alguna modificación conformacional que alteraría el centro activo, afectando quizás su capacidad de dimerización y formación de un sitio activo único.

- ❖ Se determinó que la UROD_P es menos sensible al efecto de ciertos metales (Cu⁺² y Pb⁺²). Esto podría deberse al efecto del inhibidor que al unirse al sitio activo bloquearía en parte el acceso de los metales y de las drogas al mismo y de esta forma protegería la actividad enzimática y/o produciría un cambio alostérico que afectaría el sitio de unión de los metales, diferente al sitio activo.
- ❖ El Cu⁺² fue el metal que más afectó la actividad tanto de la UROD_N como de la UROD_P. Esto podría estar relacionado a que dicho metal fue el único de los ensayados con un electrón desapareado en el último nivel energético y quizás tendría un efecto semejante al inhibidor cargado negativamente, que se ha propuesto anteriormente (Ríos de Molina et al., 1980).
- ❖ Tanto la UROD_N como la UROD_P presentan grupos reactivos similares que estarían involucrados en el centro y/o sitio activo de ambas preparaciones enzimáticas. Esto se deduce del estudio con metales.
- ❖ Se determinó que para ambas preparaciones los grupos tiólicos son necesarios pero no esenciales para la actividad enzimática, ya que se ve un efecto bifásico de la actividad UROD frente a estos reactivos (cistina y β-mercaptoetanol).
- ❖ Se describe por primera vez la purificación de la UROD hepática de ratas tratadas crónicamente con HCB. Hemos logrado avanzar en la purificación de la UROD_P. En esta área hemos optimizado la técnica de purificación y seguimiento de la misma, por medición de la actividad, pudiendo proponer métodos menos contaminantes, con menor gasto de tiempo y mayor precisión en cuanto a los datos cuantitativos de actividad y purificación.
- ❖ Se determinó por primera vez actividad UROD en peces antárticos, en cangrejos (*Chasmagnathus granulatus*) y en lapas (*Nacella concinna*).
- ❖ Pusimos a punto la determinación de la enzima en hepatopáncreas de *C. granulatus*, en glándula digestiva de *N. concinna* y en hígado de peces antárticos.

- ❖ Se realizaron estudios de contaminación de lapas con diesel. En este sentido la medición de la actividad UROD no parece ser apropiada como herramienta para detectar esta contaminación, aunque probablemente se deba a que aún no hemos logrado las condiciones óptimas para el modelo empleado.
- ❖ Se comprobó que el HCB se transfiere a través de la cadena trófica formada por:

algas (expuestas al HCB en su medio de cultivo) → cangrejos

Esto provocaría pérdida de función de la UROD. Esta disminución de la actividad UROD no se ha encontrado en todos los animales tratados, pudiendo por lo tanto clasificarlos en dos categorías: “respondedores” y “no respondedores”. La diferente susceptibilidad de la UROD al tratamiento con HCB podría estar indicando diferencias en las isoformas de las proteínas metabolizantes de drogas (por ejemplo citocromo P 450). Teniendo en cuenta que la única fuente de HCB fueron las algas contaminadas, la presencia del HCB en hepatopáncreas de *C. granulatus* indica la transferencia del tóxico a través de la cadena trófica.

- ❖ Hemos demostrado que el HCB desencadena estrés oxidativo en el último eslabón de la cadena arriba mencionada. Pudimos determinar que el HCB produce un incremento en la peroxidación de lípidos (detectada por el aumento en los niveles de MDA) y una reducción de la masa del hepatopáncreas (visualizado por el índice hepatosomático). Ambas alteraciones serían consecuencia del estrés oxidativo desencadenado por el tóxico. La disminución de los niveles de GSH y de la actividad SOD al final del tratamiento serían también consecuencia del estrés oxidativo provocado por el HCB.
- ❖ Se realizaron estudios histológicos de hepatopáncreas de cangrejos alimentados con algas expuestas al HCB, observando alteraciones en la estructura del hepatopáncreas con aumento del número de células secretoras, delaminación de la lámina basal y depósitos de tipo melanina entre los túbulos. Todas estas

alteraciones serían productos del estrés desencadenado por el HCB sobre *C. granulatus*.

- ❖ Se pudo comprobar la utilidad de la medición de la actividad UROD como biomarcador de contaminación ambiental, al verificar la caída de actividad que sufre la enzima de *C. granulatus* expuesto al HCB transferido desde algas contaminadas con este xenobiótico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis se plantean las siguientes líneas de investigación a futuro:

- ❖ Realizar el estudio de aminoácidos de la UROD hepática proveniente de ratas intoxicadas con HCB para compararlo con el ya obtenido de la enzima de ratas normales.
- ❖ Estudiar la toxicidad celular del HCB y del Cu^{+2} sobre células Hep2 en cultivo, para determinar el mecanismo de acción de ambos en forma separada y conjunta.
- ❖ Estudiar la protección, por extractos algales, contra la toxicidad celular del HCB, en células Hep2 en cultivo.
- ❖ Estudiar los efectos individuales y conjuntos del HCB y el Cu^{+2} , utilizando como modelo la contaminación de cultivos de microalgas verdes con HCB y luego su transferencia a cangrejos, que serán mantenidos en un medio conteniendo Cu^{+2} .
- ❖ Estudiar la bioacumulación, metabolización y/o biomagnificación de los contaminantes a lo largo de esta cadena trófica.
- ❖ Estudiar el efecto de la contaminación con HCB en ambientes acuáticos. Se desea evaluar el riesgo y los posibles efectos de la contaminación con HCB y el Cu^{+2} , sobre distintas especies de ambientes acuáticos, que potencialmente están sometidas a diferentes niveles de contaminantes provenientes de la actividad humana. Se aplicará el modelo puesto a punto durante el desarrollo de esta Tesis

doctoral: medio de cultivo conteniendo un tóxico (ej. HCB) → *C. kessleri* → *C. granulatus*. Se realizarán estudios de transferencia del HCB desde microalgas a cangrejos, crecidos en un ambiente limpio o en presencia de Cu^{+2} . Esto permitirá corroborar la transferencia y bioacumulación del HCB a través de cadenas tróficas y la influencia del Cu^{+2} sobre todas las respuestas esperadas. Para caracterizar los mecanismos involucrados se medirán parámetros de estrés oxidativo en *C. kessleri* y *C. granulatus*.

- ❖ Continuar con el estudio de contaminación con diesel sobre las lapas *Nacella concinna* y la posible utilización de la medición de la actividad UROD como biomarcador con este tipo de contaminante.
- ❖ Se iniciarán los estudios de contaminación de ambientes acuáticos en cadenas tróficas usando peces con alto valor comercial, los cuales representarán el último eslabón de dicha cadena.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones científicas:

1. **Chaufan G.**, Juárez A., Basack S., Ithurralde E., Sabatini S. E., Genovese G., Oneto M. L., Kesten E., Ríos de Molina M. C. **2006**. Toxicity of hexachlorobenzene and transference from microalgae (*Chlorella kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology* 227: 262-270.
2. **Chaufan G.**, Corvi M., San Martín de Viale L. C., Cárdenas M. L., Ríos de Molina M. C. **2005**. Abnormal kinetic behavior of Uroporphyrinogen decarboxylase obtained from rat with hexachlorobenzene-induced Porphyria. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19 (1): 19-24.
3. **Chaufan G.**, Corvi M., Armesto A., San Martín de Viale L. C., Luquet C., Ríos de Molina M. C. **2002**. Comparison between crab hepatopancreas and rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 133/2: 251-256.
4. **Chaufan G.**, Ríos de Molina M. C., San Martín de Viale LC. **2001**. How does hexachlorobenzene treatment affect liver uroporphyrinogen decarboxylase? *Inter. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 621-630.

Bibliografía

Abele D, Burlando B, Viarengo A, Pörtner H-O. 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 120: 425-435.

Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113: 548-553.

Ansaldo M. 2001. Niveles antioxidantes en peces antárticos pertenecientes a las familias Nototheniidae y Channichthyidae. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Ansaldo M, Najle R, Luquet CM. 2005. Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Marine Environm. Res.* 59: 381-390.

Akers GK, Thompson TE. 1965. Determination of stoichiometry and equilibrium constants for reversibly associating system by molecular sieve chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 342-349.

Barber JL, Sweetman AJ, van Wijk D, Jones KC. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci Total Environ.* 349(1-3):1-44.

Barber JL, Sweetman AJ, van Wijk D, Jones KC. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emission, levels, distribution, trends and processes. *Sc. Total Environm.* 349: 1-44.

Beale SI. 1990. Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment Precursor, delta-Aminolevulinic Acid, from Glutamate. *Plant Physiol.* 93(4):1273-1279.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-286.

Beuge JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52, 302-310.

Billi de Catabbi SC, de Calmanovici RW, Minutolo C, Aldonatti C, San Martín de Viale LC. 1999. Porphyrin-induced hepatic porphyrinogen carboxy-lyase inhibitor and its interaction with the active site(s) of the enzyme. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47(6):945-56.

Billi de Catabbi SC, Ríos de Molina MC, San Martín de Viale LC. 1991. Studies in the active centre of rat liver porphyrinogen carboxylase. In vivo effect of HCB. *Int. J. Biochem.* 23: 675–679.

Billi de Catabbi SC, San Martín de Viale LC. 1994. Studies on the active centre(s) of rat liver porphyrinogen carboxylase. In vivo effect of hexachlorobenzene on decarboxylation site(s) of porphyrinogens. *Int J Biochem.* 26(4):595-600.

Boschi EE. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral bonaerense. *Boletín del Instituto de Biología Marina (Mar del Plata)* 164: 1-34.

Botto JL, Irigoyen RH. 1979. Bioecología de la comunidad del cangrejal. I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, Provincia de Buenos Aires. Seminario Latinoamericano de Ecología Bentónica y Sedimentología de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. UNESCO, Montevideo: 161-169.

Bradford MM. 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.

Burden AE, Wu CK, Dailey T, Busch JLH, Dhawan IK, Rose JP, Wang BC, Dailey HA. 1999. Human ferrochelatase: crystallization, characterization of the [2Fe-2S] cluster and determination that the enzyme is a homodimer. *Biochim. Biophys Acta* 1435: 191-197.

Cadeé GC. 1999. Shell damage and shell repair in the Antarctic limpet *Nacella concina* from King George Island. *J. Sea Research*, 41, 149-161.

Cajaraville MP, Marigómez JA, Angulo E. 1992. Comparative effect of the water accommodated fraction of three oil son mussels. 1. Survival growth and gonad development. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 102(1): 103-112.

Cárdenas ML. 2001. The competition plot: A kinetic method to assess whether an enzyme that catalyses multiple reactions does so at a unique site. *Methods.* 24:175-180.

Caux PY, Ménard L, Kent RA. 1996. Comparative study of the effect of MCPA, butylate, atrazine, and cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Poll.* 92 (2): 219-225.

Chaufan G, Rios de Molina MC, San Martin de Viale LC. 2001. How does hexachlorobenzene treatment affect liver uroporphyrinogen decarboxylase? *Int J Biochem Cell Biol.* 33(6):621-30.

Chem TC, Miller GW. 1975. Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 15: 993-1005.

Chevillard C, Cárdenas ML, Cornish-Bowden A. 1993. The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. *Biochem. J.* 289: 599–604.

Colombo JC, Barreda A, Cappelletti N, Migoya C, Skorupka C. 2003. Contaminantes orgánicos en aguas y sedimentos de afluentes del litoral argentino. <http://www.freplata.org/documentos/otros.asp>.

Comisión Administradora del Río de la Plata, 1989. Estudio para la contaminación en el Río de la Plata. Informe de Avance.

Cox C. 1998. Herbicide factsheet. Picloram. *J. Pest. Reform.* 18 (1): 13-20.

Crockett EL, Sidell BD. 1993. Substrate selectivities differ for hepatic mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation in an Antarctic fish, *Notothenia gibberifrons*. *Biochem J.* 289 (2):427-33.

Dailey HA. 1997. Enzymes of heme biosynthesis. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 411-417.

De Matteis F, Gibbs AH, Farmer PB, Lamb JH. 1981. Liver production of N-alkylated porphyrins caused in mice by treatment with substituted dihydropyridines. Evidence that the alkyl group on the pyrrole nitrogen atom originates from the drug. *FEBS Lett.* 129(2):328-31.

De Matteis F, Prior BE, Rimington C. 1961. Nervous and biochemical disturbances following hexachlorobenzene intoxication.. *Nature.*191: 363-366.

De Matteis F. 1998. Porphyria cutanea tarda of the toxic and sporadic varieties. *Clin Dermatol.* 16(2):265-275.

Detrich HW. 3rd. 1998. Molecular adaptation of microtubules and microtubular motors from Antarctic fish. In: di Prisco G, Pisano E and Clarke A (eds.). *Fishes of Antarctica: a biological overview.* Springer-Verlang, Italy, pp 139-150.

De Verneuil H, Grandchamp B, Nordmann Y. 1980. Some kinetic properties of human red cell uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim Biophys Acta*. 611(1):174-186.

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 uroporphyrinogens I and III. *J. Biol. Chem*. 258(4):2454-60.

Doss MO 1982. Hepatic porphyrias: pathobiochemical, diagnostic, and therapeutic implications. *Prog. Liver Dis*. 7:573-597.

Doss MO, Kühnel A, Gross U. 2000. Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol Alcohol*. 35(2) 109–125.

Elder GH. 1982. Enzymatic defects in porphyria: an overview. *Semin Liver Dis*. 2(2):87-99.

Elder GH. 1998a. Porphyria cutanea tarda. *Sem. liver dis*. 18 (1): 67-75.

Elder GH. 1998b. Update on enzyme and molecular defects in porphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 14(2):66-69.

Elder GH, Roberts AG. 1995. Uroporphyrinogen decarboxylase. *J Bioenerg Biomembr*. 27(2):207-14.

Elder GH, Sheppard DM. 1982. Immunoactive uroporphyrinogen decarboxylase in PCT caused by TCDD and HCB. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 109: 113-120.

Elder GH, Tovey JA, Sheppard DM. 1983. Purification of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. Immunochemical evidence for a single protein with decarboxylase activity in human erythrocytes and liver. *Biochem. J*. 215: 45-55.

Felix F, Brouillet N. 1990. Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast uroporphyrinogen decarboxylase. *Eur. J. Biochem*. 188: 393-403.

Fujita H, Yamamoto M, Yamagami T, Hayashi N, Sassa S. 1991. Erythroleukemia differentiation. Distinctive responses of the erythroid-specific and nonspecific δ -aminolevulinate synthase mRNA. *J. Biol. Chem*. 266: 17494-17502.

García RC, San Martín de Viale LC, Tomio JM, Grinstein M. 1973. Porphyrin biosynthesis. X. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes: further properties. *Biochim Biophys Acta.* 309 (1):203-210.

Garey JR, Franklin KF, Brown DA, Harrison LM, Metcalf KM, Kushner JP. 1993 Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology.* 105(1):165-169.

Graziano M. 2006. Estudio de la relación estructura-función de la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa. En: Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, FCEyN, UBA.

Gross U, Hoffmann GF, Doss MO. 2000. Erythropoietic And Hepatic porphyries. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 641-661

Guzman RE, Solter PF. 1999. Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal Microcystin LR exposure. *Toxicol. Pathol.* 27: 582–588.

Hadener A, Matzinger PK, Malashkevich VN, Louie GV, Wood SP, Oliver P, Alefounder PR, Pitt AR, Abell C, Battersby AR. 1993. Purification, characterization, crystallisation and X-ray analysis of selenomethionine-labelled hydroxymethylbilane synthase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 211(3):615-624.

Harigae H, Suwabe N, Weinstock PH, Nagai M, Fujita H, Yamamoto M, Sassa S. 1998. Deficient heme and globin synthesis in embryonic stem cells lacking the erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase gene. *Blood.* 91(3):798-805.

Hart GJ, Abell C, Battersby AR. 1986. Purification, N-terminal amino acid sequence and properties of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochem J.* 240(1):273-276.

Hart GJ, Battersby AR. 1985. Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis*. *Biochem J.* 232(1):151-160.

Jackson AH, Sancovich HA, Ferramola AM, Evans N, Games DE, Matlin SA, Elder GH, Smith SG. 1976. Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 273(924):191-206.

Jaffe EK. 1995. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27(2):169-179.

Jones RM. y Jordan PM. 1993. Purification and properties of the uroporphyrinogen decarboxylase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. J.* 293: 703-712.

Juárez A. 2003. Estudios biológicos y enzimáticos en *Chlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). En: Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, FCEyN, UBA.

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

Kawanishi S, Seki Y, Sano S. 1981. Polychlorobiphenyls that induce delta-aminolevulinic acid synthetase inhibit uroporphyrinogen decarboxylase in cultured chick embryo liver cells. *FEBS lett.* 129(1): 93-95.

Kawanishi S, Seki Y, Sano S. 1983. Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J Biol Chem.* 258(7):4285-92.

Kohashi M, Clement RP, Tse J, Piper WN. 1984. Rat hepatic uroporphyrinogen III co-synthase. Purification and evidence for a bound folate coenzyme participating in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. *Biochem. J.* 220(3):755-765.

Koopman GE, Yuknat AA, Batlle AMC. 1986. Porphyrins biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustri*.V. Purification of porphyrinogen decarboxylase and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* 18 (10): 935-944.

Kong FX, Hu W, Liu Y. 1998. Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Exp. Bot.* 40: 105–111.

Lamparski LL, Langhorst ML, Nestruck TJ, Cutié S. 1980. Gas-liquid chromatographic determination of chlorinated benzenes and phenols in selected biological matrices. *J. Assoc. Anal. Chem.* 63 (1): 27-32.

Lim CK, Rideout JM, Wright DJ. 1983. Separation of porphyrin isomers by high-performance liquid chromatography. *Biochem J.* 211(2):435-438.

Livingstone DR. 1991. Organic xenobiotics metabolism in marine invertebrates. In R. Gilles (Ed.) *Advances in comparative and environmental physiology* (vol 7, pp. 45-185). Berlin: Springer.

Louie GV, Brownlie PD, Lambert R, Cooper JB, Blundell TL, Wood SP, Warren MJ, Woodcock SC, Jordan PM. 1992. Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature*. 359(6390):33-39.

Luquet CM, Ansaldo M. 1997. Acid–base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 117(3): 407–410,

Maciel FE, Rosa CE, Santos EA, Monserrat JM, Nery LEM. 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Can. J. Zool.* 82 (12):1871-1877.

Marks GS, Poweles J, Lyon M, McCluskey S, Sutherland E, Zelt D. 1987. Patterns of porphyrin accumulation in response to xenobiotics. Parallels between results in chick embryo and rodents. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 514: 113-127.

Martins BM, Grimm B, Mock HP, Huber R, Messerschmidt A. 2001. Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. Implications for the catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 276(47):44108-44116.

Mehendale HM, Fields M, Matthews HB. 1975. Metabolism and effects of hexachlorobenzene on hepatic microsomal enzymes in the rat. *J Agric Food Chem*, 23: 261-265.

Michielsen CC, van Loveren H, Vos JG. 1999. The role of the immune system in hexachlorobenzene-induced toxicity. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 5:783-792.

Mock HP, Trainotti L, Kruse E, Grimm B. 1995. Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley. *Plant Mol Biol.* 28(2):245-56.

Mukerji SK, Pimstone NR. 1992. Uroporphyrinogen decarboxylases from human erythrocytes: purification, complete separation and partial characterization of two isoenzymes. *Int J Biochem.* 24(1):105-119.

Muñoz MJ, Ramos C, Tarazona JV. 1996. Bioaccumulation and toxicity of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 35: 211-220.

Mylchreest E, Charbonneau M. 1997. Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145(1):23-33.

Nappi AJ, Vass E. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res.* 6(3):117-126.

Newhook R, Dormer W. 1997. Environmental health criteria 195: Hexachlorobenzene. United nations environment programme international, labour organisation, world health organization, international programme on chemical safety. www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm#PartNumber:6

Nordmann Y, de Verneuil H, Deybach JC, Delfau MH, Grandchamp B. 1990. Molecular genetics of porphyrias. *Ann Med.* 22(6):387-91.

Ockner RK, Schmid R. 1961. Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorobenzene intoxication. *Nature.* 189:499-.

Phillips JD, Whitby FG, Kushner JP, Hill CP. 1997. Characterization and crystallization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Protein Sci.* 6(6):1343-6.

Phillips JD, Whitby FG, Kushner JP, Hill CP. 2003. Structural basis for tetrapyrrole coordination by uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.* 22(23):6225-6233.

Pinho GLL, Moura da Rosa C, Yunes JS, Luquet CM, Bianchini A, Monserrat JM. 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 135: 459-468.

Poland A, Knutson JC. 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22:517-54.

Proulx KL, Woodard SI, Dailey HA. 1993. In situ conversion of coproporphyrinogen to heme by murine mitochondria: terminal steps of the heme biosynthetic pathway. *Protein Sci.* 2(7):1092-1098.

Ríos de Molina MC, Corvi M M, Chaufan G, Guidi S y San Martín de Viale L C. 1999. Detection of four isoforms for rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *An Asoc. Quim. Arg.* 87 (3/4): 121-125.

Ríos de Molina MC, Chaufan G, Iglesias S, Billi de Catabbi S, San Martín de Viale LC. 1996. Porphyrinogen carboxylase. Studies on the existence of isoenzymes. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 46(4):265-275.

Ríos de Molina MC, Mazzetti MB, Galigniana M, Aldonatti C, Tomio JM, San Martín de Viale LC. 2002. The decrease in uroporphyrinogen decarboxylase activity induced by ethanol predisposes rats to the development of porphyria and accelerates xenobiotic-triggered porphyria, regardless of hepatic damage. *Braz J Med Biol Res.* 35(11):1273-1283.

Ríos de Molina MC, Wainstok de Calmanovici R, San Martín de Viale LC 1980. Investigations on the presence of porphyrinogen carboxylase inhibitor in the liver of rats intoxicated with hexachlorobenzene. *Int J Biochem,* 12: 1027-1032.

Ríos de Molina MC, Wainstok de Calmanovici R, San Martín de Viale LC. 1987. Liver porphyrinogen carboxylase in hexachlorobenzene porphyric rats. Studies with intermediate porphyrinogens of series III and with uroporphyrinogen I. *Int J Biochem.* 19(4):365-372.

Roberts AG, Whatley SD, Daniels J, Holmans P, Fenton I, Owen MJ, Thompson P, Long C, Elder GH. 1995. Partial characterization and assignment of the gene for protoporphyrinogen oxidase and variegate porphyria to human chromosome 1q23. *Hum. Mol. Genet.* 4(12):2387-2390.

Romana M, Le Boulch P, Roméo P-H. 1987. Rat uroporphyrinogen decarboxylase cDNA: nucleotide sequence and comparison to human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucl. Acids Res.* 15 (17): 7211.

Romeo PH, Raich N, Dubart A, Beaupain D, Pryor M, Kushner J, Cohen-Solal M, Goossens M. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J. Biol Chem.* 261(21):9825-9831.

Ronco AE, Alzuet PR, Sobrero MC, Bulus Rossini G. 1996. Ecotoxicological effect assessment of pollutants in the coastal region of the Gran La Plata, Province of Buenos Aires. In: Jorge Marcovecchio (Ed.) International conference on pollution processes in coastal environments. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Rozman K, Rozman T, Greim H. 1981. Enhanced fecal elimination of stored hexachlorobenzene from rats and rhesus monkeys by hexadecane or mineral oil. *Toxicology*. 22(1):33-44.

San Martín de Viale LC, Viale AA, Nacht S, Grinstein M. 1970. Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. A study of the porphyrins excreted by urine. *Clin Chim Acta*. 28(1):13-23.

San Martín LC, Ríos de Molina MC, de Calmanovici R, Tomio JM. 1977. Porphyrins and porphyrinogen carboxy-lase in hexachlorobenzene-induced porphyria. *Biochem J*. 168(3): 393-400.

Saravana Bhavan P, Geraldine P. 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat Toxicol*. 50:331-339.

Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. Nov 1;166(2):368-79.

Schielen P, Den Besten C, Vos JG, Van Bladeren PJ, Seinen W, Bloksma N. 1995. Immune effects of hexachlorobenzene in the rat: role of metabolism in a 13-week feeding study. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 131(1):37-43.

Scholnick PL, Hammaker LE, Marver HS. 1972. Soluble δ -aminolevulinic acid synthetase of rat liver. II. Studies related to the mechanism of enzyme action and hemin inhibition. *J. Biol. Chem*. 247(13):4132-4137.

Seki Y, Kawanishi S, Sano S. 1986. Uroporphyrinogen decarboxylase purification from chicken erythrocytes. *Methods Enzymol*. 123:415-421.

Shoolingin-Jordan PM. 1995. Porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase: structure, molecular biology, and mechanism. *J. Bioenerg. Biomembr*. 27(2):181-95.

Sinclair RP, Granick S. 1974. Uroporphyrin formation induced by chlorinated hydrocarbons (lindane, polychlorinated biphenyls, tetrachlorodibenzo-p-dioxin). Requirements for endogenous iron, protein synthesis and drug-metabolizing activity. *Biochem. Res. Común*. 61: 124-133.

- Sloof W, Van Kretijil CF, Baars AJ. 1983. Relative liver weight and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface water in the Netherlands. *Aquat. Toxicol.* 4: 1-14.
- Smith AG, Francis JE. 1979. Decarboxylation of Porphyrinogens by Rat Liver Uroporphyrinogen Decarboxylase. *Biochem. J.* 183: 455-458
- Smith AG, Francis JE. 1981. Investigations of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. Comparisons of porphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins. *Biochem. J.* 195: 241-250 241.
- Söderhäll K, Cerenius L. 1992. Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2: 3-23.
- Spivak ED. 1997. Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25°-41°S) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investig. Mar.* 25: 105-120.
- Straka JG, Kushner JP. 1983. Purification and characterization of bovine hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochemistry.* 22(20):4664-4672.
- Sweeney GD, Jones KG. 1981. en *Advances in Pharmacology and Therapeutics II*, vol 5 pp147-163, Pergamon, Oxford.
- Thomas PT. 1995. Pesticide-induced immunotoxicity: are Great Lakes residents at risk? *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl 9):55-61.
- Tomio JM, García RC, San Martín de Viale LC, Grintein M. 1970. Porphyrin biosynthesis. VII. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes. Purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 198: 353-363.
- USEPA 2006. Persistent Organic Pollutant: A global issue, a global response. EPA 160-F-02-001. www.epa.gov/international/toxics/brochure.html (Cox, 1998).
- Vilas GL, Aldonatti C, San Martin de Viale LC, Rios de Molina MC. 1999. Effect of alpha lipoic acid amide on hexachlorobenzene porphyria. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47(5):815-23.
- Wang H, Long Q, Marty SD, Sassa S, Lin S. 1998. A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat Genet.* 1998 20(3): 239-43.

Warren MJ, Jordan PM. 1988. Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase. *Biochem.* 27(25):9020-9030.

Watanuki M, Tilley BE, Hall PF. 1978. Cytochrome P-450 for 11 β - and 18-hydroxylase activities of bovine adrenocortical mitochondria: One enzyme or two? *Biochem.* 17(1): 127-130.

Whitby FG, Phillips JD, Kushner JP, Hill CP. 1998. Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.* 17(9):2463-2471.

Whiting MJ, Elliott WH. 1972. Purification and properties of solubilized mitochondrial -aminolevulinic acid synthetase and comparison with the cytosol enzyme. *J. Biol. Chem.* 247(21):6818-6826.

Whiting MJ, Granick S. 1976. Delta-Aminolevulinic acid synthase from chick embryo liver mitochondria. I. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 251(5):1340-1346.

Wyckoff EE, Phillips JD, Sowa AM, Franklin MR, Kushner JP. 1996. Mutational analysis of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1298(2):294-304.

Agradecimientos

Estas páginas las hice y rehice miles de veces en mi cabeza y ahora tengo la oportunidad de decirles a todos muchas gracias. Son muchos, lo que revela el tiempo transcurrido y la buena suerte de encontrar gente linda con quien compartí y comparto muchos buenos momentos:

A mi directora, María del Carmen, amiga y consejera, por haberme contagiado desde mis comienzos las ganas de siempre seguir hacia adelante. Por acompañarme en este loco pero hermoso camino de la ciencia, por los concejos dentro y fuera de la Química Biológica. Por estar presente y por su infinita paciencia. A la mamucha MUCHAS GRACIAS !!!,

A Carmencita por todas las charlas dentro y fuera del cuarto oscuro,

A Ángela por sus buenos concejos y por estar siempre dispuesta a ayudar, aunque eso implique correr de un lado a otro,

A Seba por su humor, sin el cual sería tan difícil seguir adelante en algunos momentos, por su compañerismo y su mano siempre extendida para ayudar en lo que sea, aunque no todo sea gratis,

A Silvia por compartir sus conocimientos sobre nuestra querida UROD, sus concejos, su paciencia y tantas cosas más. Por compartir conmigo mis primeros pasos por la docencia y hacerlos amenos y divertidos,

A todos los que en todos estos años pasaron por el laboratorio y otros que todavía siguen por compartir conmigo tantos y tan lindos momentos: Iara, María, Tina, Silvina, Abel, Pampa, Liliana, Martín G., Delfi, Gonza y Andy.

A las chicas del lab de adelante, Marta, Adri, Gisela, Sandra, Claudia y Silvina por tantos años de pasillo compartidos entre risas, cafecitos y espectrofotómetro. A la Dra. Leonor por permitirme formar parte de su grupo de trabajo,

A Martín Ansaldo por compartir charlas e ideas (S.C.G.), entre mates y galletitas,

A Carlos Luquet por regresarme hacia la Biología y presentarme a los cangrejos, mis nuevas víctimas,

A Griselda por ayudarme con los cangrejos y sus fotitos,

A Martín, el secretario, por el aguante de todos los días y más de estos últimos, y a todo el Departamento de Química Biológica por permitirme el uso de las instalaciones y equipamientos,

A Susi por la buena onda y tenernos siempre todo limpio,

A los viejos y nuevos amigos de la vida, Vane, Tana, Amalia, Sandra, Lechu, Andre, Cesar, José, Salomé, Nancy y las Claudias, por estar siempre presente en los bueno y no tan buenos momentos,

A todos (y son muuuchooooos) tíos y primos, argentinos y extranjeros, de uno y otro lado de la familia, a quienes quiero un montón! Gracias por estar siempre presentes, en especial a Bety, Cholo, Leo, Marce, Mati y Ceci por la manaza que me dieron en mis comienzos, por todos aquellos momentos compartidos y los todos los que vendrán,

A Perla y David que desde hace 13 años son parte importante de mi familia, por alentarme siempre. A Vero, Jorge y Theo aunque estén lejos en la distancia están cerca en mi corazón. A mis sobris Jesi, Flor y Ari a los que quiero mucho.

A mi hermana Deby por apoyarme y estar siempre presente,

A mi papá, a quien amo y respeto, por darme fuerzas, poder contar con él en todo momento y ser un ejemplo de vida,

A mi mamá a quien recuerdo y extraño todos los días,

A Gus, el amor de mi vida, mi amigo y compañero, quien me apoya y alienta en todos mis proyectos. Gracias por ser mi sostén siempre, soportar todas mis locuras, por reelegirnos todos los días y darme esos hermosos principitos, Nico y Fede, a quienes amo con locura.

A TODOS MUCHAS GRACIAS!!!