

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de porfirinas : Formación de porfirinas a partir de ácido delta amino levúlico y porfobilinógeno, en distintos sistemas. Firiaporfirina III, su identificación con la Pseudo-uroporfirina. Biosíntesis y significado biológico

Battle, Alcira María del Carmen

1962

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

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

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

Cita tipo APA:

Battle, Alcira María del Carmen. (1962). Biosíntesis de porfirinas : Formación de porfirinas a partir de ácido delta amino levúlico y porfobilinógeno, en distintos sistemas. Firiaporfirina III, su identificación con la Pseudo-uroporfirina. Biosíntesis y significado biológico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1122_Battle.pdf

Cita tipo Chicago:

Battle, Alcira María del Carmen. "Biosíntesis de porfirinas : Formación de porfirinas a partir de ácido delta amino levúlico y porfobilinógeno, en distintos sistemas. Firiaporfirina III, su identificación con la Pseudo-uroporfirina. Biosíntesis y significado biológico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1962.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1122_Battle.pdf

FCEN-BA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

BIO SÍNTESIS DE PORFIRINAS

Formación de porfirinas a partir de ácido delta amino
levúlico y porfobilinógeno , en distintos sistemas .
Pirroporfirina III, su identificación con la Pseudo-
uroporfirina. Biosíntesis y significado biológico .

ALCIRA MARIA DEL CARMEN BAILLE

Resumen de la Tesis
presentada para optar al
Título de Doctor en Química .

Orientación : Q. Biológica

R. de Tesis: 1122

BUENOS AIRES

1 9 6 2

El presente estudio tiene por objeto: la biosíntesis e identificación de porfirinas formadas in vitro por sistemas de GN o fracciones de los mismos en presencia de ácido delta amino levúlico o porfobilinógeno; la investigación de la naturaleza química de la porfirina descrita por Falk como Pseudouroporfirina y su identificación con la aislada de orina de porfiria humana, denominada originalmente "porfirina 208", finalmente, siendo dicha porfirina de estructura isomérica III, el estudio de su significado biológico y posible intermediario en la biosíntesis del hemo.

Se describen una serie de métodos aplicados durante el trabajo, en particular un micrométodo para la determinación cuantitativa de porfirinas, que ha surgido de nuestro laboratorio (114). Además algunas modificaciones interesantes a otras técnicas que han mejorado las mismas desde el punto de vista de su rendimiento.

El empleo de distintos sistemas de incubación, en diferentes condiciones, de atmósfera, temperatura, tratamiento previo, etc. llevó a la elección de un determinado sistema como el más eficaz, es decir que produce un mejor rendimiento, en lo referente a la biosíntesis de la Piriaporfirina III.

Con iguales concentraciones de sustrato, a mayor tiempo de incubación, hay mayor síntesis; pero a los 90' se alcanza aproximadamente, el máximo, de donde el mejor tiempo de incubación es, para nuestros fines, de 90'.

El uso de solución fisiológica o de sacarosa 0,25M, como líquidos de lavado o disolución, no produce ninguna modificación.

Se han estudiado independientemente, cada una de las porfirinas aisladas de los distintos sistemas de incubación, comparativamente, cuando era posible, con los correspondientes isómeros provenientes de fuentes naturales; identificándose así dichas porfirinas.

Se aprecia que la fracción "Uroporfirina" consiste de aproximadamente 60% de Uroporfirina III y aproximadamente de 30 % de Piriaporfirina III, además de menores cantidades de porfirinas que poseen una movilidad correspondiente a, una hexacarboxílica y otras dos que se sitúan en una posición intermedia entre la Uroporfirina I y la Uroporfirina III por cromatografía sobre papel. La fracción "Coproporfirina" consiste principalmente de Coproporfirina III y cantidades menores de porfirinas hexacarboxílica, pentacarboxílica y tricarboxílica, que no habían sido descritas anteriormente. Estas porfirinas que se encuentran en pequeña cantidad, fueron detectadas utilizando la cromatografía en columna de carbonato de calcio, que demostró ser más sensible para la separación de porfirinas que la cromatografía sobre papel de Falk y Benson.

Si el sistema se calienta previamente a 60°C durante más de 15', ocurren cambios muy significativos en lo que atañe a la naturaleza de las porfirinas sintetizadas, así: la fracción "Uroporfirina" consiste casi exclusivamente de Uroporfirina I y desaparece la Piriaporfirina III; en tanto que el rendimiento de la fracción "Coproporfirina" disminuye considerablemente y ésta consiste solamente de Coproporfirina I.

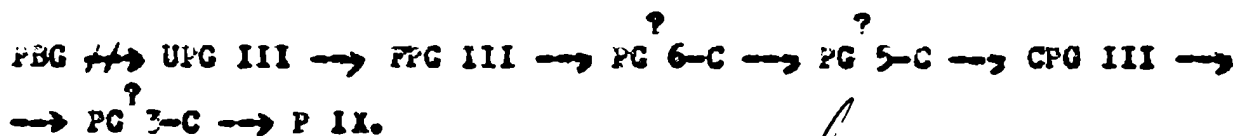
Cuando se emplea ácido delta amino levúlico como sustrato, aproximadamente un 15% del ALA agregado no se utiliza en la biosíntesis y un 25% se transforma en porfobilinógeno; en tanto que cuando se usa porfobilinógeno como sustrato, aproximadamente un 40% del mismo queda sinutilizar.

Utilizando Uroporfirinógeno III-C¹⁴ y Coproporfirinógeno III-C¹⁴ se demuestra por la vez en su transformación a Protoporfirina IX, confirmandose que el Uroporfirinógeno III y el Coproporfirinógeno III, pero no el UPG I, ni el CPG I, son intermediarios en la biosíntesis del hemo.

Se han aislado e identificado las porfirinas libres fracciones cuando se usaron los distintos porfirinógenos como sustratos, determinándose los porcentajes de los diferentes componentes de cada fracción.

SE DEMUESTRA QUE LA PORFIRINA DESCRITA POR FALK COMO PSEUDOUROPORFIRINA, ES IGUAL A LA AISLADA DE ORINA DE PORFIRIA HUMANA, DENIGNADA COMO "PORFIRINA 208" Y ACTUALMENTE COMO FERIAPORFIRINA III.

POR OTRA PARTE, MEDIANTE LA TECNICA ISOTOPICA, SE ESTABLECE QUE EL FERIA-OROPORFIRINOGENO III, ES UN INTERMEDIARIO NORMAL, SIGUIENDO AL UROPORFIRINOGENO III EN LA BIOSINTESIS DE LA PROTOPORFIRINA IX. Y MUY POSIBLEMENTE LA DECARBOXILACION TENDRIA UN PROCESO EN ETAPAS QUE SE AJUNTARIA AL SIGUIENTE ESQUEMA:



UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

**Formación de porfirinas a partir de ácido delta amino
levúlico y porfobilinógeno, en distintos sistemas .
Firiaporfirina III, su identificación con la Pseudo -
uroporfirina. Biosíntesis y significado biológico .**

ALCIRA MARIA DEL CARMEN BATLLE

Tesis presentada para optar al

Título de Doctor en Química

Orientación : Q. Biológica

TESIS: 1122

Buenos Aires

1962

A sis paires

Padrino de Tesis

Doctor Heide Grinstein

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr Moisés Grinstein, padrino de esta Tesis, por su acertada dirección, sus importantes consejos y su gran interés.

A mis compañeros de tareas del Laboratorio de Química Biológica de la Facultad.

A los Dres Galán y M. C. Russo y a la Srta I. Viana , por su ayuda y asistencia con los animales.

Al Dr A. Mitta y a la Dra J. Rodríguez por haberme introducido en el campo de los radioisótopos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, pues el trabajo fue parcialmente realizado durante la tenencia de una beca concedida por tal Institución y con la ayuda de un subsidio de la misma.

A la Fundación Rockefeller, por haberse llevado a cabo parte del trabajo, gracias a un subsidio de esa Asociación.

ABREVIATURAS USADAS

U I o UP I: Uroporfirina I

U I-B: Uroporfirina I Biosintética.

UPG I: Uroporfirinógeno I

U III o UP III: Uroporfirina III

U III-B: Uroporfirina III Biosintética.

UPG III: Uroporfirinógeno III

UPG III-B: Uroporfirinógeno III Biosintético.

U III-C¹⁴: Uroporfirina III-C¹⁴

UPG III-C¹⁴: Uroporfirinógeno III-C¹⁴.

UPG: Uroporfirinógeno

F III o FP III: Firiaporfirina III

F III-B: Firiaporfirina III Biosintética.

FPG III: Firiaporfirinógeno III

FPG III-B: Firiaporfirinógeno III Biosintético.

F III-C¹⁴: Firiaporfirina III-C¹⁴

FPG III-C¹⁴: Firiaporfirinógeno III-C¹⁴.

PuU: Pseudouroporfirina

F III-Cu: Complejo cúprico de la F III.

F III-B-Cu: Complejo cúprico de la F III-B.

F III-Zn: Complejo de Zn de la F III

F III-B-Zn: Complejo de Zn de la F III-B

C I o CP I: Coproporfirina I

C I-B: Coproporfirina I Biosintética.

CPG I: Coproporfirinógeno I

C III o CP III: Coproporfirina III

C III-B: Coproporfirina III Biosintética.

CPG III: Coproporfirinógeno III

CPG III-B: Coproporfirinógeno III Biosintético.

C III-C¹⁴: Coproporfirina III-C¹⁴

CPG III-C¹⁴: Coproporfirinógeno III-C¹⁴

CPG: Coproporfirinógeno

3-C: Porfirina de 3 COOH

PG 3-C: Porfirinógeno de 3 COOH

5-C: Porfirina de 5 COOH

PG 5-C: Porfirinógeno de 5 COOH

6-C: Porfirina de 6 COOH

PG 6-C: Porfirinógeno de 6 COOH

PG 7-C: Porfirinógeno de 7 COOH

ALA: Ácido delta amino levúlico.

ALA-4-C¹⁴: Ácido delta amino levúlico marcado con C¹⁴

PBG: Porfobilinógeno

Gli: Glicocola

Gli-2-C¹⁴: Glicocola marcada con C¹⁴ en el C nº 2

"U": Fracción "Uroporfirinas"

"C": Fracción "Coproporfirinas"

"P": Fracción "Protoporfirina"

P IX: Protoporfirina IX

Hb: Hemoglobina

S: Sustrato

GR: Glóbulos rojos

INTRODUCCION

Las porfirinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Funciones tales como transporte o almacenamiento de gases, oxidaciones intracelulares, transporte de electrones, etc, dependen de este tipo de derivados tetrapirrólicos (1).

La síntesis de porfirinas parece ser uno de los atributos fundamentales de las células. Partiendo de moléculas relativamente simples, se construyen las estructuras más o menos complejas de estos metabolitos.

Química de las porfirinas

Gracias a los trabajos de los grupos de Willstater (2), Fisher (3), y Mc Donald (4), la química de estos compuestos se conoce perfectamente. Derivan del núcleo de la porfina (5), (fig.1)

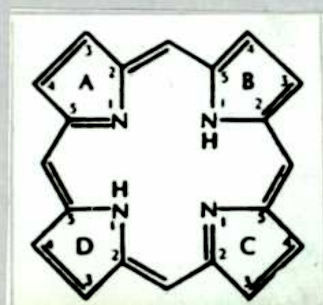


Fig.1: Núcleo de la porfina

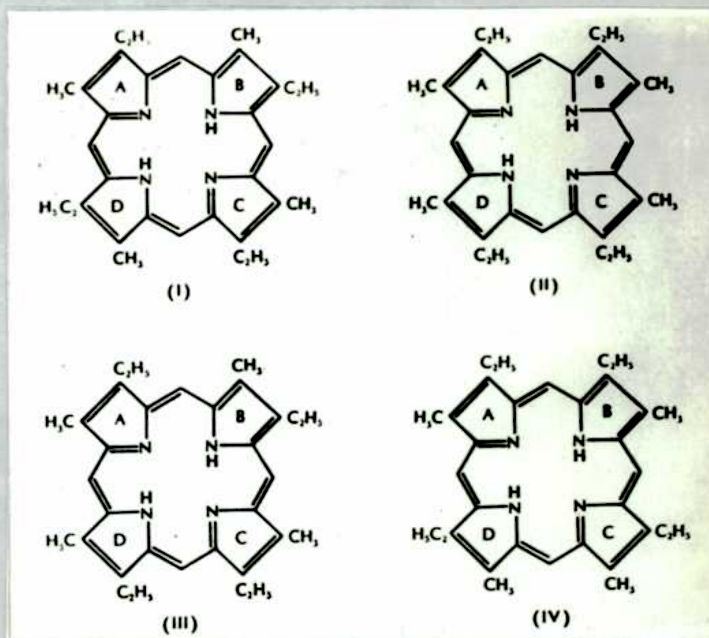


Fig.2: Las cuatro Etioporfirinas isoméricas.

por sustitución de los hidrógenos en posición beta de los anillos pirrólicos, con distintos radicales. Según la posición relativa de las cadenas laterales, se originan los distintos isómeros. El reemplazo por dos grupos diferentes, por ejemplo metilo y etilo, da lugar a las cuatro Etioporfirinas posibles (fig.2), las cuales fueron sintetizadas por Fisher (6), quien propuso que todas las porfirinas se refirieran a ellas, para determinar su tipo isomérico.

La reducción vigorosa de una porfirina, lleva a la adición de 6 átomos de hidrógeno, produciéndose un compuesto incolo-

ro, sin fluorescencia llamado porfirinógeno. Estos porfirinógenos, están íntimamente relacionados con la biosíntesis de porfirinas.

Gracias a su intensa fluorescencia roja y espectros de absorción, se pueden detectar en pequeñas cantidades, separar por extracción o identificar por técnicas cromatográficas y determinar cuantitativamente.

BIOSÍNTESIS

Glicocola como precursor

La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de la biosíntesis de porfirinas, deriva de estudios relacionados con la formación del hemo de la Hb.

Varios autores han realizado importantes puestas al día sobre este punto (7,8,9,10,11,12,13,14).

Los estudios de biosíntesis de estos compuestos se iniciaron en 1945-46, (15,16,17), mediante el uso de glicocola marcada con N^{15} , determinándose que este compuesto se usa específicamente en la síntesis del hemo, proveyendo los nitrógenos de la P IX de la Hb. Shemin, London y Rittenberg (18,19) encontraron que incubando GR de pato o eritrocitos de mamífero inmaduros, con glicocola- N^{15} , estos sistemas eran capaces de sintetizar Hb *in vitro*; y aún un hemolizado de GR de pato, retenía dicha capacidad de síntesis. El grupo de Neuberger usó sangre de conejo, y el de Rimmington, un hemolizado de eritrocitos de pollo con el mismo propósito.

Para probar la distribución de los 4 nitrógenos del hemo y su utilización a partir de glicocola- N^{15} , Wittenberg (20) y Neuberger (21) obtuvieron hemina marcada con N^{15} . Por eliminación del átomo de hierro y reducción de los grupos vinilos a etilos, se llegó a mesoporfirina, la cual se degradó con ácido crómico, (fig 3)

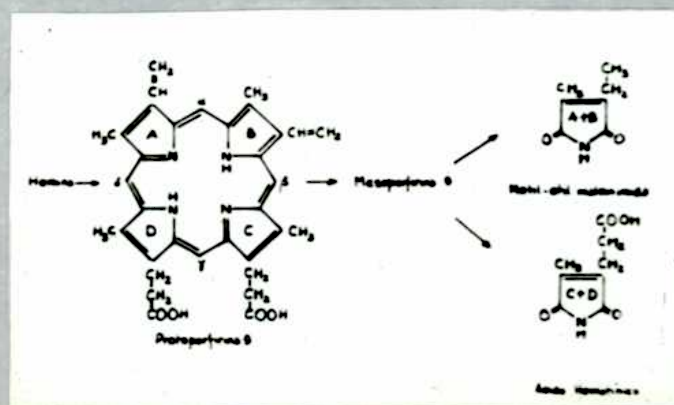


Fig. 3: Degradación de la hemina

los cuatro puentes metínicos se oxidaron a CO_2 , produciéndose dos moléculas de metil etil maleinimida (anillos A y B) y dos moléculas de ácido hematínico (anillos C y D). La actividad en N^{15} obtenida de ambas fracciones era semejante, lo que apoya la idea de una igual utilización del precursor mencionado.

Experiencias siguientes con C^{14} (22,27,24), demostraron que el carbono metilénico de la glicocola se utiliza en la biosíntesis de la protoporfirina, pero no así el átomo de carbono carboxílico (24,25,26). La degradación mostró asimismo que los cuatro carbonos de los puentes metínicos provenían también de la glicocola (21,27,28).

De manera que queda perfectamente establecido que la glicocola suministra el N y el C metilénico, cuya utilización precisa fue determinada por Wittenberg y col. (29).

Acetato como precursor

La glicocola suministra sólo 8 de los 34 átomos de carbono de la protoporfirina. Se inició entonces otra serie de trabajos importantes, con el objeto de conocer la procedencia de los 26 átomos de carbono que restaban, con las experiencias de Bloch y Wittenberg (30), quienes usando acetato marcado con deuterio obtuvieron hemo marcado, señalando así la participación del acetato en la biosíntesis (31); Raddin, Wittenberg y Shemin (32) y Wittenberg y Shemin (33,34) incubaron GR de pato con ácido acético marcado en el metilo o en el carboxilo, obteniendo protoporfirina marcada. Sometiéndolo el hemo así sintetizado a degradación (29), determinaron la actividad de los núcleos pirrólicos, verificando que la de los núcleos A y B era idéntica a la de los núcleos C y D. Concluyendo que el acetato suministraba los 26 átomos de carbono remanentes de la molécula de protoporfirina. De estas experiencias resultó también evidente, que el acetato mismo no podía ser el precursor inmediato, sino algún metabolito derivado de él. Shemin y Wittenberg (33) postularon entonces la participación de un compuesto de 4 carbonos, derivado del acetato a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, cuya existencia fue confirmada por Rubinstein y col. (35) y Wriston y col. (36). Pruebas sólidas al respecto se obtuvieron de las experiencias de Shemin y Kumin, (37), quienes incubaron GR de pato con ácido succínico marcado en los carboxilos, sugiriendo que hay una condensación de 2 moléculas

las de succinato para dar el precursor pirrólico.

Porfobilinógeno como intermediario.

Se sabía que la orina de pacientes con porfiria aguda contenía una sustancia que producía color rojo con el reactivo de Erlich (p-dimetil amino benzaldehído), no extraíble por cloroformo (38), que se denominó porfobilinógeno (39). En 1952, Westal (40) consiguió aislarlo y Cookson y Rivington (41,42) demostraron su estructura, confirmada por distintos procedimientos (43,44,45,46,47). Consideraciones generales, acerca de la estructura y propiedades del PBG, lo confirmaron como un precursor porfirínico (39,48,49,50,51,52).

ALA como precursor del PBG.

Una vez que se determinó la estructura del PBG y se demostró que esta sustancia se forma a partir de glicocola, siendo además un paso intermedio en la biosíntesis del hemo; se buscaron las etapas entre glicocola-succinato y PBG.

Wriston, Lack y Shemin (53), utilizando cetoglutarato y citrato, encontraron los carbonos radioactivos ubicados donde se lo había previsto teóricamente. Ambos compuestos se incorporan a través de un "succinato activo", que al combinarse con la glicocola da lugar a la formación de un precursor de la protoporfirina. Dicha combinación debe ser de una naturaleza tal que la glicocola se distribuya entre los puentes metínicos y los carbonos 2; por otra parte el grupo carboxilo debe poderse liberar fácilmente; y el producto que satisface todas estas condiciones, es el ácido amino levúlico.

Shemin y Russel (54), informaron ya en 1953, que el ALA podía reemplazar al succinato activo y a la glicocola en la síntesis de porfirinas. La actividad de este intermediario en la producción de hemo y porfirinas fue confirmada, por Neuberger y Scott (55), trabajando in vivo con animales; por Dresel y Falk (56), quienes demostraron su conversión en PBG y en porfirinas con su sistema de hemolizado de eritrocitos de pollo. Por otra parte, Shemin, Russel y Abramsky (57) incubaron ALA-C¹⁴, con su sistema de sangre de pato, luego de la degradación del hemo sintetizado, hallaron la distribución de radioactividad esperada; con el mismo sistema (58) encontraron protoporfirina marcada con mayor ac-

tividad que la obtenida con una cantidad equivalente de Gli-C¹⁴.

Diferentes trabajos (48,59,60), confirmaron que el PBG es el precursor monopirrólico que resulta de una condensación de 2 moléculas de ALA, catalizando la reacción una enzima denominada ALA-dehidrasa. De manera que esquemáticamente, esta primera etapa se puede representar como se muestra en la fig. 4.

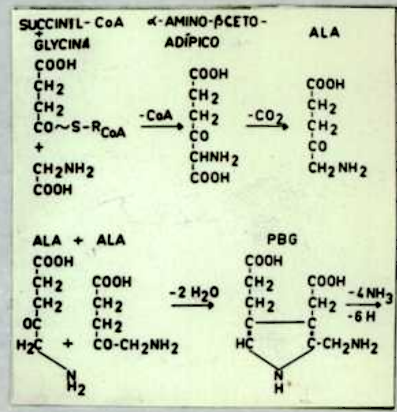
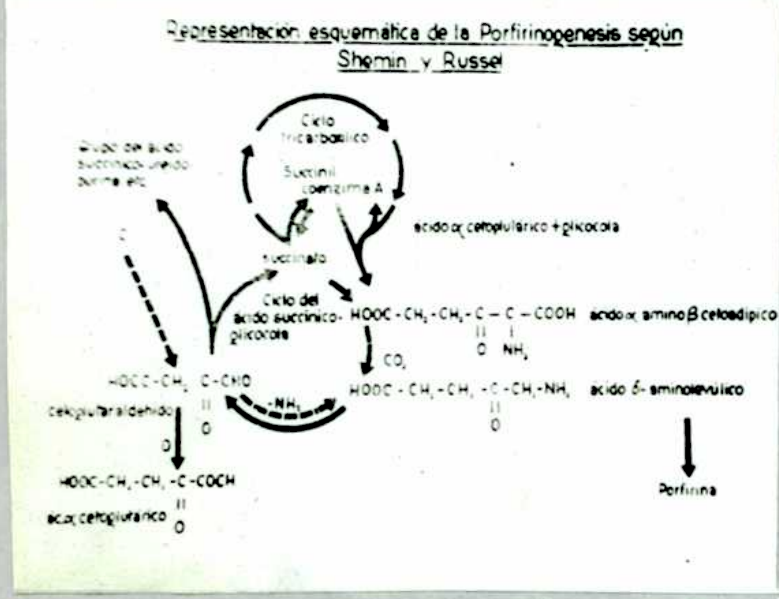


Fig.4: Esquema representando las etapas biosintéticas de Gli-succinato a PBG

Ciclo de Shemin.



Como la glicocola y el succinato son utilizados en el cuerpo, para varias síntesis específicas, Shemin y col. (61,62), interpretan estas transformaciones, mediante el llamado Ciclo de la glicocola-succinato (fig.5).

Fig. 5:

Conversión de PBG a porfirinas.

Ya en 1939 Waldenstrom y Vahlquist (39), obtuvieron U III calentando solución débilmente ácida de PBG. Debe señalarse que está ahora perfectamente claro que el primer pigmento macrocíclico producido durante la biosíntesis de porfirinas es una porfirina altamente carboxilada, probablemente U III y que las otras, copro y protoporfirina procederían de aquella como resultado de una serie de decarboxilaciones sucesivas. Esto, sin embargo, produjo una revolución en el pensamiento bioquímico relativo al metabolismo de estos compuestos, puesto que por mucho tiempo se creyó que la protoporfirina era el primer producto formado y que copro y uroporfirinas, se producían en el cuerpo humano a partir de aquella, respondiendo

a un mecanismo de "desintoxicación" (63,64).

La formación de U III a partir de PBG fue confirmada por Westall (40), aunque de acuerdo a Cookson y Rimington (42) también se forman pequeñas cantidades de otras porfirinas en esta reacción Falk y col han encontrado que en la reacción catalizada por enzimas, en condiciones normales (65), se forma principalmente U III y PsU, pero no U I; aunque si se calienta previamente el sistema a 60°C, Booiy y Rimington (66) y Bogorad y Granick (50), hallaron que se forma principalmente U I.

Parece difícil explicar la formación de una porfirina asimétrica, tal como la U III, a partir de 4 unidades de PBG, y en este sentido se han elaborado varios esquemas. Así, el mecanismo de la conversión biológica de PBG en porfirinas, no está todavía perfectamente definido; pero parece que dicha conversión, requiere dos clases de enzimas. De acuerdo con varias hipótesis (66,67,68,69), 2 ó 3 moléculas de PBG se condensan bajo la influencia de la PBG-deaminasa a pirrilmetano y amoníaco. Por acción continuada de la PBG-deaminasa, se produce UPG I el cual bajo la influencia de la UPG-isomerasa se transforma en UPG III.

La reacción se explica de distintas formas, así, Waldenstrom y Vahlquist (39), suponen la condensación de 2 dímeros; Bogorad, Granick y Shemin y col. (50,62), la de un trímero, que puede escindirse en 2 formas; Cookson y Rimington (42), suponen una migración de cadenas laterales; y finalmente Witteberg (72), la formación de un octapirrol.

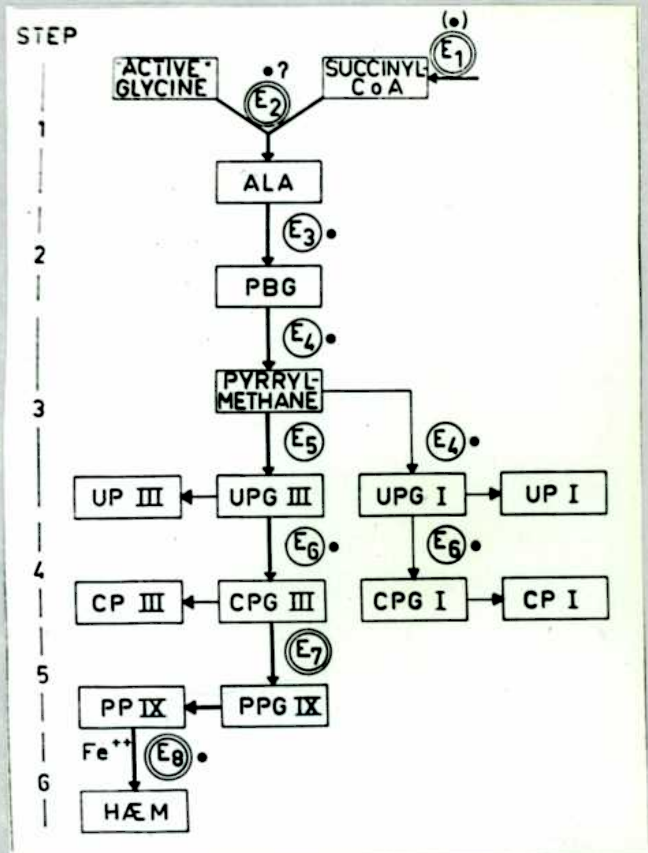


Fig.6: Los diferentes pasos de la biosíntesis del hemo.

- E₁: Enzimas del ciclo del ácido cítrico.
- E₂: ALA sintetasa
- E₃: ALA dehidrasa
- E₄: PBG deaminasa
- E₅: UPG isomerasa
- E₆: UPG decarboxilasa
- E₇: CPG oxidasa, CPG decarboxilasa.
- E₈: Hemo sintetasa
- ⊙: Indica que la enzima contiene un grupo esencial SH.
- ⊙: Enzima que está ligada a mitocondria.

Por supuesto, que todos los pasos de la biosíntesis, tienen lugar bajo la acción de enzimas y se pueden esquematizar, según lo ha propuesto Haeger-Aronsen (73), como se muestra en la fig. 6.

Podemos ya afirmar, que los porfirinógenos son los verdaderos intermediarios en la biosíntesis del hemo (74,75,76,77,78,79,80,81,82,70) que se convierten en las respectivas porfirinas, por oxidación; sobre lo cual volveremos más adelante.

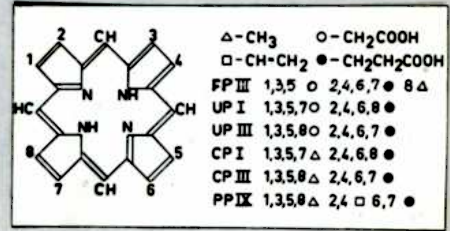


Fig.7: Principales porfirinas identificadas.

Biosíntesis de porfirinas a partir de ALA y PBG.

Ya hemos mencionado el hecho, de que cuando sistemas, tales como eritrocitos de aves en general, o bien hemolizados de los mismos; se incuban con glicocola, tiene lugar alguna formación de porfirinas junto con el hemo (83); pero usando PBG o ALA como sustratos, la producción de porfirinas es mucho mayor, aunque por supuesto, la cantidad de protoporfirina excede generalmente la de copro y uroporfirinas (48,84). Se ha determinado que el ALA (83), se convierte fácilmente, por células lavadas o sangre total, en P IX y menor cantidad de uro y coproporfirinas, dependiendo ello de la concentración de ALA; el PBG, por otra parte, con esas preparaciones da lugar sólo a trazas de P IX, formándose principalmente coproporfirina, la cual, según los autores, se originaría no enzimáticamente fuera de las células.

Pero el comportamiento del PBG, es distinto con preparaciones de hemolizados, en cuyo caso las fracciones "C", "U" y "P" se forman libremente, con rendimientos iguales a aquellos obtenidos con cantidades equivalentes de ALA. Por lo cual se deduce que ALA y PBG se comportan en forma distinta con eritrocitos intactos, a causa de que existe una impermeabilidad celular, casi completa al PBG; pero con hemolizados de eritrocitos de pollo (83), ALA y PBG, se comportan en forma similar cuali y cuantitativamente.

Las porfirinas formadas fueron identificadas cromatográficamente como P IX, C III y U III junto con la PsU, (65), una porfirina que ahora se ha identificado como heptacarboxílica.

de tipo isomérico III.

El agregado de hierro a los sistemas, aumentó la producción de hemo y disminuyó proporcionalmente la de P IX; sugiriéndose entonces, que el hierro es el factor limitante en la síntesis del hemo in vitro.(84).

Ya hemos dicho que hay pruebas suficientes, para creer que las porfirinas se encuentran en el camino biosintético del hemo. Grinstein y col. (85) y London y col (86), estudiando independientemente casos de porfiria congénita, hallaron que la uroporfirina era un anabolito en el metabolismo del hemo. Ya en 1950, Grinstein (87) había sugerido que la C III era el inmediato precursor de la P IX. Salomon y col (88) informaron acerca de que la U III era utilizada por una preparación de médula ósea de conejo, y por un hemolizado de eritrocitos de pollo, para la síntesis del hemo; pero los datos no eran muy concluyentes. Falk y col (48), trabajando con bajas concentraciones, obtuvieron alguna conversión de U III a P IX; pero no encontraron tal transformación a partir de C III. Algunos experimentos en los cuales se esperaba un efecto de dilución, por el agregado de una u otra de las porfirinas, a hemolizados capaces de sintetizar hemo radioactivo, a partir de GII-C^{14} como sustrato, dieron mucha menos disminución de la actividad del hemo, de la que se esperaba de ser verdaderos intermediarios (89,90). Los cálculos demostraron que las porfirinas agregadas no se comportaban como inhibidores; pero posiblemente existían algunas barreras de permeabilidad, que les impedía actuar. Los "pools" de estas porfirinas agregadas, reanalizados al final de cada experimento, mostraron cierto grado, aunque muy pequeño, de radioactividad; pero nada comparable con el de PBG, similarmente empleado.

Existe entonces un cúmulo de evidencias, contra la suposición de que las porfirinas mismas son los directos intermediarios en el camino biosintético, y está ahora perfectamente establecido, que ni U III, ni C III son los reales intermediarios entre PBG y P IX o hemo; sino que ellos son productos de oxidación (espontánea o catalizada enzimáticamente) de los correspondientes porfirinógenos; es decir, compuestos estrechamente relacionados con ellos pero que contienen 6 átomos extra de hidrógeno por molécula. Las porfirinas encontradas en sistemas incubados con ALA o

PBG, son productos que provienen de aquellos. Cualquier porfirinógeno que quede en el sistema al final de una operación, se puede oxidar muy fácilmente a la correspondiente porfirina durante las manipulaciones.

Estas conclusiones se basan en numerosas observaciones, que muestran entonces, que uro o coproporfirina III, marcadas isotópicamente no son incorporadas en P IX o hemo (49,87,90), en tanto que glicocola o los correspondientes porfirinógenos lo son (77) así el grupo de Neve y col. (77) han demostrado que el UPG III, es mucho mejor precursor de la P IX, en GR de pato lisados; aunque el rendimiento no fue el óptimo. Bashour halló, análogamente, alguna utilización en una preparación de hígado de perro (82); Hoare y Heath (70) han encontrado una conversión, del 70%, de UPG a CPG, en un sistema preparado a partir de *Rhodospseudomonas spheroides*. En general, se han descrito preparaciones de GR de mamíferos o aves (67,71,79,91) y de tejidos de plantas (68,69) que catalizan respectivamente, la conversión de PBG a UPG III (o cuando se calienta a 50-60 °C, al isómero I) y de este compuesto, o sea del UPG III, pero no de la U III, a CPG III. Ya dijimos que el mecanismo de PBG a U III, no está totalmente claro, Bogorad (68,69), aisló de polvo de acetona de hoja de espinaca, una fracción, que convertía PBG en UPG, que llamó PBG desaminasa, mientras que de semilla de trigo se aisló otra fracción, que transformaba el PBG en UPG III, sugiriendo entonces que el isómero III se formaba por la acción combinada de 2 enzimas, lo cual estaría confirmado también, con los trabajos de Booij y Lockwood (66,71), quienes encontraron que por calentamiento arriba de 60 °C de un sistema capaz de formar UPG III, éste se convertía en uno, formador de UPG I, con una velocidad de reacción igual; de manera que el sistema enzimático capaz de producir UPG III está constituido por 2 enzimas distintas, una de las cuales es termoestable y la otra no lo es.

Conversión de UPG a CPG.

Las etapas intermedias entre UPG III y CPG III tampoco están totalmente aclaradas; la transformación requiere la pérdida de 4 moléculas de CO₂; pero no se sabe si hay sistemas enzimáticos individuales para tal decarboxilación. Por lo menos, Mauzerall y col. (70), han aislado de eritrocitos de conejo, una preparación

enzimática, que ellos llamaron UPG decarboxilasa, que decarboxila el UPG III, pero no la U III, produciendo CPG III como producto final.

Se han detectado, como bien sabemos, porfirinas conteniendo 7,675 grupos carboxilo por molécula, tanto de materiales normales como patológicos (92,93,94,95,96,97); pero su cantidad ha sido pequeña en comparación con las cantidades de uro o coproporfirinas presentes; También se han informado porfirinas tri y aún monocarboxílicas identificadas por cromatografía (98); pero no se sabe si el sistema decarboxilante del UPG contiene decarboxilasas independientes; Hoare y Heath (70), han informado de la participación de un cofactor termoestable en la decarboxilación del UPG; pero su naturaleza todavía se está investigando.

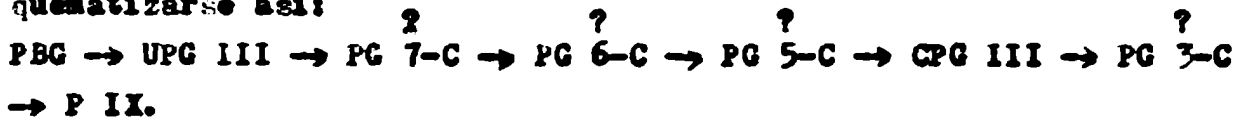
Conversión de CPG a P IX.

De la observación de las estructuras del CPG y P IX, se deduce que la transformación de uno en la otra, involucra, no sólo una decarboxilación, sino también una oxidación de 2 de las 4 cadenas propiónicas laterales de la coproporfirina. Que el precursor directo de la P IX es el CPG III, se demostró con distintos sistemas (67,99,100).

Es conocido, que preparaciones de eritrocitos de pollo hemolizados, producen normalmente considerables cantidades de P IX junto con menores cantidades de uro y coproporfirinas. Si la incubación con el sustrato, se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno la formación de P IX disminuye notablemente, en tanto que se incrementa la de copro. Análogamente, si dichos hemolizados, se centrifugan a altas velocidades y se emplea el líquido sobrenadante que resulta, la biosíntesis se detiene en la etapa de coproporfirina, aún en el aire. Se observó que la formación de P IX se restituye por adición de la fracción particulada de mitocondrias de hígado de rata (101). Rimington y Booij (89) usando GR humanas normales, mostraron que la biosíntesis se detiene en la etapa de coproporfirina, salvo que se agregue una suspensión de mitocondrias de hígado, al hemolizado. Rimington y Tooth (102), lo confirmaron, trabajando con mitocondrias de distintas fuentes. Sano y Granick (78) por su parte, aislaron, de mitocondrias de hígado de vaca una preparación enzimática, que llamaron CPG-oxidasa, que

actúa únicamente sobre CPG III transformándolo en P IX; pero ni CPG I, ni C I, ni C III, sirvieron como sustratos; lo cual, según los autores, explica en parte la ausencia, en las células, de protoporfirina perteneciente a la serie I.

De manera que el proceso total de biosíntesis a partir de PBG, hasta el momento previo a nuestras experiencias, podría esquematizarse así:



Es decir que se supone que la decarboxilación, procede en etapas y que los intermediarios reales son los porfirinógenos.

Hemos anticipado, que las principales porfirinas que se encuentran en estos sistemas in vitro, son las uroporfirinas octacarboxílicas, coproporfirinas tetracarboxílicas y protoporfirina dicarboxílica; pero la cromatografía sobre papel revela la presencia de pequeñas cantidades de porfirinas con nº de carboxilos intermedio (50,65,92,93,94,95,96,97,98).

Firiaporfirina III - Pseudouroporfirina.

En una serie de trabajos Falk y col. (63,83,84,89,103), han demostrado que la incubación de eritrocitos de pollo, o bien de hemolizados de los mismos, con ALA o PBG como sustratos, lleva a la formación de varias porfirinas, cuya constitución se definió cromatográficamente y además, llevó a la identificación de una porfirina que ellos llamaron Pseudouroporfirina, la cual, se encontraba en cantidades casi iguales a las de U III, en la fracción "U" de algunas muestras.

Observaron un comportamiento similar al de la PsU en muestras de porfirinas aisladas de orinas de pacientes con distintas formas de porfiria.

En general, dicha porfirina estaba presente en proporciones relativamente pequeñas, en la mayoría de las muestras estudiadas (cristalizadas como éteres metílicos), incluyendo aquellas provenientes de porfiria aguda y congénita típicas (48). Canivet y Rimington (65) hallaron cantidades relativamente grandes de una porfirina, cuyo éter metílico fundía a 211-216 °C, en las orinas de una serie de porfirias cutáneas, la cual, analizada por Falk y col (65), comparativamente con la PsU de sus incubados, en cromatografía

grafía sobre papel, presentó un comportamiento similar. Además, ambas produjeron C III por decarboxilación.

Grinstein, Watson y col (93,103) aislaron un material, cuyo éster metílico fundía a 208 °C, determinándose que se trataba de una porfirina heptacarbóxilica, la que denominaron "porfirina 208"; pero una muestra de la misma, estudiada por Falk (65) comparativamente con su P_{6U}, resultó diferente a esta última por cromatografía sobre papel (105), aunque también producía C III por decarboxilación. Nosotros suponemos que esto último haya sido debido a que la muestra de "porfirina 208" cedida a Falk, no haya sido lo suficientemente pura.

Como se verá más adelante, los estudios de biosíntesis realizados en el presente trabajo han permitido demostrar que ambas porfirinas, es decir, la aislada de material humano y la biosintética, son idénticas. Este compuesto que llamaremos desde ya F₁riaporfirina III, denominación que proponemos (106) y ya fuera sugerida por Grinstein (107), parece sintetizarse en cantidades significativas en ciertas condiciones (65,109).

Además, considerando la estructura icónica de la F III ésta podría ser derivada de un intermediario, aún no identificado, en el camino biosintético del hemo; en este sentido, tal como lo sugirió el Dr Grinstein; se ha demostrado que el FPG III, es decir la forma reducida de la F III, es un metabolito normal en la biosíntesis de la P IX, siguiendo al UPG III e individualizándose con ese "PG 7-C" del esquema señalado en la pág.16.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS

Sustratos:

ALA: cedido gentilmente por Parke, Davis & Co. Laboratories.

PBG: se preparó a partir de orina de una paciente afectada con porfiria aguda, aplicando la técnica de Cookson y Rimington (42). Se conserva y emplea como clorhidrate.

ALA-4-C¹⁴: de New England Corporation, Massachusetts; actividad específica: 3,1 mC/mmol.

Cl₁-2-C¹⁴: de New England Corporation, Massachusetts; actividad específica: 6,10 mC/mmol.

F III: aislada de orina de porfiria cutánea.

U III: aislada de Turacina.

U I: aislada de orina de porfiria congénita.

C I: aislada de orina de porfiria congénita.

C III: aislada de orina de intoxicados con plomo.

P IX: aislada de Hb por el método de Grinstein (108).

F III-C¹⁴, U III-C¹⁴, C III-C¹⁴: se sintetizaron a partir de ALA-4-C¹⁴ y sobrenadantes de eritrocitos de pollo hemolizados, por el procedimiento descrito más adelante (80)

Preparación de complejos metálicos:

Fueron preparados sobre la base del método de Fisher (2) con ligeras modificaciones (87). Se parte de una solución clorofórmica de la porfirina, que se mezcla con una pequeña cantidad de acetato del metal, disuelto en muy poco volumen de ácido acético glacial; la mezcla se calienta unos minutos a baño maría, al formarse el complejo desaparece la banda del rojo; se lava entonces la solución clorofórmica 3 veces con agua, se filtra a través de filtro plegado embebido en cloroformo, se concentra al vacío y se cristaliza de metanol. Se recristaliza de cloroformo-etanol. Para eliminar aquella fracción del éster que no se hubiera acompañado, se recromatografía por carbonato de calcio; el complejo queda al tops, en tanto que el resto se desplaza hacia abajo.

Saponificación de los ésteres metálicos de las porfirinas.

Se tratan los cristales de los ésteres de las porfirinas con un pequeño volumen de HCl 25%, generalmente 1-2 ml, dependiendo de la cantidad a saponificar; se dejan fuera de la luz durante 24hs al cabo de las cuales la hidrólisis es completa. Se lleva la solución ácida, con acetato de sodio sólido, a pH 3-3,2, en el cual precipitan las porfirinas; se centrifugan, se lavan 4 ó 5 veces con agua bidestilada y se secan en un desecador al vacío.

Decarboxilación.

Se procedió siguiendo la técnica de Edmonson y Schwartz (110) con ligeras variantes.

Una cantidad determinada de la porfirina, en solución clorofórmica, se coloca en un tubo de Carius, se evapora en baño maría a sequedad y se le agrega HCl 0,3 N (1%); el volumen total puede ser de 3 a 15 ml. El tubo se sumerge en un baño de hielo y se le hace un vacío de aproximadamente 10 mm de mercurio con una bomba; se mantiene esta presión durante 20', al cabo de los cuales el tubo se sella con una llama de oxígeno, manteniendo siempre la succión. Entonces, se coloca en una estufa, levantándose en 20' la temperatura a 180 °C, la que se mantiene 4 hs, después se deja volver lentamente a la temperatura ambiente y recién se retira el tubo.

En estas condiciones la decarboxilación de una uroporfirina produce 95% de coproporfirina, como término medio.

El producto obtenido, o bien se lleva a sequedad en un desecador al vacío, en presencia de Cl_2Ca , o HOK, y se esterifica, o bien, se lleva al pH isoelectrico, se centrifugan, lavan con agua destilada y secan las porfirinas precipitadas, y luego se esterifican como en el caso anterior, para su estudio completo.

Preparación de porfirinógenos.

Se tomó como base el método de Fisher (3), al cual se le introdujeron varias modificaciones tendientes a lograr un rendimiento óptimo.

Se prepararon soluciones de las distintas porfirinas libres, en HONa 0,1%, en una concentración del orden de $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$, las cuales se pueden conservar congeladas hasta el momento de su y

so. De estas soluciones se toma un volumen determinado, de acuerdo a la cantidad de porfirina requerida en cada experiencia, y, bajo luz roja se satura 5' con N_2 en un recipiente adaptado a tal fin; luego se le agrega amalgama de sodio al 3% recientemente preparada y previamente pulverizada (1g/ml de solución). Se tapa el tubo conservando la atmósfera inerte, y se agita fuertemente; al cabo de 5' la reducción es completa, lo cual se puede apreciar por desaparición de las bandas de absorción y consecuentemente del color y fluorescencia. Siempre en atmósfera de N_2 , la solución se filtra a través de placa filtrante y se titula rápidamente con H_3PO_4 40% hasta pH 7,2-7,4; en estas condiciones la solución de porfirinógenos, se puede usar directamente. Todas las operaciones incluyendo el agregado al sistema, se efectúan bajo luz roja. Hemos determinado el rendimiento del procedimiento por oxidación a porfirina, resultando estar dentro del orden del 86-90%.

Las operaciones anteriores se realizan en los recipientes del tipo mostrado en la fig.8. Se ha comprobado que el método recientemente descrito es el que da mejores resultados.

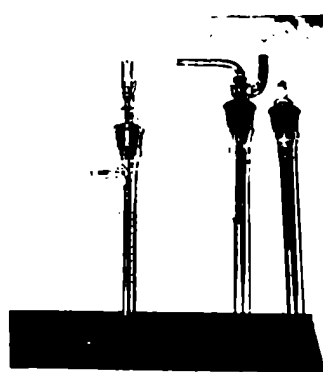


Fig. 8:

Sistemas de incubación

Materiales

Se utilizó la sangre de conejos, pollos normales, o humanos; la cual se recogió sobre heparina, (cedida gentilmente por Laboratorio Inorp), 0,5 mg/ml de sangre, disuelta en solución fisiológica.

Preparación del hemolizado

La sangre se centrifuga a 2.000 rpm, a 0°C, 15', eliminando el plasma, las células se lavan luego con solución fisiológica, siempre entre 0 y 2 °C. Después de los lavados, se elimina la capa de leucocitos por succión. Los eritrocitos se hemolizan entonces por el agregado de 1½ volumen de agua bidestilada previamente enfriada a 0°C, con agitación; se deja entonces durante ½ a 1 hora en la heladera, sacudiendo a intervalos regulares.

Preparación del sobrenadante

Los eritrocitos así hemolizados, se centrifugan a 25000 g a 0°C, durante 45'; al cabo de esta operación, se obtiene un sobre-

Incubación

Las incubaciones tienen lugar en erlenmeyers de 50 ó 100 ml, tapados con algodón y gasa en el caso de atmósfera aeróbica o bien con un dispositivo burbujeador (fig.9) en el caso de atmósfera anaeróbica (de N_2). Se colocan en baño termostático a 37-38°C, con agitación uniforme de aproximadamente 100 movimientos por minuto. A la luz ordinaria o bien en la oscuridad.



Fig. 9:

Composición de los sistemas de incubación

a) Para la obtención de porfirinas.

Con ligeras modificaciones se siguieron las técnicas descritas por Falk y col (103, Falk, comunicación personal). 20 ml de sangre total, (humana, de conejo o pollo), o sobrenadante de eritrocitos de pollo hemolizados, 1 ml de Cl_2Mg 0,12 M, 1 ml de $ClRE$ 0,604 M, 0,2 ml de buffer fosfato de pH 7,0, 0,5 mg de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina (y 0,1 ml de octanol, en el caso de incubación anaeróbica) más 5 mg de ALA ó 2,5 mg de PBG y sobrenadante, disueltos en solución fisiológica (1-2 ml). Con luz natural. Cuando las cantidades de sangre o sobrenadante se variaron, proporcionalmente se modificaron los demás componentes. Salvo en las experiencias que se aclare, la cantidad de ALA o PBG es proporcional al resto del sistema.

Cuando la incubación fue anaeróbica, el sustrato, ALA o PBG, se agregó luego de saturar previamente la atmósfera, durante 10' con N_2 .

b) Para la obtención de porfirinas marcadas con C^{14} .

El mismo sistema que el anterior, pero usando ALA-4- C^{14} como sustrato, y atmósfera anaeróbica.

c) Para la obtención de P IX- C^{14} o hemo marcado.

Se emplean eritrocitos de pollo hemolizados, pero antes de la incubación se añade un volumen, igual a la mitad de GR lavados, de tris buffer (tri-hidroxi-metil-amino-metano, 12,114g en 1000 ml de agua, llevado a pH 7,4 con HCl concentrado)

En el hemolizado así obtenido se determina la concentración de Hb y se distribuye usando por cada frasco aproxima-

mente 20 ml, además de 2 mg de penicilina, 2 mg de estreptomicina Fe^{++} como $SO_4Fe.7H_2O$ (una cantidad tal que resulte una concentración de 4 $\mu g/ml$ de sistema) más los sustratos correspondientes en cada experiencia, ya sea $Gli-C^{14}$ o los porfirinógenos derivados de las distintas porfirinas. La Gli carrier se añade en cantidad tal que resulte aproximadamente una concentración de 1 mg/ml de mezcla de incubación. La $Gli-C^{14}$ se agrega en solución acuosa, al rededor de 3 $\mu C/$ frasco, lo que da aproximadamente $3,11 \times 10^5$ cpm/ μ curie por nuestro método. Asimismo se aclara en cada caso.

Procedimientos de aislación y purificación de porfirinas a partir de sistemas del tipo a) o b).

Aislación

Se hacen en modificaciones de varios métodos (103,111, 112). Interrumpida la incubación, se trata con aproximadamente 10 veces su volumen, de una mezcla de acetato de etilo : ácido acético (4:1,v/v), agitando constantemente; se deja descansar, en algunos ensayos durante ½h, en otros durante toda la noche, en la heladera; no se aprecia ninguna diferencia.

Luego se filtra el precipitado de proteínas a través de filtro plegado, a una ampolla de decantación, se lava varias veces dicho precipitado con pequeñas porciones de la mezcla precipitante, hasta que los líquidos de lavado sean incoloros.

Fracción "U"

Se procede luego a extraer las fracciones "C" y "U", para lo cual se trata el filtrado con una solución saturada de acetato de sodio en pequeñas porciones, hasta que los lavados den fluorescencia negativa; la solución de acetato de sodio contenida de la fracción "U", se lava varias veces con acetato de etilo, reuniendo estos lavados con la fase de acetato de etilo en la cual se encuentra la fracción "C",

Se ajusta luego el pH de la fase acuosa con HCl concentrado, hasta 3-3,2 (viraje del Rojo Congo), se extrae entonces con pequeñas porciones de acetato de etilo, siempre hasta fluorescencia negativa; después de ello, de la fase acetato de etilo a la cual ha pasado toda la fracción "U", ésta se pasa cuantitativamente a HCl 5% ó 10% empleando 1 ml por vez.

Generalmente, esta fase clorhídrica se lleva nuevamente a pH 3-3,2 se extrae con acetato de etilo y otra vez se lleva a HCl, tantas veces como sea necesario, hasta conseguir tener la fracción "U" en pequeño volumen; en estas condiciones se puede medir su concentración en el Beckman. Además cabe hacerse notar que la presencia de hematina en estas soluciones, interfiere luego en la esterificación, cuando ésta se hace adsorbiendo previamente las porfirinas con talco; por lo cual, se debe tratar de obtener soluciones libres de hematina.

Fracción "C"

La fase acetato de etilo original se trata repetidas veces con HCl 10%, que extrae la fracción "C" y "P" si la hubiera, con pequeño volumen por vez. En estas condiciones se puede determinar su concentración en el Beckman (generalmente se procede a concentrarla aún más por sucesivas extracciones).

Esterificación

Se probaron 3 procedimientos para esterificar los componentes de cada fracción.

a) La solución clorhídrica (aproximadamente 2 ml en total) se evapora a sequedad en un desecador al vacío, en presencia de sílica-gel, HOK y Cl_2Ca ; el residuo seco se trata entonces con la mezcla esterificante (metanol : sulfúrico 19:1, v/v) y se deja en la oscuridad durante 24 hs.

b) El extracto clorhídrico se lleva a pH 3-3,2 con acetato de sodio sólido, se deja estar algunos minutos (o más tiempo si fuera necesario) en la heladera; en tales condiciones precipitan las porfirinas, que se centrifugan, se lavan 3 ó 4 veces con agua, se secan en el desecador, y luego se tratan con la mezcla esterificante, dejándola actuar igual que antes.

c) La solución clorhídrica llevada a pH isoelectrico, se trata con talco, agitando bien, luego se filtra por buchner; las porfirinas son adsorbidas por el talco, de éste, bien seco, se eluyen con la mezcla esterificante, se filtra y se deja como en los casos anteriores, en la oscuridad, 24 hs.

Se observa que los resultados obtenidos en los 3 casos fueron similares; por lo cual se trata de evitar la evaporación del clorhídrico, sobre todo en el caso de la fracción "C", pues si hay P IX presente, ésta se destruye parcialmente.

Por medio de cualquiera de estos procedimientos, se obtienen los componentes de cada fracción esterificados, al cabo de 24 hs. Se pasan entonces a cloroformo, se lavan con agua, amoníaco al 10%, agua, y cloruro de sodio al 7%; filtrando finalmente por papel de filtro embebido en cloroformo.

Se determina la concentración de porfirinas en cada fracción, en las soluciones cloroformicas.

Dichas soluciones se concentran al vacío y se procede entonces a identificar los componentes de las mismas por cromatografía sobre papel, en columna, cristalización, puntos de fusión, etc

Obtención de P IX a partir de los sistemas de incubación

La P IX se aísla en forma de éster metílico, siguiendo la técnica descrita por Grinstein (106), con algunas modificaciones. Suspendida la incubación se mezcla el sistema con aproximadamente 8 volúmenes de acetato de etilo : ácido acético (3:1, v/v) , el precipitado se lava luego 3 ó 4 veces con la misma mezcla, usando 20-30 ml por vez. La solución de hematina se trata entonces 3 veces con un exceso de agua destilada, eliminando cada vez la fase acuosa, luego se extrae con HCl 10% hasta fluorescencia negativa , empleando poco volumen por vez, para aislar las porfirinas libres formadas; a continuación se vuelve a lavar 2 veces con agua, 1 vez con solución de acetato de sodio saturada, 1 vez con acetato de sodio 10-15%, y finalmente 2 veces con solución de cloruro de sodio 5-7%. Al cabo de todos estos lavados, la hematina ha quedado concentrada y precipitada en la fase acetato de etilo, se filtra por papel plegado, y el precipitado se seca en la estufa, durante 1 hora a 100 °C. El precipitado seco se suspende en una solución de oxálico al 10% en metanol, agitándose durante 15-20'. Se separa la solución de hematina por filtración. Se repiten las extracciones con varias porciones de oxálico al 10% en metanol, hasta que la solución extraída sea casi incolora (5-6 extracciones con suficientes).

Entonces al total de las soluciones combinadas se le agrega aproximadamente 5 g/100 ml de solución, de $SO_4 Fe \cdot 7H_2O$, se satura con una fuerte corriente de HCl gaseoso; la solución de hematina se aclara y aumenta su temperatura. Al cabo de unos minutos ,

el color original rojo pardo, cambia a violáceo, lo cual indica la liberación del éster metílico de la P IX; se interrumpe la corriente de HCl.

La solución se deja enfriar a temperatura ambiente y entonces se sigue el procedimiento común aplicable a la obtención de ésteres de porfirinas, es decir la solución se trata con un cierto volumen de cloroformo y un exceso de agua, esta solución clorofórmica se lava 3 veces con agua, 1 vez con amoníaco 10%, en esta etapa se forma un precipitado blanco que se debe filtrar; se hacen luego 3 lavados con agua destilada y finalmente 1 con cloruro de sodio 7%; la solución clorofórmica límpida se pasa a través de filtro plegado embebido en cloroformo; se concentra al vacío y se cristaliza la P IX de metanol, recrystalizando de cloroformo-metanol. El rendimiento de la operación es del 58-60%.

Cromatografías sobre papel.

a) Para ésteres metílicos.

Se utiliza el método de Falk y Benson (105), con algunas modificaciones.

Es una cromatografía de tipo ascendente, se trabaja a 22-23 °C. El solvente para saturar las cámaras se coloca en un tubo, en el fondo de las mismas, por lo menos 1h antes de cada corrida. Se utiliza papel Wathman Nº1, en forma de rectángulo (9cm x 23cm). Los ésteres metílicos de las porfirinas se aplican en solución clorofórmica sobre una línea a 2 cm de la base, en forma de manchas, utilizando simples capilares de vidrio, la mancha no debe tener un diámetro mayor que 5 mm. Puede sembrarse en pinceladas con micropipetas especiales.

Como en todas las cromatografías con porfirinas, el revelado se hace con luz ultravioleta.

Este método requiere dos desarrollos en el mismo sentido, en dos cámaras independientes.

Solventes:

Keroseno: incoloro, fracción 190-250 °C, destilada sobre Cl_2Ca .

Cloroformo: lavado 3 veces con agua, seco sobre Cl_2Ca y destilado.

Etanol: absoluto

Dioxano: para cromatografía Merck.

Primer corrida: El solvente a desarrollo, consiste en una mezcla de kerosene y cloroformo etanólico (al 1% de etanol en cloroformo v/v), en la relación de 2:3. La atmósfera se satura con cloroformo, la tira se deja correr hasta que las manchas se hayan movido alrededor de 1/3 del total de camino disponible, lo cual lleva aproximadamente 15'. Al cabo de ese lapso se saca el papel y se seca perfectamente. Los ésteres de la U I, U III y F III, o sus mezclas, se mueven casi a la misma velocidad, en tanto que los de C I o C III y P IX corren un poco más allá de la línea de partida donde quedan las trazas de porfirinas libres u otras impurezas no móviles. Luego, más o menos 0,5 cm por debajo de las manchas se corta el papel, eliminando así dichas impurezas. Una vez marcada la nueva posición de las muestras (línea punteada), se hace el segundo desarrollo.

Segunda corrida: El solvente es una mezcla de kerosene-dioxano, 4:2, con atmósfera de dioxano. La tira se desarrolla en la misma dirección que antes, unos 20 cm en total, aproximadamente 2 hs, al cabo de este tiempo se retira, se seca y se revela.

En estas condiciones se obtienen separaciones óptimas de U I, U III, F III, C I o C III y P IX, además de otras porfirinas con nº de carboxilos intermedios, que también se pueden distinguir por este método, el cual es útil para la separación de los isómeros I y III de las uroporfirinas, aunque no separa isómeros de las demás porfirinas. La resolución del mismo es de aproximadamente 5-8% para mezclas de los isómeros I y III de las uroporfirinas.

Se hace notar, y esto es válido para el método recientemente descrito y para los que se describen a continuación, que con cada partida nueva de cualquiera de los solventes, es necesario ensayar previamente si las proporciones mencionadas cumplen su fin.

Micrométodo para la determinación cuantitativa de porfirinas(114)

Es una aplicación del método anterior. Es decir se usan soluciones clorofórmicas de los ésteres metílicos de las porfirinas.

Se emplea principalmente para la determinación de la proporción de los distintos componentes presentes en las fraccio

nes "B" y "C" aisladas de los diferentes sistemas de incubación.

Para ello, conocida la concentración total de cada mezcla a estudiar se siembra una cantidad determinada de la misma; que no debe ser superior a $1 \mu\text{g}$ por mancha; en el caso de hacerlo en forma de pincelada, se puede colocar una cantidad superior. Se procede exactamente como se indica en el método anteriormente descrito, y luego de revelada la 2ª corrida, se recorta cada mancha del papel, y se introduce en un tubo de ensayos pequeño, en el cual se eluye del mismo con 3 ml de cloroformo. De esta manera la solución clorofórmica de la porfirina está lista para medir su concentración en el Beckman (115), una vez conocida ésta, como se sabe la cantidad total de la mezcla sembrada, podemos determinar fácilmente, la proporción de cada componente presente. La recuperación de porfirinas del papel, por elución con cloroformo, es del orden del 95%.

Apreciemos que cantidades tan pequeñas como $1 \mu\text{g}$ total de muestra, son suficientes para la aplicación de esta técnica.

b) Para porfirinas libres.

Se basa en el método de Eriksen (116), con algunas modificaciones.

Es útil para la identificación de los isómeros I, II y III de las coproporfirinas, con una sensibilidad del 10%, para mezclas de ellos; aunque no separa los isómeros de las demás porfirinas.

Solventes.

2-6 Lutidina: para cromatografía Merck o BDH.

Amoníaco: para análisis.

Agua: bidestilada

Usamos la técnica ascendente, papel Wathman Nº1, en forma rectangular (7 x 30cm). Se colocan las muestras sobre una línea base a 2cm, en forma de manchas de diámetro no mayor que 5 mm, con pipeta capilar. Las porfirinas libres, en solución de amoníaco al 10%, en cantidades hasta $0,8-1 \mu\text{g}$ por mancha. La cuba se satura con amoníaco durante todo un día; ¡ hora antes de colocar la tira se introduce un cristalizador, con la mezcla de desarrollo, 2-6 Lutidina : agua (7:3). Se deja correr durante 14-16 hs, fuera de la luz, a temperatura ambiente. Retirada la tira se seca y

se revela. En estas condiciones la separación de los isómeros es buena.

La proporción de Lutidina : agua se puede variar de acuerdo a las porfirinas que se deseen separar. Cuando tienen mayor nº de carboxilos, conviene aumentar la proporción de agua.

En general los dos métodos descriptos permiten distinguir las distintas porfirinas de acuerdo a su nº de carboxilos, ya sean libres o esterificados.

Cromatografía en columna de carbonato de calcio.

La cromatografía en columna se utiliza principalmente, para la purificación de porfirinas. Se han usado columnas de talco para la purificación de los ésteres de las porfirinas por Figher y Hofmann (6) y para porfirinas libres por Comfort (117), quien empleó HCl para su elución.

Columnas de alúmina se emplearon para la separación de ésteres de porfirinas por Waldenstrom (118), Prunty (119), Lederer (120) y Mc Swiney (121) mientras que el carbonato de calcio, fue usado por Grinstein (96), Watson (104) y Gray (122). La técnica fue estudiada sistemáticamente por Nicholas (123).

Las columnas de carbonato de calcio fueron usadas por Grinstein (96) para la aislación de las porfirinas a partir de porfirinas patológicas incluyendo la porfirina 208. La misma muestra de carbonato de calcio permitió la separación de la U III y de la PsU a Dresel y Falk (65).

Nosotros empleamos la técnica del carbonato de calcio descripta en el trabajo original de Grinstein (96). Se usa una columna cromatográfica del tipo Zechmeister y Cholno-ky (124), de distintas dimensiones de acuerdo a cada caso particular (fig. 10), adaptada a un kitasato que se conecta al vacío. Se utilizaron distintas clases de carbonato de calcio; pero en general es de tipo precipitado para cromatografía. Una vez conectada la columna cromatográfica al vacío, se aplica un vacío de 30-40 mm de Hg, se va introduciendo en el tubo, el carbonato de calcio en

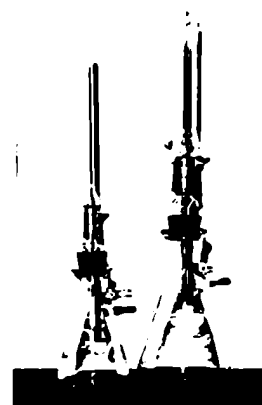


Fig. 10:

Fig. 10: Diagrama de un equipo de cromatografía en columna, mostrando una columna vertical conectada a un kitasato y un sistema de vacío.

porciones sucesivas, golpeando regularmente en las paredes del mismo, con una varilla especial, tipo émbolo, que se utiliza para presionar la columna por la parte superior, con el objeto de lograr una vela homogénea y compacta.

Cuando la altura de la columna así lograda llega a una longitud de 9/10 de la del tubo, se suspende el agregado de carbonato de calcio y se alisa, presionando la parte superior. Una vez lista la columna se está en condiciones de proceder a la cromatografía. Proceso que se puede dividir en etapas: 1) adsorción del soluto sobre la parte superior de la columna, 2) desarrollo, 3) expulsión de la vela de carbonato de calcio y revelado, 4) separación mecánica de las bandas, 5) elución.

1) El residuo seco de los ésteres metílicos a cromatografiar se disuelve totalmente en un pequeño volumen de cloroformo-benceno (a veces se le añade también un poco de éter, según las porfirinas presentes), sin suspender en ningún momento el vacío se echa esta solución por la parte superior; se permite adsorber en la menor zona posible y se le agregan porciones sucesivas de benceno hasta que la adsorción sea completa.

2) Se continúa luego con la mezcla de desarrollo del cromatograma, constituida generalmente de benceno-cloroformo, cuyas proporciones varían en cada caso, de acuerdo a la constitución de las porfirinas a cromatografiar.

3) Una vez logrado un cromatograma estable, se deja escurrir el solvente, se desconecta el vacío y se expulsa la columna ayudándose del émbolo ya mencionado. Se fija la posición y los límites de las distintas bandas, ya sea de acuerdo a su color, si están suficientemente coloreadas, o previa iluminación con luz ultravioleta.

4) y 5) Con un bisturí se cortan las distintas bandas, que se suspenden en cloroformo para la elución de las porfirinas adsorbidas, las cuales pasan a solución, y se separan del carbonato de calcio por filtración a través de placa filtrante.

Finalmente se concentran las distintas fracciones, por destilación al vacío, las cuales se recromatografían tantas veces como fuere necesario, hasta conseguir entidades cromatográficas, es decir bandas únicas.

Curvas de absorción.

Las curvas de absorción de las porfirinas, se realizaron con sus soluciones clorofórmicas o ácidas, en un Espectrofotómetro Beckman D.U.

Cálculo de las concentraciones.

Las concentraciones de las distintas porfirinas, o sus mezclas, ya sea en soluciones clorofórmicas, o bien ácidas, se midieron en el Espectrofotómetro Beckman D.U., utilizando los correspondientes Coeficientes de Extinción.(115)

Mediciones de radioactividad.

La actividad de las muestras marcada con C^{14} se midió en un contador Nuclear Chicago, Modelo D 47, con ventana micromil y corriente de gas, siguiendo los detalles técnicos descriptos por Grinstein (111,125). Las correcciones debidas a autoabsorción se calcularon usando una curva construida con éster metílico de la P IX- C^{14} . Expresándose los resultados en cpm a un espesor infinitamente pequeño (fig. 11 y 12)

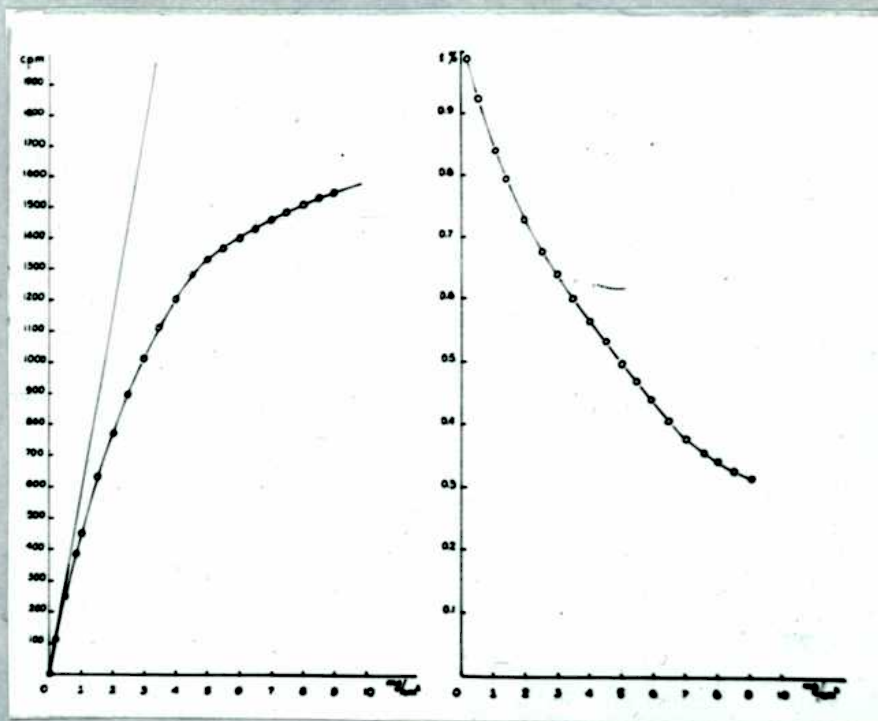


Fig.11:Curva de autoab-
sorción para
P IX- C^{14} ,

Fig.12:Factor de co-
rrección por
autoabsorción.

Determinación de Hemoglobina.

La Hb se determinó tomando 0,02 ml del sistema, añadiéndole 5 ml de HCl 1% y leyendo a los 45' en un Spectronic a 525 m μ utilizando la curva construida a tal fin. (fig.13).

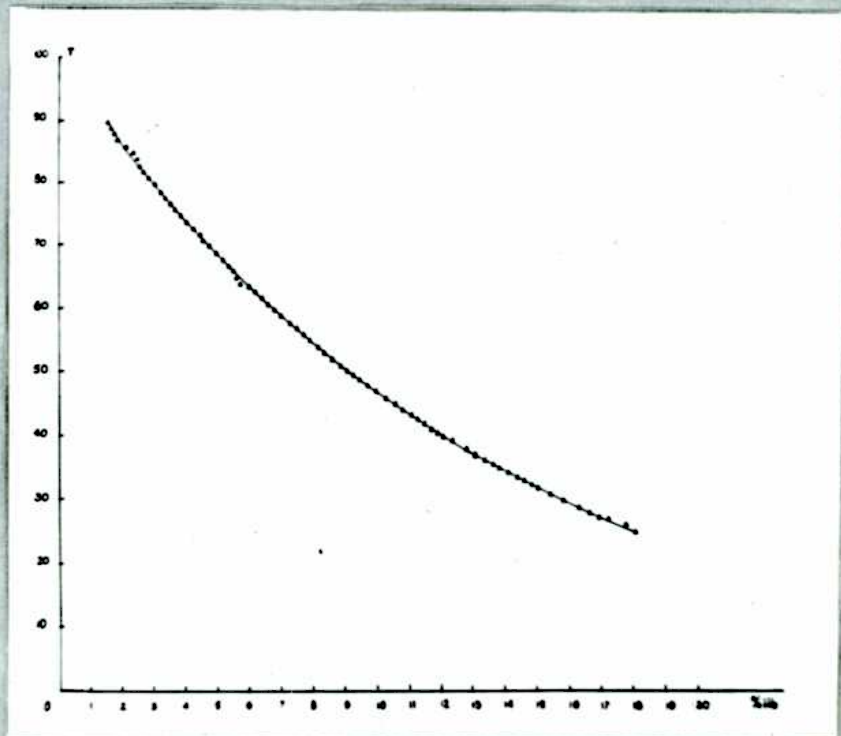


Fig. 13: Curva de Transmitancia para Hb.

Determinación de ALA y PBG.

El ALA y el PBG fueron determinados espectrofotométricamente, en base a los métodos de (126,42). Las curvas empleadas para tal fin fueron realizadas en nuestro laboratorio por los Licenciados E. Rivas y H. Tigler respectivamente.(fig.14 y 15).

Las determinaciones se hicieron en filtrados, después de la precipitación de 1 ml de incubado, con ácido tricloroacético, hasta una conc. final de 5%.(Las lecturas de PBG se tomaron a los 30").

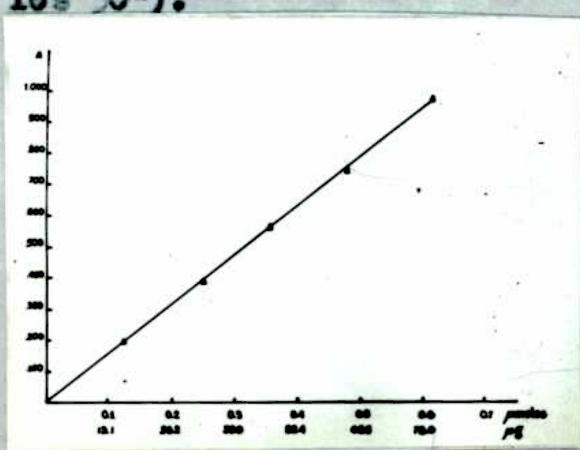


Fig.14: Curva de absorción para ALA.

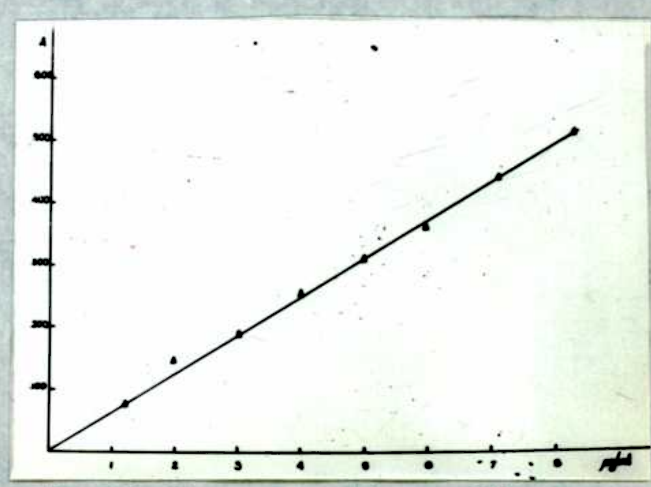


Fig.15: Curva de absorción para PBG (como clorhidrato).

Puntos de fusión.

Se tomaron con un aparato para micropunto de fusión del tipo Koeffler o con un Fisher-Johns, sobre platina calentada eléctricamente.

Fotografías de los cristales.

Se tomaron en un microscopio con cámara fotográfica interior, del Laboratorio de Genética de la Facultad.

Reactivos.

Todos los reactivos empleados fueron de grado P.A.

RESULTADOSPORTE 10: BIOSINTESIS DE LA FRIAPORFIRINA III E IDENTIFICACION
CON LA PSEUDOUROPORFIRINA.

Se realizaron una serie de experiencias, en atmósfera aeróbica, empleando diferentes sistemas, durante un tiempo de 4 hs. En cada una de ellas se procedió, aplicando las técnicas descritas, a la aislación, purificación, separación, identificación y de terminación de las porfirinas biosintetizadas.

Podemos resumir los resultados obtenidos en el siguiente cuadro:

Tabla I: Biosíntesis de porfirinas

Exp	Prepar.	S. "µmoles" (¹)	Porfirinas formadas										
			Fracción "C"					Fracción "U"					
			PIX	3-C	CIII	5-C	6-C	6-C	FIII	UI	UIII	no id.	
1	e.p.h.	ALA 3,73	++	-	++	-	-	-	-	-	-	tr	-
2	s.t.c.	ALA 1,86	-	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-
3	s.t.c.	ALA 3,73	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	-
4	s.t.c.	ALA 5,59	tr	+	++	+	+	+	++	-	++	+	+
5	s.t.h.	ALA 3,73	tr	+	++	+	+	+	+	-	+	+	+
6	s.t.c.	ALA 7,46	tr	+	++	+	+	+	++	-	+++	+	+
7	s.t.c.	ALA 3,73	tr	+	++	+	+	+	++	-	++	+	+
8	s.t.c.	ALA 5,59	tr	+	++	+	+	+	++	+	+++	+	+

Algunos resultados corresponden a promedios de duplicados.

(¹) La concentración de ALA se expresa como "µmoles" equivalentes en porfirinas; teniendo en cuenta el hecho de que 8 moléculas de ALA (y sólo 4 de PBG), se requieren para sintetizar 1 de porfirina o sea, que las concentraciones que figuran, tanto en esta Tabla, como en las siguientes, hay que multiplicarlas por 8 (ó por 4, para PBG), para tener las molaridades reales.

Las cruces, indican sólo proporciones relativas en cada experiencia

e.p.h.: eritrocitos de pollo hemolizados.

s.t.c.: sangretotal de conejo.

s.t.h.: sangre total humana

La identificación de las distintas porfirinas, es una consecuencia de la aplicación de las cromatografías en papel y columna, tanto en lo que se refiere a esta Tabla como a las siguientes.

La secuencia de operaciones aplicadas en todos los casos fue en general: incubación, aislación de porfirinas, esterificación cromatografía en papel, en columna, obtención de entidades cromato-

gráficas, nueva identificación sobre papel, cristalización, curvas de absorción etc...

Teniendo en cuenta que una atmósfera anaeróbica (109), da lugar a un mejor rendimiento de la fracción "U", sobre la cual recae nuestro interés, se llevaron a cabo distintas experiencias en tales condiciones, es decir burbujeo continuo de nitrógeno.

Asimismo se probó la influencia de la modificación de ciertos factores.

Tabla II: Con distintas concentraciones de ALA

Exp Prepar.	S "µmoles"	Porfirinas formadas (en µg)									
		Fracción "C"					Fracción "U"				
		PIX	3-C	CIII	5-C	6-C	6-C	FIII	UI	UIII	no id
1 _a	s.e.p.h. ALA 2,242	-	+	40	+	+	+	17	-	36	+
2 _a	s.e.p.h. ALA 3,067	-	+	70	+	+	+	82	-	180	+

s.e.p.h.: sobrenadante de eritrocitos de pollo hemolizados
Tiempo de incubación: 90'

Las determinaciones cuantitativas, se realizaron, en todos los casos, aplicando el micrométodo para tal fin descrito en Métodos.

Tabla IV: Empleo de distintas soluciones isotónicas

Exp Prepar.	S "µmoles"	Porfirinas formadas (en µg)									
		Fracción "C"					Fracción "U"				
		PIX	3-C	CIII	5-C	6-C	6-C	FIII	UI	UIII	no id
1 _a	s.e.p.h. ALA 3,739	-	-	92	-	+	+	27	-	95	+
2 _a	s.e.p.h. ALA 3,739	-	+	64	+	+	+	30	tr	118	+
3 _a	s.e.p.h. PBQ 3,739	-	+	56	+	+	-	37	tr	125	+

(^o): Exp 1_a, se empleó solución de sacarosa 0,25M como líquido de lavado y disolución.

Excepto en la única experiencia indicada, en todas las demás se usó solución fisiológica.
Tiempo de incubación: 90'

Tabla III: A distintos tiempos y calentamiento del sistema, previo a la incubación durante intervalos de tiempo diferentes

Exp Prepar.	S "moles"	Porfirinas formadas (en µg)									
		Fracción "C"					Fracción "U"				
		PIX	3-C	CIII (o CI)	5-C	6-C	6-C	PIII	UI	UIII	no id
1 _b	s.e.p.h. ALA 1,497	-	-	5	-	-	-	5	-	11	-
2 _b	s.e.p.h. ALA 1,497	-	-	9	-	-	-	12	-	21	-
3 _b	s.e.p.h. ALA 1,497	-	+	13	-	+	+	30	tr	60	+
4 _b	s.e.p.h. ALA 1,497 (⁽ⁱ⁾)	-	-	31	-	+	+	15	4	50	+
1 _c	s.e.p.h. ALA 3,739	-	+	110	+	+	+	67	-	158	+
2 _c	s.e.p.h. PBG 3,739	-	+	90	+	+	+	60	-	140	+
3 _c	s.e.p.h. ALA 2,242 (⁽ⁱⁱ⁾)	-	-	13	-	-	-	-	109	15	-
4 _c	s.e.p.h. ALA 2,242 (⁽ⁱⁱⁱ⁾)	-	-	6,6	-	-	-	-	132	-	-
1 _d	s.t.c. ALA 7,478	-	5	80	4	4	+	100	-	360	+
2 _d	s.t.c. ALA 3,067 (^(iv))	-	-	4,6	-	-	-	-	122	-	15

(⁽ⁱ⁾) : calentado 10' a 60°C
 (⁽ⁱⁱ⁾) : calentado 15' a 60°C
 (⁽ⁱⁱⁱ⁾) : calentado 30' a 60°C
 (^(iv)) : calentado 15' a 60°C

1_b : incubado durante 30'
 2_b : incubado durante 60'
 Todos los demás incubados 90'

Conclusiones:

De las tablas anteriores, podemos deducir:

De la Tabla I se verifica que se necesitan eritrocitos nucleados (Exp.1), para la síntesis de P IX.

Las trazas de P IX que se encuentran en las demás experiencias, posiblemente se deben a fuentes endógenas.

Se han identificado en todos los casos porfirinas de distinto nº de carboxilos.

Debe hacerse notar en general, que la aislación de porfirinas de estos sistemas, no es cuantitativa; sino que se ha determinado que la extracción de porfirinas del sistema de incubación, precipitado con la mezcla 3:1 (ó 4:1) de acetato de etilo : ácido

acético; tiene un rendimiento menor del 50%, pues hay una considerable adsorción, sobre todo de la fracción "U", sobre la proteína precipitada; de manera que los valores experimentales informados, son en realidad menores que la mitad de los reales. A pesar de ello, no se ha encontrado un método mejor. Aún así, es el más conveniente, particularmente debido a la presencia de la F III en la fracción "U".

De las Tablas siguientes, II, III, IV, se comprueba que u na atmósfera anaeróbica, detiene la síntesis a la altura de la fracción "C".

De la Tabla II, vemos que un aumento en la concentración del sustrato, produce correlativamente un aumento de síntesis.

De la Tabla III, se aprecia que con la misma concentración de sustrato (Exp. 1_b, 2_b, 3_b) a mayor tiempo, mayor síntesis; pero se ha observado, que luego de los 90', para una concentración dada de sustrato, la cantidad total sintetizada permanece más o menos constante, aunque aumenta la proporción de la fracción "C", a expensas de la "U"; lo cual no es de nuestra conveniencia. De donde el tiempo óptimo para nuestros fines es de 30'; por ello todas las demás experiencias se llevaron a cabo durante tal lapso.

Además, un calentamiento previo del sistema durante un tiempo menor que 15' (Exp. 4_b) no produce modificaciones muy notables; pero cuando ese intervalo es de 15' o más, confirmando lo hallado por otros grupos de investigadores, se sintetiza U I en lugar de U III, desaparece la F III y el rendimiento de la fracción "C" también disminuye notablemente (Exp. 3_c, 4_c, 2_d), los resultados son similares, empleando sangre total de conejo o sobrenadantes de eritrocitos de pollo hemolizados, ésto sería debido, muy probablemente, a la inactivación de la UPC-isomerasa, y además debe afectar también, el sistema enzimático que conduce hacia la "C", evidenciado por la menor síntesis de ella y la total desaparición de F III.

De la Tabla IV, diremos que, si en vez de lavar las células y disolver los sustratos y antibióticos con solución fisiológica, como se hizo siempre, se emplea solución isotónica de sacarosa 0,25M, los resultados no se afectan.

Como ya indicaron otros autores (83) de las Tablas III y IV vemos que ALA y PBG, en cantidades equivalentes, se comportan similarmente.

Otras conclusiones, expondremos más adelante.

En algunas experiencias, una vez suspendida la incubación se tomó 1 ml del sistema y se determinaron las concentraciones de ALA y PBG; resultando en general que: cuando usamos ALA como sustrato, aproximadamente un 15% del ALA agregado, no se utiliza en la biosíntesis y un 25% se transforma en PBG. En tanto que cuando usamos PBG como sustrato, aproximadamente un 40% del mismo queda sin utilizar.

En este último tipo de experiencias anaeróbicas se procedió al análisis de los productos formados en la misma forma que con las anteriores.

La mayor diferencia entre ambos tipos de experiencias, residiría en la ausencia absoluta de P IX en el segundo tipo de ensayos. De manera que teniendo en cuenta esto último, los cromatogramas tanto en papel como en columna, obtenidos en las diferentes experiencias, se pueden representar esquemáticamente como sigue:

La fig. 16 muestra un cromatograma sobre papel (105), en el cual, como en todos los que siguen, se han colocado testigos de U I, U III, F III, C III y P IX, además de las fracciones "U" y "C" correspondientes a sistemas normales. La fracción "U", reveló como constituyentes principales a U III y F III (posiblemente haya una pequeña proporción de U I), mientras que la fracción "C" a C III.

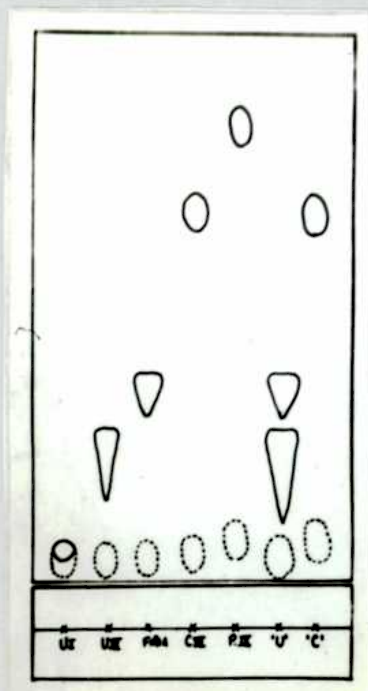


Fig. 16:

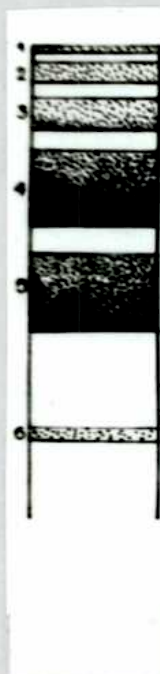


Fig. 17:

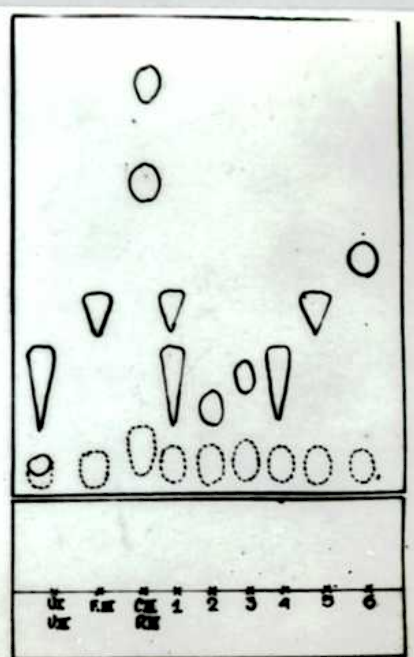


Fig. 18:

La fig.17 representa un cromatograma en columna de la fracción "U", resuelta en 6 bandas, se hace notar aquí, que la sensibilidad de la columna, en lo que respecta a la resolución, es mayor que el papel.

La fig.18 muestra otro cromatograma sobre papel, en el cual, además de los testigos, hemos colocado muestras de cada una de las bandas de la columna que se representa en la fig.17. Se observa que las bandas 4 y 5, corresponden a U III y P III respectivamente, aparecen asimismo dos manchas (bandas 2 y 3) situadas en una posición intermedia entre U I y U III; y una porfirina, que por su posición, se deduce que es hexacarboxílica.

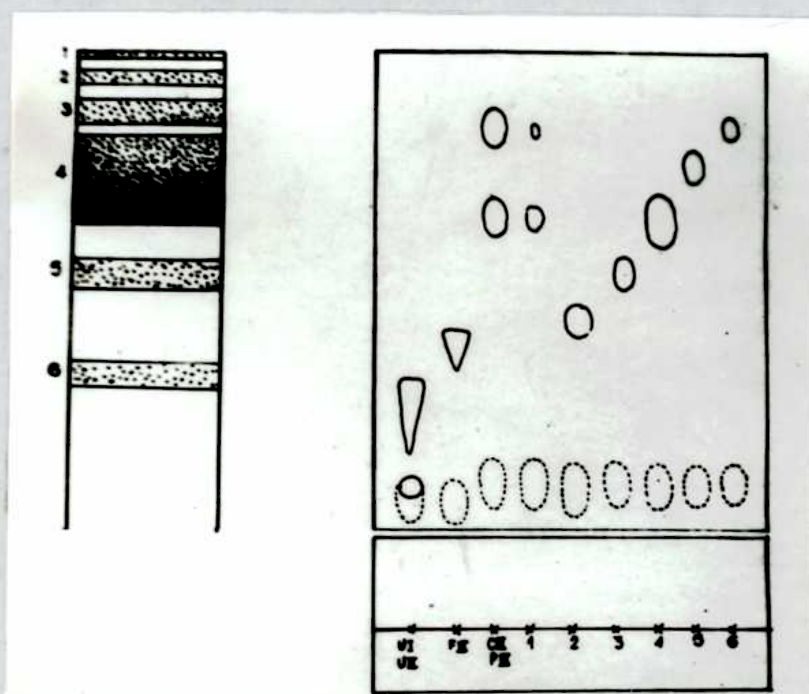


Fig. 19:

Fig. 20:

La fig.19 representa una cromatografía en columna de la fracción "C", resuelta en 6 bandas, cada una de las cuales se puede ver luego cromatografiada sobre papel según se muestra en la fig.20. La banda 2 corresponde a una porfirina de 6 COOH, (muy probablemente esta porfirina se distribuye entre ambas fracciones) la banda 3 es una pentacarboxílica, la 4 se identifica con el testigo de C III; la banda 5 sería una tricarboxílica y finalmente la banda 6 corre igual que la P IX.

Las fig. 21, 22, 23, 24, 25, corresponden a sistemas previamente calentados (Exp. 3_c, 4_c, 2_d).

La fig. 21, muestra un cromatograma sobre papel, en el cual vemos, como ya se ha anticipado, que la fracción "U" consiste casi exclusivamente de U I, en tanto que la fracción "C" de C (I).

La fig. 22 representa un cromatograma en columna de esta fracción "U", resuelta en 4 bandas, cada una de las cuales aparece luego, en la fig. 23, cromatografiada sobre papel. Se revelan acá también 2 manchas en una posición intermedia entre la U I y la U III

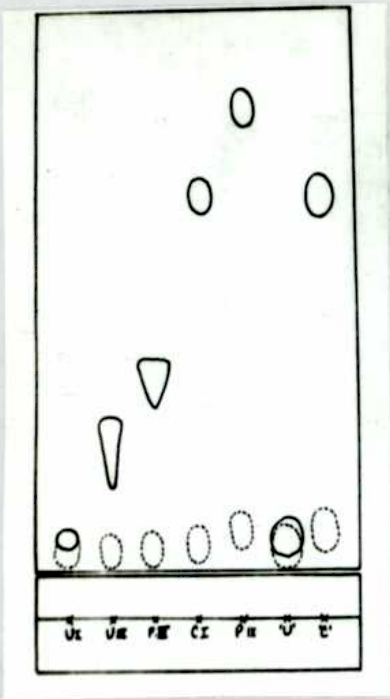


Fig. 21:

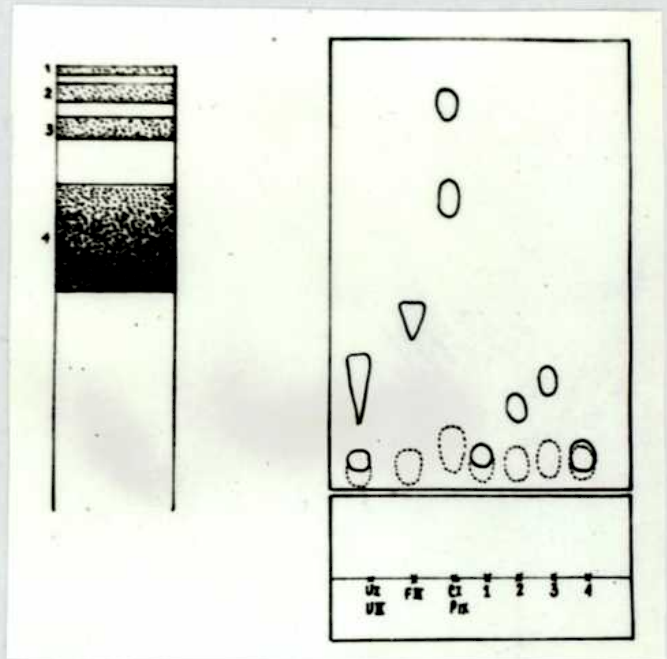


Fig. 22:

Fig. 23:

La fig. 24 representa una cromatografía en columna de la fracción "C" proveniente de los sistemas previamente calentados, resuelta en 2 bandas, cada una de las cuales se ve en la fig. 25 cromatografiada sobre papel.

Unicamente se revela la presencia de coproporfirina.

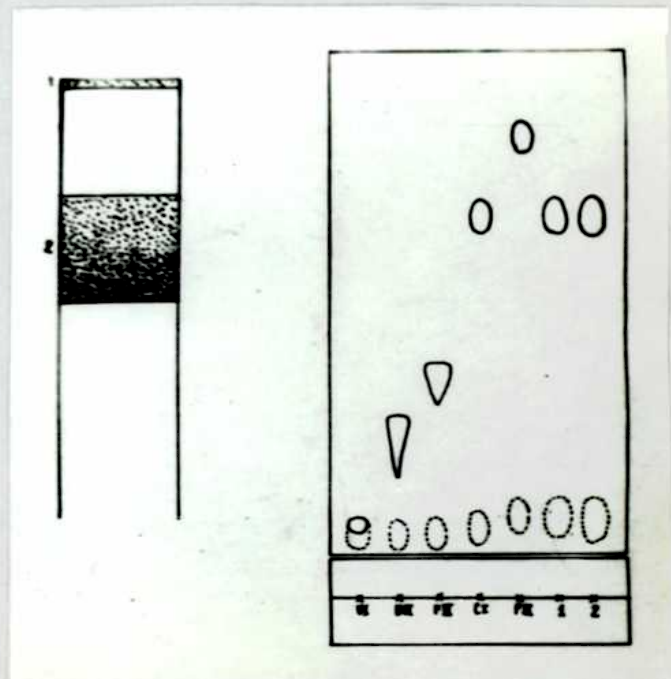


Fig. 24:

Fig. 25:

Aclaremos que en todos los casos, la banda 1 de las columnas de carbonato de calcio, se reesterificó previamente a ser sometida a una nueva corrida sobre papel.

Además del estudio cromatográfico, cada una de estas porfirinas biosintéticas fue sometida a otro tipo de identificación, y en todos los casos posibles se procedió a estudiarla comparativamente con la porfirina aislada de fuentes naturales.

Firiaporfirina III Biosintética .

Desde el punto de vista de nuestro interés, se realizó un estudio más exhaustivo con la porfirina de la banda 5 (fig.17) para la que se ha propuesto la denominación de Firiaporfirina III

Se ha estudiado comparativamente con la F III, aislada de orinas de porfiria cutánea tarda, a) por cromatografía sobre papel, los ésteres metílicos de la F III-B, el de la F III y una mezcla de ambos, corren exactamente igual (fig.27). b) por cromatografía en columna, una mezcla de ambos ésteres, se comporta como una entidad cromatográfica (fig.26) y si esta banda se cromatografía luego sobre papel, vuelve a dar una sola mancha (fig.27).

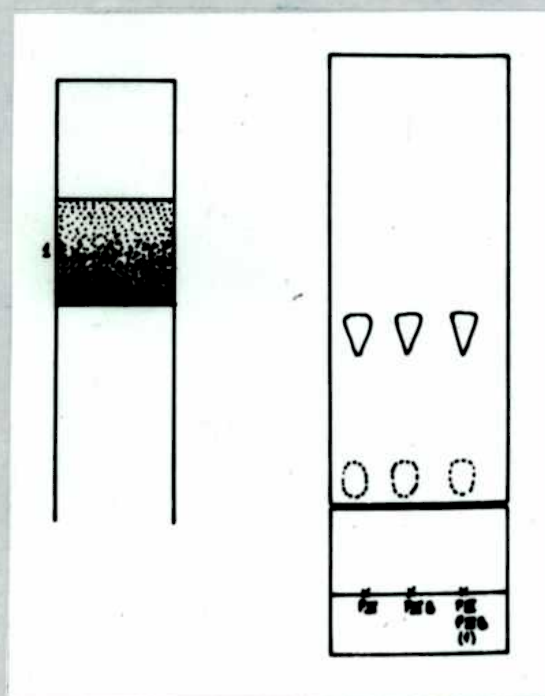


Fig. 26:

Fig. 27:

c) su éster metílico presenta una forma cristalina idéntica a la de la F III (fig. 28 y 29)

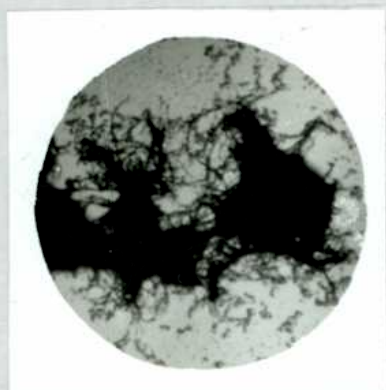


Fig. 28: Cristales de la F III-B.



Fig. 29: Cristales de la F III.

d) se determinaron los puntos de fusión de ambos, separadamente, así como de la mezcla, resultando iguales (Tabla V).

e) se hicieron las curvas de absorción de los ésteres metílicos en solución clorofórmica (fig. 30), coincidiendo sus máximos (Tabla V), así como las correspondientes a las formas libres, en solución de HCl 25% (fig. 31)(Tabla V).

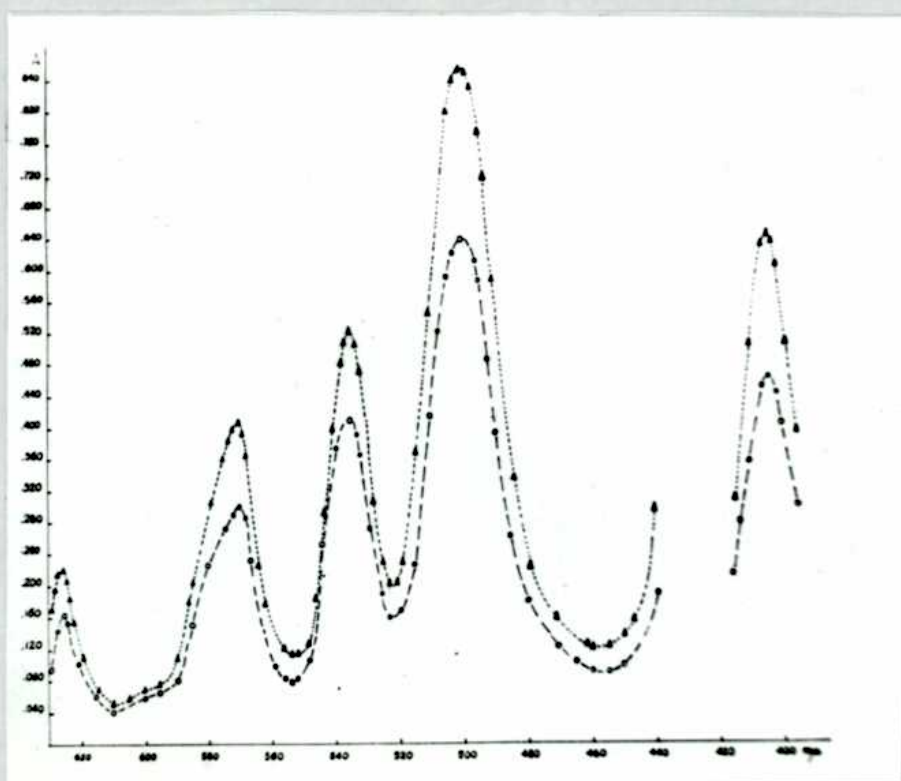


Fig. 30: Espectros de absorción de los ésteres metílicos de la F III (▲) y de la F III-B (○)

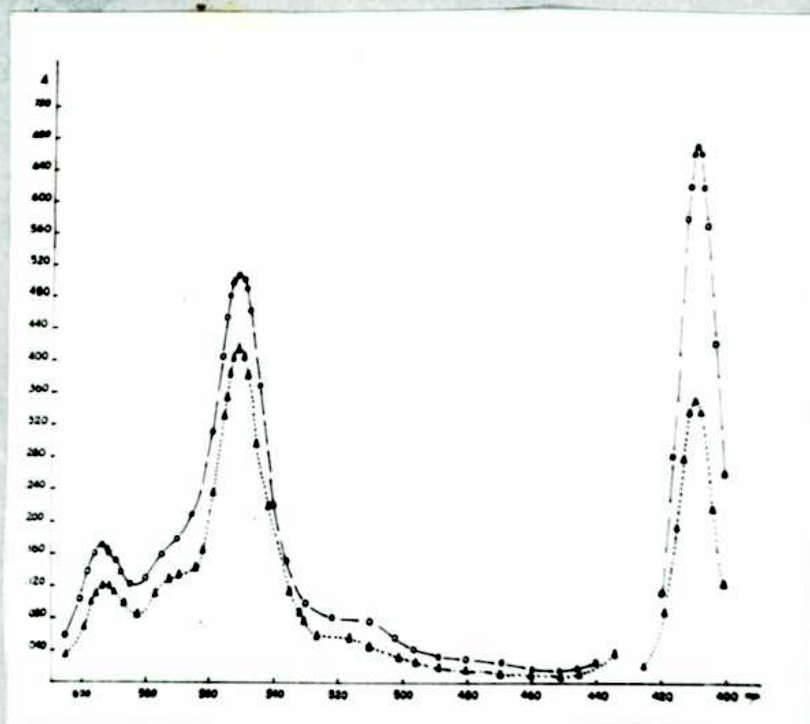


Fig. 31: Espectros de absorción de las formas libres de la F III (▲) y de la F III-B (○)

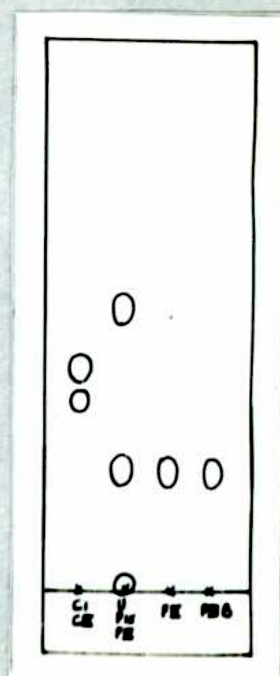


Fig. 32: Cromatografía de las formas libres de la F III y la F III-B .-

f) se saponificaron ambas porfirinas y se sometieron a una cromatografía de Lutidina, presentando el mismo Rf (fig. 32)

g) se prepararon los complejos metálicos de Cu y de Zn de ambas porfirinas a los cuales se les determinaron sus puntos de fusión y curvas de absorción (fig. 33 y 34). Los datos obtenidos se pueden cotejar en la Tabla V.

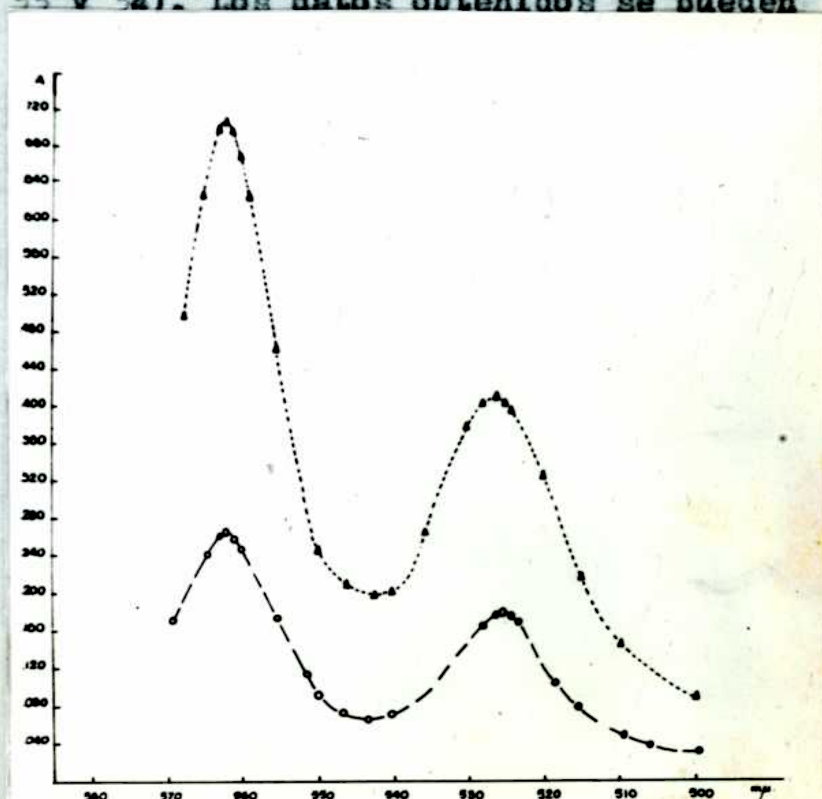


Fig. 33: Espectros de absorción de los complejos metálicos de Cu de la F III (▲) y de la F III-B (○)

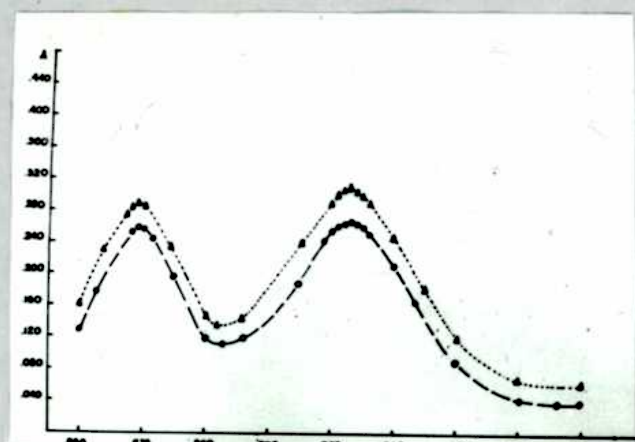


Fig. 34: Espectros de absorción de los complejos metálicos de Zn de la F III (▲) y de la F III-B (○)

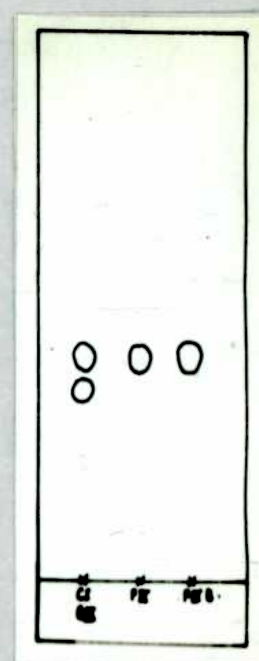


Fig. 35: Cromatografía de lutidina de los productos de decarboxilación de la F III-B y F III

h) se procedió a efectuar una decarboxilación de ambas porfirinas y se identificaron sus productos de decarboxilación como C III exclusivamente para ambas muestras, 1) por la forma cristalina del éster metálico, su punto de fusión (Tabla VI) y además por saponificación y cromatografía de Lutidina (fig.35).

Tabla V: Puntos de fusión y máximos de absorción de la F III, natural y biosintética y de sus derivados.

Porfirina	P. F.	Solv.	Bandas de Absorción (mμ)				
			I	II	III	IV	V
F III-B	213-215	Clorof.	625	570	534,6	500,8	405,5
F III	213-215	"	625	570	534,6	500,8	405,5
F III-B-Cu	275-280	"	562	525			
F III-Cu	275-280	"	562	527			
F III-B-Zn	268-277	"	571	537			
F III-Zn	267-276	"	571	537			
F III-B		HCl 25%	593	551			409
F III		HCl 25%	594	552			409

Tabla VI: Productos de decarboxilación provenientes de diferentes porfirinas

Porfirina Decarboxilada	Productos (%)(')		P.F.del éster metílico	
	C I	C III	°C	
F III-B	-	100	138-141	(170)
F III	-	100	140-143	(170)
U III-B	-	>95	138-140	(170)
U III	-	100	140-142	(172)
U I/B	> 95	-	248-250	
U I	100	-	250-252	

(3) Identificación por cromatografía

Conclusiones

Los resultados obtenidos, permiten afirmar que la F III, originalmente llamada porfirina 208 (96,104) y esta porfirina biosintética, la F III-B, así como la PsU aislada por Falk de sistemas similares, son un mismo compuesto.

Uroporfirina III Biosintética

(Banda 4, fig.17) Se estudió comparativamente con la U III aislada de turacina. Presentó igual comportamiento cromatográfico tanto en papel como en columna de carbonato de calcio.

Se tomaron los puntos de fusión de los ésteres metílicos (Tabla VII).

Se observó su típica forma cristalina (fig.36)

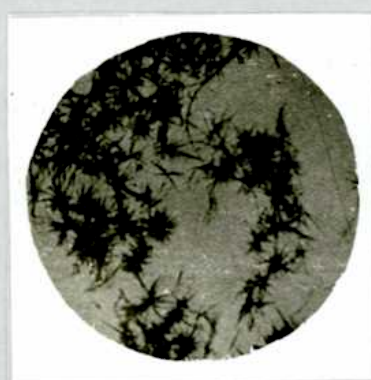
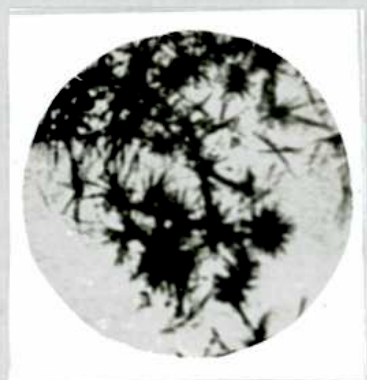


Fig. 36: Cristales de la U III.

Cristales de la U III-B

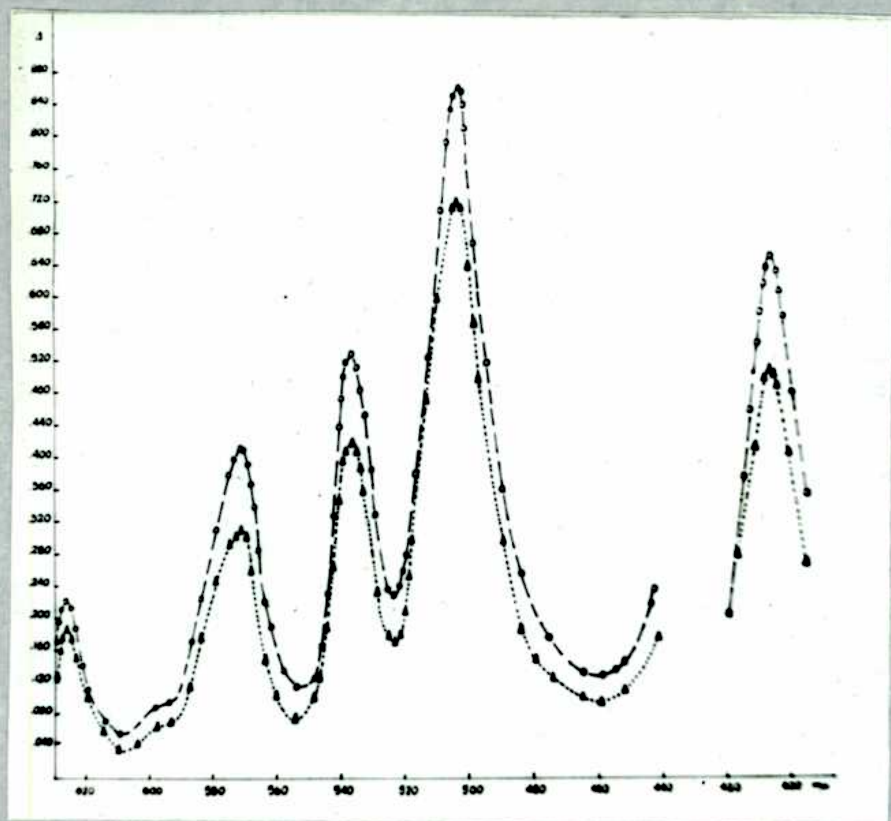


Fig. 37: Espectros de absorción de los ésteres metílicos de la U III-B (o) y de la U III (A).

Se efectuaron las curvas de absorción en cloroformo de los ésteres metílicos (fig.37), coincidiendo los máximos (Tabla VII)

Por decarboxilación e identificación de los productos resultantes, la U III produce totalmente C III, la U III-B, podemos asegurar de acuerdo al método que por lo menos un 95% es C III, no se apreciaron ni trazas del otro isómero (fig.38), los puntos de fusión de los ésteres metílicos son casi idénticos (Tabla VI).

Uroporfirina I Biosintética

(Banda 4, fig.22) Se estudió comparativamente con la U I aislada de orinas de porfiria congénita. Igual comportamiento cromatográfico. Se tomaron los puntos de fusión de sus ésteres metílicos (Tabla VII) Presentó la forma cristalina típica (fig.39)

Por decarboxilación e identificación de los productos, ambas produjeron exclusivamente C I (sin trazas de C III) (fig.40) cuyos ésteres metílicos cristalizaron como C I y fundieron como tales (Tabla VI)

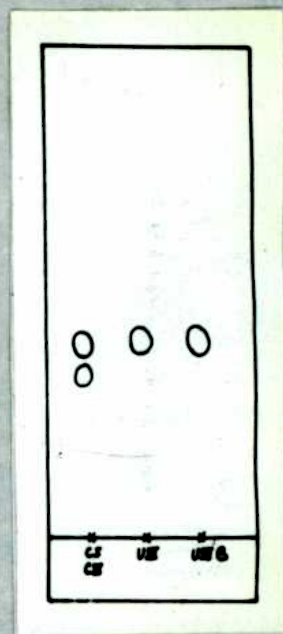


Fig. 38: Cromatografía de Lutidina de los productos de decarboxilación de las U III-B y U III.

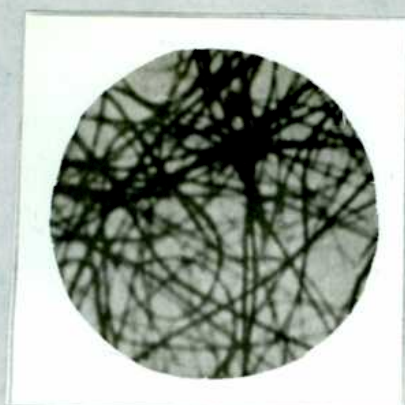


Fig. 39: Cristales del éster metílico de la U I.



Cristales del éster metílico de la U I-B.

Se efectuaron las curvas de absorción de los ésteres metílicos en cloroformo (fig.41), coincidiendo sus máximos (Tabla VII)

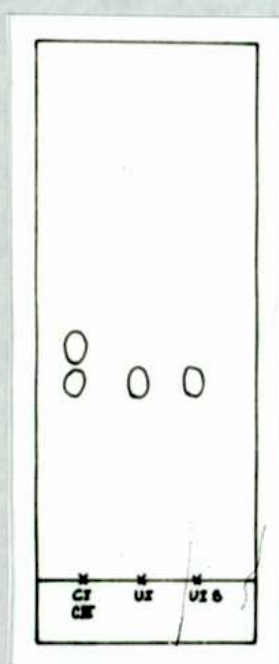


Fig. 40: Cromatografía de Lutidina de los productos de decarboxilación de U I-B y U I.

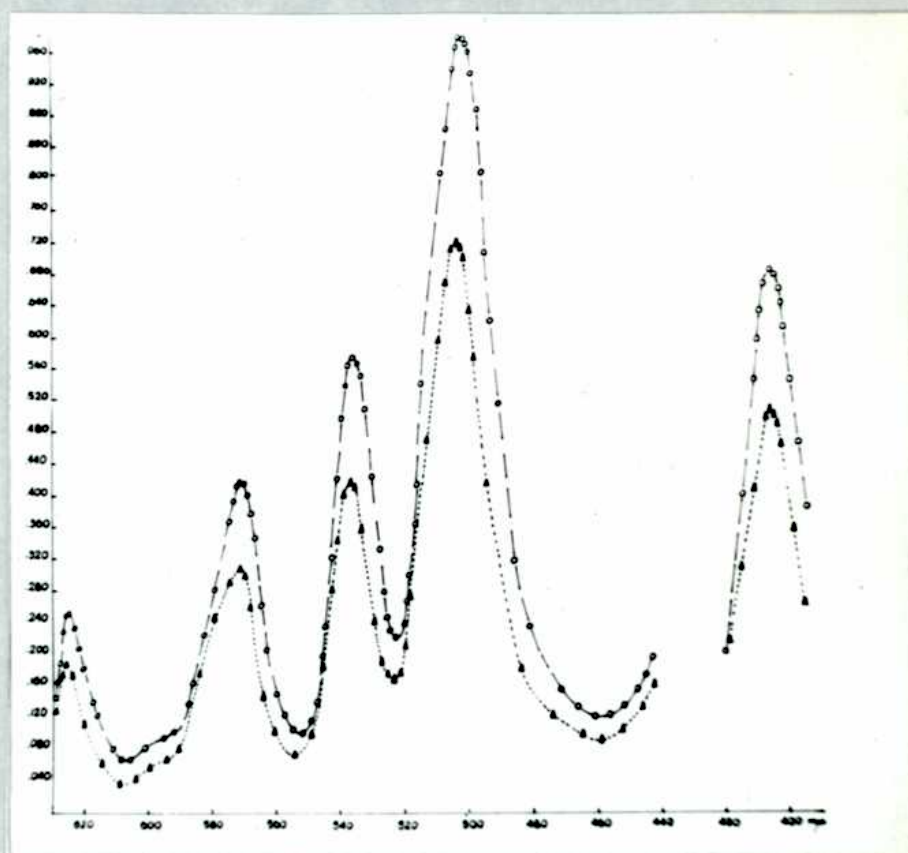


Fig. 41: Espectros de absorción de los ésteres metílicos de la U I-B (o) y de la U I (▲).

Coproporfirina III Biosintética

(Banda 4, fig.19) Comparativamente con la C III de intoxicados con plomo. Comportamiento cromatográfico, en papel y columna, idéntico con el del testigo.

Presentó forma cristalina típica (fig.42)

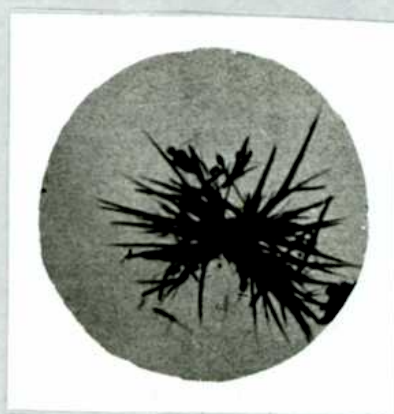


Fig.42: Cristales del Éster metílico de la C III-B.

Cristales del -éster metílico de la C III

Por saponificación del éster y corrida de la forma libre, dió únicamente C III (fig.43)

Se efectuaron las curvas de absorción en cloroformo de los ésteres metílicos (fig.44), resultando coincidentes los máximos (Tabla VII).

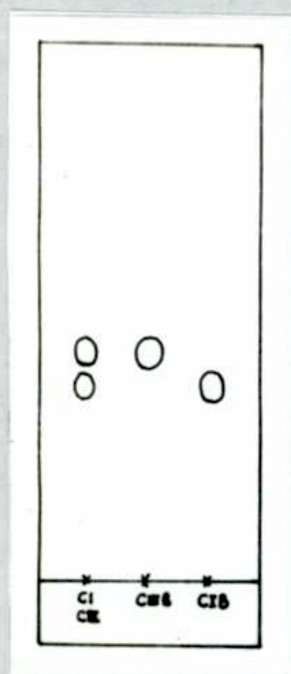


Fig.43: Cromatografía de Lutidina de las C III-B y la C I-B.

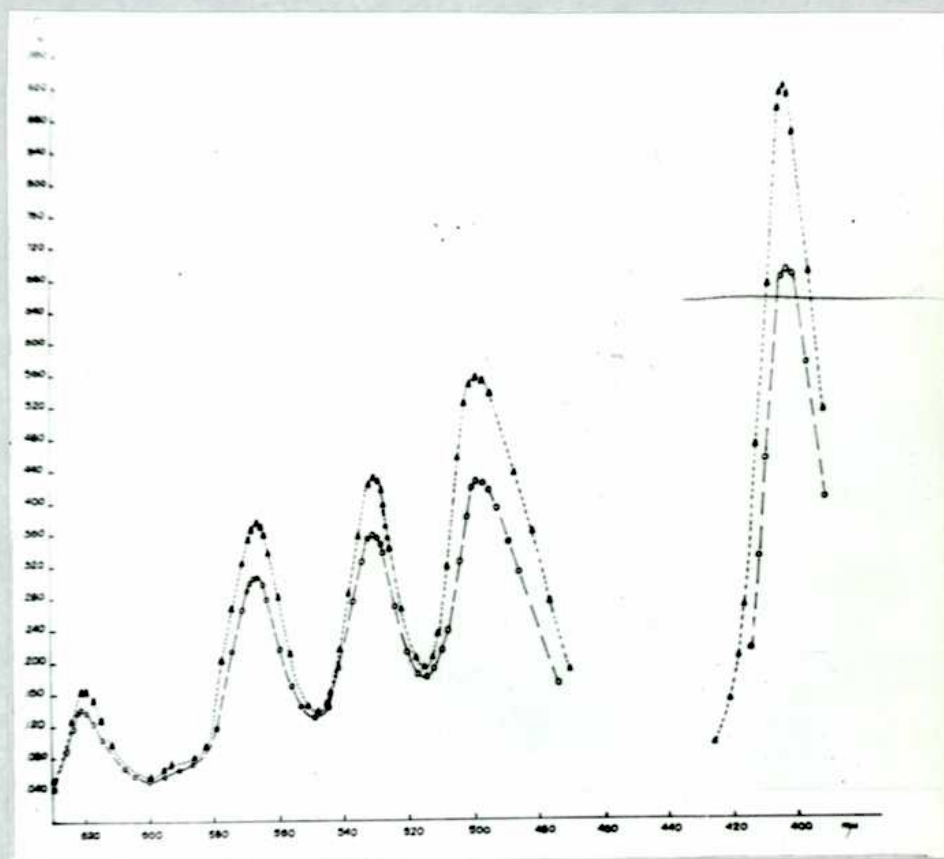


Fig. 44: Espectros de absorción de los ésteres metílicos de la C III-B (o) y de la C III (A).

Tabla VII: Puntos de fusión y máximos de absorción de las distintas porfirinas biosintéticas y de los correspondientes isómeros aislados de fuentes naturales

Porfirina	P. F. °C	Máximos de absorción (m μ)				
		I	II	III	IV	V
U III-B	244-246	626	571	536	503	406
U III	256-258	626	571	536	503	406,5
U I-B	289-291	626	571	536	503	406
U I	293-294	626	571	536	503	406
C III-B	142 (170)	621-622	566	533	498	401
C III	142 (172)	621	566	533	498	400-401
B.2 (fig.17)	130-138	628,5	566	537	502,5-35	404
B.3 (fig.17)	130-138	628,5	566	537	502,5-35	404
B.2 (fig.22)		626	570	537	502,5	406-407
B.2 (fig.22)		626	570	537	502,5	406-407
B.6 (fig.17)	180-195	624,5-25	568-70	537	503	405
B.2 (fig.19)	180-195	624,5	570	537	503	405
B.3 (fig.19)	150-168	624	568-570	537	500	404
B.5 (fig.19)	170-184	626,5	575	542	505	401
B.6 (fig.19)	220-224	629,5	573-574	540	507	406
P IX	228	630	574	543	507	407-408

Coproporfirina I biosintética

(Banda 2, fig.24) Comparativamente con la C I. Comportamiento cromatográfico, de la forma libre, idéntico con el del testigo (fig. 43).

Otras porfirinas biosintéticas

Con el resto de las porfirinas biosintéticas presentes en menor cantidad, se reunió material suficiente, como para observar el comportamiento cromatográfico en papel y en columna de cada una de ellas separadamente; se cristalizaron sus ésteres metílicos, apreciándose formas diversas, y se determinaron sus puntos de fusión (Tabla VII). Se identificaron con porfirinas de 2,3,5 y 6 grupos COOH por méscula, por cromatografía.

Asimismo se efectuaron sus espectros de absorción en solución clorofórmica (fig.45 y 46), determinándose sus máximos de absorción (Tabla VII).

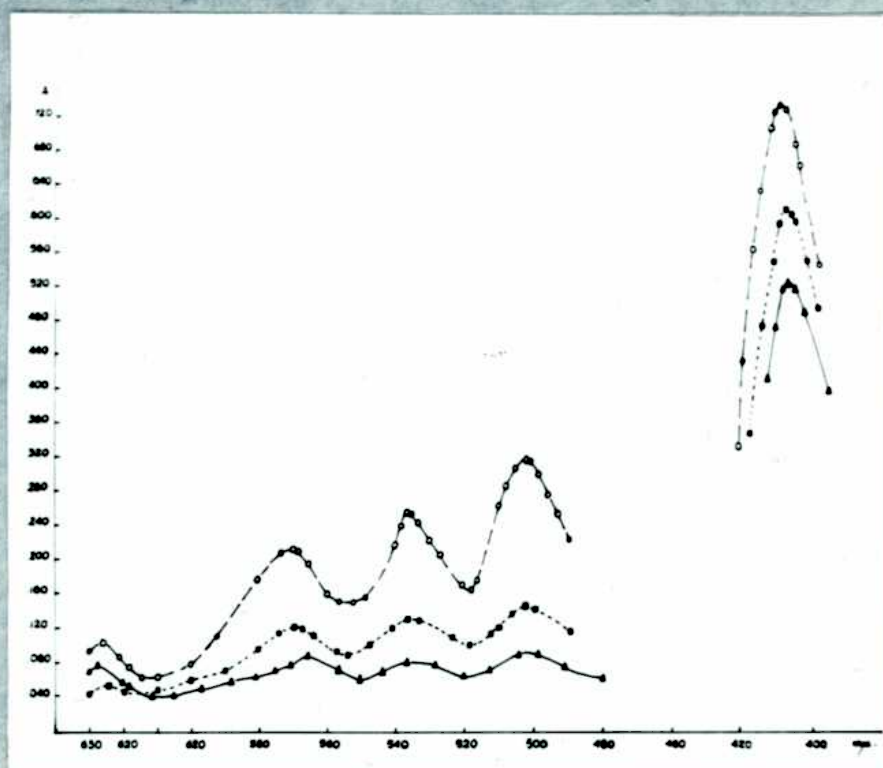


Fig.45: Espectros de absorción en cloroformo de los ésteres metálicos de las porfirinas correspondientes a las bandas 2 y 3 (fig 17) (o); 2 y 3 (fig.22)(▲) y la hexacarboxílica (●).

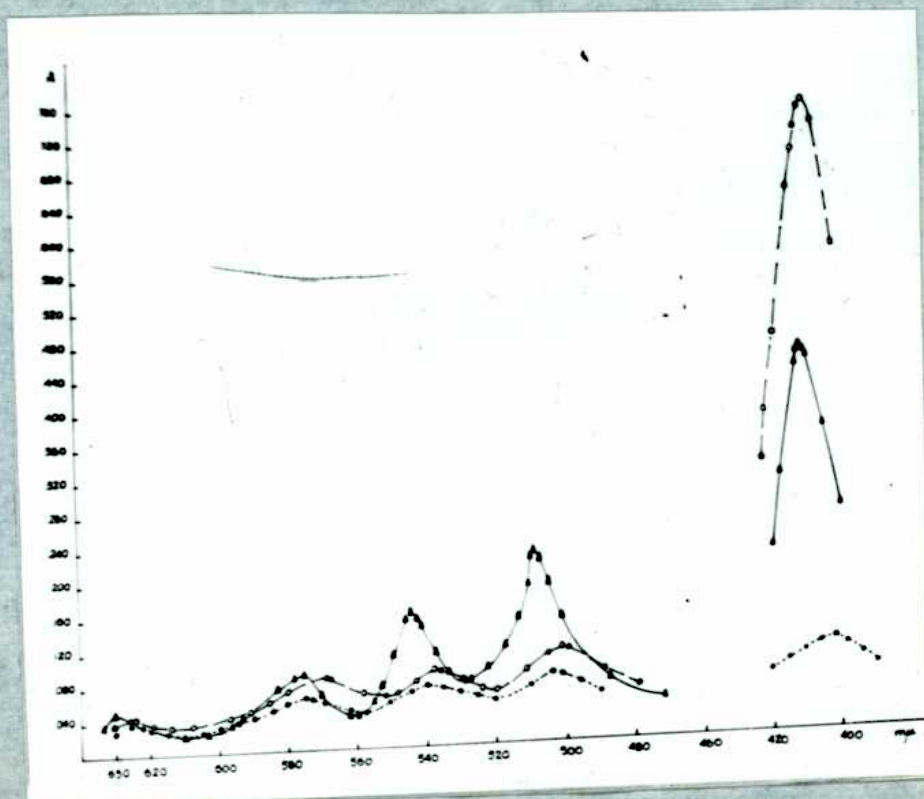


Fig.46: Espectros de absorción en cloroformo, de los ésteres metálicos de las porfirinas pentacarboxílica (●), tricarboxílica(o) y dicarboxílica (▲).

Debe señalarse que todos los datos tabulados o graficados, son el resultado de repetidas determinaciones con materiales purificados por varios procedimientos, hasta encontrar valores constantes para las diferentes propiedades estudiadas.

Conclusiones

De todo lo anterior concluimos, que la P III-B, la porfirina 208 y la PsU son el mismo compuesto.

La uroporfirina aislada de los mismos sistemas de incubación presenta comportamiento similar a la U III de turacina. La coproporfirina presente también en estos sistemas, es isómero III, con propiedades idénticas al testigo de C III.

La uroporfirina que se obtiene de sistemas previamente calentados más de 15' a 60°C, es U I; en tanto que la coproporfirina que se revela en ellos, pero en muy pequeña cantidad, pertenece al isómero I.

De las demás porfirinas sólo podemos informar que se trata de compuestos con nº de carboxilos intermedios.

Y en general, digamos que la fracción "U" (fig.17,18) de estos sistemas de incubación consiste principalmente de U III (aproximadamente 60%) y de P III (aproximadamente 30%), además de pequeñas cantidades de una porfirina hexacarboxílica y de dos porfirinas que por cromatografía se encuentran en una posición intermedia entre la U I y la U III.

La fracción "C" (fig.19,20) consiste principalmente de C III, acompañada de mucha menor cantidad de porfirinas hexacarboxílicas, pentacarboxílicas y tricarboxílicas, además de P IX (en algunos casos).

La fracción "U" correspondiente a sistemas calentados previamente (fig.22,23) contiene como constituyente principal a la U I, junto con pequeñas cantidades de porfirinas con posición intermedia entre la U I y la U III por cromatografía; y la fracción "C" (fig.24,25) de estos mismos sistemas, consiste principalmente de C I.

RESULTADOS

PARTE 2ª: FERRIAPORFIRINA III. SIGNIFICADO BIOLÓGICO.

En la 1ª parte del trabajo se concluye que la F III, originalmente llamada "porfirina 208" (36,104), es idéntica a la PsU.

En esta 2ª parte se han logrado pruebas suficientes como para afirmar que el FPG III se comporta como un intermediario normal en la cadena de reacciones que lleva a la biosíntesis del hemo.

Se efectuaron distintas experiencias que podemos dividir en 2 grupos:

1ª: Método de competencia o dilución isotópica.

2ª: Biosíntesis del intermediario marcado y estudio de su incorporación en el hemo.

1ª: Se incubaron sistemas tales como el descrito en Métodos para la obtención de P IX-C¹⁴, con Gli-C¹⁴ sola y en presencia de los distintos porfirinógenos tal como se puede apreciar en la Tablas siguientes. Después de la incubación, se aisló el éster dimetílico de la P IX y se midió su radioactividad.

En todas las Tablas siguientes se han usado las convenciones que se aclaran:

M: muestra

P: peso de la P IX colocada en cada capoleta.

H: preparación de hemolizado empleada (ver Métodos), volumen usado, en ml.

cpm: cuentas por minuto, ya corregidas por fondo y autoabsorción

cpm/mg: actividad específica.

3-C¹⁴: sustrato marcado con C¹⁴ agregado a la mezcla de reacción

3 no radioactivo: sustrato no radioactivo agregado a la mezcla de reacción.

Las concentraciones de todos los sustratos, se expresan en molaridades; $\mu\text{M} = 10^{-6}\text{M}$, en cada caso, se trata de la concentración en la mezcla de reacción.

Hb: concentración de Hb en el hemolizado, expresada en %.

P IX (mg): concentración de P IX en el hemolizado. La P IX total, presente en la mezcla de incubación, se calculó a partir del contenido de Hb y del porcentaje de P IX en la misma (3,47%, expresado como éster dimetílico).

La incorporación del 3-C^{14} , se mide como P IX- C^{14} .

Los resultados son promedios de duplicados.

Debe hacerse notar que los porfirinógenos se han agregado en concentraciones equivalentes a las de G11-2- C^{14} .

Experiencia 1: Incorporación de FPG III en el hemo

H : 23 ml

Hb : 8,4%

P IX: 67 mg

Tabla VIII

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₁	21,3	219,4	10,3
B ₁	21,0	46,0	2,1
C ₁	24,7	4,9	0,19

Tabla IX

M	3-C^{14}	S no radioactivo	3-C^{14} incorporado en el hemo		
			CPM tot.	μmol	%
A ₁	G11-2- C^{14} (200 μM) (92.745 cpm/ μmol)	—————	690,1	7,4	0,090
B ₁	G11-2- C^{14} (200 μM) (92.745 cpm/ μmol)	FPG III (22 μM)	140,7	1,5	0,019
C ₁	G11-2- C^{14} (200 μM) (92.745 cpm/ μmol)	FPG III (42 μM)	12,7	0,13	0,001

Experiencia 2. Incorporación de UPG III en el hemo

H : 22 ml

Hb : 8,3 %

P IX : 67,1 mg

Tabla X.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₂	15,6	572	36,60
B ₂	24,8	181	7,23

Tabla XI.

M	3-C ¹⁴	S no radioactivo	3-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	μmol	%
A ₂	G11-2-C ¹⁴ (306 μM) (121.250 cpm/μmol)	-----	2.309	20,0	0,24
B ₂	G11-2-C ¹⁴ (306 μM) (121.250 cpm/μmol)	UPG III (36 μM)	460	3,99	0,05

Experiencia 3: Incorporación de FPG III y UPG I en el hemo

H : 20 ml

Hb : 6,1 %

P IX: 42 mg

Tabla XII.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₂	12,0	108,0	9,0
B ₂	10,7	17,12	1,6
C ₂	16,0	152,0	9,5

Tabla XIII.

M	S-C ¹⁴	S no radioactivo	S-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	μmol	%
A ₃	G11-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	-----	378,0	3,60	0,045
B ₃	G11-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	FPG III (37,7 μM)	68,2	0,66	0,008
C ₃	G11-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	UPG I (40 μM)	399,0	3,80	0,048

Experiencia 4: Incorporación de FPG III, F III y UPG I en el hemo.

H : 18 ml

Hb : 8,4 %

P IX: 52 mg

Tabla XIV.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₄	15,8	175,4	11,1
B ₄	20,0	50,0	2,5
C ₄	10,0	111	11,1
D ₄	4,0	48	12,0

Tabla XV.

M	S-C ¹⁴	S no radioactivo	S-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	μmol	%
A ₄	G11-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	-----	577,2	5,60	0,070
B ₄	G11-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	FPG III (42,5 μM)	130	1,26	0,015
C ₄	G11-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	F III (41,6 μM)	577,2	5,60	0,070
D ₄	G11-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	UPG I (40,8 μM)	624	6,05	0,075

Experiencia 5: Incorporación de FPG III-B y UPG III-B en el hemo

H : 23 ml

Hb : 8,3 %

P IX: 66 mg

Tabla XVI.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₅	31,1	1834,9	59,0
B ₅	21,1	141,6	6,7
C ₅	37,5	341,0	9,0

Tabla XVII.

M	3-C ¹⁴	S no radioactivo	3-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	μmol	%
A ₅	G11-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	-----	3.894	33,4	0,410
B ₅	G11-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	FPG III-B (35 μM)	442	3,8	0,047
C ₅	G11-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	UPG III-B (35 μM)	594	5,09	0,063

Experiencia 6: Incorporación de CPG III y CPG I en el hemo

H : 27 ml

Hb : 8,1 %

P IX: 75 mg

Tabla XVIII.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₆	32,5	1.752	53,8
B ₆	34,0	187	5,5
C ₆	22,9	1.181,6	51,6

Tabla XIX.

M	3-C ¹⁴	S no radioactivo	3-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	μmol	%
A ₆	G11-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	—————	4.035,0	37,1	0,44
B ₆	G11-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	CPG III-B (13 μM)	412,5	3,5	0,04
C ₆	G11-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	CPG I (23 μM)	3.870,0	33,2	0,40

Conclusiones.

Si de todos los datos anteriores resumamos los resultados en un cuadro comparativo, como el que se muestra en la Tabla XI, vemos allí que las actividades en C¹⁴ de las muestras de P IX de los sistemas de incubación, conteniendo FPG III (Exp. 1, 3, 4) y FPG III-B (Exp. 5) son mucho más bajas que las de aquellos que no los contienen.

Se han obtenido resultados similares en presencia de UPG III (Exp. 2), UPG III-B (Exp. 5) y CPG III-B (Exp. 6); pero como se esperaba, no hubo dilución en presencia de P III (Exp. 4), UPG I (Exp. 3, 4) y CPG I (Exp. 6).

Además, de la experiencia 1 se ve que si se aumenta la concentración de porfirinógeno, hay una mayor dilución de la actividad.

Tabla XX: Comparación de las actividades del éster metílico de la P IX-¹⁴C, sintetizado a partir de Gli-2-C¹⁴ y en presencia de los sustratos no radioactivos: FPG III; FPG III-B; UPG III; CPG I F III, CPG III y UPG I.

Exp	S-C ¹⁴	S no radioactivo	S-C ¹⁴ incorporado en el hemo	
			cpm/ug	% (°)
1	Gli-2-C ¹⁴ (200 μM) (32.745 cpm/μmol)	-----	10,30	100
	Gli-2-C ¹⁴ (200 μM) (32.745 cpm/μmol)	FPG III (22 μM)	2,10	21
	Gli-2-C ¹⁴ (200 μM) (32.745 cpm/μmol)	FPG III (42 μM)	0,19	2
2	Gli-2-C ¹⁴ (306 μM) (121250 cpm/μmol)	-----	36,60	100
	Gli-2-C ¹⁴ (306 μM) (121250 cpm/μmol)	UPG III (36 μM)	7,29	19
3	Gli-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	-----	9,0	100
	Gli-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	FPG III (37,7 μM)	1,6	18
	Gli-2-C ¹⁴ (330 μM) (103000 cpm/μmol)	UPG I (40 μM)	9,5	105
4	Gli-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	-----	11,1	100
	Gli-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	FPG III (42,5 μM)	2,5	22
	Gli-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	F III (41,6 μM)	11,1	100
	Gli-2-C ¹⁴ (341 μM) (103000 cpm/μmol)	UPG I (40,8 μM)	12,0	108
5	Gli-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	-----	59,0	100
	Gli-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	FPG III-B (35 μM)	6,7	12
	Gli-2-C ¹⁴ (297 μM) (116625 cpm/μmol)	UPG III-B (35 μM)	9,0	15
6	Gli-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	-----	53,8	100
	Gli-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	CPG III-B (13 μM)	5,5	10
	Gli-2-C ¹⁴ (257 μM) (116625 cpm/μmol)	CPG I (23,3 μM)	51,6	96

(°): Calculado sobre la base de que la incorporación de Gli-2-C¹⁴ es 100%

Las porfirinas libres presentes en los sistemas de incubación que contenían FPG III (Exp. 1,3,4); FPG III-B (Exp. 5); UPG III (Exp. 2); UPG III-B (Exp. 5); CPG III-B (Exp. 6); UPG I (Exp. 3,4) y CPG I (Exp. 6); fueron extraídas con HCl 10%, como se indica en Métodos, esterificadas y cromatografiadas sobre papel y en columna de carbonato de calcio, determinándose aproximadamente los porcentajes de las distintas porfirinas componentes de las mezclas correspondientes a cada sistema (Tabla XXI).

Tabla XXI: Porphirinas componentes de los sistemas de incubación conteniendo distintos porfirinógenos como sustratos.

Sustrato	Porphirinas formadas (%) (')								
	U III	U I	F III	6-C	5-C	C III	C I	3-C	PIX
FPG III	-	-	4	2	3	45	-	10	36
FPG III-C ¹⁴	-	-	4	3	3	50	-	5	35
UPG III	1,5	-	-	-	3,5	35	-	-	60
UPG III-C ¹⁴	3	-	2	2	4	35	-	-	50
CPG III	-	-	-	-	-	75	-	4	20
CPG III-C ¹⁴	-	-	-	-	-	70	-	3	25
CPG I	-	-	-	-	-	-	100	-	-
UPG I	-	1	-	10	-	-	88	1	-

('): Los porcentajes se calculan teniendo en cuenta la cantidad total de porfirinas en cada fracción, y en el caso de los sustratos marcados, además, la actividad total.

Los resultados obtenidos en estos casos, coincidieron con los obtenidos cuando las porfirinas libres provenían de sistemas de incubación análogos; pero conteniendo FPG III-C¹⁴ (Exp. 7,8); UPG III-C¹⁴ (Exp. 8) y CPG III-C¹⁴ (Exp. 8). También se obtuvieron sus ésteres metílicos que se analizaron en forma idéntica; pero además se midió la actividad de los componentes aislados, resultando como se esperaba, radioactivos. Tanto las columnas como los cromatogramas en papel fueron similares en los casos de FPG III y FPG III-C¹⁴; UPG III y UPG III-C¹⁴ y CPG III y CPG III-C¹⁴; la diferencia radicó, como se dijo, en que las porfirinas aisladas de los segundos, eran radioactivas.

En las figuras 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56, se muestran los resultados mencionados.

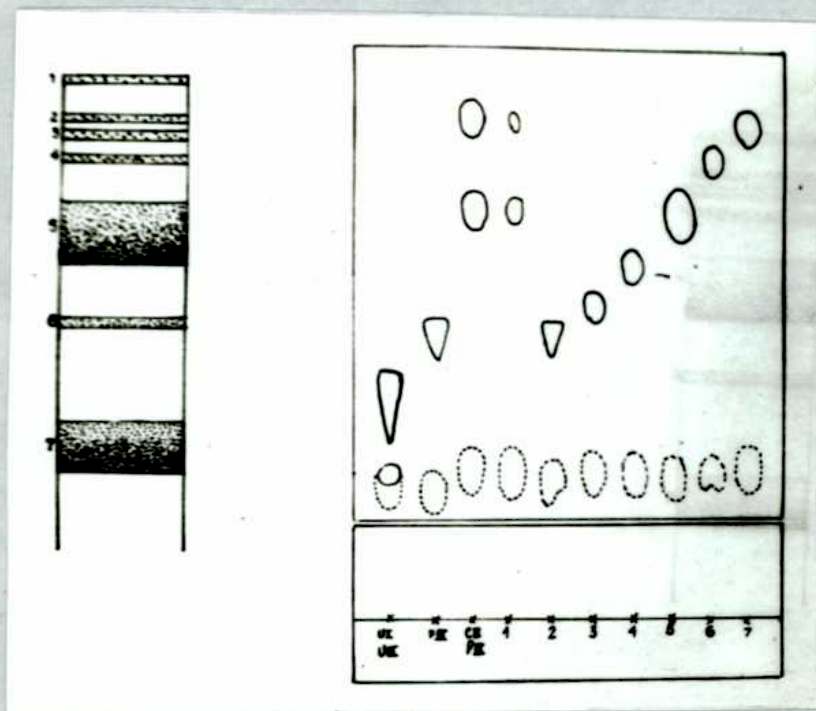


Fig. 47 y 48: Cromatografía en columna y papel de las porfirinas aisladas de los sistemas de incubación conteniendo FPG III o FPG III-C¹⁴.

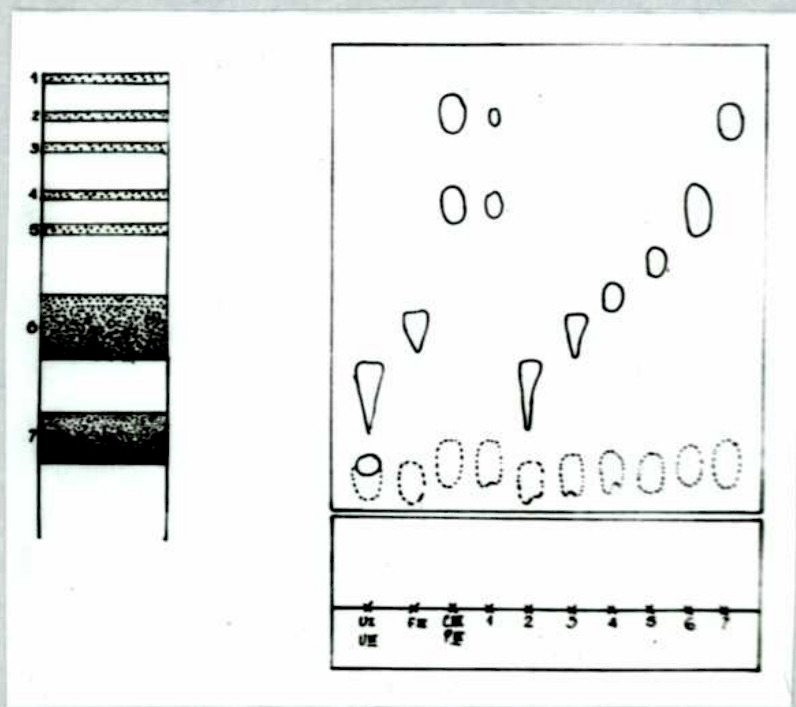


Fig. 49 y 50: cromatografía en columna y papel de las porfirinas aisladas de los sistemas de incubación conteniendo UPG III-C¹⁴ o UPG III.

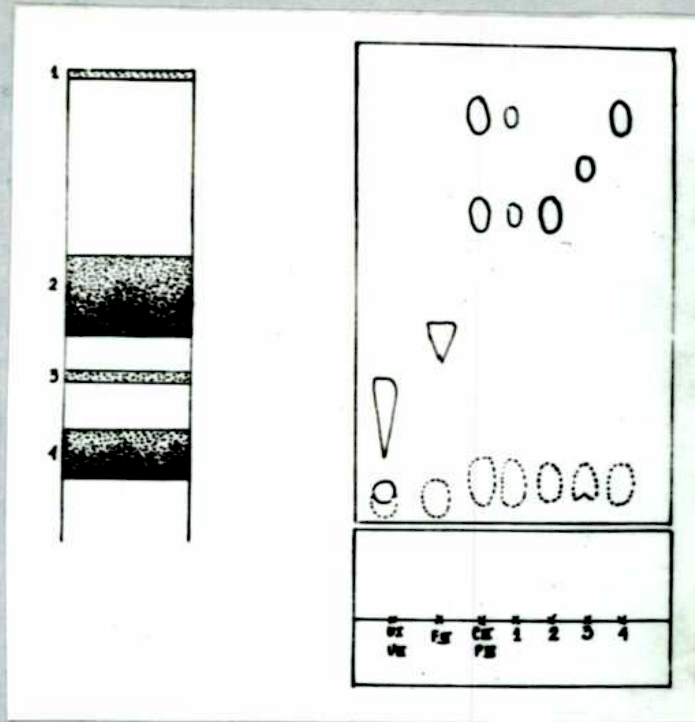


Fig. 51 y 52: Cromatografía en columna y papel de las porfirinas aisladas de los sistemas conteniendo CPG III-C¹⁴ o CPG III

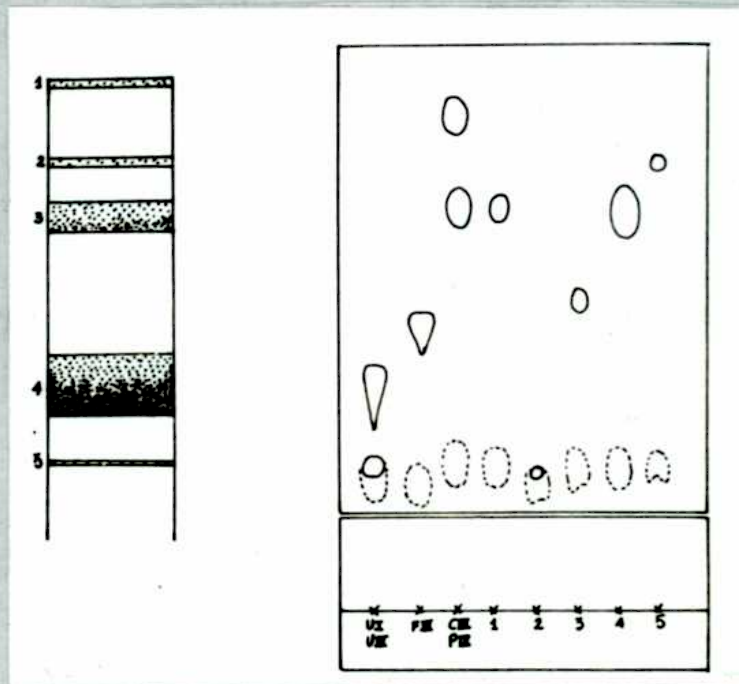


Fig. 53 y 54: Cromatografía en columna y papel de las porfirinas aisladas de los sistemas conteniendo UPG I.

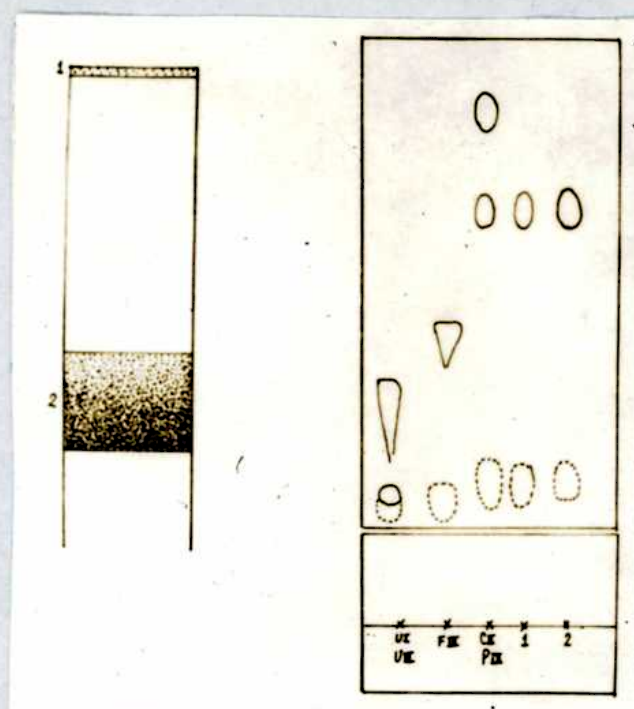


Fig. 55 y 56: Cromatografía en columna y papel de la porfirinas aisladas de los sistemas conteniendo CPG I.

Conclusiones:

La presencia de porfirinas con distinto nº de carboxilos en estos sistemas, conteniendo los diferentes porfirinógenos como sustratos, activas cuando los mismos estaban marcados con C^{14} ; es otra prueba más para suponer que la decarboxilación, como se viene sugiriendo, es un proceso en etapas .

Observamos que el principal producto formado, cuando los sustratos pertenecen a la serie isomérica III, es en general C III, luego le sigue la P IX; pero en los casos de CPG I y UPGI la decarboxilación se detiene en la etapa de C I, de donde se confirmarían las suposiciones de Sano (78), de que no debe existir el sistema enzimático capaz de producir protoporfirina isómero I; pero parecería, que las decarboxilasas que actúan entre UPG y CPG lo harían indistintamente sobre ambos isómeros, por cuanto se puede obtener C I a partir de UPG I.

2º: Incorporación del intermediario marcado con C¹⁴ en el hemo.

Se prepararon F III-C¹⁴ con una actividad específica de 365.000 cpm/mg, U III-C¹⁴ con una actividad específica de 347.000 cpm/mg y C III-C¹⁴ con una actividad específica de 483.000 cpm/mg, por el procedimiento descrito en Métodos.

Se incubaron entonces eritrocitos de pollo hemolizados con GII-2-C¹⁴, FPG III-C¹⁴ y CPG III-C¹⁴, sin otros sustratos, siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Los resultados obtenidos se pueden ver en las Tablas siguientes.

Experiencia 7: Incorporación de FPG III-C¹⁴ en el hemo

H : 23 ml

Hb : 8,3 %

P IX: 66mg

Tabla XXII.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₇	11,9	809,2	68,0
B ₇	10,0	1.108,0	110,8
C ₇	20,0	2,2	0,11

Tabla XXIII.

M	3-C ¹⁴	S no radioactivo	3-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	µmol	%
A ₇	FPG III-C ¹⁴ (4,79 µM)	—————	4.448	561,0	56,10
B ₇	GII-2-C ¹⁴ (315 µM)	—————	7.312,8	62,8	0,78
C ₇	—————	GII (315 µM)	7,26	—	—

Experiencia 8: Incorporación de FPG III-C¹⁴; UPG III-C¹⁴ y CPG III-C¹⁴ en el hemo.

H : 27 ml

Hb : 8,1 %

P IX: 75 mg

Tabla XXIV.

M	P mg	cpm	cpm/mg
A ₈	43,9	1.335,5	30,8
B ₈	24,7	2.441,2	98,6
C ₈	32,0	1.757,0	54,9
D ₈	32,5	1.752,0	53,8
E ₈	13,0	5,7	0,43

Tabla XXV.

M	S-C ¹⁴	S no radioactivo	S-C ¹⁴ incorporado en el hemo		
			cpm tot.	µmol	%
A ₈	FPG III-C ¹⁴ (4,16 µM)	-----	2.310	288,0	23,8
B ₈	UPG III-C ¹⁴ (4,75 µM)	-----	7.305	410,0	41,0
C ₈	CPG III-C ¹⁴ (5,31 µM)	-----	4.117	217,0	21,7
D ₈	G11-2-C ¹⁴ (269 µM)	-----	4.035	37,1	0,44
E ₈	-----	G11 (253 µM)	32	--	--

Tabla XXVI: Comparación de las actividades del éster dimetílico de la P IX-C¹⁴ sintetizado a partir de G11-2-C¹⁴, FPG III-C¹⁴, UPG III-C¹⁴ y CPG III-C¹⁴.

Exp	S-C ¹⁴	cuentas tot. agregadas	S-C ¹⁴ incorporado en el hemo	
			cuentas tot.	% de incorporac.
7	G11-2-C ¹⁴ (315 µM)	933.000	7.312	0,78
	FPG III-C ¹⁴ (4,8 µM)	8.000	4.488	56,10
8	G11-2-C ¹⁴ (269 µM)	933.000	4.035	0,44
	FPG III-C ¹⁴ (4,2 µM)	8.000	2.310	28,8
	UPG III-C ¹⁴ (4,8 µM)	18.000	7.305	41,0
	CPG III-C ¹⁴ (5,3 µM)	19.000	4.117	21,7

CONCLUSIONES FINALES Y RESUMEN

El presente estudio tiene por objeto: la biosíntesis e identificación de porfirinas formadas in vitro por sistemas de GR o fracciones de los mismos en presencia de ALA o PBG; la investigación de la naturaleza química de la porfirina descrita por Falk como PsU y su identificación con la aislada de orina de porfiria humana, denominada originalmente "porfirina 208" finalmente, siendo dicha porfirina de estructura isomérica III, el estudio de su significado biológico y posible intermediario en la biosíntesis del hemo.

Se describen una serie de métodos aplicados durante el trabajo, en particular un micrométodo para la determinación cuantitativa de porfirinas, que ha surgido de nuestro laboratorio (114). Además algunas modificaciones interesantes a otras técnicas que han mejorado las mismas desde el punto de vista de su rendimiento.

El empleo de distintos sistemas de incubación, en diferentes condiciones, de atmósfera, temperatura, tratamiento previo, etc, llevó a la elección de un determinado sistema como el más eficaz, es decir que produce un mejor rendimiento, en lo referente a la biosíntesis de la F III.

Con iguales concentraciones de sustrato, a mayor tiempo de incubación, hay mayor síntesis; pero a los 90' se alcanza aproximadamente, el máximo, de donde el mejor tiempo de incubación es, para nuestros fines, de 90'.

El uso de solución fisiológica o de sacarosa 0,25 M, como líquidos de lavado o disolución, no producen ninguna modificación.

Se han estudiado independientemente, cada una de las porfirinas aisladas de los distintos sistemas de incubación, comparativamente, cuando era posible, con los correspondientes isómeros provenientes de fuentes naturales; identificándose así dichas porfirinas.

Se aprecia que la fracción "U" consiste de aproximadamente 60% de U III y aproximadamente 30% de F III, además de un

nores cantidades de porfirinas que poseen una movilidad correspondiente a, una hexacarboxilica y otras dos que se sitúan en una posición intermedia entre la U I y la U III por cromatografía sobre papel (105), que no habían sido descritas anteriormente en sistemas similares. La fracción "C" consiste principalmente de C III y cantidades menores de porfirinas hexacarboxilicas, pentacarboxilicas y tricarboxilicas, tampoco descritas anteriormente. Estas porfirinas que se encuentran en pequeña cantidad, fueron detectadas utilizando la cromatografía en columna de carbonato de calcio, que demostró ser más sensible para la separación de porfirinas que la cromatografía sobre papel de Falk y Benson.

Si el sistema se calienta previamente a 60°C durante más de 15', ocurren cambios muy significativos en lo que atañe a la naturaleza de las porfirinas sintetizadas, así: la fracción "U" consiste casi exclusivamente de U I y desaparece la F III; en tanto que el rendimiento de la fracción "C" disminuye considerablemente y ésta consiste solamente de C I.

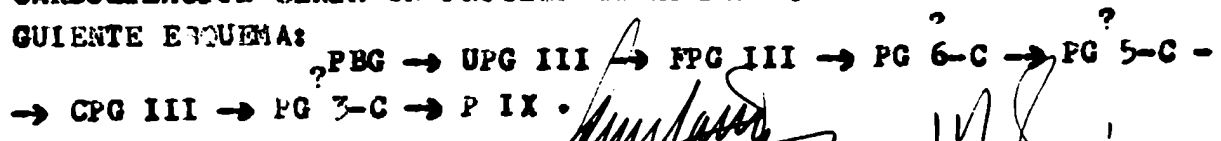
Quando se emplea ALA como sustrato, aproximadamente un 15% del ALA agregado no se utiliza en la biosíntesis y un 25% se transforma en PBG; en tanto que cuando se usa PBG como sustrato, aproximadamente un 40% del mismo queda sin utilizar.

Utilizando UPG III-C¹⁴ y CPG III-C¹⁴ se demuestra por 10⁶ vez su transformación a P IX, confirmando que el UPG III y el CPG III, pero no el UPG I, ni el CPG I, son intermediarios en la biosíntesis del hemo.

Se han aislado e identificado las porfirinas libres formadas cuando se usaron los distintos porfirinógenos como sustratos, determinándose los porcentajes de los diferentes componentes de cada fracción.

SE DEMUESTRA QUE LA PORFIRINA DESCRIPTA POR FALK COMO PSEUDOUROPORFIRINA, ES IGUAL A LA AISLADA DE ORINA DE PORFIRIA HUMANA, DESIGNADA COMO "PORFIRINA 208" Y ACTUALMENTE COMO FIRIA-PORFIRINA III.

POR OTRA PARTE, MEDIANTE LA TECNICA ISOTOPICA SE ESTABLECE QUE EL FPG III ES UN INTERMEDIARIO NORMAL, SIGUIENDO AL UPG III EN LA BIO INTESIS DE LA P IX. Y MUY POSIBLEMENTE LA DE-CARBOXILACION SERIA UN PROCESO EN ETAPAS QUE SE AJUSTARIA AL SIGUIENTE ESQUEMA:



BIBLIOGRAFIA

- (1) Rivington, C. : Acta Med. Scand. 143, (1952), 161.
- (2) Willstater and Stohl : Untersuchungen über Chloroph. (1953) c.p. Carrie (10).
- (3) Fisher, H. and Orth, H. : "Die Chemie des Pyrrols" (1937).
- (4) Mc Donald, S.F. and Michl, K.H. : "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" Ed. Wolstenholme, G.E.W. and Millar E.C.P. (J. and A. Churchill, London, 1955, 285).
- (5) Fisher, H. and Glein, W. : Ann. Chem. Justus Liebig.
- (6) Fisher, H. and Hofmann, J.H. : Z. physiol. Chem. 246, (1937), 15.
- (7) Shemin, D. : Currents in Biochemical Research. Inters. N.Y. 1958
- (8) Granick, S. : The Harvey Lectures, 44, (1950), 220.
- (9) Rivington, C. : British Med. J. 2, (1956), 189.
- (10) Rivington, C. : Ann. Rev. Biochem. 26, (1957), 561.
- (11) Rivington, C. : Trans. Hilger Watts. Londres (1954).
- (12) Rivington, C. : Rev. of pure and applied Chemistry 8, (1958), 129
- (13) Vanotti, A. : Porphyrin. Their Biological Importance.
- (14) Lemberg, R. : Zischr. Chem. org. Naturstoffe, Springer Verlag (1954).
- (15) Shemin, D. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 159, (1945), 567.
- (16) Shemin, D. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 166, (1946), 621.
- (17) Shemin, D. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 166, (1946), 627.
- (18) Shemin, D.; London, I.M. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 173, (1948), 799.
- (19) Shemin, D.; London, I.M. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 183, (1950), 757.
- (20) Wittenberg, S. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 178, (1949), 47.
- (21) Muir, H.M. and Neuberger, A. : Biochem. J. 45, (1949), 163.
- (22) Altman, K.I.; Casarett, G.N.; Masters, R.E.; Noonan, T.R. and Salomon, K. : J. Biol. Chem. 176, (1948), 319.
- (23) Altman, K.I.; Salomon, K. and Noonan, T.R. : J. Biol. Chem. 177, (1949), 489.
- (24) Radin, N.S.; Rittenberg, D. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 184, (1950), 745.
- (25) Grinstein, M.; Kamen, E.D. and Moore, C.V. : J. Biol. Chem. 174, (1948), 767.

- (26) Grinstein, M.; Kamen, M. D. and Moore, C. V. : J. Biol. Chem. 179, (1949), 759.
- (27) Mañr, H. M. and Neuberger, A. : Biochem. J. 47, (1950), 97.
- (28) Wittenberg, S. and Shemin, D. : Federation Proc. 9, (1950), 247.
- (29) Wittenberg, S. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 185, (1950), 103.
- (30) Bloch, K. and Rittenberg, D. : J. Biol. Chem. 159, (1945), 45.
- (31) Ponticorvo, L.; Rittenberg, D. and Bloch, K. : J. Biol. Chem. 179, (1949), 879.
- (32) Radin, N. S.; Rittenberg, D. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 184, (1950), 755.
- (33) Shemin, D. and Wittenberg, S. : J. Biol. Chem. 192, (1951), 715.
- (34) Wittenberg, S. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 185, (1950), 83.
- (35) Rubinstein, D. and Denstedt, D. F. : J. Biol. Chem. 24, (1953), 623
- (36) Wriston, J. C.; Lack, L. and Shemin, D. : Federation Proc. 12, (1953), 294.
- (37) Shemin, D. and Kumin, S. : J. Biol. Chem. 198, (1952), 827.
- (38) Sach, D. : Klin. Wochsch. 10, (1931), 1123.
- (39) Waldenstrom, J. and Vahlquist, B. : Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) 260, (1939), 189.
- (40) Westall, R. G. : Nature 170, (1952), 614.
- (41) Cookson, G. H. and Rimington, C. : Nature 171, (1953), 875.
- (42) Cookson, G. H. and Rimington, C. : Biochem. J. 57, (1954), 476.
- (43) Kennard, O. : Nature 171, (1953), 876.
- (44) Granick, S. and Bogorad, L. : J. Am. Chem. Soc. 75, (1953), 3610.
- (45) Cookson, G. H. : Nature 172, (1953), 457.
- (46) Rimington, C. and Krol, S. : Nature 175, (1955), 629.
- (47) Jackson, A. H.; Mc Donald, D. M. and Mc Donald, S. F. : J. Am. Chem. Soc. 78, (1956), 505.
- (48) Falk, J. E.; Dresel, E. I. B. and Rimington, C. : Nature 172, (1953), 292.
- (49) Schwartz, S. : Federation Proc. 13, (1954), 293.
- (50) Bogorad, L. and Granick, S. : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 39, (1953), 1176.
- (51) Mauzeral, D. and Granick, S. : J. Biol. Chem. 213, (1956), 435.
- (52) Wolstenholme, G. E. W. and Millar, E. C. P. "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" (J. and A. Churchill, London, 1955).
- (53) Wriston, J. E.; Lack, L. and Shemin, D. : J. Biol. Chem. 215, (1955) 603

- (54) Shemin, D. and Russell, C. S. : J. Am. Chem. Soc. 75, (1953), 4873.
- (55) Neuberger, A. and Scott, J. J. : Nature 172, (1953), 1093.
- (56) Dresel, E. I. B. and Falk, J. E. : Nature 172, (1953), 1185.
- (57) Shemin, D.; Abramsky, T. and Russell, C. S. : J. Biol. Chem. Soc. 76, (1954), 1204.
- (58) Shemin, D.; Abramsky, T. and Russell, C. S. : J. Biol. Chem. 215, (1955), 613.
- (59) Schmid, R. and Shemin, D. : J. Am. Chem. Soc. 77, (1955), 506.
- (60) Granick, S. : Science 120, (1954), 1105.
- (61) Shemin, D.; Russell, C. S. and Abramsky, T. : J. Am. Chem. Soc. 75, (1953), 4873.
- (62) Shemin, D.; Russell, C. S. and Abramsky, T. : J. Biol. Chem. 215, (1955), 615.
- (63) Rijmans van der Bergh, H.; Grotepass, A. and Revers, F. : Klin. Wochschr 11, (1932), 1574.
- (64) Watson, C. J.; Pass, I. and Schwartz, S. : J. Biol. Chem. 139, (1942), 583.
- (65) Falk, J. E.; Dresel, E. I. B.; Benson, A. and Knight, B. C. : Biochem. J. 63, (1956), 87.
- (66) Booi, H. L. and Rimington, C. : Biochem. J. 64, (1957), 4P.
- (67) Granick, S. and Mauzerall, D. : J. Biol. Chem. 232, (1958 b), 1119.
- (68) Bogorad, L. : J. Biol. Chem. 233, (1958 a), 501.
- (69) Bogorad, L. : J. Biol. Chem. 233, (1958 b), 510.
- (70) Hoare, D. S. and Heath, H. : Nature 181, (1958), 1592.
- (71) Lockwood, W. and Benson, A. : Biochem. J. 75, (1960), 772.
- (72) Wittenberg, J. B. : Nature 184, (1959), 876.
- (73) Haeger-Aronsen, B. : Scand. J. Clin. and Lab. Inv. 12, (1960), 16.
- (74) Bogorad, L. : Science 121, (1955), 878.
- (75) Bogorad, L. : J. Biol. Chem. 233, (1958 c), 516.
- (76) Rimington, C. : Rev. d'Hematology 12, (1957), 531.
- (77) Neve, R. A.; Labbe, R. F. and Aldrich, R. A. : J. Am. Chem. Soc. 78, (1956), 691.
- (78) Jano, S. and Granick S. : J. Biol. Chem. 236, (1961), 1173.
- (79) Mauzerall, D. and Granick, S. : J. Biol. Chem. 232, (1958), 1141.
- (80) Batlle, A. M. del C. and Grinstein, M. : Biochim. Biophys. Acta. P.N. 1115, (1962).

- (81) Mauzeral, D. :J. Am. Chem. Soc. 82,(1960),2601.
- (82) Bashour, F.A. :J. Clin. Inv. 35,(1956),68).
- (83) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E. :Biochem. J. 56,(1954),156.
- (84) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E. :Biochem. J. 63,(1956),80.
- (85) Grinstein, M.; Aldrich, R.A. Hawkinson, V. and Watson, C.J. :J. Biol. Chem. 179,(1949),387.
- (86) London, I.M.; Randolph, W.; Shemin, D. and Rittenberg, D. :J. Biol. Chem. 184,(1950),365.
- (87) Grinstein, M.; Kamen, M. D.; Wikoff, H.M. and Moore, C.V. :J. Biol. Chem. 182,(1950),715.
- (88) Salomon, K.; Richmond, J.E. and Altman, K. :J. Biol. Chem. 196,(1952),463.
- (89) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E. :Biochem. J. 63,(1956),388.
- (90) Dresel, E.I.B. "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" Ed. Wolstenholme, G.E.N. and Millar, E.C.P. (J. and A. Churchill, London, 1955).
- (91) Rimington, C. and Booi, H.L. :Biochem. J. 65,(1957),3P.
- (92) Larsen, E.G.; Glafkides, C.M. and Orlen, J.M. Federation Proc. 12,(1953),276.
- (93) Nicholas, R.E.H. and Rimington, C. :Biochem. J. 46,(1950),147.
- (94) Rimington, C. and Miles, P.A. :Biochem. J. 50,(1951),202.
- (95) Canivet, J and Rimington, C. :Biochem. J. 55,(1953),367.
- (96) Grinstein, M; Schwartz, S. and Watson, C.J. :J. Biol. Chem. 157,(1945),323.
- (97) Garcin, R.; Escalier, A.; Gajdos, A.; Gajdos, -Torok, M.; Godlewsky, S. and Lapresle, J. :presse Méd. 61,(1953),1959.
- (98) McGregor, A.C.; Nicholas, R.E.H. and Rimington, C. :Arch. Inst. Med. 90,(1952),483.
- (99) Granick, S. :Conference on hemoglobin. Publication 557.
- (100) Granick, S. and Mauzeral, D. :Ann. N.Y. Acad. Sc. 75,(1958),115.
- (101) Sano, S.; Inone, S.; Tanabe, Y.; Sumiya, C. and Koebe, S. :Science 129,(1959),275.
- (102) Rimington, C. and Tooth, B.E. :The J. of Biochem. 49,(1961),456.
- (103) Dresel, E.I.B. and Falk, J.E. :Biochem. J. 63,(1956),72.
- (104) Watson, C.J.; Schwartz, S. and Hawkinson, V. :J. Biol. Chem. 157,(1945),345.
- (105) Falk, J.E. and Benson, A. :Biochem. J. 55,(1953),101.

- (106) Batlle, A.M.delC. and Grinstein, M. :Biochim. Biophys. Acta 57,(1962),191.
- (107) Grinstein, M. :Prensa Médica Argentina 42,(1955),537.
- (108) Grinstein, M. :J. Biol. Chem. 167,(1947),515.
- (109) Falk, J.E. and Dresel, E.I.B. :Biochim. Biophys. Acta 39,(1960),458.
- (110) Edmonson, P.R. and Schwartz, S. :J. Biol. Chem. 205,(1953),605
- (111) Grinstein, M.; Bannerman, M.M. and Moore, C.V. :Blood 14,(1959), 476.
- (112) Schwartz, S. and Wikoff, H.M. :J. Biol. Chem. 194,(1952),563.
- (113) Dresel, E.I.B. and Tooth, B.E. :Nature 174,(1954),271.
- (114) Batlle, A.M.delC. y Grinstein, M. (a publicar).
- (115) Salun, Y.; Batlle, A.M.delC. y Grinstein, M. :An. Asoc. Quím. Arg. 49,(1961),269.
- (116) Eriksen, L. :Scandinav. J. Clin. and Lab. Inv. 10,(1958),314.
- (117) Comfort, A. :Biochem. J. 44,(1949),111.
- (118) Waldenstrom, J. :Deut. Arch. Intern. Klin. Med. 178,(1935),38.
- (119) Prunty, F.T.G. :Arch. Intern. Med. 77,(1946),623.
- (120) Lederer, E. and Tixier, R. :Compt. Rend. 225,(1947),531.
- (121) Mc Swiney, R.R.; Nicholas, R.E.H. and Prunty, F.T.G. :Biochem. J. 46,(1950),147.
- (122) Gray, C.H. and Holt, L.B. :Biochem. J. 43,(1948),191.
- (123) Nicholas, R.E.H. :Biochem. J. 48,(1951),709.
- (124) Zechmeister, L. and Cholnoky, L :Principles and Practice of Chromatography N.Y. (1941).
- (125) Bannerman, R.M.; Grinstein, M and Moore, C.V. Brit. J. Haemat. 5,(1959),102.
- (126) Shuster L. :Biochem. J. 64,(1956),101.

INDICE

Abreviaturas empleadas -----	5
INTRODUCCION -----	6
Química de las porfirinas -----	6
Biosíntesis -----	7
Glicocola como precursor -----	7
Acetato como precursor -----	8
PBG como intermediario -----	9
ALA como precursor del PBG -----	9
Ciclo de Shemin -----	10
Conversión de PBG a porfirinas -----	10
Biosíntesis de porfirinas a partir de ALA y PBG -----	12
Conversión de UPG a CPG -----	14
Conversión de CPG a P IX -----	15
Firiaporfirina III - Pseudouroporfirina -----	16
PARTE EXPERIMENTAL -----	18
METODOS -----	18
Sustratos -----	18
Preparación de complejos metálicos -----	18
Saponificación de los ésteres metálicos -----	19
Decarboxilación -----	19
Preparación de porfirinógenos -----	19
Sistemas de incubación -----	20
Materiales -----	20
Preparación del hemolizado -----	20
Preparación del sobrenadante -----	20
Incubación -----	21
Composición de los sistemas de incubación -----	21
a) Para la obtención de porfirinas -----	21
b) Para la obtención de porfirinas marcadas con C ¹⁴ -----	21
c) Para la obtención de P IX-C ¹⁴ o hemo marcado. -----	21
Procedimientos de aislación y purificación de porfirinas	
a partir de sistemas del tipo a) o b) -----	22
Aislación -----	22
Fracción "U" -----	22
Fracción "C" -----	23
Esterificación -----	23

Obtención de P IX a partir de los sistemas de incubación	24
Cromatografías sobre papel	25
Para ésteres metálicos	25
Micrométodo para la determinación cuantitativa de porfirinas	26
Para porfirinas libres	27
Cromatografía en columna de carbonato de calcio	28
Curvas de absorción	30
Concentraciones	30
Mediciones de radioactividad	30
Determinación de Hb	31
Determinación de ALA y PBG	31
Puntos de fusión	32
RESULTADOS	33
PARTE 1ª: BIOSÍNTESIS DE LA F III E	
IDENTIFICACIÓN CON LA P ₈₀	33
Biosíntesis de porfirinas	33
Distintas concentraciones de ALA	34
Distintos tiempos y calentamiento previo	35
Distintas soluciones isotónicas	34
Conclusiones	35
Cromatografía de las fracciones "U" y "C"	37
Cromatografías de la fracción "U"	37
Cromatografías de la fracción "C"	38
Cromatografía de las fracciones "U" y "C" (prev. calent.)	39
Cromatografías de la fracción "U" (prev. calent.)	39
Cromatografías de la fracción "C" (prev. calent.)	39
Estudio de la F III	40
Por cromatografía	40
Cristales	41
Puntos de fusión	41
Curvas de absorción	
a) de los ésteres metálicos	41
b) de las formas libres	42
Complejos metálicos	42
Curvas de absorción del a) complejo cúprico	42
b) complejo de cinc	43

Decarboxilación -----	43
Puntos de fusión de la F III y derivados. Máximos de absorción	43
Conclusiones -----	44
Productos de decarboxilación de las distintas porfirinas -----	44
Estudio de la U III-B -----	44
Estudio de la U I-B -----	45
Estudio de la C III-B -----	46
Estudio de la C I-B -----	48
Estudio de otras porfirinas biosintéticas -----	48
Puntos de fusión y máximos de absorción de las distintas porfirinas biosintéticas y de los correspondientes isómeros aislados de fuentes naturales -----	48
Conclusiones -----	50
PARTE 2ª: F III. SU SIGNIFICADO BIOLÓGICO	
1) Métodos de dilución isotópica -----	51
Incorporación de FPG III -----	52
Incorporación de UPG III -----	52
Incorporación de FPG III y UPG I -----	53
Incorporación de FPG III, F III y UPG I -----	54
Incorporación de FPG III-B y UPG III-B -----	55
Incorporación de CPG III y CPG I -----	55
Conclusiones -----	56
Comparación de las actividades de P IX-C ¹⁴ , sintetizado a partir de Gli-2-C ¹⁴ y en presencia de distintos porfirinógenos -----	57
Aislación de porfirinas libres presentes en sistemas de incubación que contienen porfirinógenos como sustratos -----	58
Porcentajes -----	58
Conclusiones -----	61
2) Incorporación del intermediario marcado con C ¹⁴ en el hemo	62
Incorporación de FPG III-C ¹⁴ -----	62
Incorporación de FPG III-C ¹⁴ , UPG III-C ¹⁴ y CPG III-C ¹⁴ -----	63
Comparación de las actividades de P IX-C ¹⁴ , sintetizado a partir de Gli-2-C ¹⁴ , FPG III-C ¹⁴ , UPG III-C ¹⁴ o CPG III-C ¹⁴ -----	63

Conclusiones	64
CONCLUSIONES FINALES Y RESUMEN	65
BIBLIOGRAFIA	67