

Tesis de Posgrado

Biosíntesis del hemo : Transformación de uroporfirinógeno en coproporfirinógeno por el sistema descarboxilante de eritrocitos de pollo

García, Rodolfo Carlos

1973

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:

García, Rodolfo Carlos. (1973). Biosíntesis del hemo : Transformación de uroporfirinógeno en coproporfirinógeno por el sistema descarboxilante de eritrocitos de pollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1431_Garcia.pdf

Cita tipo Chicago:

García, Rodolfo Carlos. "Biosíntesis del hemo : Transformación de uroporfirinógeno en coproporfirinógeno por el sistema descarboxilante de eritrocitos de pollo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1431_Garcia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DEL HEMO:

TRANSFORMACION DE UROPORFIRINOGENO EN COPROPORFIRINOGENO

POR EL SISTEMA DESCARBOXILANTE DE ERITROCITOS DE POLLO

1 4 3 1 -4

Tesis presentada por
RODOLFO CARLOS GARCIA
para optar al título de
DOCTOR EN QUIMICA
Orientación Química Biológica

Director de tesis : Dr. MOISES GRINSTEIN

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi madre, sin cuyo apoyo moral y económico no hubiera podido concretar mi vocación.

Al Dr. M. Grinstein, quien me brindó la posibilidad, los medios y los consejos necesarios para la realización del presente trabajo.

A las Dras. J. M. Tomio y L. C. San Martín de Viale quienes me iniciaron en el campo de la química biológica y colaboraron de manera fundamental y decisiva durante el curso de esta investigación.

A la Srta. Hilda Gasparoli y la Sra. Carmen Aldonatti de Olivar, por la ayuda y buena disposición brindadas en todo momento.

A Patricia, por su permanente estímulo y por su importante colaboración en la escritura de esta tesis.

Al Dr. M. Dankert, por su continuo aliento y comprensión.

I N D I C E D E T E M A S

	Pág.
ABREVIATURAS Y EQUIVALENCIAS	1
 INTRODUCCION	
Biosíntesis del hemo	2
Porfirinógenos como intermediarios reales	5
Oxidación de los porfirinógenos	9
Porfirinas de diferente número de carboxilos, "in vitro"	11
Porfirinas de diferente número de carboxilos, "in vivo". Porfirias	13
Probables productos de descarboxilación	16
El proceso de descarboxilación en las porfirias	18
Sistemas enzimáticos descarboxilantes	20
Multienzimas. Enzimas multivalentes	24
PLANTEO DEL TRABAJO	27
 MATERIALES Y METODOS	
Drogas	28
Técnicas	28
1) Cromatografía en papel de ésteres metílicos de porfirinas, según el método de Falk y Benson	28
2) Cromatografía en columna de ésteres metílicos de porfirinas	29
a) Adsorbente: CO_3Ca	29
b) Adsorbente: OMg	30
3) Obtención de porfirinas	31
a) A partir de orina de pacientes porfíricos	31
b) A partir de orina de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno	31
4) Sustratos	33

5) Determinaciones espectrofotométricas	34
6) Valoración de las actividades enzimáticas	34
7) Determinación de proteínas	37
8) Electroforesis en gel de poliacrilamida	37

RESULTADOS

PURIFICACION Y CONDICIONES DE DETERMINACION	39
Purificación parcial de la enzima - I	39
Condiciones de incubación - I	41
Purificación de la enzima - II	43
Condiciones de incubación - II	50
Estabilidad de la enzima	52
Condiciones de incubación - III	55
Purificación de la enzima - III	58
Grado de purificación. Peso molecular	64
PROPIEDADES	67
Acumulación de intermediarios parcialmente descarboxilados	67
Especificidad	67
Reversibilidad de la reacción	69
Curso de reacción	70
Formas de expresión de la actividad enzimática	78
Efecto del pH	78
Efecto de la concentración de enzima	80
Estabilidad térmica de la enzima	80
Efecto de sales	83
1) Cloruro de sodio	83
2) Sulfato de amonio	86
Efecto de análogos del sustrato	86
Acción de compuestos tiólicos reducidos y oxidados	88
Descarboxilación a diferentes temperaturas	94

Curvas de saturación de sustrato	96
1) Uroporfirinógeno III	96
2) Firiaporfirinógeno III	100
3) Uroporfirinógeno III + Firiaporfirinógeno III	100
4) Parámetros cinéticos	104
 DISCUSION GENERAL	 109
 RESUMEN	 115
 BIBLIOGRAFIA	 117

I N D I C E D E T A B L A S

1 - Elución de proteínas de DEAE-Celulosa, en tanda	40
2 - Elución de la porfirinógeno decarboxilasa de DEAE-Celulosa, en tanda	42
3 - Descarboxilación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas	44
4 - Requerimientos para la descarboxilación enzimática - I	45
5 - Purificación por intercambio iónico sobre DEAE-Celulosa, en tanda	46
6 - Rango de precipitación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	48
7 - Purificación por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	51
8 - Requerimientos para la descarboxilación enzimática - II	52
9 - Requerimientos para la descarboxilación enzimática - III	53
10 - Estabilidad de la enzima a -10°C	54
11 - Requerimientos para la descarboxilación enzimática - IV	55
12 - Requerimientos para la descarboxilación enzimática - V	56
13 - Purificación mediante columna de DEAE-Celulosa - I	60
14 - Tabla de purificación de la enzima	63
15 - Purificación mediante columna de DEAE-Celulosa - II	64
16 - Acumulación de intermediarios - I	68
17 - Acumulación de intermediarios - II	69
18 - Efecto del precalentamiento de la enzima	82
19 - Inhibición por NaCl	85
20 - Inhibición por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	87
21 - Inhibición por uroporfirina III	87

I N D I C E D E F I G U R A S

1 - Precipitación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	49
2 - Productos de descarboxilación en función de la concentración de sustrato	57
3 - Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa - I	59
4 - Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa - II	62
5 - Determinación de peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida	65
6 - Curso de reacción - I	71
7 - Acumulación de intermediarios	72
8 - Curso de reacción - II	73
9 - Curso de reacción - III	75
10 - Curso de reacción - IV	77
11 - Efecto del pH	79
12 - Efecto de la concentración de enzima	81
13 - Efecto del NaCl	84
14 - Efecto de compuestos sulfhidrúlicos	90
15 - Efecto del glutatión oxidado	92
16 - Efecto de la temperatura sobre la descarboxilación	95
17 - Curva de concentración de uroporfirinógeno III	97
18 - Efecto de v_1 sobre v_2	99
19 - Curva de concentración de firiaporfirinógeno III	101
20 - Inhibición de v_1 por firiaporfirinógeno III	103
21 - Velocidades inversas - Sustrato: uroporfirinógeno III	107
22 - Velocidades inversas - Sustrato: firiaporfirinógeno III	108

A B R E V I A T U R A S Y E Q U I V A L E N C I A S

ALA : Acido δ -aminolevúlico

PBG : Porfobilinógeno

UPG : Uroporfirinógeno = 8-COOH porfirinógeno = porfirinógeno octacarboxílico

FPG : Firiaporfirinógeno = 7-COOH porfirinógeno = porfirinógeno heptacarboxílico

HPG : 6-COOH porfirinógeno = porfirinógeno hexacarboxílico

PPG : 5-COOH porfirinógeno = porfirinógeno pentacarboxílico

CPG : Coproporfirinógeno = 4-COOH porfirinógeno = porfirinógeno tetracarboxílico

U : Uroporfirina = porfirina octacarboxílica = 8-COOH porfirina

F : Firiaporfirina = porfirina heptacarboxílica = 7-COOH porfirina

H : Hexacarboxiporfirina = porfirina hexacarboxílica = 6-COOH porfirina

P : Pentacarboxiporfirina = porfirina pentacarboxílica = 5-COOH porfirina

C : Coproporfirina = porfirina tetracarboxílica = 4-COOH porfirina

COOH : grupo carboxilo

EDTA : Etilendiamintetraacetato

GSH : Glutation reducido

GSSG : Glutation oxidado

DEAE-Celulosa : Dietilaminoetil-Celulosa

I N T R O D U C C I O N

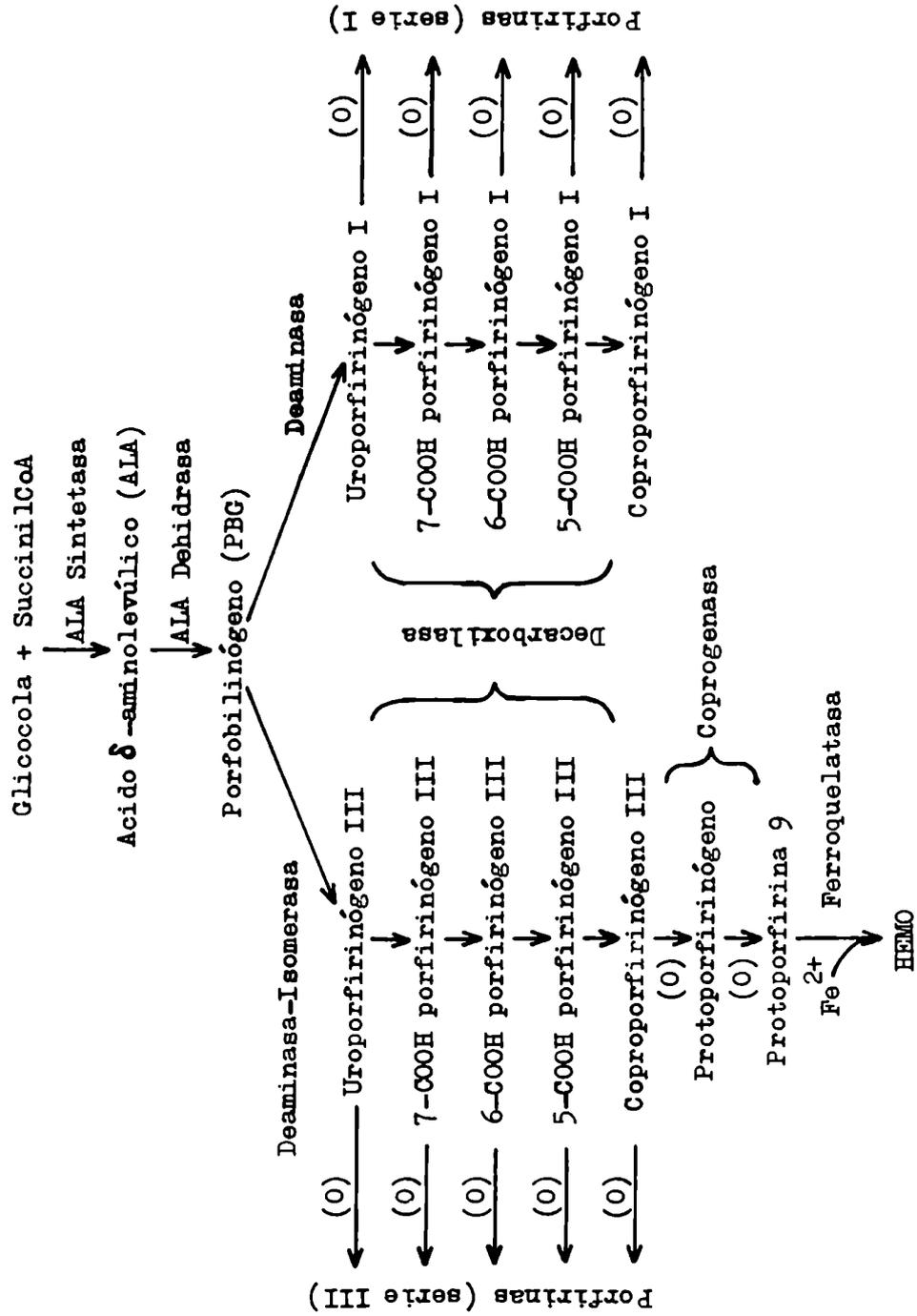
Biosíntesis del hemo

Todas las células aeróbicas, tanto bacterianas como animales o vegetales, son capaces de sintetizar hemo o clorofila. El hemo es el agente que hace disponible el oxígeno para que cumpla sus funciones metabólicas, a cuyo fin se combina con proteínas especiales, formando hemoglobina, mioglobina, citocromos. También forma parte de enzimas hémicas, por ej.: catalasa, peroxidasa, triptofano pirrolasa.

La biosíntesis del hemo ha sido y es bastante estudiada, conociéndose todos sus pasos con mayor o menor detalle (1). En el esquema 1 se pueden observar dichos pasos, con mención de las enzimas que los catalizan. Primero se unen dos moléculas, glicocola y succinilCoA, para formar una cadena corta, la molécula de ácido δ -aminolevúlico. Luego, dos moléculas de este ácido se condensan formando una molécula cíclica, un monopirrol: el porfobilinógeno. A continuación, cuatro monopirroles son encadenados para formar un gran anillo tetrapirrólico, incoloro, el uroporfirinógeno. Este encadenamiento puede realizarse de dos maneras distintas, dando por resultado uroporfirinógeno I o uroporfirinógeno III (esquema 2). La diferencia entre ambos radica en la posición de los sustituyentes (restos acético y propiónico), existiendo una inversión de dichas posiciones en uno de los cuatro pirroles. Hay otros dos isómeros más del uroporfirinógeno, II y IV, que no son naturales. El uroporfirinógeno (I o III) es descarboxilado, con eliminación de cuatro moléculas de CO_2 a partir de los grupos carboxilo terminales de los restos acéticos sustituyentes. Se llega así al coproporfirinógeno, cuyos cuatro carboxilos remanentes pertenecen a los restos propiónicos únicamente. Los porfirinógenos, cuyo número de carboxilos varía de 8 a 4, dan por oxidación las respectivas porfirinas, con igual número de carboxilos pero con seis átomos menos de H. El paso siguiente de la biosíntesis involucra la descarboxilación oxidativa de dos de las cadenas laterales de propiónico del coproporfirinógeno III, formando grupos vinilos, con lo cual se obtiene el protoporfirinógeno, y la posterior eliminación de seis átomos de H del anillo tetrapirrólico, para pasar del pro

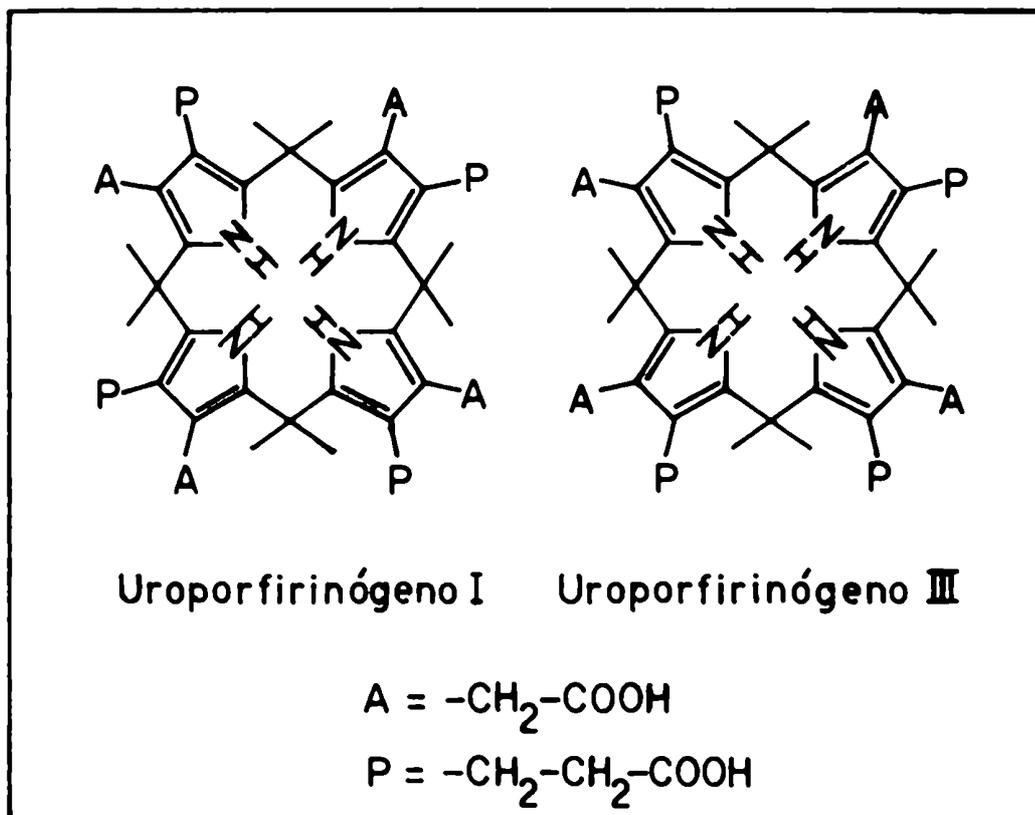
ESQUEMA 1

Biosíntesis del hemo



ESQUEMA 2

Estructura de los uroporfirinógenos I y III



toporfirinógeno a la protoporfirina 9. A esta última molécula se une el Fe^{+2} , dando el hemo (Fe-protoporfirina).

En el curso del proceso metabólico (esquema 1) se requiere energía para que ocurra la primera reacción, es decir la activación del succinato, que debe estar en forma de succinil-coenzima A para unirse a la glicocola y formar ALA. Las demás reacciones, que involucran la formación de pirroles resonantes y anillos porfirínicos, descarboxilaciones y oxidaciones, están termodinámicamente favorecidas.

Se requiere oxígeno en dos puntos de la biosíntesis: uno es la formación de

succinilCoA vía ciclo del ácido cítrico, y el otro es la oxidación del coproporfirinógeno a protoporfirina. Ambos procesos enzimáticos oxidativos ocurren en la mitocondria, cuando ésta existe, mientras que el resto de las reacciones del camino metabólico son catalizadas por enzimas "solubles".

Cabe destacar que en el hombre, y también en animales, se producen a veces disturbios metabólicos que afectan la biosíntesis del hemo. Estas enfermedades, conocidas como porfirias, tienen diversos orígenes y exteriorizaciones, pero todas producen una excreción y/o acumulación aumentada de algunos de los compuestos del camino metabólico o derivados de ellos: ALA, PBG, uroporfirinas I y III, coproporfirinas I y III y protoporfirina. Las porfirinas son productos de oxidación de sus respectivos porfirinógenos y por eso se detectan como tales luego de oxidación de la muestra a analizar, en la cual pueden coexistir los estados reducido y oxidado.

Porfirinógenos como intermediarios reales

Dentro del proceso de biosíntesis del hemo (esquema 1), cabe destacar la intervención de los porfirinógenos como intermediarios reales. En efecto, las reacciones catalizadas por la decarboxilasa y por la coprogenasa, tienen como sustratos a tales compuestos. La decarboxilasa, estudiada en el presente trabajo de tesis, actúa en la conversión de uroporfirinógeno (I o III) a coproporfirinógeno, y la coprogenasa, en la de coproporfirinógeno III a protoporfirina 9.

En una primera etapa de las investigaciones se creía que las reacciones mencionadas tenían lugar a nivel de las porfirinas, productos de oxidación de los porfirinógenos. Así, en 1952, Salomon y col.(2) encontraron una conversión de uroporfirina III radiactiva en protoporfirina, usando homogenatos de médula ósea de conejo. En 1953, Falk y col.(3) lograron formación de proto-, copro- y uroporfirinas incubando hemolizados de eritrocitos de pollo aeróbicamente, con PBG como sustrato. Como una parte del PBG no se convertía en porfirinas ni quedaba como tal, se planteó la posibilidad de que el PBG se

hubiera convertido en precursores incoloros de las porfirinas. Esta suposición se basaba en trabajos previos (4), donde se observaba que por calentamiento en medio ácido, el PBG daba origen primero a ciertos pigmentos y luego a porfirinas. No obstante esta sospecha, el hecho de haber obtenido una mezcla de uro-, copro- y protoporfirinas los indujo a intentar una demostración directa de interconversión de dichas porfirinas. Cuando incubaron uroporfirina III pura con el hemolizado, un 52% se convirtió en protoporfirina, confirmando los resultados de Salomon y col.. No se obtuvo en cambio una conversión de coproporfirina III en protoporfirina.

También en 1953, Bogorad y Granick (5) demostraron la conversión de PBG en porfirinas de 2 a 8 carboxilos por molécula, usando preparaciones congeladas y descongeladas de células de *Chlorella*.

Todos los trabajos mencionados hicieron pensar en su momento que la biosíntesis del hemo podría tener lugar a través de la conversión de PBG en uroporfirina y la descarboxilación gradual hasta llegar a la coproporfirina y finalmente a la protoporfirina y al hemo.

Sin embargo, los pacientes porfíricos excretaban parte de las porfirinas al estado de cromógenos incoloros. Fischer y Orth (6), trabajando con el caso Petry de porfiria, encontraron que en heces la coproporfirina se hallaba en gran proporción como un cromógeno. También en otras oportunidades se reconocieron cromógenos de la coproporfirina (7,8), observándose en un caso que por agregado de H_2O_2 a muestras de orina, aumentaba la cantidad de porfirinas, fluorescentes.

De Langen (9) estudió también la existencia de leuco-compuestos de las porfirinas, los que debían ser oxidados para su detección. Con un trabajo más minucioso, Watson y col.(10) mostraron similitudes entre el cromógeno incoloro aislado de orina de pacientes, que por oxidación daba coproporfirina (I y III), y el compuesto que se preparaba por reducción con amalgama de sodio de la coproporfirina.

Estos hechos planteaban una incógnita acerca del papel de los productos de reducción de las porfirinas, los porfirinógenos, en el metabolismo del hemo. Por eso se pensó en ellos como posibles intermediarios verdaderos, en lugar de las respectivas porfirinas (11).

Los trabajos de Dresel y Falk demostraron que los sobrenadantes de hemolizados de eritrocitos de pollo son capaces de utilizar PBG para dar uro- y coproporfirinas (12), pero no dan productos de descarboxilación a partir de uroporfirina III (13). En base a esto plantearon que la uroporfirina III no sería un intermediario normal en la síntesis del hemo, siendo las porfirinas que se detectan productos laterales formados a partir de los intermediarios verdaderos.

Dentro de este mismo aspecto, Bogorad (14) encontró, usando extractos de hojas de espinaca, que a partir del PBG se formaba un producto incoloro que era sustrato de enzimas descarboxilantes de células de *Chlorella*, ya que se formaban porfirinas de 3 a 7 carboxilos como productos. A su vez, el producto incoloro daba por oxidación uroporfirina I. Como las preparaciones de *Chlorella* fueron incapaces de utilizar uroporfirina I o III como sustratos para la síntesis de porfirinas con menos de 8 carboxilos por molécula, se dedujo que el producto incoloro precursor mencionado daba lugar a las porfirinas de menos carboxilos sin necesidad de pasar por la uroporfirina. Por otra parte, se pudo obtener coproporfirina incubando las mismas preparaciones con uroporfirinógeno I, y coproporfirina + protoporfirina incubando con uroporfirinógeno III (15). Estos uroporfirinógenos se prepararon por reducción de las respectivas porfirinas con Pd/H₂ o con amalgama de sodio y por el hecho de servir como sustratos de descarboxilasas, se los relacionó con el precursor incoloro aislado a partir de PBG.

También Granick (16) informó el hallazgo de intermediarios incoloros que aparecían en el camino metabólico entre PBG y protoporfirina y que podían oxidarse dando uroporfirina y coproporfirina.

Townsley y col.(17) presentaron evidencias de la formación de porfirinógenos a partir de ALA, con lisados de células de *M. lysodeikticus*.

Hoare y Heath (18) no lograron conversión de uroporfirinas I y III en coproporfirinas, con preparaciones de *Rhodopseudomonas spheroides*. Pudieron detectar un precursor, a partir de PBG, con las propiedades de una porfirina reducida, y consiguieron formación de coproporfirinas I y III a partir de los respectivos uroporfirinógenos. No hubo isomerización a nivel de los porfirinógenos, es decir que el uroporfirinógeno III daba sólo coproporfirinógeno III y el I daba coproporfirinógeno I.

La condensación química de 4 moléculas de PBG concuerda perfectamente con la estructura del uroporfirinógeno (19,20). A pH ácidos y alcalinos se forma una mezcla de isómeros del uroporfirinógeno, cuya oxidación da las respectivas porfirinas (21). Igualmente se postuló una condensación de 2 dipirroles para dar uroporfirinógeno III (22).

Los trabajos de Neve, Labbe y Aldrich (23) mostraron que la incorporación de Fe^{59} a hemina por hemolizados de eritrocitos de pato, se estimulaba por agregado de uroporfirinógeno III, preparado por reducción con amalgama de sodio. En cambio, no había ningún incremento en la biosíntesis por agregado de uroporfirinas I o III ni de uroporfirinógeno I. El uroporfirinógeno III producía dilución isotópica cuando se usaba glicina- $2-C^{14}$ como precursor del hemo.

Rimington y Booiij (24) también informaron la utilización del uroporfirinógeno III por hemolizados de glóbulos rojos humanos, para dar coproporfirina III.

Mauzerall y Granick usaron uroporfirinógeno I y III como sustratos de una descarboxilasa de glóbulos rojos de conejo (25), obteniendo coproporfirinógeno como producto final. Por descarboxilación enzimática parcial y posterior oxidación de los productos, identificaron por cromatografía en papel porfirinas de 5 a 7 carboxilos.

Quedaba claro pues que eran los uroporfirinógenos los sustratos de los sistemas descarboxilantes que los convertían en coproporfirinógenos. Era casi obvio

que esa transformación se debía llevar a cabo pasando por los porfirinógenos de 7,6 y 5 carboxilos, presunción avalada por haberse detectado las correspondientes porfirinas.

La demostración más rigurosa de un porfirinógeno heptacarboxílico como intermediario en la descarboxilación se logró en 1962 (26, 27) mediante la técnica de dilución isotópica, utilizando hemolizados de glóbulos rojos de pollo. También se preparó dicho porfirinógeno heptacarboxílico (firiaporfirinógeno) marcado con C^{14} , a partir de ALA- C^{14} , y usándolo como sustrato se observó formación de protoporfirina- C^{14} . Idénticos resultados se obtuvieron usando uroporfirinógeno III y coproporfirinógeno III, lo que fue una confirmación de trabajos anteriores.

Restaba pues verificar la intervención efectiva de los porfirinógenos de 5 y 6 grupos carboxilos por molécula. Esto último fue demostrado, utilizando también hemolizados de eritrocitos de pollo, por San Martín y Grinstein (28), mediante el uso de técnicas iguales a las recién mencionadas.

De igual modo quedó aclarado que era el coproporfirinógeno III y no la coproporfirina III el sustrato de la coprogenasa (22, 26, 29, 30).

Oxidación de los porfirinógenos

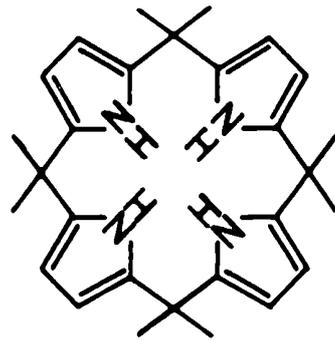
Los porfirinógenos son tetrapirrilmetanos, incoloros, que contienen 6 átomos de H más que las respectivas porfirinas. Se pueden preparar por reducción con amalgama de Na, en oscuridad y anaerobiosis (25), con Pd/H₂ (15) o con borohidruro (31).

Si se oxida uroporfirinógeno III con I₂, al finalizar la reacción se llega a recuperar prácticamente el 100% de la uroporfirina que había sido previamente reducida (25). A pH neutro y en oscuridad, el uroporfirinógeno se puede oxidar con PbO₂, algunas quinonas, Fe(CN)₆³⁻ y Cr₂O₇²⁻. A pH ácidos son oxidantes el Fe³⁺ y el CrO₃. No obstante, como la reacción con I₂ es cuantitativa e instantánea y presenta en menor grado el problema de destrucción del por-

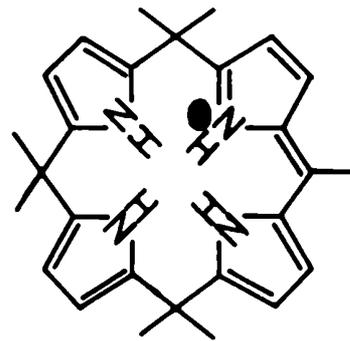
ESQUEMA 3

Porfirinas y sus estados reducidos

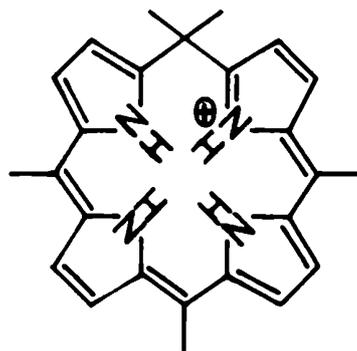
No se indican los sustituyentes de los pirroles.



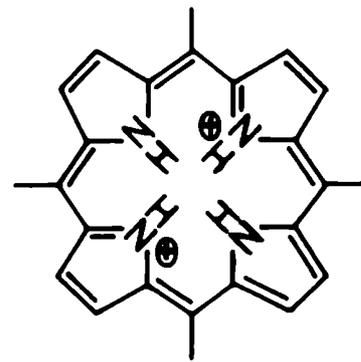
Hexahidroporfirina
(Porfirinógeno)



Tetrahidroporfirina
(Porfometeno)



Dihidroporfirina
(Florina)



Porfirina

firinógeno por un exceso del oxidante, se prefirió este método para oxidar el uroporfirinógeno de manera gradualmente creciente. Se forman así productos que representan los distintos estados de oxidación intermedios entre ambos ex tremos (esquema 3). Las estructuras de estos compuestos de oxidación intermedios se dedujeron por comparación de propiedades tales como espectros de absorción, pK , formación de complejos con Zn^{2+} , SO_3^{2-} y $S_2O_4^{2-}$, con las de alquildipirrimetenos conocidos (25). También mediante fotoreducción en anaerobiosis por aminas bis-terciarias o reducción química con $S_2O_4^{2-}$ de porfirinas, se tuvieron datos adicionales para proponer las estructuras del esquema 3 (32).

Un aspecto muy importante desde el punto de vista práctico es la autooxidación de los porfirinógenos. En efecto, Mauzerall y Granick (25) estudiaron en detalle la autooxidación del uroporfirinógeno III en soluciones neutras y encontraron que es muy estimulable por la luz y también por agregado de uroporfirina (autocatálisis). Soluciones de uroporfirinógeno a las cuales se les eliminaba el oxígeno, se oxidaban sólo levemente al exponerlas a la luz. El glutatión inhibía la fotooxidación, así como también la 2-mercaptoetilamina y el SO_3Na_2 , a $pH=7$. La velocidad de fotooxidación aumenta a medida que es me nor el pH y junto con ella aumenta la recuperación de las porfirinas.

De lo expuesto se deduce la conveniencia de un medio anaeróbico, oscuridad y algún agente inhibidor de la fotooxidación cuando se trabaja con los porfirinógenos y se los quiere mantener como tales. En este sentido se puede plantear también la posibilidad de una oxidación enzimática de los porfirinógenos, como sugirió Bogorad (15).

Porfirinas de diferente número de carboxilos, "in vitro".

En repetidas oportunidades, estudiando la biosíntesis del hemo, se detectaron "in vitro" porfirinas de 8 (uro), 7, 6, 5, 4 (copro) y aun menos carboxilos, utilizando preparaciones enzimáticas de diversos orígenes y partiendo de dife rentes sustratos, inclusive antes de conocerse con certeza la participación

de los porfirinógenos como intermediarios verdaderos.

Con células de *Chlorella* y PBG como sustrato, se observó la formación de uroporfirina, principalmente de la serie isomérica I, y porfirinas de 7, 6, 5, 4, 3 y 2 carboxilos, además de protoporfirina (5,14).

Con el sistema enzimático de *Rhodopseudomonas spheroides*, que sintetiza uroporfirinas I y III, copro- y protoporfirinas, a partir de ALA o de glicina y oxoglutarato, se han detectado trazas de porfirinas de 3 y 6 carboxilos (33). También con extractos libres de células de *Rh.spheroides* y PBG como sustrato, se formó uroporfirina (una mezcla de isómeros I y III, con predominio del I), coproporfirina y pequeñas cantidades de porfirinas de 7, 6 y 5 carboxilos(34). Con el mismo sistema pero más purificado, se consiguió formación de uroporfirina I, coproporfirina I y porfirinas intermedias, en mayor cantidad la de 5 carboxilos. También a partir de uroporfirinógeno se observaron intermediarios similares (35).

Con preparaciones de glándula de Harder de ratas y ALA o PBG como sustrato, se formaron porfirinas de 8, 7, 6, 5, 4 y 3 carboxilos, además de protoporfirina. En la etapa inicial de la reacción hubo una acumulación relativa de la de 7 carboxilos (36).

Si se usaban hemolizados de eritrocitos humanos, con ALA (24) o PBG (37) como sustratos, se formaban uroporfirina III, a veces uroporfirina I, y porfirinas de 7 a 4 carboxilos (serie III). En ciertas condiciones, la porfirina heptacarboxílica III se acumulaba relativamente. Iguales resultados se obtuvieron con sobrenadantes de hemolizados de glóbulos rojos humanos o de conejo (38).

Con uroporfirinógeno como sustrato y una preparación parcialmente purificada de decarboxilasa de reticulocitos de conejo (25), se obtuvieron, además de uro- y coproporfirinas, las de 7, 6 y 5 carboxilos, tanto en el caso de la serie isomérica III como en el de la I. Con preparaciones de glóbulos rojos de conejo se observó, a partir de PBG, de ALA o de uroporfirinógeno III, for-

mación de la porfirina heptacarboxílica y cantidades pequeñas de las penta- y hexacarboxílicas, además de coproporfirina III (39,40).

Con eritrocitos de pollo (intactos, hemolizados o sobrenadantes de hemolizados) y a partir de PBG y de ALA, se formaron uroporfirina, porfirina heptacarboxílica, coproporfirina y cantidades menores de las de 6 y 5 carboxilos, principalmente de la serie III. En ciertos casos se formaron protoporfirina y una tricarboxílica (12,39,41,42). Con la misma fuente de enzimas pero con uroporfirinógeno I, III o firiaporfirinógeno III como sustratos, se formaron también porfirinas con un número decreciente de carboxilos (27).

Dentro de la conversión enzimática del uroporfirinógeno, octacarboxílico, en coproporfirinógeno, tetracarboxílico, es importante recalcar el hecho de que el porfirinógeno heptacarboxílico, o su producto de oxidación la firiaporfirina, se ha encontrado en numerosas oportunidades en cantidades mayores que los otros dos intermediarios, los penta- y hexacarboxílicos. Esto se observó con preparaciones de glóbulos rojos humanos, de pollo y de conejo (37-43) y también con preparaciones de glándula de Harder (36) y de hojas de avena (44). Una acumulación de porfirina de 7 carboxilos también ocurre en algunos tipos de porfirias, las que se comentan a continuación.

Porfirinas de diferente número de carboxilos, "in vivo". Porfirias .

Las porfirias, enfermedades cuya manifestación metabólica es una alteración de la biosíntesis del hemo, se pueden clasificar en: 1) eritropoyéticas, en las cuales hay un disturbio en el sistema hemopoyético; 2) hepáticas, en las cuales el desorden se ubica a nivel del hígado; 3) experimentales (o químicas), que son las producidas por ciertas drogas. En todos los casos, se acumulan y se excretan cantidades anormalmente elevadas de porfirinas y/o de sus precursores, en proporciones variables y con predominio de alguno de los tipos isoméricos naturales, I o III.

En los casos de porfiria congénita humana (eritropoyética), las porfirinas

urinarias muestran un predominio de la serie isomérica I (80-90%) y dentro de ella la mayoría es uroporfirina (80% o más). También hay coproporfirina (10%) y cantidades pequeñas de las porfirinas de 7, 6 y 5 carboxilos. Un 10% del total corresponde a las porfirinas del tipo isomérico III (45-50). En heces hay predominio de coproporfirina I (50,51); en plasma la distribución es con una mayoría de uroporfirina, mucho menos de coproporfirina y trazas de las hepta-, hexa- y pentacarboxílicas (50); en eritrocitos sólo se han detectado copro- y protoporfirina (50).

También en casos de porfiria congénita en cerdos y ganado vacuno se hallaron, en orina, uro- (70-90% de la serie I) y coproporfirinas y cantidades menores de porfirinas de 3, 5, 6 y 7 carboxilos (52-54). En plasma de ganado vacuno se encontraron porfirinas de 8 a 4 carboxilos, además de protoporfirina (54).

Dentro de las porfirias hepáticas ha sido bastante estudiada la llamada "cutánea tarda". En orina de pacientes se encontró uroporfirina, firiaporfirina, cantidades pequeñas de porfirinas penta- y hexacarboxílicas y coproporfirina. La relación uro/firia fue de aproximadamente 2:1 a 3:1 (55-57). La uroporfirina urinaria suele ser una mezcla de los isómeros I y III (60-80% de I y 20-40% de III) (47), como así también las porfirinas de menos de 8 carboxilos (58, 59). Un estudio más reciente de los tipos isoméricos de las porfirinas urinarias de casos de "cutánea tarda", hecho por Chu y Chu (50), muestra características bastante peculiares:

Uroporfirina	50-70%	(70-80% serie I)
7-COOH porfirina	18-28%	(85-90% serie III)
6-COOH "	1-6 %	(> 90% serie III)
5-COOH	2-7 %	(60-70% serie I)
Coproporfirina	1-8 %	(50-80% serie III)

Valores similares, con la coproporfirina aumentada, fueron obtenidos por Nacht y col.(60). Los resultados expuestos indican que los isómeros I predominan en la uro- y pentacarboxiporfirina, mientras que los III predominan en la hepta- y hexacarboxílica y en la coproporfirina. Esta distribución puede ser un ín-

dice de la complejidad de la descarboxilación enzimática gradual, que a partir de una determinada mezcla de uroporfirinógenos I y III llega a dar cantidades bastante dispares de ambos isómeros de los productos con menor número de carboxilos. Una característica de la porfiria cutánea tarda es la acumulación relativa de la porfirina de 7 carboxilos, hecho que se repite en orina, hígado y plasma (50,61). Esta acumulación es tal que la porfirina heptacarboxílica constituye un 20-40% de las porfirinas totales.

Otra porfiria hepática es la "intermitente aguda", en la cual se observa la presencia de uroporfirina, coproporfirina y porfirinas de 7, 6 y 5 carboxilos en orina y porfirinas de menos de 7 carboxilos y protoporfirina en heces (56,62). En orina, la uroporfirina es habitualmente la más abundante y consiste en una mezcla de 20-60% de isómero I y 40-80% de isómero III; se ha encontrado a veces también que las porfirinas de 7 a 5 carboxilos están presentes, en cantidades menores (8-17% entre las tres), y son principalmente de la serie III. La cantidad de coproporfirina es mayor que la de las anteriores y también pertenece casi toda a la serie III (47,50,58).

Por envenenamiento con plomo se produce una porfirinopatía. En esos casos se han detectado en orina, tanto humana como de animales, porfirinas de 4 a 8 carboxilos y a veces también una tricarboxílica (50,56,63).

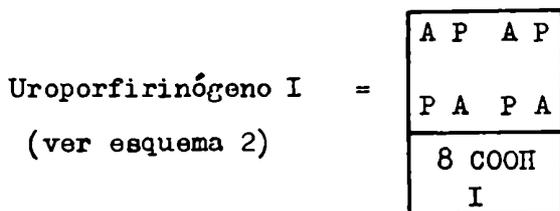
Resultados similares se obtuvieron por análisis de las porfirinas urinarias de casos de intoxicación con hexaclorobenceno, ya sea humanos como de conejos o ratas. Se encontró además en muchos de estos casos una acumulación relativa (15-40%) de la porfirina heptacarboxílica, siendo la distribución general de las porfirinas muy similar a la de la porfiria cutánea tarda (50, 64,65), pero con un predominio de la serie isomérica III. Dentro de la uroporfirina proveniente de la porfiria humana "turca", aparece una apreciable cantidad de isómero I, no así dentro de las de menor número de carboxilos (< 20% de I) (50). En orina de ratas intoxicadas sólo hay trazas de isómero I (65).

En cuanto al proceso de descarboxilación de uro- a coproporfirinógeno se pue

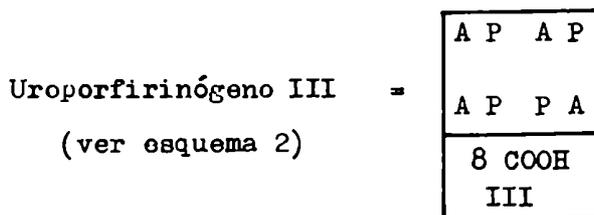
de decir pues, en resumen, que entre las porfirinas excretadas o acumuladas en casos de porfirias, se han encontrado casi siempre las de 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos. Con respecto a la isomería, en las porfirias eritropoyéticas congénitas hay mucho menos isómeros III y más I que en las porfirias hepáticas pudiendo deberse esto a algún factor que influya sobre la isomerasa, responsable de la formación de uroporfirinógeno III. Dentro de las porfirias hepáticas, la intermitente aguda presenta un predominio de isómeros III en las porfirinas de 7 a 4 carboxilos, y una mezcla de III y I en la uroporfirina (como si la uroporfirina I no se descarboxilara). La cutánea tarda muestra una mezcla disímil de isómeros en cada una de las porfirinas, resultando por ello difícil plantear una justificación en base a lo conocido hasta ahora sobre la descarboxilación enzimática en la biosíntesis del hemo.

Probables productos de descarboxilación

Cabe aquí plantear las posibilidades de descarboxilación de los uroporfirinógenos I y III (66,67), proceso que llevado a cabo enzimáticamente podría tener cierto grado de especificidad, lo que orientaría las sucesivas eliminaciones de CO₂ en algunos sentidos preferenciales. Para simplificar, se esquematizan las estructuras de la siguiente forma:



A = resto acético



P = resto propiónico

Los posibles productos de descarboxilación serían, dentro de cada serie isomérica (siendo M = resto metilo, proveniente de la eliminación de CO₂ de un resto acético):

MP AP	MP MP	MP AP	MP MP	MP MP
PA PA	PA PA	PA PM	PA PM	PM PM
7 COOH I	6 COOH I		5 COOH I	4 COOH I

Total de los posibles productos de descarboxilación de la serie I = 5

MP AP	AP MP	AP AP	AP AP
AP PA	AP PA	AP PM	MP PA
7 COOH III			

MP MP	MP AP	MP AP	AP MP	AP AP	AP MP
AP PA	MP PA	AP PM	AP PM	MP PM	MP PA
6 COOH III					

MP MP	MP AP	MP MP	AP MP	MP MP
AP PM	MP PM	MP PA	MP PM	MP PM
5 COOH III				4 COOH III

Total de los posibles productos de descarboxilación de la serie III = 15

Actualmente no se conocen las estructuras de los porfirinógenos intermedios de 7, 6 y 5 carboxilos de ninguna de las dos series isoméricas, I y III.

En base a la gran cantidad de productos de descarboxilación teóricamente posibles (25), sin haber considerado los isómeros no naturales II y IV, se puede sospechar que la descarboxilación enzimática de los uroporfirinógenos I y III debería ser bastante específica en cuanto a las características del catalizador (una o más enzimas o cofactores) y/o en cuanto a su regulación, en caso de que el proceso tuviera direcciones preferenciales; es decir, si en forma natural se obtuvieran sólo algunos de los productos de descarboxilación, quedando excluidos otros, presuntamente no naturales, de igual número de carboxilos que los anteriores pero con una diferente disposición de los grupos sustituyentes del núcleo tetrapirrólico.

El proceso de descarboxilación en las porfirias

Una vez planteada la complejidad potencial de la descarboxilación, que se basa no sólo en consideraciones teóricas sino también en los resultados obtenidos al estudiar las porfirinas excretadas o acumuladas en casos patológicos (porfirias) (ver pág. 13 a 16), se deben mencionar los estudios realizados que indican de alguna manera la posible participación del sistema descarboxilante en un metabolismo alterado del hemo.

En cuanto a la porfiria cutánea tarda, en base a la acumulación hepática de porfirinas de 8 y 7 carboxilos principalmente (pág. 14) se ha sugerido que hay una descarboxilación defectuosa del uroporfirinógeno. Con respecto a los casos normales, se ha estudiado el sistema enzimático de hígado de ratas (68), habiéndose encontrado que actúa sobre el uroporfirinógeno III produciendo coproporfirinógeno y todos los porfirinógenos intermedios, con acumulación del de 7 carboxilos. Asimismo actúa sobre el uroporfirinógeno I pero a mucho menor velocidad, produce sólo pequeñas cantidades de coproporfirinógeno y no se detectan los intermediarios de 7 a 5 carboxilos. Por otra parte, se ha estudiado la actividad de uroporfirinógeno decarboxilasa en hígado de ratas con porfiria experimental inducida por hexaclorobenceno (69), la cual se asemeja mucho a la cutánea tarda (pág. 15), y por una combinación de sobrecarga de

hierro y hexaclorobenceno. No se encontró actividad descarboxilante en los animales tratados con Fe/hexaclorobenceno, donde la acumulación hepática de porfirinas es muy grande y se compone de un 88,5% de 8-COOH y un 11,5% de 7-COOH porfirina. Esto es congruente con la hipótesis de que se ha producido un bloqueo a nivel de la uroporfirinógeno descarboxilasa, hecho que podría ser similar en las porfirias cutáneas tardas reconociendo la influencia del Fe en el proceso. Sin embargo, en los animales tratados sólo con hexaclorobenceno no hubo disminución de la actividad descarboxilante, aunque se observó una acumulación hepática de porfirinas de 8 y 7 carboxilos, no tan pronunciada como en la intoxicación con Fe/hexaclorobenceno.

En cuanto a la porfiria eritropoyética congénita, se ha encontrado que hemolizados provenientes de casos humanos producen a partir de PBG una mezcla de porfirinas de los tipos isoméricos I y III, mientras que los de casos normales dan principalmente el tipo III (70,71). Se deduce que el defecto está presente también en las células circulantes y no sólo en médula ósea.

La formación de una cantidad no habitual de uroporfirinógeno I se asocia generalmente a un desequilibrio entre las actividades de la PBG deaminasa y la isomerasa (72-74), que puede explicarse como un error genético, una falta de represión (72). El hecho de que no sólo haya uroporfirinógeno I sino también sus productos de descarboxilación, hace pensar que dicha descarboxilación no es específica para la serie III, hecho conocido, aunque el coproporfirinógeno I no tiene destino. Una actividad descarboxilante "normal" podría dar cuenta de la presencia de las porfirinas de la serie I, en condiciones patológicas. La actividad hacia la serie III puede aparentemente utilizar el exceso de uroporfirinógeno III anormalmente producido, ya que hay un incremento en la formación de protoporfirina 9, la cual proviene del coproporfirinógeno III (72). De acuerdo a esto no se podría excluir la posibilidad de que la falta de represión mencionada antes se extendiera a los sistemas enzimáticos descarboxilantes y a la coprogenasa, lo cual estaría a favor de la idea de un solo operón para la biosíntesis del hemo (72), cuya regulación se vería afecta-

da en las porfirias.

Estudios llevados a cabo por Chu y Chu (42), con sangre de pollo, indican que se puede conseguir "in vitro" una distribución de porfirinas similar a la observada en porfirias congénitas, por agregado de etanol al sistema de incubación. A partir de ALA se acumuló uroporfirina I, una cantidad 40 veces menor de 7-COOH porfirina, trazas de 5- y 6-COOH porfirinas y muy poca cantidad de coproporfirina. Evidentemente hubo una descarboxilación muy reducida, que podría ser característica para la serie I o bien sería producida por el efecto del etanol sobre el sistema enzimático correspondiente. También consiguieron una distribución de porfirinas similar a la de la porfiria cutánea tarda, por incubación de hemolizados de eritrocitos de pollo o sangre humana con ALA, en presencia de Zn^{2+} . También el efecto combinado de Zn^{2+} , hexaclorobenceno e hígado vacuno produjo una distribución característica de dicha porfiria experimental.

De lo expuesto surge la necesidad de conocer cuál es el mecanismo normal de la descarboxilación enzimática, a fin de poder relacionarlo luego con lo que ocurre en los casos patológicos.

Sistemas enzimáticos descarboxilantes

El sistema enzimático responsable de la transformación de uroporfirinógeno en coproporfirinógeno ha sido localizado en la fracción citoplasmática no particulada de diferentes células animales y vegetales. En la fracción "soluble" de células de *Chlorella* se encontró actividad de formación de porfirinas de hasta 2 carboxilos, a partir de PBG (5). Sobrenadantes de hemolizados de eritrocitos de pollo y de pato poseen sólo una pequeña proporción de la capacidad del hemolizado total original para formar protoporfirina, pero pueden sin tetizar uro- y coproporfirinas a partir de ALA o PBG (3,12,75).

Varios grupos han llevado a cabo estudios más o menos detallados de los sistemas descarboxilantes.

Mauzerall y Granick trabajaron con sobrenadantes de hemolizados de reticulocitos de conejo y de glóbulos rojos de pollo y humanos. Por electroforesis en gel de almidón de estos sobrenadantes, consiguieron separar entre sí ALA dehidrasa, PBG deaminasa-isomerasa y uroporfirinógeno decarboxilasa, siendo en cada caso diferentes las velocidades de migración relativas (76). Con una preparación de uroporfirinógeno decarboxilasa de glóbulos rojos de conejo así purificada, estudiaron el proceso de descarboxilación enzimático (25), expresando la actividad como μ moles de coproporfirinógeno/hora, formados a 38°C y bajo N_2 . Luego de la oxidación de los productos de descarboxilación parcial de uroporfirinógeno III, detectaron las porfirinas de 7 y 6 carboxilos en concentraciones bajas y de estado estacionario, y la de 5 carboxilos en concentración aun menor. Cuando la concentración inicial de uroporfirinógeno fue muy baja ($6 \mu M$), sólo se detectó coproporfirina ya que los productos intermedios se convierten en ese caso totalmente en el producto final. El rendimiento de coproporfirinógeno a partir de los distintos isómeros del uroporfirinógeno fue: III > IV > II > I. Los naturales son I y III, y el III fue descarboxilado dos veces más rápido que el I. Además no encontraron isomerización química o enzimática de los porfirinógenos, lo que podría haber ocurrido por apertura y posterior cierre del núcleo tetrapirrólico en diferentes posiciones. La coproporfirina recuperada siempre correspondió a la isomería del sustrato utilizado, o sea que no hay cambios, en ese aspecto, durante la reducción de la uroporfirina con amalgama de Na, ni en la incubación con la enzima, ni en la oxidación final de los porfirinógenos. La actividad de la enzima no fue mayormente alterada por: Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_3^{2-} , $S_2O_4^{2-}$, CO_3H^- , PBG, y cantidades pequeñas de coproporfirina o coproporfirinógeno (aprox. $6 \mu M$). El oxígeno tuvo efecto inhibitor (autooxidación del uroporfirinógeno), así como también la uroporfirina III, siendo esto último evitado por glutatión (el GSH anula el efecto de sensibilización de la autooxidación del uroporfirinógeno producido por la uroporfirina). Se observó una fuerte inhibición por Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , iodoacetamida y p-cloromercu-ribenzoato, evitada en todos los casos por GSH 5×10^{-3} M, evidenciándose así

que la enzima (o enzimas) tiene grupos sulfhidrilos esenciales. La actividad de las preparaciones utilizadas no aumentó más que un 20% por el agregado de GSH, pero si estas preparaciones sufren contaminación con metales, aumenta la necesidad del GSH para mantener la actividad. La reacción de descarboxilación fue irreversible. Se encontró un pH óptimo de 6,8 para la reacción total, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En cuanto a la concentración de sustrato, la velocidad de formación de coproporfirinógeno decreció a concentraciones de uroporfirinógeno mayores que 2×10^{-5} M. Se obtuvo, trabajando con concentraciones menores que la recién mencionada, una K_M aparente menor que 5×10^{-6} M.

Hoare y Heath estudiaron la biosíntesis de porfirinas a partir de PBG, en *Rhodopseudomonas spheroides* (35). De extractos libres de células lograron separar la PBG deaminasa de la uroporfirinógeno descarboxilasa por fraccionamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. El ensayo de actividad (realizado a 37°C, en oscuridad y bajo N_2) fue en general indirecto, usando PBG como sustrato y un exceso de PBG deaminasa (libre de descarboxilasa), y determinándose la coproporfirina formada luego de oxidación de los porfirinógenos al finalizar las incubaciones. La descarboxilasa fue estable a -15°C durante 2-3 semanas, en presencia de dimercaptopropanol, sugiriendo ser una enzima sulfhidrúlica. Esta descarboxilasa parcialmente purificada fue activa con uroporfirinógeno III como sustrato, así como también con los uroporfirinógenos del tipo isomérico I, II y IV; aunque las actividades determinadas con PBG como sustrato fueron siempre mayores que las determinadas con uroporfirinógenos. A partir de PBG, en el ensayo indirecto, se formaron uroporfirina I, coproporfirina I, y las porfirinas intermedias, indicando esto que la PBG deaminasa utilizada no contenía isomerasa activa. Dentro de las porfirinas intermedias se detectó en mayor cantidad una cuyo comportamiento cromatográfico permite suponer que es la pentacarboxílica. Se encontraron factores estimulantes de la formación de coproporfirinógeno en ultrafiltrados de extractos de *Rhodopseudomonas spheroides*, levadura, hígado de cerdo y sangre de pollo, que actuaron principal-

mente cuando el sustrato fue PBG y/o con preparaciones enzimáticas crudas. Urata y Kimura trataron de aislar el sistema enzimático de síntesis de coproporfirinógeno de eritrocitos de pollo (77) mediante una resina de intercambio iónico. Se obtuvieron dos fracciones con actividad de síntesis de porfirinas, en anaerobiosis, a 37°C y a partir de ALA o de PBG. Se encontró que una de las fracciones contenía un factor termoestable y dializable, de naturaleza polipeptídica, que podría estar involucrado ya sea en la isomerización del anillo tetrapirrólico o en uno de los pasos del proceso de descarboxilación.

Cornford estudió también con cierto detalle la transformación de PBG en porfirinas, con preparaciones de eritrocitos humanos (37), conduciendo esto a consideraciones sobre el sistema descarboxilante. Se obtuvieron, en aerobiosis, mezclas de los isómeros I y III variando sus proporciones de acuerdo a las demás condiciones de incubación. La mayoría del isómero I, formado con hemolizados de glóbulos rojos, se encontró como uroporfirina I, haciendo deducir que la descarboxilasa fue mucho más activa con el uroporfirinógeno III que con el I. Con una mezcla I/III (27:23), el pasaje de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III fue 7,5 veces más veloz que en el caso de la serie I. La formación de coproporfirina fue óptima a pH=7,2 y fue estimulada por menores concentraciones de oxígeno (incubación bajo N₂). No se encontró un factor activador, como en otros casos (18,34,77). Por agregado de fosfato o cloruro de sodio (33 a 181 mM) al sistema de incubación, no hubo variación en la cantidad de porfirinas totales pero disminuyó la formación de coproporfirina y la de uroporfirina I. El déficit de coproporfirina estuvo equilibrado por un aumento de la firiaporfirina. La cantidad de porfirinas de 5 y 6 carboxilos fue pequeña en todos los casos, de modo que el aumento relativo de la porfirina heptacarboxílica se asoció a un efecto inhibitor del Na⁺ sobre el paso: 7-COOH → 6-COOH. Esta acumulación del 7-COOH porfirinógeno permitió plantear que dos o más enzimas pudieran ser necesarias para convertir uroporfirinógeno en coproporfirinógeno.

Recientemente Romeo y Levin describieron la purificación parcial de un sistema enzimático de bazo de ratón que cataliza la transformación de los uroporfirinógenos I y III en los correspondientes coproporfirinógenos (78). La actividad descarboxilante presentó un máximo a los 6 días de tratamiento de los ratones con fenilhidracina, coincidentemente con el mayor porcentaje de células nucleadas capaces de sintetizar hemoglobina (79). Aun luego de la purificación hubo algo de la actividad de PBG deaminasa en las preparaciones de descarboxilasa. La enzima evidenció ser sulfhidrúlica, y fue estable guardada con un protector adecuado. A 37°C y con la preparación más purificada, se obtuvieron las siguientes K_M aparentes: $1,01 \times 10^{-6}$ M para el uroporfirinógeno I y $0,9 \times 10^{-6}$ M para el uroporfirinógeno III. Se logró saturación aparente de la enzima a concentraciones 6×10^{-6} M de cualquiera de los dos isómeros. No hubo estimulación de la actividad por fosfato de piridoxal ni por agregado de un sobrenadante de un homogenato calentado previamente 10 minutos a 60°C. No se acumularon porfirinas de menos de 8 y más de 4 carboxilos; todo el uroporfirinógeno que desapareció estuvo compensado por el coproporfirinógeno formado, o sea que si había intermediarios parcialmente descarboxilados, estaban presentes en pequeñas cantidades y no se detectaron. La actividad descarboxilante hacia ambos uroporfirinógenos se destruyó por completo por calentamiento de la preparación enzimática 5 minutos a 50°C. A 43°C la inactivación fue más lenta, y la velocidad con la cual se perdió la actividad fue igual con los dos sustratos (I y III). Estos resultados, junto con las K_M y velocidades máximas, indicarían que el sistema enzimático probablemente es el mismo para los dos isómeros naturales. Sin embargo, podría ser que hubiera más de una enzima, catalizando cada una uno o más pasos de la descarboxilación secuencial.

Multienzimas. Enzimas multivalentes

El hecho de que el proceso de descarboxilación de uro- a coproporfirinógeno conste de cuatro pasos, y siendo además dos las series isoméricas involucra-

das, plantea la posibilidad, ya mencionada, de que haya más de una enzima catalizadora (sistema multienzimático) o bien enzimas multivalentes.

El sistema multienzimático (80) más simple estaría constituido por entidades moleculares (enzimas) independientes, no asociadas. En sistemas más complejos habría una mayor organización, una asociación física de las enzimas individuales que eventualmente podrían estar incluidas en estructuras supramoleculares tales como membranas o ribosomas.

La cinética de un sistema multienzimático es difícil de analizar pues cada miembro de la secuencia metabólica tiene una K_M para su sustrato y para sus posibles cofactores. Por consiguiente, las concentraciones de estado estacionario de los intermediarios y las de las diferentes enzimas determinan las velocidades de los pasos individuales, de las cuales una es en general limitante, ya sea por la cantidad de su sustrato y/o por la de la enzima.

En el caso de existir una sola enzima con más de un sitio activo (81), dichos sitios pueden o no ser independientes entre sí. Si no tuvieran influencia uno sobre otro, una molécula con n sitios sería exactamente equivalente a n moléculas de enzima con un sitio cada una, no pudiendo distinguirse entre sí ambas situaciones.

Si los sitios de la enzima multivalente interactuaran, una vez ocupado el primero de ellos, la velocidad con que se llenaría el segundo no sería igual a la velocidad con que se habría llenado el primero. El mismo razonamiento se aplicaría a las reacciones inversas, las que a partir de un sitio lleno darían el sitio vacío y sustrato, y las que a partir de un sitio lleno darían el sitio vacío y producto.

El esquema de reacciones, para el caso más simple de una enzima con 2 sitios, sería:

S : sustrato	D_1 : enzima con 1 sitio ocupado
P : producto	D_2 : enzima con los 2 sitios ocupados
E : enzima libre	k : constante de velocidad



De acuerdo a la teoría, es $k_1 \neq k_2$, y difieren más que por el factor de probabilidad, que es 2 en el caso de la reacción I (pues hay 2 sitios vacantes disponibles para que se una el sustrato) y 1 en el caso de la reacción II (pues hay 1 sitio vacante).

Resolviendo el sistema de las ecuaciones que se plantean en base al esquema anterior, se llega a una ecuación de velocidad de la siguiente forma:

$$V = \frac{(aS + bS^2) \times E_t}{1 + cS + dS^2} \qquad \text{siendo } E_t = \text{enzima total}$$

a, b, c y d representan diferentes relaciones entre las constantes de velocidad de las reacciones planteadas. Para valores grandes de S (saturación) resulta:

$$V = k_{2a} \times E_t$$

La velocidad a saturación por sustrato es pues la velocidad con que se produce producto a partir de la enzima con ambos sitios ocupados.

P L A N T E O D E L T R A B A J O

El presente trabajo tuvo por objeto el estudio del sistema descarboxilante que cataliza una de las etapas de la biosíntesis del hemo, la transformación del uroporfirinógeno en coproporfirinógeno. Este sistema recibe el nombre de porfirinógeno carboxi-liasa y comunmente se lo llama descarboxilasa.

Como material de partida se eligieron glóbulos rojos de pollo, los cuales se asemejan a los eritroblastos tardíos de mamíferos, es decir, a una etapa de maduración de 3-5 días en médula ósea, siendo 6 días aproximadamente el tiempo necesario para la conversión de hemocitoblastos, no diferenciados, en reticulocitos, anucleados (1). Tanto los eritrocitos de aves como los eritroblastos tardíos de mamíferos contienen núcleo y mitocondrias; está presente el sistema completo de biosíntesis del hemo (1), hay DNA, RNA y síntesis de RNA (82). En esas circunstancias se podía esperar encontrar una mayor cantidad de enzima, uniéndose esto al hecho de que por haber una proteína ampliamente mayoritaria, la hemoglobina, se conseguiría una buena purificación si se la lograba separar del sistema enzimático que se quería estudiar.

La purificación de la carboxi-liasa a partir de esta fuente y el estudio de sus características y propiedades a través de las reacciones secuenciales que cataliza, realizados en el presente trabajo de tesis, permitiría: a) encarar en el futuro estudios similares en casos humanos, normales y patológicos especialmente con relación a la porfiria eritropoyética congénita y b) aportar datos tendientes a elucidar el complejo mecanismo de descarboxilación en el que está involucrada.

N O T A : Este trabajo de tesis ha sido parcialmente publicado, según se detalla a continuación:

- . FEBS Letters, 5 (1969) 149-152
- . Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 353-363
- . Anales Asoc. Quím. Argentina, 60 (1972) 239-248
- . Biochim. Biophys. Acta, (1973) Aceptado para su public.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Drogas

El agua usada fue deionizada o, a veces, deionizada y destilada sobre vidrio.

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico. Algunas se debieron purificar en el laboratorio para que cumplieran con las exigencias del trabajo experimental, a saber:

. Acetato de sodio: Se recristalizó de agua caliente, con agregado de carbón activado.

. Oxido de magnesio: Se preparó el de grado III según Brockmann (83), por calentamiento a 37°C durante 1 día.

. Kerosene: Se lavó con agua, secó con CaCl_2 y bidestiló en columna, aislándose la fracción 210-240°C.

. Cloroformo: Se lavó con agua, secó con CaCl_2 y destiló, agregándole luego CH_3OH hasta 1% (v/v).

Técnicas

1) Cromatografía en papel de ésteres metálicos de porfirinas, según el método de Falk y Benson (84)

Las determinaciones cualitativas se hicieron sembrando en punto y las cuantitativas sembrando en bandas de aproximadamente 6 cm. Los materiales de siembra fueron soluciones clorofórmicas concentradas de ésteres metálicos de porfirinas. La cantidad sembrada en banda varió entre 2 y 5 nmoles. Es posible hacer la cromatografía con cantidades menores (hasta 1 nmol), pero la visualización de las diferentes bandas en que se distribuye este material es más difícil, y los errores experimentales son también mayores.

El revelado se realizó por observación a la luz ultravioleta. Las porfirinas fluorescen intensamente (color rojo) y esto de gran sensibilidad al método.

Para la cromatografía, que es ascendente, se usaron tiras de papel Whatman

Nº 1 de 20 cm de largo. El desarrollo se efectuó en forma sucesiva con dos solventes diferentes: 1) Kerosene - cloroformo (6 : 9)

2) Kerosene - dioxano (11 : 4 a 10 : 5)

La primera corrida se efectuó para eliminar impurezas contaminantes y porfirinas que hubieran quedado sin esterificar. Se desarrolló durante 10 minutos, se secó el papel y se cortó por encima de la línea de siembra. Luego se efectuó la segunda corrida, durante $2\frac{1}{2}$ -3 horas, siendo ésta la que realmente resuelve.

De esta manera se separaron en bandas o manchas sucesivas, desde el origen hacia arriba, los ésteres metílicos de las porfirinas de 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos, y también la protoporfirina éster, si fuera el caso. La visualización a la luz UV permite cortar las diferentes bandas y hacer una determinación cuantitativa luego de eluir con cloroformo y medir en espectrofotómetro.

2) Cromatografía en columna de ésteres metílicos de porfirinas

a) Adsorbente: CO_3Ca

Se empleó el método de Grinstein y col. (55). Las columnas se armaron compactas, con ayuda del vacío, y la corrida cromatográfica se hizo igualmente con succión en el extremo inferior de la columna. Antes de efectuar la siembra se pasó benceno de modo de mojar el tercio o mitad superior de la columna. Antes de que se secase la superficie donde se sembraría, se aplicó la muestra de porfirinas, guardada al estado de ésteres metílicos. Para ello se solubilizaron en benceno, previo agregado de gotas de cloroformo, lo cual es indispensable para lograr una completa disolución. El solvente de desarrollo consistió en mezclas de benceno-cloroformo en diferentes proporciones, que se fueron variando a medida que progresaba la cromatografía, de acuerdo a la separación que se obtenía, dentro del rango 9:1 a 7:3. Si la muestra a cromatografiar era rica en porfirinas de mayor número de carboxi-

los, las soluciones de desarrollo contenían ya desde el comienzo mayor proporción de cloroformo.

El desarrollo es tal que se logra una separación en bandas más o menos netas, que corresponden a los ésteres metálicos de las diferentes porfirinas. En orden desde el origen hacia abajo, éstas son: uroporfirina, firiaporfirina, porfirina hexacarboxílica, porfirina pentacarboxílica y coproporfirina.

Cada banda de los cromatogramas obtenidos se aisló, una vez extrudada la columna de CO_3Ca , por simple corte con bisturí. Esto es posible por ser coloreadas las bandas y por su fluorescencia. Se eluyeron luego las porfirinas de cada banda con cloroformo y se concentraron a presión reducida. Se sometió luego cada una de ellas al análisis cromatográfico en papel s/Falk y Benson (pág. 28). Este análisis reveló cuáles eran las porfirinas presentes en cada banda de la columna, y dio una idea aproximada de las cantidades relativas.

b) Adsorbente: OMg (85)

El armado de las columnas y el desarrollo de la cromatografía fue operativamente igual al caso del adsorbente CO_3Ca . La diferencia radicó, además del adsorbente, en los solventes empleados en las diferentes etapas y en los cromatogramas obtenidos. El solvente con que se mojó la parte superior de la columna antes de sembrar fue cloroformo libre de metanol (lavado con agua y secado con Cl_2Ca , filtrado y usado en el momento). Los solventes de desarrollo fueron mezclas de metanol 0,1-0,5% (v/v) en cloroformo.

El orden de las bandas correspondientes a los ésteres metálicos de las diferentes porfirinas es exactamente inverso al caso del adsorbente CO_3Ca . Aquí, a partir del origen, se presentan las bandas de los ésteres de la coproporfirina, pentacarboxiporfirina, hexacarboxiporfirina, firiaporfirina y uroporfirina. Esta cromatografía en OMg se usó sólo para separar pequeñas cantidades de ésteres de firiaporfirina y trazas de hexacarboxiporfirina de

cantidades relativamente mucho mayores de uroporfirina. Esta separación es a veces difícil usando CO_3Ca como adsorbente.

3) Obtención de porfirinas

a) A partir de orina de pacientes porfirícos (55):

La orina se llevó a pH=3-3,2 con ClH concentrado y se le agregó talco como adsorbente. Se agitó vigorosamente y luego se dejó reposar. Se filtró con succión y el talco con las porfirinas adsorbidas se suspendió en mezcla esterificante: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{SO}_4\text{H}_2$ 19:1 (v/v). Se filtró nuevamente por buchner, lavando el talco con mezcla esterificante hasta no observar más fluorescencia en el filtrado. Las porfirinas se dejaron esterificar 48 horas, extra-yéndolas luego con cloroformo previa neutralización con solución saturada de acetato de sodio. El extracto clorofórmico se concentró a presión reducida, hasta sequedad. En ese estado, se puede guardar la mezcla de porfirinas esterificadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento, destinado a separar entre sí los diferentes componentes. Esto se llevó a cabo mediante la realización consecutiva de cromatografías en columna de CO_3Ca . Cada una de las bandas obtenidas en las columnas se recromatografió, y este proceso se repitió hasta obtener porfirinas esterificadas que fueran homogéneas en cuanto a su comportamiento cromatográfico en papel s/Falk y Benson (pág. 28).

Para separar entre sí los ésteres de las uroporfirinas I y III, se utilizó la cromatografía en papel s/Falk y Benson, en escala preparativa, usando papel Whatman N° 3 MM.

b) A partir de orina de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno:

Se utilizó la orina de ratas con porfiria inducida por hexaclorobenceno (65). La droga se administró diariamente por sonda gástrica, en dosis de aproximadamente 1 mg/g de peso del animal, como suspensión acuosa. A los 2-4 meses de tratamiento las orinas mostraron una intensa fluorescencia ro

ja.

La orina se acidificó con HCl concentrado hasta pH=3-3,5. Luego se agregó resina de intercambio aniónico De Acidite FF/1P (7g/100 ml orina). La mezcla se agitó y la resina con las porfirinas libres combinadas se separó por filtración sobre placa filtrante, con vacío. Al filtrado se le agregó más resina y se repitieron las operaciones. El procedimiento se continuó hasta que en el filtrado no hubo, por observación espectroscópica, bandas de absorción en el visible características de las porfirinas. Las resinas se reunieron y se lavaron con agua destilada hasta que ésta saliera incolora (eliminación de pigmentos). La resina lavada se extrajo repetidamente con HCl 25% (p/v) hasta no observar más fluorescencia roja en la solución clorhídrica, a la luz UV. Esta solución ácida se llevó a pH=3-3,2 con NaOH concentrado, a fin de conseguir la precipitación de las porfirinas. Se dejó estar una noche a 3-4°C y el precipitado se filtró por papel. El papel con las porfirinas se secó en desecador y se efectuó la esterificación por inmersión en la mezcla $\text{CH}_3\text{OH}-\text{SO}_4\text{H}_2$ 19:1 (v/v).

A partir de este paso se continuó exactamente igual que en el método de obtención que utiliza la adsorción en talco, ya descrito en a.

Por los métodos a y b, arriba detallados, se obtuvieron los ésteres metílicos de las uroporfirinas I y III, la firriaporfirina III y la coproporfirina III.

Las porfirinas al estado libre se obtuvieron por hidrólisis ácida de los ésteres metílicos. El éster purificado se disolvió en el menor volumen posible de HCl 25% (p/v) y se dejó 24 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad. Luego se agregó cuidadosamente, a 0°C, NaOH concentrado. Al llegar a pH=3-3,2 precipita la porfirina libre. Se alcanza el punto justo cuando el líquido queda incoloro, lo cual es índice de que la gran mayoría de la porfirina que fue hidrolizada se ha insolubilizado. Se dejó toda la noche a 3-4°C y se centrifugó. Se separó el sobrenadante y el precipitado se lavó

con un pequeño volumen de agua llevada a pH=3 con HCl diluido. Finalmente se disolvió este precipitado en NaOH 25 mM, obteniéndose una solución cuya concentración se determinó espectrofotométricamente por medición de la absorbancia de una alícuota, diluida con HCl 25%.

4) Sustratos

Durante la primera etapa del estudio se usaron: ALA obtenido comercialmente de Sigma Chemical Co. y PBG cedido gentilmente por el Dr. H. Sanoovich, preparado según un método descripto (86). Con posterioridad, los sustratos de las reacciones enzimáticas fueron, en casi todos los casos, uroporfirinógeno III y firriaporfirinógeno III. Algunas veces se usó uroporfirinógeno I y coproporfirinógeno III. Todos ellos debieron obtenerse por reducción de las correspondientes porfirinas (porfirinas $\xrightarrow{(H)}$ porfirinógenos).

La solución de la porfirina, en NaOH 25 mM, se diluyó hasta tener una concentración 60-75 μ M. Luego se redujo con amalgama de sodio 3% recientemente preparada y molida antes de usar, de acuerdo a Mauzerall y Granick (25). Esta reducción se realizó bajo corriente de nitrógeno y su rendimiento fue de aproximadamente 90%. La solución de porfirinógeno obtenida se filtró por placa porosa y se ajustó el pH del filtrado a 7,0 con PO_4H_3 40% (p/v). Después de los estudios de requerimientos, el filtrado se recogió sobre glutation, de modo de tener una concentración final 5 mM del protector. La solución del porfirinógeno así obtenida se usa inmediatamente como sustrato de las reacciones enzimáticas. Una alícuota de esta solución, se acidifica con un exceso de HCl 5% y se deja reoxidar al aire hasta el día siguiente. Luego se lleva a volumen con HCl 5% y se determina la concentración espectrofotométricamente.

5) Determinaciones espectrofotométricas

Se hicieron determinaciones espectrofotométricas para evaluar concentraciones de porfirinas libres disueltas en HCl 5% y 25% y de sus ésteres metálicos disueltos en cloroformo. En todos los casos se midió la absorbancia a la longitud de onda correspondiente a la banda de Soret, especificada en el cuadro siguiente. Se usaron los coeficientes de extinción recíprocos dados por Salum y col. (87), los que se detallan a continuación.

$$K = \frac{1}{\epsilon} = \text{nmoles/ml}$$

Porfirina	Libre				Ester metálico	
	K HCl 25%	(nm)	K HCl 5%	(nm)	K Cl ₃ CH	(nm)
Proto (2 COOH)			3,637	407,5	5,864	407
Copro (4 COOH)			2,639	401	5,566	400
Penta (5 COOH)					5,308 ⁺	402
Hexa (6 COOH)					5,090 ⁺	403
Firia (7 COOH)	2,434	407	2,085	405	4,897	405
Uro (8 COOH)	2,580	410	2,280	406	4,460	406

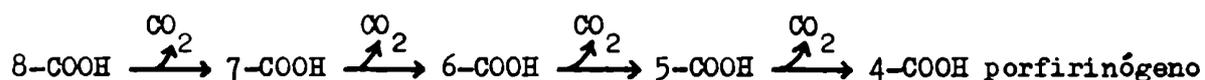
+ Los coeficientes de extinción recíprocos en cloroformo de los ésteres de las porfirinas penta- y hexacarboxílicas fueron interpolados entre los correspondientes a los ésteres de la firiaporfirina (7 COOH) y la coproporfirina (4 COOH), suponiendo una función lineal entre el número de carboxilos y el coeficiente de extinción recíproco (en $\mu\text{g/ml}$). Este procedimiento no puede provocar demasiado error pues la cantidad de porfirinas penta- y hexacarboxílicas siempre fue pequeña frente a las otras.

6) Valoración de las actividades enzimáticas

Teniendo en cuenta el camino biosintético mencionado en el esquema 1 (pág.

3), se puede efectuar la reacción de producción de los porfirinógenos de diferente número de carboxilos partiendo del sustrato sobre el cual actúa inicialmente la descarboxilasa, el uroporfirinógeno; o bien partiendo de ALA en los casos en que la preparación enzimática usada sea tal que contenga las enzimas ALA-dehidrasa y deaminasa-isomerasa en cantidad suficiente como para que las reacciones previas a la descarboxilación no sean limitantes.

Lo que se efectuó con más frecuencia fue la reacción:



Para evaluar la actividad enzimática descarboxilante se partió pues de un porfirinógeno y una vez finalizada la reacción, los productos y el sustrato remanente se oxidaron por acción del oxígeno del aire, favorecido esto por el medio ácido (HCl 5% p/v) usado para detener dicha reacción (25). O sea que la valoración de la actividad enzimática consiste en la determinación de las cantidades de las diferentes porfirinas producidas por oxidación. Una de ellas proviene del sustrato y las demás provienen de los productos de descarboxilación.

La mezcla de incubación usada con más frecuencia, salvo al comienzo del trabajo, contenía buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$ 67 mM (pH=7), GSH 1 mM, EDTA 0,1 mM, preparación enzimática y porfirinógeno 2,5-3,5 μM , en un volumen total de 4 ml. Lo estrictamente necesario para detectar la actividad es la preparación enzimática, el porfirinógeno y un buffer para mantener el pH en el rango deseado. Las reacciones se realizaron en general anaeróticamente, en tubos de Thunberg, a 37°C, en oscuridad y con agitación mecánica. Se detuvieron de dos maneras de acuerdo a la preparación enzimática utilizada:

a) Cuando se usó como preparación enzimática el sobrenadante de hemolizado de eritrocitos, se agregó al final de la incubación 5 volúmenes de una mezcla acetato de etilo-ácido acético 3:1 (v/v), con vigorosa agitación. Luego se dejó estar toda la noche y se filtró por papel, lavando el precipita-

do y el papel con porciones de la mezcla acetato de etilo-ácido acético 3:1. El filtrado se lavó dos veces con agua, para eliminar el acético. La mezcla de porfirinas libres, disueltas en acetato de etilo, se extrajo con HCl 5% (p/v). Esta extracción se repitió para que fuera cuantitativa. Se llegó pues a una solución en HCl 5% de la mezcla de porfirinas libres. El procedimiento descrito se realizó para evitar la presencia de hematina en el extracto clorhídrico. Las medidas espectrofotométricas en estos casos se corrigieron s/ Rimington y Sveinsson (88).

b) Cuando se usó como preparación enzimática cualquier solución proteica distinta de la mencionada en a), las incubaciones se detuvieron por adición de HCl concentrado hasta una concentración final de 5% (p/v). Luego se dejó estar 30 min. a 0°C. Se filtró por papel y se lavó el precipitado con HCl 5% hasta que no se observó más fluorescencia a la luz UV en el papel ni en el precipitado.

Con los extractos clorhídricos provenientes ya sea del método a) o del b) se siguió el mismo procedimiento. Este consistió en llevarlos a sequedad en desecador, al vacío. Luego se sometieron los residuos sólidos a esterificación con $\text{CH}_3\text{OH}-\text{SO}_4\text{H}_2$ 19:1 (v/v). Se dejaron 48 horas y se extrajeron las porfirinas esterificadas con cloroformo, previa neutralización con solución saturada de acetato de sodio. Los extractos clorofórmicos correspondientes a cada uno de los incubados se concentraron a presión reducida y se realizaron las cromatografías en papel s/ Falk y Benson (pág. 28).

Estas cromatografías permitieron determinar los porcentajes de las diferentes porfirinas presentes en la mezcla. Estas provienen de la oxidación de los porfirinógenos presentes al final de la incubación, de modo que el porcentaje molar de las porfirinas es el mismo que el de los porfirinógenos. Este porcentaje molar, aplicado al número total de nmoles de sustrato (que es el porfirinógeno de mayor número de carboxilos presente en la mezcla), da como resultado la cantidad de nmoles de sustrato remanente y la de cada uno de los productos de descarboxilación.

De acuerdo a las características de la reacción, que se describen en los resultados (pág. 70, 78), cuando se usa uroporfirinógeno como sustrato la actividad se puede expresar de dos maneras que involucran diferentes significados:

- 1) nmoles de firiaporfirinógeno + hexacarboxiporfirinógeno + pentacarboxiporfirinógeno + coproporfirinógeno (F+H+P+C) producidos por unidad de tiempo.
- 2) nmoles de coproporfirinógeno (C) producidos por unidad de tiempo.

Cuando el sustrato es firiaporfirinógeno, la actividad sólo se expresa de la segunda forma.

Los estudios de purificación se hicieron usando uroporfirinógeno como sustrato, y en ellos se expresó usualmente la actividad de la manera 1). En ese caso se define como unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de producir la descarboxilación de 1 nmol de uroporfirinógeno por hora. Se entiende por descarboxilación de éste a la eliminación de por lo menos un carboxilo, con lo cual deja de ser uroporfirinógeno.

7) Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron en general por el método de Lowry (89).

Para evaluar la concentración proteica de las fracciones eluidas de las columnas de DEAE-Celulosa se midió la absorbancia a 260 y 280 nm (90).

8) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las electroforesis en gel de poliacrilamida 5% se realizaron esencialmente mediante las técnicas de Raymond y Weintraub (91). Se usaron cilindros de gel de 0,7 x 12 cm, y las corridas se efectuaron en las siguientes condiciones:

- a) Con buffer tris-glicina 0,05 M, pH=8,3, durante 3-5 horas, a razón de 5-6 mA por tubo.

b) Con buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH=7,2, durante 6 horas y a 7 mA por tubo.

c) Igual que b) pero con dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% (92). En estos casos se hizo un tratamiento previo de la muestra a sembrar, con SDS 1% y β -mercaptoetanol 0,01M, a pH=7,5 y 40°C, durante 30 minutos. Luego se agregó iodoacetamida hasta 0,05 M y se dejó a temperatura ambiente 1 día, haciendo más denso el medio con glicerol, antes de sembrar en el gel.

Una vez hechas las corridas, los geles se extrudaron y se tiñeron por inmersión en Amido-Schwarz 0,25% en ácido acético 7%, durante 20 minutos, o en Coomassie Brilliant Blue 0,25% en metanol-acético-agua (5:1:5). Luego se los lavó repetidamente con acético 5% para eliminar el exceso de colorante.

En las condiciones de c), recién mencionadas, se hizo una curva de calibración de pesos moleculares, usando las siguientes proteínas como patrones: albúmina (68.000), catalasa (60.000), alcohol dehidrogenasa de levadura (37.000), hemoglobina (15.500), lisozima (14.300). Los valores entre paréntesis indican los correspondientes pesos moleculares de las proteínas, luego del tratamiento disociante mencionado en c).

R E S U L T A D O S

P U R I F I C A C I O N Y

C O N D I C I O N E S D E D E T E R M I N A C I O N

Purificación parcial de la enzima - I

Teniendo en cuenta que entre las enzimas "solubles" de glóbulos rojos correspondientes a la biosíntesis del hemo se encuentra la decarboxilasa (3,12,75), se partió de sobrenadantes de hemolizados de eritrocitos de pollo para su purificación.

Se usó sangre de pollo fresca, con heparina como anticoagulante. Por centrifugación a 1.000xg durante 15 minutos se separaron el plasma y los leucocitos de los eritrocitos. Las células se lavaron 3 veces por suspensión con NaCl 0,9% y centrifugación posterior, y finalmente se suspendieron en un volumen de agua fría. El hemolizado se obtuvo por dos congelamientos y descongelamientos sucesivos de la suspensión acuosa de glóbulos rojos, usando acetona-CO₂ como mezcla congelante. Luego se centrifugó a 35.000xg durante 60 minutos, y el sobrenadante se separó cuidadosamente para evitar contaminación con la fracción celular particulada, presente en el precipitado.

La proteína mayoritaria en este sobrenadante es la hemoglobina. Por consiguiente el primer objetivo fue tratar de eliminarla. Para ello se usó una modificación del método de Hennessey y col. (93). La separación se basa en el empleo de un intercambiador iónico (DEAE-Celulosa). A la DEAE-Celulosa se unen proteínas entre las cuales se cuentan la ALA dehidrasa, la PBG deaminasa-isomerasa, la decarboxilasa y una parte de la hemoglobina. Esta hemoglobina se elimina por lavado de la DEAE-Celulosa con un buffer de baja fuerza iónica. Luego se eluye el resto de las proteínas con uno de mayor fuerza iónica.

Se efectuaron ensayos previos para evaluar la cantidad de proteínas combinadas con la DEAE-Celulosa, sin determinar actividad enzimática. Se mezclaron

2,5 ml de sobrenadante de hemolizado con 2,5 ml de una suspensión de DEAE-Celulosa (8g/100 ml), se agitó 20 minutos y se centrifugó. Se descartó el sobrenadante y la DEAE-Celulosa, con las proteínas unidas, se sometió a una serie de eluciones con buffer fosfato de potasio 0,003 M pH=7,4, hasta obtener, luego de centrifugación, un sobrenadante incoloro. Esto indica ausencia de hemoglobina.

A la DEAE-Celulosa así liberada de hemoglobina se la trató en forma sucesiva (elución en tandas) con buffer fosfato de potasio 0,134 M pH=7,4 (Tabla N° 1).

TABLA N° 1

Elución de proteínas de DEAE-Celulosa, en tanda

Eluído N°	Volumen (ml)	Tiempo de elución (min)	Proteínas eluídas	
			mg/ml	mg
1	5,5	20	1,44	7,9
2	2,8	10	0,84	2,4
3	2,8	10	0,71	2,0
4	2,8	10	0,49	1,4

Se ve que la mayor parte de las proteínas se deadsorbe con el primer eluído.

Se efectuó una experiencia básicamente igual pero midiendo actividades enzimáticas (Tabla N° 2). La adsorción de las proteínas se hizo mezclando 5 ml de sobrenadante de hemolizado con 5 ml de suspensión de DEAE-Celulosa. Los eluídos en tanda con el buffer fosfato de potasio 0,134 M pH=7,4 se hicieron con mayores volúmenes que en el caso anterior. Como sustrato se usó ALA

en exceso, y se midió la cantidad total de porfirinas formadas y su distribución según el número de carboxilos. Las condiciones de incubación todavía no habían sido investigadas y se contemplaron los requerimientos de las enzimas ALA dehidrasa y PBG deaminasa-isomerasa, ya que el ensayo dependía de sus actividades.

La cantidad total de porfirinógenos (U+F+H+P+C) formados por el sobrenadante de hemolizado fue aproximadamente la misma que cuando se usaron como fuente de enzima los eluidos de DEAE-Celulosa. Por consiguiente, la relación entre las cantidades de ALA dehidrasa y PBG deaminasa-isomerasa, responsables de la formación del uroporfirinógeno que luego se descarboxila, no varía fundamentalmente en los eluidos de la DEAE-Celulosa con respecto al sobrenadante de hemolizado. Además, la acumulación relativa de uroporfirinógeno (diferencia entre los porfirinógenos totales formados y los descarboxilados, Tabla N° 2), observada en todos los casos permite suponer que la ALA dehidrasa y la PBG deaminasa-isomerasa no fueron limitantes. La mayor parte de la actividad descarboxilante, expresada de cualquiera de las dos diferentes maneras (pág. 37), se observó principalmente en el primer eluido de la DEAE-Celulosa. En base a los resultados expuestos se dedujo la conveniencia de realizar la elución de la descarboxilasa de la resina en una sola tanda, con un mayor volumen de buffer fosfato de potasio 0,134 M, durante más tiempo y con agitación constante.

En general, por cada 0,4 g de DEAE-Celulosa se usaron 25 ml del buffer para eluir la descarboxilasa, agitando magnéticamente durante 45 minutos.

Condiciones de incubación - I

Antes de proseguir el estudio fue imprescindible investigar las condiciones de incubación para lograr una mayor actividad descarboxilante. Estas condiciones sufrieron ajustes más adelante.

Se estudió la influencia de la aerobiosis y de la anaerobiosis sobre la des

TABLA N° 2

Elución de la porfirinógeno decarboxilasa de DEAE-Celulosa en tanda

Las incubaciones se realizaron durante dos horas, a 37°C, en aerobiosis y oscuridad, con 15 µmoles de ALA como sustrato y buffer PO₄H₂K-PO₄HK₂ 67 mM (pH=7,0), KCl 15 mM, MgCl₂ 3 mM, cisteína 5 mM. Como fuente de enzimas se colocó en cada caso una fracción del correspondiente eluido de la DEAE-Celulosa, o bien una fracción del sobrenadante de hemolizado.

Fuente de enzimas	Volumen (ml)	Tiempo de elución (min)	Porfirinógenos totales formados (U+F+H+P+C) (nmoles)	Porfirinógenos descarboxilados (nmoles)		Proteínas totales (mg)	Actividad específica +
				(F+H+P+C)	(C)		
Sobrenadante de hemolizado	5	-	302	219	106	1.385	0,16
Eluido N° 1	10	30	227	138	57	10,5	6,6
" N° 2	5	10	60	24	7	4,0	3,0
N° 3	5	10	28	14	5	2,9	2,4
N° 4	5	10	12	0	0	1,7	0
" N° 5	5	10	3	0	0	0,9	0

+ Actividad específica: nmoles de UPG descarboxilado por hora y por mg de proteína

carboxilación, utilizando distintos sustratos y preparaciones enzimáticas (Tabla N° 3). En todos los casos se observó que hay una mayor descarboxilación en condiciones anaeróbicas, expresando los resultados ya sea como nmoles de uroporfirinógeno descarboxilado (nmoles de FPG + HPG + PPG + CPG formados) o bien como nmoles de coproporfirinógeno formados. Cuando se usó ALA como sustrato se utilizaron distintas preparaciones enzimáticas, que representan diferentes estados de pureza. Cuando se usó uroporfirinógeno III como sustrato, se utilizó una misma preparación enzimática y se efectuaron los ensayos con y sin $MgCl_2$ en el sistema de incubación. El ion Mg^{2+} no influye sobre el efecto positivo de la anaerobiosis. Dicho catión se necesita para la formación de uroporfirinógeno a partir de ALA, pero cuando se parte directamente del porfirinógeno como sustrato, aparentemente no hace falta.

Otro requerimiento para la conversión de ALA en PBG y por ende en uroporfirinógeno es el de los compuestos sulfhidrúlicos, de allí que se usara cisteína en los ensayos. Se trató de averiguar si este requerimiento era válido para la descarboxilación (Tabla N° 4). Se comprobó que la cisteína no sólo no es necesaria, sino que inhibe considerablemente la descarboxilación, ya sea en presencia o en ausencia de $MgCl_2$. Además se vió que el EDTA activa al go el proceso enzimático y revierte la inhibición producida por la cisteína o bien impide que ésta actúe.

Purificación de la enzima - II

La purificación obtenida mediante el intercambio iónico con DEAE-Celulosa, eluyendo las proteínas activas en una sola tanda, fue importante. Los resultados obtenidos se esquematizan en la tabla N° 5.

En el experimento N° 1 se usó ALA como sustrato, aprovechando la presencia de las enzimas ALA dehidrasa y PBG deaminasa-isomerasa. Con un exceso de ALA se formó una cantidad considerable de porfirinógenos. Cuando la preparación enzimática fue un eluido de DEAE-Celulosa, esta cantidad llegó al 81% de la

TABLA N° 3

Descarboxilación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

Preparación enzimática	Proteínas (mg/ml)	Sustrato	Sistema de incubación	Porfirinógenos totales (nmoles) (U+F+H+P+C)	Porfirinógenos descarboxilados (nmoles)	
					(F+H+P+C)	(C)
Eluío de DEAE-Celulosa en tanda	0,35	ALA 0,5 mM	Completo+KCl 15 mM Anaeróbico	39	21,4	10,5
			Completo+KCl 15 mM Aeróbico	44	15,4	4,4
Ppdo. 0-60% sat. de SO ₄ (NH) ₂ del eluío de DEAE-Celulosa en tanda. Desalado por pasaje por Sephadex G-25	0,60	ALA 1,25 mM	Completo+KCl 15 mM Anaeróbico	15,4	8,0	3,8
			Completo+KCl 15 mM Aeróbico	17,7	5,3	1,4
Ppdo. 40-60% sat. de SO ₄ (NH) ₂ del eluío de DEAE-Celulosa en tanda, dializado con tra buffer fosfato de potasio 0,134 M pH=7,4	2,2	ALA 1,25 mM	Completo+KCl 15 mM Anaeróbico	16,9	10,5	6,4
			Completo+KCl 15 mM Aeróbico	13,2	4,0	0,9
Eluío de DEAE-Celulosa en tanda	0,32	UPG III 5 μM	Completo Anaeróbico	40	24,0	5,6
			Completo Aeróbico	40	22,8	4,0
			Completo-MgCl ₂ Anaeróbico	40	26,0	6,8
			Completo-MgCl ₂ Aeróbico	40	22,8	3,2

Las incubaciones se realizaron durante 2 horas, a 37°C y en oscuridad. Las anaeróbicas se efectuaron en tubos de Thunberg, al vacío. El sistema completo contenía buffer PO₄H₂K-PO₄HK₂ 67 mM (pH=7,0), MgCl₂ 3 mM y cisteína 5 mM. El sustrato se indica en cada caso, como así también la preparación enzimática utilizada.

TABLA N° 4

Requerimientos para la descarboxilación enzimática - I

El sistema de incubación normal contenía buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$ 67 mM (pH=7,0), UPG III en concentración 4,4 μM en el experimento N° 1 y 5 μM en el experimento N° 2, y preparación enzimática (eluido de DEAE-Celulosa en tanda), en ambos experimentos en concentración de 0,36 mg por mililitro.

Condiciones: Tiempo, 2 horas. Temperatura, 37°C. Anaerobiosis. Oscuridad.

Exp. N°	Adiciones	Porfirinógenos descarboxilados (nmoles)	
		(F+H+P+C)	(C)
1	MgCl ₂ 3 mM Cisteína 5 mM	12,9	1,7
	MgCl ₂ 3 mM	16,8	5,3
	Cisteína 5 mM	11,6	1,1
2	Ninguna	31,6	15,6
	Cisteína 5 mM	26,0	6,8
	EDTA 0,1 mM	34,0	18,0
	Cisteína 5 mM EDTA 0,1 mM	31,6	17,2

TABLA N° 5

Purificación por intercambio iónico sobre DEAE-Celulosa, en tanda

Las incubaciones se realizaron en medio buffer PO₄H₂K-PO₄HK₂ 67 mM (pH=7,0), durante 2 horas, a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad.

1 = (F+H+P+C) 2 = (C)

Exp. N°	Sustrato	Adiciones	Preparación enzimática	Proteínas (mg/ml)	Porfirinógenos totales (nmoles)	Actividad total (a)		Prot. totales (mg)	Actividad específica (b)		Rendimiento (%)		Purificación	
						1	2		1	2	1	2	1	2
1	ALA 500 μM	Cisteína 5 mM MgCl ₂ 3 mM KCl 15 mM	Sobrenadante de hemolizado Eluido de DEAE-Celulosa en tanda	124	298	110	68	1.240	0,089	0,055	100	100	1	1
						67	33		17	3,95	1,94	61	49	44
2	UPG III 3,5 μM	EDTA 0,17 mM	Sobrenadante de hemolizado Eluido de DEAE-Celulosa en tanda	26,3	21	74	37	1.580	0,047	0,023	100	100	1	1
						41	12		15	2,73	0,80	55	32	58
	FPG III 2,5 μM	EDTA 0,17 mM	Eluido de DEAE-Celulosa en tanda	0,38	15	--	18,5	15	--	1,14	--	--	--	

(a) = nmoles/hora

(b) = nmoles/horaxmg

cantidad de porfirinógenos formados cuando se usó un sobrenadante de hemolizado como fuente de enzimas. Esto confirma (pág. 41) que el proceso de intercambio iónico que lleva a la purificación de la decarboxilasa no altera la relación de las enzimas antes mencionadas. Teniendo en cuenta la purificación lograda, el rendimiento se puede considerar bueno. Los valores de purificación y rendimiento no difieren mucho en función de la manera de expresar la actividad, pero siempre son menores al expresarla como aparición del producto final.

En el experimento N° 2 se usaron dos sustratos diferentes. Con uroporfirinógeno se observa también una purificación y un rendimiento debidos al intercambio iónico que son comparables con los obtenidos en el experimento N° 1. Sus valores, calculados según la segunda manera de expresar la actividad, o sea la aparición del producto final (CPG), son bastante menores que los calculados según la primera manera, o sea desaparición del uroporfirinógeno.

Los datos que se obtienen usando firiaporfirinógeno como sustrato, expresados sólo de la segunda manera, indican una actividad total y específica mayores que las calculadas también de la segunda forma cuando el sustrato era uroporfirinógeno. Como las incubaciones se hicieron en las mismas condiciones, con excepción del sustrato, se deduce que la descarboxilación del firiaporfirinógeno probablemente se estaba haciendo en condiciones más alejadas de la saturación cuando el sustrato era uroporfirinógeno que cuando se empleaba firiaporfirinógeno. La concentración de este último usada fue mayor que la que se acumula normalmente cuando se parte de uroporfirinógeno.

Para proseguir la purificación más allá del eluido de DEAE-Celulosa en tanta fue necesario concentrar la solución proteica. Esto se realizó por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido, el cual se agregó lentamente al eluido de DEAE-Celulosa, a 0°C, hasta llegar al % de saturación deseado. El pH se fue ajustando a 7,0 con KOH 2 N, durante el curso de la precipitación. Una vez agregado todo el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, se dejó estar la suspensión 30 minutos y luego

TABLA N° 6

Rangos de precipitación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,4 mM, UPG III 12 μM y preparación enzimática en concentraciones variables.

Rango de precipitación (% sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$)	Proteínas (mg/ml)	Actividad total (nmoles/hora)		Activ. específica (nmoles/hora \times mg)	
		(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
0-20	0,8	0	0	0	0
20-45	4,1	48	12	0,8	0,2
45-60	0,7	52	10	3,1	0,6
60-75	0,9	20	3	1,7	0,3
75-85	0,15	0	0	0	0

se centrifugó a 20.000xg, 15 minutos.

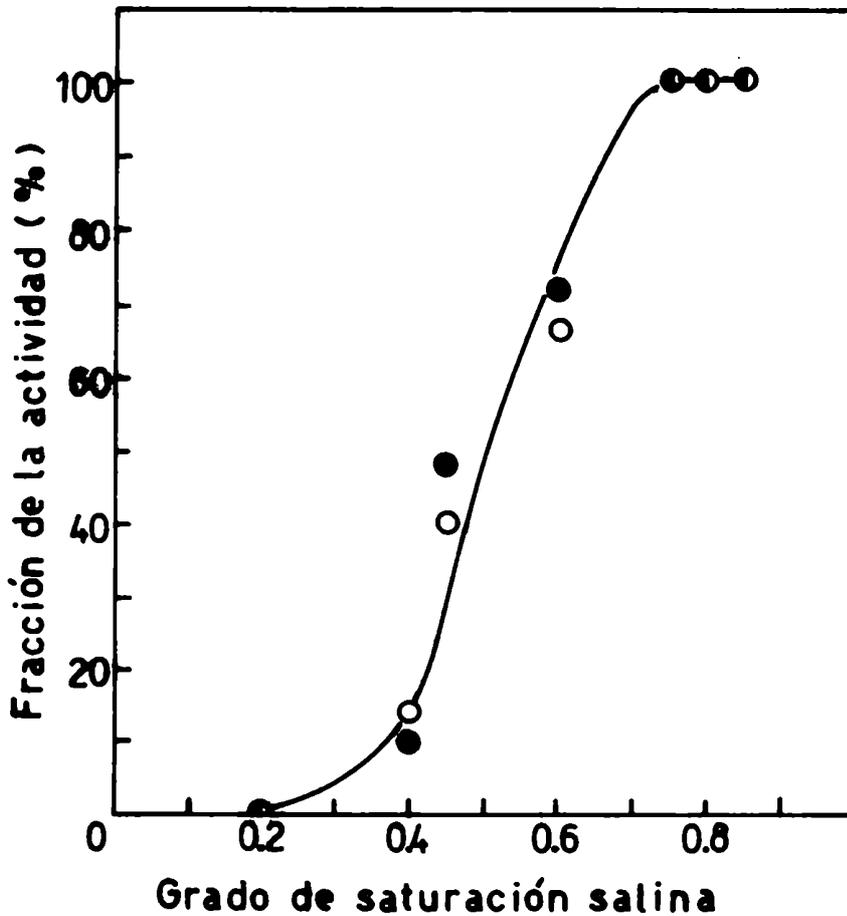
Para encontrar el rango de saturación en el que precipita la decarboxilasa se efectuaron precipitaciones sucesivas, abarcando rangos más o menos pequeños. Los respectivos precipitados se disolvieron en buffer fosfato de potasio 0,134 M y se dializaron toda la noche contra el mismo buffer, antes de ensayar sus actividades. De los resultados que figuran en la Figura N° 1 se deduce que hasta el 40% de saturación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ no precipita casi nada de decarboxilasa y por encima del 75% tampoco. Los datos de la tabla N° 6 ilustran un experimento de precipitación en etapas. La fracción que precipitó entre 20 y 45% de saturación tuvo una baja actividad específica frente a las otras dos fracciones activas: 45-60 y 60-75%.

Contrariamente a lo esperado, prácticamente no hubo purificación enzimática

FIGURA N° 1

Precipitación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,4 mM, UPG III 12-14 μM y preparación enzimática correspondiente a los precipitados por sulfato de amonio (diferentes rangos), en concentraciones finales de 1 a 4 mg/ml. Los resultados graficados son el promedio de dos experimentos. Se representa la fracción de la actividad total (%), expresada como nmoles/hora de F+H+P+C (○—○) o C (●—●), que precipita a medida que aumenta el grado de saturación salina.



en ninguno de los rangos. Esto significa que se produjo inactivación, ya que la determinación de la actividad de la enzima fue hecha siempre en las mismas condiciones. Es probable que la inactivación se haya producido en la etapa de diálisis, previa a dicha determinación, debido a su prolongada duración.

En todo el trabajo posterior a estos experimentos se usó el rango 40-75% de saturación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ para precipitar proteínas, como método de concentración. Para evitar la probable inactivación se acortó la duración de la diálisis e inclusive se suprimió, planteando esto último la posibilidad de que el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ que queda impregnando las proteínas precipitadas ejerciera algún efecto. Los resultados obtenidos (Tabla N° 7) fueron variables. En algunos casos se logró purificación (exp. 1 y 4) y en otros se produjo inactivación (exp. 2 y 3), tanto ensayando la actividad de los precipitados disueltos y dializados como la de los sin dializar.

Condiciones de incubación - II

Se trató de averiguar los posibles requerimientos de compuestos sulfhidrúlicos. Al comienzo del trabajo, cuando el sustrato utilizado era ALA, se usaba habitualmente cisteína 5 mM en el medio de incubación. Más tarde se comprobó (Tabla N° 4) que la cisteína tiene acción inhibitoria sobre la descarboxilación y por eso se suprimió de la mezcla de reacción. Cuando se investigó el efecto de otros compuestos, glutatión reducido y tioglicolato, tomando como referencia la actividad determinada en ausencia de compuestos sulfhidrúlicos, se vió (Tabla N° 8) que tanto el GSH como el tioglicolato tienen efecto activador. Se confirmó además la inhibición producida por la cisteína.

También se estudió el efecto del β -mercaptoetanol (Tabla N° 9) con referencia al del GSH. La actividad determinada en presencia de β -mercaptoetanol siempre resultó menor que la determinada en presencia de GSH.

TABLA N° 7

Purificación por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Las reacciones se llevaron a cabo en buffer fosfato de potasio 67 mM, pH=7,0 y EDTA 0,1 mM, a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad. Tiempo: 2 horas en los exp. 1, 2 y 3 y 45 minutos en el exp. 4. Las concentraciones de sustrato se indican en cada caso. Las preparaciones enzimáticas usadas correspondían a las siguientes etapas de purificación: 1- Eluido de DEAE-Celulosa en tanga; 2- Ppdo. 40-75% de saturación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$; 3- Ppdo. 40-75% de saturación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, dializado contra buffer fosfato de potasio 3 mM durante 3 horas.

Exp. N°	Conc. de UPG III (μM)	Adiciones	Etapa de purificación	Proteínas (mg/ml)	Activ. específicas (nmoles/horaxmg)		Purificación	
					(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
1	4,2	—	1	0,32	3,7	1,5	1	1
			2	0,34	5,8	2,6	1,57	1,73
2	2,5	—	1	0,18	4,7	1,8	1	1
			2	0,21	3,4	0,9	0,72	0,50
3	3,0	GSE 1 mM	1	0,17	7,2	4,3	1	1
			2	0,27	5,1	4,1	0,71	0,95
			3	0,26	5,1	3,6	0,71	0,84
4	2,5	GSE 1 mM	1	0,17	9,6	3,4	1	1
			3	0,03	26,8	6,7	2,80	1,97

TABLA N° 8

Requerimientos para la descarboxilación enzimática - II

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad. La mezcla contenía buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, UPG III 2,5 µM, preparación enzimática (ppdo. 40-75% de saturación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) 0,21 mg/ml y compuestos sulfhidríficos según se detallan.

Compuesto Sulfhidrífico agregado	Actividad (nmoles/hora)		Actividad relativa	
	(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
—	2,9	0,8	100	100
GSH 1 mM	3,5	1,5	121	188
Cisteína 1 mM	1,5	0,4	52	50
Tioglicolato 1 mM	3,3	1,4	114	175

Por estos motivos se descartaron la cisteína y el β -mercaptoetanol; y en lo sucesivo se usó GSH en la mezcla de reacción.

Estabilidad de la enzima

Se estudió la estabilidad de la enzima en dos etapas diferentes de su purificación (Tabla N° 10). El eluido de DEAE-Celulosa en tanda que es una solución proteica de concentración alrededor de 0,8 mg/ml, pierde parte de su actividad cuando se lo guarda a -10°C. Esto puede deberse a que siendo una solución relativamente diluída, ocurriría desnaturalización en el proceso de congelamiento y descongelamiento.

En cambio, si se guarda a -10°C el precipitado 40-75% de saturación por sul

TABLA N° 9

Requerimientos para la descarboxilación enzimática - III

Las mezclas de incubación contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, UPG III 2,3 μ M en el exp. 1 y 2,9 μ M en el exp. 2, preparación enzimática (ppdo. 40-75% sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) 0,12 mg/ml en el exp. 1 y 0,08 mg/ml en el exp. 2 y compuestos sulfhidrúlicos según se indica.
 Temperatura: 37°C. Tiempo: 2 horas. Anaerobiosis. Oscuridad

Exp. N°	Compuesto Sulfhidrúlico agregado	Actividad (nmoles/hora)		Actividad relativa	
		(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
1	GSH 1 mM	3,6	2,2	100	100
	β -Mercaptoetanol 1 mM	2,5	0,8	69	36
	β -Mercaptoetanol 5 mM	2,5	0,8	69	36
2	GSH 1 mM	4,7	3	100	100
	β -Mercaptoetanol 1 mM	3,9	1,6	83	53

TABLA N° 10

Estabilidad de la enzima a -10°C

Condiciones de incubación: buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, y UPG III y preparación enzimática según se indica.
 Temperatura 37°C. Tiempo: 2 horas. Anaerobiosis. Oscuridad.

Exp. N°	Preparación enzimática	Tiempo a -10°C (días)	Proteínas (mg/ml)	Conc. de UPG III (µM)	Actividad específica (nmoles/horaxmg)		% de la actividad original	
					(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
1	Eluido de DEAE-Celulosa en tanda	0	0,21	4,2	5,3	1,2	100	100
		14	0,21	4,5	4,4	0,8	83	67
2	Precipitado 40-75% de saturación por SO ₄ (NH ₄) ₂	0	0,21	2,5	4,1	1,7	100	100
		7	0,22	2,5	3,7	1,4	90	82
		21	0,21	2,7	3,6	1,2	88	71

TABLA N° 11

Requerimientos para la descarboxilación enzimática - IV

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas contenían EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,5 µM, preparación enzimática (ppdo. 40-75% sat. por sulfato de amonio) 0,22 mg/ml y buffer fosfato de potasio 67 mM, de diferente pH en cada caso.

pH	Actividad (nmoles/hora)	
	(F+H+P+C)	(C)
6,5	2,7	1,1
6,8	3,1	1,2
7,1	3,2	1,2
7,4	2,9	1,1
7,7	2,6	0,9

fato de amonio, mantiene bastante bien su actividad. En una semana hay poca inactivación, en tres semanas ésta ya es más notoria.

Condiciones de incubación - III

En cuanto al pH óptimo para la descarboxilación, se vio (Tabla N° 11) que prácticamente entre 6,8 y 7,4 no hay mayores variaciones en la actividad, la cual disminuye algo cuando se baja o se sube por sobre dichos valores límites.

El estudio de la acción del fosfato de piridoxal como probable coenzima dio resultados negativos (Tabla N° 12). No hubo ningún aumento significativo, dentro de los errores experimentales, en la actividad descarboxilante.

También se hizo un estudio de los productos de descarboxilación formados en

TABLA N° 12

Requerimientos para la descarboxilación enzimática - V

Las incubaciones se realizaron a 37°C, 30 minutos, en anaerobiosis y oscuridad, y contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, preparación enzimática (ppdo. 40-75% sat. por sulfato de amonio) 0,10 mg/ml, UPG III 2,8 μ M y fosfato de piridoxal según se indica.

Fosfato de piridoxal (mM)	Actividad (nmoles/hora)	
	(F+H+P+C)	(C)
0	13,2	4,2
0,050	12,8	3,7
0,125	13,3	5,2

un tiempo fijo, en función de la concentración de uroporfirinógeno (Figura N° 2).

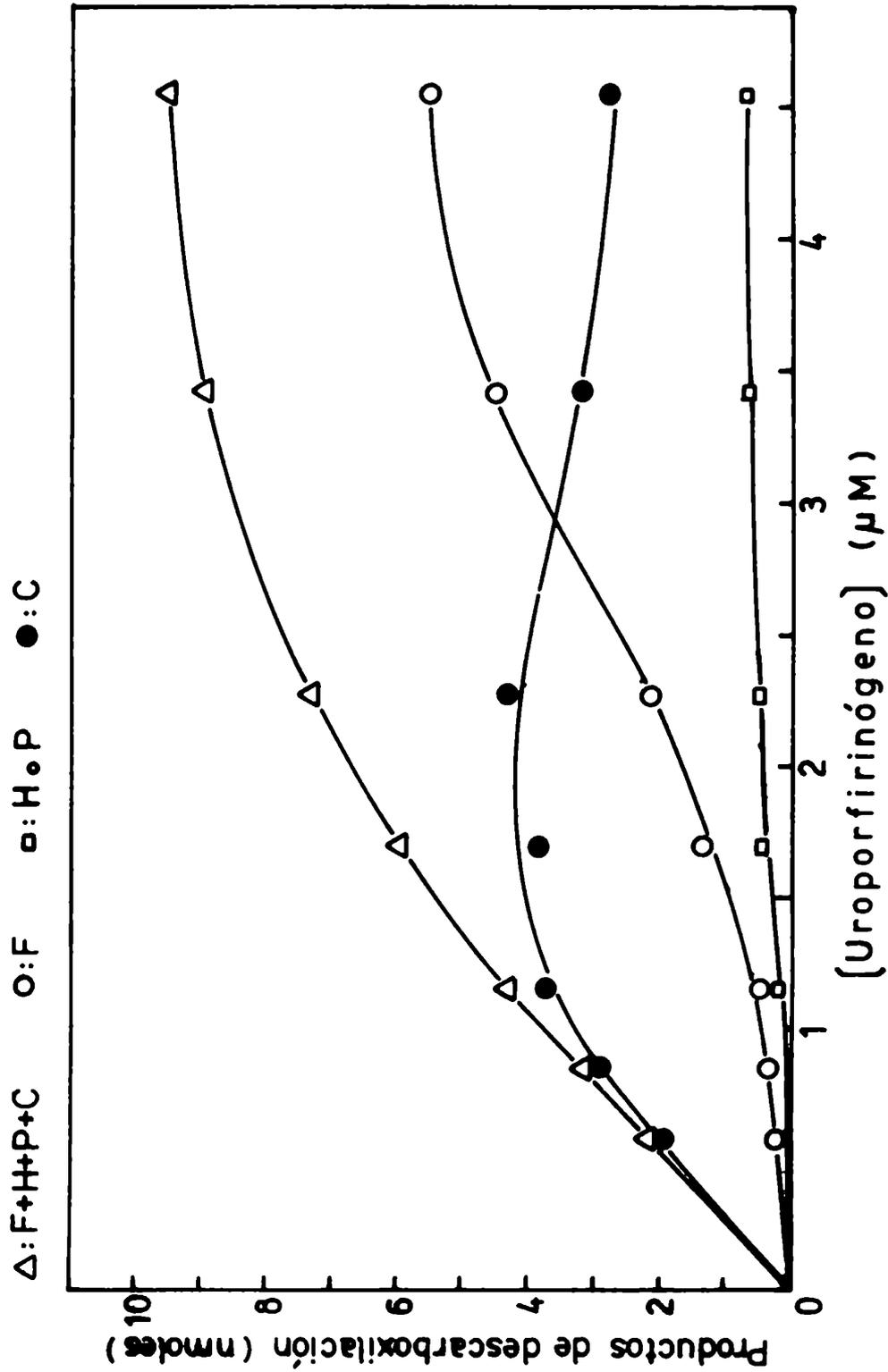
Se observa que la desaparición del sustrato (F+H+P+C), describe una curva como las de saturación de enzima por sustrato. No es exactamente una curva de ese tipo pues los valores correspondientes a las menores concentraciones de sustrato muy probablemente son menores que los valores de velocidades iniciales, que deberían graficarse para tener una correcta curva de saturación.

A mayores concentraciones de sustrato los valores pueden acercarse bastante a las velocidades iniciales, por lo que se puede decir que en cuanto a la desaparición del uroporfirinógeno (eliminación del primer carboxilo), a proximadamente a concentraciones mayores que 3 μ M hay saturación de la en-

FIGURA N° 2

Productos de descarboxilación en función de la concentración de sustrato

Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, preparación enzimática (ppdo. 40-75% sat. por SO₄(NH₄)₂) 0,12 mg/ml y concentraciones variables de uroporfirinógeno III. Tiempo de incubación: 2 horas



zima o se está cerca de ese estado.

La curva del primer intermediario de descarboxilación, el firiaporfirinógeno, es sigmoidea, y la cantidad acumulada es siempre mayor que la de los otros dos intermediarios (porfirinógenos de 5 y 6 carboxilos), cuyo nivel se mantiene bajo aun a concentraciones elevadas de sustrato. Esta mayor acumulación del firiaporfirinógeno parece alcanzar un máximo a las concentraciones más altas de sustrato utilizadas.

El producto final, coproporfirinógeno, presenta un máximo de formación a una concentración de sustrato de alrededor de 2 μM , bajando luego significativamente los valores.

Purificación de la enzima - III

A fin de proseguir la purificación enzimática se ensayó una cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Celulosa. Según se ve en la figura N° 3, se obtuvieron en esa oportunidad dos picos de proteínas. La actividad descarboxilante estuvo asociada principalmente al primer pico. Con respecto a las actividades específicas, no se consiguió purificación, sino que más bien hubo inactivación.

Se debe tener en cuenta que los dos picos de la columna de la figura N° 3 representan aproximadamente el 40% de las proteínas sembradas, el resto no fue eluído con las fuerzas iónicas usadas. Como la actividad descarboxilante está asociada en su mayoría al primer pico y éste representa un 30% del material sembrado, debiera haberse obtenido una purificación mucho mayor de no haberse producido inactivación de la enzima.

Se intentó reducir dicha inactivación reproduciendo la cromatografía en columna con GSH 1 mM como protector, y al mismo tiempo se modificó en parte el gradiente de elución discontinuo reduciendo el número de sus pasos. Se obtuvieron así 3 picos (o sea uno más que en la figura N° 3), que representan el 80% de las proteínas sembradas. La actividad descarboxilante coincide con el pri-

FIGURA N° 3

Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa-I

La columna de DEAE-Celulosa (0,83 meq/g) tenía 20 cm de largo y 1,6 cm² de sección y fue equilibrada con buffer fosfato de potasio 3 mM (pH=7). Las proteínas sembradas fueron las correspondientes al ppdo. 40-75% de saturación por SO₄(NH₄)₂, disueltas y dializadas contra el buffer 3 mM durante 3 horas. Una vez efectuada la siembra se pasó buffer 3 mM y luego un gradiente discontinuo de KCl, cuyas concentraciones se indican, disuelto en el mismo buffer. El flujo de la columna se mantuvo alrededor de 1 ml/min mediante la aplicación de presión sobre la parte superior. La concentración proteica de las fracciones se evaluó espectrofotométricamente en forma directa. La actividad se determinó en las siguientes condiciones: Buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,8 μM. Tiempo: 2 horas. Temperatura: 37°C. Anaerobiosis. Oscuridad.

La actividad específica (nmoles/horaxmg) se encuentra graficada según sus dos expresiones:

- △—△ uroporfirinógeno desaparecido
- coproporfirinógeno formado

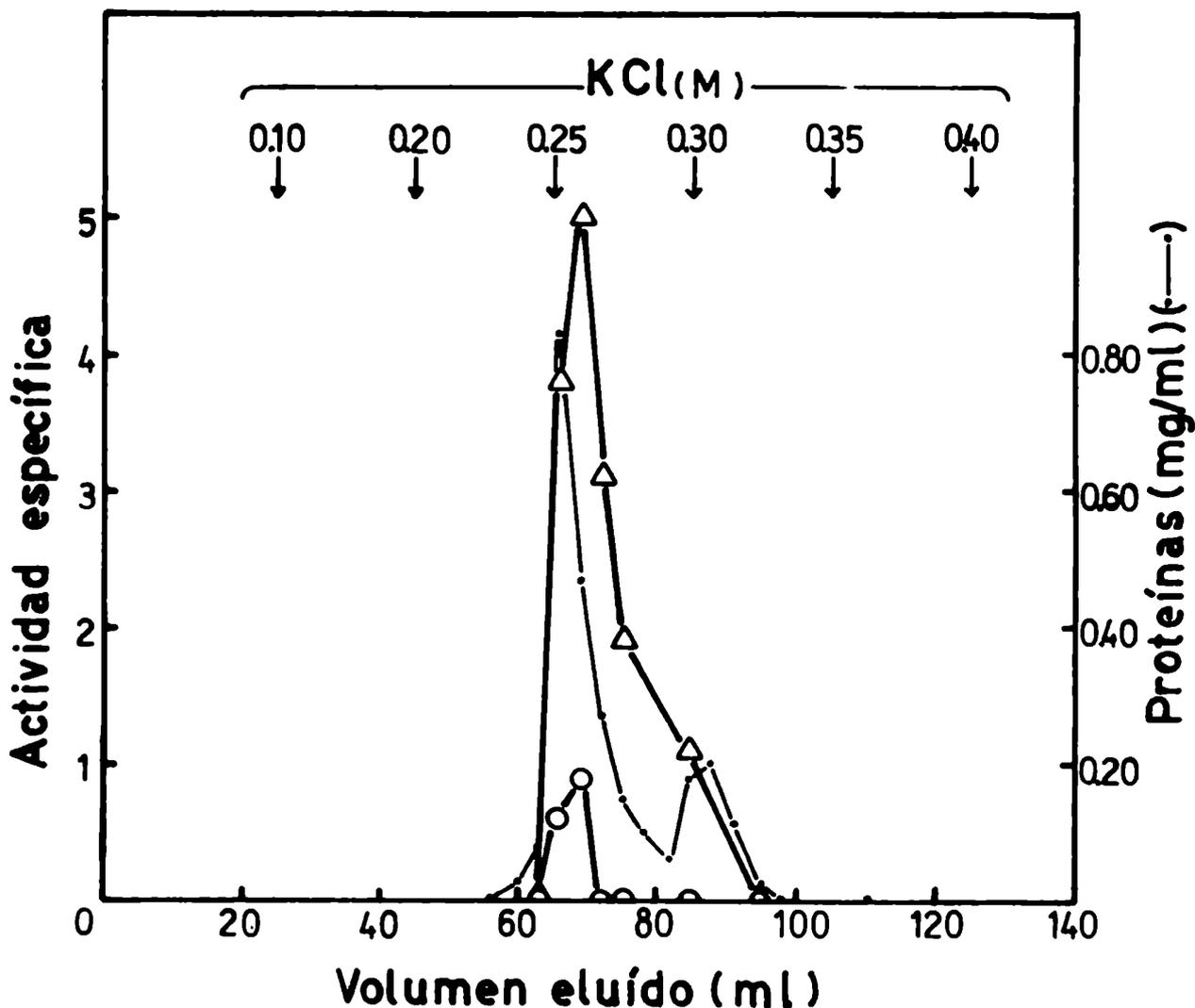


TABLA N° 13

Purificación mediante columna de DEAE-Celulosa - I

La columna de DEAE-Celulosa se realizó de manera similar a la de la Figura N° 3, constando el gradiente de las siguientes concentraciones molares de KCl: 0,10, 0,20, 0,25 y 0,30. Todas las soluciones contenían GSH 1 mM. Tanto en el material de siembra como en las fracciones eluidas de la columna, las actividades se determinaron en buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM y UPG III 3 μ M, durante 2 horas, a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad.

Preparación enzimática	Proteínas totales (mg)	Actividad total (nmoles/hora)		Act. específica (nmoles/hora \times mg)		Rendimiento (%)		Purificación	
		(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
Ppdo.40-75% de sat. por SO ₄ (NH ₄) ₂ dializado contra buffer fosfato de K 3 mM.	73	373	260	5,1	3,6	100	100	1	1
Eluido total de columna de DEAE-Celulosa con actividad descarboxilante.	18,3	167	107	9,1	5,9	45	41	1,8	1,6
Máximo del pico de actividad de la columna de DEAE-Cel.	8,7	106	84	12,2	9,7	28	32	2,4	2,7

mero de los picos y su valor específico (Tabla N° 13) indica que se consiguió una purificación de la enzima, habiéndose evitado por lo menos parcialmente su inactivación.

En la Tabla N° 14 se encuentran esquematizados todos los pasos de la purificación, que ya han sido discutidos individualmente. El cuadro corresponde a un experimento al cual pertenece la cromatografía en columna de DEAE-Celulosa de la Figura N° 4. La etapa N°2 produce la purificación más notoria, hallazgo esperable por cuanto la hemoglobina que se elimina es la proteína preponderante. La precipitación por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (etapa N° 3) no provocó aumento de la actividad específica en esta oportunidad. En cambio hubo un aumento apreciable debido a la cromatografía en columna de DEAE-Celulosa (etapa N° 4 y 4'). Teniendo en cuenta la purificación total obtenida, el rendimiento final puede considerarse bueno.

Con el objeto de establecer el grado de pureza alcanzado se realizaron ensayos para detectar la posible presencia de otras enzimas "solubles" del camino metabólico de las porfirinas que actúan en etapas vecinas a la descarboxilación. Se midió la actividad de ALA dehidrasa (94) de los picos 1 y 2 de la columna de DEAE-Celulosa que se representa en la Figura N° 4. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1 hora y la mezcla de reacción contenía buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), cisteína 10 mM, ALA 5 mM y proteínas provenientes del pico N° 1 (0,22 mg/ml) o del pico N° 2 (0,28 mg/ml). Las reacciones se detuvieron por agregado de 0,1 ml de solución saturada de sulfato de cobre. Luego se centrifugó y se determinó la cantidad de PBG formado por el procedimiento de Gibson (95). Las lecturas a 555 nm dieron absorbancia nula, indicando ausencia de ALA dehidrasa en ambos picos.

La actividad de PBG deaminasa-isomerasa (96), del pico N° 1 únicamente, se midió a 37°C, incubando durante 4 horas buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), PBG 93 μM y proteínas 0,15 mg/ml. No se obtuvo formación de porfirinas conservándose como tal todo el PBG puesto como sustrato. Se deduce que no

FIGURA N° 4

Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa - II

La cromatografía en columna de DEAE-Celulosa se realizó de manera similar a la descrita en la Figura N° 3. Las actividades se midieron incubando las respectivas fracciones a 37°C, durante 30 minutos, en anaerobiosis y oscuridad, con buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM y UPG III 2,9 μ M.

La actividad específica (nmoles/hora \times mg) se encuentra representada de las dos formas clásicas:

- Δ — Δ Uroporfirinógeno desaparecido
- \circ — \circ Coproporfirinógeno formado

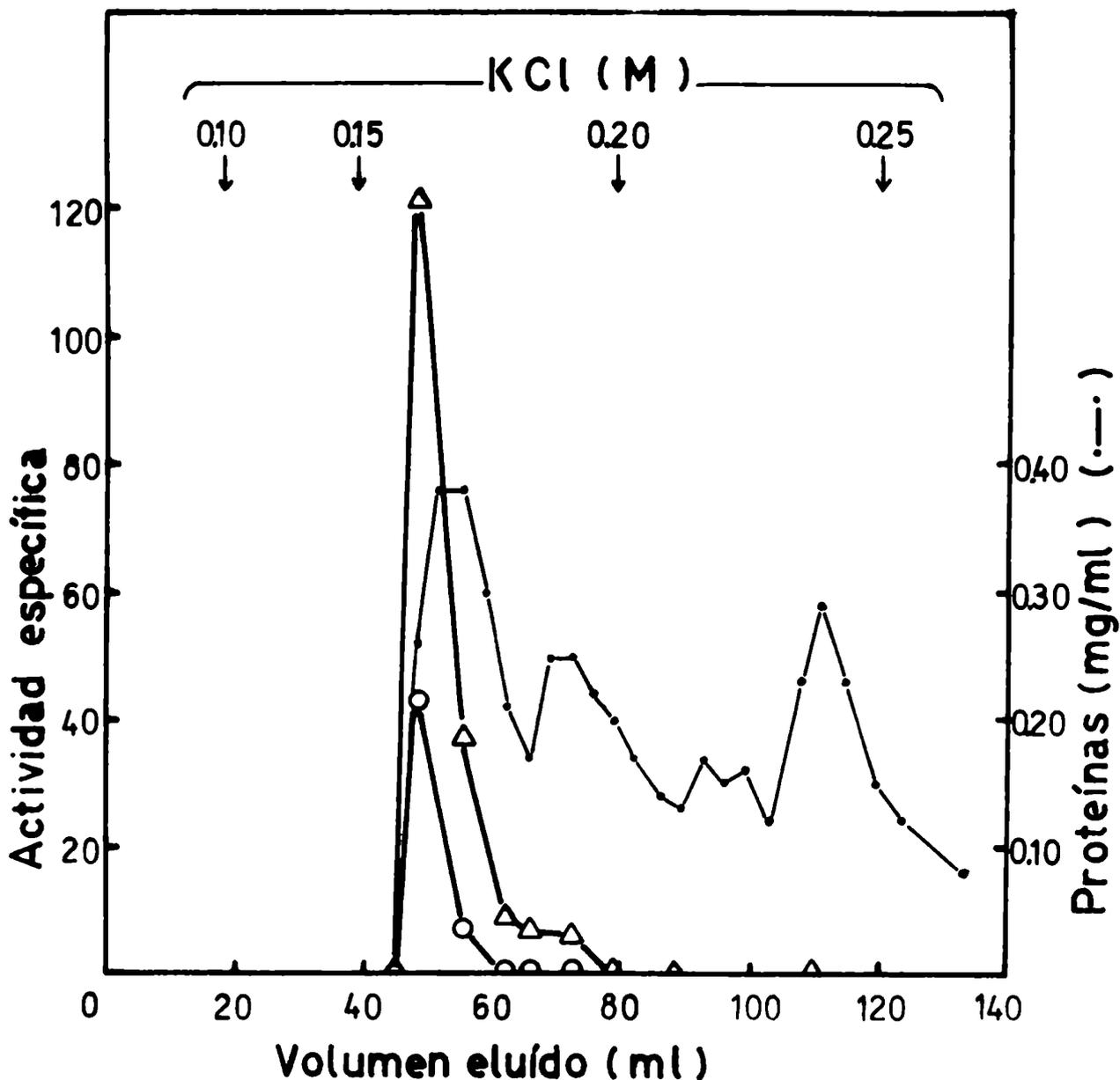


TABLA N° 14

Tabla de purificación de la enzima

Las incubaciones se realizaron en las condiciones descriptas en la Figura N° 4 .

Etapas de purificación	N°	Descripción	Proteínas totales (mg)	Activ. total (nmoles/hora)		Act. específica (nmoles/horaxmg)		Rendimiento (%)		Purificación	
				(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)	(F+H+P+C)	(C)
1		Sobrenadante de hemolizado	14.800	5.230	1.280	0,354	0,086	100	100	1	1
2		Eluido de DEAE-Celulosa, en tanda	131	3.420	900	26,0	6,9	65	70	73	80
3		Ppdo. 40-75% de saturación por sulfato de amonio, dializado	77	1.830	540	23,7	7,0	35	42	67	81
4		Eluido total de columna de DEAE-Celulosa con actividad descarboxilante	15	1.106	348	73,2	23,0	21	27	207	267
4'		Máximo del pico de actividad de la columna de DEAE-Cel.	3,8	460	164	121	43	9	13	340	500

TABLA N° 15

Purificación mediante columna de DEAE-Celulosa - II

Las incubaciones se hicieron a 37°C durante 20 minutos, en anaerobiosis y oscuridad, y contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM y preparación enzimática (eluido de columna de DEAE-Celulosa) y sustrato según se detalla.

Preparación enzimática	Proteínas (mg/ml)	Sustrato	Actividad (nmoles/hora)	
			(F+H+P+C)	(C)
Pico N° 1	0,09	UPG III 2,7 μ M	8,1	6,3
		FPG III 2,3 μ M	—	4,5
Pico N° 2	0,07	UPG III 2,7 μ M	3,3	0
		FPG III 2,3 μ M	—	0

hay deaminasa-isomerasa en el pico N° 1, donde se encuentra la decarboxilasa.

También se ensayó comparativamente la actividad descarboxilante de los picos N° 1 y 2 hacia uroporfirinógeno III y firiaporfirinógeno III (Tabla N° 15). El pico N° 1 presenta actividad frente a ambos sustratos, pero el pico N° 2 muestra una actividad disminuida frente al uroporfirinógeno y nula frente al firiaporfirinógeno. Se puede considerar que la baja actividad del pico N° 2 mencionada representa la última porción de la actividad descarboxilante que se eluye de la columna.

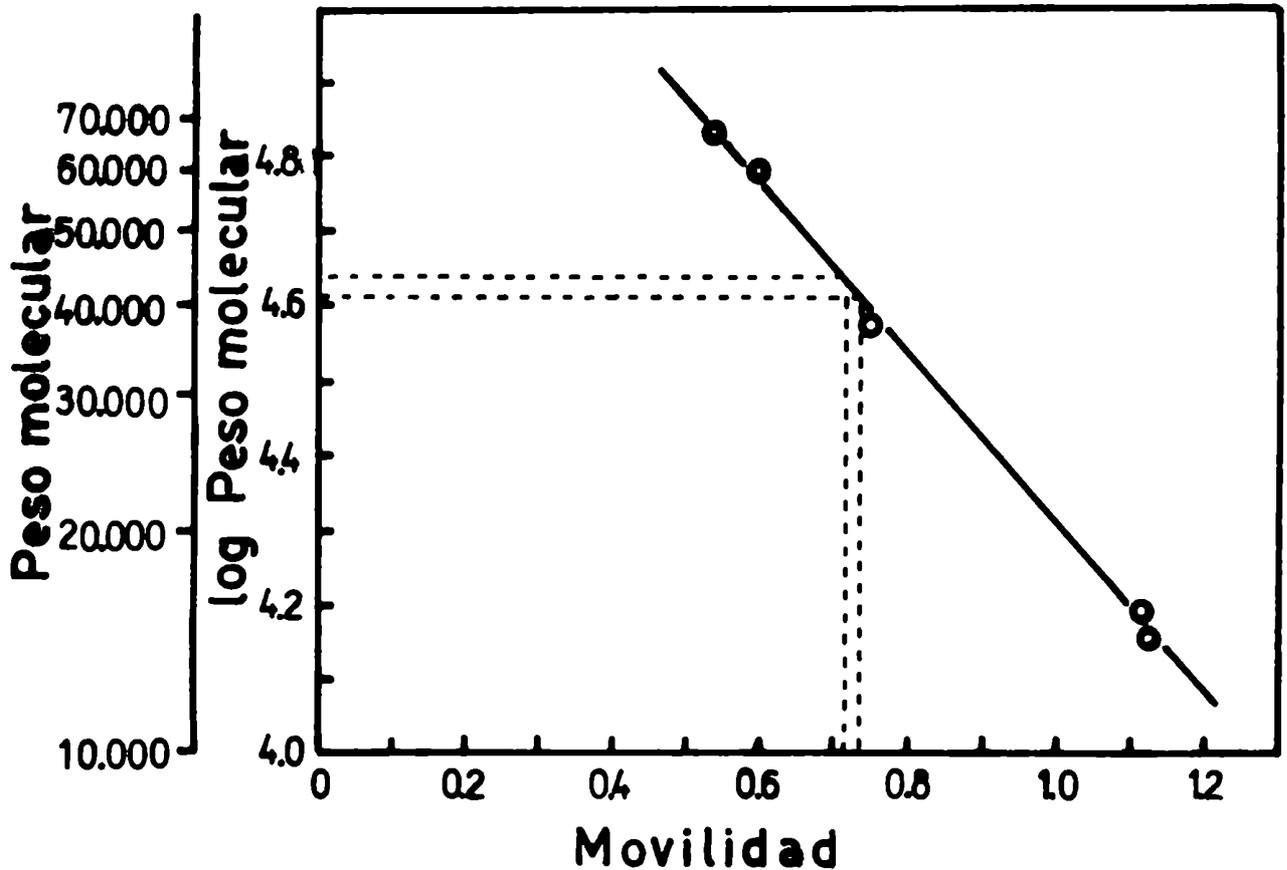
Grado de purificación . Peso molecular

Para evaluar el grado de purificación obtenido luego de la columna de DEAE-Celulosa, se hicieron geles de poliacrilamida con parte de las fracciones más activas del primer pico de dichas columnas (Figura N° 4), en diferentes

FIGURA N° 5

Determinación de peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida

Los detalles experimentales se encuentran aclarados en Métodos (pág. 38)



condiciones (pág. 37).

Por corrida electroforética a pH=8,3 se obtuvo una sola banda proteica, a una distancia del origen aproximadamente igual a 2/3 de la longitud total del gel. Este resultado indicaría que se estaba trabajando con una proteína única. A pH=7,2 se obtuvo también una sola banda, pero la movilidad fue mucho menor (1/8 de la longitud del gel), por lo cual es más significativo el resultado obtenido a pH=8,3.

Se intentó desdoblar la proteína presuntamente homogénea, tratando la muestra a analizar con dodecil-sulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol y bloqueando luego los grupos sulfhidrilos con iodoacetamida. Por electroforesis a pH=7,2 en buffer que contenía SDS 0,1%, se observó nuevamente una sola banda, obteniéndose así un mayor apoyo en cuanto a la existencia de una sola proteína enzimática con actividad descarboxilante, aunque también podría ser que esa proteína se hubiera disociado en subunidades iguales entre sí.

Se hizo una curva de calibración de pesos moleculares por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (pág.38), cuyos resultados se ven en la Figura N° 5. De acuerdo a la movilidad de la proteína en estudio, indicada en el gráfico, se obtuvo un valor de peso molecular de 42.000 ± 1.000 .

PROPIEDADES

Acumulación de intermediarios parcialmente descarboxilados

La descarboxilación enzimática en etapas del uroporfirinógeno III, octacarboxílico, para dar el coproporfirinógeno correspondiente, tetracarboxílico, tiene características particulares. En la tabla N° 16 se puede observar la acumulación de los diferentes intermediarios, obtenida cuando se hacen actuar preparaciones enzimáticas de diferentes grados de pureza sobre el uroporfirinógeno III. En todos los casos hay una cantidad mayor del primer producto de descarboxilación, el firiaporfirinógeno, heptacarboxílico. El producto final, como es lógico, también se acumula; pero la cantidad de los otros dos intermediarios (hexa- y pentacarboxílico) es pequeña y casi no presenta variaciones. Esta situación es privativa de la serie isomérica III, pues los resultados son diferentes con la serie I. En la tabla N° 17 se compara la acumulación de intermediarios producida a partir de uroporfirinógeno III y de uroporfirinógeno I. En el primer caso se observa lo ya descrito en la tabla N° 16, pero en el segundo caso sólo se aprecia una acumulación del producto final. El intermediario heptacarboxílico se encuentra en cantidad menor, no se detectó el hexacarboxílico y aparece el pentacarboxílico en cantidad mayor que en la serie III.

Especificidad

Como se puede observar en la tabla N° 17, en la columna correspondiente a (F+H+P+C), con uroporfirinógeno I la descarboxilación se produce a la mitad de velocidad que con el III. La reacción enzimática es pues más eficiente con UPG III que con UPG I como sustrato. No obstante, la diferencia de velocidades en ambos casos no es tan grande como para pensar que el sistema descarboxilante es muy específico. Podría ser que hubiera una o más enzimas, diferentes para cada serie isomérica, aunque esto parece improbable

TABLA N° 16

Acumulación de intermediarios - I

Las incubaciones se hicieron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad, durante 30 minutos. Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,9 µM y preparación enzimática según se indica.

Preparación enzimática	Proteínas (mg/ml)	Porfirinógenos formados (nmoles)			
		F	H	P	C
Sobrenadante de hemo- lizado.	7,66	3,1	0,5	0,5	1,4
Eluido de DEAE-Celulosa en tanda.	0,11	3,2	0,5	0,5	1,5
Ppdo. 40-75% de sat. por SO ₄ (NH ₄) ₂ , diali- zado o/buffer 3 mM.	0,13	3,5	0,6	0,5	1,9
Eluido de columna de DEAE-Celulosa (1er. Pico)	0,03	3,9	0,6	0,5	2,8

teniendo en cuenta que los isómeros I no tienen destino alguno conocido.

TABLA N° 17

Acumulación de intermediarios - II

Se hicieron incubaciones a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad, con buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,17 mM, enzima correspondiente al eluido de DEAE-Celulosa, en tanda (0,48 mg por ml), y los sustratos que se indican.

Sustrato	Porfirinógenos formados (nmoles)				
	F	H	P	C	F+H+P+C
UPG III 3,8 μ M	3,4	0,7	0,7	3,9	8,7
UPG I 4,1 μ M	1,0	0	1,2	2,2	4,4

Reversibilidad de la reacción

Cuando se llevaron a cabo incubaciones de preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas (ppdo. 40-75% de sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, dializado, concentración final = 0,3 mg/ml) con coproporfirinógeno III 0,9 μ M, en presencia de CO_3H^- $2,5 \times 10^{-4}$ M y demás componentes de la mezcla de reacción, no se detectaron en ningún caso productos de más de 4 carboxilos, indicando la irreversibilidad de la reacción.

En iguales condiciones tampoco hubo disminución de la descarboxilación de UPG III (0,5 a 2,8 μ M) por CPG III (0,17 y 0,34 μ M), demostrando que no hay

inhibición por producto.

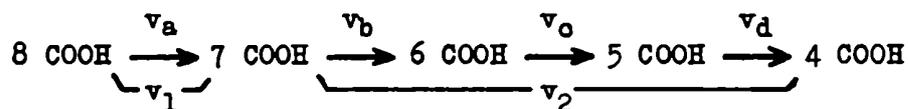
Curso de reacción

El curso de la reacción correspondiente a la serie isomérica III, estudiado utilizando enzima de una etapa de purificación intermedia (Fig. N° 6), muestra una mayor cantidad del intermediario heptacarboxílico, observable en todo momento dentro del lapso estudiado. La aparición del producto final es lineal con el tiempo.

Esta concentración aumentada del porfirinógeno heptacarboxílico no se vio fundamentalmente alterada por variaciones en la concentración de la preparación enzimática (Fig. N° 7).

Se estudió también el curso de reacción utilizando la enzima más purificada. La serie de gráficos de la Fig. N° 8 (A,B,C,D) muestra los resultados obtenidos con 4 diferentes concentraciones de uroporfirinógeno III. En todos los casos, y en concordancia con los datos previos, la cantidad del intermediario heptacarboxílico fue mayor que la de los hexa y pentacarboxílicos, acumulándose el producto final en forma lineal. En función de las concentraciones crecientes de sustrato se observa que la máxima acumulación del firiaporfirinógeno se alcanza en tiempos también crecientes. Así en el gráfico 7A se obtiene el máximo a los 20 minutos, en el 7B a los 45 minutos, y en los gráficos 7C y 7D los tiempos son mayores aún.

A fin de aclarar los pasos de la reacción de descarboxilación, ésta se puede esquematizar de la siguiente manera, en la que se indica solamente el número de carboxilos de los diferentes porfirinógenos:



En base a los resultados obtenidos se puede deducir que la eliminación del

FIGURA N° 6

Curso de reacción - I

Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,9 μ M y preparación enzimática correspondiente al ppdo. 40-75% de sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,14 mg/ml). Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad.

Porfirinógenos de: \blacktriangle — \blacktriangle 8 COOH (sustrato)
 \circ — \circ 7 COOH
 \square — \square 6 COOH ó 5 COOH
 \bullet — \bullet 4 COOH (producto final)

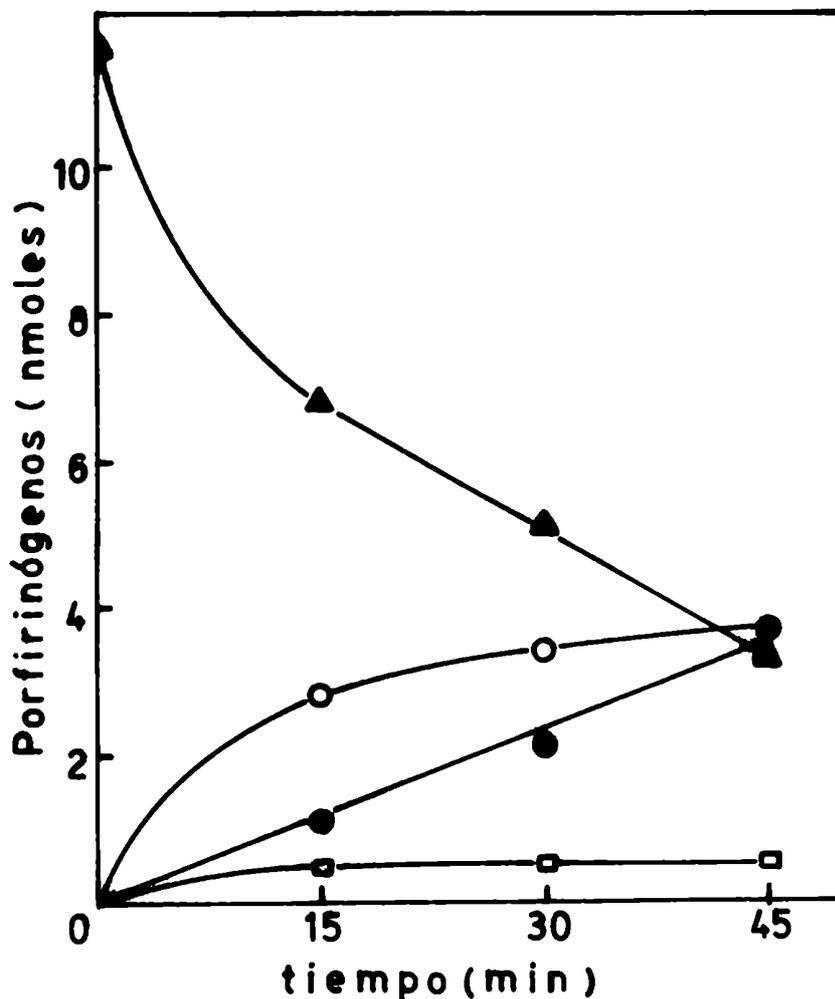


FIGURA N° 7

Acumulación de intermediarios

Las reacciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad, durante 30 minutos. Las mezclas de incubación contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,9 μ M y preparación enzimática (ppdo. 40-75% de sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, dializado) en concentraciones variables.

- ▲—▲ 8-COOH porfirinógeno
- 7-COOH "
- 6 ó 5-COOH "
- 4-COOH "

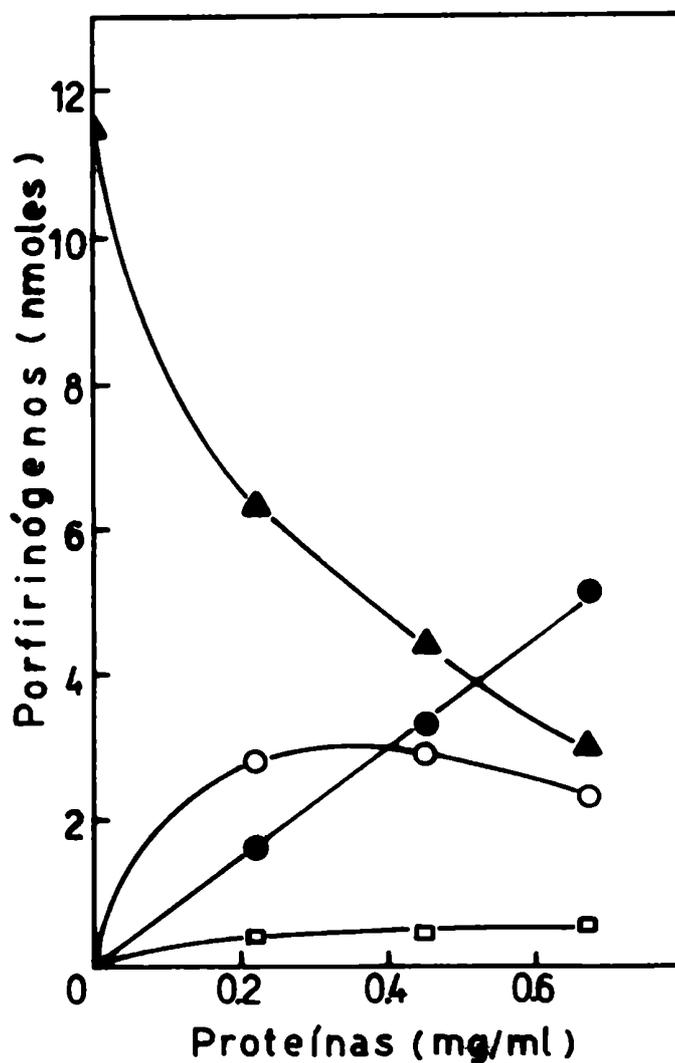
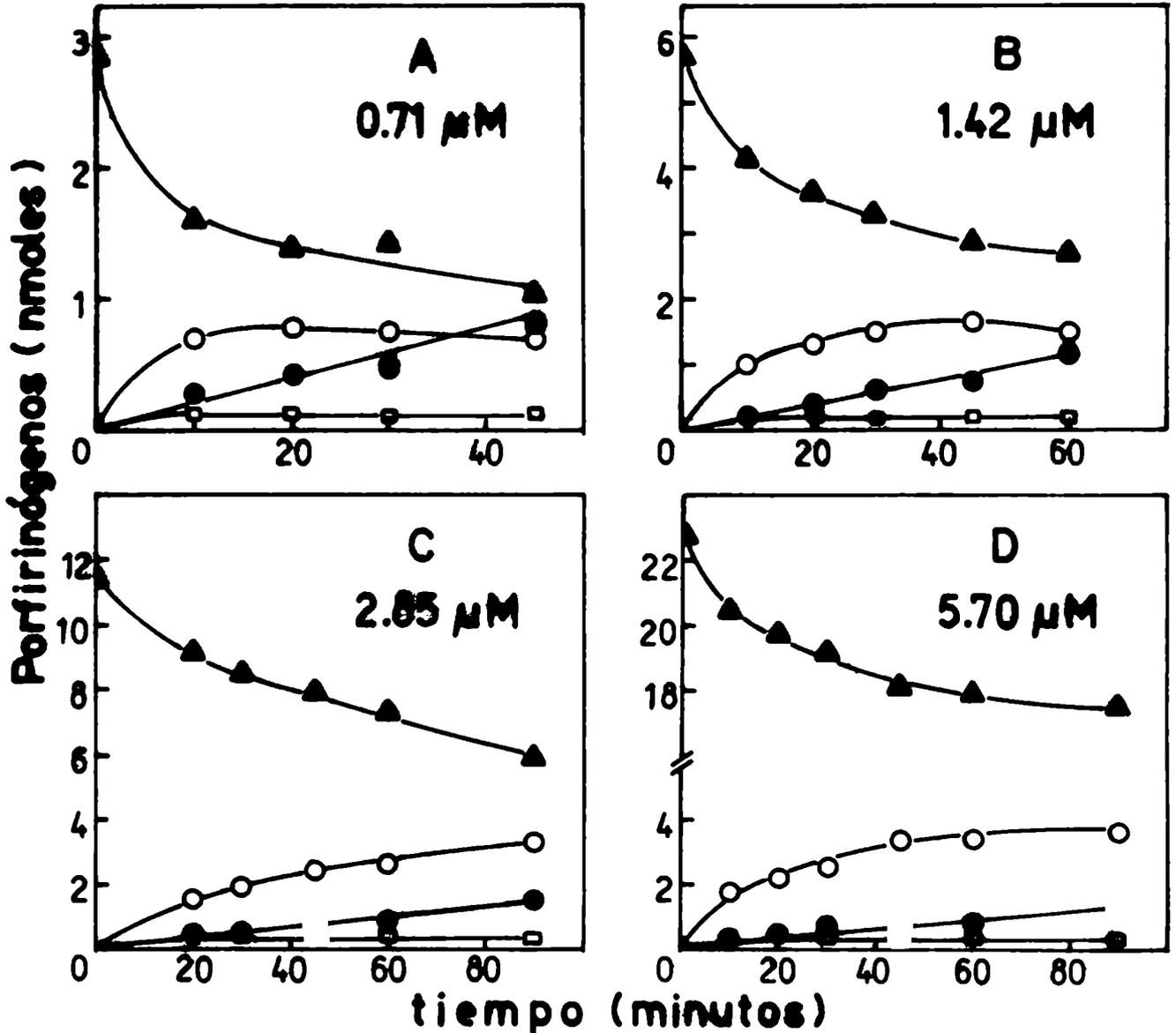


FIGURA N° 8

Curso de reacción - II

Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima proveniente de columna de DEAE-Celulosa 0,14 mg/ml y UPG III según se indica en cada caso. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C, en oscuridad y anaerobiosis, durante tiempos variables.

Porfirinógenos de:
 ▲—▲ 8 COOH (sustrato)
 ○—○ 7 COOH
 □—□ 6 COOH ó 5 COOH
 ●—● 4 COOH

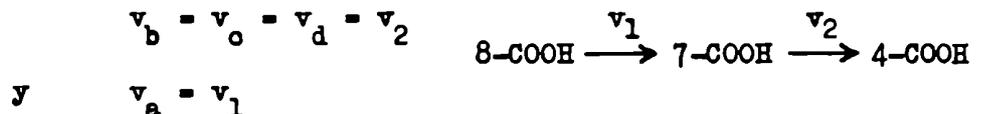


primer carboxilo del uroporfirinógeno ocurre más velozmente que la descarboxilación subsiguiente ($v_a > v_b$), produciéndose así una acumulación del intermediario heptacarboxílico. A medida que transcurre el tiempo, la velocidad de eliminación del primer carboxilo (v_a) va decreciendo, en razón de la disminución en la concentración del sustrato octacarboxílico, y cuando esta velocidad comienza a ser menor que la velocidad de eliminación del carboxilo siguiente ($v_a < v_b$), empieza a decrecer la cantidad del primer intermediario.

Es interesante destacar que la pequeña cantidad de los intermediarios hexa y pentacarboxílicos, que se mantiene prácticamente constante con el tiempo, hace suponer que sus respectivas velocidades de formación y desaparición son equivalentes, es decir:

$$v_b = v_c \quad v_c = v_d$$

Resumiendo, definimos v_1 y v_2 como:



Durante la primera parte de la reacción es $v_1 > v_2$ y más adelante es $v_1 < v_2$. Se vió que el punto de equilibrio ($v_1 = v_2$) varía según sea la concentración del sustrato octacarboxílico, lo cual es lógico pues la disminución de v_1 es más acentuada cuando hay menos sustrato y por consiguiente se llega más pronto a igualar a v_2 .

La cinética enzimática, que se discute más adelante, se realizó determinando velocidades iniciales (v_1 inicial y v_2 inicial), y en estos casos es siempre $v_1 > v_2$.

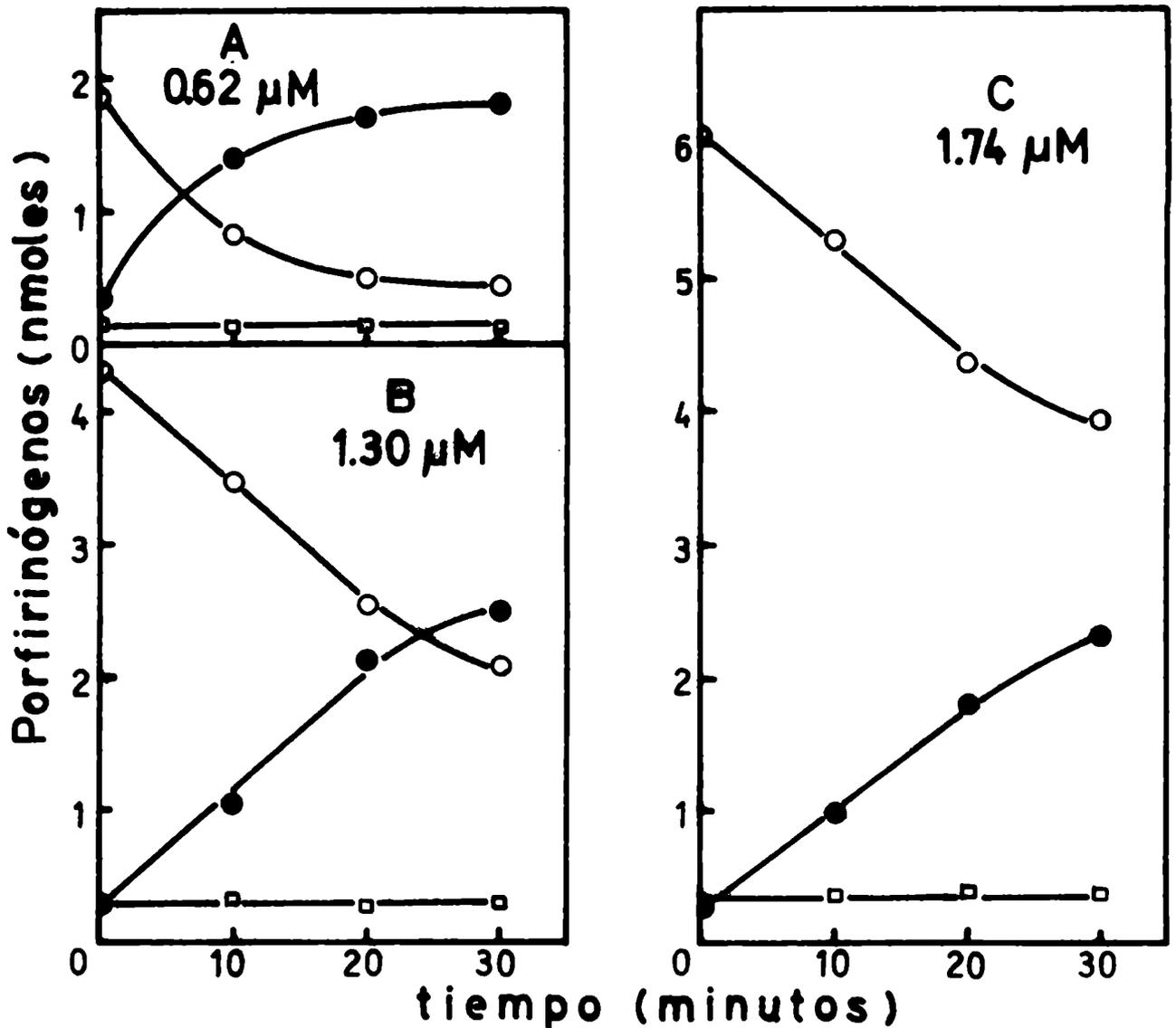
La conclusión de que $v_b = v_c = v_d$ se ve confirmada por los experimentos realizados con firiaporfirinógeno como sustrato (Fig. N° 9: A, B y C). Así, los cursos de reacción con diferentes concentraciones iniciales de dicho sustra

FIGURA N° 9

Curso de reacción - III

Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anerobiosis y oscuridad, durante tiempos variables. Las mezclas contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima proveniente de columna de DEAE-Celulosa 0,16 mg/ml y FPG III en concentraciones que se indican en los gráficos correspondientes.

Porfirinógenos de: ○—○ 7-COOH (sustrato)
□—□ 6-COOH ó 5-COOH
●—● 4-COOH



to, muestran que las cantidades de los intermediarios hexa y pentacarboxílicos son pequeñas y constantes con el tiempo. Es decir que sólo se observa desaparición del sustrato y aparición del producto final.

Se obtuvo un apoyo adicional a las inferencias mencionadas por medio de experimentos en los cuales se siguió el curso de reacción, colocando como sustrato mezclas de uroporfirinógeno y firiaporfirinógeno, en diferentes proporciones (Fig. N° 10).

En cuanto a la desaparición del uroporfirinógeno, se puede observar que tuvo lugar a velocidades decrecientes a medida que disminuyó la concentración inicial del mismo en la mezcla de reacción (gráficos 10 A, 10 B, 10 C, y 10 D). Además, se comprueba que esta eliminación del primer carboxilo se hizo lineal con el tiempo a medida que hubo menos cantidad de uroporfirinógeno y más de firiaporfirinógeno (comparar 10 A y 10 B con 10 C y 10 D).

Esto es diferente de lo que se podía prever, ya que sólo cuando la concentración de sustrato va aumentando se puede esperar una tendencia a la linealidad constante de la reacción con el tiempo, pero no a la inversa. La razón de este comportamiento, teniendo en cuenta que había presentes cantidades crecientes de firiaporfirinógeno, podría residir en que este firiaporfirinógeno se une a la enzima, disminuyendo así la concentración efectiva de enzima que pueda descarboxilar el uroporfirinógeno. Esto haría suponer que la enzima es una sola para todas las etapas de descarboxilación, y que además no podría descarboxilar uro- y firiaporfirinógeno al mismo tiempo con igual eficiencia que cuando cada uno de esos sustratos es único.

Con referencia al firiaporfirinógeno, en el gráfico 10 A se ve que a los 20 minutos alcanza su máxima acumulación ($v_1 = v_2$), o sea que su concentración inicial no era suficiente, en relación a la del uroporfirinógeno, para que $v_2 > v_1$. Lo mismo sucede en el gráfico 10 B, pero el máximo se alcanza en menos tiempo, a los 10 minutos, pues la relación firiaporfirinógeno es mayor es mayor que en 10 A. En el gráfico 10 C hay una leve disminución lineal del firiaporfirinógeno con el tiempo, o sea que allí ya fue suficiente

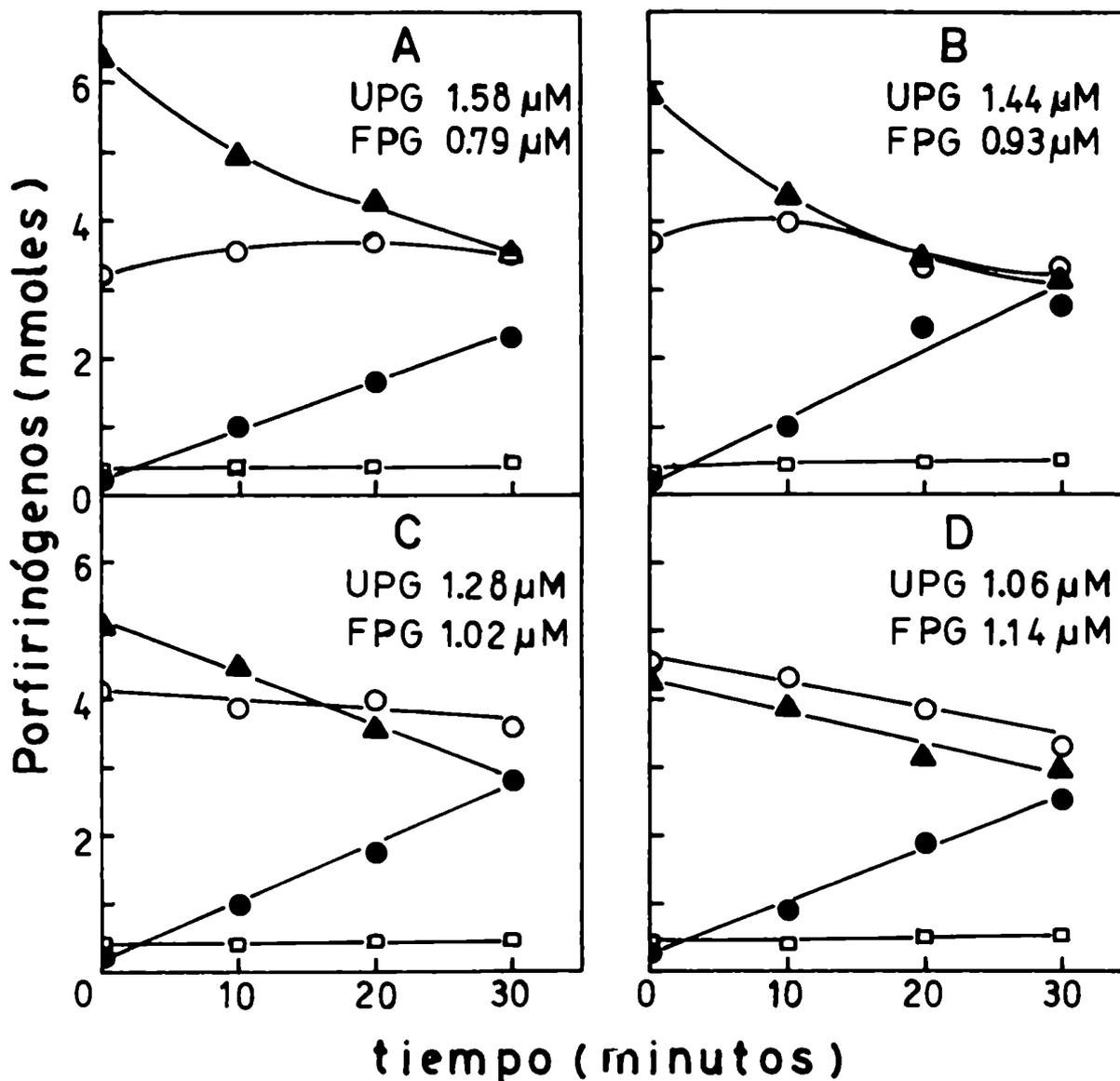
FIGURA N° 10

Curso de reacción - IV

Las mezclas de incubación contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima proveniente de columna de DEAE-Celulosa 0,09 mg/ml y cantidades variables de UPG III y FPG III tales que la suma de ambos diera una concentración total de porfirinógenos comprendida entre 2,2 y 2,4 μM . Las concentraciones iniciales de ambos porfirinógenos se indican en cada uno de los gráficos.

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad.

Porfirinógenos de: \blacktriangle — \blacktriangle 8-COOH \square — \square 6-COOH ó 5-COOH
 \circ — \circ 7-COOH \bullet — \bullet 4-COOH



la relación de ambos sustratos para que $v_2 > v_1$ desde el comienzo. También se observa esto en el gráfico 10 D, siendo en este caso más acentuada la velocidad de desaparición del firiaporfirinógeno, como corresponde a su mayor concentración inicial.

El producto final tetracarboxílico apareció, en todos los casos, linealmente con el tiempo.

Formas de expresión de la actividad enzimática

En base a la acumulación de intermediarios y al curso de reacción de la degcarboxilación enzimática se ha planteado un esquema de dos etapas (pág. 74). Se dijo también que considerando velocidades iniciales, es siempre $v_1 > v_2$ cuando se parte de uroporfirinógeno como sustrato.

v_1 se expresa habitualmente como nmoles de uroporfirinógeno desaparecidos por hora, lo que es igual a la suma de los nmoles de firia-, hexacarboxi-, pentacarboxi- y coproporfirinógenos producidos en igual lapso. Con v_1 se mide la actividad enzimática correspondiente a la eliminación del 1er. carboxilo.

v_2 se expresa como nmoles de coproporfirinógeno producidos por hora y con ella se mide la actividad correspondiente a la eliminación de cualquiera de los tres carboxilos subsiguientes.

Como $v_2 < v_1$, considerando la descarboxilación total, es v_2 la limitante. Por lo tanto v_2 da idea del proceso de descarboxilación completo.

Efecto del pH

Se estudió el efecto del pH sobre las velocidades iniciales (v_1 y v_2) de reacción. Se observa en la Fig. N° 11 que hay un intervalo óptimo entre 6,5 y 7,0, tanto en cuanto a v_1 como en cuanto a v_2 . Los valores de las velocidades, especialmente v_1 , fueron distintos según el buffer usado.

Los menores valores se obtuvieron con tris-maleato y los mayores con fosfa-

FIGURA N° 11

Efecto del pH

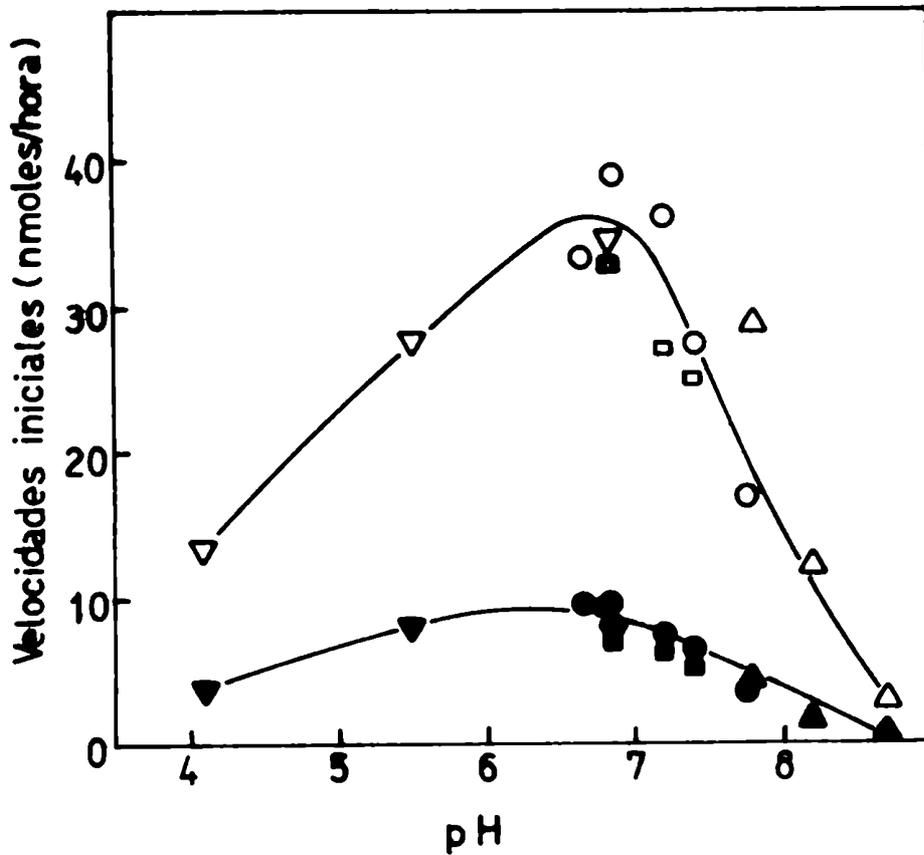
Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas de reacción contenían EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,8 μ M, proteína enzimática (eluido de columna de DEAE-Celulosa) 0,09 mg/ml, y diferentes buffers, de distintos pH, según el caso. Se encuentran representadas v_1 (puntos vacíos) y v_2 (puntos llenos).

□-Tris-Maleato 75 mM

○-Fosfato de potasio 67 mM

△-Tris-Cloruro 75 mM

▽-Acético-Acetato 67 mM



to de potasio y tris-cloruro.

Efecto de la concentración de enzima

La variación en la concentración enzimática provocó una respuesta lineal de la velocidad, ya sea v_1 o bien v_2 (Figura N° 12), dentro del rango estudiado.

Estabilidad térmica de la enzima

Se estudió el efecto de diferentes tiempos de precalentamiento, a 60°C, sobre la actividad de la enzima en un estado intermedio de purificación (Tabla N° 18). Se vio que se produce una importante inactivación, siempre mayor en el caso de v_2 que en el de v_1 , usando como sustrato uroporfirinógeno III o I. Los resultados correspondientes al isómero III, que ha sido el más estudiado, indican que la alteración de la estructura de la enzima por el calentamiento afecta menos la reacción de eliminación del primer carboxilo que la de cualquiera de los tres subsiguientes. Así, en períodos de 5-10 minutos se producen inactivaciones del 50-70% con respecto a v_1 , frente al 100% con respecto a v_2 .

Las tres últimas descarboxilaciones se estudiaron separadamente usando como sustrato firiaporfirinógeno III (Tabla N° 18, Exp. 4). Se confirmó de esta manera que la velocidad de descarboxilación de los porfirinógenos de 7, 6 y 5 carboxilos disminuye mucho (80%) por inactivación de la enzima, independientemente de la previa disminución de la velocidad de descarboxilación del porfirinógeno de 8 carboxilos.

La inactivación diferencial en cuanto a v_1 y a v_2 no hace más que confirmar la existencia de dos etapas bien definidas en el proceso total de descarboxilación.

Por otra parte, el hecho de que la inactivación abarque ambas etapas en una

FIGURA N° 12

Efecto de la concentración de enzima

Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,9 μ M y proteína enzimática correspondiente al ppto. 40-75% de sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, en las concentraciones que se indican. Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad.

Velocidades iniciales: \circ - v_1 \bullet - v_2

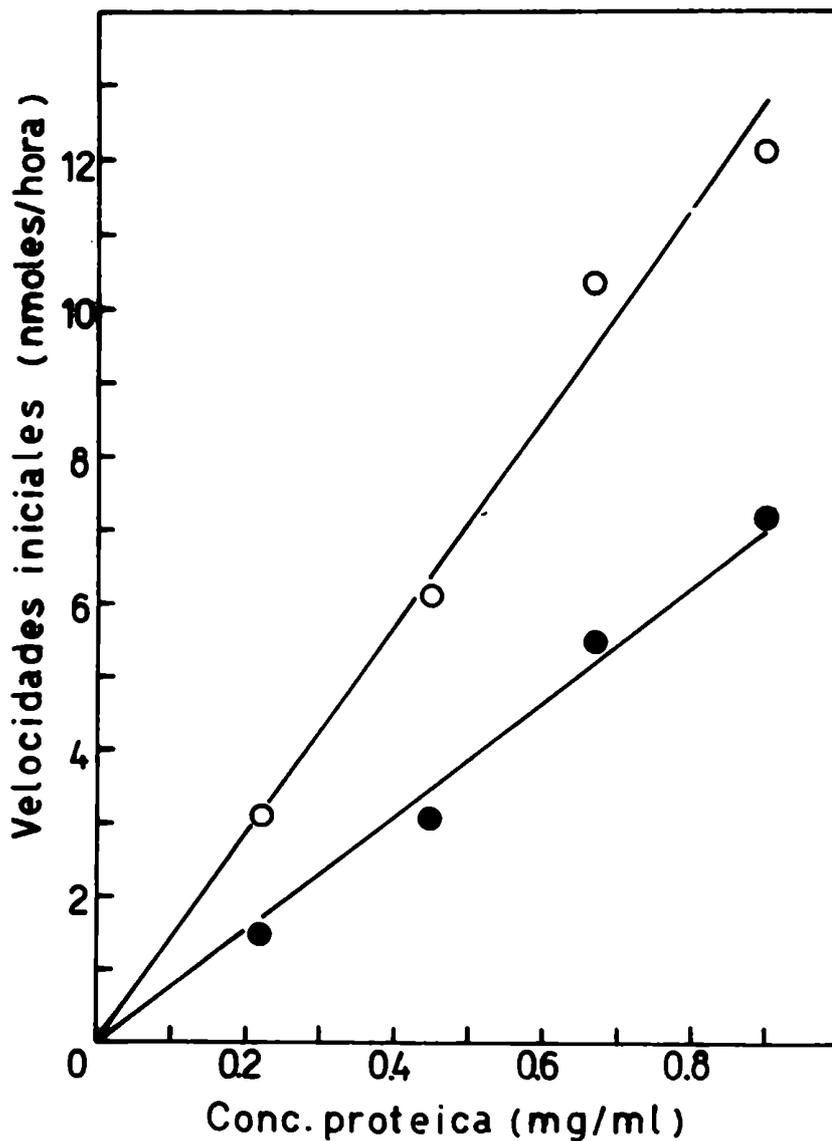


TABLA N° 18

Efecto del precalentamiento de la enzima

Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C, durante 2 horas, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, UPG I o III o FPG III según se indica y preparaciones enzimáticas provenientes del eluido de DEAE-Celulosa en tanda, previamente calentados a 60°C durante los tiempos que se indican y luego centrifugadas. Los sobrenadantes de centrifugación se usaron para efectuar las incubaciones, siendo las concentraciones proteicas finales de 0,25 a 0,45 mg/ml.

Exp. N°	Sustrato	Tiempo de precalentamiento (min)	Actividad específica (nmoles/horaxmg)		Inactivación (%)	
			v ₁ esp.	v ₂ esp.	v ₁ esp.	v ₂ esp.
1	UPG I 5,0 μM	0	1,84	0,71	—	—
		5	0,95	0	48	100
	UPG III 4,8 μM	0	5,15	2,06	—	—
		5	2,17	0	58	100
2	UPG III 4,1 μM	0	3,93	1,74	—	—
		5	1,42	0	64	100
		10	1,38	0	65	100
		15	1,53	0	61	100
3	UPG I 4,1 μM	0	0,75	0,36	—	—
		5	0,15	0	80	100
	UPG III 3,8 μM	0	1,53	0,69	—	—
		5	0,71	0	54	100
4	UPG III 3,5 μM	0	2,65	0,79	—	—
		10	0,79	0	70	100
	FPG III 3,5 μM	0	—	1,70	—	—
		10	—	0,33	—	81

magnitud importante, hizo desechar la idea de utilizar este recurso para poder estudiar separadamente las dos etapas de la descarboxilación.

Efecto de sales

1) Cloruro de sodio

De acuerdo a Cornford (37), que trabajó con eritrocitos humanos, la descarboxilación del uroporfirinógeno III se inhibe parcialmente por sales de sodio, afectándose aparentemente la eliminación del segundo grupo carboxilo (pág. 23). En base a esto se pensó que el NaCl se podría utilizar como inhibidor de la descarboxilación del 7-COOH porfirinógeno, pudiéndose así estudiar la eliminación enzimática del primer carboxilo individualmente.

Con ese objeto se ensayó la acción de diferentes concentraciones de NaCl (Tabla N° 19) sobre la descarboxilación del uroporfirinógeno III y del firiaporfirinógeno III. En el primer caso se dan las velocidades v_1 y v_2 , y en el segundo, obviamente se da sólo v_2 . Se consideró que la menor concentración de NaCl es 50 mM y no nula, debido a que los porfirinógenos sustratos de la decarboxilasa se preparan por reducción de las correspondientes porfirinas con amalgama de sodio. El valor 50 mM se obtuvo teniendo en cuenta que, en un caso límite, la amalgama liberaría todo el sodio que contiene durante el proceso de producción de hidrógeno. El ion sodio es introducido en los incubados junto con los porfirinógenos, en cantidad constante.

Con uroporfirinógeno como sustrato, se observa que concentraciones salinas crecientes inhiben en forma también creciente la actividad, tanto v_1 como v_2 , siendo siempre mayor la inhibición de v_2 que la de v_1 . Cuando el sustrato es firiaporfirinógeno, no se observa inhibición hasta una concentración 400 mM de NaCl. Esto representa una diferencia con respecto a cuando el sustrato es uroporfirinógeno, pues en ese caso ya hay inhibición con NaCl 100 mM.

A fin de aclarar el efecto inhibitorio observado, se puede analizar la distribución de los diferentes porfirinógenos en función de la concentración sa

FIGURA N° 13

Efecto del NaCl

Las incubaciones se realizaron a 37°C, durante 30 minutos, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, preparación enzimática (pre_u cipitado 40-75% de sat. por SO₄(NE)₄)₂, dializado) 0,10 mg/ml y sustrato según se indica en cada figura.

Porfirinógenos de: ▲ : 8-COOH ○ : 7-COOH □ : 6-COOH ó 5-COOH ● : 4-COOH

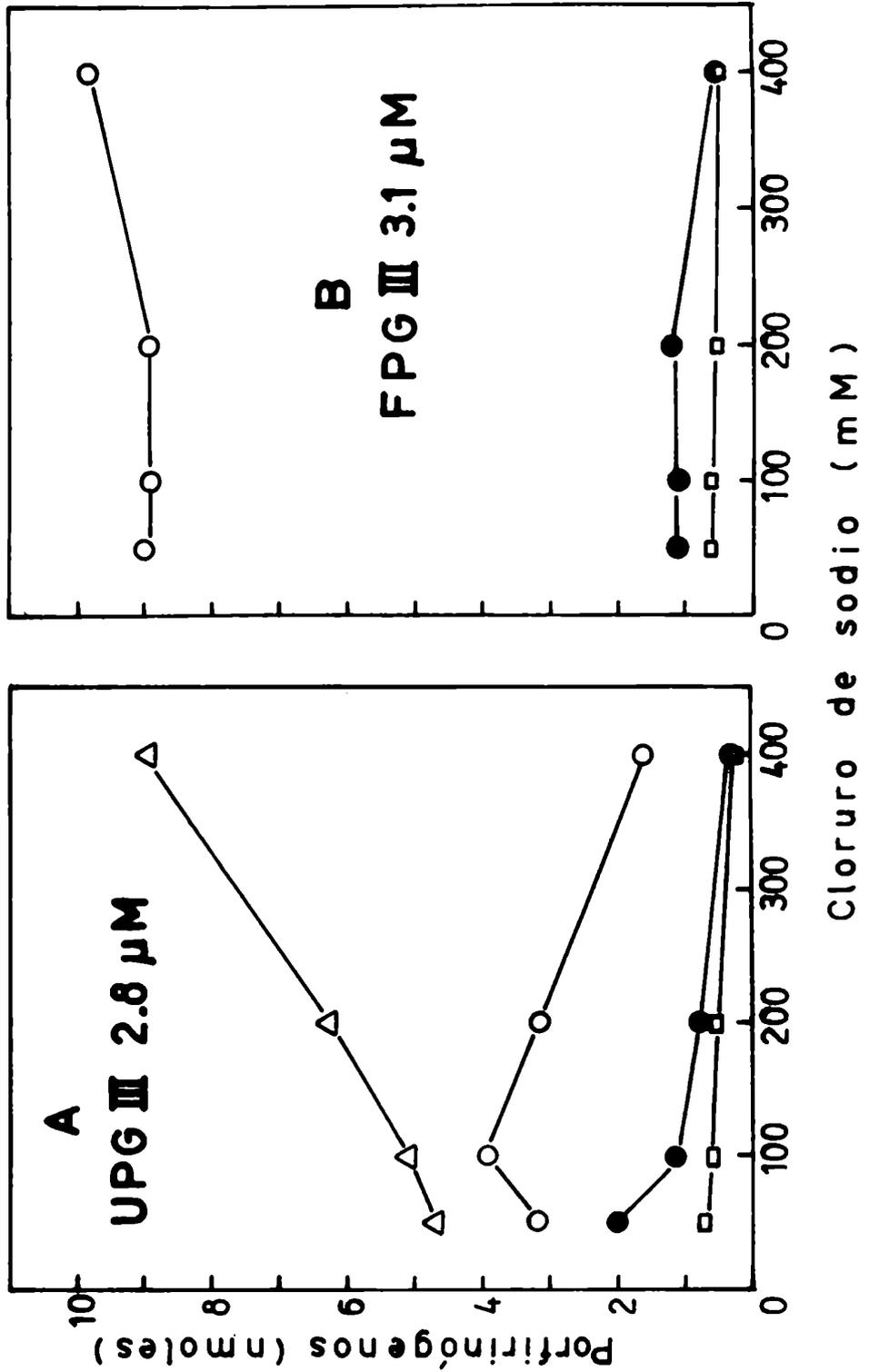


TABLA N° 19

Inhibición por NaCl

Las condiciones de incubación son las de la Figura N° 13. Las velocidades están expresadas en nmoles/hora.

NaCl (mM)	Sustrato	v ₁	v ₂	Inhibición (%)	
				v ₁	v ₂
50	UPG III 2,8 μM	13,1	4,1	—	—
100		12,5	2,3	5	44
200		9,9	1,6	24	61
400		4,6	0,6	65	85
50	FPG III 3,1 μM	—	2,2	—	—
100		—	2,2	—	0
200		—	2,4	—	0
400		—	1,1	—	50

lina, cuando se parte de uno u otro sustrato. Eso es lo que se representa en la Figura N° 13. En el gráfico A se ve que el sustrato, uroporfirinógeno, se descarboxila cada vez menos a medida que aumenta la concentración de NaCl. En cuanto al primer intermediario, el firiaporfirinógeno, aumenta un poco su acumulación a bajas concentraciones de NaCl, para decrecer luego sostenidamente. Esto indica que la eliminación del primer carboxilo no se vería afectada por concentraciones salinas moderadas, pero sí se inhibe con cantidades mayores. La eliminación de los carboxilos subsiguientes se ve afectada en todo el rango ensayado, inhibiéndose principalmente la formación del coproporfirinógeno. En el gráfico B de la Figura N° 13 está representada la variación de la cantidad de firiaporfirinógeno, usado esta vez como sustrato, junto con la de los intermediarios subsiguientes y la del producto final. Sólo

se observa inhibición de la descarboxilación con alta concentración de NaCl. Las cantidades de los porfirinógenos hexa- y pentacarboxílicos prácticamente no varía, mientras que desciende la del coproporfirinógeno a una concentración elevada de la sal.

Comparando los gráficos A y B de la Figura N° 13, es notoria la diferencia en cuanto a las cantidades de coproporfirinógeno formadas en ambos casos. La inhibición continua que se observa en A no se repite en B, salvo a altas concentraciones de NaCl. La diferencia fundamental entre A y B es que en el caso A el uroporfirinógeno está presente en cantidades de intermedio (2-4 nmoles), mientras que en B, como es el sustrato, su cantidad es bastante mayor (aproximadamente 12 nmoles). Esta última cantidad podría ser suficiente como para ejercer hasta un cierto límite un efecto de tipo protector sobre la enzima frente a la acción inhibitoria del NaCl. Este hipotético efecto protector no sería producido en igual medida por el uroporfirinógeno.

2) Sulfato de amonio

El efecto inhibitorio observado con NaCl podría no ser específico de esa sal o de ese catión o anión. Por eso se estudió la influencia del sulfato de amonio sobre la actividad descarboxilante (Tabla N° 20), encontrándose que a una concentración 200 mM esta sal inhibe considerablemente tanto v_1 como v_2 . La magnitud de la inhibición está dentro del orden de la producida por NaCl 200 mM, pero se debe tener en cuenta que mientras la fuerza iónica del NaCl 200 mM es 0,2, la del $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 200 mM es 0,6. Con esta última consideración, sería más efectivo como inhibidor el NaCl que el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y su efecto se debería más bien a sus iones constituyentes.

Efecto de análogos del sustrato

Se ensayó el efecto de la uroporfirina III, cuya reducción da origen al uroporfirinógeno, sobre la actividad enzimática. La estructura de la uroporfiri

TABLA N° 20

Inhibición por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, UPG III 2,5 μM y preparación enzimática (eluido de columna de DEAE-Celulosa, primer pico) 0,09 mg/ml. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 45 minutos, a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad. Las velocidades se expresan en nmoles/hora.

Adiciones	v_1	v_2	Inhibición (%)	
			v_1	v_2
—	8,3	3,5	—	—
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 200 mM	5,5	1,7	34	51

TABLA N° 21

Inhibición por uroporfirina III

Las condiciones de las reacciones son las mismas que las de la Tabla N° 20. Las velocidades se dan en nmoles/hora.

Concentración de uroporfirina III	v_1	v_2	Inhibición (%)	
			v_1	v_2
0	8,3	3,5	—	—
0,4 μM	7,8	2,6	6	26
1,2 μM	7,7	2,6	7	26

na, muy relacionada con la del sustrato, hizo pensar en un posible efecto inhibitor. En efecto, según la Tabla N° 21, concentraciones de uroporfirina menores que la mitad de la del sustrato produjeron una pequeña disminución de v_1 (6-7%) y un decrecimiento más apreciable de v_2 (26%). Estos bajos valores de inhibición hacen suponer que pueda deberse casi exclusivamente a un efecto de autocatálisis en la oxidación de los porfirinógenos (pág. 11). Este efecto, lógicamente, se vería reflejado más acentuadamente en las descarboxilaciones finales, ya que los porfirinógenos de menor número de carboxilos que se generan durante la reacción enzimática se oxidarían, no permitiendo su conversión a productos. Estos resultados no excluyen sin embargo, que otra de las causas de la disminución de la actividad por la presencia de la uroporfirina pueda ser un real efecto inhibitor de esa sustancia sobre la enzima.

Acción de compuestos tiólicos reducidos y oxidados

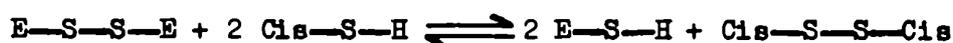
Cuando se estudiaron las condiciones de incubación se vio que la cisteína inhibía la descarboxilación (Tablas N° 4 y 8). Asimismo, se encontró un efecto activador del glutathion, en las condiciones del ensayo realizado (Tabla N° 8).

Por otra parte, se comprobó que la última etapa de purificación, la columna de DEAE-Celulosa, requería en todo momento GSH, de lo contrario se observaba una inactivación de la enzima, de modo tal que los datos no indicaban una real purificación (pág. 58, 61 y Tabla N° 13).

Con esos antecedentes fue que se estudió el efecto de la cisteína y del glutathion reducido y oxidado, en concentraciones variables, sobre la descarboxilasa. De esta manera se pretendió conocer las características de la enzima en cuanto a la probable existencia de grupos sulfhidrilos, sea en estado reducido como oxidado.

En la figura N° 14, gráfico A, se puede observar el efecto de la cisteína

sobre la actividad enzimática. Hay una clara inhibición, de tipo exponencial, tanto en el caso de v_1 como en el de v_2 , aunque más marcada para v_1 . Con una concentración 1 mM de cisteína se consigue un 86% de la inhibición máxima de v_1 . Este porcentaje se calcula teniendo en cuenta que v_1 desciende aproximadamente en forma asintótica, tendiendo a un cierto valor que sería la actividad residual de la enzima, la que aun persiste a pesar de la presencia de cantidades elevadas de cisteína. La acción marcadamente inhibitoria de la cisteína estaría indicando la existencia de uniones disulfuro en la proteína enzimática, que se romperían por el agregado del compuesto tiólico (97):



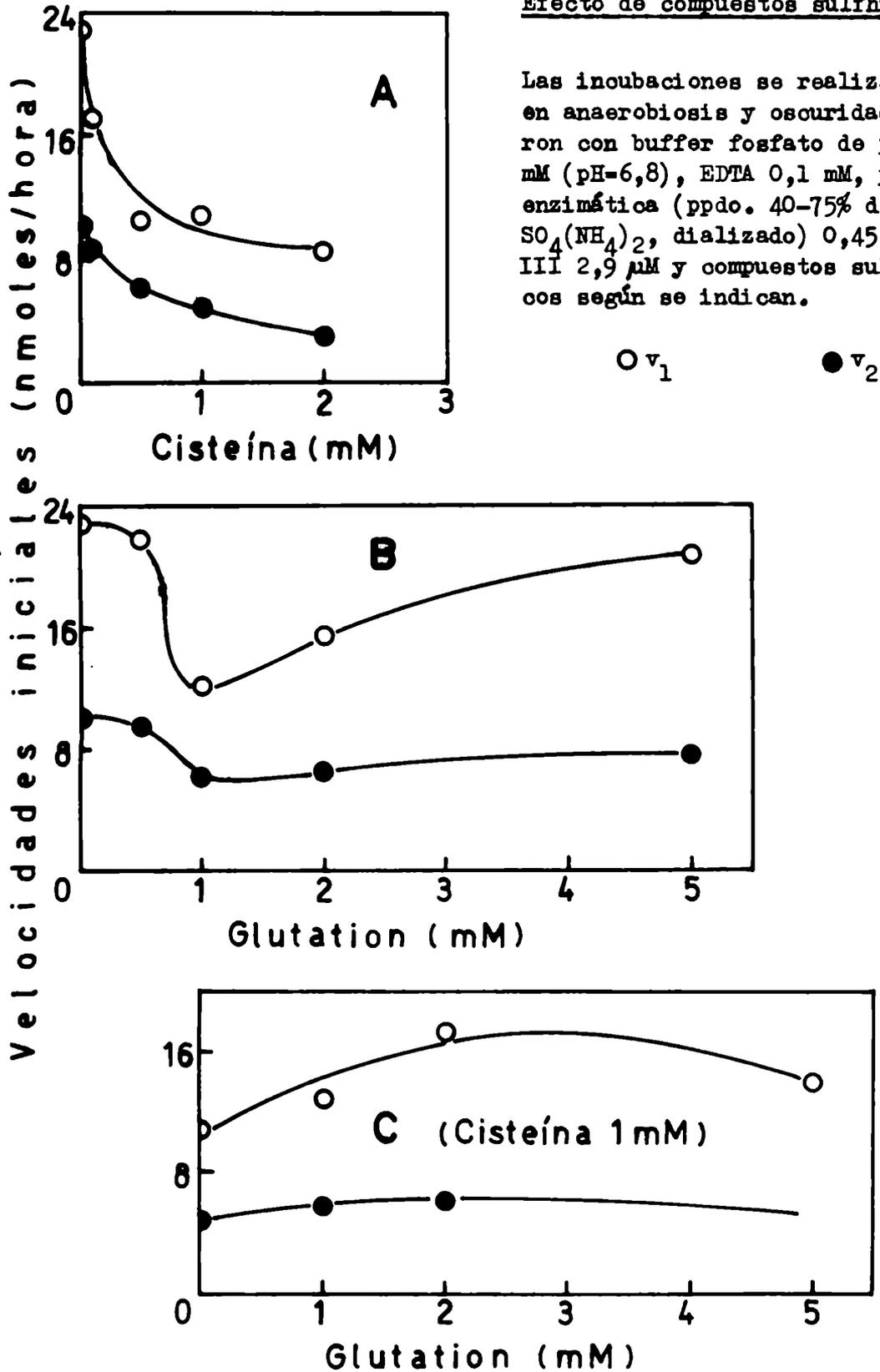
Los potenciales redox estarían favoreciendo la reacción hacia la derecha, y aparentemente la ruptura de por lo menos algunos de los puentes disulfuros provocaría una pérdida apreciable de la actividad enzimática.

En el gráfico B de la figura N° 14 está representado el efecto de concentraciones variables de glutatión reducido sobre la actividad enzimática. La curva es similar en cuanto a v_1 y a v_2 ; pero es más acentuada en el caso de v_1 . La forma de las curvas indica que casi no hay efecto a concentraciones muy bajas de GSH (hasta 0,5 mM), luego se observa una acentuada inhibición que a concentraciones mayores se va anulando gradualmente. Teniendo en cuenta cómo eran las curvas en el caso de la cisteína, se puede pensar que el GSH actúa de otra manera además de la que deriva de su carácter sulfhidrílico. La primera parte de las curvas del gráfico B (Figura N° 14) presenta variantes con respecto al gráfico A, pero se asemejan, en general, en que hay un efecto inhibitorio. La diferencia más notoria está en la segunda parte, más allá de concentraciones 1 mM, donde en el gráfico B hay una recuperación de la actividad enzimática que podría deberse a un efecto activador del GSH, independiente de su carácter de compuesto tiólico, que compensaría en parte

FIGURA N° 14

Efecto de compuestos sulfhidríficos

Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad, se hicieron con buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, preparación enzimática (ppdo. 40-75% de sat. por $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, dializado) 0,45 mg/ml, UPG III 2,9 μM y compuestos sulfhidríficos según se indican.



la inhibición producida por ruptura de grupos disulfuros, análoga al caso de la cisteína. De modo que se puede postular una acción dual del GSH: por una parte inhibiría por probable ruptura de grupos disulfuros, como la cisteína, y por otra activaría. Esta superposición de efectos antagónicos podría ser la responsable de que la primera parte de la curva del gráfico B no denote una decidida inhibición desde el comienzo, como sucede en el gráfico A.

Ya que la cisteína presenta sólo un efecto inhibitor, se hizo un experimento en el que los incubados contenían una cantidad fija de cisteína y cantidades variables de GSH (Figura N° 14, gráfico C). La cantidad fija de cisteína usada, 1 mM, se sabe por el gráfico A que produce más del 80% de la máxima inhibición posible, atribuida a ruptura de grupos disulfuro importantes para la plena actividad enzimática. De esta manera, la cisteína presente podría actuar en este sentido, al igual que el GSH, pero dejando probablemente a éste último más posibilidades de actuar como activador únicamente. Esto dependería por supuesto de los potenciales redox de la cisteína y del GSH con respecto a los potenciales de los grupos disulfuro de la enzima y también de las respectivas velocidades de las reacciones de óxido-reducción. Las curvas del gráfico C muestran que, en presencia de la cantidad fija de cisteína citada, el GSH actúa como activador hasta una concentración 3 mM aproximadamente. Este resultado es concordante con la hipótesis planteada. Parecería, pues, que estando presentes cisteína y GSH, el potencial redox y/o la velocidad correspondientes a la primera es tal que actúa preferentemente sobre los disulfuros de la enzima, de modo que el GSH puede actuar como activador. La parte ascendente del gráfico C es muy similar a la curva del gráfico B a partir de concentraciones 1 mM de GSH.

El efecto del glutatión oxidado, GSSG, sobre la actividad enzimática, está representado en la Figura N° 15. Este experimento indica que el GSSG tiene un efecto inhibitor y que a concentraciones de 0,5 mM ya ejerce prácticamente todo su poder. La inhibición radicaría a nivel de oxidación de grupos sulfhidrilos de la enzima que fueran necesarios como tales, en estado redu-

cido (97):



La máxima inhibición alcanzada es del 33%, pero este valor podría quizás ser mayor si no hubiera presente GSH en las mezclas de incubación. Esto se debe a que se usó enzima eluída de columna de DEAE-Celulosa y el GSH es necesario para prevenir la inactivación durante el proceso de purificación. El efecto inhibitorio del GSSG, junto con el de la cisteína, indicarían pues que la efectividad de la acción catalítica depende de la presencia tanto de grupos S—S como S—H en el catalizador.

Con respecto al efecto activador del GSH, independiente de su carácter sulfhidrúlico, cabe mencionar que en el caso de la histidasa de hígado de rata se ha observado algo semejante. Esta enzima es activada por glutathion e inhibida por cisteína (98), y se sugiere que el GSH puede no estar funcionando simplemente como un reactivo sulfhidrúlico. Se relaciona esto con el hecho de que la histidasa es también activada por el pirofosfato, postulándose que la estructura de la enzima puede estabilizarse por efecto de polianiones, entre los cuales se cuenta el GSH.

Los resultados obtenidos en relación al GSH (Figura N° 14, B) no son del todo concordantes con los de la Tabla N° 8, donde se observaba un neto efecto activador. Sin embargo, se pueden conciliar ambas situaciones pensando que los efectos de los compuestos tiólicos sobre las proteínas dependen de sus concentraciones relativas, y esto es lo que podría diferir en los dos casos citados. La cantidad de GSH que provocó activación en un caso podría equivaler a una cantidad menor o mayor en el otro caso, según fueran las concentraciones relativas de proteínas usadas. De acuerdo a la Figura N° 14 B, concentraciones menores que 0,5 mM de GSH o bien algo mayores que 5 mM, podrían eventualmente ejercer un efecto activador similar al obtenido en la Tabla N° 8.

Descarboxilación a diferentes temperaturas

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la descarboxilación, partiendo de uroporfirinógeno III. En todo el rango ensayado (0 a 75°C) hubo acumulación relativa del 7-COOH porfirinógeno. Una particularidad observada fue que hasta 26°C no hubo formación del producto final, 4-COOH porfirinógeno.

Se calcularon las velocidades iniciales (v_1 y v_2) y se hizo la representación de Arrhenius, basada en la ecuación:

$$v = \text{cte.} \times e^{-\frac{E}{RT}}$$

o bien: $\ln v = \ln \text{cte.} - \frac{E}{RT}$

$$\log v = \log \text{cte.} - \frac{E}{2,3 R} \times \frac{1}{T}$$

En la Figura N° 16 se ve que se obtuvieron dos rectas (curvas 1 y 2), de cuyas pendientes se calcularon los valores de $E_1 = 10,3$ Kcal/mol y $E_2 = 14,8$ Kcal/mol. Para reacciones simples, el valor de E representa la energía de activación.

En el caso de la recta 1 puede hacerse la misma consideración, ya que v_1 corresponde únicamente a la eliminación del primer carboxilo del 8-COOH porfirinógeno. La energía de activación de este primer paso de la descarboxilación enzimática sería de 10,3 Kcal/mol.

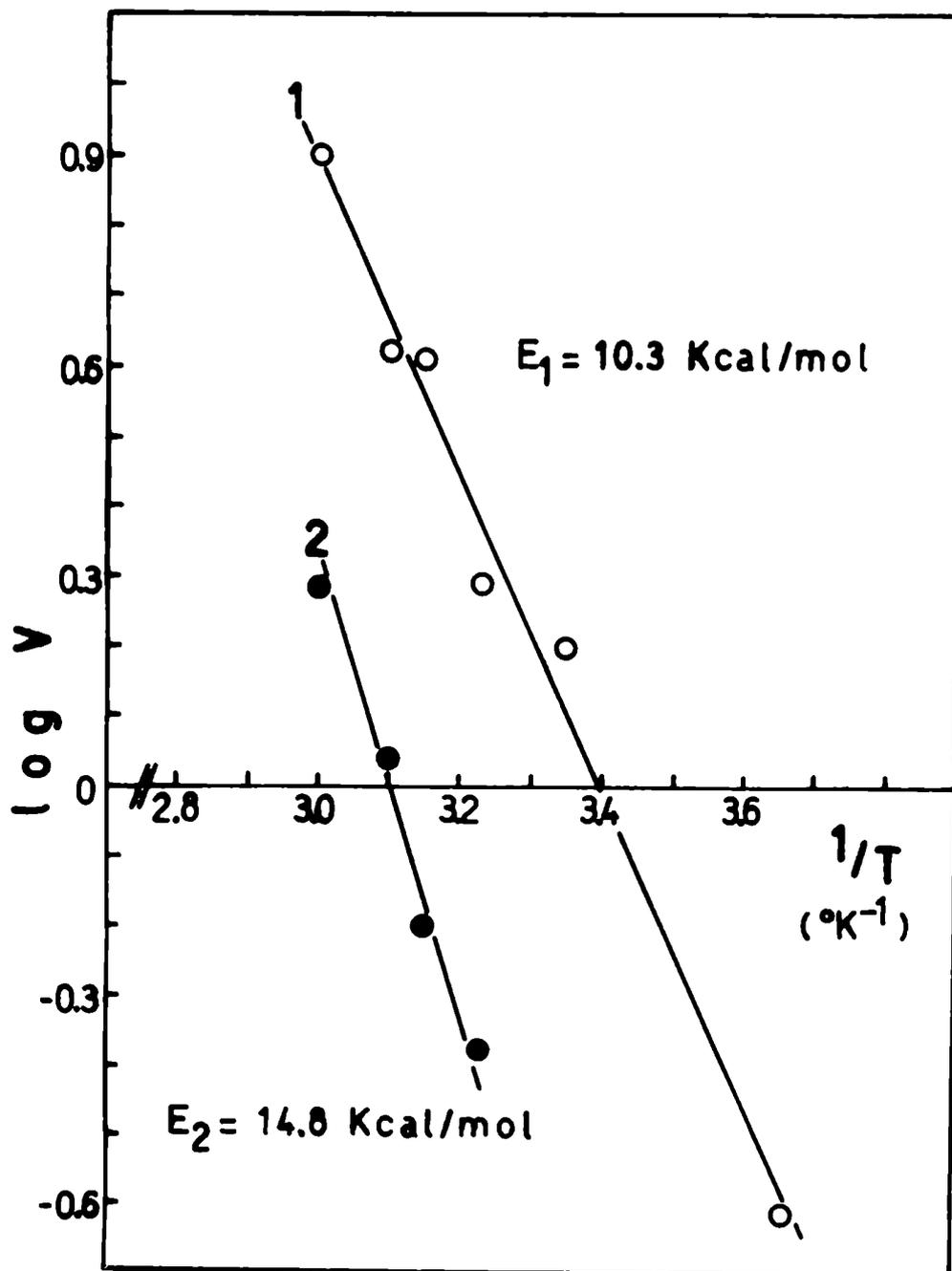
En el caso de la recta 2 se debe recordar que v_2 representa las tres últimas descarboxilaciones, y se piensa que $v_2 = v_b = v_c = v_d$ (ver pág. 74). Pero como esto es más bien una situación de estado estacionario, no hay certeza acerca de que v_2 represente realmente cualquiera de los tres últimos pasos de la reacción. Por eso E_2 (14,8 Kcal/mol), más que la energía de activación de cada uno de los tres pasos citados, debe considerarse una energía de activación "combinada", donde se relacionan de algún modo las tres energías de activa-

FIGURA N° 16

Efecto de la temperatura sobre la descarboxilación

Las incubaciones, realizadas en anaerobiosis y oscuridad, contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima (eluida de columna de DEAE-Celulosa) 0,11 mg/ml y UPG III 2,6 μ M. Las temperaturas fueron variables. Se encuentran representados los logaritmos de las velocidades iniciales (v_1 y v_2), tomadas en nmoles/hora, en función de las inversas de las temperaturas, tomadas en $^{\circ}$ K.

○ v_1 ● v_2



ción reales.

De todos modos, el hecho de que $E_1 < E_2$ concuerda con la observación de que $v_1 > v_2$ en los momentos iniciales de la reacción, corroborando la existencia de dos etapas.

Curvas de concentración de sustrato

1) Uroporfirinógeno III

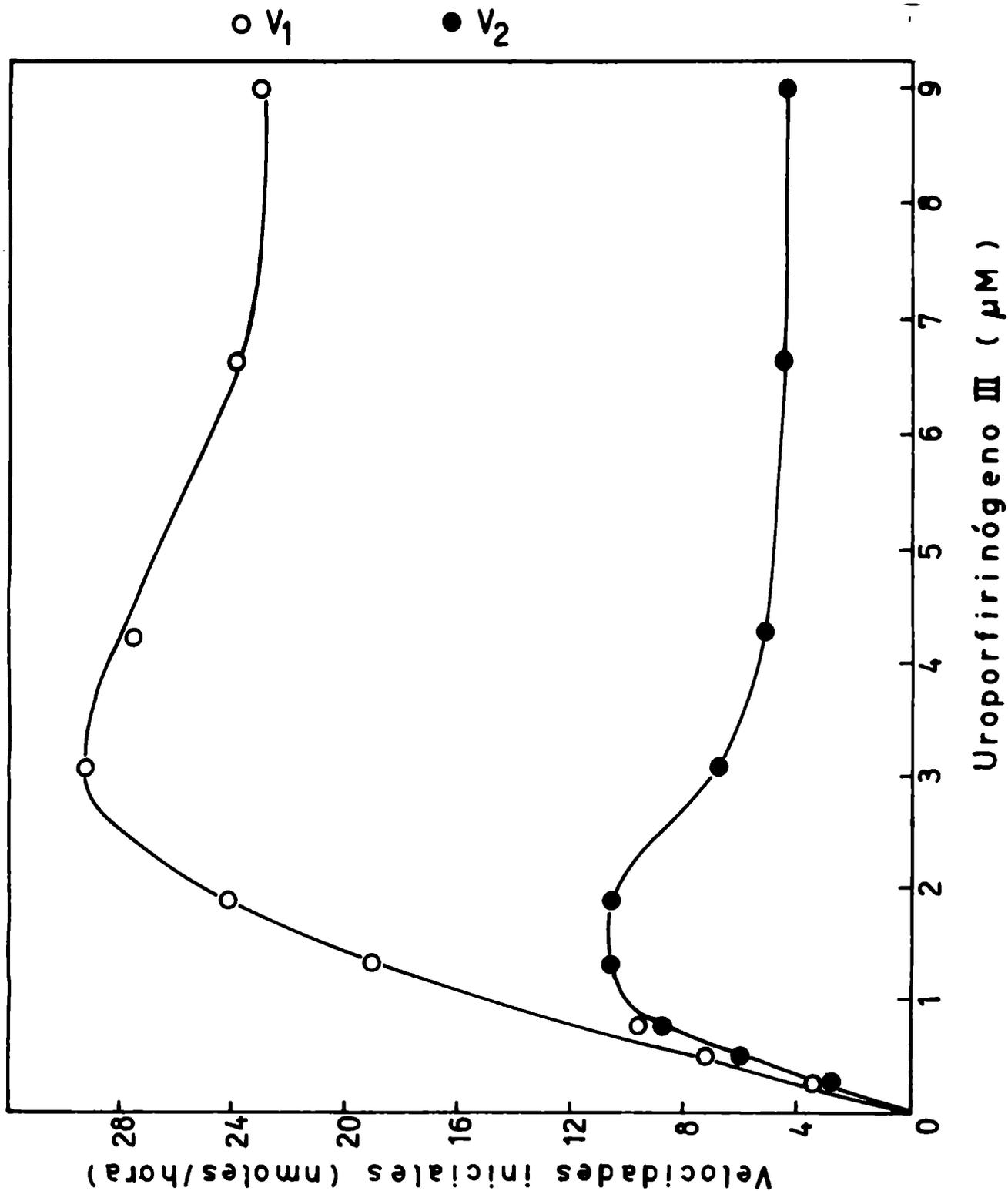
Se determinaron las velocidades iniciales para una serie de concentraciones del sustrato octacarboxílico, siendo similares las curvas obtenidas tanto para v_1 como para v_2 (Figura N° 17). Se puede observar que la primera parte de las curvas se asemeja a lo esperado para un comportamiento "michaeliano" de la enzima, pero se llega a un máximo en las velocidades y luego los valores decrecen. La posición del máximo es diferente según se trate de v_1 o de v_2 . Así, en el caso de v_1 , el máximo corresponde aproximadamente a una concentración $3 \mu\text{M}$ de uroporfirinógeno, mientras que en el caso de v_2 se encuentra dentro del rango de concentraciones de sustrato $1,3-1,8 \mu\text{M}$. Además se observa que v_2 alcanza un valor constante para concentraciones mayores de uroporfirinógeno, e igual tendencia parece tener v_1 , aunque menos acentuada. Se debe tener en cuenta que sólo la curva de v_1 es estrictamente una curva de velocidades iniciales, pues el sustrato es uroporfirinógeno y v_1 mide la eliminación del primer carboxilo. En cambio, v_2 mide las descarboxilaciones subsiguientes partiendo del intermediario heptacarboxílico que se acumula y por consiguiente no se puede asegurar que las velocidades determinadas sean realmente iniciales, puesto que hubo una etapa previa para llegar a ese intermediario que es el sustrato de la segunda etapa de descarboxilaciones (pág. 74).

Restringiéndose al examen de la curva de v_1 , se puede decir que se está frente a una inhibición por sustrato, siendo en este caso el uroporfirinógeno el

FIGURA N° 17

Curva de concentración de uroporfirinógeno III

Las incubaciones, realizadas a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad, contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=7,0), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima (eluída de columna de DEAE-Celulosa) 0,11 mg/ml, y concentraciones variables de UPG III.

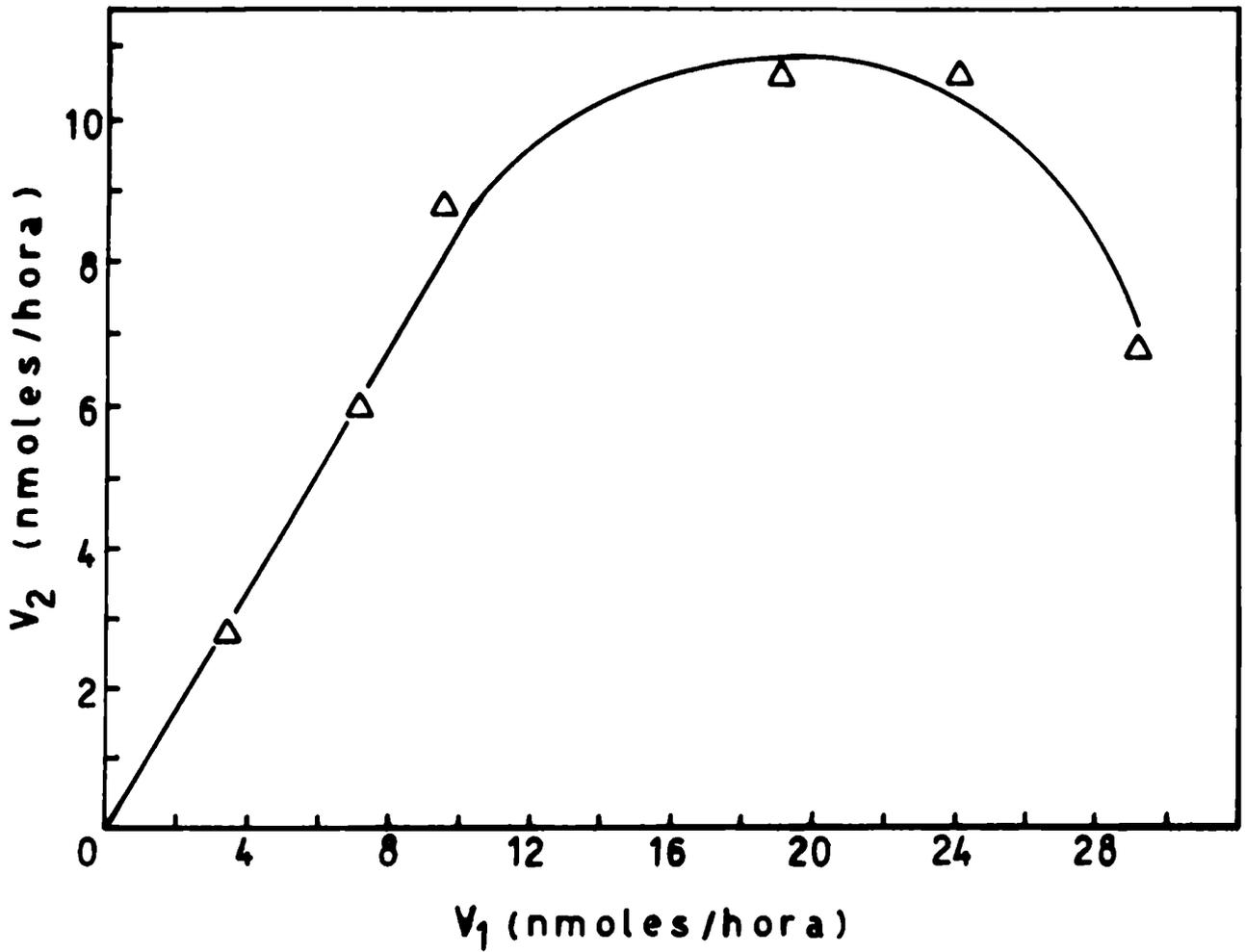


inhibidor. También los productos de oxidación parcial del uroporfirinógeno podrían ser inhibidores, pero esto queda descartado pues, según lo estudiado por Mauzerall y Granick (25), en las condiciones de trabajo usadas (anaerobiosis, oscuridad, GSH) dicha oxidación no se produce. Por otra parte, es curioso que v_2 presente un máximo a menores concentraciones que v_1 . El hecho de que v_1 aumente hasta llegar a un máximo quiere decir que el primer intermediario de la descarboxilación (7-COOH) se forma con rapidez creciente a medida que es mayor la concentración de su antecesor, de un carboxilo más. Debería esperarse pues que v_2 tuviera igual tendencia que v_1 , es decir que ambos máximos coincidieran o bien que el de v_2 estuviera desplazado a la derecha, ya que las descarboxilaciones siguientes están condicionadas a la primera. Sin embargo, v_2 llega a un máximo y comienza a disminuir cuando todavía v_1 está aumentando, como si el porfirinógeno heptacarboxílico, que se sigue formando con rapidez creciente, estuviera inhibiendo su propia descarboxilación, de manera análoga al uroporfirinógeno. Este efecto de v_1 sobre v_2 está representado en forma independiente en la figura N° 18, donde se ve claramente que v_2 no aumenta constantemente a medida que lo hace v_1 , sino que a partir de cierto valor deja de incrementarse y luego baja. Otra posibilidad sería que el mismo uroporfirinógeno inhibiera preferencialmente la descarboxilación del 7-COOH porfirinógeno y las sucesivas, presentándose por ello un decrecimiento de v_2 antes que v_1 . Además, en la curva de v_2 de la figura N° 17, se puede observar también que la estabilización de la velocidad tiene lugar aproximadamente a partir de concentraciones 4 μM de uroporfirinógeno, y se produce cuando v_1 está disminuyendo, o sea luego de haber alcanzado su máximo. Esto sugiere que al reducirse la rapidez de formación del firia porfirinógeno, decrecería suficientemente la supuesta inhibición sobre las descarboxilaciones subsiguientes, de modo que v_2 no seguiría bajando. Esto podría aclararse usando directamente el firia porfirinógeno como sustrato.

FIGURA N° 18

Efecto de v_1 sobre v_2

Todas las condiciones son iguales que en la figura N° 17.



2) Firiaporfirinógeno III

Se determinaron las velocidades iniciales para una serie de concentraciones del porfirinógeno heptacarboxílico, analizándose sólo v_2 en este caso. Los resultados representados en la Figura N° 19, indican que la velocidad llega a un máximo con concentraciones de 1,7 a 2,1 μM del sustrato, para decrecer luego decididamente. De acuerdo a esto se confirma la presunción hecha acerca de que el firiaporfirinógeno actúa como inhibidor, viéndose que la inhibición por sustrato es aún más clara que con el uroporfirinógeno.

En esta oportunidad no se llegó a una estabilización de la velocidad a las mayores concentraciones, como era el caso de v_2 en la Fig. N° 17, pues aquí la cantidad de firiaporfirinógeno (inhibidor) se hace aumentar constantemente, ya que se agrega como sustrato, y no se está formando a partir del uroporfirinógeno, como en el caso de la Fig. N° 17.

Resumiendo parcialmente los resultados de 1) y 2), se puede decir que, usando 8-COOH porfirinógeno como sustrato, hay una inhibición producida por éste sobre su propia descarboxilación, y existe la posibilidad de que también inhiba en alguna medida las descarboxilaciones subsiguientes. En forma indirecta se tienen indicios también de una inhibición ejercida por el 7-COOH porfirinógeno sobre las descarboxilaciones que tienen lugar a partir de él. Esta última posibilidad se confirmó en forma directa usándolo como sustrato en las incubaciones.

3) Uroporfirinógeno III + Firiaporfirinógeno III

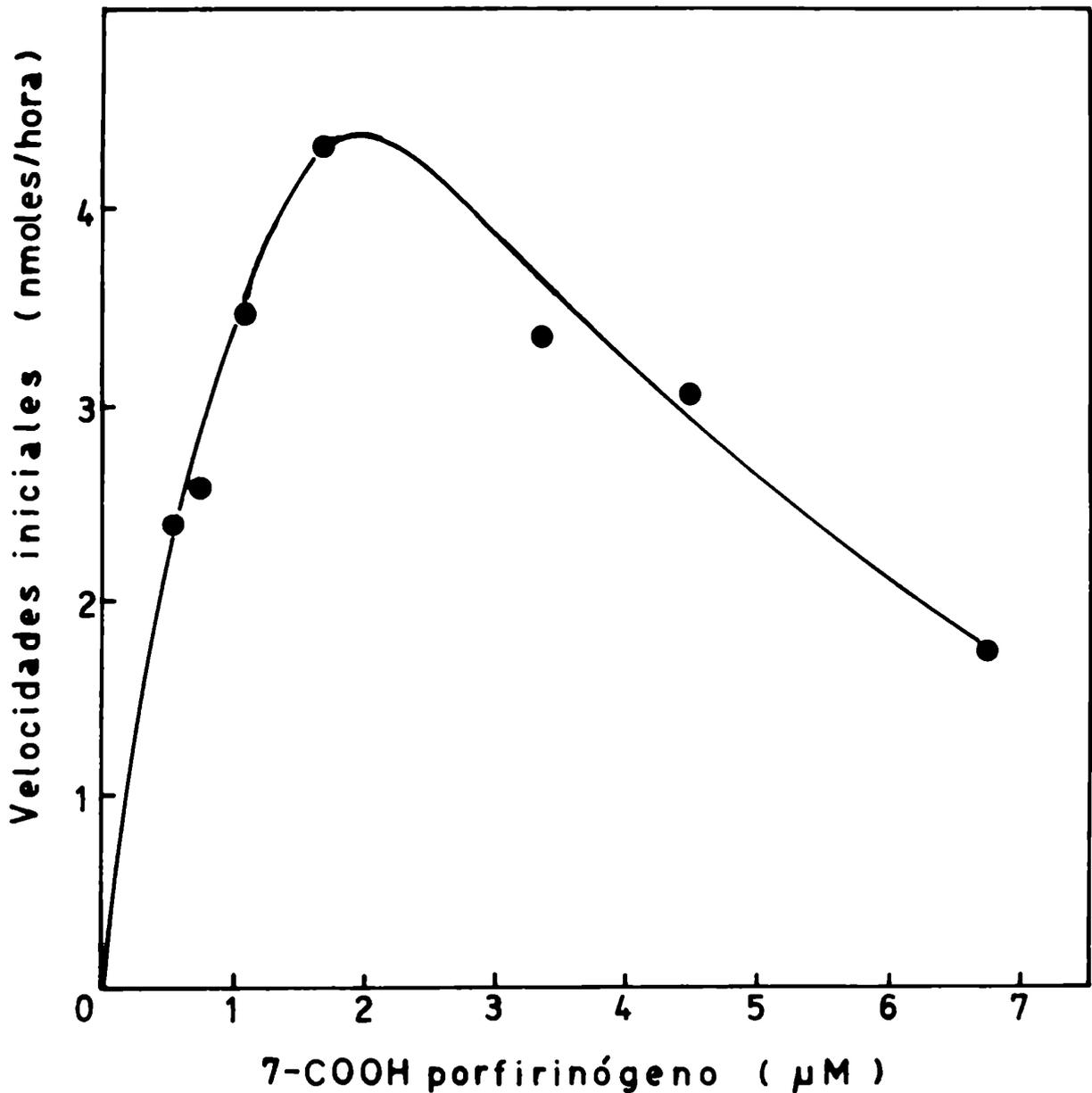
Cuando se midieron las velocidades iniciales en función de concentraciones crecientes de uroporfirinógeno y decrecientes de firiaporfirinógeno se obtuvieron los resultados de la Fig. N° 20 B. La línea punteada representa las concentraciones de 7-COOH porfirinógeno incubadas, cuya disminución se ve acompañada por un discreto aumento de v_2 y un incremento de v_1 que se hace más notable a medida que es menor la cantidad del 7-COOH con respecto a

FIGURA N° 19

Curva de concentración de firiaporfirinógeno III

Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, CSH 1 mM, enzima (eluída de columna de DEAE-Celulosa) 0,13 mg/ml y concentraciones variables de FPG III (7-COOH).

● v_2



la del 8-COOH porfirinógeno.

Como control (Fig. N° 20 A) se midieron análogamente las velocidades en función de la concentración de uroporfirinógeno, pero en este caso en presencia de cantidades casi constantes de 7-COOH porfirinógeno, marcadamente menores que en la Fig. N° 20 B. Estas cantidades de firiaporfirinógeno variaron muy poco con relación a las de uroporfirinógeno, y su presencia se debió a que, a 0°C, mientras se elimina el O₂ de los tubos de Thunberg que luego se colocarán a 37°C para efectuar las incubaciones, se produce en mayor o menor medida una leve conversión enzimática del porfirinógeno de 8 carboxilos en el de 7 carboxilos. La magnitud de la descarboxilación más allá del primer intermediario es prácticamente nula a 0°C.

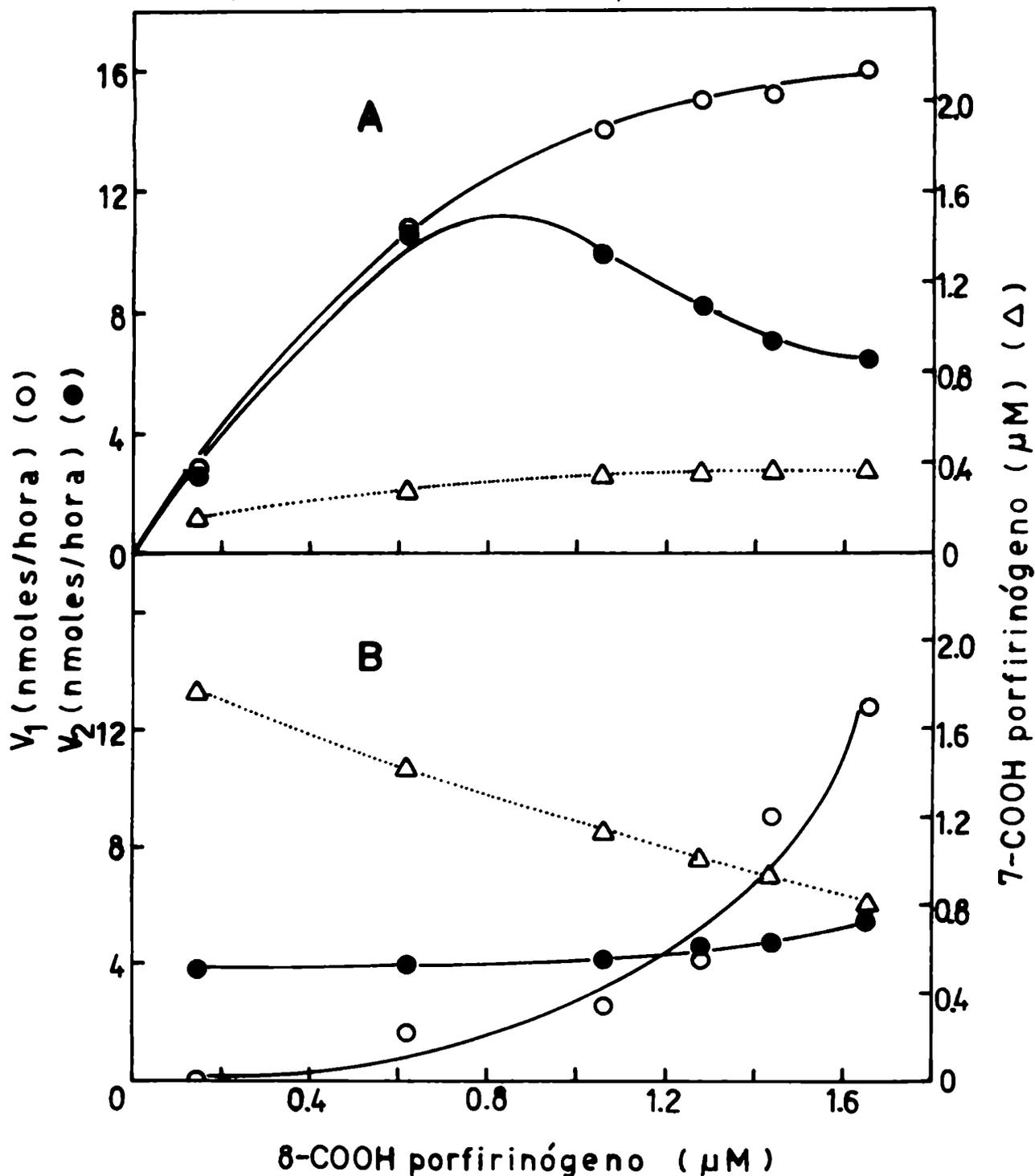
Las curvas de v_1 y v_2 de la Fig. N° 20 A son similares a la porción de las curvas de la Figura N° 17 correspondiente a las menores concentraciones de uroporfirinógeno. Como diferencias se encuentra que: a) v_2 alcanza su máximo a menores concentraciones de sustrato que en el caso de la Figura N° 17, posiblemente por haber mayores cantidades iniciales del 7-COOH porfirinógeno. b) el aumento de v_1 parece ser menos pronunciado en la Figura N° 20 A que en la Figura N° 17. No obstante estas diferencias, el comportamiento observado es básicamente el mismo en ambos casos.

En la Figura N° 20 B se puede apreciar cómo varía la situación por el hecho de tener como sustrato el 7-COOH porfirinógeno en cantidades relativamente elevadas y que varían de mayor a menor, además del 8-COOH porfirinógeno que varía de menor a mayor, de forma tal que se tiende progresivamente a la situación de la Figura N° 20 A. Se observa que v_1 aumenta mucho menos que lo habitual a bajas concentraciones de uroporfirinógeno, pero va recuperando sus valores a medida que la relación del 7-COOH al 8-COOH porfirinógeno va siendo cada vez menor. Esto sugiere un efecto inhibitorio del 7-COOH porfirinógeno sobre la descarboxilación del 8-COOH porfirinógeno. Sin embargo es necesario examinar qué sucede con v_2 , puesto que la menor velocidad de eli-

FIGURA N° 20

Inhibición de v_1 por firiaporfirinógeno III

Las incubaciones se realizaron a 37°C, en anaerobiosis y oscuridad. Las mezclas de reacción contenían buffer fosfato de potasio 67 mM (pH=6,8), EDTA 0,1 mM, GSH 1 mM, enzima (eluida de columna de DEAE-Celulosa) 0,12 mg/ml, y concentraciones variables de UPG III (abscisa) y FPG III (ordenada de la derecha). La ordenada de la izquierda corresponde a v_1 y/o v_2 .

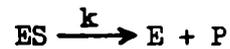
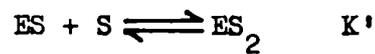


minación del primer carboxilo del uroporfirinógeno podría deberse a que la misma cantidad de enzima tiene más cantidad del segundo sustrato (el porfirinógeno de 7 carboxilos) disponible para descarboxilar, además del 8-COOH porfirinógeno. Si así ocurriera, v_2 en la Figura N° 20 B debería ser mayor que en la Figura N° 20 A. Comparando las v_2 de las Figuras N° 20 A y 20 B se puede observar que tal cosa no parece suceder, pues los valores de v_2 son menores en el gráfico B que el A, en prácticamente todo el rango de concentraciones. La tendencia de v_2 es a aumentar a medida que desciende la concentración del 7-COOH porfirinógeno y aumenta la del 8-COOH porfirinógeno. Este hallazgo es aceptable si se recuerda la clara inhibición producida por el sustrato firiaporfirinógeno sobre las tres últimas descarboxilaciones (Figura N° 19). En los experimentos de la Figura 20 B tendría lugar este mismo efecto, sólo que a medida que desciende la concentración del sustrato-inhibidor, v_2 tiene mayor oportunidad de ascender en virtud del aumento de la concentración de 8-COOH porfirinógeno. Parece quedar descartado así que haya un efecto competitivo entre el 7-COOH y el 8-COOH porfirinógeno para explicar la curva de v_1 en la Figura N° 20 B. Por lo tanto adquiere mayor validez la hipótesis planteada acerca de una inhibición cruzada de la descarboxilación del 8-COOH porfirinógeno por el 7-COOH porfirinógeno.

Un comportamiento recíproco, es decir una inhibición de la descarboxilación del 7-COOH porfirinógeno por el 8-COOH porfirinógeno, es difícil de probar pues, como se ha visto, el 7-COOH porfirinógeno ya es un fuerte inhibidor de su propia descarboxilación y la probable superposición del efecto inhibitor del 8-COOH porfirinógeno no se detectaría con facilidad pues estaría dentro de los límites del error experimental.

4) Parámetros cinéticos

El caso extremo más simple de inhibición por sustrato permite postular las siguientes reacciones (99):



$$v = k_{cat}ES = \frac{k_{cat}E}{1 + \frac{K}{S} + \frac{S}{K'}} \quad (1)$$

Se dice que éste es un caso extremo pues el complejo ES_2 sería totalmente inefectivo.

A bajas S la ecuación (1) se simplifica:

$$v = \frac{k_{cat}E}{1 + \frac{K}{S}} = \frac{V_m}{1 + \frac{K}{S}}$$

o bien

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K}{V_m} \cdot \frac{1}{S} \quad (2)$$

A altas S la (1) toma otra forma:

$$v = \frac{k_{cat}E}{1 + \frac{S}{K'}} = \frac{V_m}{1 + \frac{S}{K'}}$$

o bien

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{K'V_m} \cdot S \quad (3)$$

De acuerdo a (2) y (3), la representación gráfica de $1/v$ en función de $1/S$ o de S dará en cada caso una curva cuya porción recta se puede extrapolar y obtener así los valores aparentes de V_m y K o K' . Mediante el uso de cuál

quiera de las dos rectas se debería obtener un valor similar de V_m , calculado como la inversa de la intersección de la recta extrapolada con el eje de las ordenadas.

En la Fig. N° 21 se pueden observar las representaciones gráficas A y B, correspondientes a las ecuaciones (2) y (3) respectivamente, siendo uroporfirinógeno el sustrato. Ambas curvas presentan una porción recta extrapolable, pudiéndose obtener de ese modo los valores de K_1 y K_1' . Pero el valor de las ordenadas correspondiente a la intersección con las rectas extrapoladas es distinto en cada caso. Esta diferencia hace pensar que la ecuación de velocidad de descarboxilación a partir de uroporfirinógeno no es tan sencilla como la (1).

No obstante, como la primera parte de la curva de concentración de uroporfirinógeno (Fig. N° 17) se asemeja a lo esperado para un comportamiento "michaeliano", es probable que el valor de K_1 obtenido del gráfico A de la Fig. N° 21 sea aproximadamente la K_M para el uroporfirinógeno III. El valor de K_1' no tendría ninguna significación ya que el esquema de reacciones para explicar el comportamiento observado no sería el ya mencionado sino otro desconocido.

En la Fig. N° 22 se observan los gráficos A y B, correspondientes a las ecuaciones (2) y (3) respectivamente, para el caso de ser firiaporfirinógeno III el sustrato.

Con un razonamiento análogo al recién expuesto, como en este caso tampoco coinciden los valores de $1/V_m$ de los dos gráficos, se diría que sólo el valor de K_2 puede corresponder aproximadamente al de la K_M para el firiaporfirinógeno III.

En base a los datos obtenidos: $K_1 = 5 \text{ } (\mu\text{M})$ $K_2 = 1,3 \text{ } (\mu\text{M})$

es probable que la afinidad de la enzima sea mayor por el 7-COOH porfirinógeno III que por el 8-COOH porfirinógeno III.

FIGURA N° 21

Velocidades inversas - Sustrato: uroporfirinógeno III

Las condiciones de incubación son las de la figura N° 17.

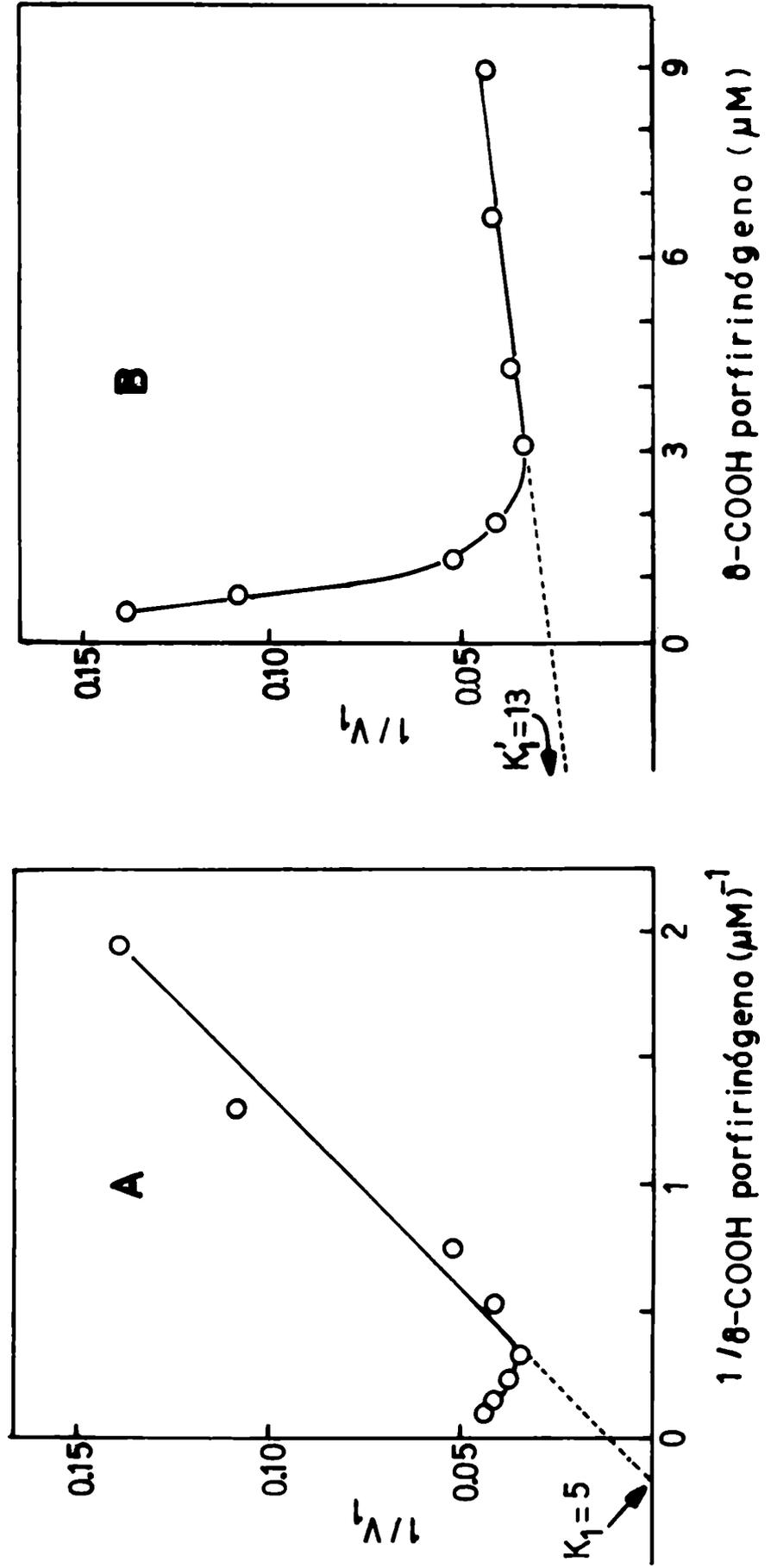
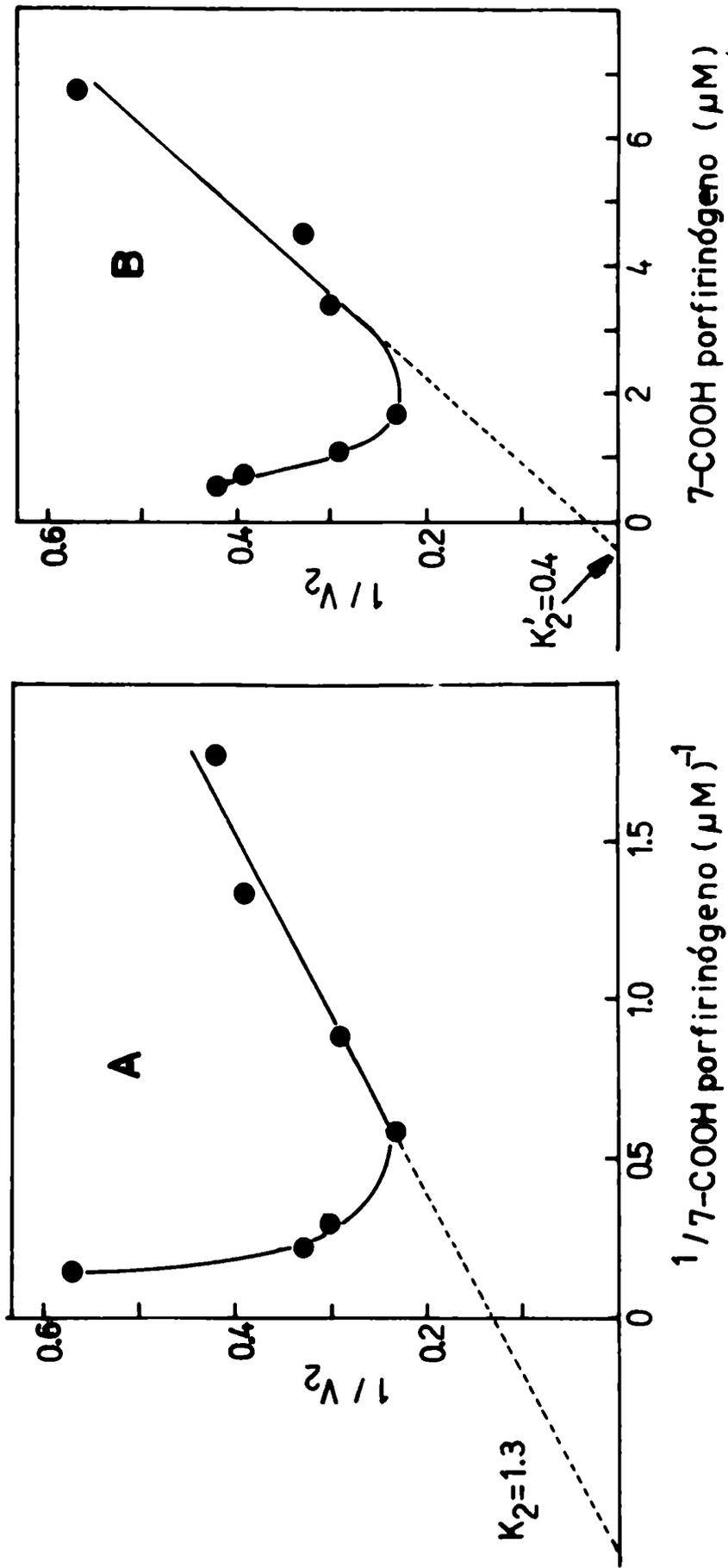


FIGURA N° 22

Velocidades inversas - Sustrato: firiaporfirinógeno III

Las condiciones de incubación son las de la figura N° 19.



DISCUSSION GENERAL

En el presente trabajo se describe la purificación y propiedades del sistema enzimático descarboxilante de eritrocitos de pollo, que cataliza la transformación irreversible de uroporfirinógeno en coproporfirinógeno.

Con anterioridad se aisló esta descarboxilasa a partir de glóbulos rojos de conejo (25) y *Rhodopseudomonas spheroides* (35) y con posterioridad a este trabajo, de bazo de ratón (78).

En este estudio se consiguió una purificación superior a las 300 veces, obteniéndose de este modo una proteína que se comportó como entidad única en electroforesis en gel de poliacrilamida (pág. 65), aún luego de ser sometida a la acción de agentes disociantes, mostrando tener un peso molecular de alrededor de 42.000. Podría ser una sola proteína que no se disocia o que por disociación da subunidades iguales entre sí.

Esta proteína enzimática es responsable de los cuatro pasos del proceso de descarboxilación de la serie III (Esquema 1, pág. 3). Se tuvo un indicio concreto de que una sola entidad molecular podría actuar como catalizadora de más de un paso cuando se estudió el curso de reacción usando dos sustratos, uroporfirinógeno y firiaporfirinógeno, al mismo tiempo (pág. 76). Allí se comprobó que la desaparición del uroporfirinógeno se hacía lineal con el tiempo a medida que decrecía su concentración inicial y aumentaba la de firiaporfirinógeno, como si la misma entidad catalizadora actuara tanto sobre el uroporfirinógeno como sobre el firiaporfirinógeno. Probablemente también la misma enzima actúe sobre el hexacarboxi- y el pentacarboxiporfirinógeno, por razones que se discuten más adelante.

La reacción de descarboxilación ocurre más eficientemente en anaerobiosis (pág. 44), como se encontrara también en glóbulos rojos de conejo (25) y eritrocitos humanos (37).

Se obtuvo un pH óptimo dentro del rango 6,5-7,0 (pág. 78), lo que concuerda con el valor de 6,8 informado en el caso de glóbulos rojos de conejo (25) y el de 7,2 en eritrocitos humanos (37).

La enzima estudiada es bastante estable (20 días a -10°C) en un estado intermedio de pureza (pág. 52), similarmente a la decarboxilasa de *Rhodopseudomonas spheroides* (35) y a la de bazo de ratón (78). Por calentamiento a 60°C , durante tiempos cortos, se produce una importante inactivación (pág. 80), evidenciándose así una labilidad al calor observada también con sistemas descarboxilantes de células de *Chlorella* (5), sobrenadantes de eritrocitos de pollo (38,39), glándulas de Harder (36) y bazo de ratón (78).

La influencia de compuestos tiólicos durante la purificación de la enzima y sobre la actividad enzimática (pág. 58 y 88-93) sugiere la existencia de grupos sulfhidrilo y disulfuro que deben mantenerse como tales para la plena funcionalidad del catalizador. En relación con esto se puede decir que las decarboxilasas de glóbulos rojos de conejo (25) y de bazo de ratón (78) son netamente sulfhidríflicas. Por otra parte, se encontró un efecto activador no clásico del glutatión, es decir aparentemente prescindente de su carácter de tiol, quizás similar al hallado con la histidasa de hígado de rata (98).

En cuanto a la presencia de los porfirinógenos con número intermedio de carboxilos entre el uroporfirinógeno (8 COOH) y el coproporfirinógeno (4 COOH), con referencia a la serie III se hallaron todos ellos (7, 6 y 5 COOH), verificándose una acumulación relativa del de 7 carboxilos (pág. 69). Este último resultado difiere de lo informado por Mauzerall y Granick (25), quienes detectan cantidades pequeñas de las porfirinas de 7 y 6 carboxilos y aún menores de la de 5 carboxilos, y tampoco concuerda con la descarboxilación llevada a cabo por la enzima de bazo de ratón (78), donde no se detectan intermediarios parcialmente descarboxilados. En cambio, Chu y Chu (42) obtienen, con hemolizados de eritrocitos de pollo, toda la gama de intermediarios y en mayor cantidad el de 7 carboxilos.

El estudio del curso de la reacción (pág. 70-78), con los porfirinógenos de 8 y 7 carboxilos de la serie III como sustratos, confirmó los resultados referentes a la acumulación de intermediarios y dio la base para proponer que

la descarboxilación enzimática de la serie III consta de dos etapas definidas: $8\text{-COOH} \longrightarrow 7\text{-COOH} \longrightarrow 4\text{-COOH}$ porfirinógeno (pág. 74), de las cuales la primera es más rápida. Probablemente, la no-detección de intermediarios con el sistema enzimático de glóbulos rojos de conejo (25) se deba a un largo tiempo de incubación; con esos resultados se propone precisamente que el paso determinante de la velocidad es la primera descarboxilación del uroporfirinógeno, o sea justamente lo contrario a lo verificado en el actual trabajo.

El estudio de las velocidades de reacción a diferentes temperaturas (pág. 94) sirvió de apoyo a la observación de que el paso $8\text{-COOH} \longrightarrow 7\text{-COOH}$ es el más veloz y por consiguiente no-limitante.

Varios efectores ejercieron su acción en forma diferencial sobre las dos etapas de la descarboxilación. La inactivación producida por calentamiento del sistema enzimático (pág. 80) fue siempre mayor en cuanto a la segunda etapa. La disminución de actividad por incubación en presencia de NaCl o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (pág. 83 y 86) fue asimismo mayor para la segunda etapa, siendo significativa también la disminución de la velocidad de la primera etapa. Esto último difiere en parte de los resultados obtenidos por Cornford (37) con eritrocitos humanos, de los cuales se deduce que el Na^+ inhibe el paso $7\text{-COOH} \longrightarrow 6\text{-COOH}$ pero no el $8\text{-COOH} \longrightarrow 7\text{-COOH}$. Eso es lo que se observó en el presente trabajo, con concentraciones de hasta 100 mM de NaCl, pero a mayores concentraciones ya es evidente un efecto sobre las dos etapas. Chu y Chu (42) obtuvieron, con respecto al NaCl, resultados totalmente similares a los del presente trabajo.

También el efecto desfavorable de la aerobiosis (pág. 44) y de la uroporfirina (pág. 86) tuvieron mayor intensidad con relación a la segunda etapa, aunque en estos casos, además de una posible influencia sobre la enzima, era esperable un efecto de oxidación de los porfirinógenos, que lógicamente debe ser más notorio a medida que se avanza en la descarboxilación secuencial.

Los estudios de Chu y Chu (42) con hemolizados de eritrocitos de pollo y ALA como sustrato, o sea con un sistema prácticamente completo de biosíntesis del hemo, demuestran en cuanto a la descarboxilación de la serie III que NaI 35 y 105 mM, oxoglutarato 53 mM, FeSO₄ 22,6 mM y tiamina 16 mM inhiben la reacción más allá del porfirinógeno de 7 carboxilos y AMP y ADP 53 mM inhiben la descarboxilación del uroporfirinógeno III. Estos resultados los hacen plantear la existencia de dos o más descarboxilasas o cofactores para la transformación de uroporfirinógeno III en coproporfirinógeno III. En reali-dad, esos resultados confirman, con un sistema no purificado, lo observado acerca de la existencia de dos etapas dentro del proceso total.

Las dos etapas tienen pues un cierto grado de independencia entre sí. La segunda incluye 3 pasos (7-COOH → 6-COOH → 5-COOH → 4-COOH), los cuales parecen suceder de manera interdependiente o concertada. En efecto, ningún agente o efector de los ensayos alteró la distribución característica de los porfirinógenos, con una cantidad siempre pequeña de los de 5 y 6 COOH, sugiriendo que las mayores inhibiciones producidas sobre la segunda etapa abarcarían realmente los 3 pasos citados, que estarían "acoplados" de alguna manera. En caso contrario, debería haberse producido alguna variación en la cantidad de alguno de los porfirinógenos involucrados, por efecto de dichos agentes.

El estudio de las velocidades de reacción en función de la concentración de uroporfirinógeno III permitió postular lo siguiente (pág.96):

- a) El uroporfirinógeno inhibe su propia descarboxilación.
- b) Hay indicios de que la descarboxilación del firiaporfirinógeno está inhibida por el mismo firiaporfirinógeno y/o por el uroporfirinógeno.

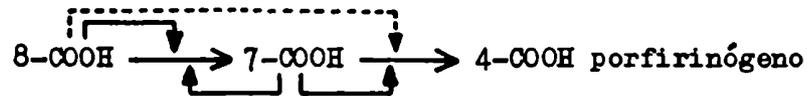
Efectuando el mismo estudio pero con firiaporfirinógeno como sustrato (pág. 100), se llegó a la siguiente conclusión:

- c) El firiaporfirinógeno inhibe su propia descarboxilación.

Cuando se usaron como sustratos uroporfirinógeno y firiaporfirinógeno simul
táneamente (pág.100), se dedujo que:

d) El firiaporfirinógeno inhibe la descarboxilación del uroporfirinógeno.

Lo expuesto en a, b, c y d se puede resumir en un esquema ilustrativo de las inhibiciones encontradas:



Estas inhibiciones por sustratos se pueden deber a una competición entre los diferentes porfirinógenos o a complejos enzima-sustrato menos efectivos o inefectivos, cuya formación se vería favorecida por concentraciones elevadas de sustrato, aunque los modelos más simples no se adaptan a los datos obtenidos (pág.106). La competición entre porfirinógenos parece improbable más allá del firiaporfirinógeno, en la descarboxilación secuencial, debido a las pequeñas cantidades de hexacarboxiporfirinógeno y pentacarboxiporfirinógeno. Con respecto a los complejos enzima-sustrato poco efectivos, se pueden relacionar con lo expuesto acerca de las enzimas multivalentes (pág.25) si se piensa que una enzima bi-ocupada (D_2) podría dar producto a una velocidad menor que la mono-ocupada (D_1), es decir $k_{2a} < k_{1a}$. A medida que la cantidad de sustrato aumenta, partiendo de valores bajos, primero predominarán las enzimas mono-ocupadas (D_1) y la velocidad tenderá pues al correspondiente valor de saturación, o sea $k_{1a} \times E_t$. Pero si la cantidad de sustrato sigue aumentando, va creciendo gradualmente la proporción de enzima bi-ocupada (D_2), que daría producto a menor velocidad, y por consiguiente la velocidad de la reacción total decrecería, pues tendería al valor de saturación $k_{2a} \times E_t$.

A altas concentraciones de uroporfirinógeno III fueron observadas también inhibiciones con los sistemas de eritrocitos de pato (23) y glóbulos rojos de conejo (25).

En cuanto a las constantes, en este trabajo se hallaron los siguientes valores de K_M aparentes (pág. 106): 5×10^{-6} M para el uroporfirinógeno III y $1,3 \times 10^{-6}$ M para el firriaporfirinógeno III. Mauzerall y Granick informaron (25) una K_M aparente menor que 5×10^{-6} M para el uroporfirinógeno III, con la enzima de glóbulos rojos de conejo; Hoare y Heath (35) han dado datos que permiten deducir que el valor de K_M en Rh. spheroides sería menor que 8×10^{-6} M; Romeo y Levin (78) encontraron una K_M aparente de $1,01 \times 10^{-6}$ M para uroporfirinógeno III.

Con referencia a la serie isomérica I, se obtuvieron resultados diferentes a los de la serie III (pág. 67), utilizando preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas. La velocidad de descarboxilación del uroporfirinógeno I fue menor que la del uroporfirinógeno III (Tabla N° 17, pág. 69), resultado similar al obtenido con la descarboxilasa de glóbulos rojos de conejo (25) y de eritrocitos humanos (37), pero diferente al de la enzima de bazo de ratón (78), donde se informa una velocidad igual para los isómeros I y III.

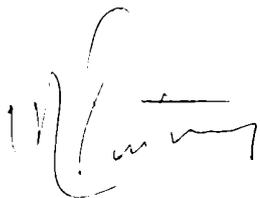
En cuanto al curso de reacción cuando se parte de uroporfirinógeno I, no se encontró acumulación del porfirinógeno de 7 COOH y sí una cantidad relativamente elevada del de 5 COOH. Algo similar obtuvieron Hoare y Heath (35), con una preparación parcialmente purificada de Rh. spheroides, y Chu y Chu (42), con hemolizados de eritrocitos de pollo. En cambio, Romeo y Levin (78) no detectaron intermediarios. La diferente distribución cuantitativa de los intermediarios para las series isoméricas I y III podría deberse a la existencia de enzimas distintas (pág. 67) o bien, en el caso de tratarse de la misma enzima, a una diferencia en el mecanismo de la descarboxilación.

R E S U M E N

- . Se estudian las condiciones de determinación de actividad del sistema de carboxilante que transforma uroporfirinógeno III en coproporfirinógeno III (Porfirinógeno carboxi-liasa) en eritrocitos de pollo, hallándose que la reacción está favorecida por anaerobiosis, pH aproximadamente neutro, glutation y EDTA. El $MgCl_2$ no tiene ningún efecto y la cisteína y el β -mercaptoetanol son inhibidores.
- . Se realiza una purificación de dicho sistema, basada en procesos de intercambio iónico sobre DEAE-Celulosa (en tanda o "batch" y en columna) y precipitaciones salinas. Se obtiene de ese modo una proteína activa, homogénea de acuerdo a su comportamiento electroforético. Ciertas evidencias indican que podría tratarse de una sola especie molecular.
- . Se estudian algunas características del sistema enzimático: es relativamente estable en un estado intermedio de pureza, es lábil al calor y parece poseer grupos sulfhidrilos y disulfuros que deben mantenerse como tales para que no se pierda actividad. Se encontró un efecto activador no clásico del glutation.
- . Durante el curso de la descarboxilación enzimática del uroporfirinógeno se detectan los porfirinógenos de 8 a 4 carboxilos y durante la del firiaporfirinógeno, los de 7 a 4 carboxilos.
- . Se verifica la existencia de dos etapas en la reacción de descarboxilación: 1) $8-COOH \longrightarrow 7-COOH$ y 2) $7-COOH \longrightarrow 4-COOH$ porfirinógeno, siendo la velocidad de la primera mayor que la de la segunda.
- . La velocidad de cada una de las etapas mencionadas tiene diferente susceptibilidad frente a diversos agentes: calentamiento del sistema enzimático, oxígeno, sales, uroporfirina III. Todos ellos inhiben en mayor grado la segunda etapa. El aumento de la temperatura de reacción hace incrementar

en mayor proporción la velocidad de la primera etapa.

- Se estudia la cinética de las reacciones de descarboxilación enzimática, determinándose los siguientes valores de K_M aparentes: 5×10^{-6} M para el uroporfirinógeno III y $1,3 \times 10^{-6}$ M para el firiaporfirinógeno III. Se observan efectos de inhibición por sustrato tanto con uroporfirinógeno como con firiaporfirinógeno. El uroporfirinógeno inhibe su propia descarboxilación y probablemente la de firiaporfirinógeno a coproporfirinógeno. El firiaporfirinógeno inhibe también su propia descarboxilación y, además, la del uroporfirinógeno.
- En base a los resultados obtenidos, se discuten en una forma general el mecanismo de descarboxilación para la serie III y las inhibiciones por sustrato.
- Se describen las características de la descarboxilación del uroporfirinógeno I a coproporfirinógeno I, que presenta diferencias frente a la serie III. Aparte de ser menos veloz, es distinta la distribución cuantitativa de los productos de descarboxilación parcial. El intermediario de 7 carboxilos no se acumula como en el caso de la serie III y el de 5 carboxilos se encuentra presente en mayor cantidad que en la serie III.



B I B L I O G R A F I A

- (1) S.Granick y R.D.Levere - Progress in Hematology - Ed. Grune and Stratton, N.Y., vol. 4 (1964) 1
- (2) K.Salomon, J.E.Richmond y K.I.Altman - J.Biol.Chem., 196 (1952) 463
- (3) J.E.Falk, E.I.B.Dresel y C.Rimington - Nature, 172 (1953) 292
- (4) P.E.Brockman y C.H.Gray - Biochem.J., 54 (1953) 22
- (5) L.Bogorad y S.Granick - Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 39 (1953) 1176
- (6) H.Fischer y H.Orth - Die Chemie des Pyrrols, vol.2, parte 1, Akad.Verlagsgesellschaft, Leipzig (1937) 472
- (7) Sallet - Rév. de Méd., 16 (1896) 542
- (8) S.F.Meek, T.Mooney y G.C.Harrold - Indust.Med., 17 (1948) 469
- (9) C.D.De Langen - Acta Med.Scand., 133 (1949) 73
- (10) C.J.Watson, R.Pimenta de Mello, S.Schwartz, V.E.Hawkinson y I.Bossenmaier - J.Lab.Clin.Med., 37 (1951) 831
- (11) C.Rimington - Endeavour, XIV(55) (1955) 126
- (12) E.I.B.Dresel y J.E.Falk - Biochem. J., 63 (1956) 80
- (13) E.I.B.Dresel y J.E.Falk - Biochem. J., 63 (1956) 388
- (14) L.Bogorad - Science, 121 (1955) 878
- (15) L.Bogorad - J.Biol.Chem., 233 (1958) 516
- (16) S.Granick - Absts.128th.Meeting, Am.Chem.Soc.(Sep 1955) 69 C
- (17) P.N.Townsley y J.B.Neilands - J.Biol.Chem., 224 (1957) 695
- (18) D.S.Hoare y H.Heath - Nature, 181 (1958) 1592
- (19) G.H.Cookson y C.Rimington - Biochem.J., 57 (1954) 476
- (20) J.H.Mathewson y A.H.Corwin - J.Am.Chem.Soc., 83 (1961) 135
- (21) D.Mauzerall - J.Am.Chem.Soc., 82 (1960) 2605
- (22) D.Shemin, C.S.Russell y T.Abramsky - J.Biol.Chem., 215 (1955) 613
- (23) R.A.Neve, R.F.Labbe y R.A.Aldrich - J.Am.Chem.Soc., 78 (1956) 691
- (24) C.Rimington y H.L.Booiij - Biochem.J., 65 (1957) 3P
- (25) D.Mauzerall y S.Granick - J.Biol.Chem., 232 (1958) 1141
- (26) A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 62 (1962) 197
- (27) A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 82 (1964) 13
- (28) L.C.San Martín de Viale y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 158(1968)79

- (29) R.Cooper - Biochem.J., 63 (1956) 25P
- (30) S.Graniok y D.Mauzerall - Ann.N.Y.Acad.Sci., 75 (1958) 115
- (31) G.Nishida y R.F.Labbe - Biochim.Biophys.Acta, 31 (1959) 519
- (32) D.Mauzerall - J.Am.Chem.Soc., 84 (1962) 2437
- (33) J.Lascelles - Biochem.J., 62 (1956) 78
- (34) H.Heath y D.S.Hoare - Biochem.J., 72 (1959) 14
- (35) D.S.Hoare y H.Heath - Biochem.J., 73 (1959) 679
- (36) J.M.Tomio y M.Grinstein - European J.Biochem., 6 (1968) 80
- (37) P.Cornford - Biochem.J., 91 (1964) 64
- (38) A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 57 (1962) 191
- (39) A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 82 (1964) 1
- (40) M.Kreimer Birnbaum y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta, 111 (1965) 110
- (41) J.E.Falk, E.I.B.Dresel, A.Benson y B.C.Knight - Biochem.J., 63 (1956) 87
- (42) T.C.Chu y E.Chu - Biochim.Biophys.Acta, 215 (1970) 377
- (43) J.E.Falk y E.I.B.Dresel - Biochim.Biophys.Acta, 39 (1960) 458
- (44) J.E.Falk, C.A.Appleby y R.J.Porra - Symposia Soc. Exptl. Biol., 8(1959)73
- (45) H.Fischer, H.Hilmer, F.Lindner y B.Putzer - Z.Physiol.Chem., 150(1925) 44
- (46) C.Rimington y P.A.Miles - Biochem.J., 50 (1951) 202
- (47) J.Canivet y C.Rimington - Biochem.J., 55 (1953) 867
- (48) C.J.Watson, V.Perman, F.A.Spurrell, H.H.Hoyt y S.Schwartz - Trans.Ass. Amer.Physicians, 71 (1958) 196
- (49) T.C.Chu y E.Chu - Clin.Chem., 11 (1965) 395
- (50) T.C.Chu y E.Chu - Clin.Chem., 13 (1967) 371
- (51) R.A.Aldrich, V.Hawkinson, M.Grinstein y C.J.Watson - Blood, 6 (1951) 685
- (52) S.K.Jorgensen y T.K.With - Nature, 176 (1955) 156
- (53) T.K.With - Biochem.J., 68 (1958) 717
- (54) T.C.Chu y E.Chu - Biochem.J., 83 (1962) 318
- (55) M.Grinstein, S.Schwartz y C.J.Watson - J.Biol.Chem., 157 (1945) 323
- (56) R.E.H.Nicholas y C.Rimington - Biochem.J., 48 (1951) 306
- (57) T.C.Chu y E.Chu - J.Biol.Chem., 234 (1959) 2741
- (58) T.C.Chu y E.Chu - J.Biol.Chem., 227 (1957) 505

- (59) T.C.Chu y E.Chu - J.Biol.Chem., 234 (1959) 2751
- (60) S.Nacht, L.C.San Martín de Viale y M.Grinstein - Clin.Chim.Acta, 27 (1970) 445
- (61) E.Dowdle, P.Goldswain, N.Spong y L.Eales - Clin.Sci., 39 (1970) 147
- (62) R.R.McSwiney, R.E.H.Nicholas y F.T.G.Prunty - Biochem.J., 46 (1950) 147
- (63) A.Comfort y M.Weatherall - Biochem.J., 54 (1953) 247
- (64) F.DeMatteis, B.E.Prior y C.Rimington - Nature, 191 (1961) 363
- (65) L.C.San Martín de Viale, S.Nacht y M.Grinstein - Clin.Chim.Acta, 28 (1970) 13
- (66) T.C.Chu y E.Chu - J.Biol.Chem., 234 (1959) 2747
- (67) T.C.Chu y E.Chu - Clin.Chem., 12 (1966) 647
- (68) A.Aragonés, R.C.García, L.C.San Martín de Viale, J.M.Tomico y M.Grinstein - Anales Asoc. Quím. Arg., 60 (1972) 239
- (69) J.J.F.Taljaard, B.C.Shanley y S.M.Joubert - Life Sciences, 10 (1971) 887
- (70) H.L.Booij y C.Rimington - Biochem.J., 65 (1957) 4P
- (71) C.Rimington - Proc.Roy.Soc.Med., 52 (1959) 963
- (72) C.J.Watson, W.Runge, L.Taddeini, I.Bossenmaier y R.Cardinal - Proc. Nat.Acad.Sci.USA, 52 (1964) 478
- (73) E.Y.Levin - Science, 161 (1968) 907
- (74) G.Romeo y E.Y.Levin - Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 63 (1969) 856
- (75) D.Shemin, T.Abramsky y C.S.Russell - J.Am.Chem.Soc., 76 (1954) 1204
- (76) S.Granick y D.Mauzerall - J.Biol.Chem., 232 (1958) 1119
- (77) G.Urata y H.Kimura - J.of Biochem., 47 (1960) 150
- (78) G.Romeo y E.Y.Levin - Biochim.Biophys.Acta, 230 (1971) 330
- (79) D.L.Coleman, E.S.Russell y E.Y.Levin - Genetics, 61 (1969) 631
- (80) A.L.Lehninger - Biochemistry, Worth Pub.Inc., N.Y. (1970) 177
- (81) J.M.Reiner - Behaviour of enzyme systems, Burgess Pub.Co. (1959) 64
- (82) J.A.Grasso, J.W.Woodard y N.Swift - Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 50(1963) 134
- (83) A.Brockmann y H.Schodder - Chem.Ber., 74 (1941) 73
- (84) J.E.Falk y A.Benson - Biochem.J., 55 (1953) 101
- (85) R.E.H.Nicholas - Biochem.J., 48 (1951) 309

- (86) H.A.Sancovich, A.M.Ferramola, A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Anales Asoc.Quím.Arg., 55 (1967) 279
- (87) J.Salum, A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Anales Asoc.Quím.Arg. , 49 (1961) 3
- (88) C.Rimington y S.L.Sveinsson - Scand.J.Clin.Lab.Invest., 2 (1950) 209
- (89) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr y R.J.Randall - J.Biol.Chem. , 193 (1951) 265
- (90) O.Warburg y W.Christian - Biochem.Z., 310 (1942) 384
- (91) S.Raymond y L.Weintraub - Science, 130 (1959) 711
- (92) A.L.Shapiro, E.Viñuela y J.V.Maizel - Biochem.Biophys.Res.Com. , 28 (1967) 815
- (93) M.A.Hennesey, A.M.Waltersdorph, F.M.Huennakins y B.W.Gabrio - J.Clin. Invest., 41 (1962) 1257
- (94) J.M.Tomio, V.Tuzman y M.Grinstein - European J.Biochem., 6 (1968) 84
- (95) K.D.Gibson, A.Neuberger y J.J.Scott - Biochem.J., 61 (1955) 618
- (96) H.A.Sancovich, A.M.del C.Batlle y M.Grinstein - Biochim.Biophys.Acta , 191 (1969) 130
- (97) The Enzymes, vol.1 - P.D.Boyer, H.Lardy y K.Myrbäck, N.Y.,AP (1959) 511
- (98) N.W.Cornell y C.A.Villee - Biochim.Biophys.Acta, 167 (1968) 172
- (99) M.Dixon y E.Webb - Enzymes; Longmans,Green and Co.Ltd. (1960) 81