



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**“PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA Y ESTRES  
OXIDATIVO. PROTECCION POR ANTIOXIDANTES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
de Química Biológica.

**MARIA DEL CARMEN MARTINEZ**

Directora de Tesis: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni.

Directora Asistente: Dra. Susana Graciela Afonso.

Consejero de Estudios. Dra. Victoria Parera

Lugares de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias - Consejo  
Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Hospital de Clínicas “José de San  
Martín” y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2007

A mi familia y a Swe

# “PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA Y ESTRES OXIDATIVO. PROTECCIÓN POR ANTIOXIDANTES

## RESUMEN

La Protoporfiria Eritropoyética (PPE), enfermedad hereditaria asociada con una deficiencia en la última enzima de la biosíntesis del hemo, Ferroquelatasa, produce acumulación de protoporfirina IX (PROTO IX) en eritrocitos, hígado y piel. Además de la típica fotosensibilización cutánea, la manifestación más grave la constituye el depósito de PROTO XI en los canalículos biliares, falla hepática progresiva y colestasis.

El antimicótico Griseofulvina (Gris), desarrolla en animales manifestaciones hepáticas similares a las de la PPE.

Considerando la gravedad de la hepatopatía de la PPE, se investigó la posibilidad de revertir o reducir el daño hepático, utilizando el modelo animal de PPE en ratones intoxicados con Gris. Se analizaron las alteraciones producidas por la droga en la biosíntesis del hemo, en los mecanismos de defensa antioxidante y en el sistema metabolizante de drogas. Se estudió el efecto de conocidos antioxidantes y de diversos polifenoles naturales, de ácidos biliares que facilitan la eliminación de la PROTO IX, así como de los fármacos Cimetidina, Desferrioxamina y Colestiramina, empleados en el tratamiento de pacientes con PPE.

Los resultados obtenidos indicarían que el tratamiento con antioxidantes solos o con ácidos biliares evita parcialmente el daño hepático, ya sea por disminución del estrés oxidativo, aumento de la excreción de porfirinas o a nivel de la regulación del metabolismo del hemo.

**Palabras claves:** Protoporfiria, Griseofulvina, Antioxidantes, Polifenoles, Acidos biliares

# **“ERYTHROPOIETIC PROTOPORPHYRIA AND OXIDATIVE STRESS. ANTIOXIDANT PROTECTION”**

## **ABSTRACT**

Erythropoietic protoporphyria (EPP) is a genetic disorder arising from impaired activity of ferrochelatase, the ultimate enzyme of heme biosynthesis. The excessive accumulation of its substrate, protoporphyrin IX (PROTO IX) in erythrocytes, liver and skin, causes a distinctive cutaneous photosensitivity and hepatobiliary disease

Griseofulvin (Gris) is an antifungal drug that provokes in animal models hepatic manifestations similar to those found in EPP patients.

In view of these considerations, experiments were carried out to elucidate whether it is possible to reverse or reduce hepatic damage caused by Gris. To this end, the effect of this drug on heme biosynthesis, antioxidant defense mechanisms and drug metabolism systems was studied. Furthermore, the action of well known antioxidants, natural polyphenols, biliar acids that promote PROTO IX elimination, and drugs employed in EPP treatment, such as Cymetidin, Deferroxamin and Colestiramine, were also studied.

Results here reported indicated that treatment with antioxidants and alone or in combination with biliar acids could alleviate hepatic damage. This could be a result of a diminution of oxidative stress, an enhancement of porphyrins excretion or a regulation of heme metabolism.

**Key words:** Protoporphyria, Griseofulvin, Antioxidants, Polyphenols, Biliar Acids

# ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ii
<b>OBJETIVOS</b> .....	v
 <b>INTRODUCCIÓN</b>	
 <b>CAPÍTULO I: METABOLISMO DEL HEMO</b> .....	
I.1. BIOSÍNTESIS DEL HEMO.....	1
I.2. CATABOLISMO DEL HEMO.....	7
I.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HEMO.....	11
I.4. PORFIRIAS.....	16
I.5. PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA.....	20
I.5.1 Manifestaciones Cutáneas.....	21
I.5.2 Manifestaciones hepáticas.....	23
I.5.3 Factores Genéticos.....	25
I.6. PORFIRIAS EXPERIMENTALES.....	27
I.7. MODELO EXPERIMENTAL DE PROTOPORFIRIA INDUCIDA.....	30
POR GRISEOFULVINA	
I.8. REFERENCIAS.....	37
 <b>CAPÍTULO II: ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE</b> .....	
II.1. RADICALES LIBRES.....	53
II.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	55
II.2.1 Radical superóxido.....	55
II.2.2 Peróxido de hidrógeno.....	56
II.2.3 Radical hidroxilo.....	57
II.2.4 Oxígeno singulete.....	58
II.3. FUENTES BIOLÓGICAS DE RADICALES LIBRES.....	58
II.4. TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES.....	60
II.5. MECANISMO DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN LOS SISTEMAS.....	62
BIOLÓGICOS	
II.5.1 Mecanismos no Enzimáticos.....	63
II.5.1.1 Glutation.....	64
II.5.1.2 Ácido Úrico.....	66
II.5.1.3 Carotenoides.....	66

II.5.1.4 Ácido Ascórbico o Vitamina C.....	68
II.5.1.5 Vitamina E.....	70
II.5.1.6 Polifenoles.....	72
II.5.2 Mecanismos Enzimáticos.....	77
II.5.2.1 Catalasa.....	77
II.5.2.2 Superóxido Dismutasa.....	78
I.5.2.3 Glutation Peroxidasa.....	79
I.5.2.4 Glutation Reductasa.....	80
II.5.2.5 Hemo Oxigenasa.....	81
II.6. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	81
EN EL DAÑO HEPÁTICO	
II.6.1 Sistema Antioxidante en el hígado.....	83
II.7 PORFIRINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	84
II.8 REFERENCIAS.....	86

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>CAPÍTULO I: MATERIALES.....</b>	<b>98</b>
I.1 EQUIPOS.....	98
I.2. REACTIVOS.....	99
I.3 ANIMALES.....	99
I.4 SONDAS PARA NORTHERN BLOT.....	99
<b>CAPÍTULO II: DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>100</b>
II.1 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.....	100
II.1.1 Caracterización del Modelo experimental.....	100
II.1.2 Tratamiento con Antioxidantes.....	101
II.1.2.1 Tratamiento con Trolox, Se y Acido Ascórbico.....	101
II.1.2.2 Tratamiento con Melatonina.....	102
II.1.2.2.1 Administración Oral.....	102
II.1.2.2.2 Administración Intraperitoneal.....	103
II.1.2.3 Tratamiento con Polifenoles.....	104
II.1.3 Tratamiento con Ácidos Biliares.....	104
II.1.4 Tratamiento con Desferrioxamina, Cimetidina y Colestiramina.....	105
II.1.4.1 Tratamiento con Desferrioxamina.....	105
II.1.4.2 Tratamiento con Cimetidina.....	107
II.1.4.3 Tratamiento con Colestiramina.....	107
II.1.5 Tratamiento conjunto con Ácido Clorogénico y.....	108

Acido Desoxicólico o Ursodeoxicólico	
II.2 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS.....	109
II.2.1 Procesamiento del hígado.....	109
II.2.2 Procesamiento de la sangre.....	111
<b>CAPÍTULO III: DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS,.....</b>	<b>113</b>
<b>MOLECULARES Y ESTUDIOS HISTOLÓGICOS</b>	
III.1 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	113
III.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno.....	113
III.1.2 Malondialdehído.....	113
III.1.3 Porfirinas.....	114
III.1.3.1 Extracción de porfirinas.....	114
III.1.3.2 Identificación de Porfirinas por RP-HPLC.....	114
III.1.3.3 Determinación de los niveles de PROTO IX.....	115
III.1.4 Glutation Reducido.....	115
III.1.5 Citocromo P450.....	116
III.1.6 Determinación de la concentración de Proteínas.....	117
III.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	117
III.2.1 Fosfatasa Alcalina.....	117
III.2.2 $\gamma$ - Glutamyl Transferasa.....	118
III.2.3 Transaminasas.....	118
III.2.4 ALA-S.....	119
III.2.5 Hemo oxigenasa.....	119
III.2.6 Glutation-S-Transferasa.....	120
III.2.7 Triptofano Pirrolasa.....	121
III.2.8 Catalasa.....	122
III.2.9 Superóxido Dismutasa.....	122
III.2.10 Glutation Peroxidasa.....	123
III.2.11 Glutation Reductasa.....	124
III.2.12 Citocromo P450 2E1.....	124
III.2.13 Citocromo P450 2A6.....	125
III.2.14 Citocromo P450 2C9.....	126
III.2.15 Citocromo P450 1A2.....	127
III.3 ESTUDIOS MOLECULARES.....	128
III.3.1 Extracción de ARN total.....	128
III.3.2 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	129
III.3.3 Northern Blot.....	129

III.3.3.1 Electroforesis de ARN en geles de agarosa.....	129
III.3.3.2. Transferencia de ARN a membranas de nylon.....	129
III.3.3.3 Hibridización.....	130
III.3.3.4 Exposición radiográfica.....	130
III.3.3.5 Cuantificación de las señales de hibridización.....	131
III.3.4 Preparación de la sonda de Glutation Peroxidasa.....	131
III.3.5 Expresión de la Isoforma del Citocromo P450 3A4.....	131
III.3.5.1 Western Blot.....	131
III.2.5.2 Reutilización de la membrana.....	132
III.3.5.3 Expresión de la Actina.....	133
III.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	133
III.4.1 Preparación de los cortes Histológicos.....	133
III.4.2 Inmunohistoquímica.....	133
III. 5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	134
III.6 REFERENCIAS.....	135

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>137</b>
I.1 INTRODUCCIÓN.....	137
I.2 EFECTOS DE LA GRIS EN EL ANIMAL Y EN SU HÍGADO.....	137
I.2.1 Alteraciones Macroscópicas.....	137
I.2.2. Alteraciones Histológicas.....	140
I.3 EFECTOS DE LA GRIS SOBRE LAS ENZIMAS MARCADORAS.....	142
DE DAÑO HEPÁTICO	
I. 4 EFECTO DE LA GRIS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO.....	144
I.5 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL CITOCROMO P450 TOTAL.....	150
Y SUS ISOFORMAS	
I.6 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL DESARROLLO DE ESTRÉS.....	153
OXIDATIVO	
I.7 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA.....	155
ANTIOXIDANTE	
I.8. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE.....	166
CATALASA Y GLUTATION PEROXIDASA	
I.9 CONCLUSIONES.....	170
I.10 REFERENCIAS.....	175



<b>CAPÍTULO II: ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE EL MODELO DE PROTOPORFIRIA</b>	180
II.1. EFECTO DEL TROLOX, SELENIO Y ACIDO ASCORBICO	180
II.1.1 Introducción	180
II.1.2 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo	181
II.1.3 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante	183
II.1.3 Conclusiones	190
II.2. EFECTO DE LA MELATONINA	192
II.2.1 Introducción	192
II.2.2 Administración de la Melatonina Vía Oral	192
II.2.3 Administración vía intra peritoneal de la Melatonina	193
II.2.3.1 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo	194
II.2.3.2 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante	195
II.2.4 Conclusiones	201
II.3. PROTECCIÓN POR POLIFENOLES	201
II.3.1 Introducción	201
II.3.2 Efectos sobre la Ruta Biosintética del Hemo	203
II.3.3 Efecto de los Polifenoles sobre el Sistema de Defensa Antioxidante	204
II.3.4 Efecto de los Polifenoles sobre el Sistema Metabolizante de Drogas de Fase I - Citocromo P450	209
II.3.5 Conclusiones	211
II.4 REFERENCIAS	213
 <b>CAPÍTULO III: TRATAMIENTO CON ÁCIDOS BILIARES</b>	 216
III.1 INTRODUCCIÓN	216
III.2 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS PRODUCIDAS POR LA GRIS	219
III.2.1 Relación entre el peso del hígado y el peso corporal	219
III. 2.2 Alteraciones Histológicas	219
III.3 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE COLESTASIS	222
III.4 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL METABOLISMO DEL HEMO	224
III.5. ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	226
III.6. ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL SISTEMA METABOLIZANTE DE DROGAS DE FASE I- CITOCROMO P450	231
III.7 CONCLUSIONES	234
III.8 REFERENCIAS	237

<b>CAPITULO IV: TRATAMIENTO CON DESFERRIOXAMINA, CIMETIDINA Y COLESTIRAMINA</b>	242
IV.1 INTRODUCCIÓN	242
IV. 2 TRATAMIENTO CON DESFERRIOXAMINA	242
IV.2.1 Introducción	242
IV.2.2 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo	243
IV.2.3 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante y la enzima del Sistema Metabolizante de Drogas de Fase II, GST	244
IV.2.4 Conclusiones	247
IV. 3 TRATAMIENTO CON CIMETIDINA	248
IV.3.1 Introducción	248
IV.3.2 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo	249
IV.3.3 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante y la enzima del Sistema Metabolizante de Drogas de Fase II, GST	250
IV.3 4 Conclusiones	254
IV. 4 TRATAMIENTO CON COLESTIRAMINA	254
IV.4.1 Introducción	254
IV.4.2 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo	255
IV.4.3 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante y la Enzima del Sistema Metabolizante de Drogas de Fase II, GST	256
IV.4.4 Conclusiones	260
IV.5 REFERENCIAS	261
<b>CAPÍTULO V: TRATAMIENTO CONJUNTO CON ÁCIDOS BILIARES Y... POLIFENOLES</b>	263
V.1 INTRODUCCIÓN	263
V.2 TRATAMIENTO CON ACIDO DESOXICÓLICO Y ÁCIDO CLOROGÉNICO	264
V.3 TRATAMIENTO CON ÁCIDO URSODEOXICÓLICO Y ÁCIDO CLOROGÉNICO	269
V.4 CONCLUSIONES	275
V.5 REFERENCIAS	276
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES FINALES</b>	277
REFERENCIAS	281

## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento

En primer lugar a la Dra. Susana Afonso, por su confianza, apoyo, guía, estímulo y preocupación, incluso hasta en sus últimos momentos de vida

A la Dra. Batlle, Directora del CIPYP y Directora de esta tesis por darme la oportunidad de realizar este proyecto y brindarme todo su apoyo y experiencia.

A Ana María Buzaleh por su invaluable y desinteresada ayuda sin la cual no hubiera sido posible finalizar esta tesis.

A Cuqui, Jimena, Leda por su incondicional colaboración y ayuda en todo momento.

Al Dr. Roberto Meiss porque aún en las circunstancias desfavorables siguió colaborando y asesorandome para la realización de este trabajo

A todos mis compañeros el CIPYP por estar permanentemente atentos y dispuestos a brindarme su ayuda y generar un ambiente cordial y amistoso en todo momento.

A la familia Afonso, que a pesar de los momentos duros siempre tuvieron un pensamiento hacia mí.

A mi familia porque con su amor, apoyo y contención son mi sostén en todo momento.

Y a todos los que de una manera u otra colaboraron para que se llevara a cabo esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado la beca que hizo posible que pueda realizar este proyecto

## ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Radical Superóxido
4-HNE	4-Hidroxinonenal
ACf	Ácido Cafeico
ACl	Ácido Clorogénico
ADh	Acido Dehidrocólico
ADx	Acido Desoxicólico
AE	Ácido Elágico
AE	Actividad Específica
AF	Ácido Ferúlico
AG	Ácido Gálico
AIA	Alil-Isopropil-Acetamida
ALA	Ácido $\delta$ -Aminolevúlico
ALA-D	Ácido $\delta$ -Aminolevúlico Dehidrasa
ALA-S	Ácido $\delta$ -Aminolevúlico Sintetasa
Asc	Ácido Ascórbico
AscH <sup>-</sup>	Ascorbato
AscH <sup>\cdot</sup>	Radical Tricarbonil Ascorbato
BFK	Buffer Fosfato de Potasio
BFS	Buffer Fosfato de Sodio
Cim	Cimetidina
Cole	Colestiramina
COPRO	Coproporfirina
COPROgen III	Coproporfinógeno III
CPGasa	Coproporfinógeno Oxidasa
CPH	Coproporfiria Hereditaria
CYP	Citocromo P450
DDC	3,5-dietoxicarbonil-1,4-dehidrocolina
Dfx	Desferrioxamina
DOVA	Acido 4,5-Dioxovalérico
FAlc	Fosfatasa Alcalina

Fe-Quel	Ferroquelatasa
$\gamma$ -GT	Gama Glutamil Transferasa
GOT	Glutámico Oxalacético Transaminasa
GPT	Glutámico Pirúvico Transaminasa
GPx	Glutation Peroxidasa
GRed	Glutation Reductasa
Gris	Griseofulvina
GSH	Glutation Reducido
GSSG	Glutation Oxidado
GST	Glutation –S-Transferasa
GST	Glutation –S-Transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
HCB	Hexaclorobenceno
HMB	Hidroximetilbilano
HO	Hemooxigenasa
HO $\cdot$	Radical Oxhidrilo o Hidroxilo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IRE	Elemento de Respuesta al Hierro
LDL	Lipoproteína de Bajo Peso Molecular
LOOH $^{\cdot-}$	Hidroperóxidos Lipídicos
MDA	Malondialdehído
Mel	Melatonina
NPA	Nueva Porfiria Aguda
O <sub>2</sub> $^{\cdot-}$	Radical Superóxido
ONOO $^{\cdot-}$	Anión Peroxinitrito
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBGasa	Porfobilinógenasa
PBG-D	Porfobilinógeno Deaminasa
PCE	Porfiria Congénita Eritropoyética
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT	Porfiria Cutánea Tardía
PHE	Porfiria Hepatoeritropoyética

PhO <sup>·</sup>	Radical Fenoxi
PhOH	Antioxidante Fenólico
PPE	Protoporfiria Eritropoyética
PP-ox	Protogen oxidasa
PROTO IX	Protoporfirina IX
PROTOgen IX	Protoporfirinógeno IX
PV	Porfíria Variegata
Que	Quercetina
Queno	Acido Quenodeoxicólico
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
RO <sup>·</sup>	Radical Alcóxido
ROO <sup>·</sup>	Radical Peroxilo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SOD	Superóxido Dismutasa
TBARS	Especies Reactivas del Acido Tiobarbitúrico
TRP	Triptofano Pirrolasa
Tx	Trolox
UE	Unidad Enzimática
URO-D	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
UROgen I	Uroporfirinógeno I
UROgen III	Uroporfirinógeno III
URO-S	Uroporfirinógeno III Sintetasa
Urso	Ácido Ursodeoxicólico

# OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que:

- la mayor complicación en pacientes con PPE reside en el desarrollo de una severa disfunción hepatobiliar, que progresa a una falla hepática que puede ser fatal si no se realiza un trasplante hepático.
- el exceso de producción de PROTO IX en la médula ósea continúa causando recurrencia de la enfermedad hepática en los pacientes transplantados.
- la Gris produce en animales de laboratorio cambios en la patología hepática similar a los encontrados en pacientes con PPE asociada con disfunción hepática,

El principal objetivo de este trabajo fue investigar la posibilidad de revertir o en su defecto reducir el daño hepático causado por la acumulación de porfirinas en el hígado.

## Objetivos específicos

- I. Optimizar el modelo animal de Protoporfirina inducida por Gris, estudiando los efectos de distintas concentraciones y tiempos de tratamiento con el antimicótico sobre: la biosíntesis del Hemo, parámetros indicadores de daño celular, marcadores de estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante y los niveles hepáticos de citocromo P450 y de sus distintas isoformas.
- II. Investigar el efecto, en animales intoxicados con Gris, de la administración “temprana” de los siguientes compuestos:
  - Antioxidantes tradicionales, como  $\alpha$ -Tocoferol, Se, Acido Ascórbico, Melatonina.

- Polifenoles naturales, como Quercetina y los Acidos Clorogénico, Elálgico, Cafeico y Ferúlico.
- Fármacos que fluidifican el flujo biliar, como los ácidos Quenodeoxicólico, Dehidrocólico, Desoxicólico y Ursodeoxicólico
- Fármacos que actúan sobre el ciclo enterohepático, evitando la reabsorción de PROTO IX en el intestino, como la Colesteramina.
- Fármacos que sustraen el exceso de hierro producido por la inhibición de la Fe-Quel como la Desferrioxamina.
- Fármacos que inhiben la actividad de ALA-S como la Cimetidina

III. Estudiar el efecto, en animales intoxicados con Gris, de la combinación del ácido Clorogénico con el ácido Desoxicólico y con el ácido Ursodeoxicólico.



# ***INTRODUCCIÓN***

# CAPÍTULO I

## METABOLISMO DEL HEMO

### I.1. BIOSÍNTESIS DEL HEMO

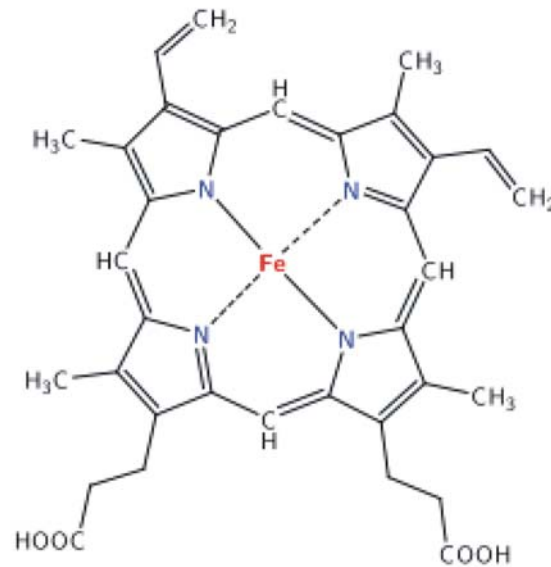
El hemo es una molécula esencial para los organismos aeróbicos, tiene un rol fundamental en varias reacciones biológicas, tales como transporte de oxígeno, respiración, detoxificación de drogas y señales de transducción (Ponka, 1999). La función de la molécula de hemo está determinada por las propiedades de los polipéptidos a los cuales se une (Dawson, 1988). Interacciona con varias apo-proteínas inactivas proporcionando un aumento de la funcionalidad de las hemoproteínas resultantes. En la hemoglobina y mioglobina el hemo transporta y almacena oxígeno respectivamente, mientras que en los citocromos, está involucrado en el transporte de electrones, generación de energía y diversas transformaciones químicas. En catalasas y peroxidasas, el hemo interviene en la degradación de peróxidos y por ende en las diferentes reacciones biológicas en las que participa el peróxido de hidrógeno (Bhattacharyya *et al.*, 1992; Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Además, el hemo es indispensable para otros sistemas enzimáticos, tales como la ciclooxigenasa y la óxido nítrico sintetasa (Seed *et al.*, 1997). Controla la expresión de numerosas proteínas tales como globina, citocromos, mieloperoxidasa, hemooxigenasa, receptores de transferrina y las enzimas del camino de su síntesis (Gidari & Levere, 1977). También regula la diferenciación y proliferación de varios tipos celulares (Chen & London, 1981; Verger, 1983).

El hemo es un tetrapirrol con un hierro coordinado (Figura I.1), en su síntesis están involucradas ocho enzimas, de las cuales la primera y las tres últimas son mitocondriales, y las restantes son citosólicas (Figura I.2).

Las enzimas del camino biosintético del hemo han sido estudiadas intensivamente, en los últimos años se determinó la estructura cristalina de cada una ellas y se clonaron todos los genes involucrados.

El primer paso de este camino metabólico es la condensación de glicina y succinil CoA para formar el ácido  $\delta$ -aminolevúlico (ALA) (Figura I.2). Esta reacción es la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de hemo. Está catalizada por la enzima ALA

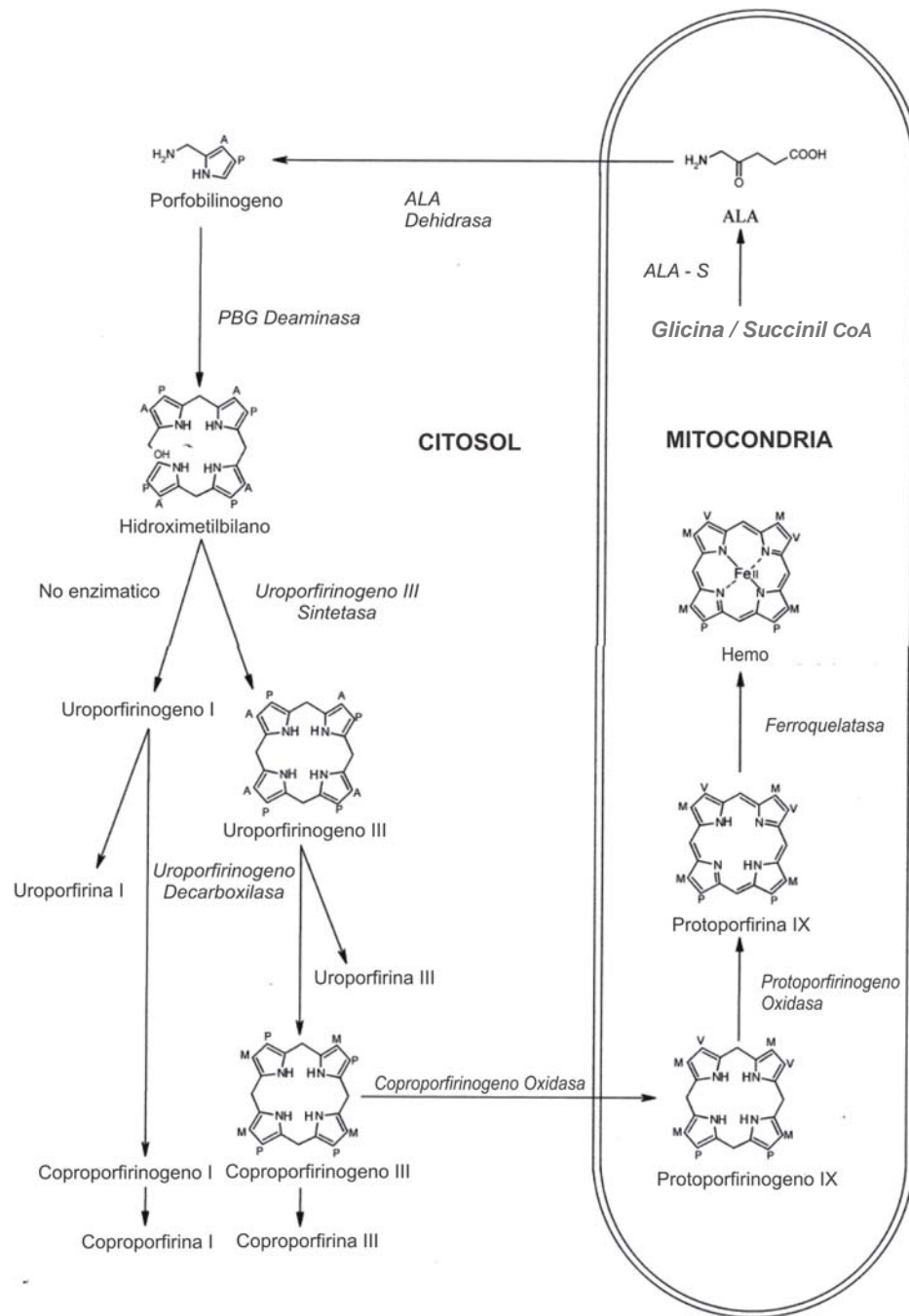
sintetasa (ALA-S) ubicada en la matriz mitocondrial cuya actividad esta regulada por el pool de hemo libre intracelular.



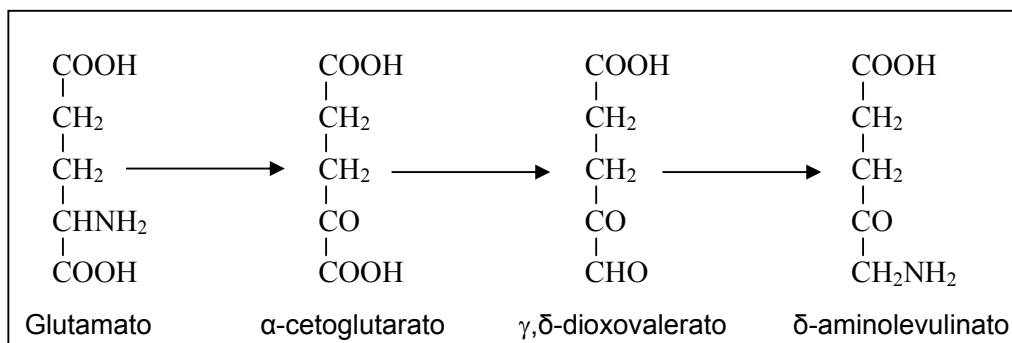
**Figura I.1: Estructura del hemo**

En eucariotas existen dos isoenzimas del ALA-S, ALA-S1 que se expresa ubicuamente, participa de la formación de citocromos y otras hemoproteínas, y ALA-S2 que se expresa sólo en precursores eritroides, es esencial para la producción de hemoglobina y eritrocitos funcionales (Thunell, 2000). El gen que codifica ALA-S1 mapea en el brazo corto del cromosoma 3 (Cotter *et al.*, 1992) mientras que el del ALA-S2 está codificado en el cromosoma X (Cox, *et al.*, 1990). La regulación de estas dos ALA-S está mediada por diferentes mecanismos que tienen en común el requerimiento de fosfato de piridoxal como cofactor y su expresión como homodímeros.

Existe una vía alternativa en plantas y en algunas bacterias para la síntesis de ALA que no involucra glicina ni succinil CoA (Beale & Castelfranco, 1974). En esta ruta el C-1 del glutamato se convierte en el C-5 del ALA, a través de la formación de un intermediario activo, el ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) por acción de la glutamato y DOVA transaminasas (Figura I.3).



**Figura I.2:** Esquema del camino biosintético del hemo  
 A: acetilo, M: metilo, P: propilo, V: vinilo.

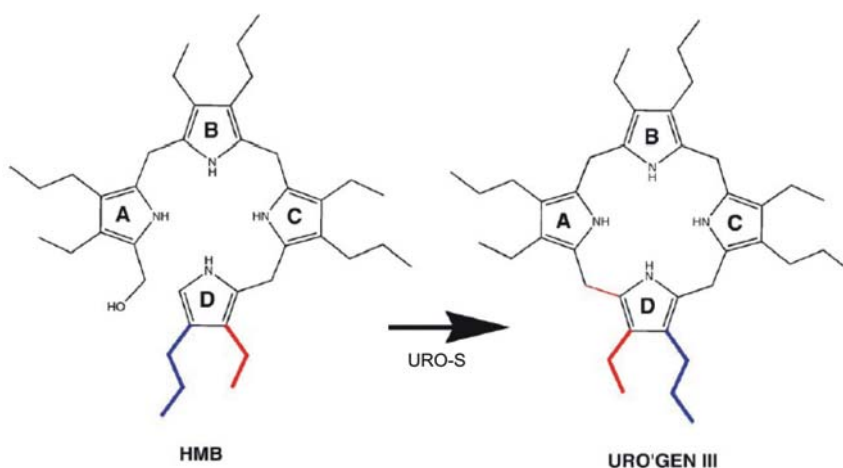


**Figura I.3:** Ruta alternativa para la formación de ALA, a partir de glutamato o α-cetoglutarato vía γ, δ-dioxoalerato.

El ALA formado es transportado activamente al citoplasma (Batlle, 1993). Una vez en el citosol, mediante una reacción de condensación catalizada por la ALA dehidrasa (ALA-D) (EC 4.2.1.24), dos moléculas de ALA forman el monopirrol porfobilinógeno (PBG) (Sassa, 1982, 1998; Jaffe, 1995). Según su estructura cristalina, la enzima ALA-D es un tetrámero de homodímeros, con ocho subunidades, con un sitio activo por dímero (Batlle & Stella, 1978; Anderson & Desnick, 1979; Erskine, *et al.*, 1999; Frankenberg *et al.*, 1999). La enzima requiere ocho átomos de cinc, uno por subunidad, cuatro son esenciales para la catálisis mientras los otros cuatro sirven para estabilizar la estructura terciaria de la enzima (Bevan *et al.*, 1980; Dent *et al.*, 1990; Jaffe *et al.*, 1992). En todos los tejidos la actividad del ALA-D es mucho mayor que la del ALA-S y a diferencia del ALA-S, en humanos está codificada por un solo gen, localizado en el cromosoma 9 (9q34) (Potluri *et al.*, 1987). Esta enzima se usa como marcador de estrés oxidativo ya que los grupos sulfhidrílos que presenta son altamente sensibles a compuestos prooxidantes que afectan su función (Folmer *et al.*, 2003). Es inactivada cuando se reemplaza cinc por plomo, y se demostró que su actividad se inhibe por la presencia de metales pesados como mercurio o aluminio (Rocha *et al.*, 2004).

Cuatro moléculas de PBG se condensan en forma repetitiva cabeza-cola, con eliminación de amonio, para formar un tetrapirrol lineal inestable denominado hidroximetilbilano (HMB). Esta reacción es catalizada por la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) (EC 4.3.1.8). Se ha determinado la estructura cristalina de la PBG-D (Helliwell *et al.*, 2003), actúa como un monómero; el gen que la codifica contiene 15 exones, y mapea en el cromosoma 11 (11q23-11) (Wang *et al.*, 1981).

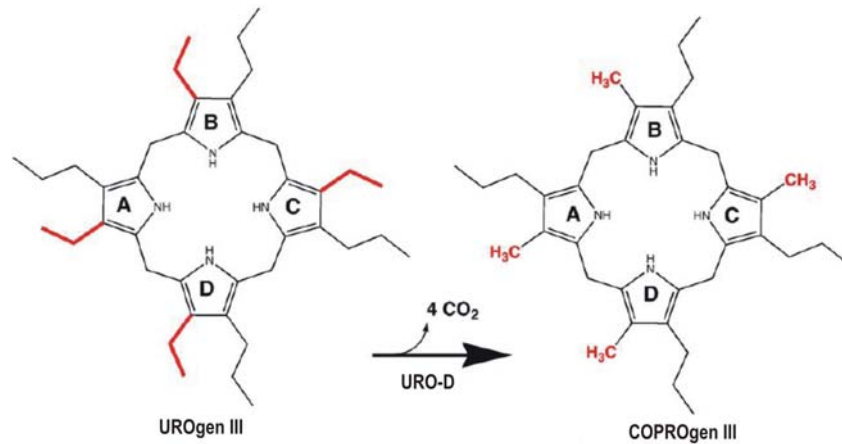
El HMB sirve como sustrato para la uroporfirinógeno III sintetasa (URO-S) o Isomerasa, que cataliza la conversión del tetrapirrol a uroporfirinógeno III (UROgen III) por inversión del anillo D de HMB, seguida por el cierre del macrociclo en forma asimétrica (Figura I.4). También puede ocurrir la ciclación simétrica espontánea de HMB, pero el producto, UROgen I, es biológicamente inactivo y sólo se acumula en el organismo en condiciones patológicas. Según la estructura cristalina de la URO-S humana, es un homodímero (Mathews *et al.*, 2001), y es codificada por un único gen con 10 exones (Aizencang *et al.*, 2000) localizado en el cromosoma 10 (10q25.2-q26.3) (Astrin *et al.*, 1991).



**Figura I.4: Síntesis de uroporfirinógeno III (UROgen III).**  
 Rojo: grupo acetato, azul: grupo propionato

El complejo de ambas enzimas, Deaminasa e Isomerasa, se conoce con el nombre de Porfobilinogenasa (PBGasa)

El UROgen III se convierte en coproporfirinógeno III (COPROgen III) por la decarboxilación secuencial de cuatro grupos acetilos. La decarboxilación del UROgen III comienza en el anillo asimétrico D y procede en el sentido de las agujas del reloj (Smith & Francis, 1979) formando intermediarios de siete, seis, cinco y cuatro carboxilos (Figura I.5). Esta reacción es catalizada por la enzima uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) (EC 4.1.1.37) (Straka & Kushner, 1983), cuya estructura es un homodímero con un sitio activo en cada monómero; en humanos la codifica un único gen en el cromosoma 1 (1p34) (de Verneuil *et al.*, 1984; Dubart *et al.*, 1986). El UROgen I también puede ser decarboxilado a menor velocidad, pero sólo COPROgen III puede continuar con la síntesis de hemo.



**Figura I.5: Síntesis del COPROgen III.**  
 Rojo: grupo acetato, azul: grupo propionato

El COPROgen III es transportado a la mitocondria, allí la enzima Coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa) (EC 1.3.3.3) decarboxila oxidativamente dos grupos propiónicos en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B para dar dos grupos vinilo, produciendo el Protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX) con formación de un intermediario tricarbóxico (Batlle *et al.*, 1965). La CPGasa es una enzima localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria, existen formas oxígeno dependiente y oxígeno independiente de esta enzima, que catalizan la misma reacción. Los mamíferos y otros eucariotes superiores utilizan solamente la forma oxígeno dependiente, la cual libera CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yoshinaga & Sano, 1980). Se ha sugerido que la CPGasa cataliza una inusual decarboxilación oxidativa, independiente de metales y cofactores, en donde el oxígeno molecular actúa como un intermediario aceptor de electrones (Lee *et al.*, 2005). Se determinó la estructura cristalina en humanos (Phillips *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), la enzima funciona como un homodímero (Martasek *et al.*, 1997) y el gen que la codifica está localizado en el cromosoma 3 (3q12) (Cacheux *et al.*, 1994)

El PROTOgen IX se oxida a protoporfirina IX (PROTO IX) por la acción de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PP-ox). La eliminación de los seis hidrógenos requiere oxígeno como un aceptor de electrones terminal. La enzima se sintetiza en el citosol y luego es transportada a la superficie exterior de la membrana interna mitocondrial, es sulfhidrónica, funciona como un homodímero que contiene una unión no

covalente a FAD (Koch *et al.*, 2004). El gen humano de la PP-ox se localiza en el cromosoma 1 (1q2-1q23) (Roberts *et al.*, 1995; Taketani *et al.*, 1995).

La última etapa de este camino ocurre en la superficie interna de la membrana interior de la mitocondria, donde la enzima ferroquelatasa (Fe-Quel) (EC 4.99.1.1), cataliza la inserción de un ión ferroso en el anillo porfirínico de la PROTO IX. La Fe-Quel humana es un homodímero (Wu *et al.*, 2001), requiere de ácido ascórbico y cisteína como agentes reductores. Es oligomérica, sulfhidrónica y está asociada a la membrana interna mitocondrial (Harbin & Dayley, 1985). Cada homodímero de Fe-Quel contiene un grupo (cluster) 2Fe-2S sensible al óxido nítrico (Burden *et al.*, 1999). El gen humano de Fe-Quel se clonó y mapeó en el cromosoma 18 (18q21.3) (Whitcombe *et al.*, 1991).

Una vez formada la molécula de hemo su destino será, como ya se ha señalado, formar parte de las diferentes hemoproteínas como ser hemoglobina, mioglobina, grupo prostético de los citocromos y enzimas tales como peroxidasas, catalasa y triptófano pirrolasa.

## **I.2.CATABOLISMO DEL HEMO**

La destrucción de hematíes senescentes, y la ruptura de la molécula de hemoglobina y de otras hemoproteínas (citocromos, peroxidasas, catalasas y triptófano-pirrolasa) producen moléculas de hemo que se degradan junto con el hemo libre. El 20% del hemo libre se destruye sin incorporación previa a las hemoproteínas (Chowdhury *et al.*, 1989).

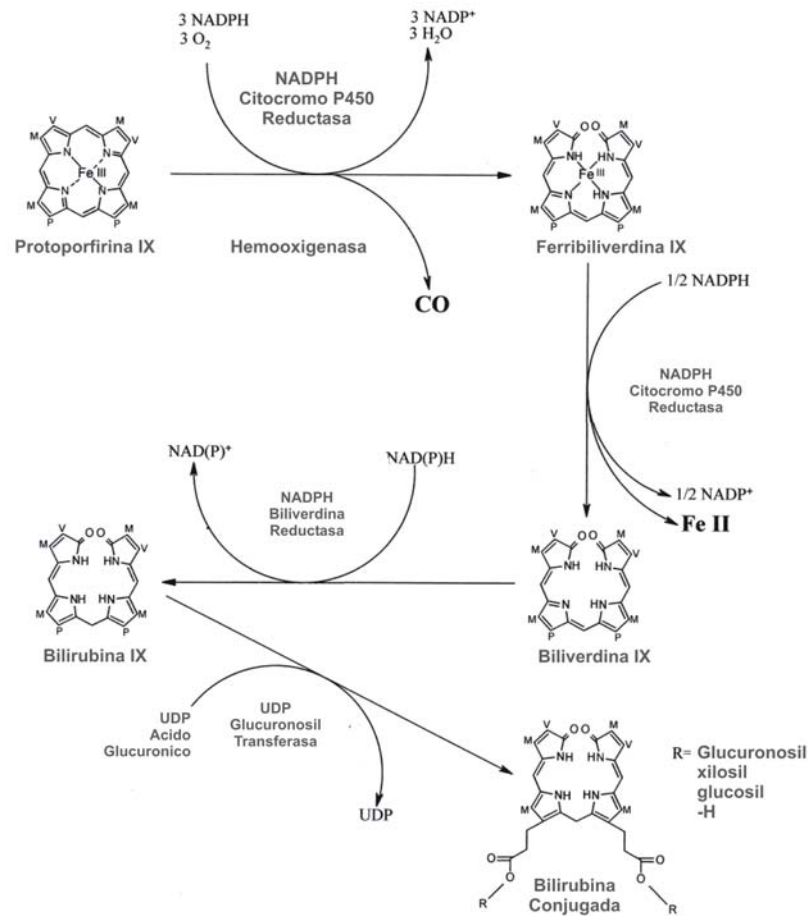
No todas las hemoproteínas se degradan con igual rapidez: la hemoglobina lo hace entre los 110 a 120 días de vida de los eritrocitos, mientras que los CYPs y algunas otras hemoproteínas se degradan en el hígado más rápidamente.

El catabolismo del hemo es de gran importancia por sus implicaciones clínicas, como la síntesis de pigmentos biliares y, en las plantas, por dar lugar a fotocromos y fitocianinas.

En mamíferos, el hemo se cataboliza a biliverdina, CO e hierro por la acción de la hemooxigenasa microsomal (HO) (Maines, 1988) (Figura I.6). Esta proteína es la primer



enzima y además, limitante de la velocidad de degradación del hemo, que requiere la actividad concertada del NADPH y la citocromo P450 reductasa microsomal (Docherty *et al.*, 1984; Kutty *et al.*, 1988).



**Figura I.6: Catabolismo del Hemo**

La HO no es una hemoproteína por naturaleza, se une al hemo formando un complejo 1:1. Es una proteína simple de 32 kDa que no necesita ningún grupo prostético para la activación del  $\text{O}_2$  (Yoshida & Kikuchi, 1978a, 1979); esta activación se produce por el sustrato hemo y sus dos intermediarios,  $\alpha$ -mesohidroxihemo y verdohemo (Figura I.7). El hemo se une a la HO en una posición específica para formar el complejo hexacoordinado hemo-enzima (Takahashi *et al.*, 1994), estudios de resonancia Raman sugirieron que los seis ligandos son agua e hidroperóxido.

La reacción con la HO comienza con la formación del complejo Hemo férrico – HO, el hierro luego es reducido a estado ferroso por el primer electrón donado por la

NADPH-citocromo P450 reductasa (Yoshida & Kikuchi, 1978b). Posteriormente, el oxígeno molecular se une al complejo para formar una oxi-forma metaestable (Yoshida *et al.*, 1980). El hierro unido al oxígeno se convierte en un intermediario hidroperóxido ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ), recibiendo otro electrón desde la reductasa y un protón desde el agua de una posición distal del complejo. Finalmente, el oxígeno terminal de  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$  ataca el carbono  $\alpha$ -meso del anillo de la PROTO IX para formar  $\alpha$ -meso-hidroxihemo (Davydov *et al.*, 1999).

Esta especie de hemo reacciona con  $\text{O}_2$  molecular, con consumo de un electrón, para formar el complejo verdohemo ferroso-HO y CO (Mansfield Matera *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1999) (Figura I.7). Por un mecanismo aún desconocido, el verdohemo se degrada a biliverdina férrica con consumo de oxígeno y equivalentes de reducción (Yoshida & Noguchi, 1984; Wilks & Ortiz de Montellano, 1993). Sólo la isoforma verdohemo IX $\alpha$  puede ser convertida a biliverdina IX $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2003). Luego, el complejo oxi-verdohemo IX $\alpha$ -HO es transformado al quelato férrico biliverdina via un intermediario hidroxoperóxido, unido aún a la proteína HO. Para la liberación del hierro y biliverdina, completando así la reacción total de la HO, el hierro en forma férrica de la biliverdina es reducido a la forma ferrosa por la reductasa (Yoshida & Kikuchi, 1978b) (Figura I.7)

El clivaje de la molécula de hemo puede ocurrir en cualquiera de los cuatro carbonos meso de los puentes meteno; la función de la HO es unir la molécula de hemo de tal modo que el clivaje ocurra en la posición  $\alpha$  (Kutty & Maines 1982).

La biliverdina se convierte rápidamente en bilirrubina por la enzima citosólica biliverdina reductasa (EC 1.3.1.24), presente en el hígado, riñón, músculo, cerebro, con consumo de NADPH (Montellano, 2000) (Figura I.6). La bilirrubina formada es insoluble en agua, por lo tanto para poder ser eliminada por medio del líquido biliar se glucuroniza en el hepatocito gracias a la actividad del sistema enzimático glucuroniltransferasa o bilirrubina uridinfosoglucuronil-transferasa (EC. 2.4.1.17).

La degradación del hemo ocurre fundamentalmente en el bazo y en el hígado. En situaciones de hemólisis, los hepatocitos y las células tubulares renales son activas degradadoras de la hemoglobina.

La vía metabólica terminal del catabolismo de hemo, es la transformación de la bilirrubina conjugada en urobilinoídes, grupo constituido por D-Urobilinógeno,

estercobilina y urobilina. Son las bacterias intestinales las encargadas de esta desconjugación de la bilirrubina. Una pequeña cantidad del urobilinógeno fecal es absorbido por el intestino para ser casi totalmente re-excretado por el hígado (Billing, 1982).

La HO es una enzima microsomal cuya actividad está elevada en el bazo, lugar de destrucción de los hematíes senescentes o hemocateresis esplénica, aumentando su actividad en situaciones de hemólisis. También existe actividad de HO en el hígado (en los hepatocitos y en las células de Kupffer), y en muchos otros órganos, en los que tiene capacidad protectora celular contra la lesión oxidativa (Ossola *et al.*, 2000; Rytter & Tyrrell, 2000; Tomaro & Batlle, 2002). La Dra. Tomaro ha demostrado asimismo, por primera vez, la participación de la HO en el sistema de defensa antioxidante en tejidos vegetales (Noriega *et al.*, 2004; Balestrasse *et al.*, 2005).

La HO, además de ser la enzima encargada de degradar el hemo, juega un rol significativo de protección celular ante el estrés oxidativo. Se han identificado tres isoformas de la HO, HO-1, HO-2 y HO-3 (Maines, 1997, Mc Coubry *et al.*, 1997), que son productos de diferentes genes y su expresión difiere mucho según los tipos celulares, distribución tisular y regulación (Panahian *et al.*, 1999). La HO se expresa virtualmente en todas las formas vivientes, tanto en bacterias procarióticas, como en hongos, plantas y humanos, regulando un amplio espectro de procesos celulares (Terry *et al.*, 2002; Tomaro & Batlle, 2002). El gen que expresa la HO-1 es fuertemente inducido por hipoxia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, depleción celular de GSH y hemo (Immenschuh & Ramadori, 2000). La HO-1 tiene un rol vital en el mantenimiento de la homeostasis del hemo celular además de su degradación (Maines, 2000). La inducción de HO-1 protege a la célula del daño por isquemia/reperfusión, estrés oxidativo, inflamación, refección de transplante, apoptosis, entre otras (Melo *et al.*, 2002). El hemo, estimula la expresión de la HO-1, que juega un papel importante como anti-oxidante, citoprotectora y antiinflamatoria, por la generación de moléculas beneficiosas como CO, bilirrubina y ferritina, a través del catabolismo del mismo hemo, el cual es tóxico para el organismo.

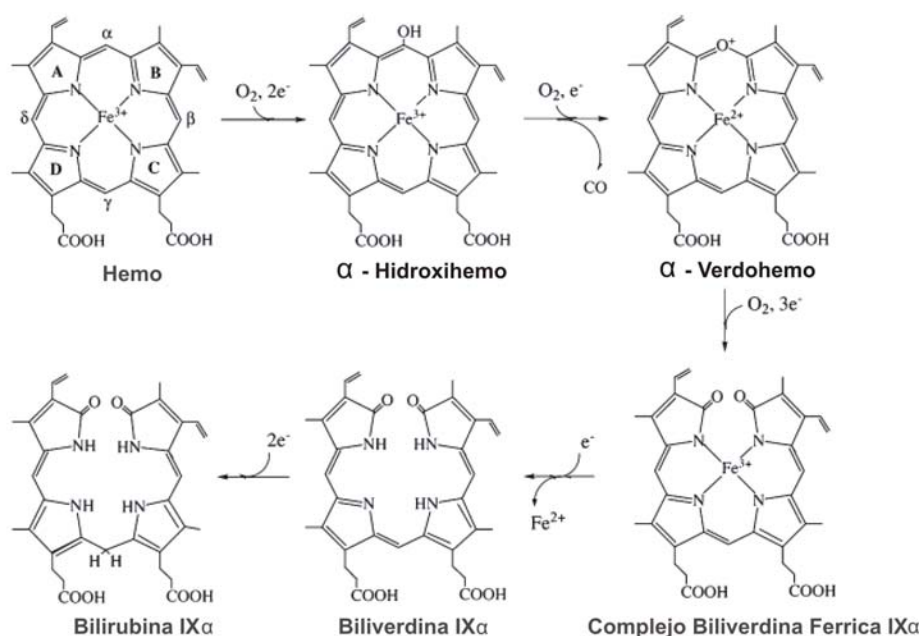
La bilirrubina, se considera un relevante anti-oxidante potencial de significancia fisiológica (Stocker *et al.*, 1987; Tomaro & Batlle, 2002).

El CO, a su vez, cumple varias funciones importantes. Controla la actividad de algunas hemoproteínas, tales como citocromo-P450, ciclooxigenasas, guanilil ciclasa y NO sintasa (Kappas & Drummond, 1986; Haider *et al.*, 2002). Por activación de la guanilil

ciclasa puede producir vasodilatación (Maines, 1997). Modula el tono muscular regulando la formación de endotelina-1 (Coceani *et al.*, 1997). Tiene efecto antiinflamatorio, inhibiendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Otterbein *et al.*, 2000).

La HO-1 estimula la inducción de la síntesis de ferritina, mientras que su inhibición la disminuye (Eisenstein *et al.*, 1991, 1994). Sabemos que la ferritina secuestra el hierro libre y protege a la célula de los efectos adversos que puede producir este metal.

Se considera que las isoformas HO-2 y HO-3 funcionarían como primera defensa contra el daño oxidativo/inflamatorio. La HO-2 se expresa principalmente en cerebro y testículos y protege a las neuronas contra el estrés oxidativo.



**Figura I.7:** Intermediarios en la vía del catabolismo del hemo

### I.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HEMO

Los niveles celulares de hemo están estrechamente regulados, esto se logra por un fino balance entre su síntesis y su catabolismo. Los requerimientos de hemo varían significativamente entre las distintas células y tejidos. La máxima producción de hemo ocurre en los eritrocitos en desarrollo, allí se sintetiza aproximadamente el 85% del hemo

total. El segundo órgano en importancia es el hígado, con una diferencia entre ambos, de aproximadamente un orden en la velocidad de síntesis. Consecuentemente, la hemoglobina provee la mayor parte del hemo que se cataboliza principalmente en macrófagos, aunque todas las células pueden degradarlo, con excepción de los eritrocitos maduros y algunas otras células altamente diferenciadas.

La regulación de la síntesis de hemo es específica del tejido. Diferencias en el metabolismo de hierro y en los genes de ALA-S, la primera enzima de la biosíntesis de hemo, son responsables de las diferencias en la regulación y velocidad de síntesis en células eritroides y no eritroides.

Como ya hemos señalado existen dos isoenzimas del ALA-S, codificadas por diferentes genes ubicadas en distintos cromosomas. El gen del ALA-S1 se expresa ubicuamente, aunque fundamentalmente en el hígado, mientras que la expresión del ALA-S2 es específica para células eritroides.

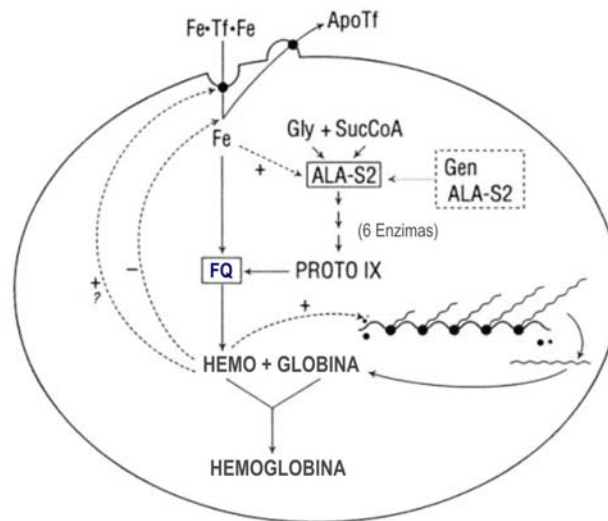
Ambas formas contienen una secuencia blanco mitocondrial terminal con un motivo (“motif”) de respuesta al hemo (Lathrop & Timko, 1993) cuya unión bloquea la importación a la mitocondria del precursor del ALA-S, representando un punto post-traducciona l de inhibición por producto final. Se ha demostrado que la unión del hemo a este motivo es funcional sólo en el ALA-S1 (Munakata *et al.*, 2004).

Tanto ALA-S1 como ALA-S2 son reguladas transcripcionalmente por mecanismos completamente diferentes (Srivastava *et al.*, 1988; Surinya *et al.*, 1997; Roberts & Elder, 2001). Además del efecto post-traducciona l que afecta la importación a mitocondria, el hemo inhibe la transcripción del ALA-S1.

En eritrocitos, el hemo no inhibe ni la síntesis ni la actividad del ALA-S2 (Sassa & Nagai, 1996; Ponka, 1997), pero sí el suministro de hierro desde la transferrina (Ponka & Neuwirt, 1969; Ponka *et al.*, 1974, 1988; Schulman *et al.*, 1974; Iacopetta & Morgan, 1984; Cox *et al.*, 1985; Hradilek & Neuwirt, 1989). La regulación transcripcional del ALA-S2 es mediada por factores eritroides específicos, los cuales interactúan con una secuencia en la región promotora, presente en muchos genes regulados diferencialmente en células eritroides (Srivastava *et al.*, 1988). El ARNm del ALA-S2 contiene un elemento de respuesta al hierro (IRE) (“iron-responsive element”) localizado en la región 5’ no codificante. Esta localización del IRE hace que la traducción del ARNm del ALA-S2 dependa de la disponibilidad de hierro (Klausner *et al.*, 1993; Hentze & Kühn, 1996;

Ponka, 1997, Richardson & Ponka, 1997). Por lo tanto, en células eritroides, la disponibilidad de hierro antes que la producción de ALA, es por definición el paso limitante de la velocidad de la síntesis de hemo. El IRE está presente en todas las formas eritroides de ARNm de ALA-S en vertebrados (Duncan *et al.*, 1999), en los cuales la expresión de ALA-S2 y por lo tanto la producción de hemoglobina, está influenciada por el contenido intracelular de hierro.

Estudios *in vivo*, tanto en humanos como en ratones, demostraron que todo el hierro utilizado para la síntesis de hemoglobina proviene de la transferrina, la enzima transportadora de hierro en circulación. El IRE también se encuentra en la región 5' no codificante de los ARNm específicos de la ferritina y el receptor de la transferrina (Dierks, 1990; Cox *et al.*, 1991; Dandekar, *et al.*, 1991). Por lo tanto la traducción de estas proteínas también depende de la disponibilidad de hierro, sugiriendo que la maquinaria transportadora de este metal, en células eritroides, es una parte integral de la biosíntesis de hemo (Ponka, 1997) (Figura I.8).



**Figura I.8: Regulación de la síntesis de hemo en células eritroides**

Además, en células eritroides, los niveles de PROTO IX están acoplados a la disponibilidad de hierro como resultado de la inducción traduccional del ALA-S2 por el hierro.

Por otra parte, en células eritroides, el hemo aumenta la transcripción del gen de globina, que es esencial para la traducción de esta proteína y suministra además, el grupo prostético para el ensamble de la hemoglobina.

Otro rasgo importante del ALA-S2, con posible implicancia en la regulación de la síntesis de hemo en eritrocitos, es que esta enzima está asociada con la succinil CoA sintetasa (Furuyama & Sassa, 1998). Se vió que la succinil CoA sintetasa sirve como proteína de anclaje para el ALA-S2 y puede proveer succinil CoA más eficientemente al ALA-S (Furuyama & Sassa, 1998).

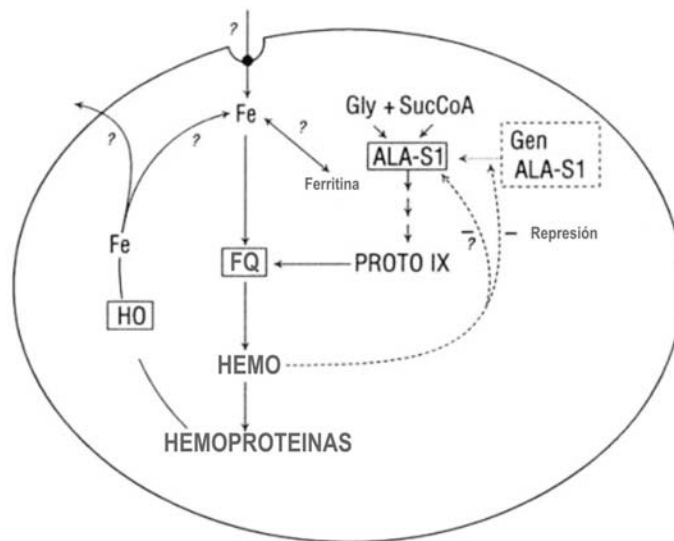
Se observó que si se suministra un flujo continuo de hierro a la mitocondria, se inhibe significativamente la síntesis de Fe-Quel (Richardson *et al.*, 1996). Se ha propuesto, que una vez que el hierro es liberado por la transferrina a un endosoma en la mitocondria, éste se transfiere directamente a la Fe-Quel por medio de transportadores unidos a la membrana (Dent *et al.*, 1990; Jaffe, 1995).

En los hepatocitos existe un pool de hemo libre que sirve como precursor y regulador de su síntesis. En cultivos primarios de hepatocitos de ratas adultas, se vio que el 20% del hemo recién formado es convertido directamente a pigmentos biliares, mientras que el 80% restante es utilizado para la formación de hemoproteínas (Grandchamp *et al.*, 1981). Esto indicaría que en el hígado, el hemo se forma en un pequeño exceso por encima de las necesidades metabólicas. En eritrocitos, la función del hemo libre es aún enigmática, se vió que se incrementa en la mitocondria cuando la célula se trata con inhibidores de la síntesis proteica (Ponka *et al.*, 1973). Esto sugiere que cadenas de globina son probablemente necesarias para la liberación del hemo en mitocondria.

El control de hemo en hepatocitos ha sido muy estudiado. Se sabe que el pool de hemo libre ejerce una regulación por retroalimentación negativa sobre la transcripción, traducción y actividad del ALA-S (Ibrahim *et al.*, 1983; Bonkowsky, 1991) (Figura I.9) Debido a que el hemo inhibe la entrada del ALA-S en la mitocondria, donde se genera el sustrato de la enzima succinil- CoA, el hemo libre también podría afectar la síntesis de hemo actuando sobre la entrada del ALA-S a la mitocondria (Hayashi *et al.*, 1983; Srivastava *et al.*, 1983).

Ya hemos dicho que la biodegradación del hemo está regulada por la actividad de la HO (Goldberg & Moore, 1980; Ibrahim *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1987; Schacter, 1988). La relación inducción/inhibición de esta enzima por iones de metales de transición y

metaloporfirinas, es un componente regulatorio, por su acción sobre el estado reducido de grupos sulfhidrilos (Schacter, 1988). Se ha demostrado que la administración de hierro, induce la HO, pero sólo cuando el citocromo-P450 se induce al mismo tiempo, observándose así una mayor inducción por efecto sinérgico (Bonkowsky, 1991). La obstrucción biliar puede incrementar la actividad de la HO, sugiriendo cierto rol de los ácidos biliares primarios en la regulación del hemo libre (Nakahashi *et al.*, 1990). Estas observaciones conducen al concepto actual, de que el hemo libre regula la síntesis del ARNm de la HO (Schacter, 1988).



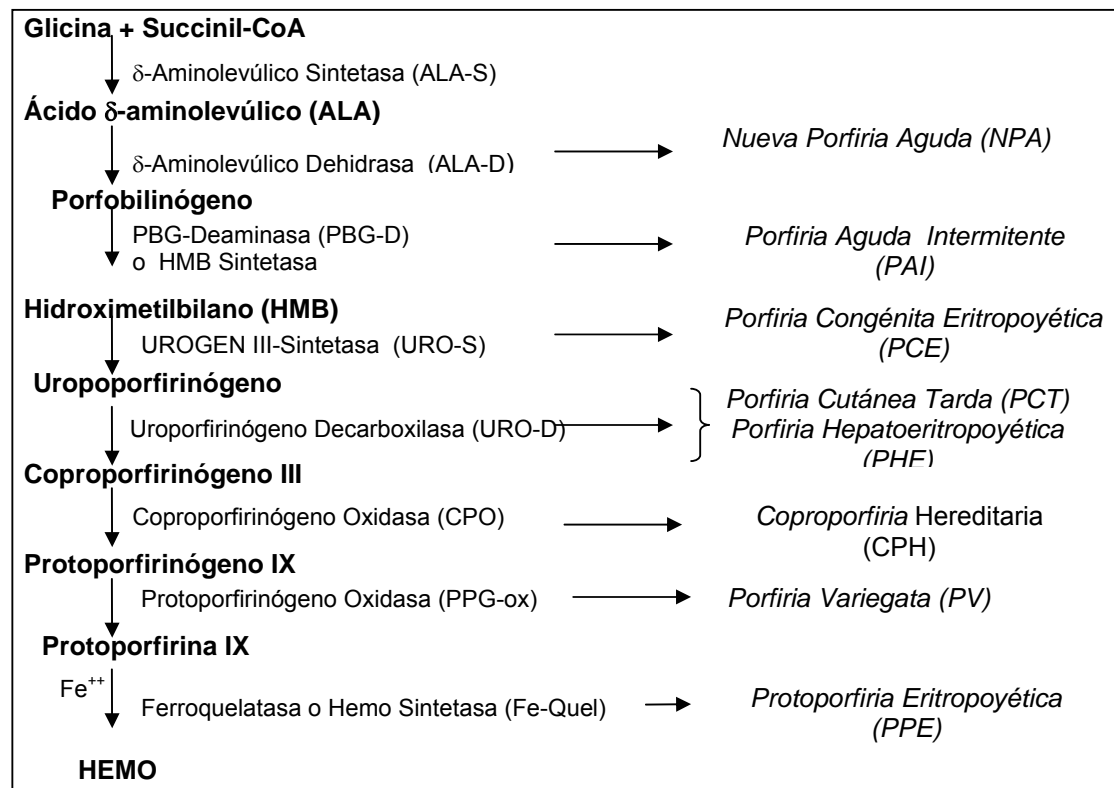
**Figura I.9:** Regulación de la síntesis de hemo en células no eritroides

En 1981, Sassa y Kappas calcularon que en condiciones normales 65% del ALA-S se utiliza para producir citocromo-P450, 15% para catalasa peroximal, 6% para citocromos mitocondriales y 8% para citocromo b<sub>5</sub>. Por inducción de la síntesis del ARNm de apoproteínas, el pool de hemo libre puede regular la biosíntesis de hemoglobina, de citocromos mitocondriales y microsomales y de enzimas que contienen hemo (Peterson *et al.*, 1980; Ibrahim *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1987; Bottomley & Muller-Eberhard, 1988; Schacter, 1988).



## I.4. PORFIRIAS

Las porfirias humanas son desórdenes metabólicos, hereditarios o adquiridos, que resultan de la deficiencia parcial de una de las enzimas del camino biosintético del Hemo, con excepción de la primera enzima de la síntesis, ALA-S (Figura I.10). Mutaciones eritroide específicas en el gen del ALA-S (ALA-S2) están asociadas con la anemia sideroblástica ligada al cromosoma X, mientras que no se han encontrado desórdenes metabólicos asociados al gen del ALA-S1 (Batlle, 1997; Anderson *et al.*, 2001).

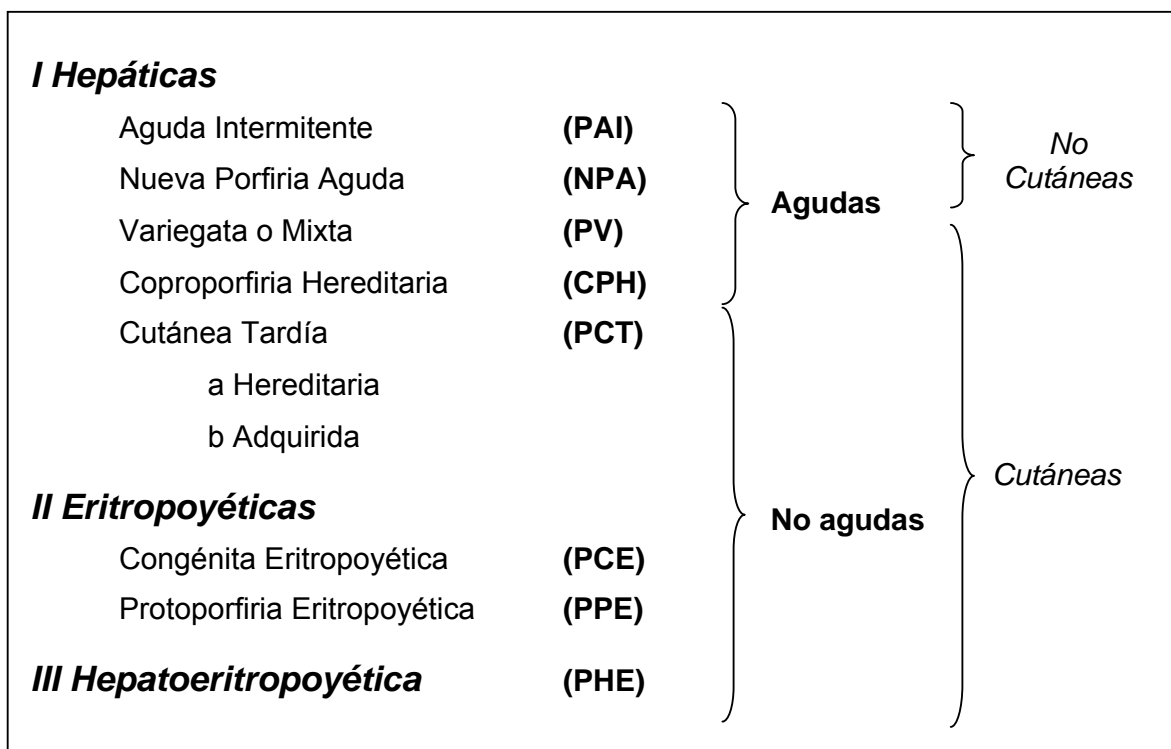


**Figura I.10:** Biosíntesis del Hemo: Enzimas involucradas y Porfirias asociadas

Existen 8 tipos de porfirias, en cada una de ellas, como consecuencia de la deficiencia enzimática específica, se produce un patrón característico de incremento y acumulación de precursores de hemo en sangre, orina y heces (Batlle, 1997), que provoca síntomas particulares que permiten llegar, generalmente, a su diagnóstico preciso (Deacon & Elder, 2001).

En estas enfermedades existen dos tipos de manifestaciones clínicas que pueden presentarse separada o conjuntamente: ataques neurovisceral agudos, asociados con el incremento de ALA y PBG; o signos cutáneos que resultan de la fotosensibilización de las porfirinas acumuladas, en circulación o depositadas en la piel. Según estas manifestaciones, las Porfirias se clasifican en (Esquema I.11):

- i) *Agudas*: Nueva Porfiria Aguda (NPA), Porfiria Aguda Intermitente (PAI).
- ii) *Cutáneas*: Porfiria Cutánea Tardía (PCT), Protoporfiria Eritropoyética (PPE), Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE), Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE).
- iii) *Mixtas*: Porfiria Variegata (PV) y Coproporfiria Hereditaria (CPH).



**Esquema I.11: Clasificación de las Porfirias**

Si bien el hemo se sintetiza en todas las células nucleadas los principales sitios de síntesis son el hígado y la médula ósea. De acuerdo al órgano en el cual se produce la acumulación de porfirinas o sus precursores, las porfirias se clasifican en (Tabla I.1):

- i) *Hepáticas*: NPA, PAI, PCT y PV
- ii) *Eritropoyéticas*: PCE y PPE
- iii) *Hepatoeritropoyéticas*: PHE

Todas las porfirias son desórdenes genéticos, con la única excepción de la PCT, que puede presentarse también en forma adquirida o esporádica (tipo I). Cinco porfirias se heredan en forma autosómica dominante, con penetrancia incompleta (PAI, PCT, PV, PPE, CPH), sin embargo, se han descrito formas autosómicas recesivas y también son posibles patrones más complejos de herencia (Gouya *et al.*, 2004). Las otras tres porfirias se heredan en forma autosómica recesiva (Tabla I.1) (Anderson *et al.*, 2001).

Los genes que codifican para las enzimas del metabolismo del hemo han sido clonados y caracterizados (Tabla I.1) (Batlle, 1997; Anderson *et al.*, 2001). En cada una de ellas se han detectado varias mutaciones responsables de las diferentes porfirias lo que demuestra su heterogeneidad genética (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org/>). La mayoría de las mutaciones provocan una disminución de la funcionalidad de la proteína específica, aunque la actividad enzimática codificada por el alelo normal es suficiente para mantener el requerimiento fisiológico de hemo en los pacientes. Factores adicionales que afectan el camino biosintético del hemo, ya sea aumentando la demanda de hemo, produciendo una disminución adicional de la actividad enzimática o la combinación de ambos, serían responsables de las manifestaciones clínicas. Estos factores pueden ser: un descenso adicional en la actividad enzimática como resultado de una inhibición directa órgano-específica de la enzima o provocado por algún factor genético que afecte la eficiencia de la transcripción y/o traducción del alelo trans, como se ha descrito para la PPE (Gouya *et al.*, 2004); influencia de genes distintos de aquellos directamente involucrados en la biosíntesis del hemo, como se ha descrito para el gen de la hemocromatosis en el desarrollo de la PCT (Méndez *et al.*, 2005); exposición a drogas, hormonas, estrés, ayuno, que disminuyen aún más el pool de hemo libre, aumentando el nivel de represión del ALA-S, lo que produce una mayor inducción de su síntesis y actividad. La disminución adicional del pool de hemo libre, se puede producir ya sea por aumento de su utilización para formar las hemoproteínas necesarias para la detoxificación o incrementando su degradación por inducción de la HO (Rossetti y col., 2006).

**Tabla I.1: Características de las porfirias**

Porfiria	Clasificación	Herencia	Gen y mutaciones	Sitio de sobreproducción de precursores de hemo	Principales síntomas clínicos
NPA	Aguda	Autosómica recesiva	7 mutaciones en gen ALAD en cromosoma 9q34	hígado	Ataques agudos o neuropatía crónica
PAI	Aguda	Autosómica dominante	227 mutaciones en gen PBGD en cromosoma 11q23.3	hígado	Ataques agudos
PCE	Cutánea	Autosómica recesiva	35 mutaciones en gen UROS en cromosoma 10q25.2 –q26.3	Células eritroides	Fotosensibilidad severa y hemólisis
PCT	Cutánea	Autosómica dominante o adquirida	70 mutaciones en gen UROD en cromosoma 1q34	hígado	Fragilidad cutánea y enfermedad hepática crónica
PHE	Cutánea	Autosómica recesiva	Mutaciones compartidas con la PCT	Células eritroides hígado	Fragilidad cutánea y posible enfermedad hepática crónica
CPH	Mixta	Autosómica dominante	36 mutaciones en gen CPOX en cromosoma 3q12	hígado	Ataques agudos y fragilidad cutánea
PV	Mixta	Autosómica dominante	121 mutaciones en gen PPOX en cromosoma 1q22	hígado	Ataques agudos y fragilidad cutánea
PPE	Cutánea	Autosómica dominante	74 mutaciones en gen FECH en cromosoma 18q21.3	Células eritroides	Fotosensibilidad, y posible enfermedad hepática

Estudios de la estructura tridimensional de las enzimas recombinantes, establecida por cristalografía de rayos X (Brownlie *et al.*, 1994; Al-Karadaghi *et al.*, 1997; Whitby *et al.*, 1998; Mathews *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2004) y de expresión (Christiansen & Ged, 1999; Lamoril *et al.*, 2001; Shady *et al.*, 2002; Gouya *et al.*, 2004), permitieron conocer los procesos intracelulares producidos como consecuencia de la acción de las enzimas mutadas, dilucidando posibles mecanismos patogénicos a nivel celular.

Se ha tratado de establecer la correlación genotipo-fenotipo en porfirias agudas y cutáneas, aunque los resultados no son aún concluyentes (von und zu Fraunberg *et al.*, 2002 y 2005; Andersson *et al.*, 2000; Minder *et al.*, 2002; Wiman *et al.*, 2003). La penetrancia de estas enfermedades es incompleta y no todos los portadores de la falla genética tienen manifestaciones clínicas, así, como se ha indicado, otros genes mutados y

factores ambientales tienen un rol crucial en el fenotipo porfírico (Andersson *et al.*, 2000; Bulaj *et al.*, 2000; Christiansen *et al.*, 2000; Whatley *et al.*, 2000; von und zu Fraunberg *et al.*, 2002, 2005; Hift *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2005).

La sobreproducción de porfirinas y/o sus precursores son los responsables de las manifestaciones clínicas de las porfirias. Los mecanismos patogénicos en las diferentes porfirias varían y no existe un tratamiento universal (Mustajoki & Nordmann, 1993; Meyer *et al.*, 1998; Schneider-Yin *et al.*, 2000a).

Las porfirias son panétnicas y su prevalencia varía de 0,5 a 10 /100.000 en diferentes poblaciones (Anderson *et al.*, 2001). Por ello y debido a que sus síntomas se mimetizan con otras enfermedades a veces mal diagnosticadas, son necesarios estudios bioquímicos específicos y sensibles, y en algunos casos estudios genéticos para llegar a su diagnóstico preciso (Hindmarsh *et al.*, 1999; de Rooij *et al.*, 2003).

## **I.5 PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA**

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE) es una porfiria hereditaria producida por una actividad deficiente de la Fe-Quel (EC.4.99.1.1), la última enzima de la biosíntesis del hemo que cataliza la inserción de Fe<sup>2+</sup> en la PROTO IX (Bottomley *et al.*, 1975; Sassa, 2000). Como consecuencia se produce la acumulación de PROTO IX en piel, médula ósea, eritrocitos, plasma, hígado y heces (Kappas *et al.*, 1989; Bloomer, 1998).

Fue descrita primeramente en un ambiente pediátrico por Kosenow y Treibs en 1953, pero recién años después en 1961 fue difundida por Langhoff *et al.* (1961) y Magnus *et al.* (1961). Fue el dermatólogo Magnus quien la denominó Protoporfirina Eritropoyética (Batlle, 1997).

Las dos manifestaciones clínicas principales de la PPE son la fotosensibilidad y la enfermedad hepatobiliar, ambas asociadas a las anormalidades bioquímicas. Todos los pacientes sintomáticos tienen fotosensibilidad debido al daño producido por la PROTO IX en la piel (Poh-Fitzpatrick, 1986). La enfermedad hepática, la menos común de las manifestaciones clínicas, se debe al efecto tóxico de la porfirina sobre la estructura y función del hígado (Bloomer *et al.*, 1975; Avner *et al.*, 1981; Doss & Frank, 1989; Meerman *et al.*, 1999). En la forma más severa la enfermedad hepática avanza

progresivamente hasta llegar a cirrosis y a la necesidad de trasplante hepático (Bloomer *et al.*, 1996). La PROTO IX se origina principalmente en tejido eritroide, el origen hepático de esta porfirina es probablemente de menor importancia y por lo tanto el incremento en la excreción de PROTO IX y la fotosensibilidad no se modifican después del trasplante hepático en estos pacientes (Scholnick *et al.*, 1971).

Un 25% de los pacientes con PPE pueden presentar una leve anemia miocítica e hipocrómica, con una concentración de hemoglobina disminuída (Deleo *et al.*, 1976). El examen de la médula ósea muestra depósitos de hierro intramitocondrial y sideroblastos, posiblemente por defectos en la utilización del hierro (Schwarzenberg & Sharp, 1996). Pueden existir evidencias de hemólisis débil por fotoactivación de los eritrocitos conteniendo la porfirina (Mathews-Roth, 1974; Key *et al.*, 1992).

### **I.5.1 Manifestaciones Cutáneas**

La patología cutánea se debe a la fotoactivación de la PROTO IX en la vasculatura dérmica, proveniente de los eritrocitos y el plasma.

La fotosensibilización cutánea se inicia en la niñez y juventud, principalmente en primavera y verano, por la mayor intensidad de radiación solar (Key *et al.*, 1992; Murphy, 1999). También puede agravarse por la exposición al calor o gradientes de temperatura (Poh-Fitzpatrick, 1989; Varma *et al.* 2000).

La PROTO IX es hidrofóbica y se disuelve en las membranas celulares. Su acumulación en la piel produce fotosensibilización en las zonas expuestas (caras y manos), con ardor, sensación de quemazón, eritema con prurito, edema, pápulas, urticaria, petequias, y en algunos casos vesículas y ampollas que si se erosionan van seguidas de costras residuales. Los episodios pueden durar de minutos a días, la sucesiva repetición de estos ataques pueden ocasionar hiperqueratosis, liquenificación y onicólisis. En casos excepcionales se puede presentar hiperpigmentación e hipertriosis.

La examinación histológica de piel fresca lesionada muestra vacuolas intracelulares y edema intercelular en la epidermis, acompañado por cambios inflamatorios agudos y glóbulos rojos extravasados. En la exposición crónica, mediante microscopía electrónica, se observan defectos progresivos en la reduplicación del basamento de la membrana de las

paredes de los vasos sanguíneos superficiales, con la consecuencia del daño endotelial fotoinducido (Thunell *et al.*, 2000).

El carácter hidrofóbico de la PROTO IX facilita su transferencia a través de las membranas de los eritrocitos a la célula endotelial con un adecuado gradiente de concentración. Los capilares dérmicos en contacto cercano entre eritrocitos y células epiteliales permiten esta transferencia.

Las porfirinas se caracterizan por un espectro de absorción con pico máximo entre 400 y 410 nm y con picos de absorción de menor magnitud entre 500 y 640 nm. Las porfirinas en estado oxidado inducen efectos fotodinámicos en los tejidos cutáneos y elementos subcelulares cuando se las expone a la luz UV y a la luz visible de longitud de onda corta (360-420nm) o longitudes de onda infrarrojas (640-700nm). No hay una única explicación para la fotosensibilidad inducida por las porfirinas y la luz; hay varios factores que interactúan para producir las lesiones características. La PROTO IX por efecto de la luz UV llega a un estado excitado y de esta forma reacciona con moléculas biológicas como el oxígeno, formando radicales libres, que transfieren su energía a lípidos, otras macromoléculas o agua. Como consecuencia se forma peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos que lesionan las membranas de las células con alto contenido graso, como los eritrocitos y las células de la piel. Existe evidencia que el daño en la pared de los vasos sanguíneos de la dermis papilar sería uno de los eventos primarios en la fototoxicidad aguda (Poh-Fitzpatrick, 1985). La PROTO IX excitada estimula la degranulación de mastocitos en la piel, con la consiguiente liberación de enzimas y mediadores bioquímicos, como la histamina, responsables del eritema, edema, dolor y prurito (Glover *et al.*, 1990; Timonen *et al.*, 2000). Además favorecería la síntesis de colágeno con cicatrización prominente y consecuente deformidad estructural. También, produce alteraciones histológicas compatibles con los cambios mediados por productos de activación de la cascada del complemento, durante la fase aguda de fotosensibilidad (Doss & Frank, 1989; Varma *et al.*, 2000) Altera asimismo el metabolismo de los eicosanoides, debido a cambios en las enzimas involucradas en este camino metabólico, como resultado de las lesiones por la respuesta fototóxica (He & Lim, 1991).

## I.5.2 Manifestaciones hepáticas

La afección hepática es de variable intensidad, la fase inicial es una protoporfirinosis hepática latente, sin apenas alteración funcional (Lim *et al.*, 1984). Cuando la producción hepática de porfirinas es elevada, en cantidad superior a la que puede eliminarse por vía biliar, se acumula en el hepatocito en la región periportal. La insuficiencia hepática puede ser grave existiendo una correlación entre la intensidad de la hepatopatía y la concentración de PROTO IX en los eritrocitos (Herbert *et al.*, 1991). Se reconoce una forma de hepatopatía fulminante que requiere trasplante hepático, en estos casos se presentan concentraciones de protoporfirina en hematíes y en plasma superiores a las encontradas en la mayoría de los pacientes con PPE (Moore, 1993; Todd, 1994; Cox, 1997).

Sólo entre el 1% y el 5% de los pacientes con PPE desarrolla insuficiencia hepática en algún momento de su evolución (Deleo *et al.*, 1976). Se observa que el hígado de estos pacientes está aumentado de tamaño, habitualmente liso y no muy consistente, con o sin dolor en el hipocondrio derecho con o sin esplenomegalia, evolución lenta hacia una hepatomegalia o hepatoesplenomegalia cirrótica y con disfunción hepática positiva. La evolución presenta las siguientes etapas: porfirinosis, hepatitis y cirrosis hepática. La presencia de ictericia asociada a fotosensibilización dérmica, aumento de PROTO IX libre en hematíes y plasma, con coproporfirinuria y disminución de la porfirinorrea (Gauer *et al.*, 1995), es un signo de insuficiencia hepática irreversible y posible indicación de trasplante hepático,

Estudios microscópicos muestran depósitos de PROTO IX en los hepatocitos, trombos en los canalículos biliares, proliferación de ductos y colangitis. Se observa cirrosis micro nodular con deposición de pigmentos que bajo la luz polarizada presentan doble refringencia y forma característica de “Cruz de Malta” (Bloomer, 1988).

En contraste con las formas graves de hepatopatía se encuentran los casos de evolución «benigna», y prolongada de la PPE, controlada mediante carotenoides, lo que no implica que, incluso después de mucho tiempo, se desarrolle la enfermedad. En la mayoría de los casos la hepatopatía de la PPE se detecta pasados los 30 años de edad (Schwarzenberg & Sharp 1996).

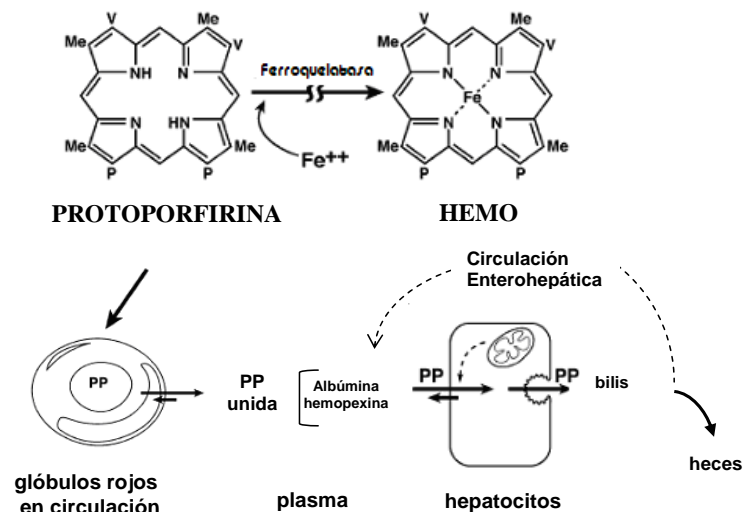


Acompaña a la hepatopatía de la PPE, colelitiasis pigmentaria, cálculos con acumulación de PROTO IX, consecuencia de la precipitación de ésta en la bilis que llega a ser hasta 70 veces superior a lo normal (Moore, 1993; Todd, 1994).

Más rara es la asociación de la PPE con enfermedad renal túbulointersticial y cardiomiopatía dilatada. La biopsia renal evidencia alteraciones tubulares, intersticiales y proliferación mesangial, por lo que se ha sugerido que el tubo proximal intervendría en la biosíntesis del hemo y en su regulación y que interferencias en estas vías podrían justificar alteraciones e los niveles de la PROTO IX (Ishizuka *et al.*, 1995).

Recordemos que como consecuencia de la deficiencia de la actividad de Fe-Quel en el desarrollo de eritrocitos en la médula ósea, se acumula un exceso de PROTO IX. Luego los glóbulos rojos entran a la circulación, la porfirina difunde a través de la membrana de los hematíes y se une a proteínas plasmáticas. La PROTO IX se incorpora al hepatocito a través de la membrana basolateral y probablemente se une al citoplasma a través de proteínas asociadas a ácidos grasos. La PROTO IX es secretada a la bilis, a través de la membrana canalicular, donde una parte puede pasar a la circulación enterohepática.

Como la actividad de la Fe-Quel hepática también es deficiente en la PPE, el hígado puede contribuir al exceso de PROTO IX que se excreta por bilis (Figura I.11).



**Figura I.11:** *Metabolismo de la PROTO IX en PPE*  
(PP: PROTO IX)

El punto crítico es que este órgano tiene una limitada capacidad de excreción del exceso de PROTO IX. El hepatocito incorpora PROTO IX por difusión, aún en el caso que la excreción biliar esté impedida. La excreción es dependiente de la formación de micelas con ácidos biliares, cuya síntesis a su vez, está inhibida por PROTO IX. Este pesado tráfico de PROTO IX y la retención producida cuando se alcanza la máxima capacidad excretora, conduce a que el exceso de porfirina induzca colestasis y toxicidad en los hepatocitos, produciendo lesiones consistentes en trombos biliares, proliferación de ductos biliares, colangitis y fibrosis irradiadas desde las áreas portales.

### **I.5.3 Factores Genéticos**

La PPE se considera una enfermedad de transmisión autosómica dominante con penetrancia incompleta, sin embargo existen evidencias de que también puede hacerlo en forma autosómica recesiva (Lamoril *et al.*, 1991; Sarkany *et al.*, 1994; Poh Fitzpatrick *et al.*, 2002; Whatley *et al.*, 2004). Su prevalencia oscila entre 1/75.000 a 200.000, afecta a ambos sexos por igual y no tiene predominancia racial (Schwarzenberg *et al.*, 1996).

Se ha clonado el ADNc que codifica el gen de la Fe-Que1, se ha secuenciado y mapeado en el cromosoma 18 (18q22 y 18q23), contiene 11 exones, con un tamaño mínimo de 45kb (Whitcombe *et al.*, 1991). Células eritroides y no eritroides tienen el mismo promotor (Taketani *et al.*, 1992; Tugores *et al.*, 1994). El ARNm de Fe-Que1 posee 1.269 bases que codifican una proteína de 423 residuos aminoácidos, 62 de los cuales están en la secuencia blanco mitocondrial (Nakahashi *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 2001). La enzima humana funciona en mitocondria, como un homodímero con un peso molecular de 86 kDa (Straka *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2001).

La PPE es una enfermedad genéticamente muy heterogénea, hasta el momento se han descrito alrededor de 90 mutaciones distintas en el gen de la Fe-Que1, responsables de la enfermedad (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org/>). Estudios moleculares muestran que diferentes mutaciones en el gen de la Fe-Que1 provocan la deficiencia en la actividad de la enzima (Rufenacht *et al.*, 1998; Bloomer & Poh-Fitzpatrick, 2000; Sarkany, 2000), afectando su unión a los dos sustratos, hierro y PROTO IX (Ferreira, 1995).

Se detectaron diferentes tipos de mutaciones:

- i) Mutaciones erradas ("missense"), que ocasionan un reemplazo de aminoácidos o terminación temprana de la cadena polipeptídica. Estas mutaciones afectan en general, a una porción o estructura del ADN denominada [2Fe-2S] cluster, que al estar alterada, ocasionan una actividad enzimática extremadamente baja; o una proteína muy inestable (Schneider-Yin *et al.*, 2000b; Rufenacht *et al.*, 2001)
- ii) Deleciones o supresiones, que son más frecuentes que las anteriores, ocasionan ausencia de 2 ó más residuos de aminoácidos produciéndose un ARNm inestable o no funcional.

Clásicamente, se acepta que es una enfermedad de herencia autosómica dominante, con penetración reducida y marcada heterogeneidad de los alelos (Deleo *et al.*, 1976; Went & Klasen, 1984; Sybert, 1997), pudiendo requerir heterozigocidad compuesta (Norris, 1990). Sin embargo, hay cada vez más evidencias a favor de patrones de herencia más complejos que el meramente dominante.

Gouya *et al.*, (1996) señalan que en la PPE con patrón de herencia dominante, se evidencian diferentes grados de deficiencia enzimática entre pacientes y portadores asintomáticos de los genes mutados; los individuos sintomáticos tienen usualmente menos del 50% de la actividad normal, mientras que los portadores asintomáticos muestran un 50% de actividad normal. Esto indica que factores adicionales a las mutaciones estarían involucrados en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Se ha demostrado que el valor residual de la enzima en la PPE es menor que el 50% del esperado para una enfermedad autosómica dominante, es el resultado de la herencia de un alelo mutado y un alelo normal de baja expresión. Así la presencia del polimorfismo IVS3-48T/C en trans al alelo mutado es necesario para la manifestación clínica de la porfiria (Gouya *et al.*, 1999, 2002, 2004).

En los últimos años se ha demostrado que la metilación de secuencias CpG en el promotor del gen de la Fe-Que1 sumada a una mutación y al alelo normal de baja expresión serían los responsables de una PPE con falla hepática fatal (Onaga *et al.*, 2004).

## **I.6. PORFIRIAS EXPERIMENTALES**

Existe una variedad de compuestos, como contaminantes ambientales o drogas de uso terapéutico en humanos que son capaces de inducir alteraciones en el camino metabólico del hemo. La acción de estos agentes puede conducir a un aumento de la concentración de los intermediarios porfirínicos y/o precursores ALA y PBG que se acumulan y excretan dando lugar a un patrón bioquímico similar al de una porfiria.

En animales de laboratorio y en tejidos, la inducción de porfirias por drogas proporciona modelos experimentales que permiten el estudio de los mecanismos tisulares, la fisiopatología y los rasgos clínicos y bioquímicos de estas enfermedades, como así también la aplicación de posibles terapias.

Todos los compuestos porfirinogénicos tienen en común la propiedad de estimular marcadamente la actividad del ALA-S hepática y además disminuir el contenido de hemo hepático, ya sea por inhibición de su síntesis o por un aumento en la velocidad de su degradación (De Matteis, 1971a).

Los mecanismos por los cuales actúan los compuestos porfirinogénicos pueden ser: i) una inhibición directa de la actividad de alguna de las enzimas intermedias, que producirá, entonces, un bloqueo parcial en la biosíntesis del hemo, ii) un aumento en la utilización o degradación del hemo hepático, que estimularía la actividad del ALA-S, de forma tal que la síntesis de los precursores excederá la capacidad de las siguientes enzimas de la secuencia para su metabolización, aún cuando todas ellas estuvieran dentro de los valores normales (Batlle & Magnin, 1988). Además pueden afectar funciones bioquímicas no relacionadas con el metabolismo del hemo. Así, muchos compuestos porfirinogénicos ejercen su acción sobre el sistema metabolizante de drogas, ya sea, inhibiéndolo o induciéndolo.

Como se mencionó en el Item I.3, la biosíntesis del hemo está regulada por un mecanismo de represión y retro-inhibición negativo ejercido por el producto final hemo, sobre el ALA-S hepática, que controla su síntesis y actividad. El pool de hemo libre es relativamente pequeño y de rápida velocidad de recambio. Un ligero exceso de hemo sirve para satisfacer la demanda de la síntesis de hemoproteínas, si sus niveles superan esas necesidades, ese exceso se degrada y, además, ejerce su acción regulatoria sobre el ALA-S. En condiciones en las cuales la concentración hepática de hemo disminuye, estos

mecanismos no actúan y la cantidad y actividad del ALA-S aumentan. Esta situación es la que ocurre, en cualquiera de los mecanismos por los que actúan los compuestos porfirinogénicos.

Entre los compuestos porfirinogénicos más estudiados que actúan a nivel de alguna de las enzimas de la síntesis de hemo podemos mencionar alil-isopropil-acetamida (AIA), 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dehidrocolina (DDC), Griseofulvina (Gris), y los hidrocarburos poli-halogenados.

El AIA es una de las drogas más investigadas en el estudio del metabolismo del hemo, es un análogo del Sedormid, que tiene la ventaja de carecer de sus propiedades hipnóticas (Golberg *et al.*, 1955). El AIA provoca la pérdida de CYP como consecuencia de la destrucción de su grupo prostético hemo, y consecuentemente, un aumento de actividad de ALA-S por pérdida del control de la regulación y acumulación de porfirinas (Schwartz & Ikeda 1955; De Matteis 1971b; Bonkowsky *et al.*, 1980) (Figura I.13). La interacción de los grupos alilisopropil ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$ ) y la función amida ( $-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) del AIA y del Sedormid con el grupo hemo del CYP produce la formación de pigmentos verdes responsables de la destrucción del CYP y consecuentemente la estimulación del ALA-S hepática (De Matteis, 1975; Smith & De Matteis, 1980; De Matteis & Marks, 1983).

En animales de laboratorio el AIA produce el aumento de la excreción de ALA y PBG y Uroporfirina en orina y de PROTO IX en materia fecal, además de la acumulación de estos compuestos en hígado. El aumento de actividad de ALA-S hepática, se produce por la estimulación de la síntesis de ARNm de la ALA-S y aumento de su estabilidad (Tyrrell & Marks, 1972) alterando la tasa de transcripción de su gen (Srivastava *et al.*, 1989) sin afectar la tasa de degradación del ALA-S (Sassa & Granick, 1970).

En la búsqueda de un modelo experimental adecuado para el estudio de la PAI, tanto para el estudio del mecanismo de las alteraciones neurológicas que la caracterizan, como para el ensayo de nuevas alternativas terapéuticas, en nuestro laboratorio se obtuvo un modelo animal en el cual se reproducirían totalmente los signos clínicos y bioquímicos de la PAI. Se ha encontrado que la administración a ratones de una dosis de AIA disuelta en una mezcla de glicerina y solución salina (1:1) provoca todos los síntomas de una ataque agudo de PAI incluyendo una disminución de hasta 70% de la PBG-D (Polo *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que la administración de dihidropiridinas, como el DDC y la Gris, producen acumulación de PROTO IX por inhibición de la enzima Fe-Quel tanto *in vivo* como *in vitro* (Tephly *et al.*, 1979, 1981; De Matteis & Gibbs, 1980). Ambos compuestos tienen en común la propiedad de provocar acumulación de PROTO IX, por lo cual son buenos modelos de PV. Cuando la porfiria inducida en ratones es muy severa, también hay acumulación de PROTO IX en eritrocitos, fotosensibilización y litiasis biliar, por lo cual se comporta como un modelo de PPE (De Matteis *et al.*, 1987; Marks *et al.*, 1985). La inhibición de la Fe-Quel por ambos compuestos produce la acumulación de su sustrato y un agotamiento del *pool* de hemo regulador con el consecuente estímulo de la actividad del ALA-S. Tanto el DDC como la Gris interaccionan con el CYP formando un pigmento verde identificado como N-metil-porfirina, que al unirse al centro activo de la Fe-Quel la inhibe fuertemente (De Matteis *et al.*, 1980, Tephly *et al.*, 1981).

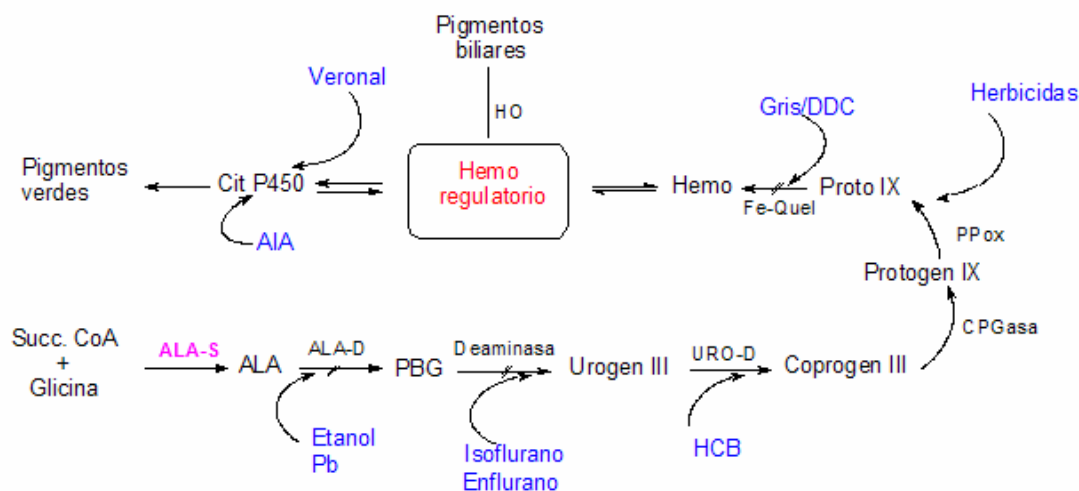
Si bien en la porfiria experimental producida por DDC disminuyen los niveles y actividad del CYP, la formación de la PROTO IX alquilada que inhibe a la Fe-Quel es el desencadenante de la sintomatología. Por el contrario en el modelo de porfiria aguda originada por el tratamiento con AIA la disminución del CYP es la causa principal del aumento de la actividad del ALA-S, mientras que la formación del pigmento verde por la alquilación del hemo no tiene un rol metabólico significativo. Otra diferencia entre la acción porfirinogénica del AIA y el DDC es que con el primero se produce una inhibición de la actividad de la catalasa en hígado debido a la disminución del hemo disponible para la síntesis de hemoproteínas, que no ocurre en la porfiria provocada por DDC (Sweeney, 1985)

Los hidrocarburos aromáticos polihalogenados, ocasionan porfiria hepática crónica por contaminación ambiental en animales y en el hombre. Dentro de este grupo se encuentran el hexaclorobenceno (HCB), los bifenilos policlorados y polibromados los cuales inducen una porfiria hepática crónica, con acumulación de uroporfirina y otras porfirinas altamente carboxiladas como consecuencia de la inhibición de la URO-D hepática (Schwartz & Ikeda 1955; Smith & De Matteis 1980) (Figura I.12).

El herbicida difenilo (Acilfluorfen) inhibe la PP-ox en las plantas y en los mamíferos, acumulándose PROTO IX en los hepatocitos (Sinclair *et al.*, 1994) produciendo un modelo de PV.

El fenobarbital es un anticonvulsionante que posee la propiedad de ser inductor del CYP, por lo tanto, el tratamiento con este xenobiótico produce la depleción del pool de

hemo regulatorio y consecuentemente un incremento de la expresión del ALA-S (Ryan & Ades, 1989). Sin embargo se ha sugerido que además del efecto sobre el CYP, existe un mecanismo adicional que produce la acción directa del fenobarbital, como de otras drogas, sobre la inducción del ALA-S hepático (Jover et al., 1996, 2000)



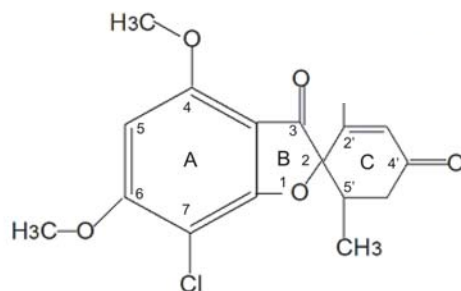
**Figura I.12: Mecanismo de acción de drogas. AIA: alil-isopropilacetamida; Gris: griseofulvina; HCB: hexaclorobenceno; DDC: dietildietoxicarboxidimida .**

Es evidente que muchos de estos compuestos capaces de inducir una porfiria experimental en animales o cultivos de tejidos, pueden provocar una alteración similar en humanos, dando lugar a diversas porfirias tóxicas y porfirinurias, en individuos sin ninguna predisposición genética, o desencadenar un ataque de porfiria o exacerbar la sintomatología en portadores de la falla enzimática.

## I.7 MODELO EXPERIMENTAL DE PROTOPORFIRIA INDUCIDA POR GRISEOFULVINA

La griseofulvina (7-cloro,4,6-trimetoxi-6-metilespiro-[Benzofenona-2(3H),1-(2) ciclohexeno]3,4-diona (Gris) (Figura I.13) es un producto metabólico de ciertas especies de *Penicillium* descubierta en 1939. En ese tiempo se utilizó para la agricultura, luego,

debido a su eficacia en la eliminación de hongos de las cosechas, se empleó en animales. Posteriormente, en 1958, se usó por primera vez como medicamento en humanos. Fue el primer antimicótico disponible para el tratamiento oral de las infecciones fúngicas cutáneas, y ha sido utilizado por más de 40 años como droga farmacéutica para el tratamiento de dermatosis.



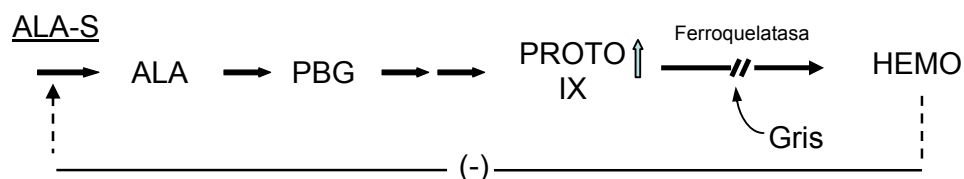
**Figura I.13:** Estructura de la Griseofulvina

Estudios con animales evidenciaron claramente que la Gris tiene una variedad de efectos tóxicos, agudos y crónicos, causando incluso cáncer de hígado y de tiroides en roedores. La aparición de cáncer hepatocelular en ratones con dieta suplementada con Gris está precedida por varios cambios morfológicos y bioquímicos en el hígado como consecuencia de una marcada inhibición de la Fe-Que1 y la disminución de pool de hemo regulatorio que estimula secundariamente la actividad del ALA-S (Figura I.14). Se produce acumulación de porfirinas seguida por daño celular y procesos inflamatorios y necróticos (Knasmüller *et al.*, 1997). Los cambios en la patología hepática con Gris son similares a los que se pueden encontrar en la PPE humana asociada a falla hepática (Kappas *et al.*, 1995; Bloomer, 1998, Cox *et al.*, 1998).

La Gris, por lo tanto, induce protoporfiria en animales de laboratorio (De Matteis & Rimington 1963; Denk *et al.*, 1981; Polo *et al.*, 1997) debido a que produce cambios en la ruta biosintética del hemo. La protoporfiria murina inducida por la administración de Gris ha sido usada como un modelo experimental de PPE humana (Matilla & Molland, 1974; Gschnait *et al.*, 1975). La acumulación de PROTO IX en este modelo es primariamente, sino solamente, hepática (Poh-Fitzpatrick & Lamola, 1977); sin embargo la concentración de PROTO IX asociada con eritrocitos circulantes en este modelo puede ser comparable a la



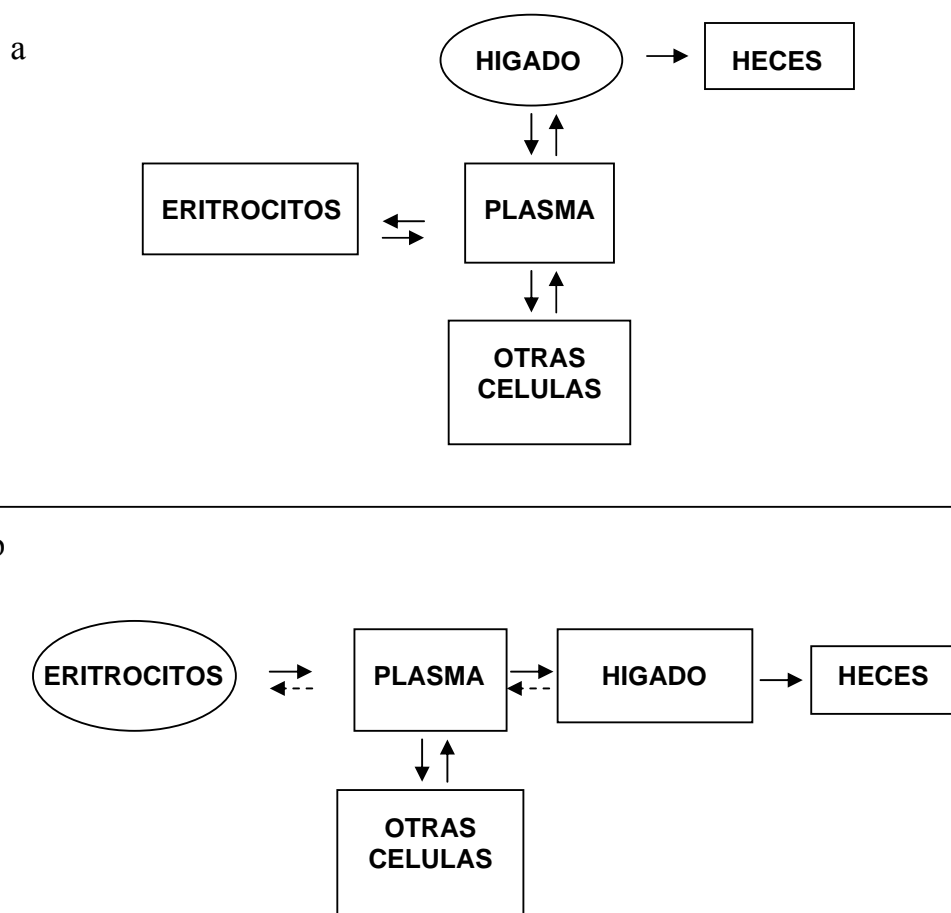
que se observa en la PPE (De Matteis & Rimington, 1963; Nakao *et al.*, 1967; Gschnait *et al.*, 1975)



**Figura I.14:** Mecanismo de inducción de una porfiria experimental por Griseofulvina

Estudios comparativos, en hígado y médula, permitieron concluir que la sobreproducción de PROTO IX en ratones con protoporfiria inducida por Gris se origina en tejido hepático y no en eritroide (Figura I.15.a), a diferencia de lo que ocurre en los pacientes con PPE donde la fuente del exceso de PROTO IX son los glóbulos rojos (Figura I.15.b) (Poh-Fitzpatrick & Lamola, 1977). En la PPE la disfunción hepática se produce como consecuencia de los depósitos de PROTO IX derivados de la gran cantidad de porfirina generada en los glóbulos rojos que pasa al plasma y clarifica diariamente por el hígado. Si bien en estos pacientes la síntesis de PROTO IX en hígado puede estar aumentada, no contribuye significativamente a los niveles circulantes porque el flujo es preponderantemente en dirección de la sangre a heces vía el hígado.

La porfiria hepática inducida por Gris en ratones está asociada con una interacción de la Gris con el CYP (De Matteis *et al.*, 1991), la droga es metabolizada por el CYP mediante la demetilación de uno de los dos grupos metilo del anillo  $\alpha$  llevando a la forma 6 demetil o 4 demetil Gris (Hathaway, 1975; Lavalley *et al.*, 1978) actuando la Gris como sustrato suicida.

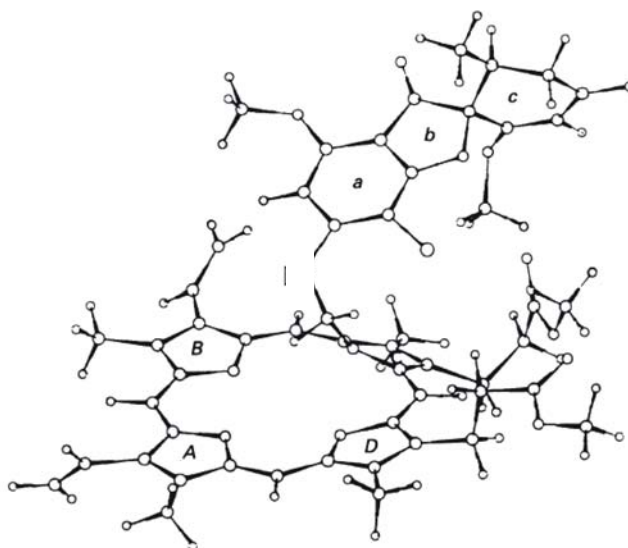


**Figura I.15:** a) Transporte de PROTO IX en el modelo murino de Protoporfiria por intoxicación con Gris. b) Transporte de PROTO IX en la Protoporfiria Eritropoyética humana

Se ha demostrado que en animales, la Gris produce la acumulación de dos pigmentos verdes en el hígado (De Matteis & Gibbs, 1980; Tephley *et al* 1981). En 1991 De Matteis y sus colegas (De Matteis *et al.*, 1991; Holley *et al.*, 1991) aislaron estos pigmentos verdes y los identificaron como aductos de porfirinas que se forman por la reacción de especies derivadas de la Gris con la porfirina del CYP (Holley *et al.*, 1991)

Uno de los pigmentos, denominado aducto menor, se forma en pequeña cantidad y se identificó como N Metil-Protoporfirina, que por unión al centro activo de la Fe-Quel, es un potente inhibidor de la enzima tanto *in vivo* como *in vitro* (Tephly *et al* 1979; De Matteis *et al.*, 1980; Ortiz de Montellano *et al.*, 1981). Después de la administración de Gris *in vivo* se forman 4 regioisómeros del aducto menor siendo el N<sub>A</sub> el predominante (Holley *et al.*, 1991).

El segundo pigmento, el aducto mayor, es más abundante y se forma entre la Gris y el anillo protoporfirina (Holley *et al.*, 1991). La N-Gris-Protoporfirina está formada por una unión N-CH<sub>2</sub>-N= entre el sustituyente 4 ó 6 del anillo  $\alpha$  del antimicótico y un nitrógeno pirrólico de la porfirina, formando los regioisómeros N<sub>C</sub> o N<sub>D</sub> (Figura I.16). Este compuesto en sí mismo no es un inhibidor de la Fe-Quel, pero existen evidencias de la fragmentación del aducto mayor a la forma N-Metil-Protoporfirina, por lo que existiría la posibilidad que la N-Gris-Protoporfirina podría ser un precursor del inhibidor. Si bien el producto mayoritario de la fragmentación del aducto mayor es el regioisómero N<sub>C</sub>, es posible que pequeñas cantidades de la forma N<sub>A</sub> contribuyan a aumentar el contenido del inhibidor (De Matteis *et al.*, 1991).



**Figura I.16:** Estructura de la N-Gris Protoporfirina

Un posible mecanismo para la formación de los pigmentos es que la Gris interactúe con el CYP y produzca dos especies reactivas diferentes: un radical metilo el cual conduce a la formación de N-Metil-Protoporfirina y un “radical Gris” con un H abstraído del grupo 4 o 6 metoxi de la Gris el cual conduce a la formación del aducto mayor. El producto predominante de la acción del CYP sobre la Gris es el compuesto 6 demetilado, aunque el 4 demetil Gris también se forma en menor cantidad. Los dos grupos metoxi del anillo  $\alpha$  de la Gris son muy similares químicamente lo que hace probable que el grupo que es demetilado oxidativamente esté determinado por la orientación relativa de la droga con respecto al grupo hemo del sitio activo del CYP. Estas dos orientaciones podrían ser el

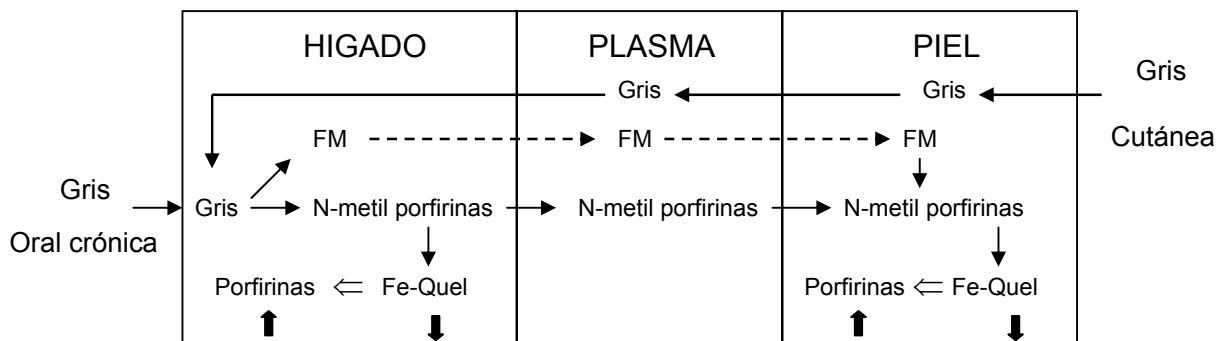
resultado de diferentes modos de unión de especies individuales al CYP o quizás, más probablemente, de la interacción de la Gris con dos isoformas diferentes del CYP. En este caso, la formación de dos productos diferentes puede ser la diferencia que determina cuál de los productos de la inactivación suicida se forma. Si dos isoenzimas diferentes están involucradas, el contenido relativo del porfirinógeno N-Metil-Protoporfirina y el no porfirinógeno N-Gris-Protoporfirina, y probablemente la porfiria, depende de la expresión de las dos isoenzimas.

El uso de la Gris como modelo de Protoporfiria ha sido extensivamente utilizado en nuestro laboratorio. Con el objetivo de determinar si las porfirinas acumuladas en la piel, causantes de la fotosensibilidad observada en los pacientes con Porfiria, se sintetizaban en la piel o provenían de su síntesis en hígado, Vazquez *et al.* (1987) realizaron un estudio comparativo empleando 2 vías distintas de administración de Gris a ratones, tópica y oral.

Los autores establecieron que la administración tópica de Gris es un buen modelo para el estudio de la Protoporfiria experimental y propusieron dos mecanismos para explicar el proceso de intoxicación por vía oral o cutánea. Postularon que en el proceso de intoxicación por vía cutánea, luego de la absorción del tóxico por la piel, la Gris llegaría al hígado por la vía circulatoria y allí ejercería su acción produciendo la acumulación de porfirinas endógenas hepáticas (Figura I.17). Consideraron que en la administración del antimicótico, tanto por vía oral como cutánea, para que la intoxicación se llegue a manifestar en la piel es requisito que el sistema “hígado, plasma, piel” funcione como un todo, debido a que probablemente en este último tejido no se puedan sintetizar *per se* las N-metil-porfirinas. Estos inhibidores se formarían primero en el hígado y por la vía circulatoria llegarían a la piel, donde ejercerían su acción sobre la Fe-Quel. Alternativamente, puede ocurrir que una especie reactiva endógena de bajo peso molecular con capacidad metilante, identificada como “Factor Metilante” (Tephly *et al.*, 1981), preformada en el hígado, fuese transportada a la piel, donde se uniría al átomo de nitrógeno pirrólico de los núcleos porfirínicos, dando lugar a la formación de las N-metil porfirinas inhibitorias.

Los estudios a corto y largo plazo de intoxicación con Gris en forma tópica a ratones, revelaron una respuesta bifásica de las enzimas ALA-S, ALA-D y PBGasa, además de la presencia de porfirinas en distintas fracciones subcelulares (Navone *et al.*, 1991). Bajo dichas condiciones, se detectó daño hepático, a través del aumento de la

bilirrubina y el desarrollo de colestasis en base al incremento en la fosfatasa alcalina y la glutámico oxalacético transaminasa (Polo *et al.*, 1997).



**Figura I.17:** Mecanismo propuesto para explicar el proceso de intoxicación con *Griseofulvina* por vía oral o cutánea

Aún no se sabe si la Gris produce en el hombre inhibidores endógenos similares a los hallados en los modelos experimentales, que sean responsables de un bloqueo parcial en la biosíntesis del hemo. Sin embargo, se ha descrito que personas tratadas con Gris como antimicótico, presentaban cantidades significativamente elevadas de porfirinas en heces y sangre, sugiriendo que el antibiótico podría también inhibir la actividad de la Fe-Quel en humanos (Rimington *et al.* 1963; Ziprkowski *et al.*, 1966).

## I.8 REFERENCIAS:

Aizencang G, Solis C, Bishop DF, Warner C, Desnick RJ. (2000). Human uroporphyrinogen-III synthase: genomic organization, alternative promoters, and erythroid-specific expression, *Genomics* 70 (2): 223–231.

Al-Karadaghi S, Hansson M, Nikonov S, Jonsson B, Hederstedt L. (1997). Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis. *Structure* 5: 1501-1510.

- Anderson PM & Desnick RJ. (1979). Purification and properties of delta aminolevulinate dehydratase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 254: 6924–6930.
- Andersson C, Floderus Y, Wikberg A, Uthner F. (2000). The W198X and R173W mutations in the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria have higher clinical penetrance than R167W: a population-based study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60: 643-648.
- Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. (2001) Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2961-3062.
- Astrin KH, Warner CA, Yoo HW, Goodfellow PJ, Tsai SF, Desnick RJ. (1991). Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (UROS) gene to chromosome 10q25.2–q26.3, *Hum. Genet.* 87 (1): 18–22.
- Avner DL, Lee RG, Berenson MM. (1981). Protoporphyrin-induced cholestasis in the isolated in situ perfused rat liver. *J Clin Invest.* 67: 385–394.
- Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML. (2005). Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Rad. Res.* 39(2): 145-151.
- Bandyopadhyay U, Adak S, Banerjee, RK. (1999). Role of active site residues in peroxidase catalysis: studies on horseradish peroxidase. *Proc. Ind. Natl. Sci. Acad. B* 65: 315–330.
- Batlle AM. (1993). Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B.* 20(1): 5-22.
- Batlle AMC. (1997). Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular, Ed. Acta. Bioq. Lat. Sup.2. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
- Batlle AMC, Stella AM. (1978). Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int J Biochem.* 9(12): 861-864.
- Batlle AMC; Magnin PH. (1988). Porfirinas y Porfirias. Actualizaciones Médico Bioquímicas Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Sup 2.
- Batlle AMC; Benson A, Rimington C. (1965). Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem J.* 97: 731-740.
- Beale S, Castelfranco P. (1974). The biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid in higher plants. *Plant Physiol.* 53: 143.
- Bevan DR, Bodlaender P, Shemin D. (1980). Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn<sup>2+</sup> for enzyme activity, *J. Biol. Chem.* 255 (5): 2030–2035.
- Bhattacharyya DK, Bandyopadhyay U, Banerjee RK (1992). Chemical and kinetic evidence for an essential histidine in horseradish peroxidase for iodine oxidation. *J. Biol. Chem.* 267: 9800–9804.
- Billing BA.(1982). Bilirubin metabolism. En *Disease of the liver*. Schill, ER. Schiff (eds.). 11: 349-378.
- Bloomer JR. (1988). The liver in protoporphyria. *Hepatology* 8: 402-407.
- Bloomer JR. (1998). Liver metabolism of porphyrins and haem. *J Gastroenterol Hepatol.*13(3):324-329.

- Bloomer JR, Poh-Fitzpatrick MB. (2000). Pathogenesis of biochemical abnormalities in protoporphyria. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 111: 245–257.
- Bloomer JR, Phillips MJ, Davidson DL, Klatskin G. (1975). Hepatic disease in erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Med.* 58: 869–882.
- Bloomer JR, Rank JM, Payne WD, Snover DC, Sharp HL, Zwiener RJ, Carithers RL. (1996). Follow-up after liver transplantation for protoporphyric liver disease. *Liver Transpl. Surg.* 2: 269–275.
- Bonkowsky HL. (1991). Key relationships of hepatic heme and iron metabolism: new insights into functions of two old molecules. *Viewpoints on Digestive Diseases*; 23:Nº4, Boston, Massachusetts, USA.
- Bonkowsky HL; Healey NF; Sinclair PR; Meyer YD; Erny R. (1980). Metabolism of hepatic heme and 'green pigments' in rats given 2-allyl-2-isopropylacetamide and ferric citrate. *Biochem. J.* 188: 289-295.
- Bottomley S, Muller-Eberhard U. (1988). Pathophysiology of heme synthesis. *Seminars in Hematology* 1988; 25:282-302.
- Bottomley SS, Tanaka M, Everett MA. (1975). Diminished erythroid ferrochelatase activity in protoporphyria. *J. Lab. Clin. Med.* 86: 126–131.
- Brownlie PD, Lambert R, Louie GV, Jordan PM, Blundell TL, Warren MJ, Cooper JB, Wood SP. (1994). The three-dimensional structures of mutants of porphobilinogen deaminase: toward an understanding of the structural basis of acute intermittent porphyria. *Protein. Sci.* 3: 1644-1650.
- Bulaj ZJ, Phillips JD, Ajioka RS, Franklin MR, Griffen LM, Guinee DJ, Edwards CQ, Kushner JP. (2000). Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 95: 1565-1571.
- Burden AE, Wu C, Dailey TA, Busch JL, Dhawan IK, Rose JP, Wang B, Dailey HA., (1999). Human ferrochelatase: crystallization, characterization of the [2Fe–2S] cluster and determination that the enzyme is a homodimer. *Biochim. Biophys. Acta* 1435 (1–2): 191–197.
- Cacheux V, Martasek P, Fougerousse F, Delfau MH, Druart L, Tachdjian G, Grandchamp B. (1994). Localization of the human coproporphyrinogen oxidase gene to chromosome band 3q12. *Hum. Genet.* 94 (5): 557–559.
- Chen JJ, London IM. (1981). Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* 26: 117–122.
- Chowdhury JR, Wolkoff AW, Arjas IM. (1989). Hereditary jaundice and disorders of Bilirubin Metabolism. *En: The metabolic basis of inherited disease.* (Scriver, Beaudel, Sly, Valla, eds.). McGraw-Hill, 6ª. ed. 53: 1367-1408.
- Christiansen L, Ged C, Hombrados I, Brons-Poulsen J, Fontanellas A, de Verneuil H, Hørdér M, Petersen NE. (1999). Screening for mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene using denaturing gradient gel electrophoresis. Identification and characterization of six novel mutations associated with familial PCT. *Hum Mutat.* 14: 222-232.

- Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E, Marks GS, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Rabinovitch M, Ackerley C. (1997). Carbon monoxide formation in the ductus arteriosus in the lamb: implication for the regulation of muscle tone. *Br. J. Pharmacol.* 120: 599–608.
- Cotter PD, Willard HF, Gorski JL, Bishop DF. (1992). Assignment of human erythroid delta-aminolevulinic synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X; autosome translocations. *Genomics.* 13 (1): 211–212.
- Cox TM. (1997). Erythropoietic protoporphyria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20(2): 258-269
- Cox TM, O'Donnell MW, Aisen P, London IM. (1985). Hemin inhibits internalization of transferrin by reticulocytes and promotes phosphorylation of the membrane transferrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 5170–5174.
- Cox TC, Bawden MJ, Abraham NG, Bottomley S, May BK, Baker E, Chen LZ, Sutherland GR. (1990). Erythroid 5-aminolevulinic synthase is located on the X chromosome, *Am. J. Hum. Genet.* 46 (1): 107–111.
- Cox TC, Bawden MJ, Martin A, May BK. (1991). Human erythroid 5-aminolevulinic synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. *EMBO J.* 10: 1891–1902.
- Cox TM., Alexander GJ, Sarkany R. (1998). Protoporphyria. *Semin. Liver Dis.* 18: 85-93.
- Dandekar T, Stripecke R, Gray NK, Goossen B, Constable A, Johansson HE, Hentze MW. (1991). Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid delta-aminolevulinic acid synthase mRNA. *EMBO J.* 10: 1903–1909.
- Davydov RM, Yoshida T, Ikeda-Saito M, Hoffman BM. (1999). Hydroperoxy-heme oxygenase generated by cryoreduction catalyzes the formation of a-meso-hydroxyheme as detected by EPR and ENDOR. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 10656–10657.
- Dawson JH. (1988). Probing structure–function relations in hemecontaining oxygenases and peroxidases. *Science* 240: 433–439.
- De Matteis F. (1971a) Drugs and Porphyrins. *South Afr. J. Lab. & Clin. Med.* 17: 126-134.
- De Matteis F. (1971b). Loss of heme in rat liver caused by the porphyrinogenic agent 2-allyl-2-isopropylacetamide. *Biochem. J.* 124: 767-777.
- De Matteis F. (1975). The effect of drugs on 5-aminolevulinic synthetase and other enzymes in the pathway of liver haem biosynthesis. *Basic Life Sci.* 6:185-205.
- De Matteis F.; Rimington C. (1963). Disturbance of porphyrin metabolism caused by griseofulvin in mice. *Brit. J. Dermatol.* 75: 91-104
- De Matteis F, Gibbs AH. (1980). Drug-induced conversion of liver haem into modified porphyrins. Evidence for two classes of products. *Biochem J.* 187(1): 285-288.
- De Matteis F, Marks GS. (1983). The effect of N-methylprotoporphyrin and succinyl-acetone on the regulation of heme biosynthesis in chicken hepatocytes in culture. *FEBS Lett.* 159(1-2): 127-131.
- De Matteis F, Gibbs AH, Smith AG. (1980). Inhibition of protohaem ferro-lyase by N-substituted porphyrins. Structural requirements for the inhibitory effect. *Biochem J.* 189(3):645-648.



- De Matteis F, Gibbs AH, Holley AE. (1987). Occurrence and biological properties of N-methyl protoporphyrin. *Ann N Y Acad Sci.* 514: 30-40.
- De Matteis F, Gibbs AH, Martin SR, Milek RL. (1991). Labelling in vivo and chirality of griseofulvin-derived N-alkylated protoporphyrins. *Biochem J.* 280 (Pt 3): 813-816.
- De Rooij WM, Edixhoven A, Wilson JH. (2003). Porphyrin: a diagnostic approach. In Kadish KM; Smith KM, Guillard R, eds. *The Porphyrin Handbook*. St Louis: Elsevier. 211-245.
- De Verneuil H, Grandchamp B, Foubert C, Weil D, N'Guyen VC, Gross MS, Sassa S, Nordmann Y. (1984). Assignment of the gene for uroporphyrinogen decarboxylase to human chromosome 1 by somatic cell hybridization and specific enzyme immunoassay. *Hum. Genet.* 66 (2-3): 202-205.
- Deacon AC, Elder GH. (2001). Front line tests for the investigation of suspected porphyria. *J. Clin. Pathol.* 54: 500-507.
- Denk H, Kalt R, Abdelfattach-Gad M, Meyer UA. (1981). Effect of Griseofulvin on 5-aminolevulinic acid synthase and on ferrochelatase in mouse liver neoplastic nodules. *Cancer Res.* 41(4): 1535-1538.
- Deleo VA, Poh-Fitzpatrick M, Mathews-Roth M, Harber LC. (1976). Erythropoietic Protoporphyrin. *Amer. J. Med.* 60: 8-22.
- Dent AJ, Beyersmann D, Block C, Hasnain SS. (1990). Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry* 29 (34): 7822-7828.
- Dierks P. (1990). Molecular biology of eukaryotic [delta]-aminolevulinic acid synthase. En: Dailey HA, ed. *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. New York, McGraw-Hill. pp. 201-203.
- Docherty JC, Firneisz GD, Schacter BA. (1984). Methene bridge carbon atom elimination in oxidative heme degradation catalyzed by heme oxygenase and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 657-664.
- Doss MO, Frank M. (1989). Hepatobiliary implications and complications in protoporphyrin: a 20 years study. *Clin. Biochem.* 22: 223-229.
- Dubart A, Mattei MG, Raich N, Beaupain D, Romeo PH, Mattei JF, Goossens M. (1986). Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1, *Hum. Genet.* 73 (3): 277-279.
- Duncan R, Faggart MA, Roger AJ, Cornell NW. (1999). Phylogenetic analysis of the 5-aminolevulinic acid synthase gene. *Mol Biol Evol.* 16: 383-396.
- Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 688-692.
- Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN, Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrel RM. (1994). Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2607-2610.
- Erskine PT, Norton E, Cooper JB, Lambert R, Coker A, Lewis G, Spencer P, Sarwar M, Wood SP, Warren MJ, Shoolingin-Jordan PM. (1999). X-ray structure of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* complexed with the inhibitor levulinic acid at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* 38 (14): 4266-4276.

- Ferreira GC. (1995). Ferrochelatase binds the iron-responsive element present in the erythroid 5-aminolevulinatase synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 214(3): 875-878.
- Folmer V, Soares J, Gabriel D, Rocha J. (2003) A high fat diet inhibits delta-aminolevulinatase dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*), *J Nutr.* 133: 2165–2170.
- Frankenberg N, Erskine PT, Cooper JB, Shoolingin-Jordan PM, Jahn D, Heinz DW. (1999). High resolution crystal structure of a Mg<sup>2+</sup>- dependent porphobilinogen synthase, *J. Mol. Biol.* 289 (3): 591–602.
- Furuyama K, Sassa S. (1998). The erythroid-specific [delta]-aminolevulinatase synthase associates with succinyl CoA synthase: an anchoring mechanism to the inner mitochondrial membrane. *Blood.* 92 (Suppl 1, Part 1): 669a.
- Gauer EB, Doss MO, Riemann JF.(1995). Erythropoietic protoporphyria. A rare differential diagnosis of perenchymatosen jaundice. *Eutsch. Med. Wochenr.* 120 (20): 713-717
- Gidari AS, Levere RD. (1977). Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. *Semin. Hematol.* 14: 145–168.
- Glover RA, Bailey CS, Barrett KE, Wasserman SI, Gigli I. (1990). Histamine release from rodent and human mast cells induced by protoporphyria and ultraviolet light: studies of the mechanism of mast-cell activation in erythropoietic protoporphyria. *Br. J. Dermatol.* 122: 501-512.
- Goldberg A, Moore MR. (1980). The porphyrias. *Clinics in Hematology.* vol.9 N°2; Saunders Company Ltd, Eastbome, Sussex, UK
- Goldberg A., Rimington C, Fenton JBC. (1955). Experimentally produced porphyria in animals. *Proc. Roy Soc. , Series B.* 143: 257-280
- Gouya L, Deybach JC, Lamoril J, Da Silva V, Beaumont C, Grandchamp B, Nordmann Y. (1996). Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. *Am. J. Hum. Genet.* 58(2): 292-299.
- Gouya L, Puy H, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Nordmann Y, Deybach JC. (1999). Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood* 93(6): 2105-2110.
- Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Deybach JC. (2002). The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet.* 30(1): 27-28.
- Gouya L, Puy H, Robreau AM, Lyoumi S, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Deybach JC. (2004). Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. *Hum. Genet.* 114: 256-262.
- Grandchamp B, Bissell DM, Licko V, Schmid R. (1981). Formation and disposition of newly synthesized heme in adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biol. Chem.* 256: 11677–11683.
- Gschnait F, Konrad K, Honigsmann H, Denk H, Wolff K. (1975). Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyria crystals. *J. Invest. Dermatol.* 65(3): 290-299.
- Haider A, Olszanecki R, Gryglewski R, Schwartzman ML, Lianos E, Kappas A, Nasjletti A, Abraham NG. (2002). Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 188–194.

- Harbin B & Dayley H. (1985) Orientation of ferrochelatase in bovine liver mitochondria. *Biochem.* 24: 366-370.
- Hathaway, D. E. (1975) (ed.) *Foreign Compound Metabolism in Mammals*, vol. 3, p. 299, The Chemical Society, London
- Hayashi N, Wanatabe N, Kikuchi G. (1983). Inhibition of hemin of *in vivo* translocation of chicken liver 5-aminolaevulinic synthase into mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 115: 700-706.
- He D, Lim HW. (1991). Irradiation of protoporphyrin mice induces down-regulation of epidermal eicosanoid metabolism. *J. Invest. Dermatol.* 97(3):488-494
- Helliwell JR, Nieh YP, Habash J, Faulder PF, Raftery J, Cianci M, Wulff M, Hadener A. (2003). Time-resolved and static-ensemble structural chemistry of hydroxymethylbilane synthase. *Faraday Discuss.* 122: 131-44; discussion 171-190.
- Hentze MW, Kühn LC. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 8175–8182.
- Herbert A, Corbin D, Williams A, Thompson D, Buckels J, Elias E. (1991). Erythropoietic protoporphyria: unusual skin and neurological problems after liver transplantation. *Gastroenterology.* 100(6): 1753-1757.
- Hift RJ, Meissner D, Meissner PN. (2004). A systematic study of the clinical and biochemical expression of variegate porphyria in a large South African family. *Br. J. Dermatol.* 151: 465-471.
- Hindmarsh JT, Oliveras L, Greenway DC. (1999). Biochemical differentiation of the porphyrias. *Clin. Biochem.* 32: 609-619.
- Holley AE, Frater Y, Gibbs AH, De Matteis F, Lamb JH, Farmer PB, Naylor S. (1991). Isolation of two *N*-monosubstituted protoporphyrins, bearing either the whole drug or a methyl group on the pyrrole nitrogen atom, from liver of mice given griseofulvin. *Biochem. J.* 274: 843–848.
- Hradilek A, Neuwirt J. (1989). Inhibition of cellular iron uptake by haem in mouse erythroleukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 73: 410–415.
- Iacopetta B, Morgan EH. (1984). Hemin inhibits transferrin endocytosis in immature erythroid cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 805: 211–216.
- Ibrahim NG, Friedland ML, Levere RD. (1983). Heme metabolism in erythroid and hepatic cells. *Prog. Hematol.* 3: 75-130.
- Immenschuh S, Ramadori G. (2000). Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1121–1128.
- Ishizuka S, Suzuki M, Soejima A, Nakabayashi K, Kitamoto K, Nagasawa T. (1995). A case of erythropoietic protoporphyria associated with tubulointerstitial disease and dilated cardiomyopathy. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 37(3): 201-206.
- Jaffe EK. (1995) Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27(2): 169-79.

- Jaffe EK, Abrams WR, Kaempfen HX, Harris KA Jr. (1992). 5-Chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. *Biochemistry* 31 (7): 2113–2123.
- Jover R, Hoffmann K, Meyer UA. (1996). Induction of 5-aminolevulinate synthase by drugs is independent of increased apocytochrome P450 synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226(1): 152-157.
- Jover R, Hoffmann F, Scheffler-Koch V, Lindberg RL. (2000). Limited heme synthesis in porphobilinogen deaminase-deficient mice impairs transcriptional activation of specific cytochrome P450 genes by phenobarbital. *Eur. J. Biochem.* 267(24): 7128-7137.
- Kappas A, Drummond GS. (1986). Control of heme metabolism with synthetic metalloporphyrins. *J. Clin. Investig.* 77: 335– 339.
- Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. (1989). The porphyrias. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds.). *The Metabolic Basis of Inherited Disease* McGraw-Hill, New York, pp. 1305–1365.
- Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. (1995) The Porphyrias. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edn. New York: McGraw-Hill, 2139 –2141.
- Key NS, Rank JM, Freese D, Bloomer JR, Hammerschmidt DE. (1992). Hemolytic anemia in protoporphyria: possible precipitating role of liver failure and photic stress. *Am. J. Hematol.* 39(3): 202-207.
- Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. (1993). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19–28.
- Knasmüller S., Parzefall W., Helma C., Kassie F., Ecker S. & Schult-Hermann R. (1997) Disease Model, Mechanism and Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 27: 495-537.
- Koch M, Breithaupt C, Kiefersauer R, Freigang J, Huber R, Messerschmidt A. (2004). Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J.* 23 (8): 1720–1728.
- Kutty RK, Maines MD. (1982). Oxidation of heme *c* derivatives by purified heme oxygenase: evidence for the presence of one molecule species of heme oxygenase in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 257: 9944–9952.
- Kutty RK, Daniel RF, Ryan DE, Levine W, Maines MD. (1988). Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 638–644.
- Lamoril J, Boulechfar S, de Verneuil H, Grandchamp B, Nordmann Y, Deybach JC. (1991). Human erythropoietic protoporphyria: two point mutations in the ferrochelatase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(2): 594-599.
- Lamoril J, Puy H, Whatley SD, Martin C, Woolf JR, Da Silva V, Deybach JC, Elder GH. (2001). Characterization of mutations in the CPO gene in British patients demonstrates absence of genotype-phenotype correlation and identifies relationship between hereditary coproporphyria and harderoporphyria. *Am.J. Hum. Genet.* 68: 1130-1138.
- Langhoff H, Müller H, Rietschel L. (1961). Untersuchungen zur familärer protoporphyrinämischen Lichturticaria. *Arch. Klin. Exp. Derm.* 212: 506–518.

- Lathrop JT, Timko MP. (1993). Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* 259: 522–525.
- Lavallee M, de Champlain J, Nadeau RA, Yamaguchi N. (1978). Muscarinic inhibition of endogenous myocardial catecholamine liberation in the dog. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56(4): 642-649.
- Lee DS, Flachsová E, Bodnárová M, Demeler B, Martásek P, Raman CS. (2005). Structural basis of hereditary coproporphyrinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (40): 14232–14237.
- Lim HW, Poh-Fitzpatrick MB, Gigli I. (1984). Activation of the complement system in patients with porphyrias after irradiation in vivo. *J Clin Invest.* 74(6): 1961-1965.
- Liu Y, Moënné-Locoq P, Loehr TM, Ortiz de Montellano PR. (1997). Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents. *J. Biol. Chem.* 272: 6909–6917.
- Magnus IA, Jarrett A, Prankerd TA, Rimington C. (1961). Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyriaemia. *Lancet.* 2: 448-451.
- Maines MD. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557–2568.
- Maines MD. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517–554.
- Maines MD. (2000). The heme oxygenase system and its functions in brain. *Cell. Mol. Biol.* 46: 573–585.
- Mansfield Matera K, Takahashi S, Fujii H, Zhou H, Ishikawa K, Yoshimura T, Rousseau DL, Yoshida T, Ikeda- Saito M. (1996). Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of a-hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* 271: 6618–6624.
- Marks GS, Allen DT, Johnston CT, Sutherland EP, Nakatsu K, Whitney RA. (1985). Suicidal destruction of cytochrome P-450 and reduction of ferrochelatase activity by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine and its analogues in chick embryo liver cells. *Mol. Pharmacol.* 27(4): 459-465.
- Martasek P, Camadro JM, Raman CS, Lecomte MC, Le Caer JP, Demeler B, Grandchamp B, Labbe P. (1997). Human coproporphyrinogen oxidase. Biochemical characterization of recombinant normal and R231W mutated enzymes expressed in *E. coli* as soluble, catalytically active homodimers. *Cell Mol. Biol.* 43 (1): 47–58.
- Mathews-Roth MM. (1974). Letter: Anemia in erythropoietic protoporphyria. *JAMA.* 230(6): 824.
- Mathews MA, Schubert HL, Whitby FG, Alexander KJ, Schadick K, Bergonia HA, Phillips JD, Hill CP. (2001). Crystal structure of human uroporphyrinogen III synthase. *EMBO J.* 20 (21): 5832–5839.
- Matilla A, Molland EA. (1974). A light and electron microscopic study of the liver in case of erythrohepatic protoporphyria and in griseofulvin-induced porphyria in mice. *J. Clin. Pathol.* 27(9): 698-709.

- Mc Coubry WJ, Huang TJ, Maines MD. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247: 725–732.
- Meerman L, Koopen NR, Bloks V, Van Goor H, Havinga R, Wolthers BG, Kramer W, Stengelin S, Muller M, Kuipers F, Jansen PL. (1999). Biliary fibrosis associated with altered bile composition in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterology.* 117(3): 696-705.
- Melo LG, Agrawal R, Zhang L, Rezvani M, Ehsan AA, Griese DP, Dell'Acqua G, Mann MJ, Oyama J, Yet SF, Layne MD, Perrella MA, Dzau VJ. (2002). Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adenoassociated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation* 105: 602–607.
- Méndez M, Rossetti MV, Batlle AM del C, Parera VE. (2005). The role of inherited and acquired factors in the development of porphyria cutanea tarda in the Argentinean population. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52: 417-24.
- Meyer UA, Sehuurnans MM, Lindberg RI. (1998). Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations. *Semin. Liver Dis.* 18: 43-52.
- Minder EI, Gouya L, Schneider-Yin X, Deybach JC. (2002). A genotype-phenotype correlation between null-allele mutations in the ferrochelatase gene and liver complication in patients with erythropoietic protoporphyria. *Cell. Mol. Biol.* 48: 91-96.
- Montellano PR. (2000). The mechanism of heme oxygenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 221–227.
- Moore MR. (1993). *Biochemistry of Porphyrins.* Int. J. Biochem. 25: 1355-1368
- Moore MR, McColl KEL, Rimington C, Goldberg A. (1987). *Disorders of porphyrin metabolism.* Plenum Publishing Corporation. New York, NY, USA.
- Munakata H, Sun JY, Yoshida K, Nakatani T, Honda E, Hayakawa S, Furuyama K, Hayashi N. (2004). Role of the heme regulatory motif in the heme mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinic synthase. *J. Biochem. (Tokyo)* 136 (2): 233–238.
- Murphy GM. (1999). The cutaneous porphyrias: a review. *The British Photodermatology Group. Br.J. Dermatol.* 140: 573-581.
- Mustajoki P, Nordmann Y. (1993). Early administration of heme arginate for acute porphyric attacks. *Arch. Intern. Med.* 153: 2004-2008.
- Nakahashi Y, Taketani S, Okuda M, Inoue K, Tokunaga R. (1990). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(2): 748-755.
- Nakao K, Wada O, Takaku F, Sassa S, Yano Y, Urata G. (1967). The origin of the increased protoporphyrin in erythrocytes of mice with experimentally induced porphyria. *J Lab Clin Med.* 70(6): 923-932.
- Navone NM, Buzaleh AM, Polo CF, Afonso SG, Vazquez ES, Batlle AM. (1991). The effect of griseofulvin on the heme pathway-II. An exhaustive analysis during short and long-term challenge. *Gen Pharmacol.* 22(6):1179-1183.
- Noriega GO, Balestrasse KB, Batlle A, Tomaro ML. (2004). Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323(3): 1003-1008.

- Norris PG. (1990). Genetic heterogeneity in erythropoietic protoporphyria: a study of the enzymatic defect in nine affected families. *J. Invest. Dermatol.* 95(3): 260-263.
- Onaga Y, Ido A, Uto H, Hasuike S, Kusumoto K, Moriuchi A, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. (2004). Hypermethylation of the wild-type ferrochelatase allele is closely associated with severe liver complication in a family with erythropoietic protoporphyria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321(4): 851-858
- Ortiz de Montellano PR, Beilan HS, Kunze KL. (1981). N-Methylprotoporphyrin IX: chemical synthesis and identification as the green pigment produced by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78(3): 1490-1494.
- Ossola JO, Kristoff G, Tomaro ML. (2000). Heme oxygenase induction by menadione bisulfite adduct-generated oxidative stress in rat liver. *Comp. Biochem. Phys.* 127: 91-99.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Lu HT, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AMK. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6: 422-428.
- Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. (1999). Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J. Neurochem.* 72: 1187-1203.
- Peterson DA, Gerrard JM, Rao GH, White JG. (1980). Reduction of ferric heme to ferrous by lipid peroxides: possible relevance to the role of peroxide tone in the regulation of prostaglandin synthesis. *Prostaglandins Med.* 4(2): 73-78.
- Phillips JD, Whitby FG, Warby CA, Labbe P, Yang C, Pflugrath JW, Ferrara JD, Robinson H, Kushner JP, Hill CP. (2004). Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279 (37): 38960-38968
- Piper WN. (1988). Role of heme in endocrine function. *Semin. Hematol.* 25: 330- 335.
- Poh-Fitzpatrick MB. (1985). Porphyrin-sensitized cutaneous photosensitivity: pathogenesis and treatment. *Clin Dermatol.* 3(2): 41-82.
- Poh-Fitzpatrick MB. (1986). Molecular and cellular mechanisms of porphyrin photosensitization. *Photodermatology.* 3: 148-157.
- Poh-Fitzpatrick MB. (1989). The "priming phenomenon" in the acute phototoxicity of erythropoietic protoporphyria. *J Am Acad Dermatol.* 21: 311-312.
- Poh-Fitzpatrick MB, Lamola AA. (1977). Comparative study of protoporphyrins in erythropoietic protoporphyria and griseofulvin-induced murine protoporphyria. Binding affinities, distribution, and fluorescence spectra in various blood fractions. *J. Clin. Invest.* 60(2): 380-389.
- Poh-Fitzpatrick MB, Wang X, Anderson KE, Bloomer JR, Bolwell B, Lichtin AE. (2002). Erythropoietic protoporphyria: altered phenotype after bone marrow transplantation for myelogenous leukemia in a patient heteroallelic for ferrochelatase gene mutations. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46(6): 861-866
- Polo C, Navone N, Afonso S, Buzaleh AM, Schoua E, Vazquez E, Batlle A. (1987). Allyl-isopropylacetamide and glycerine reproduce clinical and biochemical manifestations of acute intermittent porphyria in mice. *Med. Sci. Res.* 15: 1335-1336

- Polo CF, Buzaleh AM, Vazquez ES, Afonso SG, Navone NM, Batlle AM. (1997). Griseofulvin-induced hepatopathy due to abnormalities in heme pathway. *Gen. Pharmacol.* 29(2): 207-210.
- Ponka P. (1997). Tissue-specific regulation of heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* 89: 1–25.
- Ponka P. (1999). Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.* 318: 241–256.
- Ponka P, Neuwirt J. (1969). Regulation of iron entry into reticulocytes. I. Feedback inhibitory effect of heme on iron entry into reticulocytes and on heme synthesis. *Blood* 33: 690–707.
- Ponka P, Borova J, Neuwirt J. (1973). Accumulation of heme in mitochondria from rabbit reticulocytes with inhibited globin synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 304: 715–718.
- Ponka P, Neuwirt J, Borova J.(1974). The role of heme in the release of iron from transferrin in reticulocytes. *Enzyme.* 17: 91–99.
- Ponka P, Schulman HM, Martinez-Medellin J. (1988). Haem inhibits iron uptake subsequent to endocytosis of transferrin in reticulocytes. *Biochem J.* 251: 105–109.
- Potluri VR, Astrin KH, Wetmur JG, Bishop DF, Desnick RJ. (1987). Human delta-aminolevulinate dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum. Genet.* 76 (3): 236–239.
- Richardson DR, Ponka P. (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1331: 1–40.
- Richardson DR, Ponka P, Vyoral D. (1996). Distribution of iron in reticulocytes after inhibition of heme synthesis with succinylacetone. Examination of cytoplasmic and mitochondrial intermediates involved in iron metabolism. *Blood* 87: 3477–3488.
- Rimington C, Morgan PN, Nicholls K, Everall JD, Davies RR. (1963). Griseofulvin administration and porphyrin metabolism. A survey. *Lancet.* 2: 318-322.
- Roberts AG, Elder GH. (2001). Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinate synthase (ALAS1) genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1518 (1–2): 95–105.
- Roberts AG, Whatley SD, Daniels J, Holmans P, Fenton I, Owen MJ, Thompson P, Long C, Elder GH. (1995). Partial characterization and assignment of the gene for protoporphyrinogen oxidase and variegate porphyria to human chromosome 1q23, *Hum. Mol. Genet.* 4 (12): 2387–2390.
- Rocha J, Tuerlinckx S, Schetinger M, Folmer V. (2004). Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 200: 169–176.
- Rossetti MV, Parera VE y Batlle A. (2006). Porfirias. En *Climaterio, Unidad XVI (Asociación Argentina para el Estudio del Climaterio - AAPEC)*. Ed. Ascune Hnos. pp:794-804
- Rufenacht UB, Gouya L, Schneider-Yin X, Puy H, Schafer BW, Aquaron R, Nordmann Y, Minder EI, Deybach JC. (1998). Systematic analysis of molecular defects in the ferrochelatase gene from patients with erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Hum. Genet.* 62(6): 1341-1352.
- Rufenacht UB, Gregor A, Gouya L, Tarczyska-Nosal S, Schneider-Yin X, Deybach JC. (2001). New missense mutation in the human ferrochelatase gene in a family with erythropoietic protoporphyria: functional studies and correlation of genotype and phenotype. *Clin. Chem.* 47(6): 1112-1113.



- Ryan G, Ades IZ. (1989). Coordinate elevations of liver delta-aminolevulinic synthase and cytochrome P-450 RNA by phenobarbital in chicken embryos: the effects of heme. *Int. J. Biochem.* 21(9): 1025-1031.
- Ryter SW, Tyrrell RM. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 289-309.
- Sakamoto H, Omata Y, Palmer G, Noguchi M. (1999). Ferric  $\alpha$ -hydroxyheme bound to heme oxygenase can be converted to verdoheme by dioxygen in the absence of added reducing equivalents. *J. Biol. Chem.* 274: 18196-18200.
- Sarkany RP. (2000). Erythropoietic protoporphyria (EPP) at 40. Where are we now? *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18: 147-152.
- Sarkany RP, Alexander GJ, Cox TM. (1994). Recessive inheritance of erythropoietic protoporphyria with liver failure. *Lancet.* 343(8910): 1394-1396.
- Sassa S. (1982) Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme.* 28(2-3): 133-145.
- Sassa S. (1998) ALA-D porphyria. *Semin. Liver Dis.* 18(1): 95-101.
- Sassa S. (2000). Hematologic aspects of the porphyrias. *Int. J. Hematol.* 71(1):1-17
- Sassa S, Granick. (1970). Induction of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67(2): 517-522.
- Sassa S, Kappas A. (1981). Genetic metabolic and biochemical aspects of the porphyrias. En: *Advances in human genetics II.* Harris H, Hirshhorn K, eds. Plenum Press, New York, NY, USA.:121-231.
- Sassa S, Nagai T. (1996). The role of heme in gene expression. *Int J Hematol.* 63(3): 167-178
- Schacter BA. (1988). Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action. *Seminars in Hematology* 25: 349-369.
- Schneider-Yin X, Gouya L, Meier-Weinand A, Deybach JC, Minder EI. (2000a). New insights into the pathogenesis of erythropoietic protoporphyria and their impact on patient care. *Eur. J. Pediatr.* 159: 719-725.
- Schneider-Yin X, Gouya L, Dorsey M, Rufenacht U, Deybach JC, Ferreira GC. (2000b). Mutations in the iron-sulfur cluster ligands of the human ferrochelatase lead to erythropoietic protoporphyria. *Blood.* 96(4): 1545-1549.
- Scholnick P, Marver HS, Schmid R. (1971). Erythropoietic protoporphyria: evidence for multiple sites of excess protoporphyrin formation. *J. Clin. Invest.* 50(1): 203-207.
- Schulman HM, Martinez-Medellin J, Sidloi R. (1974). The reticulocyte-mediated release of iron and bicarbonate from transferrin: effect of metabolic inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 343: 529-534.
- Schwartz S; Ikeda K. (1955). Studies of porphyrin synthesis and interconversion, with special reference to certain green porphyrins in animals with experimental hepatic porphyria, En *Porphyrin Biosynthesis and Metabolism.* Wolstenholme, G. E. N. and Miller, E. C. P. (eds.), CIBA Found. Symp., London, J. R. A. Churchill Ltd., 209-226.

- Schwarzenberg SJ, Sharp HL. (1996). Pediatric gastroenterology. Update on metabolic liver disease. *Pediatr. Clin. North. Am.* 43(1): 27-56.
- Seed MP, Willoughby DA. (1997). COX-2, HO NO Cyclooxygenase-2, heme oxygenase and nitric oxide synthase: their role and interactions in inflammation. *BIRAs Symposium, Saint Bartholomew's Hospital, London, Inflamm. Res.* 46: 279–281.
- Shady AA, Colby BR, Cunha LF, Astrin KH, Bishop DF, Desnick RJ. (2002). Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of eight novel mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *Br. J. Haematol.* 117: 980-987.
- Sinclair PR, Gorman N, Walton HS, Sinclair JF, Jacobs JM, Jacobs NJ. (1994). Protoporphyrinogen accumulation in cultured hepatocytes treated with the diphenyl ether herbicide, acifluorfen. *Cell. Mol. Biol.* 40(7): 891-897.
- Smith AG, Francis JE. (1979). Decarboxylation of porphyrinogens by rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* 183 (2): 455–458.
- Smith AG, De Matteis F. (1980). Drugs and the hepatic porphyrias. *Clin. Haematol.* 9: 399-425.
- Srivastava G, Borthwick IA, Brooker JD, Wallace JC, May BK, Elliott WH. (1983). Hemin inhibits transfer of pre-delta-aminolevulinate synthase into chick embryo liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117(1): 344-349.
- Srivastava G, Borthwick IA, Maguire DJ, Elferink CJ, Bawden MJ, Mercer JF, May BK. (1988). Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.* 263(11): 5202–5209.
- Srivastava G, Bawden MJ, Anderson A, May BK. (1989). Drug induction of P450IIB1/IIB2 and 5-aminolevulinate synthase mRNAs in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1007(2): 192-195.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043–1046.
- Straka JG, Kushner JP. (1983). Purification and characterization of bovine hepatic uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochemistry* 22 (20): 4664–4672.
- Straka JG, Bloomer JR, Kempner ES. (1991). The functional size of ferrochelatase determined in situ by radiation inactivation. *J. Biol. Chem.* 266: 24637–24641.
- Surinya KH, Cox TC, May BK. (1997). Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinate synthase gene. Identification of promoter elements and role of regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 272 (42): 26585–26594.
- Sweeney GD. (1985). Experimental porphyria in *Clinics in Dermatology* Ed. Elsevier. 3(2): 125-143.
- Sybert VP. (1997). *Genetic Skin Disorders*. Oxford University Press, pp 535-538.
- Takahashi S, Wang J, Rousseau DL, Ishikawa K, Yoshida T, Host JR, Ikeda-Saito M. (1994). Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation. *J. Biol. Chem.* 269: 1010–1014.

- Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T, Tokunaga R. (1992). Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Eur. J. Biochem.* 205(1): 217-222.
- Taketani S, Inazawa J, Abe T, Furukawa T, Kohno H, Tokunaga R, Nishimura K, Inokuchi H. (1995). The human protoporphyrinogen oxidase gene (PPOX): organization and location to chromosome 1. *Genomics* 29 (3): 698–703.
- Tephly TR, Gibbs AH, De Matteis F. (1979). Studies on the mechanism of experimental porphyria produced by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. Role of a porphyrin-like inhibitor of protohaem ferro-lyase. *Biochem. J.* 180(1): 241-244.
- Tephly TR, Coffman BL, Ingall G, Ziet-Har MS, Goff HM, Tappa HD, Smith KM. (1981). Identification of N-methylprotoporphyrin IX in livers of untreated mice and mice treated with 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine: source of the methyl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 212(1): 120-126.
- Terry MJ, Linley PJ, Kohchi T. (2002). Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 604–609.
- Thunell S. (2000) Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60(7): 509-40.
- Thunell S, Harper P, Brun A. (2000). Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. IV. Pathophysiology of erythropoietic protoporphyria-diagnosis, care and monitoring of the patient. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 60(7): 581-604.
- Timonen K, Kariniemi AL, Niemi KM, Teppo AM, Tenhunen R, Kauppinen R. (2000). Vascular changes in erythropoietic protoporphyria: histopathologic and immunohistochemical study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43(3): 489-497.
- Todd DJ. (1994). Erythropoietic protoporphyria. *Br. J. Dermatol.* 131: 751-766
- Tomaro ML, Batlle A. (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int. J. Biochem. & Cell. Biol.* 34: 216–220.
- Tugores A, Magness ST, Brenner DA. (1994). A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. *J. Biol. Chem.* 269: 30789–30797.
- Tyrrell DL, Marks GS. (1972). Drug-induced porphyrin biosynthesis. V. Effect of protohemin on the transcriptional and post-transcriptional phases of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase induction. *Biochem. Pharmacol.* 21(15): 2077-2093.
- Varma S, Haworth A, Keefe M, Anstey AV. (2000). Delayed onset of cutaneous symptoms in erythropoietic protoporphyria. *Br. J. Dermatol.* 43(1): 221-223
- Vazquez E, Afonso S, Buzaleh AM, Navone N, Polo C, Schoua E, Batlle A. (1987). The effect of griseofulvin on the heme pathway. Studies on tissue explant cultures. *Toxicology* 46(1): 73-82.
- Verger C, Sassa S, Kappas A. (1983). Growth-promoting effects of iron- and cobalt-protoporphyrin on cultured embryonic cells. *J. Cell. Phys.* 116: 135–141.
- von und zu Fraunberg M, Timonen K, Mustajoki P, Kauppinen R. (2002). Clinical and biochemical characteristics and genotype- phenotype correlation in a Finnish variegate porphyria patient. *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 649-657.

- von und zu Fraunberg M, Pischik E, Udd L, Kauppinen R. (2005). Clinical and biochemical characteristics and genotype-phenotype correlation in 143 Finnish and Russian patients with acute intermittent porphyria. *Medicine (Baltimore)* 84: 35-47.
- Wang AL, Arredondo-Vega FX, Giampietro PF, Smith M, Anderson WF, Desnick RJ. (1981). Regional gene assignment of human porphobilinogen deaminase and esterase A4 to chromosome 11q23 leads to 11qter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (9): 5734–5738.
- Went LN, Klasen EC. (1984). Genetic aspects of erythropoietic porphyria. *Ann. Hum. Genet.* 48: 105-117.
- Whatley SD, Roberts AG, Llewellyn DH, Bennett CP, Garrett C, Elder GH. (2000). Non-erythroid form of acute intermittent porphyria caused by promoter and frameshift mutations distant from the coding sequence of exon 1 of the HMBS gene. *Hum. Genet.* 107: 243-248.
- Whatley SD, Mason NG, Khan M, Zamiri M, Badminton MN, Missaoui WN, Dailey TA, Dailey HA, Douglas WS, Wainwright NJ, Elder GH. (2004). Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria in the United Kingdom: prevalence and relationship to liver disease. *J. Med. Genet.* 41(8):e105
- Whitby FG, Phillips JD, Kushner J P, Hill CP. (1998). Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.* 17: 2463-2471.
- Whitcombe DM, Carter NP, Albertson DG, Smith SJ, Rhodes DA, Cox TM. (1991). Assignment of the human ferrochelatase gene (FECH) and a locus for protoporphyria to chromosome 18q22, *Genomics* 11 (4): 1152–1154.
- Wilks A, Ortiz de Montellano PR. (1993). Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species, *J. Biol. Chem.* 268: 22357–22362.
- Wiman A, Floderus Y, Harper P. (2003). Novel mutations and phenotypic effect of the splice site modulator IVS3-48C in nine Swedish families with erythropoietic protoporphyria. *J. Hum. Genet.* 48: 70-76.
- Wu CK, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM, Wang BC. (2001). The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 8 (2): 156–160.
- Yoshida T, Kikuchi G. (1978a). Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J. Biol. Chem.* 253: 4224–4229.
- Yoshida T, Kikuchi G. (1978b). Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J. Biol. Chem.* 253: 4230–4236.
- Yoshida T, Kikuchi G. (1979). Purification and properties of heme oxygenase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 254: 4487–4491.
- Yoshida T, Noguchi M. (1984). Features of intermediary steps around the 688-nm substance in the heme oxygenase reaction, *J. Biochem. (Tokyo)* 96: 563–570.
- Yoshida T, Noguchi M, Kikuchi G. (1980). Oxygenated form of heme. Heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *J. Biol. Chem.* 255: 4418–4420.
- Yoshinaga T, Sano S. (1980). Coproporphyrinogen oxidase: II. Reaction mechanism and role of tyrosine residues on the activity. *J. Biol. Chem.* 255 (10): 4727–4730.

Zhang X, Fujii H, Mansfield M, Matera K, Migita CT, Sun D, Sato M, Ikeda-Saito M, Yoshida T. (2003). Stereoselectivity of each of the three steps of the heme oxygenase reaction: heme to mesohydroxyheme, meso-hydroxyheme to verdoheme, and verdoheme to biliverdin. *Biochemistry* 42: 7418–7426.

Ziprkowski L, Szeinberg A, Crispin M, Krakowski A, Zaidman J. (1966). The effect of griseofulvin in hereditary porphyria cutanea tarda. Investigation of porphyrins and blood lipids. *Arch. Dermatol.* 3(1): 21-27.

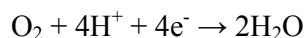
## CAPÍTULO II

### ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE

#### II.1 RADICALES LIBRES

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados o impares en el orbital externo. Es una entidad química que, contrariamente a la tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de pares tiene electrones desapareados. Esta configuración espacial los hace muy inestables, extraordinariamente reactivos y de vida efímera. Poseen una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell & Gutteridge, 1999, Valko *et al.* 2004).

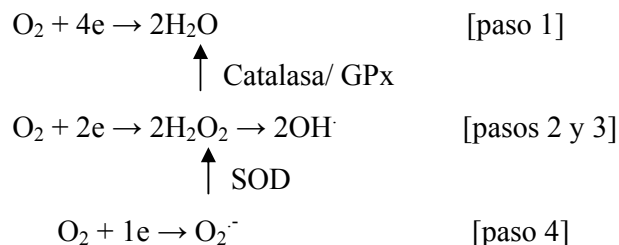
Los radicales libres se generan continuamente como un producto del metabolismo normal de la célula inactivados por un conjunto de mecanismos que pueden ser enzimáticos o de atrapamiento. En las células de mamíferos, bajo condiciones aeróbicas, la participación del oxígeno en reacciones de óxido-reducción (redox), es inevitable. El oxígeno molecular es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo spin (giro paralelo), impidiendo que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene. El oxígeno solo puede participar en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno (Halliwell & Gutteridge, 1999). La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, según la Ecuación II.1:



---

**Ecuación II.1: Reducción del Oxígeno**

Por las razones descriptas anteriormente la reacción involucra 4 pasos univalentes [Ecuación II.2].




---

**Ecuación II.2: Reacciones del Oxígeno en la cadena de transporte de electrones**

La Ecuación II.2 describe el destino del oxígeno en la cadena de transporte de electrones microsomal y mitocondrial, desde las cuales pueden escapar sus intermediarios, radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) (Reilly & Bulkley 1990). Estos intermediarios, en condiciones normales, quedan unidos al sitio activo de la citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula.

El término especies reactivas de oxígeno (ROS) usualmente se refiere a los radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$ , peroxilo ( $\text{ROO}^\cdot$ ), alcoxilo ( $\text{RO}^\cdot$ ) pero también incluye especies no radicales como ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), cloraminas, oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este último no es estrictamente un radical libre pero por su capacidad de generar el  $\text{OH}^\cdot$  en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal.

Muchas células pueden sintetizar óxido nítrico (NO), el cual es capaz de reaccionar con ROS, tales como  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , para producir ión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ). El anión  $\text{ONOO}^{\cdot-}$  es típico de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) que en sí mismas son poderosos oxidantes. El  $\text{ONOO}^{\cdot-}$  protonado (ácido peroxinitroso), es un radical inestable que se descompone a nitrato. Durante la descomposición, este radical puede iniciar reacciones adicionales involucrando  $\text{HO}^\cdot$ , dióxido nítrico, o catión nitrilo. Estas RNS están implicadas en modificaciones oxidativas de proteínas y lipoproteínas de bajo peso

molecular (LDL) a través de procesos que pueden ser independientes de la peroxidación lipídica, producida por ROS (Bergendi *et al.*, 1999; Alderton *et al.*, 2001, Poli *et al.*, 2004).

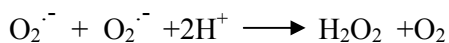
## II.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

### II.2.1 Radical superóxido

El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se forma por adición de un electrón a una molécula de oxígeno. Las fuentes más importantes son la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, el retículo endoplasmático y el cloroplasto (Halliwell & Gutteridge, 1999; Inoue *et al.*, 2003). En la mitocondria, se produce por la fuga de electrones en reacciones mediadas por la ubiquinona y sus complejos. También es generado por numerosas enzimas oxidativas como NADPH-oxidasa, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, triptofano dioxigenasa, las flavín deshidrogenasas y las peroxidases (Fernandez-Checa *et al.*, 1997; Cadenas & Davies, 2000; Li & Jackson, 2002; Inoue *et al.*, 2003). Otra fuente es la auto oxidación de varias moléculas biológicamente importantes, como son el gliceraldehído, los compuestos tiólicos como la cisteína, las catecolaminas, las formas reducidas de la riboflavina y sus derivados FMN y FAD (Del Maestro, 1980; Young *et al.*, 2002; Kuding *et al.*, 2004), las hemoglobinas, las mioglobinas, los citocromos, etc.

Su amplia capacidad oxidante lo hace capaz de oxidar polifenoles, catecolaminas, tocoferol, ascorbato, lactato deshidrogenasa unida a NADH y diversos tioles (Bielski & Chan, 1973; Fridovich, 1989). Además, puede inactivar algunas enzimas como la creatina fosfoquinasa o la catalasa (Pigeolet *et al.*, 1990).

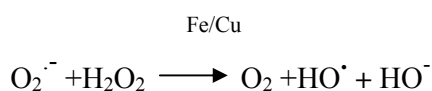
En solución acuosa el radical superóxido es capaz de reaccionar consigo mismo, dando una reacción de dismutación [Ecuación II.3].



**Ecuación II.3: Reacción del Radical Superóxido**



A pH fisiológico, la reacción directa de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  es muy lenta debido, probablemente, a la repulsión electrostática. Por este motivo, una vez formado en los sistemas biológicos tiene una vida media significativa ( $10^{-6}$ seg), lo cual le permite difundir desde el lugar de su formación hasta otras estructuras celulares. Como carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, se ha llegado a proponer para él un papel de mensajero (Forstermann *et al.*, 1998). Sin embargo la enzima superóxido dismutasa (SOD), presente en muchos organismos, elimina el  $O_2^{\cdot-}$  catalizando la reacción anterior. Es esta transformación la que potencia su toxicidad ya que el radical superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de hierro o cobre dando lugar al radical hidroxilo, muy reactivo, en la llamada reacción de Haber-Weiss [Ecuación II.4] (Halliwell & Gutteridge, 1999; Liochev & Fridovich, 2002):

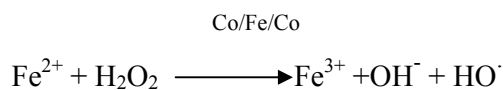


**Ecuación II.4: *Reacción de Haber-Weiss***

## II.2.2 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se produce en todos los sistemas que generan  $O_2^{\cdot-}$ , pero existen también enzimas que llevan a cabo la reducción divalente del oxígeno sin mediación de este radical, como la urato oxidasa, la acil-coenzima A oxidasa, la NADH oxidasa, la glutatión oxidasa y el sistema xantina/xantina oxidasa entre otras (Boveris *et al.*, 1972; Link & Riley, 1988; Moldovan & Moldovan, 2004; Jezek & Hlavatá, 2005).

El  $H_2O_2$  puede inactivar enzimas, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando grupos tiólicos (Brodie & Reed, 1987; Hyslop *et al.*, 1988), llevando a la célula a una deficiencia de ATP por inhibición de la glicólisis. Puede además, oxidar muchos oxoácidos tales como piruvato, glioxilato o 2-oxoglutarato (Andrae *et al.*, 1985). En presencia de trazas metálicas (Cu, Fe, Co) se produce la reacción de Fenton [Ecuación 5] (Stohs & Bagchi, 1995; Liochev & Fridovich, 2002; Leonard *et al.* 2004), dando lugar al radical hidroxilo a partir de  $H_2O_2$ .



**Ecuación II.5: Reacción de Fenton**

Por ser una molécula pequeña, sin carga y relativamente estable posee una gran capacidad de difundir y atravesar membranas celulares (Link & Riley, 1988; Halliwell, 1990). La disponibilidad de trazas de metales, una vez dentro de la célula, potencia los efectos deletéreos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediados por la producción de OH<sup>·</sup>, causando así daño aún en lugares alejados de donde se originó.

### II.2.3 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) es el radical libre más reactivo que se conoce y es capaz de dañar a la mayoría de las moléculas que se encuentran en las células (Pastor *et al.*, 2000). Es tan reactivo que solamente existe como tal durante pocos microsegundos (10<sup>-9</sup> seg). Tiene una distancia de difusión pequeña y se combina rápidamente con moléculas vecinas, comenzando una serie de reacciones en cadena que pueden atacar a todas las moléculas presentes en la célula, incluyendo al DNA, provocando mutaciones. El daño biológico causado por el radical mejor caracterizado, es la peroxidación lipídica (Aruoma *et al.*, 1989a). Se acepta que la mayor parte del daño celular causado por el radical O<sub>2</sub><sup>-·</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deriva de la conversión de éstos al HO<sup>·</sup> mediante la reacción de Harber Weiss [Ecuación II.4] (Aruoma, 1989b; Halliwell & Gutteridge, 1999).

La reacción de Fenton [Ecuación II.5], debido a la continua reducción de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> por el O<sub>2</sub><sup>-·</sup>, requiere cantidades submicromolares de hierro. La reacción puede ser catalizada por otros metales divalentes como el cobre, aunque el agente más importante en la producción del radical HO<sup>·</sup> *in vivo* es el hierro (Platenik *et al.*, 2001; Liochev & Fridovich, 2002).

El sistema biológico no contiene sales de hierro libres, este metal se encuentra unido a proteínas, membranas, ácidos nucleicos o agentes quelantes de bajo peso molecular

(Halliwell & Gutteridge, 1999). El hierro no es inmediatamente utilizado por la célula, se encuentra almacenado unido a la transferrina o secuestrado por la ferritina. El  $\text{Fe}^{3+}$  unido a la ferritina puede ser liberado *in vivo* como  $\text{Fe}^{2+}$  a través de la acción de agentes reductores como el ascorbato (Crichton & Charlotheaux-Wauters, 1987) o el  $\text{O}_2^-$  (Buettner *et al.*, 1986).

#### II.2.4 Oxígeno singulete

El Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) posee una configuración electrónica de alta energía. Por ello la vida media de esta especie es corta, sobre todo en solución acuosa, pues pierde rápidamente su energía. Sin embargo en medios hidrofóbicos, como membranas celulares, este tiempo se prolonga, pudiendo reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados formando peróxidos lipídicos.

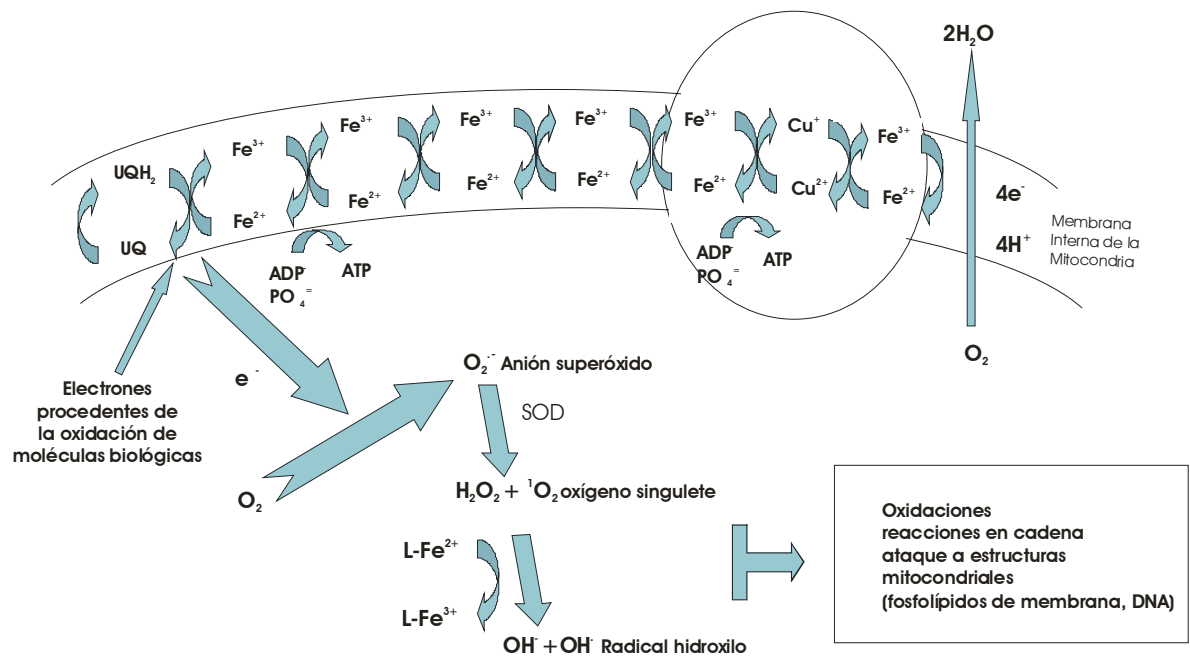
### II.3 FUENTES BIOLÓGICAS DE RADICALES LIBRES

Las ROS y RNS son generadas intracelularmente y extracelularmente. Intracelularmente como consecuencia de la actividad metabólica de mitocondrias, microsomas, y peroxisomas que involucran varios sistemas enzimáticos. Extracelularmente son liberadas por células inflamatorias y macrófagos presentes en los tejidos.

La sangre, fluido biológico compuesto por eritrocitos, leucocitos y plaquetas como elementos celulares, cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y es aquí donde el  $\text{O}_2$  actúa como sustrato en diversas reacciones bioquímicas intracelulares y como resultado se desencadena una gran producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , entre otras ROS.

La mitocondria constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar

adenosina trifosfato (ATP). En este proceso de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo un total de 4 electrones por molécula con producción de 2 moléculas de agua, en más del 95 % de estas reacciones (Figura II.1). Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos (Turrens, 1994).



**Figura II.1:** *Especies activas incompletamente reducidas por la acción secuencial de electrones en la cadena respiratoria*

Los peroxisomas, organelas del citosol muy ricas en oxidasas, generan  $H_2O_2$ , el cual es depurado por enzimas específicas, como las catalasas [Ecuación II.2].

Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleuquinas, etc.). Estas células poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de  $O_2$  que en presencia de hierro se transforma en la especie altamente tóxica

OH<sup>·</sup>. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios (Markert *et al.*, 1984)

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios y normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca<sup>+</sup>, etc.) y genera O<sub>2</sub><sup>-·</sup>.

Los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares. En situación patológica esta producción se incrementa sustancialmente, ingresándose al estado de “estrés oxidativo”. Los factores que llevan a esta situación son:

- Químicos: aumento de metales pesados, xenobióticos, drogas, componentes del tabaco.
- Físicos: radiaciones ultravioleta, hiperoxia.
- Orgánicos y metabólicos: dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia - reperfusión y ejercicios extenuantes.

## II.4 TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

En 1954 una investigadora argentina, *Rebeca Gerschman*, propuso por primera vez, que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades (Gerschman *et al.*, 1954). Por la alta inestabilidad atómica, los radicales libres colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Las ROS se unen a proteínas, rompen las cadenas de ADN, reaccionan con componentes vitales de la célula y atacan los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados enclavados en la estructura de los fosfolípidos de las membranas.

Por acción de los radicales libres sobre las proteínas, se oxidan preferentemente los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina. Como consecuencia de ello se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que

regulan el metabolismo celular, etc.) (Oteiza, 1995). Entre los aminoácidos que se oxidan dando lugar a grupos carbonilos se encuentran lisina, prolina y arginina; el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadtman, 1992).

El daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, con serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formando el radical peroxilo, que genera un gran número de productos por las posteriores reacciones de estas especies radicales del ADN. También se forman puentes cruzados ADN-proteína. La modificación oxidativa más frecuente suele darse a nivel de la guanosina, dando lugar a la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones G-T (Kasai & Nishimura, 1984; Shibutani et al., 1992).

Por otra parte, el daño oxidativo asociado a proteínas y al ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras del ADN puede aumentar el daño oxidativo al mismo, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, ocurre una mutación (Halliwell & Auroma 1991; Breen & Murphy, 1995). El daño al ADN ha sido observado en un gran número de líneas celulares procedentes de mamíferos, expuestas a estrés oxidativo (Halliwell & Auroma, 1991). Este daño incluye roturas de doble y simple cadena, deleciones, cambio de bases, daño oxidativo, e incluso aberraciones en los cromosomas.

Los glúcidos reaccionan fácilmente con los radicales HO $\cdot$ . La glucosa constituye un secuestrante del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son secuestrantes del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos pueden actuar como agentes protectores celulares (Albertini *et al.*, 1996). El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel *et al.*, 1988) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la

viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Grootveld *et al.*, 1991). Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (Grootveld *et al.*, 1991). Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo en la *diabetes mellitus*, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas.

La oxidación de lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) por los radicales libres produce una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina (Figura II.2). En este proceso, conocido como “**peroxidación lipídica**” se dañan las estructuras ricas en lípidos como las membranas celulares y las lipoproteínas. El hierro libre ( $Fe^{2+}$ ) acelera la descomposición de lípidos a hidroperóxidos ( $LOOH^{\cdot}$ ) en compuestos tales como radicales alcoxilos ( $RO^{\cdot}$ ) y peroxilos ( $ROO^{\cdot}$ ), 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Estos compuestos son los productos finales de la descomposición peroxidativa de ácidos grasos poliélicos (Halliwell & Chirico, 1998); son muy reactivos, y pueden oxidar grupos tioles de la célula a distancia de donde se produjo la injuria inicial. La peroxidación lipídica, por lo tanto, puede propagarse a través de la célula, resultando en una disrupción de la membrana lipídica, a veces lejos del sitio en donde se originó la formación de las ROS.

## II.5 MECANISMO DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

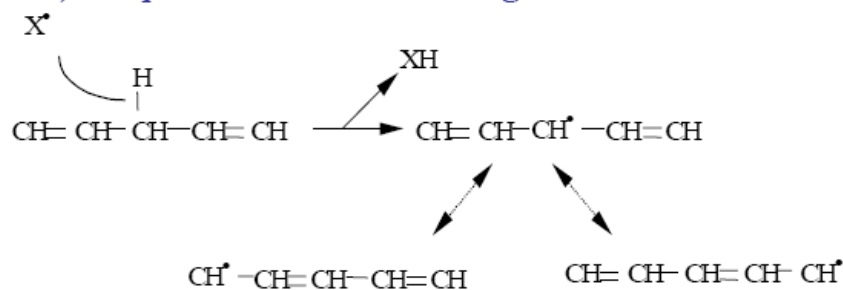
La aparición de ROS y RNS es una característica de la vida aerobia. La existencia y desarrollo de células en un ambiente oxidante no sería posible sin poderosos mecanismos de defensa frente a dichas especies.

Halliwell (Halliwell & Gutteridge, 1999) define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. La función primaria de

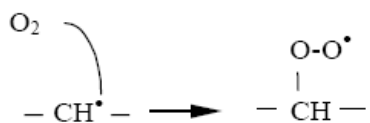
los antioxidantes es asegurar que las concentraciones de radicales libres en la célula se mantengan bajas.

Los mecanismos antioxidantes se pueden dividir en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos.

**a) Ataque oxidativo a un ácido graso insaturado.**



**b) Formación de un radical peróxido, COO<sup>•</sup>.**



**c) Propagación de la reacción.**



**Figura II.2:** Mecanismo de la Peroxidación Lipídica

### II.5.1 Mecanismos no Enzimáticos

Estos mecanismos involucran moléculas de bajo peso molecular con un gran poder reductor, por lo tanto con propiedades antioxidantes. Estos compuestos al colisionar con las ROS y/o RNS les ceden un electrón oxidándose a su vez, y transformándose en un radical libre débil no tóxico. Este tipo de antioxidantes actúan como verdaderos “secuestrantes” de radicales libres. Se los puede clasificar como endógenos, sintetizados por la misma célula o exógenos, antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria (Tabla II.1)

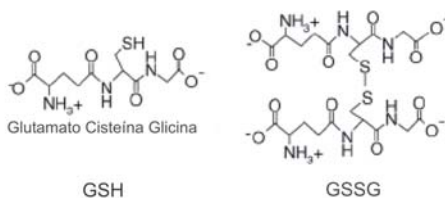


**Tabla II.1: Antioxidantes**

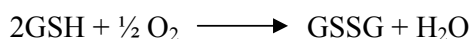
Antioxidantes Endógenos	Antioxidantes Exógenos
Glutation	Vitamina C
Melatonina	Vitamina E
Acido Úrico	Carotenoides
Tiorredoxina	Polifenoles

**II.5.1.1 Glutation**

El estado redox de la célula está determinado por el equilibrio entre especies oxidadas y reducidas de los compuestos biológicos presentes en mayor proporción. El glutatión (GSH) es un tripéptido compuesto por glutamato, cisteína y glicina (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina) (Figura II.3); es el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células y de mayor distribución en los sistemas biológicos, por ello se lo considera un regulador homeostático del estado redox celular.

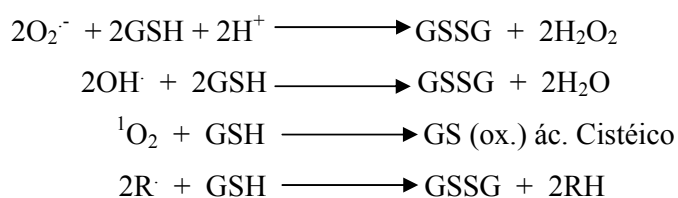
**Figura II.3: Estructura del Glutation**

Los niveles intracelulares de GSH, en mamíferos se hallan en concentración desde 0,5 a 10 mM (Meister & Anderson, 1983; Meister, 1988). Sólo el 1% del total del glutatión se encuentra en su forma oxidada (GSSG), por ello un ligero desplazamiento del equilibrio hacia esta forma afecta drásticamente el estado redox general de la célula [Ecuación II.5].

**Ecuación II.5: Oxidación del Glutation**

Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiol de su cisteína. Puede actuar como reductor en reacciones enzimáticas o no enzimáticas y constituye la fuente de poder reductor más importante en la célula (Kalyanaraman *et al.*, 1996; Briviba *et al.*, 1999). El grupo tiólico del glutathion reducido está muy expuesto por lo que es oxidado rápidamente por el O<sub>2</sub>, evitando la oxidación de los grupos tiólicos de proteínas.

El GSH actúa además, como reductor de puentes disulfuro formados en proteínas por oxidación. Puede eliminar radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO·, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y reducir cualquier molécula orgánica oxidada (Figura II.4).

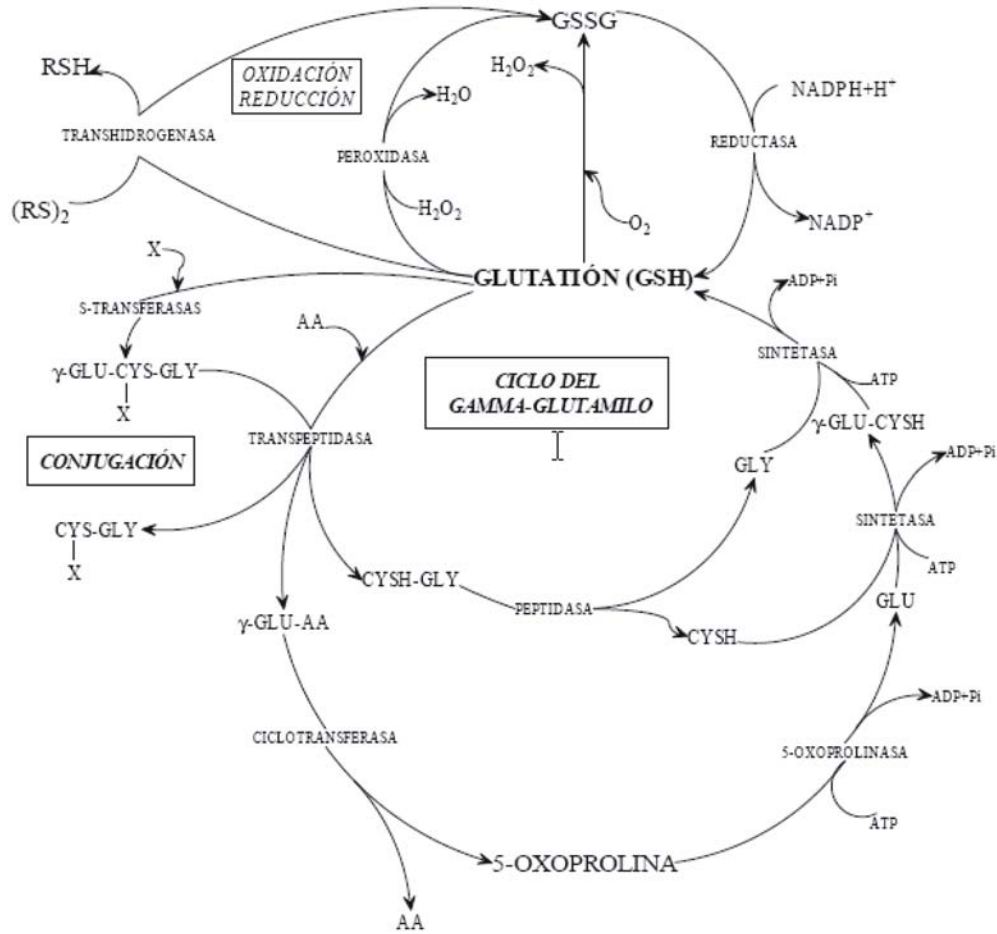



---

**Figura II.4:** Reacciones redox en las que toma parte el Glutathion

También contribuye a la eliminación de peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos, reacción catalizada por la enzima glutathion peroxidasa (GPx) (Figura II.5). La reducción del GSSG es mediada por una enzima ampliamente distribuida en los tejidos, la glutathion reductasa (GRed) dependiente de NADPH (Figura II.5).

El GSH actúa como cofactor de numerosas enzimas y tiene un papel relevante en el metabolismo de xenobióticos, generando ácidos mercaptúricos por acción de las glutathion-S transferasas. Estas enzimas son particularmente abundantes en hígado donde los conjugados de GSH son excretados con la bilis, utilizando los mismos mecanismos de transporte que expulsa el GSSG durante el estrés oxidativo. La acumulación de GSSG por estrés oxidativo puede inactivar una serie de enzimas (adenilato ciclasa, fosfofructoquinasa, fosforilasa fosfatasa) probablemente por formación de puentes disulfuro con ellas (Cheng *et al.*, 1987; Nakajima & Nakamura, 1991; Rubin *et al.*, 2000).



**Figura II.5: Metabolismo del Glutation**

### II.5.1.2 Ácido Úrico

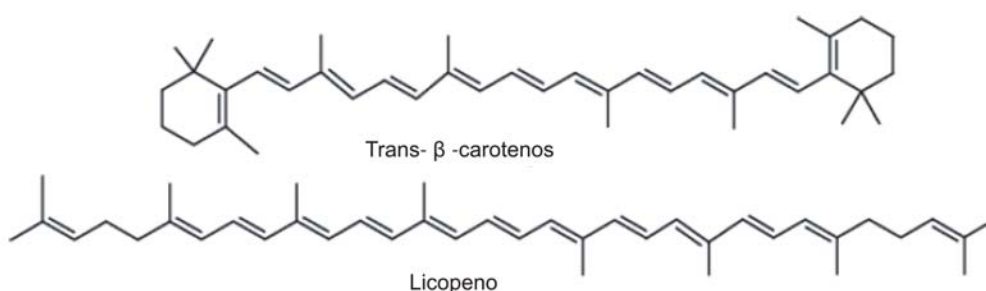
El ácido úrico es un potente secuestrante del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, del radical OH<sup>·</sup> y de radicales ROO<sup>·</sup>, dando lugar a H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ROOH, respectivamente (Ames *et al.*, 1981). Asimismo se ha demostrado la capacidad del ácido úrico para inhibir la peroxidación lipídica (Niki, 1987).

### II.5.1.3 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que se encuentran principalmente en plantas y en microorganismos. Existen en la naturaleza más de 600 carotenoides, de los cuales cerca de

50 son precursores de la vitamina A o retinol. En la dieta la vitamina A puede ser ingerida a través de alimentos de origen animal, mayoritariamente en forma de ésteres de retinilo o a través de alimentos de origen vegetal, en forma de carotenoides, principalmente el  $\beta$ -caroteno.

Tanto el retinol como los carotenoides han mostrado actividad antioxidante, aunque estos últimos son los compuestos más activos. La actividad antioxidante de los carotenoides se debe primariamente a la habilidad de deslocalizar los electrones desapareados mediante los dobles enlaces conjugados presentes en su estructura (Figura II.6) (Mortensen *et al.*, 2001). Reaccionan con  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{RO}^\cdot$  y  $\text{ROO}^\cdot$ , tras la reacción se destruye la molécula. En presencia de radicales peroxilos, el  $\beta$ -caroteno es un eficaz finalizador de la cadena oxidativa. Este efecto se produce siempre y cuando se mantengan bajas las presiones parciales de  $\text{O}_2$ , en caso contrario prosigue el proceso oxidativo; por tanto las condiciones fisiológicas determinan el carácter de antioxidante o pro-oxidante de esta molécula. (Palozza & Krinsky, 1992).



**Figura II.6: Estructuras carotenoides**

El efecto protector de los carotenoides se ejerce sobre moléculas lipídicas y nucleares. Poseen propiedades anticancerígenas, probablemente debido a su habilidad para secuestrar una variedad de radicales de oxígeno que de otra forma causarían daño al ADN y conducirían a la carcinogénesis.

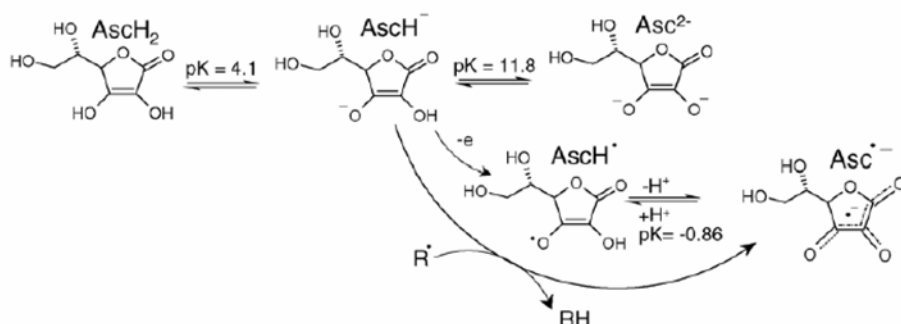
El caroteno es capaz de reducir el daño nuclear inducido por xantina oxidasa/hipoxantina o por los leucocitos polimorfonucleares activados, como así también la peroxidación lipídica causada por ROS (Kurashige *et al.*, 1990; Miki, 1992).

Si bien el  $\beta$ -caroteno es un precursor de la vitamina A, esta vitamina no es capaz de secuestrar  $^1\text{O}_2$  y tiene poca capacidad de hacerlo con otros radicales libres. El  $\beta$ -caroteno aún suministrado en altas dosis por largos períodos no causa toxicidad (Hennerkens, 1986; Hathcock, 1990). Sin embargo, altas dosis de vitamina A y retinoides provocan hepatotoxicidad aguda, además de otros efectos fisiológicos adversos.

#### II.5.1.4 Ácido Ascórbico o Vitamina C

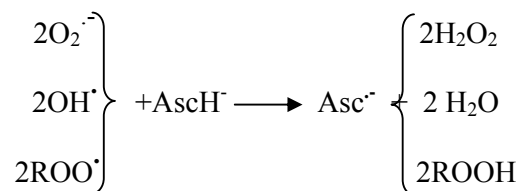
La Vitamina C o ácido ascórbico es un poderoso antioxidante que actúa en los ambientes acuosos del cuerpo, como en los pulmones y en la lente del ojo. Además interactúa con antioxidantes primarios como la Vitamina E y los carotenoides, así como con las enzimas del sistema antioxidante. La Vitamina C coopera con la Vitamina E para regenerar el  $\alpha$ -tocopherol de los radicales  $\alpha$ -tocopherilos en las membranas y lipoproteínas (Carr & Frei, 1999; Kojo, 2004).

El ácido ascórbico es un diácido que tiene dos grupos hidroxilos ionizables ( $\text{AscH}_2$ ) (Figura II.7). A pH fisiológico, el 99,9 % de la Vitamina C está presente como ascorbato ( $\text{AscH}^-$ ), y sólo en muy pequeña proporción como  $\text{AscH}_2$  (el 0.05 %) y  $\text{Asc}^{2-}$  (0.004 %); por lo tanto el  $\text{AscH}^-$  es la especie antioxidante de la Vitamina C.



**Figura II.7:** *Acido Ascórbico*

El  $\text{AscH}^-$  reacciona con radicales libres donando un electrón para producir el radical libre tricarbonil ascorbato ( $\text{AscH}^\cdot$ ), estabilizado por resonancia. Este radical tiene un  $\text{pK} = -0.86$ , por ende no está protonado y está presente en la forma de  $\text{Asc}^{\cdot-}$  (Figura II.7). El producto de la oxidación del ascorbato, por muchas ROS, es el radical semidehidroascorbato ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ ) un radical pequeño y poco reactivo que es considerado como la molécula terminal de la reacción en cadena de radicales libres; el nivel de este radical es una buena medida del grado de estrés de oxidativo en sistemas biológicos (Cuzzorrea *et al.*, 2004; Kasparova, *et al.* 2005). El ácido ascórbico reacciona rápidamente con el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y más rápido aún con el radical  $\text{HO}^\cdot$  (Figura II.8).



**Figura II.8:** Reacciones en la que toma parte el ascorbato

La Vitamina C protege a las membranas contra la oxidación (Retsky *et al.*, 1999). Se ha publicado que bajos niveles en suero de Vitamina C pueden contribuir a aumentar el riesgo de metaplasia gástrica o gastritis crónica, ambas lesiones precancerosas, en poblaciones de alto riesgo (You *et al.*, 2000). El efecto positivo de la Vitamina C para reducir la incidencia de cáncer de estómago es, probablemente, debido a la generación de compuestos N-nitroso que finalizan la reacción entre grupos de amina y nitritos. También se ha encontrado efecto de la Vitamina C sobre el cáncer pulmonar y colonrectal (Knekt *et al.*, 1991).

Algunos estudios *in vitro* y en animales exploraron las propiedades pro-oxidantes del ascorbato (Kang *et al.*, 1998). Este efecto fue atribuido a la reducción, por parte del  $\text{AscH}^-$ , de los iones metálicos liberados por las células dañadas, los que reaccionan rápidamente con el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y más rápido aún con el radical  $\text{HO}^\cdot$  (Figura II.8). La reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , provee todos los componentes necesarios

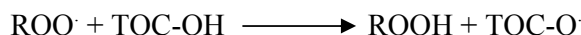
para la Reacción de Fenton [Ecuación II.4] (Standtman, 1991; Smith *et al.*, 1997). Además, se ha descrito que la Vitamina C induce la descomposición de hidroperóxidos lipídicos a los electrófilos bifuncionales 4-oxo-2-nonenal, 4,5 epoxi - 2 (E)-decenal y 4-hydroxy-2-nonenal que reaccionan con el ADN (Lee *et al.*, 2001); este último es un precursor de eteno-2'-deoxyadenosine sumamente mutagénico y se encuentra en las lesiones del DNA humano.

Sin embargo, la mayoría de los estudios *in vivo* mostraron una reducción de los marcadores de oxidación de ADN, lípidos y de daño de proteína después de la suplementación con la Vitamina C, incluso en presencia de hierro, cobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Suh *et al.*, 2003). Algunas publicaciones indican la capacidad del ácido ascórbico de regular factores que pueden influir en la expresión génica, apoptosis y otras funciones celulares debido a su capacidad como antioxidante (You *et al.*, 2000). Los estudios de la actividad anti-apoptótica de la Vitamina C han revelado su papel en la modulación del sistema inmunológico. (Valko *et al.*, 2006).

#### II.5.1.5 Vitamina E

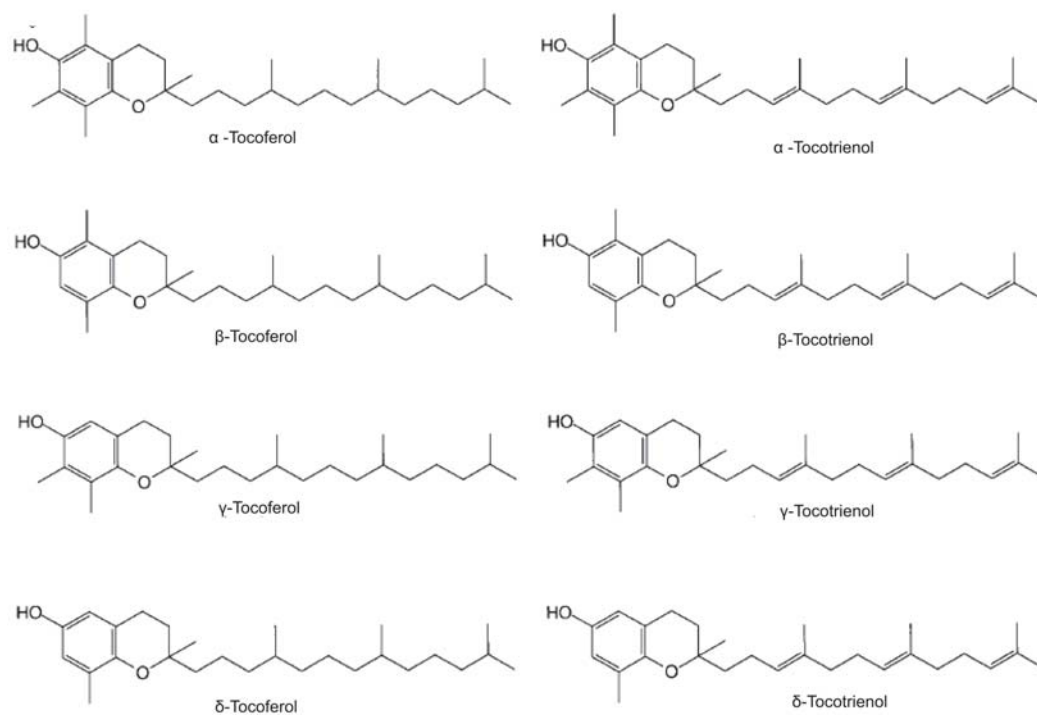
La Vitamina E es compuesto liposoluble que existe en 8 formas diferentes llamadas tocoferoles (Fritsma, 1983). El  $\alpha$ -Tocopherol es la forma más activa de la Vitamina E en humanos; es un poderoso antioxidante biológico, considerado como el principal antioxidante unido a membrana empleado por la célula (Figura II.9) (Burton & Ingold, 1989).

Su capacidad antioxidante suele atribuirse al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol (Ecuación II.6).




---

**Ecuación II.6: Reacción de Generación del Radical Tocoferilo**



**Figura II.9: Estructuras de la Vitamina E**

Su alta solubilidad en lípidos le permite acceder directamente a los grupos peroxilo, frenar la reacción en cadena y evitar la fragmentación de los hidroperóxidos lipídicos (Burton *et al.*, 1983; Pryor, 2000). Como se mencionó anteriormente, el ácido ascórbico es considerado como el antioxidante principal en fase acuosa, pruebas recientes sugieren que  $\alpha$ -tocopherol y ácido ascórbico funcionan juntos en un proceso cíclico. Durante la reacción antioxidante el  $\alpha$ -tocopherol es convertido a un radical  $\alpha$ -tocoferilo por donación de un hidrógeno lábil a un lípido o al radical peroxilo de un lípido; así el radical  $\alpha$ -tocoferilo es reducido a la forma original  $\alpha$ -tocopherol por el ácido ascórbico (Kojo, 2004).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la Vitamina E reduce la incidencia de cáncer colonrectal por inducción de la apoptosis en células cancerígenas (White *et al.*, 1997). Pruebas recientes revelan que dosis diarias de 400UI o más de Vitamina C incrementan el riesgo de muerte (Millar *et al.*, 2005), pero este riesgo no existe con dosis diarias de 200 UI o menos.



### II.5.1.6 Polifenoles

Numerosos estudios han sugerido que el contenido de fotoquímicos de frutas y vegetales contribuyen a su efecto protector contra enfermedades degenerativas. Estos alimentos contienen gran cantidad de compuestos de diversa estructura, de los cuales una fracción importante son los polifenoles (Scalbert & Williamson, 2000).

Miles de moléculas que contienen estructuras polifenólicas (varios grupos hidroxilos en anillos aromáticos), se han identificado en plantas superiores, y muchos se encuentran en plantas comestibles. Estas moléculas son metabolitos secundarios de las plantas y están generalmente involucrados en su defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por patógenos.

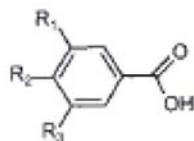
En la dieta los polifenoles se encuentran en aceites, frutas y vegetales, así como en determinadas bebidas obtenidas por fermentación a partir de vegetales como la cebada y el lúpulo en el caso de la cerveza y la uva en el vino. También se puede encontrar en el té, chocolate y otros compuestos del cacao (Manach, 2004).

Los polifenoles se clasifican en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que están unidos a estos anillos. Se pueden clasificar en: ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico y derivados de ácido cinámico), flavonoides, estilbenos y lignanos (Figura II. 10).

En los últimos años ha cobrado especial interés la capacidad antioxidante que presentan determinados polifenoles, especialmente flavonoides, presentes en diferentes vegetales. Estas sustancias se forman en el reino vegetal a partir de la fenilalanina y la tirosina, combinados con unidades de acetato. La estructura básica está formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo (anillo C) (Figura II.11).

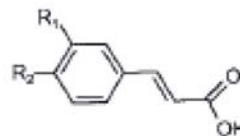
Pueden asimismo, dividirse en 6 subclases en función del tipo de heterociclo involucrado: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y flavanoles (catequinas y proantocianinas) (Figura II.12). Además de esta diversidad, los polifenoles pueden asociarse con varios carbohidratos, ácidos orgánicos y también entre sí.

Ácidos Hidroxibenzoicos



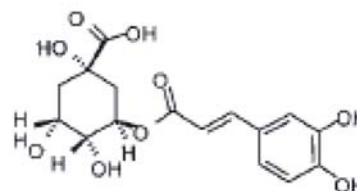
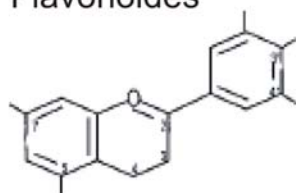
$R_1=R_2=OH$ ,  $R_3=H$  : ácido protocatechuico  
 $R_1=R_2=R_3=OH$ : ácido Gálico

Ácidos Hidroxicinámicos



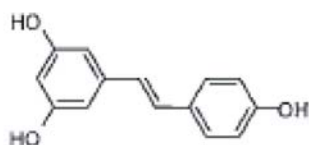
$R_1=OH$ : ácido Cumárico  
 $R_1=R_2=OH$ : ácido Cafeico  
 $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=OH$ : ácido Ferúlico

Flavonoides



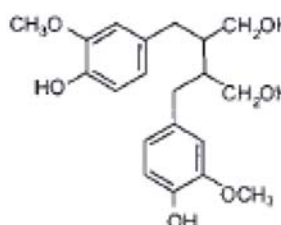
Ácido Clorogénico

Stilbenos



Resveratrol

Lignanós

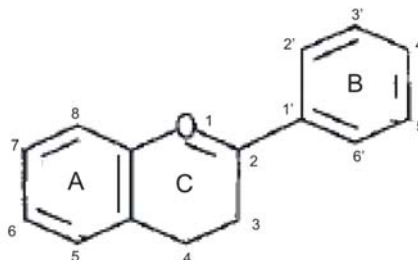


Secoisolariciresinol

**Figura II.10:** Estructura química de los Polifenoles

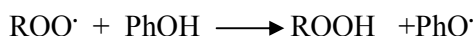
Estudios epidemiológicos muestran que un incremento en el consumo de polifenoles está asociado con la reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y desórdenes neurodegenerativos (Hertog & Hollman, 1996; Arts & Hollman 2005). Los efectos beneficiosos de los polifenoles están principalmente atribuidos a su capacidad de neutralizar las condiciones de estrés oxidativo que acompaña a estas patologías (Rice-Evans, 2001; Polovka et al., 2003). Se ha demostrado que *in vitro* varios polifenoles tienen claras propiedades antioxidantes; pueden actuar como finalizadores de reacciones en cadena o secuestrantes de radicales y como quelantes de metales como hierro

y cobre, capaces de producir peroxidación lipídica (Hu *et al.* 1995; Rice-Evans, 1995, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001).



**Figura II.11:** Estructura básica del esqueleto Flavonoide

Los antioxidantes fenólicos (PhOH) pueden reaccionar directamente con radicales libres formando productos con una reactividad mucho menor, por medio de una rápida donación de átomos de hidrógeno a estos radicales [Ecuación II.7]

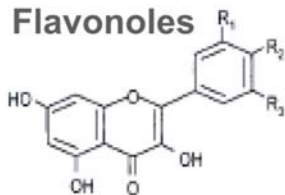



---

**Ecuación II.7: Reacción de los polifenoles con radicales libres**

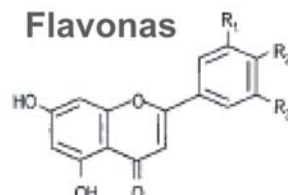
El radical fenoxi intermediario (PhO<sup>·</sup>) es relativamente estable y no deja que se propaguen otras reacciones radicalarias. Actúan terminando las reacciones en cadena por interacción con otros radicales libres. Sin embargo bajo ciertas condiciones, una elevada concentración de antioxidantes fenólicos, la presencia de gran cantidad de metales redox activos (hierro, cobre) y pH elevado, pueden convertirse en pro-oxidantes (Valko *et al.*, 2006).

### Flavonoles



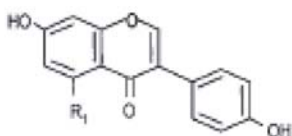
R<sub>2</sub>=OH; R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H: Kaempferol  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=H: Quercetina  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH: Miricetina

### Flavonas



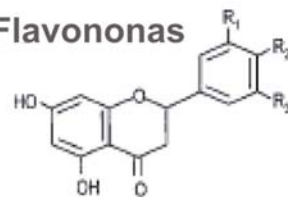
R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH: Apigenina  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH: Luteolina

### Isoflavonas



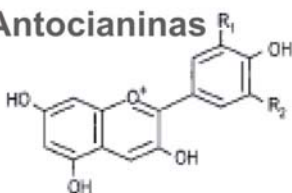
R<sub>1</sub>=H: Daidzeina  
 R<sub>1</sub>=OH: Genisteina

### Flavononas



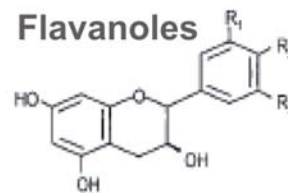
R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH: Naringenina  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH: Eriodictiol  
 R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>: Hesperetina

### Antocianinas

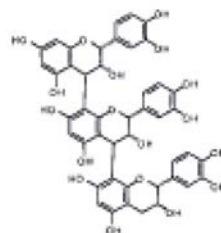


R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H: Pelargonidina  
 R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=H: Cyanidina  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH: Delfinidina  
 R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=OH: Petunidina  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>: Malvidina

### Flavanoles



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH; R<sub>3</sub>=H: Catequinas  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH: Gallocatequinas



Procianidina trimérica

**Figura II.12:** Estructura química de los Flavonoides

La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que les confiere su capacidad para actuar como secuestrantes de radicales libres y quelantes de metales (Hu *et al.* 1995; Rice-Evans, 1995, 2001; Rice-Evans *et al.*, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001). El tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo son algunos de los parámetros que determinan esta actividad antioxidante. Así, según Rice-Evans *et al.*

(1996) los compuestos con mayor actividad son los de estructura flavonoidea, y de estos, aquellos que:

- Presentan dos grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B, lo que confiere una alta estabilidad al radical que se forma después de la reacción de captura del radical libre.
- Contienen un doble enlace 2,3 en conjugación con el 4-oxo (C=O) en el anillo C.
- Tienen grupos OH<sup>-</sup> en la posición 3 y 5 de los anillos A y C respectivamente junto con el grupo oxo (C=O) en la posición 4 del anillo C.

Los diferentes polifenoles *in vivo* pueden tener acción farmacológica que modulan varias actividades celulares. Datos experimentales muestran múltiples actividades biológicas potenciales de los polifenoles. (i) inhibición o reducción de diferentes enzimas tales como la telomerasa (Bielski & Chan, 1973), ciclooxigenasas (O'Leary *et al.*, 2004, Hussain *et al.*, 2005), lipoxigenasas (Schewe *et al.* 2001; Sadik *et al.*, 2003), xantina oxidasa (Van Hoorn *et al.*, 2002), metaloproteinasas (Isemura *et al.*, 1999; Oak *et al.*, 2004), conversión de la enzima angiotensina (Actis-Goretta *et al.*, 2003), proteínas quinasas (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999); (ii) interacción con la ruta de traducción de señales (Kong *et al.*, 2000; Wiseman *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2003); (iii) interacción con receptores celulares (Rosenkranz *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2004). Los polifenoles también pueden interactuar con la vía dependiente de caspasas (Monasterio *et al.*, 2004; Way *et al.*, 2005), interferir con la regulación dependiente de ciclina del ciclo celular (Fischer & Lane 2000); inducir enzimas de detoxificación (Birt *et al.* 2001), aumentar la producción de factores de vasodilatación tales como óxido nítrico (Aldini *et al.*, 2003; Wallerath *et al.*, 2003), inhibir la agregación plaquetaria (Murphy *et al.*, 2003) y competir con la glucosa por el transporte trans membrana (Vera *et al.*, 1996). Es por estas virtudes que los polifenoles ejercen su efecto protector y reciben cada vez mayor atención como agentes terapéuticos contra el cáncer y enfermedades vasculares (Birt *et al.* 2001; Kris-Etherton & Keen, 2002). Además se ha demostrado que pueden ofrecer una protección indirecta por activación del sistema de defensa endógeno.

Se han publicado efectos pro-oxidantes de los polifenoles (Elbling *et al.*, 2005), tales como inducción de apoptosis, muerte celular y bloqueo de la proliferación celular (Lambert *et al.*, 2005). También se ha sugerido que estos efectos puedan neutralizarse por dos motivos, en primer lugar los compuestos fenólicos son metabolizados *in vivo*, dando

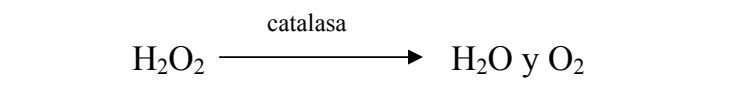
compuestos que pierden su potencial antioxidante, por pérdida de la estructura fenólica (Bors *et al.*, 2001). Secundariamente las concentraciones de polifenoles y sus metabolitos, *in vivo*, en plasma o tejidos, son menores que las de otros antioxidantes tales como ácido ascórbico y/o  $\alpha$ -tocoferol, los cuales hacen su competencia improbable (Spencer *et al.*, 2004; Williamson & Manach, 2005).

## II.5.2 Mecanismos Enzimáticos

Este tipo de mecanismos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con radicales libres o que actúan específicamente sobre determinadas especies reactivas.

### II.5.2.1 Catalasa

La enzima catalasa (E.C.1.11.1.6) es una enzima presente en células de plantas, animales y en bacterias aeróbicas (Mates *et al.*, 1999). En animales se encuentra especialmente concentrada en eritrocitos y en hígado, localizada principalmente en los peroxisomas. Cataliza la reacción de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  [Ecuación II.8].



**Ecuación II.8: Reacción catalizada por la Catalasa**

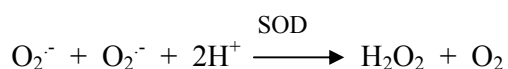
Es de gran importancia en el metabolismo de las ROS y se puede considerar como secuestrante de radicales libres, aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sea estrictamente un radical (Galeotti *et al.*, 1990).

La cinética de esta enzima no obedece a un patrón normal, es una enzima no saturable por sustrato, existe una rápida inactivación a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mayores que 0,1 M (Aebi, 1984). La enzima purificada está formada por 4 subunidades proteicas, cada una de las cuales posee un grupo hemo unido a un sitio activo. Tiene un peso molecular que oscila entre 210 kD y 280 kD. Cada subunidad suele contener también una molécula de NADPH unida, que ayuda a estabilizar la enzima (Kirkman, 1987).

El rol protector de la catalasa frente al ataque oxidativo se pone de manifiesto en situaciones como la hiperoxia, en la que se produce una mayor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yusa *et al.*, 1987) y que suele asociarse con inducciones adaptativas de la actividad de la enzima (Frank *et al.*, 1980; Barja de Quiroga *et al.*, 1988).

### II.5.2.2 Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) es una metaloenzima que cataliza muy eficientemente la dismutación del radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Ecuación II.9].




---

#### **Ecuación II.9: Reacción catalizada por la Superóxido Dismutasa**

En humanos se han descrito tres tipos de SOD (Landis & Toser, 2005). Todas ellas catalizan la misma reacción con un mecanismo idéntico, pero se diferencian en el metal presente en su centro activo. Esta enzima destruye el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, con una elevada velocidad de reacción, por sucesivas oxidaciones y reducciones del ión del metal de transición presente en el sitio activo mediante un mecanismo tipo “Ping Pong” (Mates *et al.*, 1999).

La Cu/Zn-SOD se encuentra en el citoplasma de todas las células eucariotas. Tiene un peso molecular de 32 kD con dos subunidades de 153 aminoácidos, cada una de las cuales posee un sitio activo con un átomo de cobre, con actividad catalítica, y otro de zinc, que estabiliza la estructura (Halliwell & Gutteridge, 1999, Mates *et al.*, 1999). Es una enzima muy estable lo que facilita su aislamiento pero es fuertemente inhibida por cianuro, lo que la diferencia del resto de las SOD.

La Mn-SOD es una proteína aislada primeramente en *E. coli* cuyo peso molecular es de 40 kD. En organismos bacterianos suele tener 2 subunidades. También se ha aislado en organismos superiores pero tan sólo en la matriz mitocondrial (Wolin, 2000). En estos organismos posee 4 subunidades, es mucho más lábil que la Cu/Zn-SOD y no se inhibe por cianuro. La dismutación del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> catalizada por esta isoforma se produce en dos pasos, en el primero, el Mn(III) pasa a Mn(II) y en el segundo paso vuelve a la forma Mn(III). La

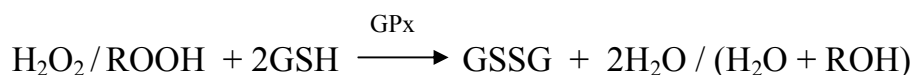
Mn-SOD es una de las enzimas antioxidantes más efectiva que tiene acción antitumoral (Behrend et al., 2003)

La SOD extracelular (EC-SOD) es una glicoproteína secretoria, tetramérica que contiene cobre y cinc, tiene elevada afinidad por ciertos glucosaminoglicanos como la heparina y la sulfato heparina (Mates *et al.*, 1999). En tejido de mamíferos esta regulación ocurre primariamente de manera coordinada por citocinas antes que como una respuesta individual de la célula ante oxidantes (Valko *et al.*, 2006).

Otras clases de SOD incluyen la Fe-SOD, que es similar a la Mn-SOD pero se encuentra casi exclusivamente en procariotas y algas, y la Ni-SOD recientemente descubierta en *Streptomyces* y cianobacterias (Barondeau *et al.*, 2004).

### **I.5.2.3 Glutation Peroxidasa**

Existen dos formas de Glutation Peroxidasa, una selenio independiente, la Glutation-S-Transferasa (GST, EC.2.5.1.18), y otra selenio dependiente (GPx, EC.1.11.1.19)) (Mates *et al.*, 1999). La GPx es el miembro más importante dentro del grupo de las peroxidasas en células animales. Cataliza la oxidación de GSH a la forma GSSG con un concomitante consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Ecuación II.10] (Halliwell & Gutteridge, 1999).




---

**Ecuación II.10: Reacción catalizada por la Glutation Peroxidasa**

En humanos la GPx tiene un peso molecular de 84 kD y está constituida por 4 subunidades de 182 aminoácidos con un átomo de selenio (Se) en el centro activo de cada subunidad (Mates *et al.*, 1999). Su sustrato específico es el GSH, aunque puede utilizar peróxidos orgánicos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; todas las GPx adicionan 2 electrones para reducir los peróxidos y formar selenoles (Se-OH).

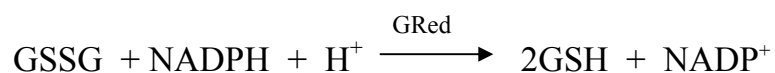


La GPx actúa paralelamente a la catalasa. En las células de hígado de rata, en las cuales la concentración de ambas enzimas es muy alta, 2/3 de la GPx está localizada en el citosol y el tercio restante reside en la mitocondria; mientras que la totalidad de la actividad de catalasa se encuentra en el peroxisoma (Flohé & Schlegel, 1971). En eritrocitos humanos, tanto la GPx como la catalasa participan equitativamente en la eliminación del peróxido (Gaetani, 1989).

El Se se encuentra en el centro activo como seleno-cisteína, es decir ocupando el lugar del S en el grupo tiólico de la cisteína. Las dietas animales requieren trazas de Se en cantidades elevadas es tóxico. Varios síntomas de la deficiencia de Se se han asociado a baja actividad de GPx. La relación GSSG/GSH en células normales se mantiene baja, debido a que otra enzima, la glutatión reductasa, vuelve a reducir el GSSG a GSH.

#### **I.5.2.4 Glutation Reductasa**

La glutatión reductasa (GRed) (EC 1.6.4.2) es la enzima encargada de mantener el equilibrio GSH/GSSG, llevando a cabo la reacción de reducción del GSSG con consumo de NADPH [Ecuación II.11].



**Ecuación II.11: Reacción catalizada por la Glutation Reductasa**

La GRed también puede catalizar la reducción de ciertos bisulfuros mixtos, tales como los que se forman entre GSH y el coenzima A. Estructuralmente la GRed contiene dos subunidades proteicas, cada una con un nucleótido de flavina (FAD) en su centro activo. El NADPH reduce el FAD, el que pasa sus electrones al puente disulfuro entre dos cisteínas de la proteína. Los dos grupos tiólicos así formados interaccionan con el GSSG y lo reducen a 2 GSH, volviéndose a formar el puente disulfuro de la proteína.

### II.5.2.5 Hemo Oxigenasa

La HO, la enzima limitante de la ruta de degradación del hemo, es inducida en tejidos animales, particularmente en hígado, por muchos factores tales como su sustrato hemo, hemoproteínas, metales pesados, radiación UV, hipoxia, hiperoxia y otros (Maines & Kappas 1976; Keyse & Tyrell, 1989; Tomaro *et al.*, 1991; Abraham *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2000, Maines 2005)

Los productos finales de la degradación de hemo, CO y bilirrubina, juegan un rol importante en la adaptación de la célula a condiciones de estrés oxidativo ya que poseen propiedades regulatorias y antioxidantes respectivamente (Maines, 1997; Morse & Choi, 2002). Stoker *et al.* (1987) fueron los primeros en demostrar que a concentraciones fisiológicas, la bilirrubina protege eficientemente contra la oxidación de lípidos de membranas, y que su propiedad de secuestrar radicales libres es superior a la del  $\alpha$ -tocoferol y la Vitamina C. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron el rol de la HO-1 y su producto bilirrubina como protectores de la célula contra el daño oxidativo (Llesuy & Tomaro, 1994; Ossola & Tomaro, 1995, 1998; Ossola *et al.*, 1997, 2000; Clark *et al.*, 2000; Noriega *et al.*, 2000).

Si bien el catabolismo del hemo genera la liberación del hierro, cuya presencia aumenta el daño oxidativo producido por  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , algunos estudios demostraron que el hierro liberado por la inducción de la HO aumenta los niveles de ferritina, la enzima encargada de secuestrar el hierro libre, incrementando de este modo la resistencia al estrés oxidativo (Ossola *et al.*, 2000; Ryter & Tyrrell, 2000).

## II.6. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE EN EL DAÑO HEPÁTICO

Se acepta que el estrés oxidativo es de gran importancia en los disturbios de las funciones del hígado (Rosser & Gores, 1995). La peroxidación lipídica se cree que es la principal causa del daño hepatocelular.

Tanto en pacientes como en animales con enfermedad hepática se observa, en plasma y tejido, un incremento de los marcadores de peroxidación lipídica, tales como

LOOH<sup>-</sup> y MDA (De Maria *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Baron & Muriel, 1999); y un contenido reducido de antioxidantes, como GSH, y vitaminas A y E. (Singh *et al.*, 1992; De Maria *et al.*, 1996; Bianchi *et al.*, 1997). Los macrófagos están íntimamente involucrados en este proceso debido a que ellos generan ROS y RNS, una vez estimulados por fibrogénesis (Poli & Parola, 1997).

Las fuentes de radicales libres pueden ser subdivididas en intra y extra hepáticas. Las intrahepáticas incluye agentes etiológicos responsables del daño hepático, como virus, bacterias, toxinas, drogas, retención de sustancias endógenas tales como ácidos biliares y acumulación de hierro o cobre.

Los ácidos biliares se acumulan en el plasma de los pacientes con colestasis (Ostrow, 1993). Los ácidos biliares hidrofóbicos tales como ácido cólico y quenodeoxicólico son pro-oxidantes causando daño tisular mediado por ROS (Sokol *et al.*, 1993, 1995). En la enfermedad hepática inducida por alcohol, existen múltiples procesos asociados al metabolismo de este xenobiótico que promueven la generación de ROS. En el daño hepatocelular por sobrecarga de hierro y cobre, se incrementa el estrés oxidativo por aumento de reacciones catalizadas por metales. En la hepatitis viral, las células de Kupffer son activadas para generar y liberar ROS y RNS, eicosanoides, y citocinas como parte de la respuesta inflamatoria universal. Elementos humorales, tales como endotoxinas, ácidos biliares hidrofóbicos, y xenobióticos, también pueden activar las células de Kupffer y liberar radicales libres (Ljubuncic *et al.*, 1996; Sung & Go, 1999).

Las fuentes extrahepáticas de generación de ROS y RNS incluyen la activación crónica de los sistemas nervioso parasimpático y renina- angiotensina. El primero se refleja en un incremento de las concentraciones plasmáticas de catecolaminas (Henriksen *et al.*, 1985) que al ser prooxidantes, estimulan la generación de ROS. (Singal *et al.*, 1983). El segundo produce un aumento de la concentración en plasma de angiotensina II (Henriksen *et al.*, 1985), que puede causar la liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por una estimulación, dependiente de NADH/NADPH, de oxidasas unidas a membranas de las células del músculo liso vascular (Oskarsson & Hesitad, 1997) y neutrófilos circulantes (Weiss, 1989).

Se ha documentado que el estrés oxidativo en el hígado no está confinado solamente a la enfermedad hepática, sino que es un fenómeno sistémico que involucra tejidos extrahepáticos, tales como riñón, corazón y cerebro (Bomzon *et al.*, 1997; Ljubuncic *et al.*, 2000). El origen de ROS y RNS puede ocurrir por la existencia de estrés oxidativo en tejidos extra hepáticos que involucra la liberación de factores intrahepáticos.

Por ejemplo los ácidos biliares pueden acumularse intracelularmente en virtud de su habilidad a unirse a lipoproteínas plasmáticas, específicamente LDL (Ceryak *et al.*, 1993) que son blanco de todas las células. Estas LDLs pueden jugar un rol importante en el transporte de ácidos biliares, potencialmente tóxicos, desde el plasma hasta el interior de la célula del tejido extracelular y generar ROS cuando la integridad de la circulación enterohepática está interrumpida o por la liberación de ácidos biliares a la circulación sistémica. La médula ósea también puede contribuir al estrés oxidativo de tejido extrahepático. Células polimorfonucleares circulantes son activadas por el daño hepático, estas células liberan ROS, tanto como NO y citoquinas. La presencia en plasma de MDA y sustancias similares pueden, en sí mismas, agravar la citotoxicidad inducida por ROS. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

### **II.6.1 Sistema Antioxidante en el hígado**

El hígado contiene grandes concentraciones de Catalasa y GPx. Mientras que la Catalasa está prácticamente en su totalidad en los peroxisomas, la GPx se encuentra principalmente en el citosol y en la matriz mitocondrial; con una distribución similar a la del GSH. De forma que, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido, por ejemplo, por la urato oxidasa en los peroxisomas es eliminado principalmente por la catalasa, mientras que el generado en las mitocondrias, el retículo endoplasmático o por las enzimas citosólicas como la SOD es eliminado por la GPx.

En presencia de colestasis o daño hepático producido por alcohol, los niveles de GSH hepáticos están disminuidos (Nanji & Zakim, 1996). Los mecanismos por los cuales se produce esta disminución son multifactoriales, el tratamiento con quelantes es capaz de aumentar los niveles de GSH (Nanji & Zakim, 1996). Deficiencias de vitaminas liposolubles pueden observarse especialmente en formas colestáticas, y en enfermedades producidas por una mala absorción. En síndromes de sobreproducción de hierro, donde el catabolismo del ácido ascórbico está acelerado se han encontrado niveles disminuidos de vitamina C (Ceryak *et al.*, 1993).

Con respecto a algunas enzimas antioxidantes, se ha demostrado que la expresión de Catalasa y GPx está incrementada en afecciones hepáticas. Este incremento probablemente, es compensatorio, ya que productos de peroxidación lipídica que incluyen

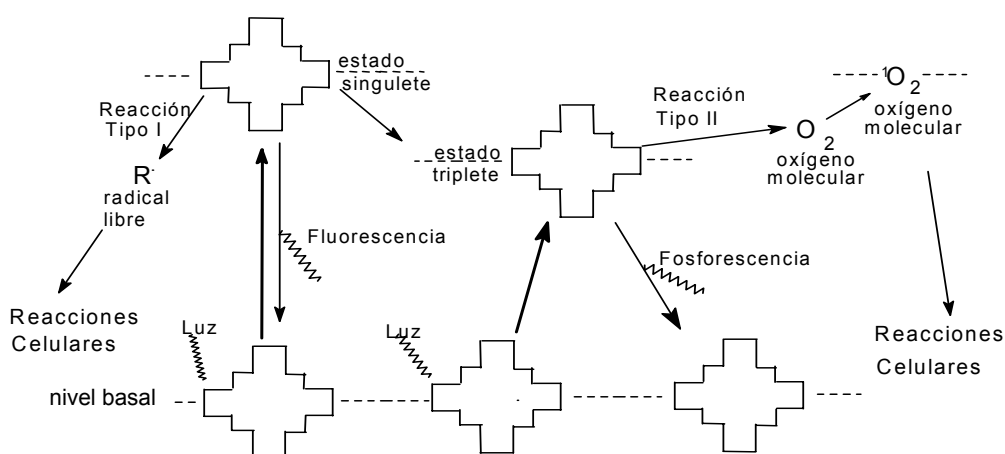
LOOH<sup>-</sup> pueden inducir la expresión de GPx y catalasa en hepatocitos (Ceryak *et al.*, 1993, Meilhac *et al.*, 2000).

## II.7 PORFIRINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las porfirinas absorben intensamente energía radiante en la banda de Soret (400-410nm) y, en menor grado en la región visible (580-650nm), resultando en transiciones a estados electrónicos excitados (Magnus *et al.*, 1959)

Las porfirinas excitadas pueden producir dos tipos de reacciones fotodinámicas (Figura II.13):

- (i) Reacciones Tipo I que involucran transferencia de electrones o hidrógeno entre las porfirinas excitadas y las estructuras biológicas, con generación de radicales libres y otros intermediarios reactivos.
- (ii) Reacciones tipo II que involucran transferencia de energía entre las porfirinas en estado triplete y el oxígeno, con formación de oxígeno singlete. El oxígeno singlete, a su vez actúa sobre los tejidos produciendo daño oxidativo en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y es capaz de generar otras ROS, aumentando así su toxicidad.



**Figura II.13:** Excitación de las Porphirinas con la luz- Reacciones Tipo I y Tipo II

La heterogeneidad de las manifestaciones cutáneas de las porfirias se debe a la acumulación de porfirinas y a sus diferentes respuestas a la luz relacionadas con sus propiedades físicas y químicas (Meyer & Schmid, 1978). Por ejemplo la PROTO IX se acumula predominantemente en mitocondrias y membranas biológicas, mientras que URO se acumula en lisosomas y no se asocia a membranas (Sandberg *et al.*, 1982), por lo tanto, las distintas porfirinas tendrán distintos efectos sobre los tipos específicos de células.

Estudios realizados *in vitro* indicaron que los tetrapirroles pueden interactuar directamente sobre las proteínas. La irradiación de las enzimas en presencia de porfirinas induce fundamentalmente reacciones fotodinámicas Tipo I, aunque al mismo tiempo pueden ocurrir reacciones Tipo II (Afonso *et al.*, 1996). Se ha observado que la acción de las porfirinas produce cambios conformacionales en la estructura proteica de las enzimas, que reducen su actividad y las hacen más susceptibles al ataque proteolítico (Afonso *et al.*, 1987, 1990, 1991, 1994, 1997).

Los tetrapirroles no sólo afectan a las enzimas aisladas sino que también producen alteraciones en las proteínas presentes en el medio celular. La acción de las porfirinas afecta la funcionalidad de las enzimas de la biosíntesis del hemo y, en el caso de las porfirias, aumenta las deficiencias de este camino metabólico.

La absorción de energía lumínica por las porfirinas circulantes induce la generación de ROS, y su producción anormalmente alta sobrepasa la capacidad de los mecanismos de defensa de las células, conduciendo al daño molecular, celular y tisular, magnificando así el cuadro porfirico.

Además de la acción fotodinámica, las porfirinas producen efectos tóxicos independientes de la luz. La acumulación en los tejidos interfiere con el sistema redox de la célula (Morehouse *et al.*, 1987; van Steveninck *et al.*, 1987, 1988). Estudios *in vitro* demostraron que en oscuridad las porfirinas pueden conducir a la formación de ROS y se propuso a la peroxidación lipídica como principal mecanismo de disfunción de la membrana y daño tisular asociado con radicales libres iniciadores del proceso (Comporti, 1985; Tribble *et al.*, 1987, Afonso *et al.*, 1987, 1990, 1991, 1994).

**II.8 REFERENCIAS**

- Abraham NG, Drummed GS, Lutton JD, Kappas A. (1996). The biological significance and physiological role of heme oxygenase. *Cell Physiol. Biochem.* 6: 129–168.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. (2003). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett.* 555: 597–600.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Afonso S, Chinarro S., Muñoz J., Salamanca R.E; Batlle A. (1987). Light-dependent and light-independent inactivation of red cell porphobilinogenase by Type I and III porphyrins. *Boll. Ist. Dermatol. S. Gallicano.* XIII: 35-40
- Afonso S, Chinarro S, Muñoz J, Salamanca RE, Batlle A. (1990). Photodynamic and non-photodynamic action of several porphyrins in the activity of some heme-enzymes. *J. Enzyme Inhibition.* 3: 303-310
- Afonso S, Chinarro S, Salamanca RE, Batlle A. (1991). Further evidence on the photodynamic and the novel non-photodynamic inactivation of uroporphyrinogen decarboxylase by uroporphyrin I. *J. Enzyme Inhibition.* 5: 225-233
- Afonso S, Chinarro S., Salamanca RE. Batlle A. (1994).  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase inactivation by uroporphyrin I in light and darkness. *Int. J. Biochem.* 26: 255-258
- Afonso S, Polo CF, Salamanca RE, Batlle A. (1996). Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 415-420.
- Afonso S, Salamanca RE, Batlle A. (1997). Folding and unfolding of  $\delta$ aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase induced by URO and Protoporphyrin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29: 493-503.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, De Luca G. (1996). The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 327(2):209-214.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593–615.
- Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. (2003). Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.* 73:2883– 2898.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 6858-6862.
- Andrae U, Singh J, Ziegler-Skylakakis K. (1985) Pyruvate and related aketoacids protect mamalian cells in culture against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 28: 93-98.
- Arts IC, Hollman PC. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl):317S–325S.

- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge J M. (1989a) The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem. J.* 258: 617-620.
- Aruoma OI., Halliwell B., Gajewski E, Oizdaroglu M. (1989b) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.* 264: 20509-20512.
- Barja de Quiroga G, Gil P, Lopez-Torres M. (1988). Physiological significance of catalase and glutathione peroxidases, and *in vivo* peroxidation, in selected tissues of the toad *Discoglossus pictus* (Amphibia) during acclimation to normobaric hyperoxia. *J. Comp. Physiol. [B]* 58(5):583-590.
- Baron V, Muriel P. (1999) Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidant on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 173-180.
- Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED. (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* 43: 8038–8047.
- Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1441–1444.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65: 1865–1874.
- Bianchi G, Bugianesi E, Ronchi M, Fabri A, Zoli M, Marchesini G. (1997). Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. *J. Hepatol* 26: 606-613.
- Bielski BH, Chan PC. (1973) Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinate-adenine nucleotides. I. Lactate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of bound NADH by superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 873-879 .
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90: 157– 177.
- Bomzon A, Holt S, Moore K. (1997). Bile acid, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin. Nephrol.* 17: 549-562.
- Borel JP, Monboise JC, Bellon G. (1988). Inflammation, collagene et radicaux libres oxygénés. *Med. Sci.* 5:304-311.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K. (2001). Structure–activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods Enzymol.* 335:166–180.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128(3):617-630.
- Breen AP, Murphy JA. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1033-1077.
- Briviba K, Klotz LO, Sies H. (1999). Defenses against peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 301:301-311.
- Brodie AE, Reed OJ. (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 120-125



- Buettner GR, Saran M, Bors W. (1986). The kinetics of the reaction of ferritin with superoxide. *Free Rad. Res. Comm.* 2: 369-372.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chainbreaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 281-290.
- Burton GW, Ingold KU. (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. NY Acad. Sci.* 570: 7-22.
- Cadenas E, Davies KJ. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29:222-230.
- Carr A, Frei B. (1999). Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007-1024.
- Ceryak S, Bousearel B, Fromm H. (1993). Comparative binding of bile acids to serum lipoproteins and albumin. *J. Lipid Res.* 34: 1661-1674.
- Chen MF, Mo LR, Lin RC, Kuo JY, Chang KK, Liao C, Lu FJ. (1997). Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Radic. Biol. Med.* 23(4):672-679.
- Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. (2000). Dynamics of heme oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem. J.* 348: 615-619.
- Comporti M. (1985). Lipid peroxidation and cellular damage in toxic injury. *Lab. Invest.* 53: 599-623.
- Crichton RR, Charlotheaux-Wauters M. (1987). Iron transport and storage. *Eur. J. Biochem.* 164:485-506
- Cuzzocrea S, Thiemermann C., Salvemini D. (2004). Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation, *Curr. Med. Chem.* 11: 1147-1162.
- De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. (1996). Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 291-295.
- Del Maestro RF. (1980). An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand. Suppl* 492: 153-168.
- Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. (2005). Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* 19(7):807-809.
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 273: 7-17.
- Fischer PM, Lane DP. (2000). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anticancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 7:1213- 1245.

- Flohé L, Schlegel W. (1971). Glutathione peroxidase IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 352(10):1401-1410.
- Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12: 773-790.
- Frank L, Summerville J, Massaro D. (1980) Protection from oxygen toxicity with endotoxin. Role of the endogenous antioxidant enzymes of the lung. *J. Clin. Invest* 65: 1104-1110.
- Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. *J. Biol. Chem.* 264:7761-7764.
- Fritsma G A. (1983) Vitamin E and autoxidation. *Am. J. Med. Technol.* 49: 453-456.
- Gaetani GF, Galiano S., Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood.* 73: 334-339.
- Galeotti T, Borrello S, Masoti L. (1990). Oxygen radicals: systemic events and disease processes. *Das. E. Eds. (Karger, Basel), pp. 129-148.*
- Gamet-Payrastré L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Peyrastré B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol.* 32:279-286.
- Gerschman R, Gilbert DI, Nye SW, Dwyer P, Fenn Wo. (1954). Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common. *Science* 119:623-626.
- Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett.* 349: 197-200.
- Greenwald RA, Moy WW. (1980). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23: 455-463.
- Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. (1991). Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem. J.* 273(Pt 2):459-67.
- Halliwell B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comm.* 9: 1-32
- Halliwell, B; Auroma, OI. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Halliwell B, Chirico S. (1998). Lipid Peroxidation: its mechanism measurement, and significance. *Am J. Clin Nutr.* 57 (suppl.), 715s-725s.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1988) Iron as a biological prooxidant. *ISI. Atlas Sci. Biochem.* 1:48-52
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.
- Hassanain H H, Goldschmidt-Clermont P J (2001). Rac, superoxide, and signal transduction. *En: Antioxidant and Redox Regulation of Genes. Ed.: Sen C. K., Sies H, Baeuerle P.A. Acad. Press, San Diego. Cap. 1, pp 3-20*

- Hathcock JN. (1990). Nutritional toxicology: basic principles and actual problems. *Food Addit. Contam. Suppl* 1:S12-S18.
- Hennekens CH. (1986). Vitamin A analogues in cancer chemoprevention. *Important Adv Oncol.* :23-35.
- Henriksen J, Ring-Larsen H, Christensen NJ. (1985). Sympathetic nervous activity in cirrhosis. A survey of plasma catecholamine studies. *J. Hepatol.* 1(1): 55-65.
- Hertog MGL, Hollman PCH. (1996). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J. Clin. Nutr.*50: 63–71.
- Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe DA. (1995). Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elem Res.* 47(1-3):327-331.
- Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. (2005). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 113:660– 669.
- Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA Jr, Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochrane CG. (1988). Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 263(4):1665-1675.
- Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 10(23):2495-2505.
- Isemura M, Saeki K, Minami T, Hayakawa S, Kimura T, Shoji Y, Sazuka M. (1999). Inhibition of matrix metalloproteinases by tea catechins and related polyphenols. *Ann N Y Acad Sci.* 878:629-631.
- Jezek P, Hlavatá L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(12):2478-2503.
- Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. (1996). Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols--a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). *Anal. Biochem.* 241(1):75-81.
- Kang SA, Jang YJ, Park H. (1998) In vivo dual effects of Vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Rad. Res.* 28: 93–107.
- Kasai H, Nishimura S. (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12: 2137-2145.
- Kasparova S, Brezova V, Valko M, Horecky J, Mlynarik V, Liptaj T, Vancova O, Ulicna O, Dobrota D. (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem. Int.* 46: 601–611.
- Keyse SM, Tyrrell RM. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 99–103.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. (1987) The function of catalase-bound NADPH, *J. Biol. Chem.* 262: 660-666.

- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Rissanen A, Aromaa A, Heinonen OP, Albanes D, Heinonen M, Pukkala E, Teppo L. (1991). Dietary antioxidants and the risk of lung-cancer. *Am. J. Epidemiol.* 134: 471–479.
- Kojo S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 11:1041–1064.
- Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. (2000). Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* 23:1– 16.
- Kris-Etherton PM, Keen CL. (2002). Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* 3: 41–49.
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279(6):4127-4135.
- Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. (1990). Inhibition of oxidative injury of biological membranes by axtaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22(1):27-38.
- Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(Suppl):284S–291S.
- Landis GN, Tower J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation, *Mech. Ageing Dev.* 126: 365–379.
- Lee SH, Oe T, Blair LA. (2001). Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 292: 2083–2086.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 37(12):1921-1942.
- Llesuy SF, Tomaro ML. (1994). Heme oxygenase and oxidative stress: evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1223: 9–14.
- Li CY, Jackson RM. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 282: C227-C241.
- Link EM, Riley PA. (1988) Role of hydrogen peroxide in the cytotoxicity of the xanthine/xanthine oxidase system. *Biochem. J.* 249: 391-399.
- Liochev SI, Fridovich I. (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7(1):55-57.
- Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. (1996). Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut.* 39: 475-478.
- Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. (2000). Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut.* 47(5):710-716.
- Magnus I., Porter AO, Rimington C. (1959). The action spectrum for skin lesion in porphyria cutanea tarda. *Lancet.* 1, 912-914

- Maines MD. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:517-554.
- Maines MD. (2005). The heme oxygenase system: update. *Antioxid. Redox Signal.* 7(11-12):1761-1766.
- Maines MD, Kappas A. (1976). Studies on the mechanism of induction of haem oxygenase by cobalt and other metal ions. *Biochem. J.* 154(1):125-131.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727– 747.
- Markert M, Andrews PC, Babior BM. (1984). Measurement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol.* 105:358-365.
- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* 32: 595–603.
- Meilhac O, Zhou M, Santanam N, Parthasarathy S. (2000). Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J. Lipid. Res.* 41: 1205-1213.
- Meister A, Anderson ME. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Meister A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263(33): 17205-17208.
- Meyer US; Schmid R. (1978). En *Metabolic basis of inherited diseases* (Eds.J.B. Stanbury; J.B. Wyngaarden & D.S.Frederickson). Mc Graw-Hill, New York. pp 1166-1220.
- Miki W. (1992). Recent advances in carotenoid studies-metabolisms and bioactivities. *Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) Spec N°:* 469-472.
- Millar ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. (2005). Meta-analysis: high-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med.* 142: 37–46.
- Moldovan L, Moldovan NI. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem. Cell. Biol.* 122(4):395-412.
- Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, Lopez-Moratalla N, Martinez-Irujo JJ. (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutr. Cancer.* 50: 90–100.
- Morehouse KM, Moreno SNJ, Mason RP. (1987). The one-electron reduction of uroporphyrin 1 by rat hepatic microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 276-284.
- Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 13–19.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol. Sci.* 80:14–25.

- Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(6):1466-1473.
- Nakajima Y, Nakamura K. (1991). Chemical modification of the most reactive thiol group of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase, to reduce its affinity toward substrate ATP and activating monovalent cations. *J. Biochem. (Tokyo)* 109: 251-255 .
- Nanji AA, Zakim D. (1996). Alcoholic liver disease. In D. Zakim & JD Boyer (Eds.) *Hepatology A Textbook of Liver Diseases* (pp 891-962). Philadelphia; W.B. Saunders Company.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leewen PA. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:418-425.
- Niki E. (1987) Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* 44: 227-253.
- Noriega GO, Ossola JO, Tomaro ML, Batlle AMC. (2000). Effect of acetaminophen on heme metabolism in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32: 983-991.
- Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB. (2004). Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 110:1861-1867.
- O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2). *Mutat. Res.* 551:245-254
- Oskarsson HJ, Heistad DD. (1997). Oxidative stress produced by angiotensin II-implications for hypertension and vascular injury. *Circulation.* 95:557-559.
- Ossola JO, Tomaro ML. (1995). Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology* 104: 141-147.
- Ossola JO, Tomaro ML. (1998). Heme oxygenase induction by UVA radiation: a response to oxidative stress in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 285-292.
- Ossola JO, Groppa MD, Tomaro ML. (1997). Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (2):332-337.
- Ossola JO, Kristoff G, Tomaro ML. (2000). Heme oxygenase induction by menadione bisulfite adduct-generated oxidative stress in rat liver. *Comp. Biochem. Phys.* 127:91-99.
- Ostrow JD. (1993). Metabolisms of bile salts in cholestasis in humans. En: *Hepatic Transport and Bile Secretion*. N Tavoloni, & P.D. Berk (eds.). *Physiology and Pathophysiology* (pp.673-712) New York: Raven Press, Ltd.
- Oteiza PA. (1995). Modificación activa de las proteínas. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 2:12-20.
- Palozza P, Krinsky N. (1992). Antioxidant effect of carotenoides in vivo and in vitro: an overview. *Methods Enzymol.* 213: 202-209.

- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.* 304(1):55-68.
- Pigeolet E, Corbisier P., Houbion A, Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M.-O. (1990). Superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Age. Dev.* 1: 283-297
- Platenik J, Stopka P, Vejrazka M, Stipek S. (2001). Quinolinic acid-iron(ii) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the fenton reaction. *Free Radic. Res.* 34(5):445-459.
- Poli G, Parola M. (1997). Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 287-305.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.* 11(9):1163-1182.
- Polovka M, Brezova V, Stasko A. (2003). Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy. *Biophys. Chem.* 106: 39–56.
- Pryor WA. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.* 28: 141–164.
- Reilly PM, Bulkley GB. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br. J. Surg.* 77:1324-1325.
- Retsky KL, Chen K, Zeind J, Frei B. (1999). Inhibition of copperinduced LDL oxidation by Vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 90–98.
- Rice-Evans C. (1995). Plant polyphenols: free radicals scavengers or chainbreaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.* 61:103–116.
- Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8: 797–807.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996). Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933– 956.
- Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Bohm M. (2002). Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the “French Paradox”. *FASEB J.* 16:1958–1960.
- Rosser BG, Gores GJ. (1995). Liver cell necrosis: cellular mechanism and chemical implications. *Gastroenterology* 108: 252-275
- Rubin DB, Reznik G, Weiss EA, Young PR. (2000). Non-protein thiols flux to S-nitrosothiols in endothelial cells: an LPS redox signal. *Shock* 14: 200-207.
- Ryter SW, Tyrrell RM. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* 28: 289–30.
- Sadik CD, Sies H, Schewe T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* 65:773–781.

- Sandberg S., Romslo I, Hovding G, Bjorndal T. (1982). Porphyrin-induced photodamage as related to the subcellular localization of the porphyrins. *Acta Dermatovener, Stockholm, Supl.* 100:75-80.
- Scalbert A, Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073s-2085s.
- Schewe T, Sadik C, Klotz L-O, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. (2001). Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol. Chem.* 382:1687– 1696.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 349(6308):431-434.
- Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. (1983). Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 161: 391-395.
- Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. (1992). Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology.* 103(5):1625-1629.
- Smith MA, Harris PLR, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17: 2653–2657.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R A, O'Brien K. (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17: 869-881.
- Sokol RJ, Wnhlhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acid. *Gastroenterology* 109: 1249-1256.
- Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. (2003). Modulation of pro-survival Akt/PKB and ERK1/2 signalling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 278:34783– 34793.
- Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Rice-Evans C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 423:148– 161.
- Stadtman ER. (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1125S-1128S
- Stadtman ER. (1992). Protein oxidation and aging. *Science.* 257(5074): 1220-1224.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043–1046.
- Stohs SJ, Bagchi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18(2):321-336.
- Suh J, Zhu BZ, Frei B. (2003). Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redoxactive transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 34:1306–1314.
- Sung JJY, Go MYY. (1999). Reversible Kupffer cell suppression in biliary obstruction is caused by hydrophobic bile acid. *J. Hepatol.* 30: 413-418.



- Sutton HC, Winterbourn CC. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 6(1):53-60.
- Tomaro ML, Frydman J, Frydman RB. (1991). Heme oxygenase induction by CoCl<sub>2</sub>, Protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: evidence for oxidative stress involvement, *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 610–617.
- Turrens J. (1994). Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 1:16-9.
- Tribble DL, Tak YA, Jones DP. (1987). The pathophysiological significance of lipid peroxidative cell injury. *Hepatology* 7: 377-387.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266(1-2):37-56.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160: 1–40
- Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol.* 451(2):111-118.
- Van Steveninck J, Boegheim JP, Dubbelman TM, Van der Zee J. (1987). The mechanism of potentiation of horseradish peroxidase-catalysed oxidation of NADPH by porphyrins. *Biochem. J.* 242(2):611-613.
- Van Steveninck J, Boegheim JP, Dubbelman TM, Van der Zee J. (1988). The influence of porphyrins on iron-catalysed generation of hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 250(1):197-201.
- Vera JC, Reyes AM, Carcamo JG, Velasquez FV, Rivas CI, Zhang RH, Strobel P, Iribarren R, Scher HI, Slebe JC, Slebe JC, Golde DW. (1996). Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J. Biol. Chem.* 271(15):8719-8724.
- Wallerath T, Poleo D, Li H, Fostermann U. (2003). Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:471– 478.
- Way TD, Kao MC, Lin JK. (2005). Degradation of HER2/neu by apigenin induces apoptosis through cytochrome c release and caspase-3 activation in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *FEBS Lett.* 579:145–152.
- Weiss, SJ (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
- White E, Shannon JS, Patterson RE. (1997). Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 6: 769–774.
- Williamson G, Manach C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II: review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(Suppl):243S–255S.
- Wilson SJ, Keenan AK. (2003). Role of hemin in the modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated endothelial cell injury. *Vas. Pharmacol.* 40: 109-118.
- Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. (2001). Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathway *in vitro*. *Antioxid. Redox Signal.* 3:1009–1021.

Wolin MS (2000). Interaction of oxidant with vascular signaling systems. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 20: 1430-1442.

You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blazer MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF, Xu GW. (2000). Gastric cancer: Helicobacter pylori, serum Vitamin C, and other risk factors, *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1607–1612.

Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. (2002). Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch. Biochem. Biophys.* 405(1): 65-72.

Yusa T, Beckman JS, Crapo JD, Freeman BA. (1987) Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by brain *in vivo*, *J. Appl. Physiol.* 63: 353-358 .

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

# **CAPÍTULO I**

## **MATERIALES**

### **I.1 EQUIPOS**

Los homogenatos se prepararon con un homogeneizador ULTRA-TURRAX Janke & Kunkel (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). Para sonicar las muestras se utilizó un sonicador SONIPREP 150.

Las centrifugaciones se efectuaron en una centrífuga refrigerada SORVALL RC5B SIGMA 3K 30, en centrífugas de mesa ROLCO 2036 ó CM-36 (Buenos Aires, Argentina), en una microcentrífuga Eppendorf 5415C y en una ultracentrífuga SORVALL, USA, modelo OTD-65B.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros SHIMADZU, Japón, modelo UV 1203 o en HEWLETT PACKARD, USA, modelo HP 845 2A con arreglo de diodos. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro SHIMADZU, Japón, modelo RF-510 o Perkin Elmer, USA, modelo L555.

Las determinaciones por HPLC se realizaron en un equipo SHIMADZU, Japón, LC-10A5 con sistema controlador SCL-10A, detector UV-visible SPD-10AV y fluorométrico RF-10A.

Los termocicladores que se utilizaron fueron los modelos M. J. y PTC 100 Research Mini Cyclers, USA.

Los geles de agarosa se corrieron en una cuba horizontal (Horizon 58, Life Technologies Inc., USA), y los geles de poliacrilamida en una cuba de electroforesis para minigeles (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Las bandas obtenidas se visualizaron utilizando un transiluminador UV FOTO/PREP Fotodyne, USA.

Para la obtención del H<sub>2</sub>O destilada y desionizada (mQ) se utilizó un destilador Barmstead MP1 y un desionizador Barmstead E-pure.

## **I.2. REACTIVOS**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y provenientes de Merck o Sigma Chem. Co (S1. Louis, MO). Los solventes utilizados para cromatografía fueron de grado HPLC marca Merck.

## **I.3 ANIMALES**

Se usaron ratones macho *CF1*, de 1 mes de edad y 18-19 g de peso al comienzo de la experiencia, los mismos fueron obtenidos y mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. o de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, bajo condiciones controladas de temperatura e iluminación (ciclo de 12 horas luz-oscuridad). Los animales dispusieron de agua y comida (Alimento Cooperación de la Asociación de Cooperativas Argentinas) *ad libitum*. Todos los animales recibieron cuidado humanitario de acuerdo a las guías establecidas por el Comité de Asociaciones de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEAL).

## **I.4 SONDAS PARA NORTHERN BLOT**

Para la cuantificación de los distintos ARNm se utilizaron las siguientes sondas:

- a) **Catalasa:** cedida por la Dra. Gerez del Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias.
- b) **ARN 18S:** Fragmento de ADN obtenido por amplificación del gen correspondiente al ARNr 18S de ratón, cedida por la Dra. Gerez del Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias.
- c) **Glutation Peroxidasa:** preparada según como se describe en III. 3.6

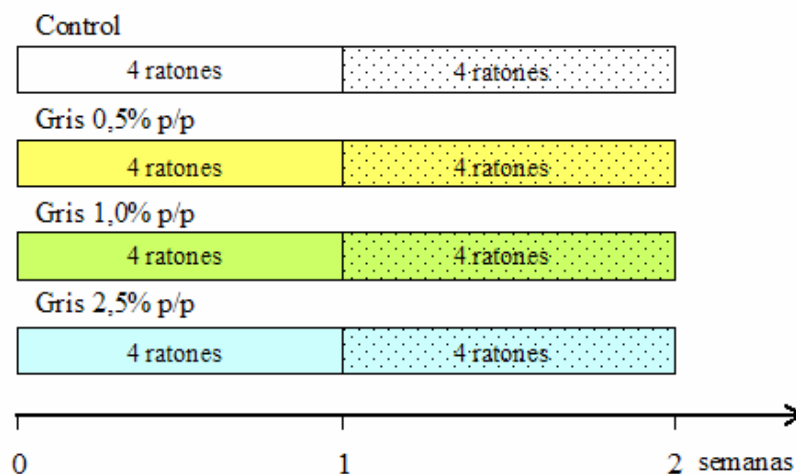
## CAPÍTULO II

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### II.1 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

##### II.1.1 Caracterización del Modelo experimental

Los animales se separaron en 4 grupos de 8 ratones cada uno. Un grupo recibió dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g), y los tres grupos restantes recibieron dieta estándar adicionada con Gris (0,5%, 1,5% y 2,5% respectivamente) disuelta en aceite de maíz (10ml/100g de alimento). Una vez iniciado el tratamiento 4 animales de cada grupo se sacrificaron a los 8 días y los 4 restantes a los 14 días (Figura II.1).



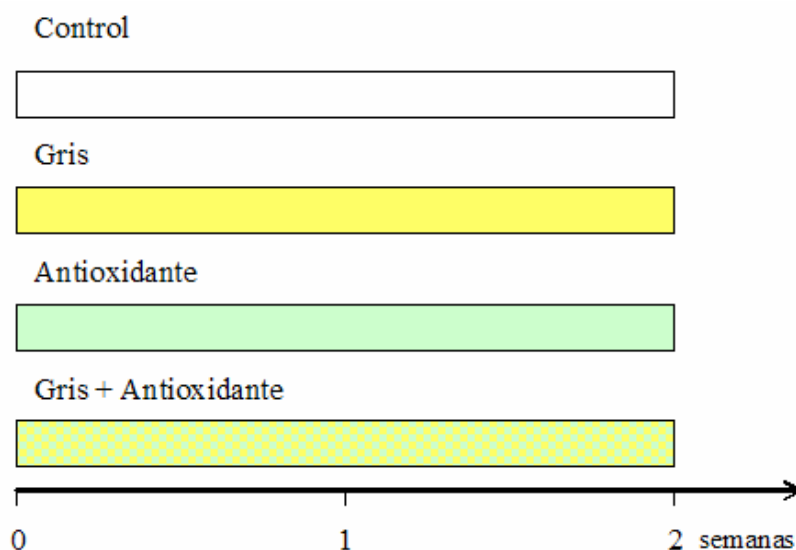
**Figura II.1: Esquema del tratamiento para la caracterización del modelo experimental**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control adicionada con Gris 1,0% (p/p)
- Dieta control adicionada con Gris 2,5% (p/p)

## II.1.2 Tratamiento con Antioxidantes

### II.1.2.1 Tratamiento con Trolox, Se y Acido Ascórbico

Para estudiar el efecto de los antioxidantes Trolox (ácido 6-Hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Se, ácido Ascórbico (Acido 3-oxo-L-gulofuranolactona, forma enólica) o las combinaciones Trolox con Se o con ácido Ascórbico, sobre ratones tratados con Gris, los animales se separaron en 12 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la [Figura II.2](#):



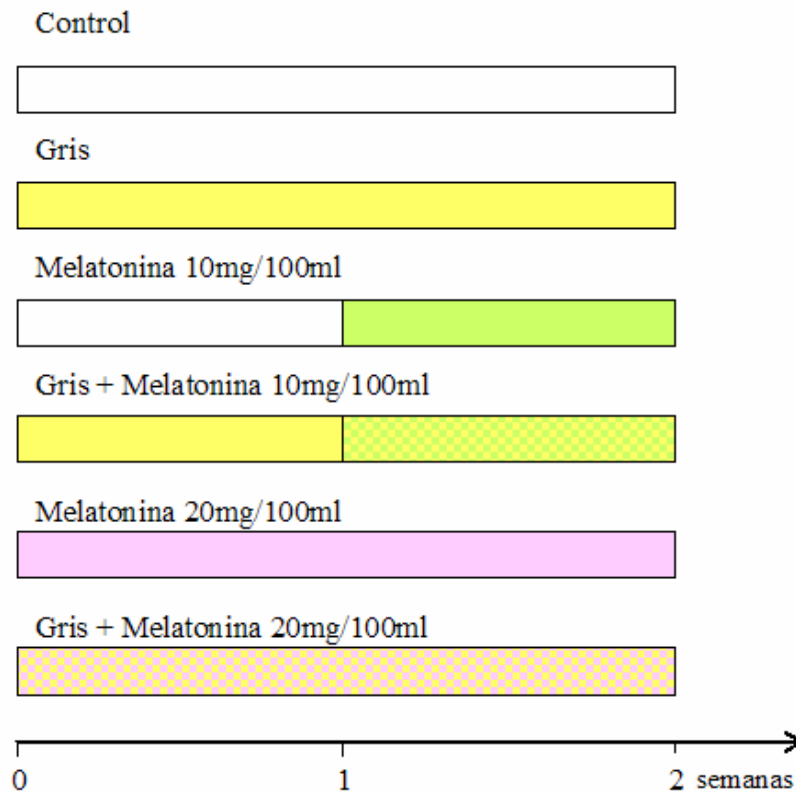
**Figura II.2: Esquema del tratamiento con Trolox, Se y ácido Ascórbico**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + los Antioxidantes en el agua de bebida (Trolox 2,0mg/100ml, Se 0,01mg/100ml, ácido Ascórbico 12mg/100ml o las combinaciones Trolox (2,0mg/100ml) con Se (0,01mg/100ml) ó con Acido ascórbico (12mg/100ml))
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + los antioxidantes en el agua de bebida (Trolox 2,0mg/100ml, Se 0,01mg/100ml, ácido ascórbico 12mg/100ml ó las combinaciones Trolox (2,0mg/100ml) con Se (0,01mg/100ml) ó con ácido ascórbico (12mg/100ml))

### II.1.2.2 Tratamiento con Melatonina

#### II.1.2.2.1 Administración Oral

Para estudiar el efecto de la administración oral de Melatonina, los animales se separaron en 6 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la Figura II.3:



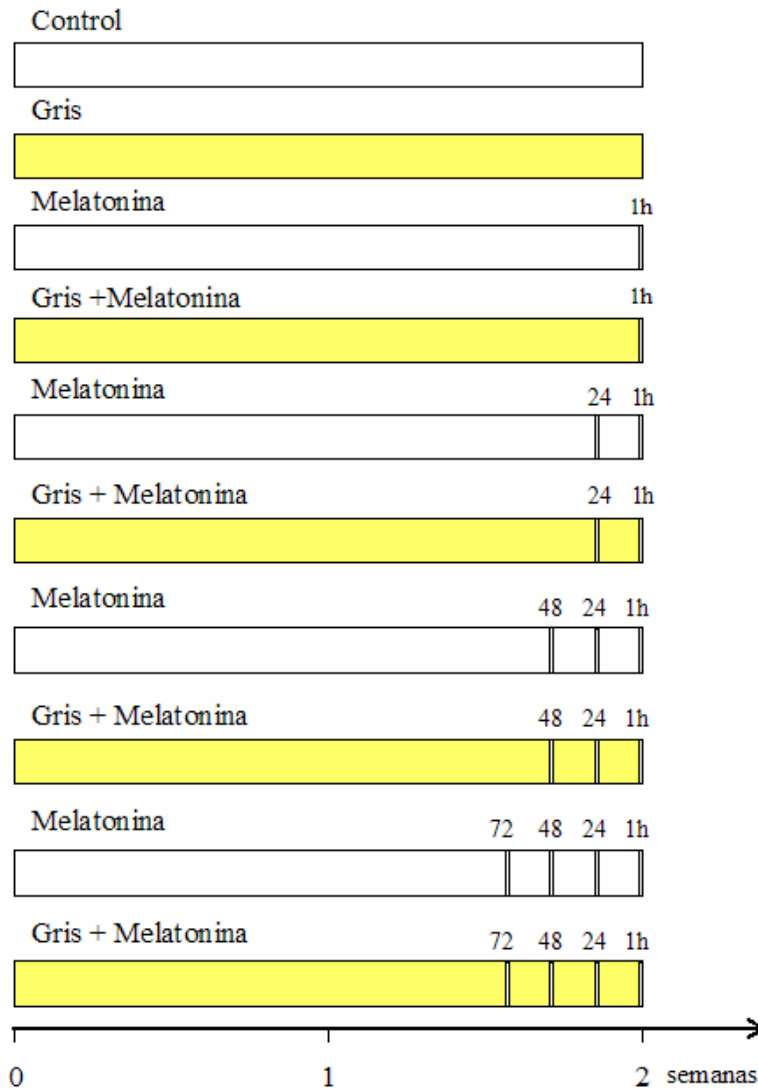
**Figura II.3: Esquema del protocolo del tratamiento con Melatonina vía oral**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + Melatonina 10mg/100ml en el agua de bebida en la última semana de Tratamiento
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Melatonina 10mg/100ml en el agua de bebida en la última semana de tratamiento
- Dieta control + Melatonina 20mg/100ml en el agua de bebida durante las dos semanas de tratamiento
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Melatonina 20mg/100ml en el agua de bebida durante las dos semanas de tratamiento



**II.1.2.2 Administración Intraperitoneal**

Para estudiar el efecto de la administración i.p. de Melatonina, sobre los ratones tratados con Gris los animales se separaron en 10 grupos de 4 ratones cada uno, y se siguió el esquema de tratamiento de la Figura II.4:

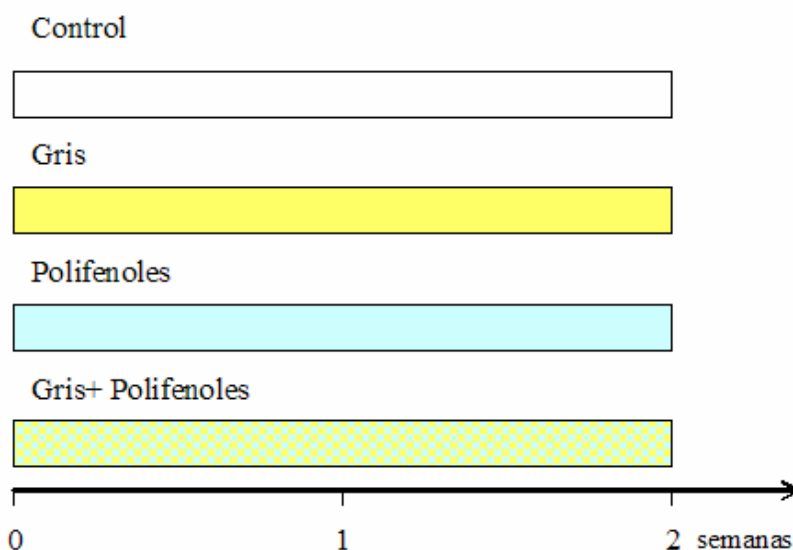


**Figura II.4: Esquema del protocolo del tratamiento con Melatonina vía i.p.**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + Melatonina 5mg/kg vía i.p., 72, 48, 24 ó 1 hora antes del sacrificio
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Melatonina 5mg/kg vía i.p., 72, 48, 24 ó 1 hora antes del sacrificio

### II.1.2.3 Tratamiento con Polifenoles

Se estudió el efecto de los siguientes polifenoles: Quercetina (3,3',4',5,7-Pentahidroxiflavona) y los ácidos, Clorogénico (ácido 3-[3,4-dihidroxifenil-1-oxo-2-propenil]oxi-1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico), Cafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico), Gálico (Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), Elágico (dímero del ácido Gálico) y Ferúlico (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico). Los animales se separaron en 14 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la [Figura II.5](#):



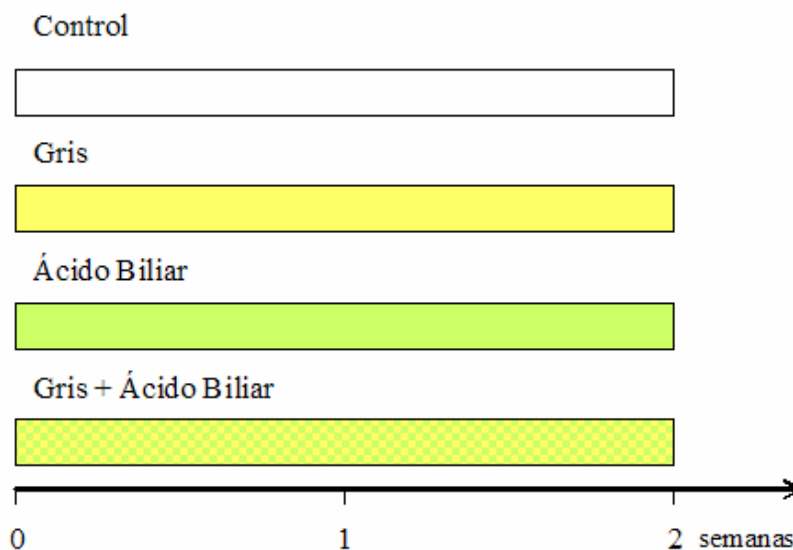
**Figura II.5: Esquema del protocolo del tratamiento con Polifenoles**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + los Polifenoles en el agua de bebida (Quercetina 50 mg/l y los ácidos Elágico 300 mg/l, Clorogénico 50 mg/l, Cafeico 650mg/l, Gálico 50mg/l y Ferúlico 60mg/l)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + los Polifenoles en el agua de bebida (Quercetina 50 mg/l y los ácidos Elágico 300 mg/l, Clorogénico 50 mg/l, Cafeico 650mg/l, Gálico 50mg/l y Ferúlico 60mg/l)

### II.1.3 Tratamiento con Ácidos Biliares

Los ácidos biliares estudiados fueron: ácido Dehidrocólico; ácido Quenodesoxicólico (3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -di hidrox-5 $\beta$ -colan-24-oico), ácido Desoxicólico (3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -di hidrox-5 $\beta$ -colan-24-oico); ácido Ursodesoxicólico (ácido 3 $\alpha$ , 7 $\beta$ -di hidrox-5 $\beta$ -colan-24-

oico). Los animales se separaron en 10 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la Figura II.6:



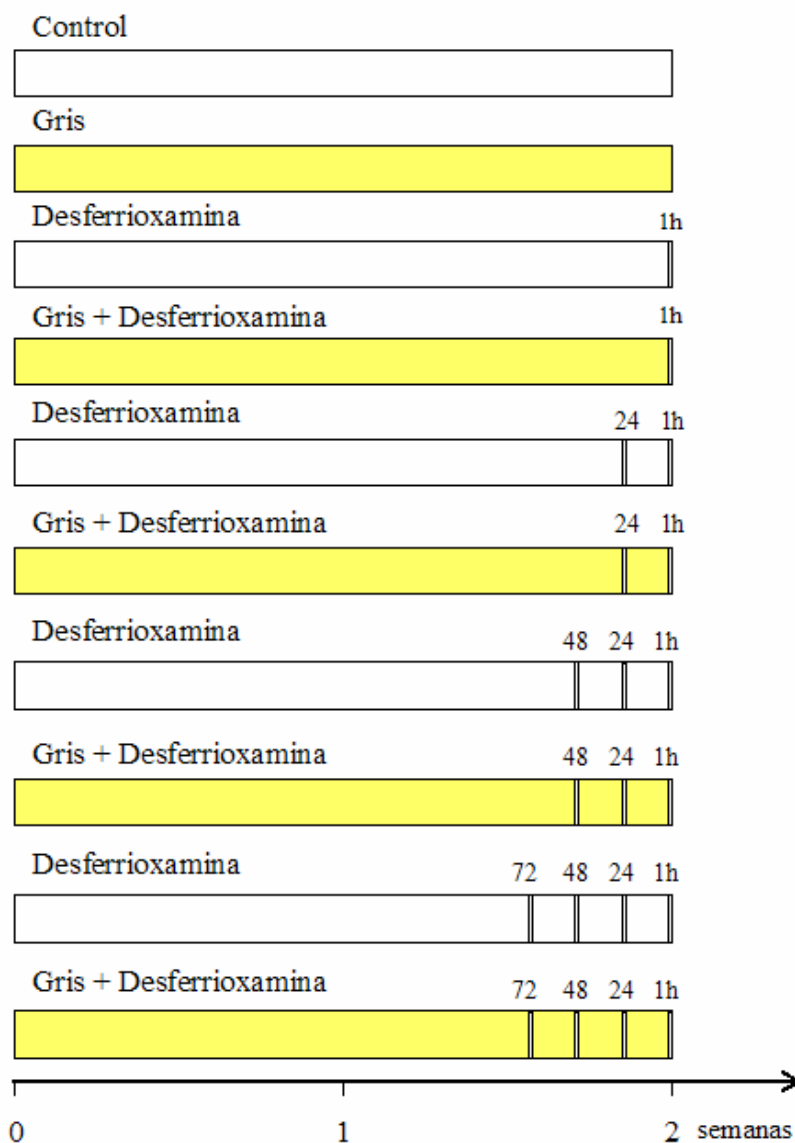
**Figura II.6: Esquema del protocolo del tratamiento con Ácidos Biliares**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control adicionada con + los Ácidos Biliares (ácido Dehidrocólico 0,33% p/p; ácido Quenodesoxicólico 0,01% p/p; ácido Desoxicólico 0,33% p/p; ácido Ursodesoxicólico 0,20% p/p)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + los Ácidos Biliares (ácido Dehidrocólico 0,33% p/p; ácido Quenodesoxicólico 0,01% p/p; ácido Desoxicólico 0,33% p/p; ácido Ursodesoxicólico 0,20% p/p)

## II.1.4 Tratamiento con Desferrioxamina, Cimetidina y Colestiramina

### II.1.4.1 Tratamiento con Desferrioxamina

Los animales se separaron en 10 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la Figura II.7:

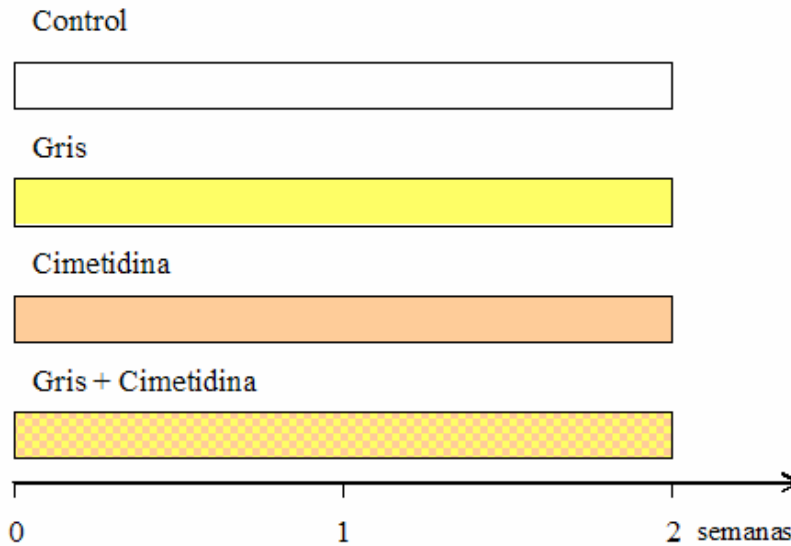


**Figura II.7: Esquema del protocolo del tratamiento con Melatonina vía i.p.**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + Desferrioxamina 75 mg/kg vía i.p., 72, 48, 24 ó 1 hora antes del sacrificio.
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Desferrioxamina 75 mg/kg vía i.p., 72, 48, 24 ó 1 hora antes del sacrificio.

### II.1.4.2 Tratamiento con Cimetidina

Los animales se separaron en 4 grupos de 4 ratones cada uno y se siguió el esquema de tratamiento de la [Figura II.8](#):

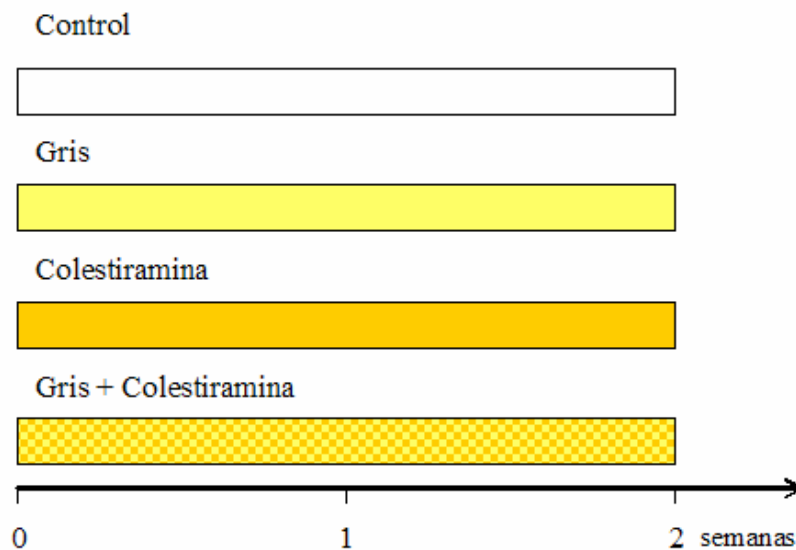


**Figura II.8: Esquema del protocolo del tratamiento con Cimetidina**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control + Cimetidina (72 mg/ml p/v) en el agua de bebida
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Cimetidina (72 mg/ml p/v) en el agua de bebida

### II.1.4.3 Tratamiento con Colestiramina

Los animales se separaron en 4 grupos de 4 ratones cada uno, y se siguió el esquema de tratamiento de la [Figura II.9](#):

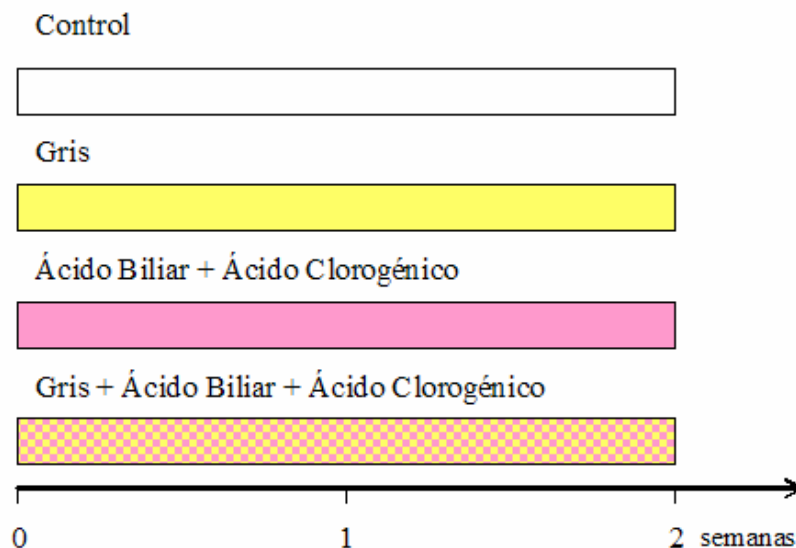


**Figura II.9: Esquema del protocolo del tratamiento con Colestiramina**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control adicionada con Colestiramina 0,125% (p/p)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + Colestiramina 0,125% (p/p)

### II.1.5 Tratamiento conjunto con Ácido Clorogénico y Acido Desoxicólico o Ursodeoxicólico

Se estudió el efecto de la combinación de ácido Clorogénico (50 mg/l) en el agua de bebida junto con ácido Desoxicólico (0,33% p/p) o ácido Ursodesoxicólico (0,20% p/p) incorporados a la dieta. Los animales se separaron en 6 grupos de 4 ratones y se siguió el esquema de tratamiento de la [Figura II.10](#):



**Figura II.10: Esquema del protocolo del tratamiento con ácido Clorogénico con ácido Desoxicólico o Ursodeoxicólico**

- Dieta control (dieta estándar adicionada con aceite de maíz 10ml/100g)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p)
- Dieta control adicionada con un ácido Biliar (Ácido Desoxicólico 0,33% (p/p) ó Ursodeoxicólico 0,20% (p/p)) + Ácido Clorogénico (50mg/l en el agua de bebida)
- Dieta control adicionada con Gris 0,5% (p/p) + un ácido Biliar (Ácido Desoxicólico 0,33% p/p ó Ursodeoxicólico 0,20% p/p) y Ácido Clorogénico 50mg/l en el agua de bebida

## II.2 Preparación de los tejidos

Los animales fueron ayunados 16 horas antes del sacrificio, que se produjo bajo anestesia con éter. Posterior e inmediatamente, se extirpó una porción del lóbulo derecho del hígado, y se extrajo sangre por punción cardíaca del ventrículo izquierdo. Se realizó perfusión aórtica con solución de NaCl 0,9% p/v fría y se extrajo el resto del hígado para su procesamiento.

De cada jaula se recogió la materia fecal de las últimas 16 horas.

### II.2.1 Procesamiento del hígado

La porción de hígado sin perfundir se homogeneizó (1:3, p/v) en una solución de

buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 conteniendo NaCl 0,9% y EDTA 0,5 mM. El homogenato resultante (H1) se utilizó para la determinación de actividad enzimática de ALA-S. El resto del hígado se fraccionó en partes para realizar los diferentes homogenatos (Figura II.11):

I. Una parte se homogeneizó (1:3, p/v) en sacarosa 0,25 M. El homogenato obtenido se sometió a una centrifugación diferencial. En una alícuota del sobrenadante de 10.000 xg durante 20 min (H2) se midieron los niveles de GSH y las actividades de HO y GST y otra fracción se centrifugó a 105.000 xg, durante 60 min. El sobrenadante resultante (H3) se usó para medir las actividades enzimáticas de SOD y GPx, y el pellet (H4) y se utilizó para medir los niveles de CYP totales y la actividad de la isoforma CYP 2E1.

II. Otra parte se homogeneizó (1:10 p/v) en buffer fosfato de sodio (BFS) 0,05 M pH 7,4; una fracción (H5) se utilizó directamente para la determinación del malondialdehído (MDA) y otra se centrifugó durante 20 min a 10.000 xg. El sobrenadante resultante (H6) se usó para medir las actividades de Catalasa y GRed.

III. Otra parte del hígado se homogeneizó (1:7 p/v) en KCl 0,14 M pH 7,5 conteniendo NaOH 2,5 mM y se centrifugó durante 15 min a 10.000 xg; el sobrenadante resultante (H7) se utilizó para determinar la actividad de la Triptofano Pirrolasa (TRP).

IV. Otra fracción se homogeneizó (1:2, p/v) en una solución que contenía: buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4; KCl 0,15 M y EDTA 2 mM, se centrifugó 20 min a 10.000 xg y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 xg durante 60 min. El pellet de la última centrifugación (fracción microsomal) se resuspendió en un volumen de sacarosa 0,25 M para obtener una concentración 0,25 ml/g de hígado (H8) y se utilizó para medir las actividades de las isoformas del CYP 2A6, 1A2 y 2C9.

V. Un trozo del hígado se homogeneizó (1:5, p/v) en una solución que contenía: buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4; glicerol 20% (v/v); KCl 1,4% (p/v); EDTA 0,2 mM; p-



metilsulfonil fluoruro (PMSF); 0,1 mM, ditionitrol (DTT) 0,1 mM; pepstatina 1µg/ml y leupeptina 10 µg/ml; se centrifugó 20 min a 15.000 xg; el sobrenadante se centrifugó 60 min a 105.000 xg. El pellet obtenido se resuspendió en 0,7 ml de la misma solución utilizada para homogeneizar (fracción H9) y se utilizó para evaluar la expresión de la isoforma del CYP 3A4.

VI. Un trozo de hígado se guardó a -20°C para la extracción y cuantificación de porfirinas.

### **II.2.2 Procesamiento de la sangre**

Tras la extracción de sangre, el volumen obtenido (aproximadamente 1ml) se recogió en tubos preparados con heparina y se sometieron a agitación suave. Para obtener el plasma, los tubos con la sangre se centrifugaron 10-15 min a 10.000 xg y se recogió el sobrenadante. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Para la obtención de suero, la sangre extraída se recogió en tubos sin heparina, se centrifugaron 10-15min a 10.000xg y se recogió el sobrenadante. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis.

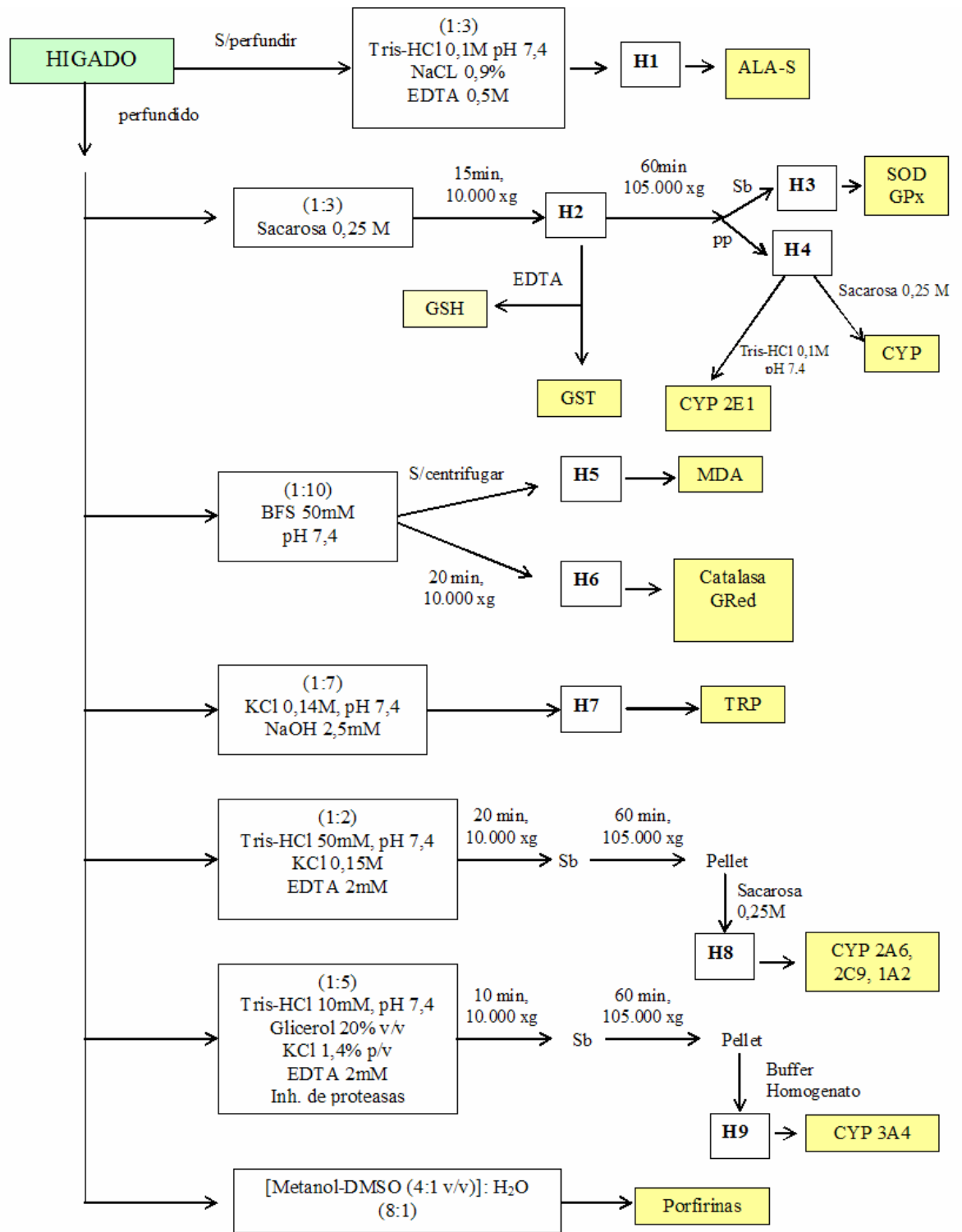


Figura II.11 : Esquema de la preparación de los homogenatos de hígado

# CAPÍTULO III

## DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS, MOLECULARES Y ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

### III.1 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

#### III.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno

La medición de ROS se realizó mediante el kit comercial FORT (Prueba de Radicales Libres- Callegari, Italia) en 20 µl de sangre. Las ROS reaccionan con un cromóforo determinado, provisto en el kit, produciendo un compuesto coloreado que se mide espectrofotométricamente, con un pico máximo de absorbancia a 505 nm y cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ROS de acuerdo a la ley de Lambert Beer. La unidad de medición es U FORT, donde 1U FORT corresponde a 0,26 mg/l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### III.1.2 Malondialdehído

El MDA se determinó según el método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A 0,1 ml de la fracción H5 se le agregó SDS 0,2% (p/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,3% en ácido acético 7,5% (p/v); HCl 0,25 N y TCA 15% (p/v). La solución se calentó durante 15 min en baño de agua a ebullición. Luego de enfriar se centrifugó a 1.000 xg durante 10 min. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 535nm. La concentración de MDA se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de MDA/min.ml} = \frac{(A_m^{535} - A_b^{535}) \times V_f \times 10^6}{V_{H5} \times \epsilon}$$

$A_m^{535}$ : absorbancia de la muestra a 535 nm

$A_b^{535}$ : absorbancia del blanco de reactivos a 535 nm

$V_f$ : volumen final

$V_{H5}$ : volumen de la fracción H5

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $1,56 \times 10^5 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### **III.1.3 Porfirinas**

Las porfirinas se extrajeron de los tejidos y se identificaron por cromatografía de alta precisión en fase reversa (RP-HPLC) y se cuantificó el contenido de PROTO IX espectrofluorométricamente.

#### ***III.1.3.1 Extracción de porfirinas***

Hígado: Las porfirinas se extrajeron según el método descrito por De Matteis & Lim, (1994). Una porción de tejido de 200-300 mg se homogeneizó con 2 ml de mezcla homogenizante consistente en 8 partes de metanol:DMSO (4:1 v/v) y 1 parte de agua. El homogenato se centrifugó a 2.600 xg durante 10 min, el sobrenadante se diluyó 2:1 con agua y se determinaron las porfirinas.

Sangre: la porfirinas se extrajeron según el método descrito por De Matteis & Lim, (1994) Un volumen entre 100-200  $\mu\text{l}$  de sangre se homogeneizó con 2 volúmenes de metanol-DMSO (4:1 v/v) y se centrifugó a 2.600 xg durante 10 min. En el sobrenadante se midió el contenido de PROTO IX.

Heces: se extrajeron las porfirinas según el método de Lockwood *et al.* (1985). Por cada 25-50 mg de materia fecal se adicionó 1ml de HCl concentrado y se agitó en vórtex para desintegrar todas las partículas. Se agregaron 3 ml de éter etílico, se formó una emulsión, y luego 3ml de agua. La mezcla se centrifugó a 2.600 xg durante 15 min, obteniéndose una fase superior, una interfase con material insoluble y una fase inferior acuosa. Se separó la fase acuosa en la cual se determinó el contenido de porfirinas.

#### ***III.1.3.2 Identificación de Porfirinas por RP-HPLC***

La identificación de porfirinas por RP-HPLC se realizó bajo las siguientes

condiciones:

- Columna: Merck Lichrospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y de 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm.
- Solventes de desarrollo: buffer acetato de amonio 1 M, pH 5,16; como solvente A y 100% de metanol como solvente B.
- Gradiente de elución: un gradiente lineal de 10% (v/v) a 90% (v/v) de solvente B, 90% v/v de solvente B hasta los 40 min, un gradiente lineal de 90% (v/v) a 10% (v/v) de solvente B hasta los 45 min. La velocidad de flujo fue 1 ml/min.
- Detector fluorométrico, longitud de onda:  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 400 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  618 nm.
- Volumen de inyección: 20 µl.
- Como estándar se utilizó una mezcla de porfirinas libres (Frontier Scientific, USA) y PROTO IX libre.

### III.1.3.3 Determinación de los niveles de PROTO IX

Para la cuantificación de PROTO IX se realizó un espectro de emisión de fluorescencia de cada muestra y del estándar a  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 400nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$ : 500-700 nm, se calculó el contenido de PROTO IX en el máximo de fluorescencia (alrededor de 632nm), utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/ml} = \frac{[\text{Std}] \times \text{UF}_m \times \text{dil}}{\text{UF}_{\text{std}}}$$

[Std]: concentración del estándar

UF<sub>m</sub>: unidad de fluorescencia de la muestra

UF<sub>Std</sub>: unidad de fluorescencia del estándar

dil: dilución de la muestra

### III.1.4 Glutation Reducido

Los niveles de GSH se determinaron por el método de Rossi *et al.*, (1995). A una alícuota de la fracción H2 se agregó EDTA hasta concentración final de 5 mM. Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) (concentración final de 5%), se

centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. En el sobrenadante se midieron los niveles de GSH usando el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB), a la muestra se adicionó EDTA y DTNB disueltos en BFS 80 mM pH 8 en concentración final de 1,24 mM y 0,56 mM, respectivamente, y en un volumen final de 1,8 ml. Luego de 15 min se midió absorbancia a 410 nm. El contenido de GSH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{moles/ml} = \frac{(A_m^{410} - A_b^{410}) \times V_f \times 10^{-3} \times \text{dil}}{V_M \times \epsilon}$$

$A_m^{410}$ : absorbancia de la muestra a 410nm

$A_b^{410}$ : absorbancia del blanco de reactivos a 410nm

$V_f$ : volumen final

$V_M$ : volumen de la muestra

$\epsilon$ : coeficiente de extinción (obtenido por una curva de calibración)=  $1971,64 \times 10^{-6} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

dil: dilución de la muestra

### **III.1.5 Citocromo P450**

La cantidad de CYP se determinó en la fracción microsomal según el método de Omura & Sato (1964).

La fracción microsomal H4, se resuspendió en buffer fosfato de potasio (BFK) 0,05 M pH 7,4 conteniendo glicina 20% y EDTA 1,5 mM hasta obtener una concentración de proteínas de 1 mg/ml. A la muestra a analizar se le agregó ditionito de sodio para reducir el citocromo y se leyó la absorbancia a 450 y 490 nm. Estos valores se tomaron como blanco. Luego se burbujeó CO durante 20 seg y se volvieron a leer las absorbancias a 450nm y 490nm. Para calcular el contenido de P450 se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles /ml homogenato} = \frac{(A^m - A^{bco}) \times V_f \times 10^3 \times \text{dil}}{\epsilon}$$

$(A^{450} - A^{490})$  de la muestra

$A^{bco}$ :  $(A^{450} - A^{490})$  del blanco

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

dil: dilución de la muestra

### III.1.6 Determinación de la concentración de Proteínas

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas se determinó empleando el método descrito por Lowry *et al.*, (1951), utilizando seroalbúmina bobina como estándar. La cantidad de proteína se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg de proteína/ml} = (A_m^{660} - A_b^{660}) \times f \times \text{dil}$$

$A_m^{660}$  : absorbancia de la muestra a 660nm

$A_b^{660}$  : absorbancia del blanco a 660nm

f: factor obtenido de la curva de calibración

dil: dilución de la muestra

## III.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

### III.2.1 Fosfatasa Alcalina

La actividad de la Fosfatasa Alcalina (FAlc) se determinó en muestras de suero mediante un kit comercial específico, Wiener lab. (Rosario, Argentina). Este método se basa en el desdoblamiento de la enzima en medio básico tamponado con aminometil propanol, el fenol liberado reacciona con 4-aminoantipirina y ferricianuro (como agente oxidante). El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520nm contra un estándar de producto.

$$U/ml = \frac{0,2 \times (A_m^{520} - A_b^{520})}{(A_{std}^{520} - A_b^{520})}$$

$A_m^{520}$ : absorbancia de la muestra a 520nm

$A_b^{520}$ : absorbancia del blanco a 520nm

$A_{std}^{520}$ : absorbancia del estándar a 520nm

0,2= concentración del estándar (0,2 U/ml)

### **III.2.2 $\gamma$ - Glutamyl Transferasa**

La actividad de la  $\gamma$ - Glutamyl Transferasa ( $\gamma$ - GT) en se determinó en muestras de plasma mediante un kit comercial específico, Wiener lab. (Rosario, Argentina). El método se basa en la reacción catalizada, por la enzima, entre  $\gamma$ - Glutamyl p-nitroanilida y gliciglicina. Se lee la velocidad de aparición del color de la p-nitroanilina a 405nm. La actividad enzimática, en U/ml, se determina midiendo la pendiente de la curva obtenida con las absorbacias leídas a 1, 2 y3 min de iniciada la reacción.

### **III.2.3 Transaminasas**

Las actividades de la Glutámico Oxalacético Transaminasa (GOT) y la Glutámico Pirúvico Transaminasa (GPT) se determinaron en muestras de suero mediante un kit comercial específico, Wiener lab. (Rosario, Argentina). El método se basa en la reacción del l-aspartato con  $\alpha$ -cetogluturato (catalizada por la GOT) o l-alanina con  $\alpha$ -cetogluturato (que cataliza la GPT). El piruvato formado en ambas reacciones reacciona con 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505nm.

$$U/ml = (A_m^{505} - A_b^{505}) \times f \times 10^{-3}$$

$A_m^{505}$ : absorbancia de la muestra a 505nm

$A_b^{505}$ : absorbancia del blanco a 505nm

f: factor obtenido mediante una curva de calibración con estándar de producto



### III.2.4 ALA-S

La actividad de ALA-S se determinó según el método descrito por Marver *et al.* (1966). El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2 ml: buffer Tris-HCl 75 mM pH 7,4; glicina 0,1 M; EDTA 10 mM y 25  $\mu$ l del extracto enzimático (H1). La incubación se llevó a cabo durante 60 min a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 0,5 ml de TCA 25% y posteriormente se centrifugó a 1.000 xg durante 20 min. El ALA contenido en 1ml del sobrenadante se condensó con acetilacetona en buffer acético/acetato 0,5 M pH 4,6 por calentamiento a 100°C durante 10 min. Luego de enfriar se agregó el reactivo de Ehrlich modificado (2% p/v de p-dimetilaminobenzaldehído en ácido acético glacial: ácido perclórico 70%; 42:8, v/v) en una relación 1:1 (v/v) y se midió la absorbancia a 555nm entre los 8-30 min de ocurrida la reacción. Se definió una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ALA en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/ml homogenato} = \frac{(A_m^{555} - A_b^{555}) \times V_f \times 10^3 \times \text{dil}}{V_{\text{enz}} \times \epsilon}$$

$A_m^{555}$ : absorbancia de la muestra a 555nm

$A_b^{555}$ : absorbancia del blanco a 555nm

$V_f$ : volumen final

$V_{\text{enz}}$ : volumen de la solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción = 58mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.5 Hemo oxigenasa

La actividad de HO se determinó en la fracción soluble de los homogenatos de hígado según el método descrito por Tenhunen *et al.* (1970).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: hemina 34  $\mu$ M (2,23mg de hemina + 2,5 ml de NaOH 0,1 N + 1 ml de Tris 6 mg/ml; se ajusta a pH 7,6 por el agregado de HCl 0,1 N, se lleva a un volumen final de 10 ml con agua destilada), BFK 62,5 mM pH 7,4 y 0,10 ml de solución enzimática H7 (entre 6 y 9 mg/ml de

proteínas). Se pre-incubó durante 2 min a 37°C, luego se agregó NADPH 4,5 µM y se incubó durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo por enfriamiento en baño de hielo y se leyó la absorbancia a 468 nm. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de Bilirrubina en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de bilirrubina/ml} = \frac{(A_m^{468} - A_b^{468}) \times V_f \times 10^3}{V_{enz} \times \epsilon}$$

$A_m^{468}$ : absorbancia de la muestra a 468nm

$A_b^{468}$ : absorbancia del blanco a 468nm

$V_f$ : volumen final

$V_{enz}$ : volumen de la solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción = 30mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.6 Glutation-S-Transferasa

La actividad de la GST se midió utilizando una adaptación del método descrito por Habig *et al.* (1974).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2 ml: GSH 1 mM; BFK 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1 mM y 0,5 ml de la solución enzimática H2. Se incubó 3 min a 25°C y se leyó la absorbancia a 340 nm. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de Bilirrubina en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de Bilirrubina /ml} = \frac{(A_m^{340} - A_b^{340}) \times V_f \times 10^6 \times \text{dil}}{V_{enz} \times \epsilon}$$

$A_m^{340}$ : absorbancia de la muestra a 340nm

$A_b^{340}$ : absorbancia del blanco a 340nm

$V_f$ : volumen final

$V_{enz}$ : volumen de la solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $9,6\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

dil: dilución de la muestra

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### **III.2.7 Triptofano Pirrolasa**

La actividad de la TRP total, la Apo y Holo enzima se determinó según el método de Badawy & Evans (1975).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2 ml: triptofano 2,25 mM; BFS 12,5 mM pH 7; hematina 4 mM y 1ml de solución enzimática H7. Se incubó 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{O}_2$ . La reacción se detuvo con el agregado de 1ml de TCA 15%, se centrifugó a 2.000 xg durante 15 min y a 1 ml del sobrenadante se le agregó NaOH 0,6 N hasta obtener un pH en el rango de 6,5-7,5. Se leyó la absorbancia a 365 nm, dentro de 1 hora de finalizada la reacción. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de kirurenina en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de kinurenina/ml homogenato} = \frac{A_m^{365} - A_b^{365}}{f}$$

$A_m^{365}$ : absorbancia de la muestra a 365nm

$A_b^{365}$ : absorbancia de los reactivos a 365nm

f: factor calculado por Knox (1955)= $0,567\text{nmoles}^{-1}\text{ ml}$

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

La actividad de la Apo TRP se determinó de la misma manera que la TRP total pero sin el agregado de hematina.

La actividad de la Holo TRP se determinó por la diferencia entre la actividad de la TRP total y de la Apo TRP.

### III.2.8 Catalasa

La actividad de Catalasa se determinó según el método cinético de Chance y Maehly (1965).

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 3 ml. A 2,9 ml de BFS 0,05 pH 7,4 conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (suficiente como para obtener una lectura de absorbancia inicial a 240nm de aproximadamente 0,500) se le agregaron 0,1 ml de solución enzimática H6. La actividad de la Catalasa se determinó midiendo el tiempo requerido para conseguir una disminución en la absorbancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde 0,450 a 0,400. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza el consumo de 1 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos/min.ml} = \frac{\text{Pend} \times 60 \times V_f \times 10^6 \times \text{dil}}{V_{\text{enz}} \times \varepsilon}$$

Pend: valor de la pendiente obtenida con la caída de la absorbancia a 240nm

V<sub>f</sub>: volumen final

V<sub>enz</sub>: volumen de solución enzimática incubada

ε: coeficiente de extinción = 39,44mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

60: factor de conversión de seg. a min

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.9 Superóxido Dismutasa

La actividad enzimática de la SOD se determinó según una adaptación del método descrito por Paoletti *et al.*, (1986).

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1ml: BFS 35 mM pH 7,4; NADH 4μM; EDTA/MnCl<sub>2</sub> (0,03 M/0,015 M) y 0,1 ml de solución enzimática H3. Se leyó la absorbancia a 340nm durante los primeros segundos de la reacción, hasta valor constante. Se interrumpió la lectura y se agregó 0,1ml de β-mercaptoetanol (10 mM). Se registró la caída de absorbancia a la misma longitud de onda durante 300 seg. La SOD de la muestra inhibe la reacción, observándose un cambio de pendiente de la curva

absorbancia vs tiempo. Este procedimiento se repitió con distintas diluciones de la solución enzimática. Luego se determinó la relación entre la pendiente obtenida con la muestra sin enzima (a) y la pendiente obtenida con la muestra enzimática (b). Con estos datos se graficó el logaritmo del cociente entre las pendientes ( $\log a/b$ ) vs el volumen de muestra agregado y se obtuvo el volumen de enzima que inhibe la reacción del  $\beta$ -mercaptoetanol en un 50%, este volumen contiene 1 unidad de SOD. Se definió una UE de SOD como la concentración de enzima que produce un 50% de la inhibición de la reacción.

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### **III.2.10 Glutation Peroxidasa**

La actividad de la enzima GPx se determinó según el método descrito por Paglia & Valentine, (1967).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1ml: BFK 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM;  $\text{NaN}_3$  1 mM; NADPH 0,2 mM; GSH 1 mM; 0,01 UE/ml de GRed y 0,1ml de una dilución 1:50 de la solución enzimática H3. Se incubó durante 5 min a 25°C y se inició la reacción con el agregado de 0,1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,25 mM. Se leyó la caída de la absorbancia a 340nm durante 5min y se calcularon las distintas pendientes. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 nmol de NADPH en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de NADPH oxidados/min.ml} = \frac{\text{Pend} \times 60 \times V_f \times 10^6 \times \text{dil}}{V_{\text{enz}} \times \epsilon}$$

Pend: valor de la pendiente obtenida con la caída de la absorbancia a 340nm

$V_f$ : volumen final

$V_{\text{enz}}$ : volumen de solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $6,22 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

60: factor de conversión de seg. a min.

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.11 Glutation Reductasa

La actividad enzimática de la GRed se determinó según el método descrito por Pinto & Bartley (1969).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2,5 ml: BFS 50mM pH 7,4; EDTA 1 mM; GSSG 2,5 mM; NADPH 0,3 mM y 50  $\mu$ l de solución enzimática H6. Se leyó la caída de la absorbancia a 340nm y se calcularon las pendientes. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 nmol de NADPH en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de NADPH oxidados/min.ml} = \frac{\text{Pend} \times 60 \times V_f \times 10^6 \times \text{dil}}{V_{\text{enz}} \times \epsilon}$$

Pend: valor de la pendiente obtenida con la caída de la absorbancia a 340nm

$V_f$ : volumen final

$V_{\text{enz}}$ : volumen de solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción =  $6,22 \cdot 10^3 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

60: factor de conversión de seg. a min

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.12 Citocromo P450 2E1

La actividad de la isoenzima CYP2E1 se determinó según el método descrito por Reinke & Moyer (1985).

La fracción microsomal H4 se resuspendió en 1ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1ml: BFK 0,1 M pH 7,4; NADPH 1mM, p-nitrofenol 0,2 mM y 0,1 ml del extracto enzimático.

Se incubó 10min a 37°C y se midió la absorbancia a 546 nm. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza formación de 1 nmol de 4-nitrocatecol en condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles 4-nitrocatecol/ml} = \frac{(A_m^{546} - A_b^{546}) \times V_f \times 10^5}{V_{\text{enz}} \times \epsilon}$$

$A_m^{546}$ : absorbancia de la muestra a 546nm

$A_b^{546}$ : absorbancia del blanco de reactivos

$V_f$ : volumen final

$V_{\text{enz}}$ : volumen de solución enzimática incubada

$\epsilon$ : coeficiente de extinción a 546nm =  $12\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.13 Citocromo P450 2A6

La actividad de la isoenzima CYP2A6 se determinó según el método descrito por Pearce *et al.* (1996).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 1 ml: BFK 25 mM pH 7,4; MgCl 3mM; EDTA 1 mM; NADPH 1 mM; coumarina 50  $\mu\text{M}$  y extracto enzimático H8 (0,01-0,1mg de microsomas). Se incubó 10 min a 37°C, la reacción se detuvo por agregado de 125 $\mu\text{l}$  de TCA 15% (p/v) frío y 2 ml de cloruro de metileno. Las muestras se homogeneizaron a temperatura ambiente se centrifugaron a 1300 xg durante 10 min y la fase acuosa (fase superior) se aspiró y descartó. A 1 ml de fase orgánica se agregó 3 ml de una solución que contenía NaOH 10 mM y NaCl 1M. La concentración de 7-hidroxi coumarina se determinó fluorométricamente  $\lambda_{\text{exc}} = 371\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 454\text{nm}$ . Se tomó como blanco un incubado a tiempo cero mientras que el estándar consistió en un blanco con el agregado de 0,125 a 5 nmoles de 7-hidroxi coumarina, adicionado en 40  $\mu\text{l}$  de metanol. Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de 7-hidroxi coumarina condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmol de 7-hidroxi coumarina /ml} = \frac{[\text{Std}] \times (\text{UF}_m - \text{UF}_b) \times \text{dil}}{\text{UF}_{\text{std}} - \text{UF}_b}$$

[Std]: concentración del estándar

$\text{UF}_m$ : unidad de fluorescencia de la muestra

UF<sub>b</sub>: unidad de fluorescencia del blanco

UF<sub>Std</sub>: unidad de fluorescencia del estándar

dil: dilución de la muestra

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### III.2.14 Citocromo P450 2C9

La actividad de la isoforma CYP2C9 se analizó según el método de Pearce *et al.* (1996).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 500µl: BFK 50mM pH 7,4; MgCl 3 mM; EDTA 1mM; NADPH 1mM; tolbutamida 100 mM adicionada en 5µl de metanol y extracto enzimático H8 (0,5 mg de microsomas). Se incubó 30 min a 37°C, la reacción se detuvo por agregado de 5 ml de Cloruro de metileno. Se eliminaron las proteínas por centrifugación. Una alícuota de 4ml de la fracción orgánica se evaporó a sequedad. La muestra se reconstituyó con 100 µl de fase móvil y una alícuota de 20 µl se analizó por HPLC en fase reversa con un solvente isocrático y siguientes condiciones:

- Fase móvil: (Buffer perclorato de sodio 20 mM pH 2,5: Acetonitrilo) (70:30)
- Columna: Merck Lichrospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y de 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm.
- Flujo: 1,2ml/min a temperatura ambiente
- Detector UV λ=230nm
- Tiempo total de análisis 20min.

El tiempo de retención de los picos obtenidos se comparó con el tiempo de retención del producto (hydroximetiltolbutamida) aproximadamente 4 min y el de la tolbutamida, 17,5 min.

Se tomó como blanco un incubado a tiempo cero.

Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de hydroximetiltolbutamida condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmol de hydroximetiltolbutamida /ml} = \frac{[\text{Std}] \times (\text{Área}_m - \text{Área}_b)}{\text{Área}_{\text{Std}} - \text{Área}_{b(\text{std})}}$$



[Std]: concentración del estándar

Área<sub>m</sub>: área bajo la curva de la hydroximetiltolbutamida obtenido con la muestra

Área<sub>b</sub>: área bajo la curva del de la hydroximetiltolbutamida obtenido con el blanco de muestra

Área<sub>std</sub>: área bajo la curva del estándar

Área<sub>b (std)</sub>: área bajo la curva del blanco del estándar

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### **III.2.15 Citocromo P450 1A2**

La actividad de la isoforma CYP1A2 se analizó según el método de Pearce *et al.* (1996).

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 250 µl: BFK 50 mM pH 7,4; MgCl 3 mM; EDTA 1 mM; NADPH 1 mM; cafeína 1 mM y extracto enzimático H8 (0,5 mg de microsomas). Se incubó 60min a 37°C, la reacción se detuvo por agregado de 50 µl de ácido perclórico. Se removieron las proteínas por centrifugación (10 min a 2000g). Se extrajeron 20 µl del sobrenadante y se analizó por HPLC en fase reversa con las siguientes condiciones:

- Fase móvil: (Buffer perclorato de sodio 20 mM pH 3,5 conteniendo 0,5% (v/v) de acetonitrilo y 0,5% (v/v) de tetrahydrofurano.
- Columna: Lichrocart 125-4/ LiChropher 100 RP-18 (5µm)
- Flujo: 1,5ml/min a temperatura ambiente
- Detector UV  $\lambda=280\text{nm}$
- Tiempo total de análisis 45 min.

Los resultados se evaluaron comparando los tiempos de retención de los picos obtenidos con los tiempo de retención de los productos de la 1, 3 y 7 demetilación de la cafeína: teobromina, paraxantina y teofilina respectivamente y la 8-hidroxilación de la cafeína a 1, 3, 7 ácido trimetilurico y el de la cafeína (7, 12, 13, 19 y 29 min, respectivamente).

Se tomó como blanco un incubado a tiempo cero.

Se definió una UE como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de hydroximetiltolbutamida condiciones estándar de incubación, utilizándose para el cálculo la siguiente ecuación:

$$\text{nmol de hydroximetiltolbutamida /ml} = \frac{[\text{Std}] \times (\text{Área}_m - \text{Área}_b)}{\text{Área}_{\text{Std}} - \text{Área}_{b(\text{std})}}$$

[Std]: concentración del estándar

Área<sub>m</sub>: área bajo la curva de la hydroximetiltolbutamida obtenido con la muestra

Área<sub>b</sub>: área bajo la curva del de la hydroximetiltolbutamida obtenido con el blanco de muestra

Área<sub>std</sub>: área bajo la curva del estándar

Área<sub>b (std)</sub>: área bajo la curva del blanco del estándar

La AE se expresó como las UE por mg de proteína.

### **III.3 ESTUDIOS MOLECULARES**

#### **III.3.1 Extracción de ARN total**

La extracción se realizó en cinco etapas de acuerdo al método de Chomczynski & Sacchi (1987)

1. El tejido (200mg de hígado) se homogeneizó en 2 ml de una solución desnaturizante (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM, pH 7; β-mercaptoetanol 0,1 M y lauril sarcosina 0,5% v/v).
2. La extracción del ARN se realizó por el agregado secuencial de acetato de sodio 2M pH 4 10% (v/v), un volumen de fenol saturado en agua y cloroformo-alcohol isoamílico (49:1, v/v). Luego de agitar, se incubó 15 min a 4°C y se centrifugó 20 min a 10.000xg en frío.
3. El ARN contenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol durante 1 hora a -20°C, y se centrifugó a 4°C durante 20min a 10.000xg.
4. El pellet de ARN se resuspendió en 600 μl de la solución desnaturizante y se repitió

la etapa 3).

5. El precipitado se lavó dos veces con 800µl de etanol 75%, realizando dos centrifugaciones de 5 min a 10.000xg en frío. EL pellet final se secó al vacío y luego se resuspendió en agua libre de RNAsas. El material resultante se cuantificó y se guardó inmediatamente a -70°C.

### **III.3.2 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de ADN y ARN se realizó por absorbancia a 260nm, considerando que una unidad de D.O. equivale a 50µg/ml de ADN de doble cadena ó 4050µg/ml de ARN. En ambos casos como índice de pureza se midió la absorbancia a 280nm y se calculó la relación 260/280. Se consideró un cociente de 1,7 - 2 como un índice de pureza adecuado

### **III.3.3 Northern Blot**

#### ***III.3.3.1 Electroforesis de ARN en geles de agarosa***

El ARN total de cada muestra, 20 µg/línea, se corrió en geles de agarosa al 1% en BFS 10 mM pH 7 y 2,2 M de formaldehído deionizado. Antes de sembrarse en el gel, el ARN se desnaturalizó en el buffer de siembra (formamida deionizada 50%, formaldehído 2,2 M, BFS 10 mM pH 7, bromuro de etidio 25µg/ml, glicerol 10%, azul bromofenol 0,1%) a 65°C durante 5min. El buffer de corrida utilizado fue BFS 10mM pH 7. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un campo eléctrico de 5v/cm.

#### ***III.3.3.2. Transferencia de ARN a membranas de nylon***

La transferencia del ARN del gel de agarosa a la membrana de nylon se llevó a cabo en forma pasiva. Se realizaron dos lavados del gel en 20X SSE (NaCl 3M; citrato de sodio 0,3M, pH 7) durante 20 min, simultáneamente la membrana de nylon se lavó 10 min en agua y otros 10 min en 20X SSE. Se colocó el gel sobre una banda de papel Whatman

3MM del mismo ancho que el gel pero más larga. El papel con el gel encima se colocó sobre una plataforma en el interior de una bandeja conteniendo 600ml de la solución de transferencia (20X SSE), de manera que sólo los extremos del papel tocaran la solución. Posteriormente se colocó sobre el gel la membrana de nylon y se cubrió la superficie no ocupada por la membrana con parafilm para que toda la solución pasara a través del nylon y aumentar de esta manera la eficiencia de la transferencia. A continuación se colocaron sobre la membrana de nylon, 3 hojas de papel Whatman 3MM humedecidas con la solución de transferencia, 8cm de papel absorbente seco y por último un vidrio sobre el cual se apoyó un peso de 1Kg. La transferencia se realizó en todos los casos por un período de 15 horas. Una vez finalizada la transferencia, el entrecruzamiento del ARN a la membrana se realizó utilizando un UV Stratalinker 1800.

#### ***III.3.3.3 Hibridización***

Las membranas de nylon se pre-incubaron en un horno de hibridización con 1ml de solución de hibridización ULTRAhyb (Ambion) cada 10cm<sup>2</sup> de membrana a hibridizar durante 4 horas a 42°C. Después de la pre-hibridización se adicionó, a la misma solución, la sonda marcada radioactivamente en una concentración 10<sup>6</sup> cpm/ml, la cual se hirvió previamente durante 5 min para disociar las cadenas complementarias. La incubación con la sonda se realizó durante 12horas. Posteriormente se retiró la solución de hibridización y se comenzaron los lavados. Se realizaron dos lavados de 15 min cada uno con una solución SSC 2X; SDS 0,1% a temperatura ambiente, y a continuación se hicieron lavados de 15 min cada uno con solución SSC 1X, SDS 0,1% a 45°C. Se evaluó la eficiencia de los lavados mediante la medición de radiactividad con un contador Geiger-Müller hasta obtener una relación señal/ruido adecuada.

#### ***III.3.3.4 Exposición radiográfica***

Para obtener la imagen de hibridización, placas radiográficas AGFA se expusieron a estas membranas de nylon que fueron previamente recubiertas con un film. En todos los casos la exposición se realizó a -70°C y el tiempo de la misma dependió de la cantidad de radiación emitida por la membrana.

### ***III.3.3.5 Cuantificación de las señales de hibridización***

Las autoradiografías se cuantificaron en unidades de scanner relativas. Se relativizó al 18s.

### **III.3.4 Preparación de la sonda de Glutation Peroxidasa**

La obtención del ADNc de GPx de ratón y su amplificación se realizaron por la técnica de RT-PCR utilizando el kit SUPERSRIPT™ One Step RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). Para la síntesis de la sonda GPx se usaron los siguientes primers:

“Forward”: 5' TCATTGAGAATGTCGCGTCT 3'

“Reverse”: 5' TCATTGAGAATGTCGCGTCT 3'

El producto de amplificación de la PCR, de 442 pb, se analizó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE pH 8 (19,9g de Tris, 55g de ácido bórico y 0,93g de EDTA por cada litro), conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El buffer de siembra contenía azul de bromofenol 0,025% y glicerol 10%. El buffer de corrida utilizado fue TBE pH 8. Una vez analizado el producto de ampliación se purificó utilizando el kit comercial de purificación de PCR, QIAquick (QUIAGEN)

### **III.3.5 Expresión de la Isoforma del Citocromo P450 3A4**

#### ***III.3.5.1 Western Blot***

La expresión de la isoforma CYP3A4 se determinó en microsomas de hígado de los animales tratados con Gris mediante la técnica de Western Blot. Se realizó una electroforesis de la fracción microsomal H9 en geles de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Un volumen de homogenato conteniendo 20 µg de proteína se desnaturalizó en el buffer de siembra que contenía buffer Tris-HCl 0,1 M pH 6,7; glicerol 8,7% (v/v); dodecil sulfato de sodio (SDS) 2,65% (v/v); azul de Bromofenol 0,01% y β-mercaptoetanol 0,5 M a 100°C durante 3 min. El buffer de corrida utilizado fue

Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 3,5 mM, pH 8,3 (llevado con HCl) y la electroforesis se llevó a cabo aplicando un campo eléctrico de 140v.

Se realizó una transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Towbin *et al.*, 1979) utilizándose un sistema de electrotransferencia, el buffer de transferencia contenía Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 3,5mM; Metanol 0,20% (v/v) pH 8,3. La eficiencia de la transferencia se verificó por tinción de las proteínas de la membrana con una solución de Rojo Punzó 0,2% (p/v) en ácido acético 0,5% (v/v). Se lavó la membrana hasta eliminar el colorante con solución TBS-T, compuesta por Tris 20 mM; NaCl 137 mM; 0,1% de Tween. Para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana, la misma se trató con una solución de albúmina 5% en TBS-T a 4°C, toda la noche. Se realizaron sucesivos lavados con TBS-T para eliminar la albúmina no incorporada a la membrana y se la incubó con el anticuerpo antiCYP3A4 (Santa Cruz, Biotechnology) durante 60min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-T para eliminar el anticuerpo no unido a las proteínas y se incubó con el segundo anticuerpo, anti-rabbit IgG-hRP (Horse-raddish Peroxidase) durante 60min a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente la membrana para eliminar el anticuerpo no unido a la misma. La detección de las bandas se realizó mediante el sistema ECL (Enhanced Chemiluminiscent System, Amersham). Para obtener la imagen de la inmunomarcación se expusieron las membranas a placas radiográficas AGFA. Para evaluar si existen diferencias entre los grupos controles y los tratados, se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa informático Scion Image for Windows.

### ***III.2.5.2 Reutilización de la membrana***

Se realizó a la membrana el proceso de “stripping”, que consiste en someter a la misma a condiciones de astringencia para favorecer al máximo la disociación del anticuerpo a las proteínas a la que estaba unido sin afectar a las propiedades de la membrana. Para ello se sumergió la membrana en una solución que contenía 100 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris pH 6,7, y se calentó 1 hora a 50° C con agitación. Luego se realizaron varios lavados con TBS-T y se procedió a la inmunomarcación con un anticuerpo antiActina

### ***III.3.5.3 Expresión de la Actina***

Para evaluar la expresión de Actina se realizó la misma técnica usada en la evaluación de la expresión de la isoforma CYP3A4 utilizándose como anticuerpo primario el anti Actina (Santa Cruz, Biotechnology).

## **III.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS**

### **III.4.1 Preparación de los cortes Histológicos**

De los animales sacrificados se realizó una autopsia completa con especial énfasis en el estudio de los hígados que se extrajeron totalmente.

De los hígados extirpados se consignaron peso, tamaño y color; de cada uno de ellos y se realizaron, sistemáticamente, 4 secciones macroscópicas, delgadas de 0.5 a 1cm de espesor, paralelas entre si en el sentido del eje mayor, representativas de los lóbulos hepáticos: mediano y laterales izquierdo y derecho. Los cortes así obtenidos y el material remanente se fijaron, inmediatamente, en una solución de formaldehído BFS al 4% a pH 7; una vez fijados, los materiales se sometieron a un proceso de deshidratación con alcohol etílico de graduación creciente para su posterior inclusión en parafina.

Para el examen histológico se procedió a realizar cortes microscópicos 3-5 $\mu$ m de espesor de los tejidos embebidos en parafina que fueron coloreados con la técnica de hematoxilina-eosina (H&E). Esta operación se repitió hasta examinar, al menos, 6 cortes por cada hígado.

### **III.4.2 Inmunohistoquímica**

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron en cortes continuos seriados obtenidos de los mismos tacos de parafina usados para el estudio histológico. Se realizaron cortes de 4 $\mu$ m que se montaron en portaobjetos previamente tratados con sustancia adhesiva (xilano) y secados en un una estufa a 70°C durante 30min.

Los cortes debidamente identificados se procesaron para la marcación inmunohistoquímica de la siguiente manera: a) 3 baños de 10min cada uno en xileno para su desparafinización; b) 2 baños de etanol 100%; c) 2 baños de etanol 95%; d) 1 baño de etanol 80% y luego agua corriente. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó incubando 10min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Previo a la coloración los cortes se colocaron en buffer citrato de sodio 10 mM pH 6 en un horno a microondas (5x2min. a 750W, con un período de enfriamiento de 6min luego de cada tratamiento). Los cortes se lavaron con BFS y los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina bovina sérica (BSA) 2% en BFS por 20 min.

Para estudiar la expresión de la HO-1 los preparados se incubaron con un anticuerpo anti -HO1 policlonal producido en conejo (Stressgen, Biotechnologies Corp) diluido 1:500 en BFS, durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda; posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti - Ig conejo biotinilado (DAKO LSAB+Kit, HRP) durante 30min. y por último con complejo estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB+Kit, HRP) durante 30min. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente (22°C) y los lavados, entre los distintos periodos de incubación, se realizaron con BFS pH 7,5.

Se utilizó 3,3' diaminobencidina (DAB) como cromógeno para revelar formando un precipitado marrón-dorado en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo.

Los preparados se contra-colorearon, levemente, con hematoxilina de Mayer's y se cubrieron con un cubreobjeto utilizando bálsamo de Canadá para su montaje definitivo.

Los cortes controles para determinar la especificidad de la reacción del anticuerpo fueron: a) control positivo tisular (cortes de tejido esplénico de ratón) y b) control negativo de la técnica (cortes seriados de cada muestra omitiendo el primer antisuero).

### **III. 5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Cada valor representa el promedio  $\pm$  la desviación estándar (DE) de los valores obtenidos en por lo menos dos experiencias, realizando cada determinación por duplicado. Los resultados se analizaron, mediante un programa informático (GraphPad InStat<sup>tm</sup> 2.0), por el análisis de la variancia de una vía (ANOVA), previa verificación de homogeneidad de varianzas (test de Bartlett). Las comparaciones múltiples de medias (post-ANOVA) se



hicieron mediante test de Tukey-Kramer. Para todas las inferencias se estipuló una  $p < 0,01$  y  $p < 0.05$  ( $\alpha = 5\%$ ), por debajo de la cual se rechazó la hipótesis nula de igualdad.

### **III.6 REFERENCIAS**

Badawy AA, Evans M. (1975). Regulation of rat liver tryptophan pyrrolase by its cofactor haem: Experiments with haematin and 5-aminolaevulinate and comparison with the substrate and hormonal mechanisms. *Biochem. J.* 150(3):511-520.

Chance B, Moehly A. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* Vol. II, pp 764-768. ed. SP Colowick and NO Kaplan (New York: ademic Press.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.

De Matteis F, Lim CK (1994). Porphyrins as Non-Destructive Indicators of Exposure to Environmental Pollutants. En: *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates* (C. Fossi and C. Leonzio, Eds.), pp.93-128, Lewis Publisher, Boca Raton, USA.

Habig W, Pabst M, Jakoby W. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

Knox WE, Auerbach VH. (1955). The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat. *J. Biol. Chem.* 214(1):307-313.

Lockwood WH, Poulos V, Rossi E, Curnow DH. (1985). Rapid procedure for fecal porphyrin assay. *Clin Chem.* 31(7):1163-1167.

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

Marver H; Tschudy D; PerIroth M, Collins A. (1966).  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 193: 2803-2809.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2):351-358.

Omura T, Sato R. (1964). The carbon monoxide binding pigment of liver. *J. Biol. Chem.* 232: 2370-2378.

Paglia DE, Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169

Paoletti F; Aldinucci D; Mocali A, Caparrini A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of Superoxide Dismutase activity in tissues extracts. *Anal. Biochem.* 154: 536- 541.

Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A. (1996). Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys.* 331(2):145-169.

Pinto R, Bartley W. (1969). The effect of age and sex on glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem. J.* 112: 109-115.

Reinke LA, Moyer MJ. (1985). p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab. Dispos.* 13(5):548-552.

Rossi R, Cardaioli E, Scaloni A, Amiconi G, Di Simplicio P. (1995). Thiol groups in protein as endogenous reductants to determine glutathione protein mixed disulphides in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243: 230-238.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. (1970). The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* 75(3):410-421.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9): 4350-4354.

# ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

# CAPÍTULO I

## CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

### I.1 INTRODUCCIÓN

Con el fin de caracterizar el modelo de Protoporfiria inducido por Gris en ratones de la cepa *CF1*, de establecer si este antimicótico induce daño hepático y si éste es debido al desarrollo de estrés oxidativo, así como seleccionar las condiciones óptimas para estudios posteriores; se evaluaron las alteraciones producidas sobre diferentes parámetros hepáticos por la administración de tres concentraciones diferentes de Gris (0,5% p/p; 1,0% p/p y 2,5% p/p), durante 7 y 14 días de tratamiento.

### I.2 EFECTOS DE LA GRIS EN EL ANIMAL Y EN SU HÍGADO

#### I.2.1 Alteraciones Macroscópicas

La administración de Gris a ratones produjo una variedad de alteraciones en estos animales. Como se aprecia en la [Figura I.1](#) los ratones que recibieron el antimicótico muestran un marcado aumento del tamaño del abdomen, en comparación con los no tratados. La mayoría de los roedores que recibieron 2,5% de Gris durante 14 días, presentaron heridas en el hocico, orejas y patas, en los últimos días del tratamiento ([Figura I.1](#)).



**Figura I.1: Ratón Control (a), Ratón tratado con Gris (b)**

También se observaron alteraciones en el peso corporal por efecto de la Gris. En la [Tabla I.1](#) se indica el peso de los ratones al final del tratamiento. Los animales que recibieron Gris experimentaron una pérdida de peso en función del tiempo y de la concentración del antimicótico recibida. Los animales tratados con 2,5% de Gris pesaron un 35% ( $p<0,01$ ) menos que los animales control, al día 14 del tratamiento.

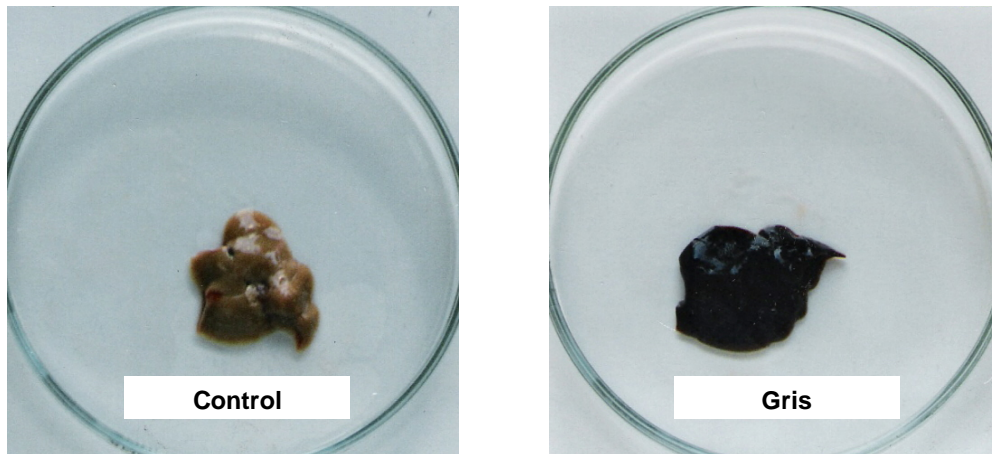
**Tabla I.1:** *Peso corporal y peso del hígado de los ratones en función de la concentración de Gris y del tiempo de intoxicación*

Gris (%)	Duración del tratamiento	Peso corporal (g)	Peso hígado (g)
0	7 días	25,31 ± 1,32	1,72 ± 0,53
0,5		24,45 ± 1,23	2,64 ± 0,65
1,0		23,11 ± 0,98	2,75 ± 0,65
2,5		21,93 ± 0,95*	2,87 ± 0,39
0	14 días	25,31 ± 1,32	1,72 ± 0,53
0,5		24,92 ± 1,18	2,74 ± 0,56
1,0		23,34 ± 1,35	3,27 ± 0,71
2,5		16,04 ± 1,16**	2,55 ± 0,44

Los animales recibieron en la dieta: Gris 0,5% p/p; 1,0% p/p ó 2,5% p/p, durante 7 ó 14 días. Los datos muestran el promedio del peso del cuerpo y del hígado de 8 animales y se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p<0,05$  y (\*\*)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

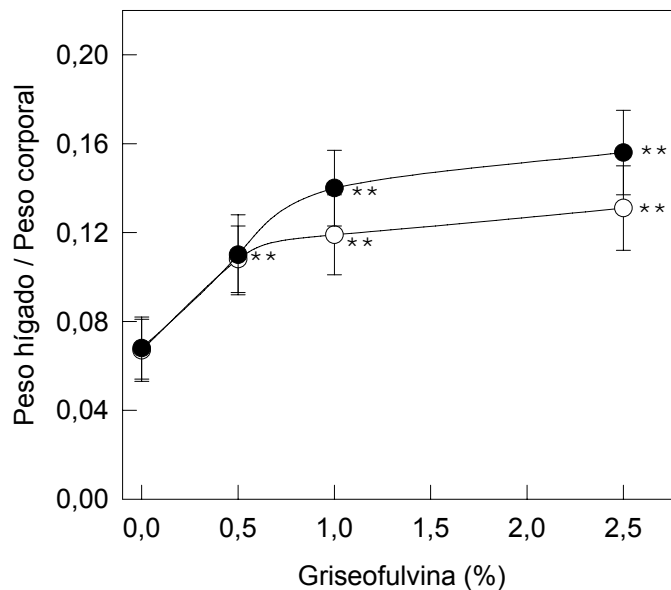
La [Figura I.2](#) muestra el aspecto morfológico de los hígados de los ratones tratados con Gris. Este órgano presentó un color marrón oscuro, mayor tamaño y consistencia que el de los animales controles, aún a la concentración mas baja de antimicótico ensayada.

La Gris produjo un aumento de la masa hepática entre el 50-90% ( $p<0,05$ ) en todos los animales tratados. ([Tabla I.1.](#))



**Figura I.2:** Aspecto morfológico del hígado de un ratón control y de un ratón tratado con Gris

En la [Figura I.3](#) se graficó la relación peso del hígado/peso corporal, en función de la concentración de Gris a 7 y 14 días de tratamiento. Dicha relación aumentó con la concentración de xenobiótico, hecho que refleja una marcada hepatomegalia en estos ratones.



**Figura I.3:** Efecto de la Gris sobre la relación peso hígado/peso corporal (PH/PC).

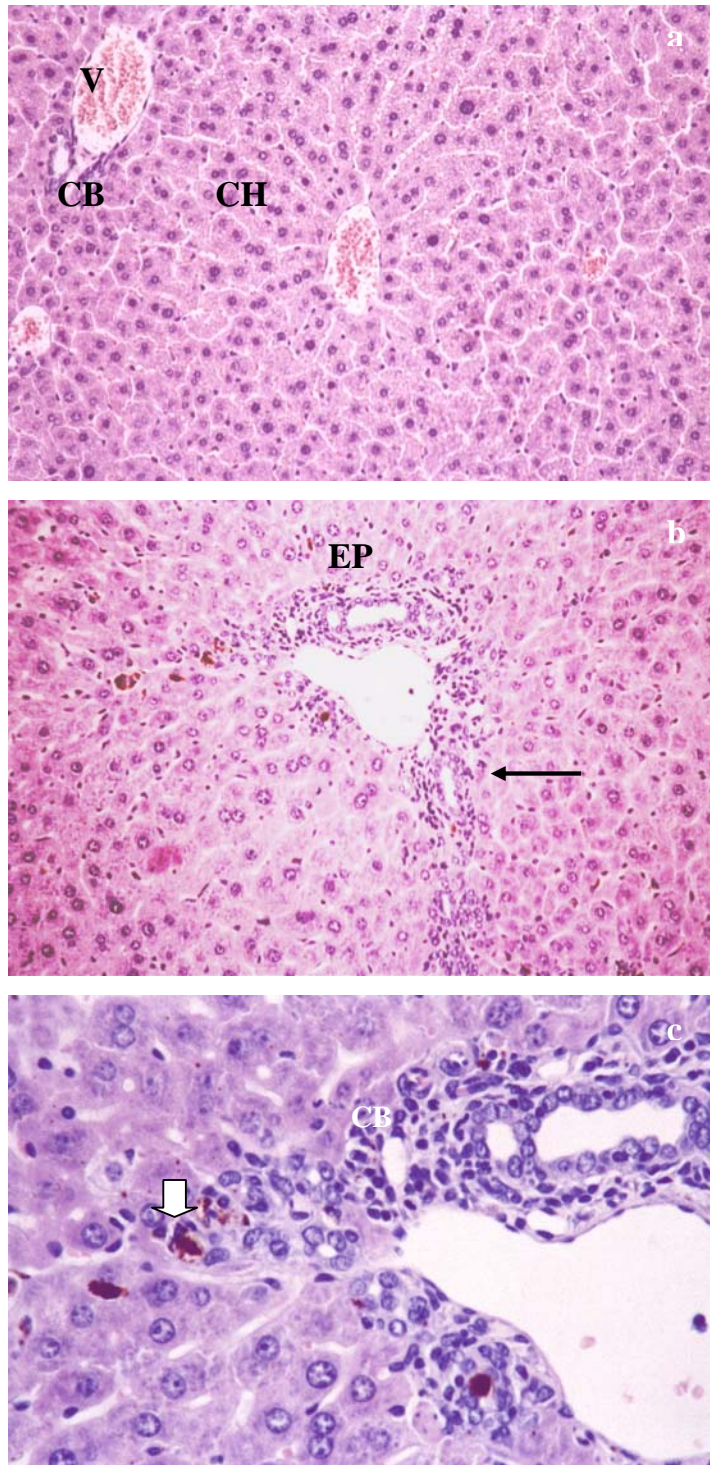
Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Tabla I.1](#) y en Materiales y Métodos.

## I.2.2. Alteraciones Histológicas

Para determinar los cambios morfológicos en las células hepáticas de los animales tratados con Gris, se realizaron estudios histológicos en hígados de ratones intoxicados con 0,25%; 0,5%; 1,0% ó 2,5% de Gris durante 14 días. La Figura I.4 muestra algunos de los cortes de tejido estudiados. A partir de la concentración 0,5% de Gris histológicamente se observó un tejido con (Figuras I.4b y c):

- i) arquitectura alterada con lobulillos hepáticos conformados por trabéculas desorientadas hacia la vena centrolobulillar o pérdida de lobulillos y trabéculas.
- ii) hepatocitos con anisonucleosis y anisocariosis (núcleos y citoplasmas de formas y tamaños diferentes), acumulación de pigmento marrón dorado intracitoplasmático, focos de degeneración hialina a necrosis hepatocitaria, presencia de cuerpos hialinos (corpúsculos de Mallory).
- iii) el Espacio Porta con vena porta congestiva; conductillos biliares, con epitelio de revestimiento interno hiperplásico (aumentado de número) con la luz ocupada por trombos marrón rojizo y rodeados por elementos celulares de tipo inflamatorio crónico (linfo-plasmocitarios). Arteriolas portales con paredes de grueso espesor.
- iv) sinusoides dilatados y congestivos con células macrofágicas (Células de von Kupffer) hiperplásicas.

Estas alteraciones no se observaron en los cortes de los hígados controles (Figura I.4a) y en los animales tratados con 0,25%, sólo en algunos casos, se encontraron algunas lesiones. Las intensidades de las lesiones fueron de leves a severas, si bien no se observó una relación directa entre la concentración de Gris y el grado o tipo de lesión. Estos resultados son similares a los encontrados por Matilla & Molland (1974), Hönigsmann (1977) y Shapiro & Wessely (1984) en ratones alimentados con Gris y por Tutois *et al.* (1991) en ratones “knock out” para la de Fe-Que1.



**Figura I.4:** Cortes histológicas de hígado

Ratón Control (a), Ratón con Gris (b y c) Zona de necrosis, CB:canalículo biliar, CH: cordones de hepatocitos, EP: espacio porta, V: vena del espacio porta, → zona de necrosis, ⇩ Trombos biliares

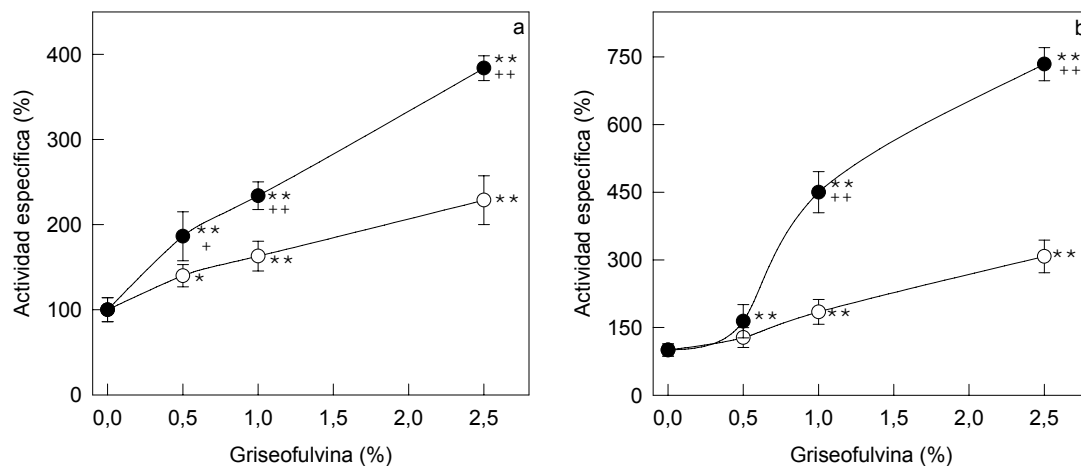


### I.3 EFECTOS DE LA GRIS SOBRE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO HEPÁTICO

Las enfermedades hepáticas, ya sean focales o generalizadas, pueden provocar alteraciones en una cantidad de enzimas funcionales. Generalmente el incremento de la actividad sérica de estas enzimas representa su liberación desde las células, a través de las membranas celulares dañadas.

Las transaminasas, glutámico oxalacético transaminasa (GOT) y glutámico pirúvico transaminasa (GPT), constituyen un excelente marcador de lesión hepatocelular. El aumento de la actividad en el suero de estas enzimas, simultáneamente, se correlaciona con enfermedad hepática. La GOT está localizada en el citosol y en la mitocondria, mientras que la GPT es citosólica. Esta última se halla en concentraciones más elevadas en el hígado, por lo tanto es más específica de este órgano.

Con el fin de evaluar el daño hepático causado por la Gris, se midieron las actividades de GOT y GPT en suero de los animales que recibieron las distintas concentraciones de Gris a los 7 y 14 días de tratamiento. En las Figuras I.5.a y I.5.b se muestran los resultados obtenidos.



**Figura I.5.:** Efecto de la Gris sobre la Glutámico Oxalacético Transaminasa (a) y Glutámico Pirúvico Transaminasa (b).

Animales tratados 7 días: ○ , animales tratados 14 días: ●

Los animales recibieron en la dieta: Gris 0,5% p/p; 1,0% p/p ó 2,5% p/p, durante 7 ó 14 días. Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control. Valor medio control GOT:  $16,60 \pm 2,42$  U/ml, GPT:  $27,75 \pm 4,05$  U/ml. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

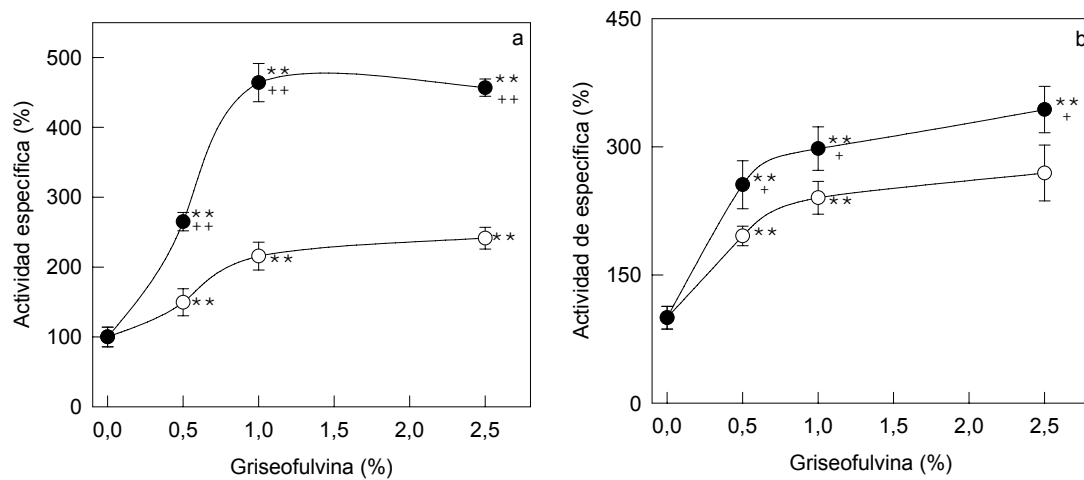
Se observa que la actividad de ambas enzimas aumentó, en forma dosis y tiempo dependiente alcanzando a los 14 días un incremento del 280% ( $p<0,01$ ) para la GOT y del 730% ( $p<0,01$ ) para la GPT.

Cuando hay colestasis, la presión en las vías biliares aumenta, produciendo daño en el epitelio, con liberación de ciertas enzimas, como la fosfatasa alcalina (FAlc) y la gamma glutamil transferasa ( $\gamma$ -GT) y un aumento en su síntesis. La FAlc, proviene principalmente de dos fuentes: hígado y hueso, aunque puede estar presente en otros tejidos como intestino, riñón, placenta y leucocitos. Su incremento puede ser fisiológico o patológico. El mecanismo fisiológico se desconoce pero, se ha sugerido, que la producción de FAlc aumenta en los tejidos bajo estimulación metabólica. Entre las causas patológicas se encuentran: obstrucción de conductos biliares, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, colestasis provocada por drogas como esteroides anabólicos, ductopenia biliar del adulto, enfermedad hepática metastática y patología ósea. La FAlc hepática está presente tanto en la parte canalicular como luminal del epitelio de los conductos biliares, debido a que el aumento en sus niveles es consecuencia de su mayor síntesis y consiguiente liberación en la circulación, el incremento puede no detectarse hasta uno o dos días después de la obstrucción biliar. Además, la enzima tiene una vida media de 1 semana, por lo que, pueden pasar varios días hasta su normalización luego de la resolución de la obstrucción biliar.

La  $\gamma$ -GT se encuentra en los hepatocitos y células epiteliales biliares. Si bien no es una enzima muy específica, en presencia de otras alteraciones enzimáticas el incremento de la  $\gamma$ -GT apoya el origen hepatobiliar del daño. Entre las causas de su aumento se mencionan patología hepatobiliar, enfermedad pancreática, alcoholismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal, diabetes, infarto de miocardio y drogas como carbamazepina, fenitoína y barbitúricos.

Para evaluar el daño en las vías biliares producido por la Gris, se determinó la actividad sérica de la FAlc y la  $\gamma$ -GT. En las Figuras I.6.a y I.6.b se muestran los resultados obtenidos.

La actividad de ambas enzimas aumentó en los animales tratados con Gris en función de la cantidad de antimicótico recibida, alcanzando, a los 14 días, un incremento del 350% ( $p<0,01$ ) para la FAlc (Figura I.6.a) y del 240% ( $p<0,01$ ) para la  $\gamma$ -GT (Figura I.6.b), comparado con sus respectivos controles.



**Figura I.6:** Efecto de la Gris sobre la Fosfatasa Alcalina (a) y Gamma Glutamyl Transferasa (b).

Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control FALc:  $469,4 \pm 68,3$  mU/ml,  $\gamma$ -GT:  $45,25 \cdot 10^{-3} \pm 7 \cdot 10^{-3}$  mU/ml. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*),  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

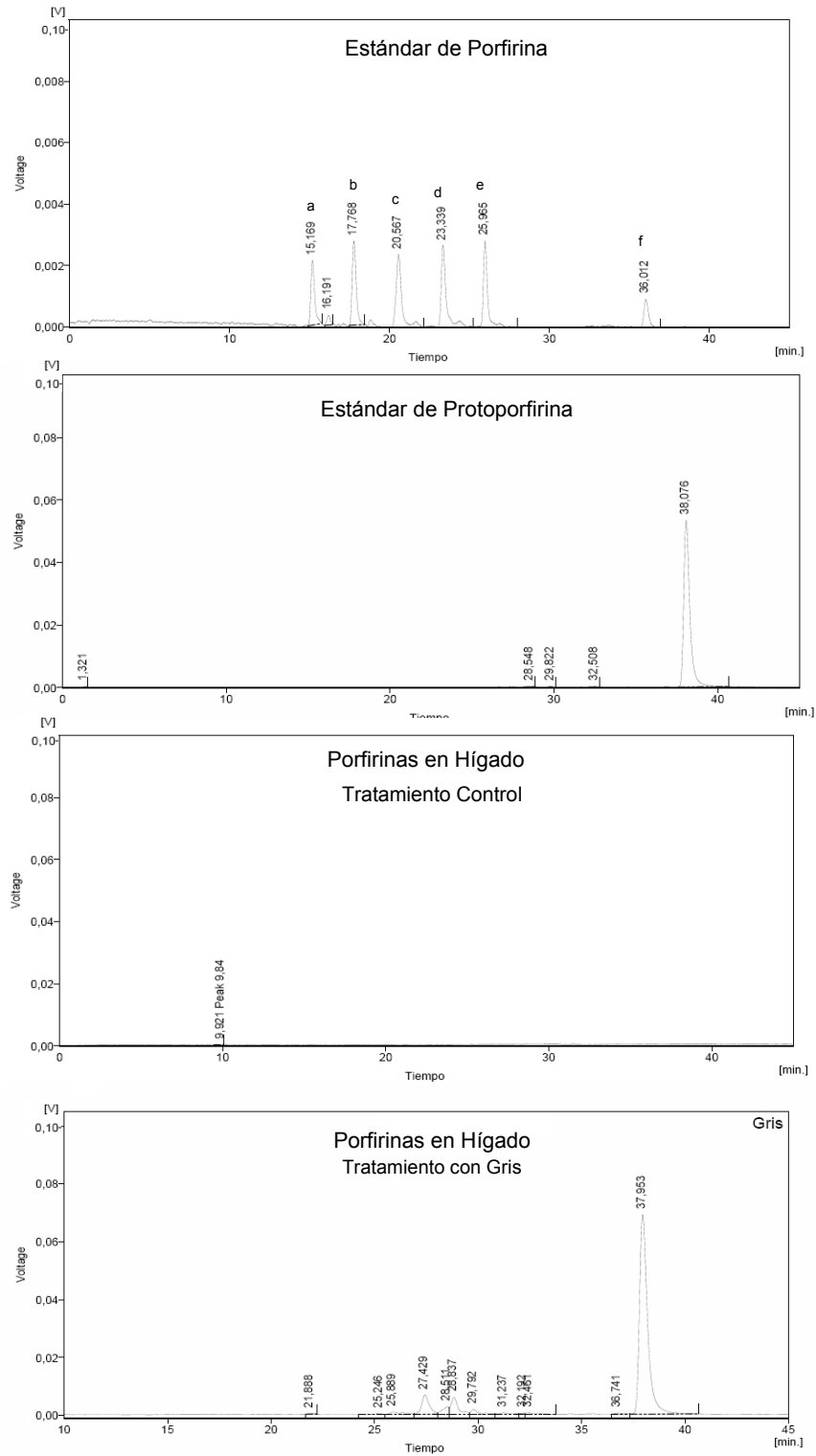
El aumento de la actividad sérica de estas cuatro enzimas marcadoras de daño hepático sugiere, que la Gris induce en estos animales daño sustancial a los hepatocitos y disturbios en la excreción biliar, proporcional al tiempo del tratamiento y a la concentración de la droga suministrada.

#### I. 4 EFECTO DE LA GRIS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO

En roedores, la Gris produce inhibición de la actividad de la Fe-Quel, y la consiguiente alteración del camino biosintético del hemo, que se manifiesta bioquímicamente con la sobreproducción de porfirinas.

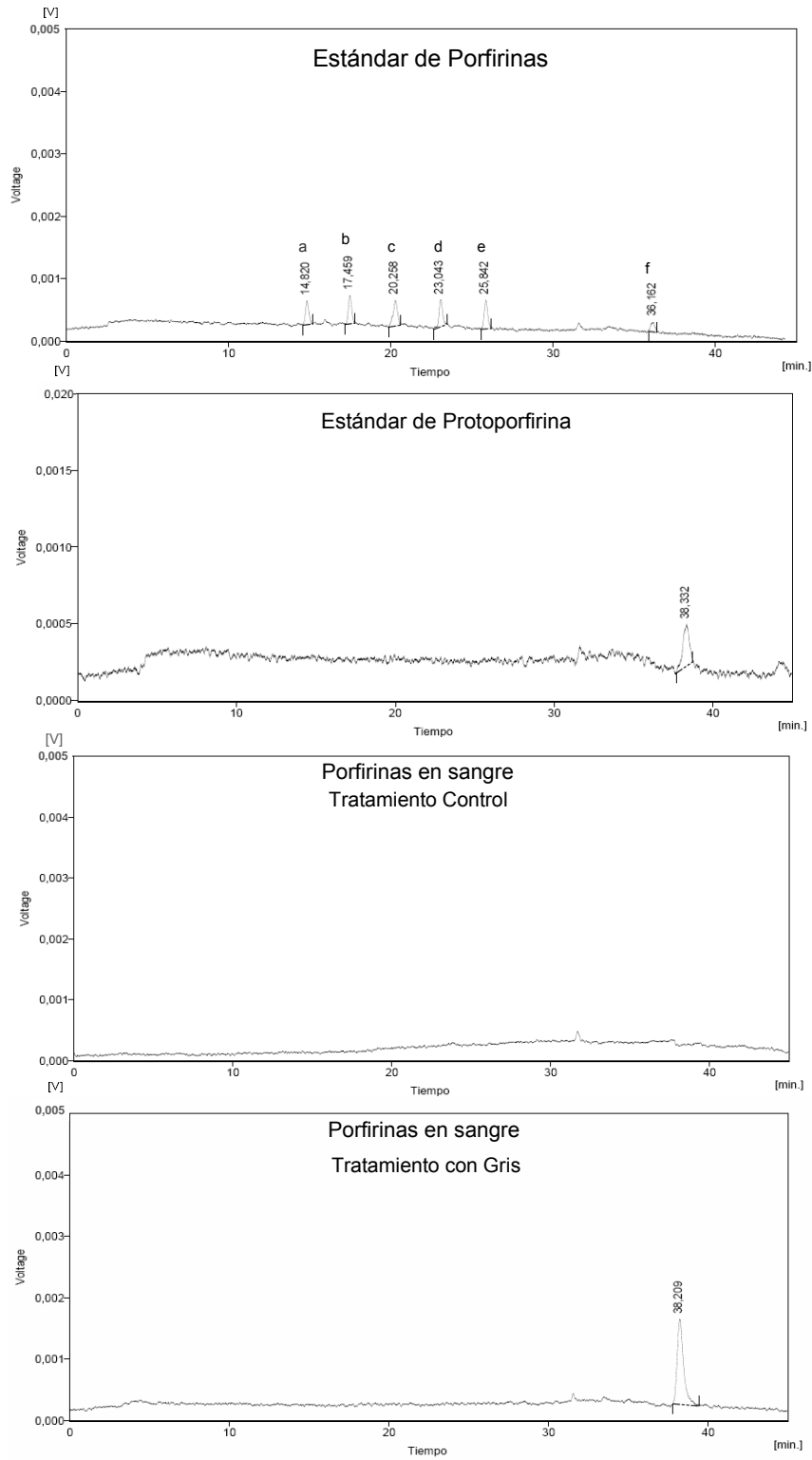
En las [Figuras I.7.a, b, y c](#), se muestra el perfil de porfirinas acumuladas en hígado, sangre y materia fecal, respectivamente, de los animales intoxicados con Gris.

Se observó que, por acción de la Gris, la PROTO IX estaba aumentada en todos los tejidos analizados, sin que se produjeran variaciones significativas en las otras porfirinas



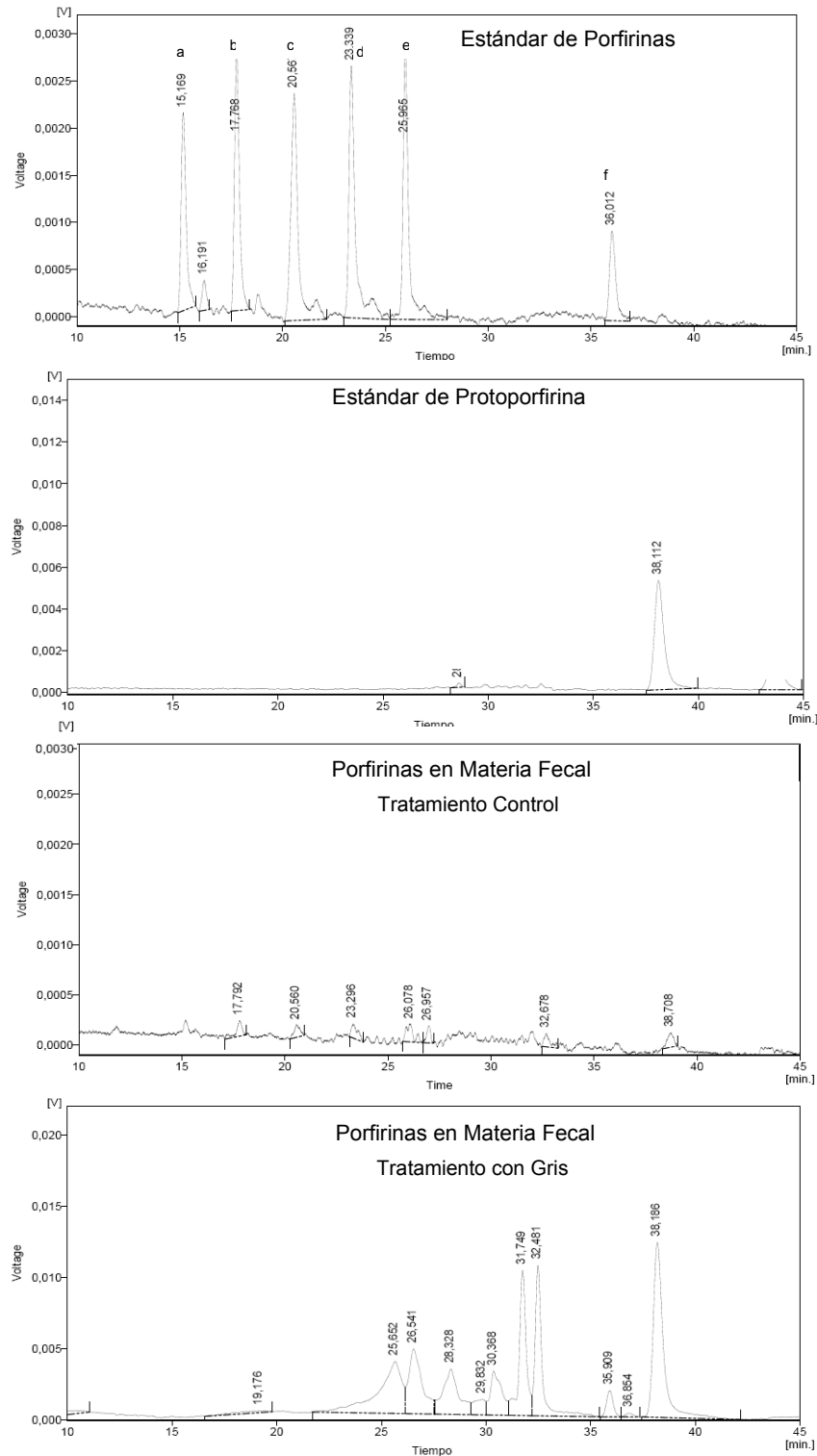
**Figura. I.: Cromatogramas del perfil de porfirinas en hígado**

a: uroporfirina, b: porfirina pentacarboxilada, c: porfirina hexacarboxilada, d, porfirina heptacarboxilada, e: coproporfirina, f mesoprotoporfirina. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.



**Figura 1:** Cromatogramas del perfil de porfirinas en sangre

a: uroporfirina, b: porfirina pentacarboxilada, c: porfirina hexacarboxilada, d: porfirina heptacarboxilada, e: coproporfirina, f: mesoproporfirina. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.



**Figura. I.:** Cromatogramas del perfil de *porfirinas en materia fecal*

a: uroporfirina, b: porfirina pentacarboxilada, c: porfirina hexacarboxilada, d, porfirina heptacarboxilada, e: coproporfirina, f mesoproporfirina. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La cantidad de PROTO IX acumulada se midió espectrofluorométricamente en muestras de hígado y sangre de los ratones tratados con Gris. Los resultados se muestran en la [Tabla I.2](#)

**Tabla I.2:** Efecto de la Gris sobre los niveles de PROTO IX en hígado, en sangre y heces.

Gris (%)	Duración del tratamiento	Contenido de PROTO IX		
		Hígado (ng/mg de proteína)	Sangre (ng/mg de proteína)	Heces (ng/mg de heces)
0	7 días	0,45 ± 0,04	67,3 ± 11,6	2,32 ± 0,05
0,5		11,95 ± 2,26**	178 ± 21**	5,43 ± 0,21**
1,0		15,71 ± 3,32**	573 ± 108**	8,65 ± 0,23**
2,5		21,35 ± 4,28**	857 ± 142**	12,34 ± 0,41**
0	14 días	0,45 ± 0,04	67,3 ± 11,6	2,32 ± 0,05
0,5		22,46 ± 5,24**	753 ± 134**	11,02 ± 0,35**
1,0		29,10 ± 6,34**	1445 ± 206**	15,25 ± 0,51**
2,5		11,02 ± 0,35**	1342 ± 223**	15,56 ± 0,43**

Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ ). Los detalles experimentales se describen en la [Tabla I.2](#) y en Materiales y Métodos.

En el hígado la variación en los niveles de PROTO IX fue tiempo dependiente, encontrándose aumentada 47 veces y 65 veces, con respecto a los niveles controles, a los 7 y 14 días de tratamiento respectivamente. Sin embargo, a los 14 días no hubo modificación en la cantidad de esta porfirina en función de la concentración del antimicótico.

Un perfil similar se observó en los niveles de PROTO IX sanguínea con un aumento de 12 y 20 veces con respecto al control a los 7 y 14 días de tratamiento, respectivamente.

Para determinar si también aumentaba la excreción de PROTO IX se midieron sus niveles en materia fecal ([Tabla I.2](#)). Se observó un incremento entre el 534% y 670% de la

excreción fecal de PROTO IX que se correlacionó con el aumento de la concentración de Gris.

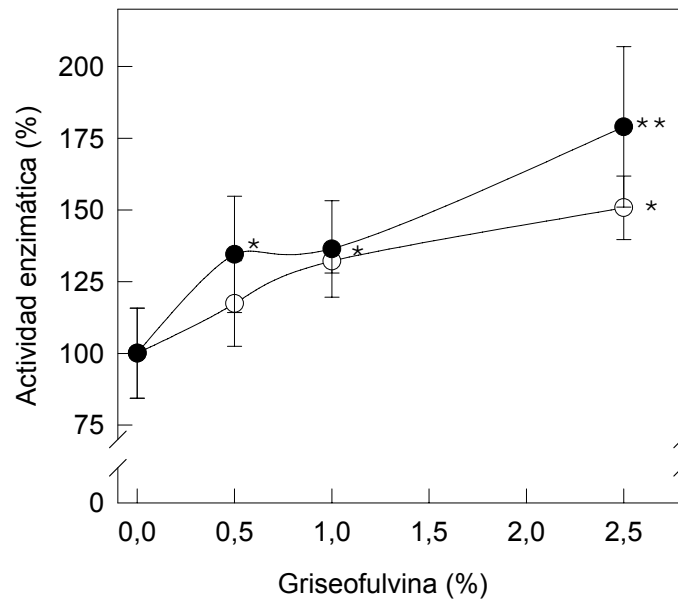
La Gris inhibe la Fe-Quel hepática, como consecuencia la PROTO IX se acumula predominantemente en este órgano y se excreta rápidamente por materia fecal. Nakao *et al.*, (1967) concluyeron que la sobreproducción de PROTO IX en hígado, inducida por drogas, causa un aumento en la concentración de porfirinas plasmáticas, que aparentemente son captadas por los glóbulos rojos, produciendo el característico incremento en la concentración de la PROTO IX en eritrocitos. Simoyama *et al.* (1985) demostraron que cuando se suministró Gris 0,5% a ratones, durante largos períodos, los niveles de PROTO IX en eritrocitos e hígado eran similares, a los detectados en ratones tratados con 1% durante períodos cortos. Sin embargo en este trabajo, a igual período de tiempo y diferentes concentraciones de Gris, la cantidad de PROTO IX acumulada en el hígado fue similar. Por cuanto la PROTO IX es hidrofóbica, sólo se elimina por la vía hepatobiliar, la obstrucción de los ductos biliares conjuntamente con la inhibición del camino del hemo por parte del agente porfirinogénico, y factores tales como la absorción de la Gris en el tracto intestinal, su concentración en suero y la reactividad de las células hepáticas frente al antimicótico podrían llevar a que la cantidad de PROTO IX que se acumula en los tejidos alcance un valor constante en el tiempo.

El ALA-S es la enzima limitante del camino biosintético del hemo, normalmente su actividad es muy baja. Se sabe que tanto en las porfirias experimentales, como en las porfirias hereditarias hepáticas y en las eritropoyéticas, la actividad de ALA-S en el hígado está aumentada debido a que el control del camino del hemo se produce a través de mecanismos de retroinhibición y represión por el producto final (Batlle, 1997).

En la Figura I.8 se muestran los resultados obtenidos cuando se midió la actividad de ALA-S en el hígado de los ratones tratados con Gris.

La actividad enzimática en los animales que recibieron Gris aumentó de manera significativa en función de la concentración de la droga. La máxima inducción se produjo con una dosis del 2,5% de Gris siendo del 50% ( $p < 0,01$ ) a los 7 días y del 80% ( $p < 0,01$ ) a los 14 días.





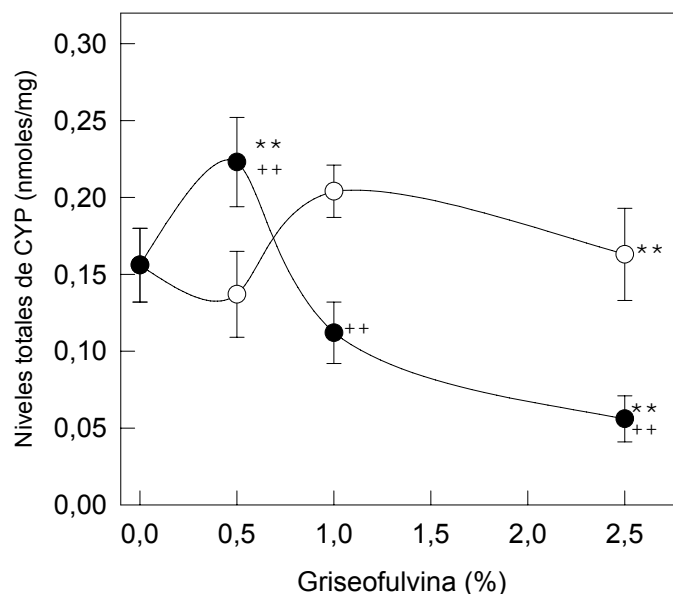
**Figura I.8:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática del Ácido  $\delta$ -Aminolevúlico Sintetasa.

Animales tratados 7 días: ○ , animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control:  $0,144 \pm 0,021$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

De los resultados obtenidos se deduce que la administración de Gris en la dieta de los animales provocó un estado similar al de protoporfiria. La reducción de la biosíntesis del hemo se tradujo en una elevada concentración de porfirinas en hígado, sangre y heces, y en un aumento de la actividad de ALA-S. Estos resultados son concordantes con el conocido mecanismo de control para la síntesis de hemo.

## I.5 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL CITOCROMO P450 TOTAL Y SUS ISOFORMAS

En la [Figura I.9](#) se muestran los valores obtenidos acerca del efecto de la Gris sobre los niveles de CYP.

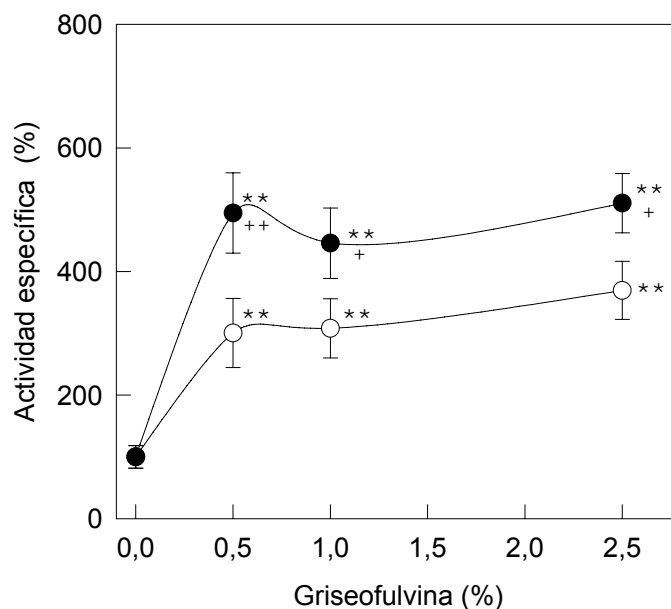


**Figura I.9:** Efecto de la Gris sobre el contenido de Citocromo P450.

Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Los resultados se expresan como niveles totales de CYP  $\pm$  DE. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  
 $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (++)  
 $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.2](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando a los ratones se les suministró Gris durante 7 días el contenido de CYP sufrió un aumento de un 30 % ( $p < 0,05$ ) con la dosis de 1,0% de Gris, retornando al nivel control con la dosis de 2,5%. En cambio cuando el tratamiento fue de 14 días, se observó un aumento del 43% ( $p < 0,01$ ) con 0,5% de Gris seguida de una fuerte disminución hasta llegar a un 36% ( $p < 0,01$ ) por debajo de la cantidad de CYP hepático de los animales control, con 2,5% de Gris.

En la [Figura I.10](#) se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Gris sobre la actividad del CYP2A6.

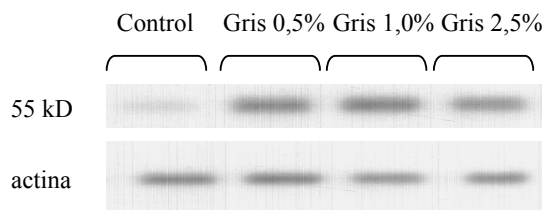


**Figura I.10:** Efecto de la Gris sobre la actividad del CYP2A6.

Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control. Valor medio control:  $1,46 \pm 0,27$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de CYP2A6 aumentó entre 300 y 360% ( $p < 0,01$ ) con 7 días de tratamiento y entre 446 y 510% ( $p < 0,01$ ) con 14 días de tratamiento. El incremento observado a los 14 días fue significativamente mayor que el detectado a los 7 días de tratamiento.

Se investigó el efecto de la Gris sobre la expresión del CYP3A4, los resultados se muestran en la [Figura I.11](#).



**Figura I.12:** Efecto de la Gris sobre la expresión de la isoforma CYP 3A4

Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La Gris en todas las concentraciones estudiadas produjo un aumento de la expresión de la isoforma 3A4 en relación con el control.

Cuando se evaluó el efecto de la Gris sobre las isoformas 2E1, 1A2, 2C9 no se observaron diferencias significativas con respecto a los animales controles (Datos no mostrados).

## I.6 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL DESARROLLO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* demostraron que la PROTO es capaz de generar ROS e inducir rápidamente daño oxidativo en el hígado (Koningsberger *et al.*, 1993; Afonso *et al.*, 1999). Se ha propuesto que la peroxidación lipídica es el principal mecanismo por el cual se producen alteraciones en la estructura, organización y funcionalidad de los sistemas de membrana de los hepatocitos y daño tisular, junto con alteraciones en el contenido de GSH y variaciones en la actividad de algunas enzimas del sistema de defensa antioxidante (Trible *et al.*, 1987; Afonso *et al.*, 1999).

Se decidió estudiar el grado de estrés oxidativo que produce la administración de Gris a ratones y su efecto sobre el sistema de defensa antioxidante.

Se midió en sangre el estado de estrés oxidativo evaluando la cantidad de ROS. Los resultados se muestran en la [Tabla I.3](#). Se observó que los niveles de radicales libres

aumentaron significativamente en forma dosis dependiente hasta una concentración de Gris del 1%, manteniéndose en estos niveles cuando la dosis fue del 2,5%.

**Tabla I.3:** Efecto de la Gris sobre los niveles de radicales libres

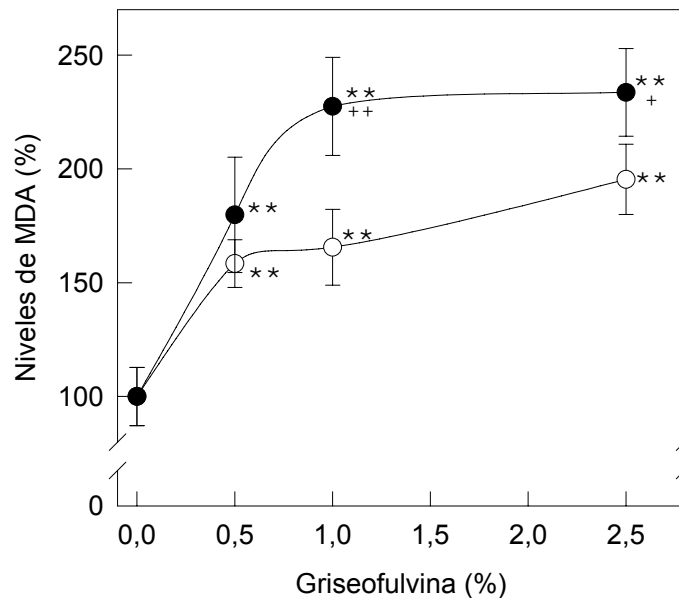
Gris (%)	Duración del tratamiento	mg/l de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
0	7 días	< 41,60
0,5		52,78
1,0		74,36
2,5		78,26
0	14 días	< 41,60
0,5		54,08
1,0		81,64
2,5		75,40

Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El nivel de MDA, formado a partir de los peróxidos lipídicos durante el tratamiento con ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido (Gutteridge, 1982; Gutteridge & Quinland, 1983) y expresado como contenidos de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), constituye un índice adecuado para la medida del grado de peroxidación de ácidos grasos y lípidos de membrana (Halliwell & Gutteridge, 1985).

En la [Figura I.12](#) se muestran los resultados obtenidos cuando se midieron los niveles de MDA en los hígados de los ratones sometidos a los tratamientos con Gris.

Se observa que los niveles de MDA aumentaron entre un 60% ( $p < 0,01$ ) a un 95% ( $p < 0,01$ ) a los 7 días y desde un 80% ( $p < 0,01$ ) hasta un 130% ( $p < 0,01$ ) a los 14 días de tratamiento, el incremento observado a los 14 días fue significativamente mayor al producido a los 7 días. Estos resultados indicarían que la PROTO y/o la Gris inducen peroxidación lipídica en los hígados de estos animales.



**Figura I.12:** Efecto de la Gris sobre los niveles de Malondialdehído.

Animales tratados 7 días: ○ , animales tratados 14 días: ●  
 Los resultados representan los porcentajes con respecto a los animales control de los niveles de MDA. Valor medio control:  $3,15 \pm 0,40$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

## I.7 EFECTO DE LA GRIS SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Las consecuencias del estrés oxidativo dependen del estado de los sistemas antioxidantes intracelulares, así como de los cambios adaptativos que pueden sufrir dichos sistemas. Para profundizar en los mecanismos de respuesta del organismo ante la liberación de ROS desencadenada por la PROTO y/o Gris, se ha llevado a cabo el estudio de varios sistemas clave para la defensa antioxidante, tales como GSH, y las enzimas GPx, GST, GRed, SOD y Catalasa.

El glutatión desempeña un papel muy importante en la protección celular frente a los daños ocasionados por la exposición a ambientes oxidantes, tanto por su acción

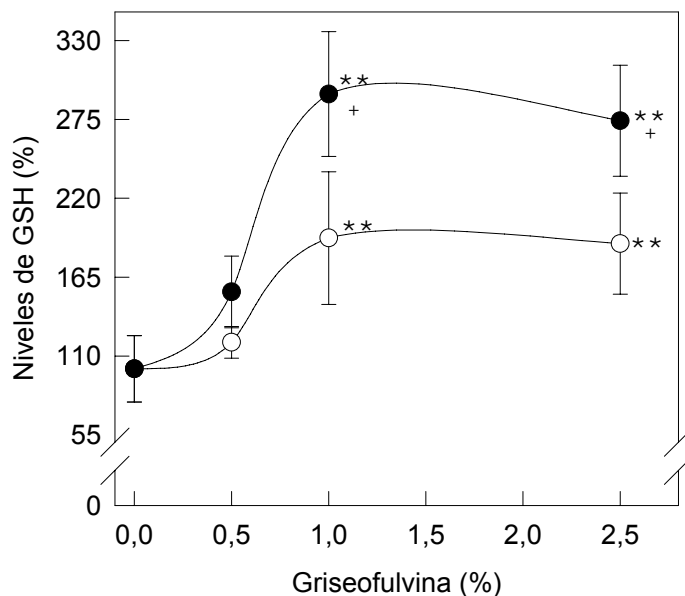
tamponadora redox, como por el hecho de ser el sustrato de importantes enzimas de defensa y por regular ciertas rutas metabólicas. Es un compuesto nucleofílico y reductor, por lo tanto puede reaccionar con especies electrofílicas u oxidantes antes que interactúen con los constituyentes más críticos de la célula, tales como ácidos nucleicos y proteínas (Pompella *et al.*, 2003). Muchas drogas y xenobióticos son detoxificados a través de la conjugación con GSH mediante las enzimas Glutation-S-Transferasas (Townsend & Tew, 2003). Es el cofactor de la familia de enzimas glutatión peroxidasa, encargadas de remover los hidroperóxidos lipídicos y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También tiene la propiedad de secuestrar, por sí mismo, radicales libres tales como radical hidroxilo, HOCl, RO<sup>•</sup>, RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, radicales con centro carbonado, peroxinitritos y O<sub>2</sub><sup>•</sup>, produciendo el radical GS<sup>•</sup>, el cual genera potencialmente O<sub>2</sub><sup>•</sup> y radicales libres, los que luego son eliminados por otras enzimas antioxidantes como la SOD (Jezek & Hlavatá, 2005)

Dado que el hígado es el principal órgano que sintetiza y exporta glutatión, la determinación de los niveles hepáticos de este sistema antioxidante es fundamental para conocer el grado de estrés oxidativo producido por la Gris.

En este trabajo se evaluó el contenido de GSH en el hígado de los animales tratados con Gris y de los controles. En la [Figura I.13](#) se muestran los resultados obtenidos.

En los animales que recibieron 1,0% y 2,5% de Gris durante 7 días, los niveles de GSH se elevaron en un 90% (p<0,01), mientras que a los 14 días el incremento fue entre 170 y 190% (p<0,01) para esas mismas dosis. El aumento observado a los 14 días fue significativamente mayor al encontrado a los 7 días. En consecuencia, se produjo un incremento de los niveles de GSH hepático que se ha correlacionado con la concentración creciente de Gris y el tiempo de tratamiento.

La GPx cataliza la reducción, por GSH, de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dando como resultado GSSG y H<sub>2</sub>O. Los hidroperóxidos lipídicos generados por una reacción en cadena iniciada por el ión superóxido, son los intermediarios clave en la peroxidación lipídica. En condiciones basales la eliminación de estos hidroperóxidos por la GPx constituye un mecanismo de protección contra la peroxidación.



**Figura I.13:** Efecto de la Gris sobre los niveles de Glutation Reducido.

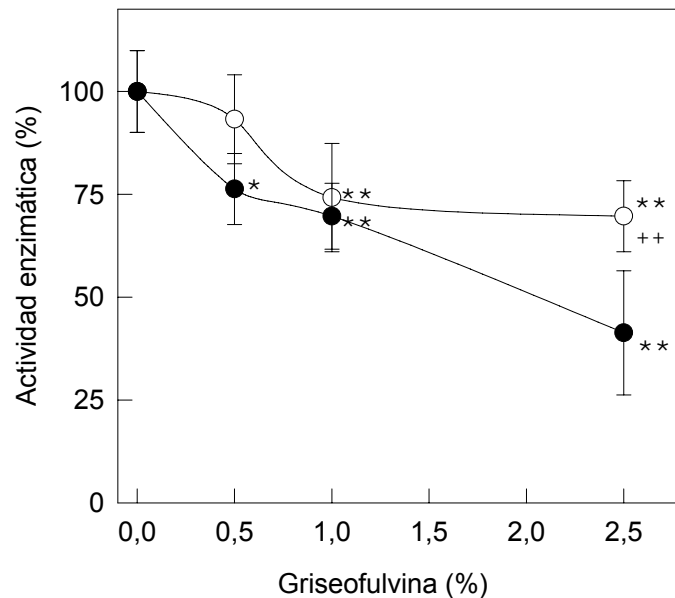
Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●

Los resultados representan los porcentajes con respecto a los animales control de los niveles de GSH. Valor medio control:  $22,98 \pm 5,29$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (+)  $p < 0,05$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

La [Figura I.14](#) muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la Gris sobre la actividad hepática de Se-GPx.

Se encontró una disminución del 30% ( $p < 0,01$ ) de la actividad enzimática en los ratones tratados con 1% de Gris a los 7 y 14 días de tratamiento o con 2,5% de Gris luego de 1 semana de intoxicación. Mientras que en el grupo que recibió 2,5% de Gris durante 2 semanas la actividad enzimática disminuyó un 60% ( $p < 0,01$ ).





**Figura I.14.: Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Glutathion Peroxidasa.**

Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●

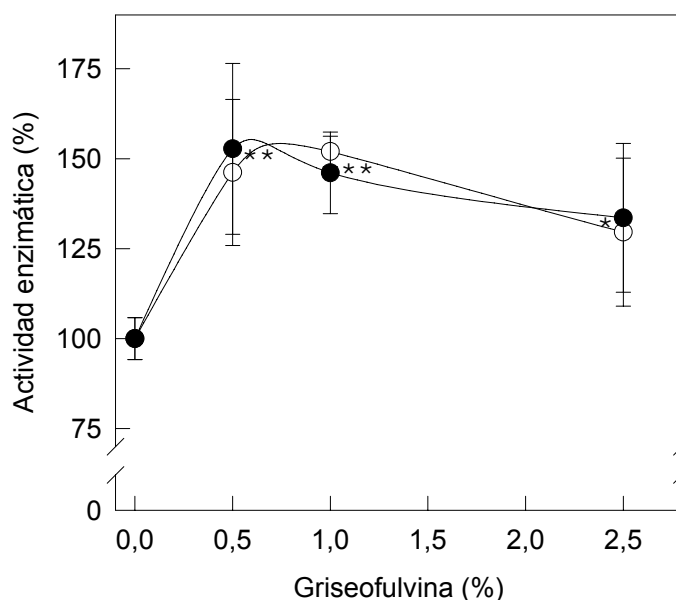
Los resultados representan los porcentajes con respecto a los animales control de la actividad específica de la enzima. Valor medio control:  $646,2 \pm 64,5$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

Estos hallazgos demuestran que la Gris inhibe directamente la actividad hepática de la Se-GPx en los ratones, lo que conduciría a un aumento de los hidroperóxidos lipídicos, incrementando así la tasa de peroxidación (Simmons & Jamall, 1988). Los resultados presentados justifican los aumentos detectados en los niveles de MDA en los animales tratados con el antimicótico

Las glutathion S-transferasas (GSTs) son enzimas ubicuas que se encuentran tanto en mamíferos como en otras especies (Hayes & Pulford, 1995). Forman parte de la Fase II del sistema metabolizante de drogas, constituyen una familia de supergenes complejos que colectivamente metabolizan drogas quimioterapéuticas, carcinógenos, contaminantes ambientales y juegan un rol fundamental en la detoxificación de xenobióticos (Hayes & Pulford, 1995; Beckett & Hayes, 1993).

Además, las GSTs contribuyen a la resistencia contra el estrés oxidativo. Se ha propuesto que algunas GSTs exhiben actividad de peroxidasa (Hayes & Strange, 1995). Estas enzimas, implicadas en la conjugación del GSH con xenobióticos, también actuarían sobre hidroperóxidos orgánicos, pero no sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sies & Cadenas, 1985).

La Figura I.15 muestra la actividad de GST en función de la concentración de Gris a los 7 y 14 días de tratamiento.



**Figura I.15:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Glutation-S-Transferasa.

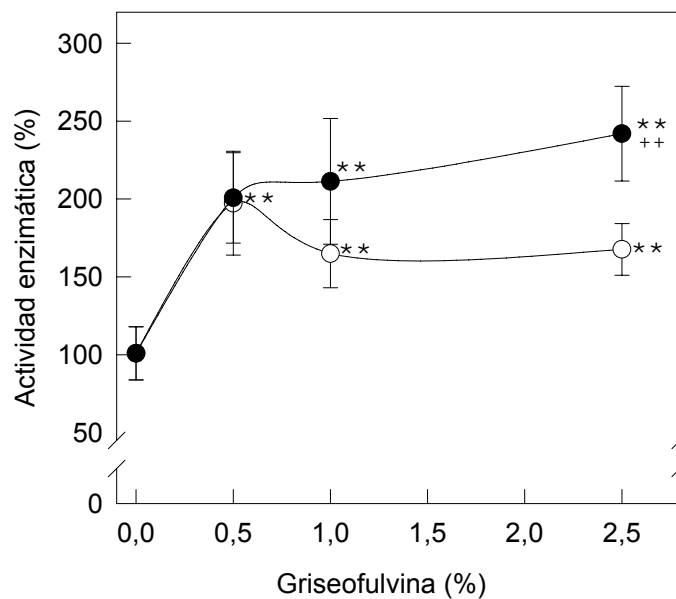
Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control: 22,77±1,20 μmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*) p<0,05 y (\*\*) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura I.5 y en Materiales y Métodos.

La actividad de esta enzima se incrementó alrededor del 50% (p<0,01) con respecto a los controles, independientemente del tiempo de administración de Gris o de la concentración, indicando que el daño hepático se produce tempranamente, incluso a niveles bajos de porfirinas. Además este aumento de actividad se correlaciona con la marcada disminución de la actividad de la GPx. Por otro lado, es posible que la inactivación de la Se-GPx promueva un aumento en la actividad de peroxidasa de las

GSTs, y que estas enzimas terminen la cadena peroxidativa conjugando una molécula de GSH con el resto radical (Sies & Cadenas, 1985).

El reciclado enzimático del GSSG a GSH es de gran importancia para el mantenimiento de los mecanismos antioxidantes (GPx), la detoxificación de xenobióticos y el metabolismo de la glucosa.

Se determinó el efecto de la Gris sobre la actividad hepática de la GRed. Los resultados se muestran en la Figura I.16.



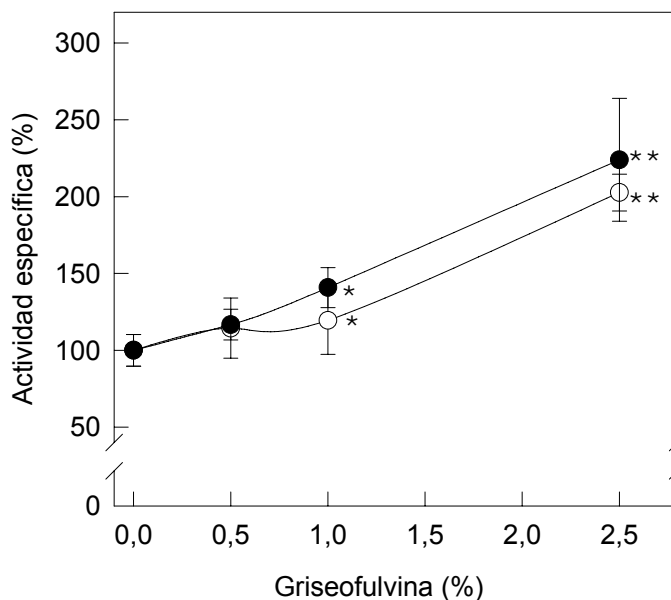
**Figura I.16:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Glutathione Reductasa.

Animales tratados 7 días: ○ , animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control:  $43,52 \pm 7,40$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura I.5 y en Materiales y Métodos.

El antimicótico, en todas las dosis ensayadas, provocó un aumento de la actividad de la enzima de alrededor del 65% ( $p < 0,01$ ) a los 7 días y entre el 100-150% ( $p < 0,01$ ) a los 14 días de administrado. Nuevamente, el incremento observado a los 14 días fue significativamente mayor al medido a los 7 días.

Estos hallazgos, sumados a la disminución de la actividad de GPx observada, serían responsables de los altos niveles de GSH encontrados en los ratones tratados con Gris, ya que ambas enzimas participan del ciclo redox de GSH/GSSG. El aumento de GRed, podría explicarse como un intento de la célula por reponer los niveles de GSH, necesarios para los procesos de detoxificación.

La SOD es la enzima encargada de eliminar el radical  $O_2^-$  mediante la formación de  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Se midió la actividad de SOD mitocondrial (Mn-SOD) en los hígados tratados con las distintas concentraciones de Gris. Los resultados se muestran en la [Figura I.17](#).



**Figura I.17:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa.

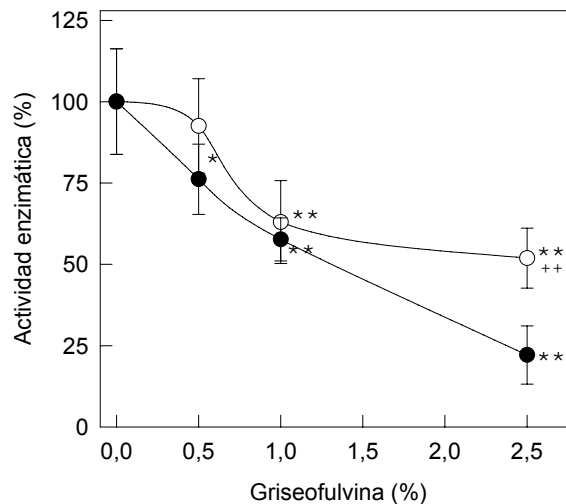
Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control:  $83,90 \pm 8,66$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

Como se puede observar, se produjo un incremento significativo en la actividad enzimática en función de la dosis de Gris, siendo éste del 100% ( $p < 0,01$ ) a la mayor concentración. No se observaron diferencias significativas a los 7 ó 14 días de tratamiento.

Este hecho demuestra que existe una pronunciada modulación de la Mn-SOD en respuesta al estado redox de la célula. Debido a la alta especificidad de sustrato de esta enzima, el aumento de su actividad indicaría la generación del radical superóxido por encima de los valores fisiológicos (Fridovich, 1974).

La reacción de dismutación catalizada por la SOD produce la generación de  $H_2O_2$ . Esta especie, a su vez, se transforma fácilmente, por ruptura del enlace O-O o enlace peróxido, en especies muy oxidantes, fundamentalmente el radical hidroxilo. Este radical es “hiper-reactivo” y su formación en la célula puede tener consecuencias muy graves; ya que reacciona al azar con infinidad de moléculas biológicas, a las que inactiva o destruye. La catalasa es la enzima que cataliza específicamente la transformación  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ .

Se midió la actividad de la catalasa en el hígado de los ratones tratados con Gris, los resultados se muestran en la [Figura I.18](#).



**Figura I.18:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Catalasa.

Animales tratados 7 días: ● , animales tratados 14 días: ○  
 Valor medio control:  $68,18 \pm 11,07 \mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris 14 días respecto del grupo tratado con Gris 7 días: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos.

Se observó una disminución progresiva de la actividad enzimática en función de la concentración de Gris administrada, llegando al 80% ( $p < 0,01$ ) cuando la dosis fue del 2,5% y el tiempo de administración 14 días, significativamente mayor que la detectada a los 7 días.

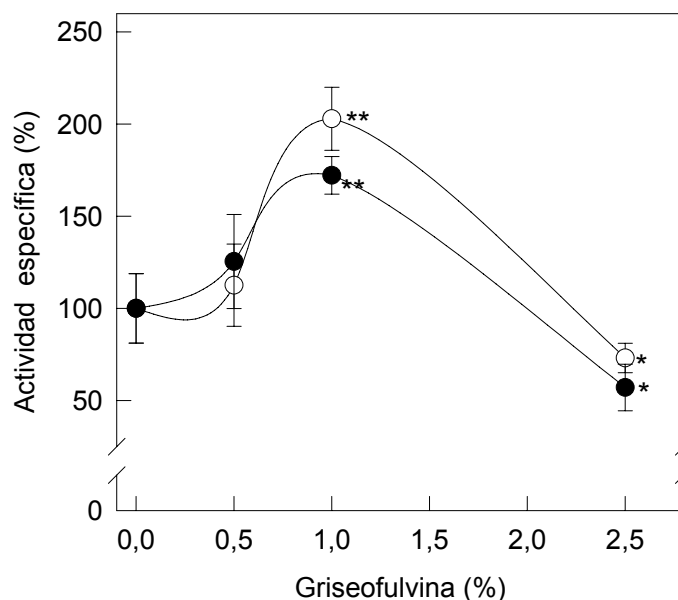
Los radicales hidroxilo inactivan la Catalasa, en tanto que el  $H_2O_2$  inhibe la GPx (Pigeolet *et al.*, 1990). Dado que estas enzimas son susceptibles a por lo menos una de las ROS, si hay un aumento de estrés oxidativo, podría tener lugar una inhibición de estas enzimas, llevando a un proceso autocatalítico irreversible, en el cual la producción de ROS incrementaría continuamente conduciendo a la muerte celular (Pigeolet *et al.*, 1990). Por lo tanto, el alto grado de estrés oxidativo presente en nuestro modelo, evidenciado por el aumento significativo de radicales libres y de TBARS, podría, por lo tanto, ser el responsable de la inhibición observada.

Debido a que la HO es la enzima encargada de degradar el hemo y además, juega un rol significativo en la protección celular contra el estrés oxidativo, se decidió medir la actividad de esta enzima en los hígados de los ratones tratados con Gris. Los resultados se muestran en la [Figura I.19](#).

Mediante inmunohistoquímica se evaluó la expresión celular de HO-1 en hígados de animales tratados con Gris, la [Figura I.20](#) muestra algunos de los cortes obtenidos.

En los animales controles ([Figura I.20a](#)) se observó una expresión moderada de HO-1 en células de von Kupffer y negativa en hepatocitos, en cambio en los hígados tratados con Gris ([Figura I.20b](#)) se vio expresión positiva, de leve a moderada, en los citoplasmas de los hepatocitos e intensa en el citoplasma de foco de los hepatocitos (centro); y expresión positiva leve de HO-1 en células de Kupffer sinusoidales.

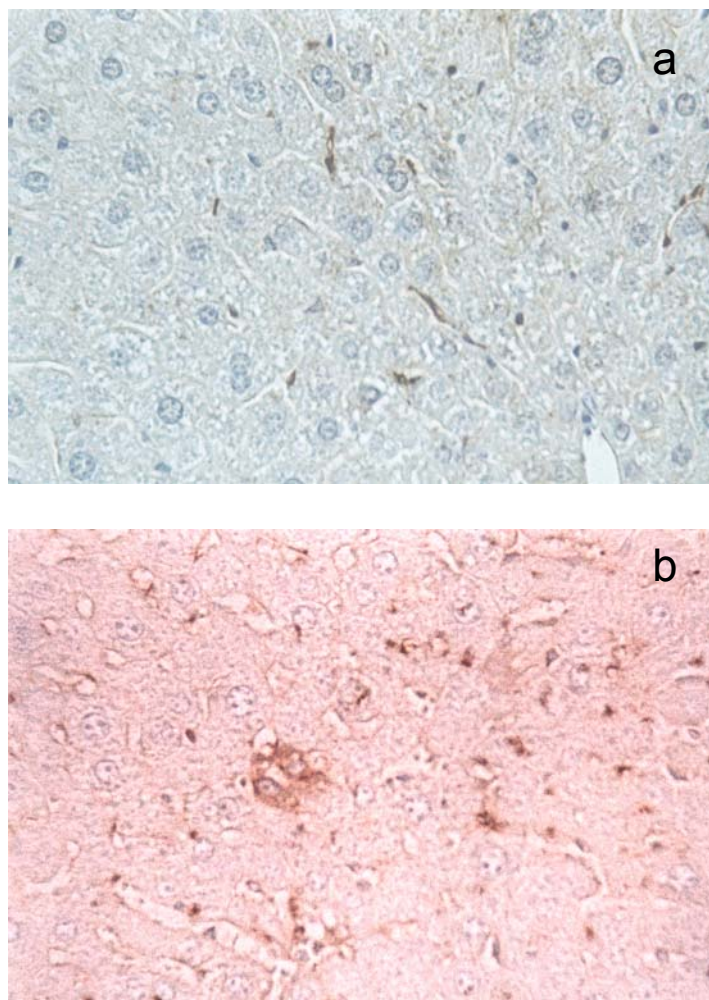
En los animales controles ([Figura I.20a](#)) se observó una expresión moderada de HO-1 en células de von Kupffer y negativa en hepatocitos, en cambio en los hígados tratados con Gris ([Figura I.20b](#)) se vio expresión positiva, de leve a moderada, en los citoplasmas de los hepatocitos e intensa en el citoplasma de foco de los hepatocitos (centro); y expresión positiva leve de HO-1 en células de Kupffer sinusoidales.



**Figura I.19:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Hemo Oxigenasa.

Animales tratados 7 días: ○, animales tratados 14 días: ●  
 Valor medio control:  $1,368 \pm 0,257$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura I.5](#) y en Materiales y Métodos

La HO es la enzima limitante de la vía de degradación del hemo a biliverdina, hierro y CO. En tejidos animales, particularmente en el hígado, es inducida por muchos factores incluyendo su sustrato hemo, algunas hemoproteínas, metales pesados, radiación UV, hipoxia, hiperoxia, entre otros (Maines, 1988, Tomaro *et al.*, 1991, [Foresti et al., 2001](#)). Se ha demostrado previamente que la HO también se induce por el tratamiento con Gris (Inafucku *et al.*, 1999). Otros factores que aumentan la actividad de HO pueden ser la inducción concomitante de CYP (Bonkowsky *et al.*, 1991) y la colestasis (Schacter *et al.*, 1983). En los últimos años se ha propuesto para la HO y su producto bilirrubina, un rol en la citoprotección contra el daño oxidativo ([Tomaro & Batlle, 2002](#)).



***Figura I.20: Expresión de Hemo oxigenasa en cortes histológicos de hígado.***

Ratón Control (a), Ratón con Gris (b). Los detalles experimentales se describen en en Materiales y Métodos

Teniendo en cuenta los niveles de estrés oxidativo, el contenido elevado de CYP y el daño hepático que produce la Gris en estos ratones, es de suponer que la inducción de la HO observada en los animales tratados con 0,5% y 1,0% de Gris se deba a una respuesta de la célula ante los factores mencionados. Por otro lado la baja actividad enzimática encontrada con una dosis de 2,5% de Gris, podría ser atribuída a la falta de su sustrato específico, hemo, por la inhibición de la Fe-Quel causada por las N-metil porfirinas que se forman durante la metabolización del xenobiótico.



## I.8. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA Y GLUTATION PEROXIDASA

El aumento de la GRed y la disminución de la GPx serían responsables de los altos niveles de GSH observados, ya que ambas enzimas participan del ciclo redox de GSH-GSSG.

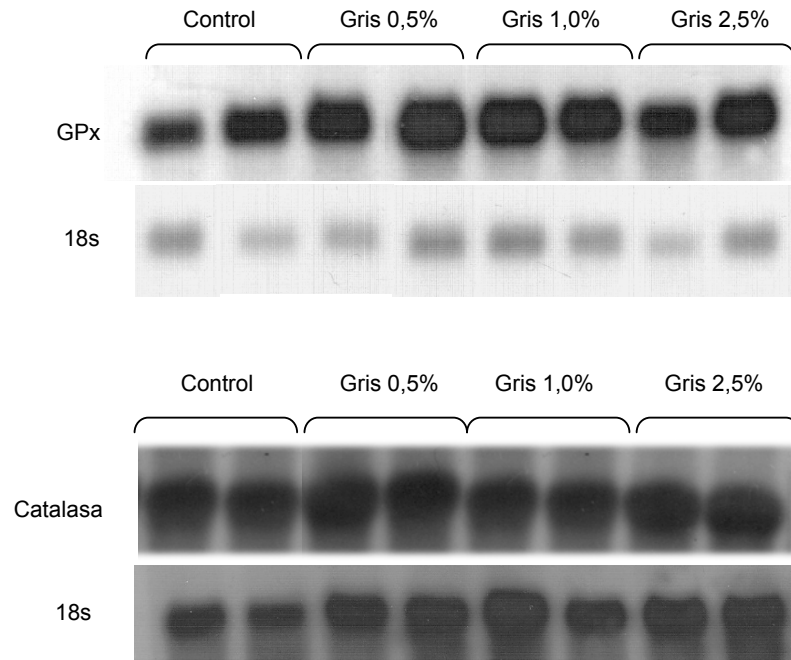
En los hígados de los ratones alimentados con Gris, las actividades enzimáticas de Catalasa y GPx siguieron un perfil muy similar. Las actividades de ambas enzimas, encargadas de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro de la célula (Tenhunen & Mustajoki, 1998), se encontraron significativamente disminuidas lo que sugiere que la protección celular contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está reducida.

La activación de la Catalasa, como respuesta del sistema de defensa en un proceso durante el cual existe un marcado estrés oxidativo, también se observado en otros estados patofisiológicos que inducen este tipo de estrés, tales como el ayuno (Wohaieb & Godin, 1987), procesos cancerosos (Kaplan & Groves, 1972) y daños por isquemia-reperusión (Gulati *et al.*, 1992). Esta reducción en la actividad es debida en parte a la formación de los complejos I y II de Catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos compuestos inactivos son generados por la interacción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> con la Catalasa y prevenidos, en parte, por la SOD (Kono & Fridovich, 1982).

Para determinar si la disminución de las actividades de GPx y Catalasa en este modelo se produce por el elevado nivel de estrés oxidativo, se evaluaron los niveles hepáticos de los ARNm de ambas enzimas en tres grupos de ratones que recibieron Gris en durante 14 días. Los resultados se muestran en la [Figura I.21](#).

Se observó que el tratamiento con Gris no disminuyó los niveles de ARNm de Catalasa y GPx en los ratones tratados. Esto sugiere que la inhibición de la actividad de ambas enzimas en hígado no es causada por una reducción a nivel transcripcional.

Si bien la Catalasa y la GPx están involucradas en la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ambas enzimas están moduladas por mecanismos diferentes y por distintos factores a nivel traduccional y post-traduccional. La GPx es una selenio proteína por lo que su síntesis está controlada por el estatus de selenio (Bermano *et al.*, 1996), mientras que la actividad de la Catalasa está regulada por iones y por el hemo (Eventoff *et al.*, 1976; Hortner *et al.*, 1982; Kirkman *et al.*, 1987).



***Figura 1.21: Efecto de la Gris sobre los niveles del RNAm de la GPx y de Catalasa***  
 Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos

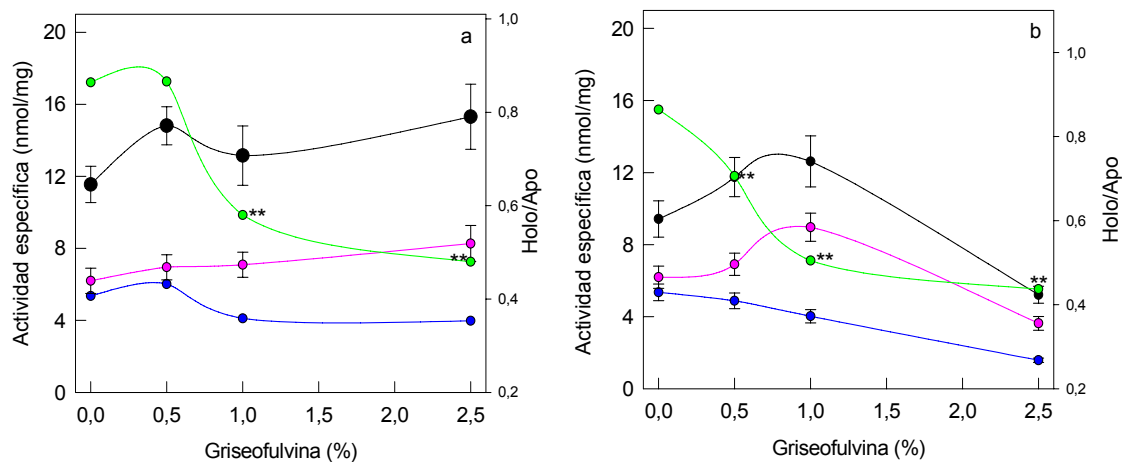
Para establecer si los niveles de selenio pueden ser la causa de la inhibición de la GPx por tratamiento con Gris, se suministró selenio (10 $\mu$ g/100ml) en el agua de bebida a animales que recibieron 0,5%, 1,0% ó 2,5% de Gris, durante 14 días. La actividad de GPx en todos los animales que recibieron el cofactor junto con Gris, no se vio modificada con respecto a los grupos tratados sólo con el antimicótico (resultados no mostrados). Por lo tanto inferimos que los niveles de selenio en estos ratones no serían la causa de la inhibición de la enzima.

Teniendo en cuenta que ambas enzimas son hemoproteínas, y que la síntesis de hemo está reducida debido a la inhibición de la Fe-Que1 por Gris, la baja actividad se podría atribuir a una disminución en la cantidad de proteína enzimática.

Los niveles de diferentes apoproteínas y su afinidad por el hemo puede ser un índice de la distribución del hemo hepático (Bloomer, 1998). La Triptofano pirrolasa (TRP), enzima que limita la velocidad del metabolismo del triptofano, se une al hemo con

una afinidad relativamente baja. En consecuencia, el grado de saturación de la TRP por hemo es un buen indicador de la cantidad relativa del tetrapirrol en el pool regulatorio hepático (Badawy *et al.*, 1986).

Se decidió, entonces, evaluar el estado del pool hepático regulatorio de hemo en los animales tratados con Gris. Para ello se midió la actividad de la holo y apo TRP en los grupos tratados con las diferentes dosis de Gris a los 7 y 14 días de tratamiento. Los resultados obtenidos se representan en la Figura I.22.



**Figura I.22:** Efecto de la Gris sobre la actividad enzimática de la Triptofano Pirrolasa.

(a) Animales tratados 7 días, (b) Animales tratados 14 días.

Total: ● Holo: ● Apo: ● Holo/Apo: ●

Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura I.5 y en Materiales y Métodos

Se observó que la actividad de holo y apoproteína, y la relación holo/apo enzima se redujeron en función de la concentración de Gris a los 7 y 14 días de tratamiento. Estos resultados reflejan una depreciación del pool de hemo libre a medida que aumenta cantidad de Gris ingerida por los animales.

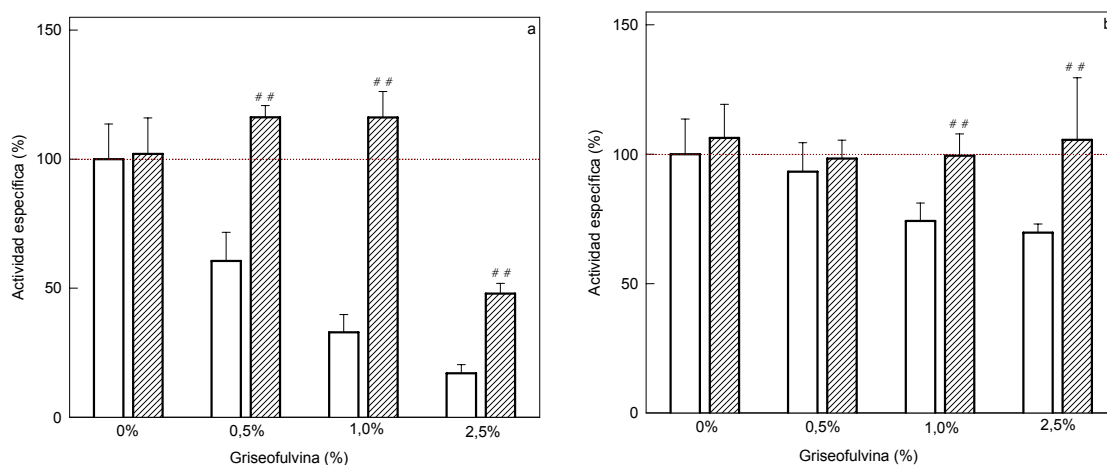
Teniendo en cuenta que la Gris produce en los ratones:

- (i) un significativo desbalance oxidativo
- (ii) una importante disminución de la actividad de Catalasa y GPx, a pesar de los altos niveles de GSH, sin disminuir los niveles de RNAm de ambas enzimas

(iii) disminución del pool de hemo hepático

se decidió evaluar si la actividad reducida de estas enzimas se debe principalmente a la baja disponibilidad de hemo en el hígado.

La hemina es una hierro protoporfirina, es un derivado oxidado del hemo, que ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento de las porfirias. Para ello, a ratones intoxicados con las diferentes concentraciones de Gris por 14 días, se les suministraron 4 dosis de hemina i.p. (15mg/kg) en los días 7, 9, 11 y 13 de tratamiento. Se evaluó el efecto de la hemina sobre la actividad enzimática de Catalasa y GPx en el hígado. Los resultados se muestran en la [Figura I.22](#).



**Figura I.23: Efecto de la Hemina sobre la actividad enzimática de la Catalasa (a) y Glutacion Peroxidasa (b).**

Animales sin hemina: □, animales con hemina: ▨

Los animales recibieron en la dieta durante 14 días: Gris 0,5% p/p, 1,0% p/p ó 2,5% p/p, o Gris más hemina i.p. (15mg/kg) a los 7, 9, 11 y 13 días. Los resultados representan los porcentajes con respecto a los animales control de la actividad específica de la enzima. Valor medio control:  $63,46 \pm 9,32$   $\mu\text{mol/mg}$  para Catalasa y  $598,97 \pm 48,23$   $\text{nmol/mg}$  para GPx. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y hemina respecto del grupo tratado con Gris sola: (##)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

En todos los animales a los que se les administró hemina junto con Gris, se observó que la actividad de la Catalasa y GPx en el hígado alcanzaron los valores basales, con excepción del grupo que recibió 2,5% donde la actividad de Catalasa aumentó un 30% ( $p < 0,01$ ) respecto del grupo que no recibió hemina, si bien en ambos casos la actividad se mantuvo reducida con respecto al control. Estos resultados, indicarían que la hemina es capaz de recuperar la actividad de ambas enzimas antioxidantes y, por lo tanto, la

disminución de la actividad enzimática de estas hemoproteínas en los ratones intoxicados con Gris, puede atribuirse a un pool de hemo insuficiente en el hígado. Muppala *et al.*, (2000) obtuvieron resultados similares en ratones de la línea HNF.1 $\alpha$ -null en las cuales la actividad de Fe-Quel también está inhibida.

El hígado es un sitio activo para la biosíntesis del hemo, que sólo es superado por la médula ósea en cuanto a la cantidad de hemo que produce (Bloomer, 1998). El hemo es requerido para la actividad funcional de CYP y otras hemoproteínas críticas como TRP (Eventoff & Gurskaya, 1975; Badawy *et al.*, 1986; Wong, 1998). El CYP utiliza la mayor parte del hemo hepático producido (Bonkovsky *et al.*, 1991; Bloomer, 1998; Wong, 1998), disminuyendo aún más la disponibilidad del tetrapirrol para cubrir los requerimientos de Catalasa y GPx, y de esta forma reducir el sistema de protección contra el daño oxidativo que produce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hígado.

## **I.9 CONCLUSIONES**

La administración de Gris en la dieta de ratones *CF1* provocó un estado similar al de la protoporfiria. La Gris es metabolizada por el CYP a N-metil protoporfirina, un poderoso inhibidor de la Fe-Quel (Frater *et al.*, 1993; Bellingham *et al.*, 1995). La reducción de la biosíntesis del hemo se tradujo en un aumento de la actividad de ALA-S, la primera enzima y limitante de la velocidad del camino biosintético, y una gran acumulación de PROTO IX en hígado, sangre y un aumento en su excreción por heces. Estos resultados son concordantes con el conocido mecanismo de control de la síntesis de hemo. Se sabe que el pool de hemo libre controla la transcripción, la traducción y la actividad de ALA-S, a través de un mecanismo de regulación negativa (Batlle, 1997).

Nosotros observamos que, a medida que aumenta la concentración de Gris y el tiempo de intoxicación, disminuye el pool de hemo. Resultados similares fueron obtenidos por Badawy & Evans (1973), quienes describieron que la Gris disminuye la saturación de la apo TRP por hemo en ratas.

Las N-metilporfirinas se formarían por la reacción de especies derivadas de la Gris con el anillo porfirínico del CYP, actuando la Gris como sustrato suicida. Se ha propuesto que la inhibición se debe a una fuerte interacción entre la N-metilporfirina y el centro

activo de la Fe-Quel, con la consecuente acumulación de los sustratos de la enzima: Fe y PROTO IX.

En ratones alimentados con dieta suplementada con Gris se vio que el contenido de CYP por mg de proteína disminuía, mientras que el contenido total de CYP en hígado no sufría alteraciones (Cantoni *et al.*, 1993). En cambio, en ratas se observó una clara disminución del contenido hepático de P450 (40%) paralelamente con una disminución del Hemo total (43%) (Williams & Simonet, 1986).

Se ha descrito que la Gris induce un aumento de 126 veces en el ARNm del CYP2A6 y de 10 veces en su actividad. La inducción de esta isoenzima del CYP es de interés debido a que está sobreexpresada en sitios preneoplásicos y en tumores de hígado de ratón (Wastl *et al.*, 1998; Hasler *et al.*, 1999). También se ha observado un efecto inductor de la Gris sobre la actividad del CYP 3A4 (Hasler *et al.*, 1999; Hayes, 2002). En este estudio se observó una inducción del CYP a bajas concentraciones de Gris y luego una importante caída del contenido del citocromo al aumentar la concentración y el tiempo de tratamiento con el antimicótico. También se registró una inducción de la actividad del CYP2A6, y de la expresión del CYP3A4, indicando que ambas isoformas participan en la metabolización de la Gris.

Si bien aún no se conocen los mecanismos moleculares responsables de la desregulación de las isoformas del CYP, aparentemente la Gris altera las enzimas del sistema metabolizante de drogas en varias formas (Knasmüller *et al.*, 1997):

- i. Una disminución podría causar una disminución transitoria del P450 debido a un efecto tóxico directo o indirecto de la Gris.
- ii. Una destrucción de la isoenzima del CYP que iría acompañada de un daño celular, inflamación y necrosis.
- iii. Un efecto directo sobre determinadas isoformas del CYP.

La pérdida del Hemo y subsecuentemente de CYP por un lado y la inducción de algunas isoformas del CYP resultarían en un balance neto inalterado del CYP hepático total, como se ha observado en los primeros estudios sobre este tema.

Se ha demostrado que la administración de Gris induce rápidamente los ARNm de FeQuel y ALA-S (Salompaa *et al.*, 1995; Inafuku *et al.*, 1999; Laftah *et al.*, 2004) mientras que en pacientes con PPE se encontró que los niveles del ARNm de Fe-Quel son

aproximadamente la mitad de los de los controles (Taketani *et al.*, 1990). Estos resultados podrían ser la diferencia fundamental entre la consecuencia del defecto molecular del gen de la Fe-Quel en la PPE y la inhibición de la actividad de la enzima por los metabolitos de la Gris en el modelo murino.

El contenido elevado de PROTO IX induce severo daño hepático. El incremento de la relación peso hígado/peso corporal después del tratamiento con Gris puede ser atribuido a un incremento de la actividad mitótica en los hepatocitos de estos ratones (Shimoyama & Nonaka, 1987; Knasmuller *et al.*, 1997; Laftah *et al.*, 2004). El aumento de los niveles séricos de GOT y GPT en este estudio indicarían necrosis y degeneración funcional del hígado, debido a que estas enzimas reflejan el daño en los hepatocitos. Un incremento significativo de las actividades enzimáticas de FAlc y  $\gamma$ -GT señalan daño obstructivo en los ductos biliares intrahepáticos. Estos resultados muestran que la Gris induce disfunción hepática como una combinación de daño a las células con obstrucción de los ductos biliares, siendo consistentes con los estudios previos realizados en un modelo de intoxicación similar (Tanaka *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1991; Polo *et al.*, 1997; Inafuku *et al.*, 1999).

En dietas prolongadas con Gris se observó la inducción de hepatopatías asociadas a la formación de cuerpos de hialina (cuerpos de Mallory) en los hepatocitos (Knasmuller *et al.*, 1997). Estas anomalías en el citoesqueleto, están asociadas con inducción de enfermedad hepática y carcinoma hepatocelular. El daño hepático crónico asociado con la porfiria y la formación de cuerpos de Mallory acrecienta la proliferación celular, produce severa hepatomegalia e inducción de todas las enzimas lo que puede contribuir al efecto hepatocarcinogénico de Gris en ratones (Knasmuller *et al.*, 1997).

El aumento de la actividad de GST en ratones que recibieron Gris es indicativo de daño hepático (Buzaleh *et al.*, 1997). Además, se ha observado un incremento de actividad de esta enzima en ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes (Siess *et al.*, 1997). Se ha descrito que en condiciones de estrés oxidativo, la GST se activa por S-tiolación mediada por hidroperóxidos, siendo el GSH el dador de grupos SH. Esta reacción es reversible, dependiendo del equilibrio redox del GSH intracelular (Sheen *et al.*, 1996). El aumento de GST observado estaría en relación con el contenido de GSH hepático.

Si bien la patogénesis del daño celular en la PPE no puede asociarse solamente a depósitos de PROTO IX en los hepatocitos y canalículos biliares, esto puede contribuir a la

falla hepática sobre todo en estadios tardíos de la enfermedad cuando están presentes anomalías ultraestructurales (Avner *et al.*, 1981; Rademakers, *et al.*, 1990).

Nosotros observamos una alteración en el balance redox del hígado debido a la concentración elevada de porfirinas y por la Gris; como consecuencia de ello, el sistema de defensas antioxidante fue perturbado. La acumulación de PROTO IX e hierro, primeramente en la mitocondria, y luego en otras organelas y en citosol, producida por la desregulación de la biodegradación de hemo libre (Rademarkers *et al.*, 1990; Mac Donald *et al.*, 1981; Navone *et al.*, 1991; Koningsberger *et al.*, 1993) podrían provocar daño oxidativo. Las porfirinas son conocidas generadoras de ROS y aumentan la peroxidación lipídica en el hígado. En nuestro estudio, esto se vio reflejado por un aumento de radicales libres y de MDA, en los ratones que recibieron Gris en las diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento.

La GPx reduce los peróxidos lipídicos y no lipídicos y oxida el GSH a GSSG. La catalasa, junto con la GPx son capaces de destruir el peróxido de hidrógeno. Como se vio anteriormente la Gris induce la disminución del pool de hemo hepático. El hemo es necesario para la actividad funcional del CYP y otras enzimas críticas tales como Catalasa y TRP, pero son los citocromos los que utilizan la mayor cantidad del hemo producido por el hígado (Eventoff & Gurskaya, 1975; Badawy *et al.*, 1986; Bloomer, 1998; Wong, 1998). Se observó la disminución de la actividad de las dos hemoproteínas del sistema de defensa antioxidante, mientras que no se observó disminución de los ARNm de ambas enzimas. Esto nos hace suponer que la falta de hemo disponible para la síntesis proteica de Catalasa y GPx disminuirían la capacidad de defensa de los hepatocitos para hacer frente al ataque de los peróxidos.

A concentraciones fisiológicas de GSH, una baja actividad de GRed es suficiente para reducir el GSSG proveniente de la actividad de GPx (Michiels *et al.*, 1994). En condiciones de estrés oxidativo aumenta la actividad de ambas enzimas para proveer los mecanismos de defensa antioxidante de la célula. En nuestro modelo, observamos un incremento de la actividad de GRed, elevados niveles de GSH y como se dijo anteriormente la disminución de la actividad de GPx; esto produciría un desbalance tal que los niveles de GSH permanecerían elevados y paralelamente inducirían un aumento de la actividad de GRed.

La actividad de SOD se encontró aumentada, esta enzima es también inducida por estrés oxidativo (Michiels *et al.*, 1994). Debido a la alta especificidad de sustrato de la



SOD, el incremento de su actividad indica la generación de radical superóxido por encima de los valores fisiológicos (Fridovich, 1974). La reacción de dismutación de  $O_2^{\cdot -}$  lleva a la formación de  $H_2O_2$  que no puede consumirse por la baja actividad de Catalasa y GPx y a un aumento de la peroxidación lipídica debido a la inhibición de la reacción de terminación del ciclo de radicales peróxidos (Fridovich, 1974), lo cual contribuye al aumento de los niveles de MDA.

En este estudio se encontró una inducción de la actividad de HO a concentraciones de 0,5% y 1,0% de Gris, tanto a 7 como a 14 días, pero la actividad de la enzima disminuyó significativamente con 2,5% de la droga. Nosotros atribuimos la inducción de la HO a un efecto antioxidante frente al estrés oxidativo generado por la Gris y la acumulación de PROTO IX. Sin embargo, a mayor concentración del antimicótico, el pool de hemo libre está tan reducido que no llega a producir la inducción de la enzima.

Inafuku *et al.*, (1999) publicaron que en el modelo de protoporfiria inducida por Gris, los niveles de ARNm de HO-1 se incrementaban muy rápidamente debido a que los hepatocitos pueden ser estresados químicamente por acumulación de sustancias precursoras del hemo o N- metil Porfirinas. La Gris por sí misma puede, potencialmente, inducir la expresión de HO-1. Además los autores sostienen que la inducción del ARNm de HO-1 puede deberse al incremento de hierro libre, el cual podría no estar siendo incorporado a la PROTO IX. Si bien ellos observaron que la administración de Gris apenas tuvo algún efecto sobre los niveles de hierro en suero, el contenido de transferrina, capaz de unir al hierro, se incrementó significativamente. Esto puede ser un signo de que la gran demanda de hierro en hígado es compensada por la disminución de hemo.

En conclusión, los resultados obtenidos sugerirían que en este modelo de protoporfiria inducida por Gris se produce alteración de la vía metabólica del hemo, daño a los hepatocitos y obstrucción de las vías biliares, elevados niveles de estrés oxidativo, y perturbación del sistema metabolizante de drogas en todas las dosis estudiadas. Estas alteraciones son similares a las que se encuentran en los pacientes con PPE. Si bien la patogénesis del daño celular en PPE no puede asociarse solamente a depósitos de PROTO IX en los hepatocitos y canalículos biliares, no obstante puede contribuir a la falla hepática sobre todo en estadios tardíos de la enfermedad cuando están presentes anomalías ultraestructurales (Avner *et al.*, 1981; Rademakers, *et al.*, 1990)

Debido a que los efectos de la Gris ya se observan a baja concentración del tóxico, y que algunos efectos son tiempo dependiente mientras que otros, una vez establecidos, se mantienen independientemente del período de intoxicación, se ha seleccionado la concentración intermedia de 0,5% de Gris, suministrada durante 14 días para los estudios posteriores.

## I.10 REFERENCIAS

Avner DL, Lee RG, Berenson MM. (1981). Protoporphyrin-induced cholestasis in the isolated *in situ* perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 67(2):385-394.

Afonso S, Vanore G.& Batlle A. (1999). Protoporphyrin IX and Oxidative Stress. *Free. Rad. Res.* 31: 161-170.

Badawy AA, Evans M. (1973). The effects of chemical porphyrinogens and drugs on the activity of rat liver tryptophan pyrrolase. *Biochem. J.* 136(4): 885-892.

Badawy AAB, Morgan CJ, Davis NR. (1986) Tryptophan pyrrolase and the regulation of mammalian haem biosynthesis, in *Porphyrias and Porphyrins* (Nordmann Y ed) pp 69-82, John Libbey and Company Ltd, London.

Batlle, A. (1997). Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular, Ed. Acta Bioq. Clin. Latinoamer. Buenos Aires. Argentina

Beckett GJ, Hayes JD. (1993). Glutathione S-transferases: Biomedical applications. *Adv. Clin. Chem.* 30: 282-380.

Bellingham R, Gibbs A, De Matteis F, Lian L, Roberts G. (1995). Determination of the structure of an N-substituted protoporphyrin isolated from the liver of griseofulvin-fed mice. *Biochem. J.* 307: 505-512.

Bermano G, Arthur JR, Hesketh JE. (1996). Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply. *FEBS Lett.* 387:157-160.

Bloomer J. (1998). Liver metabolism of porphyrins and haem. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 324-329.

Bonkovsky HL, Healey JF, Lourie AN, Geron GG. (1991). Intravenous heme-albumin in acute intermittent porphyria: Evidence for repletion of hepatic hemoproteins and regulatory heme pools. *Am. J. Gastroenterol.* 86: 1050-1056

Buzaleh AM, Vazquez ES, Nuñez G, Batlle AMC. (1997). Effect of chronic anesthesia on the drug-metabolizing enzyme system and heme pathway regulation. *Gen Pharmacol.* 4: 577-582.

Cantoni L, Di Padova C, Rovagnati P, Ruggieri R, Dal Fiume D, Tritapepe R. (1993) Bile secretion and liver microsomal mixed function oxidase system in mice with griseofulvin-induced hepatic protoporphyrin. *Toxicology* 27: 27-39.

Choi SW, Han JH, Lim KT, Cho HM, Chung KW, Sun HS, Park DH, Kim BS, Seo EJ. (1991). Effect of ursodeoxycholic acid on experimental hepatic porphyria induced by griseofulvin. *J. Korean Med. Sci.* 6(2): 146-156.

- Eventoff W, Gurskaya GU. (1975). The molecular symmetry of bovine liver catalase. *J. Mol Biol.* 93: 55-62.
- Eventoff W, Tanaka N, Rossmann MG. (1976). Crystalline bovine liver catalase. *J. Mol. Biol.* 103: 799–780.
- Frater Y, Brady A, Lock EA, De Matteis F. (1993). Formation of N-methyl protoporphyrin in chemically-induced protoporphyria. *Arch. Toxicol.* 67: 179–185.
- Foresti R, Goatly H, Green CJ, Motterlini R. (2001). Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281(5): H1976-H1984
- Fridovich I. (1974). Superoxide dismutases. En *Advances in Enzymology* (Ed. Alton Meister) vol.41. Interscience, USA.
- Gulati S, Singh AK, Irazu C, Orak J, Rajagopalan PR, Fitts CT, Singh I. (1992). Ischemia-reperfusion injury: biochemical alterations in peroxisomes of rat kidney, *Arch.Biochem.Biophys.* 295: 90-100.
- Gutteridge JM. (1982). Free radical damage to lipids, aminoacids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. *Int. J. Biochem.* 14: 649-652.
- Gutteridge JM, Quinland GJ. (1983). Malondialdehyde formation from lipid eroxides in the thiobarbituric acid test. The role of liid radicals, iron salts, and metal chelators. *J. Apl. Biochem.* 5: 293-295
- Halliwell B., Gutteridge JM. (1985). *Free radical in Biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hasler J, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falk J, Farrell G, Kaminsky L, Spivack S, Boitier E, Beaune P. (1999) Human cytochromes P450. *Mol Asp. Med.* 20: 1-137
- Hayes E. (2002). The cytochrome P-450 enzyme System [www.edhayes.com/startp450.htm](http://www.edhayes.com/startp450.htm)
- Hayes JD, Pulford DJ. (1995). The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445–460.
- Hayes JD, Strange RC. (1995). Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad. Res.* 22: 193–207.
- Hönigsmann H. (1977). Erythropoietic protoporphyria. III. Experimental studies of model systems: Pathogenesis of liver damage. *Z. Hautkr.* 52(11): 599-621.
- Hortner H, Ammerer G, Hartter E, Hamilton B, Rytka J, Bilinski T, Ruis H. (1982). Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur J Biochem* 128: 179–184.
- Inafuku K, Takamiyagi A, Oshiro M, Kinjo T, Nakashima Y, Nonaka S. (1999). Alteration of mRNA levels of d-aminolevulinic acid synthase, ferrochelatae and heme oxygenase-1 in griseofulvin induced protoporphyria mice. *J. Dermat. Sci.* 19: 189–198.
- Jezek P, Hlavatá L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(12): 2478-503.

- Kaplan JH and Groves JN. (1972). Liver and blood cell catalase activity of tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 32: 1190-1194.
- Kirkman HN, Galiano S and Gaetani GF (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* 262: 660-666.
- Knasmüller S, Parzefall W, Helma C, Kassie F, Ecker S, Schult-Hermann R. (1997). Disease Model, Mechanism and Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 27: 495-537
- Koningsberger JC, Van Asbeck BS, Van Hattum J, Wiegman LJ, Van Berge Henegouwen GM, Marx JJ. (1993). The effect of porphyrins on cellular redox systems: a study on the dark effect of porphyrins on phagocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 716-723.
- Kono Y, Fridovich I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257: 5751-5754.
- Laftah AH, Raja KB, Beaumont N, Simpson RJ, Deacon A, Solanky N, Srail SK, Peters TJ. (2004). The effects of inhibition of haem biosynthesis by griseofulvin on intestinal iron absorption. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94(4): 161-168.
- MacDonald DM, Germain D, Perrot H. (1981). The histopathology and ultrastructure of liver disease in erythropoietic protoporphyria. *Br. J. Dermatol.* 104(1): 7-17.
- Maines, MD. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557-2568.
- Matilla A, Molland EA (1974). A light and electron microscopic study of the liver in case of erythrohepatic protoporphyria and in griseofulvin-induced porphyria in mice. *J. Clin. Pathol.* 27(9): 698-709
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994). Importance of Se- glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free. Rad. Biol. Med.* 17: 235-248.
- Muppala V, Lin Ch S, Lee YH. (2000). The Role of HNF-1a in Controlling Hepatic Catalase Activity. *Mol. Pharmacol.* 57: 93-100.
- Nakao K, Wada Navone NM, Buzaleh AM, Polo CF, Afonso SG, Vazquez ES, Batlle AMC. (1991). The effect of griseofulvin on the heme pathway--II. An exhaustive analysis during short and long-term challenge. *Gen Pharmacol.* 22(6):1179-1183.
- Pigeolet E., Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary M, Remacle J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 51(3): 283-297.
- Polo CF, Buzaleh AM, Vazquez ES, Afonso SG, Navone NM, Batlle AMC. (1997). Griseofulvin-induced hepatopathy due to abnormalities in heme pathway. *Gen Pharmacol.* 29(2): 207-210.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66(8): 1499-1503.
- Rademakers LPHM, Cleton MI, Kooijman C, Baart de la Faille H, van Hattum J. (1990). Early involvement of hepatic parenchymal cells in Erythropoietic Protoporphyria. An ultrastructural study of patients with and without overt liver disease and the effect of chenodeoxycholic acid treatment. *Hepatology* 11: 449-457.

- Salonpaa P, Krause K, Pelkonen O, Raunio H.(1995). Up-regulation of CYP2A5 expression by porphynogenic agents in mouse liver. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 351: 446-452.
- Schacter BA, Joseph E, Firneisz G. (1983). Effect of cholestasis produced by bile duct ligation on hepatic heme and hemoprotein metabolism in rats. *Gastroenterology* 84(2): 227-235.
- Shapiro SH, Wessely Z. (1984). Ultrastructural changes of intrahepatic bileductules in griseofulvin fed mice. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 14(1): 69-77.
- Sheen LY, Li CK, Sheu SF, Meng RH, Tsai SJ. (1996). Effect of the active principle of garlic (diallyl sulfide) on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. *Food. Chem. Toxicol.* 34: 971-972.
- Shimoyama T, Nonaka S. (1987). Biochemical Studies on griseofulvin- induced protoporphyria. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 514: 160-169.
- Shimoyama T, Nonaka S, Honda T, Murayama F, Ohgami T, Yoshida H. (1985). Biochemical studies of experimental porphyria. II. The influence of porphyrinogenic substances in mice treated with low concentrations of griseofulvin. *J. Dermatol.* 12(5): 416-420.
- Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos.Trans.R.Soc.Lond. B. Biol. Sci.* 311: 617-631.
- Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M. (1997). Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Lett.* 120(2): 195-201.
- Simmons TW, Jamall IS. (1988). Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes. Primacy of glutathione peroxidase. *Biochem. J.* 251: 913-917.
- Taketani S, Nakahashi Y, Osumi T, Tokunaga R. (1990). Molecular cloning, sequencing, and expression of mouse ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* 265: 19377-19380
- Tanaka K, Ohgami T, Nonaka S. (1993). Experimental murine protoporphyria induced by griseofulvin (GF): the relationship between hepatic porphyrin levels and liver function test values in mice treated with GF. *J. Dermatol.* 20(9): 545-553.
- Tenhunen R, Mustajoki P. (1998). Acute porphyria: Treatment with heme. *Semin. Liver Dis.* 18: 53-55.
- Tomaro ML, Batlle AM. (2002). Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34(3):216-220.
- Tomaro ML, Frydman J, Frydman RB. (1991). Heme oxygenase induction by CoCl<sub>2</sub>, Co-protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: evidence for oxidative stress involvement. *Arch. Biochem. Biophys.* 286(2): 610-617.
- Townsend D, Tew K. (2003). Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am. J. Pharmacogenomics.* 3(3):157-172.
- Tribble DI, Tak YA, Jones, DP. (1987). The patho-physiological significance of lipid peroxidative cell injury. *Hepatology* 7: 377-387.
- Tutois S, Montagutelli X, Da Silva V, Jouault H, Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, Guenet JL, Nordmann Y, Beuzard Y, Deybach JC . (1991). Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J. Clin. Invest.* 88(5): 1730-1736.

Wastl U, Rossmannith W, Lang M, Camus-Randon AM, Grasl-Kraupp., Bursch W, Schult-Hermann R. (1998). Expression of cytochrome P450 2A5 in preneoplastic and neoplastic mouse liver lesion. *Mol. Carcinog.* 22(4): 229-234.

Williams M., Simonet L. (1986). Effect of griseofulvin on enzymes associated with Phase I and II of drug metabolizing. *Biochem. Pharmacol.* 35: 2630-2632.

Wohaieb S A, Godin DV. (1987). Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB Wistar) rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 2191-2195.

Wong LL. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 263-268.

## CAPÍTULO II

### ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE EL MODELO DE PROTOPORFIRIA

Los resultados de los estudios anteriores, han mostrado que la célula ha perdido la capacidad de su sistema para enfrentar el severo estrés oxidativo producido por la Gris, por ello ha sido de interés investigar la posibilidad del uso de diferentes antioxidantes para prevenir o revertir el daño hepático provocado con el antimicótico.

#### II.1. EFECTO DEL TROLOX, SELENIO Y ACIDO ASCORBICO

##### II.1.1 Introducción

El Se, cofactor de la GPx y de la Tiorredoxina Reductasa, puede proteger al ADN y otros componentes celulares frente al daño oxidativo (Schrauzer, 2000; Trueba *et al.*, 2004). La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) es el principal antioxidante encontrado en membranas (Brigelius-Flohé & Traber, 1999), la cual controla la formación de hidroperóxidos lipídicos a través de su función antioxidante (Cuzzorrea *et al.*, 2004). El Trolox (Tx) es un análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -tocoferol, la diferencia de solubilidad se debe al reemplazo de una cadena fitol por un grupo carboxilo (Poljšak & Raspor, 2007). Se ha demostrado que este compuesto, al igual que la vitamina E, posee acción antioxidante contra la peroxidación de lípidos (Mickle *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1991) y se ha sugerido su uso como un posible agente terapéutico para la prevención del daño tisular mediado por radicales libres en situaciones clínicas relevantes (Ko *et al.*, 1994).

La deficiencia de Se en animales produce una variedad de efectos adversos que son sorprendentemente similares a los observados en animales alimentados con dietas deficientes en vitamina E (Halliwell & Gutteridge, 1986). Estos efectos pueden ser revertidos administrando exceso de vitamina E y, viceversa, la deficiencia de esta vitamina puede ser revertida administrando Se (De Duve & Hayaishi, 1978; Diplock, 1981).

El ácido ascórbico (Asc) es considerado un poderoso agente antioxidante, capaz de capturar ROS y RNS. A pesar de ser una molécula hidrofílica interviene en la protección

de compuestos hidrofóbicos como los lípidos de membrana, a través de la cooperación con la vitamina E. El Asc está involucrado en la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol a partir del radical  $\alpha$ -tocoferilo (Carr & Frei, 1999; Kojo, 2004). De esta forma el poder antioxidante de la vitamina E se ve incrementado por la presencia de la vitamina C.

Por lo expuesto, se decidió evaluar el efecto de Tx, Se, Asc y las combinaciones Tx con Se y Tx con Asc en ratones tratados con Gris.

### **II.1.2 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo**

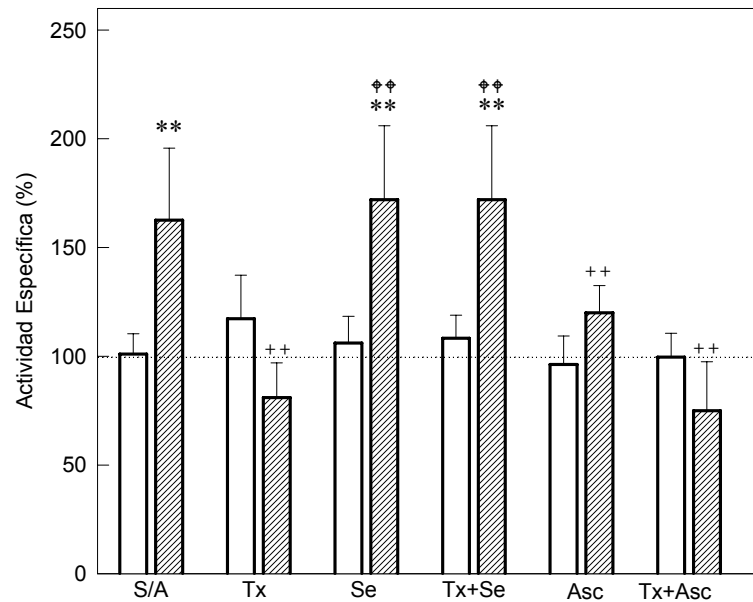
La Figura II.1 muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto del Tx, Se, Asc y las combinaciones Tx con Se y Tx con Asc sobre la actividad del ALA-S.

Cuando se administraron Tx, Se, Asc o la combinación Se más Tx o Asc más Tx a animales controles no se observaron diferencias significativas en la actividad de ALA-S con respecto a los niveles basales.

La administración de Se o Se más Tx, conjuntamente con Gris, no evitó la inducción del 60% ( $p < 0,01$ ) producida por la Gris. Cuando se suministró Asc junto con Gris, la actividad de ALA-S disminuyó un 25% ( $p < 0,01$ ) en relación al grupo que sólo recibió el antimicótico, mientras que Tx o Tx más Asc produjeron una caída del 50% ( $p < 0,01$ ) en dicha actividad enzimática, retornando entonces a los niveles basales.

En la Tabla II.1 se muestran los resultados obtenidos cuando se midió el contenido de PROTO IX hepático





**Figura II.1:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática del Ácido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa

Control  Gris , S/A: sin antioxidante

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) recibieron además Tx (2,0 mg/100ml), Se (0,01 mg/100ml), Asc (12 mg/ml), o las combinaciones Tx con Se y Tx con Asc, en el agua de bebida, durante 14 días. Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $0,144 \pm 0,019$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

**Tabla II.1.:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Acido Ascórbico sobre el nivel de PROTO IX en el hígado

		<b>Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)</b>				
<b>Gris</b>	<b>Sin antioxidante</b>	<b>Tx</b>	<b>Se</b>	<b>Tx + Se</b>	<b>Asc</b>	<b>Tx + Asc</b>
<b>sin</b>	0,42 ± 0,04	0,45 ± 0,06	0,43 ± 0,04	0,44 ± 0,07	0,41 ± 0,05	0,43 ± 0,04
<b>con</b>	20,32 ± 3,15 **	19,85 ± 2,28 ** ††	20,21 ± 3,18 ** ††	20,07 ± 3,06 ** ††	21,01 ± 3,51 ** ††	20,40 ± 3,24 ** ††

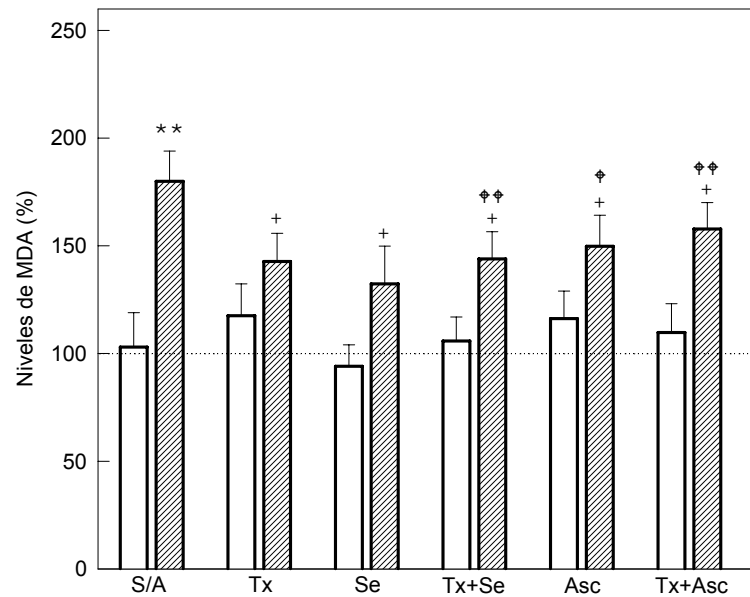
Los resultados se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto al grupo tratado con antioxidante: (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.1](#) y en Materiales y Métodos.

La administración de los antioxidantes solos, o en las combinaciones estudiadas, a animales controles no produjo diferencias significativas en el contenido de PROTO IX en el hígado. Cuando se los suministraron junto con Gris, el contenido de PROTO IX fue el mismo que el del grupo que sólo recibió Gris, en el cual los niveles fueron 50 veces mayor ( $p < 0,01$ ) que en el grupo control, es decir que tampoco tuvieron acción alguna.

### **II.1.3 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante**

En las [Figuras II.2, II.3, II.4, y II.5](#) se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto del Tx, Se, Asc y las combinaciones Tx con Se o Tx con Asc sobre los distintos parámetros del sistema de defensa antioxidante.

Los niveles de MDA en el grupo control no se modificaron por la administración de los compuestos mencionados. Cuando los animales recibieron Gris el aumento de la peroxidación lipídica fue del 80% ( $p < 0,01$ ) con respecto al grupo control. En tanto que el tratamiento conjunto de Gris con estos compuestos o sus combinaciones produjo una disminución entre el 18 y el 20% ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo que recibió sólo Gris. En ninguno de estos grupos se alcanzaron los niveles basales ([Figura II.2](#))

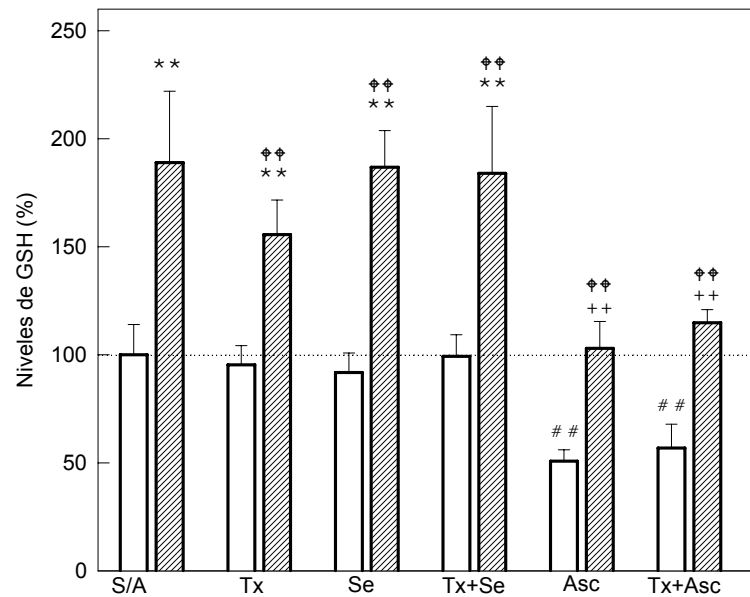


**Figura II.2:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre los niveles de Malondialdehído

Control  Gris  S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA del grupo control (---). Valor medio control  $4,22 \pm 0,07$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (+)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (♠)  $p < 0,05$  y (♠♠)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.1](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando se evaluó el efecto sobre el contenido de GSH en animales controles, el Asc sólo o en combinación con Tx produjeron una disminución de alrededor del 55% ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con Gris provocó un incremento del 90% ( $p < 0,01$ ) en el contenido de GSH hepático, que no se modificó por la administración de Tx, Se o la combinación de ambos. En los animales que recibieron Gris con Asc o Asc más Tx se observó una disminución del 50% ( $p < 0,01$ ), llegando a alcanzar los niveles basales pero manteniendo una diferencia significativa con respecto a sus respectivos controles ([Figura II.3](#)).

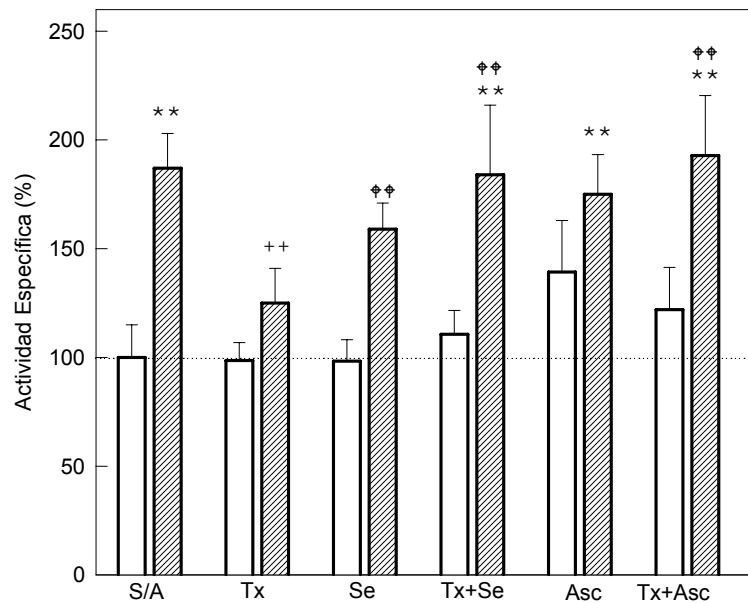


**Figura II.3:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre los niveles de Glutacion Reducido

Control  Gris , S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $24,43 \pm 3,42$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*).  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (@@)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.1](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de GRed no varió por la administración de los antioxidantes estudiados a animales controles. Cuando a los ratones se los trató con Gris la enzima se indujo un 87% ( $p < 0,01$ ). El Tx redujo un 33% ( $p < 0,01$ ) este aumento de actividad; no observándose variaciones significativas en las otras condiciones ([Figura II.4](#)).

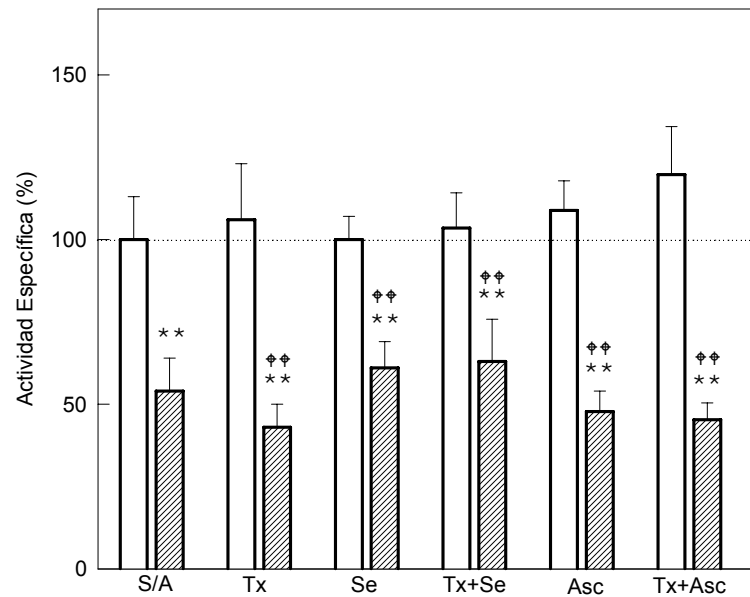


**Figura II.4:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática de la Glutathione Reductasa

Control Gris , S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $49,58 \pm 7,44$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (##)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.2](#) y en Materiales y Métodos.

Nuevamente la actividad de Catalasa no se modificó por la administración de los antioxidantes, solos o en las combinaciones estudiadas, a animales controles. Estos compuestos tampoco revirtieron la disminución del 46% ( $p < 0,01$ ) de la actividad enzimática producida por la Gris ([Figura II.5](#)).

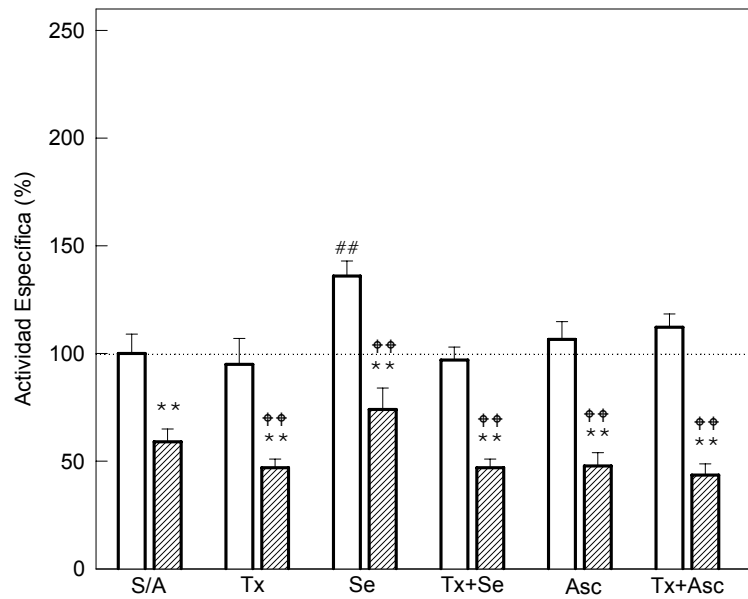


**Figura II.5:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática de la Catalasa

Control □ Gris ▨, S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $67,57 \pm 8,78 \mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*),  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (◆◆),  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.1](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando se evaluaron los efectos sobre la actividad de GPx, se observó que el Se suministrado a animales controles produjo un aumento del 36% ( $p < 0,01$ ) en dicha actividad. En los ratones que recibieron Tx, Se, Asc o las combinaciones Se más Tx y Asc más Tx junto con Gris, la actividad enzimática disminuyó alrededor del 40% ( $p < 0,01$ ) respecto al control, al igual que en el grupo que sólo recibió Gris ([Figura II.6](#)).

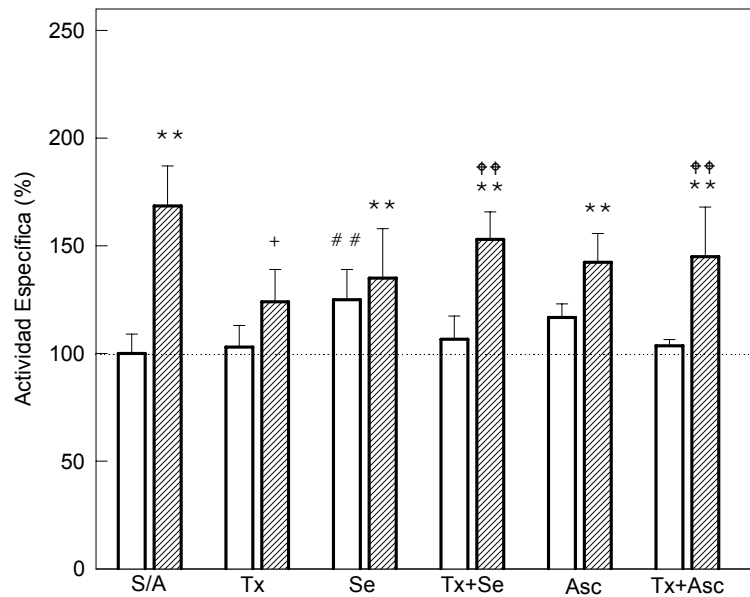


**Figura II.6:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática de la Glutathione Peroxidasa

Control Gris , S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $635,56 \pm 57,20$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*),  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (##),  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (ΦΦ),  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.1](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de la SOD aumentó únicamente cuando el grupo control recibió Se (20% ( $p < 0,05$ )). En los ratones que recibieron Gris se produjo una inducción de la actividad enzimática del 69% ( $p < 0,01$ ). Estos niveles se mantuvieron elevados cuando, junto con el antimicótico, se administraron Se, Asc, y la combinación de ambos con Tx. Por otro lado, el tratamiento conjunto de Gris y Tx produjo una disminución del 26% ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la SOD con respecto al grupo que sólo recibió Gris, logrando así alcanzar el nivel basal. ([Figura II.7](#))



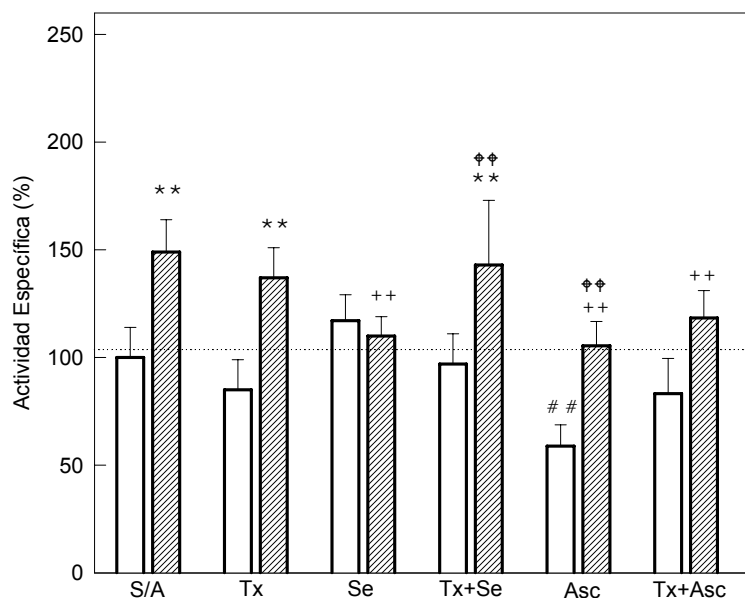
**Figura II.7:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa

Control  Gris , S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $86,89 \pm 7,82$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (+)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (##)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.2](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de GST disminuyó 40% ( $p < 0,01$ ) por efecto del Asc, no detectándose alteraciones por la administración de los otros compuestos estudiados. La Gris produjo una inducción de la actividad del 50% ( $p < 0,01$ ), que no fue afectada cuando se suministró Tx sólo o con Se junto con el antimicótico. Por el contrario, cuando se suministraron Se, Asc o Asc más Tx, junto con Gris, la actividad disminuyó alrededor del 27 ( $p < 0,01$ ) con respecto a los animales que sólo recibieron el antifúngico, alcanzando de esta forma, los niveles basales de actividad enzimática ([Figura II.8](#))





**Figura II.8:** Efecto de los antioxidantes Trolox, Selenio y Ácido Ascórbico sobre la actividad enzimática de la Glutathione-S-Transferasa

Control Gris , S/A: sin antioxidante

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $40,19 \pm 5,63$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y antioxidante respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (ΦΦ)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.2](#) y en Materiales y Métodos.

### II.1.3 Conclusiones

La administración de Se simultáneamente con Gris no tuvo efecto sobre la inducción de ALA-S y la gran acumulación de PROTO IX en el hígado producida por el antimicótico. Los niveles de GSH y la actividad de GRed se mantuvieron dentro de los valores de los animales tratados sólo con Gris, aunque la actividad de GPx fue ligeramente mayor que la observada en los animales tratados sólo con el antimicótico. El Se produjo una disminución parcial de la peroxidación lipídica producida por la Gris, mientras que la

actividad de la SOD no se modificó significativamente con respecto al grupo que sólo recibió el antimicótico; en cambio la actividad de GST se mantuvo dentro de los valores controles.

El suplemento de Tx a la dieta de animales tratados con Gris revirtió completamente la inducción del ALA-S provocada por el antimicótico, aunque no modificó el contenido de PROTO IX acumulada en el hígado por la Gris. Los niveles de MDA disminuyeron significativamente, aunque sin llegar al valor control, por lo tanto la peroxidación lipídica producida por la Gris se impidió solo parcialmente por el Tx. Los niveles de GSH se mantuvieron elevados, mientras que la actividad de la GRed y de la SOD disminuyeron significativamente. La actividad de GPx se mantuvo en los valores observados en el grupo que sólo recibió el antimicótico.

La administración de Se más Tx simultáneamente con Gris no modificó las alteraciones en la actividad de ALA-S y la acumulación de porfirinas hepáticas causado por la Gris. Si bien esta combinación redujo ligeramente la peroxidación lipídica producida por el antimicótico, no produjo modificaciones sobre los niveles de GSH y las actividades de GST y de las enzimas del sistema antioxidante.

Se ha demostrado la habilidad del Tx para proteger a la célula contra el daño inducido por oxidantes y su acción como agente citoprotector (Wu *et al.*, 1990). El mecanismo de protección que ejerce este compuesto involucra el secuestro de radicales libres derivados del oxígeno generados en los lípidos de la membrana celular, presumiblemente, de manera similar al modo de acción del  $\alpha$ -tocoferol (Burton *et al.*, 1981), a pesar de las diferencias de solubilidad en fase entre ambos compuestos. Gerez *et al.* (1997) demostraron que el  $\alpha$ -tocoferol es capaz de revertir la inducción de ALA-S y GST producida por agentes hepatocarcinogénicos.

El Asc, sólo o combinado con Tx, contrarrestó el aumento de la actividad del ALA-S producido por la Gris; aunque la cantidad de PROTO IX acumulada en el hígado se mantuvo elevada. Este compuesto fue efectivo en la protección de los lípidos contra la peroxidación inducida por la Gris, mantuvo incrementadas las actividades de la GRed y SOD, aunque los niveles de GSH y la actividad de GST estuvieron dentro de los valores controles.

## II.2. EFECTO DE LA MELATONINA

### II.2.1 Introducción

La Mel es un conocido antioxidante y secuestrante de radicales libres y efectivo agente protector de numerosas patologías experimentales (Reiter, 1998a y 1999; Ng *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2000). Se ha observado que la melatonina es un efectivo secuestrante de radicales oxhidrilo y radicales peróxido generados durante la oxidación de lípidos insaturados. Además, puede estimular la actividad de algunas enzimas antioxidantes como SOD, GPx y GRed (Reiter *et al.*, 1997<sup>a</sup>, 2000). Estas funciones están favorecidas por la facilidad con que atraviesa las barreras morfofisiológicas y penetra en las células y en los compartimientos subcelulares (Reiter *et al.*, 1997b, 2000).

Por lo tanto, era de esperar que la administración de Mel resultara beneficiosa para el tratamiento de la sintomatología hepática de pacientes con PPE.

Se decidió investigar la capacidad de la Mel para revertir y/o prevenir el daño hepático causado por la intoxicación con Gris. Se estudiaron dos vías diferentes de administración de Mel: oral y vía i.p.

### II.2.2 Administración de la Melatonina Vía Oral

Para estudiar el efecto de la Mel, a un grupo de animales se les administró Mel en el agua de bebida, 10mg/100ml, durante la segunda semana de intoxicación con Gris y a otro grupo 20mg/100ml del antioxidante durante las dos semanas de tratamiento con Gris.

En la Tabla II.3 se muestran los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de la Melatonina vía oral sobre el metabolismo del hemo y el sistema de defensa antioxidante

La administración de Mel vía oral a animales controles no produjo variaciones significativas en ninguno de los parámetros medidos.

Cuando la Mel se suministró conjuntamente con la Gris, no se modificaron ninguna de las alteraciones causadas por el antimicótico, ya sea sobre el metabolismo del hemo o sobre el sistema antioxidante.

**Tabla II.3:** *Prevención y/o reversión por Melatonina del efecto inducido por Gris sobre el metabolismo del hemo y el sistema de defensa antioxidante.*

	CONTROL	Gris	MEL 7 días (10mg/100ml)	Gris + MEL 7 días (10mg/100ml)	MEL 14 días (20mg/100ml)	Gris + MEL 14 días (20mg/100ml)
<b>ALA-S</b> (Act. Esp. (%))	100.04 ± 15.70	162,62 ± 32,09**	109,77 ± 22,38	168,14 ± 22,50	104,45 ± 14,8	171,29 ± 46,75
<b>PROTO IX.</b> (ng/mg)	0,041 ± 0,06	21,30 ± 4,17**	0,040 ± 0,04	20,43 ± 3,98	0,042 ± 0,05	22,05 ± 4,21
<b>GSH</b> (niveles %)	107.91 ± 23.97	165.04 ± 48.71**	107,37 ± 25,45	185,60 ± 33,30	102,72 ± 22,66	149,51 ± 28,30
<b>Catalasa</b> (Act. Esp. (%))	100.00 ± 7,81	65,72 ± 13.00**	101,96 ± 14,97	66,39 ± 9,88	25,37 ± 8,00	55,90 ± 16,50
<b>GRed</b> (Act. Esp. (%))	101.17 ± 16.94	155.31 ± 79.55**	115,17 ± 27,10	168,98 ± 17,04	105,79 ± 20,98	154,77 ± 16,90
<b>GPx</b> (Act. Esp. (%))	99.95 ± 6.51	62.15 ± 8.95**	95,50 ± 8,36	65,52 ± 7,26	95,56 ± 9,62	76,06 ± 8,94
<b>GST</b> (Act. Esp. (%))	99.99 ± 9.21	135.72 ± 14.51**	82,90 ± 5,27	133,57 ± 5,68	106,02 ± 16 60	129,46 ± 19,64

Los resultados se expresan como porcentaje ± DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

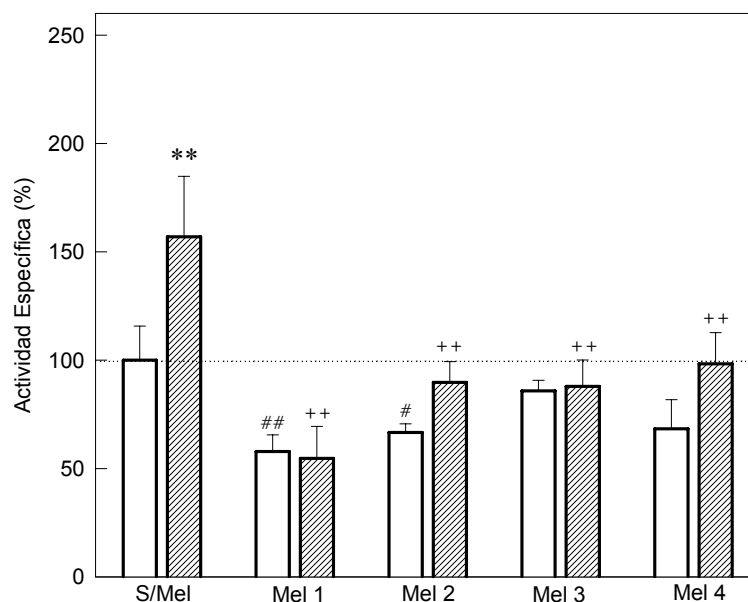
En conclusión, no se observaron efectos beneficiosos por el tratamiento con Mel, administrada vía oral, en los animales que recibieron Gris.

### II.2.3 Administración vía intra peritoneal de la Melatonina

En los estudios anteriores se llegó a la conclusión de que la Mel, administrada en forma oral, no sería capaz de modificar el cuadro de estrés oxidativo producido por la intoxicación con Gris. Se decidió, entonces, estudiar si la administración vía i.p. del antioxidante podría tener la capacidad de evitar el daño hepático que produce la Gris. Para ello a animales intoxicados con Gris durante 14 días se les administró, vía i.p., de 1 a 4 dosis de Mel (5mg/kg), 1, 24, 48, y 72 horas antes del sacrificio.

### II.2.3.1 Efecto sobre el Camino Biosintético del Hemo

En la [Figura II.9](#) se muestran los resultados obtenidos cuando se midió la actividad del ALA-S.



**Figura II.9.: Efecto de la Melatonina sobre la actividad enzimática del Ácido  $\delta$ -Aminolevúlico Sintetasa**

Control  Gris  S/Mel: sin Melatonina

Los animales recibieron Gris (2,5 % p/p) en la dieta durante 15 días y una (Mel 1), dos (Mel 2), tres (Mel 3) y cuatro (Mel 4) inyecciones de vía i.p. de Melatonina (5 mg/kg). Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control. Valor medio control  $0,122 \pm 0,019$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con antioxidante con respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$  y (###)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Mel con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con Mel: (◆◆)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La administración de 1 y 2 dosis de Mel a animales controles disminuyó la actividad de la enzima alrededor de un 40% ( $p < 0,01$ ), mientras que con 3 y 4 dosis la actividad se mantuvo dentro de los niveles basales.

El tratamiento con Gris produjo en los ratones un incremento del 50% ( $p < 0,01$ ) en la actividad del ALA-S. En los animales que recibieron una dosis de Mel junto con Gris la

actividad de la enzima fue 65% ( $p < 0,01$ ) menor respecto del grupo tratado sólo con Gris, siendo los niveles de actividad similares a los observados en el grupo que recibió sólo Mel. Cuando los animales tratados con Gris recibieron de 2 a 4 dosis de Mel, la actividad de ALA-S retornó a los niveles basales.

En la [Tabla II.2](#) se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de 1, 2, 3 y 4 dosis de Mel vía i.p. sobre los niveles de PROTO IX acumulada en el hígado de los ratones

**Tabla II.2: Efecto de la Melatonina sobre el nivel de PROTO IX en el hígado**

	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)				
Gris	Sin Mel	Mel 1	Mel 2	Mel 3	Mel 4
Sin	0,42 ± 0,06	0,40 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,04	0,44 ± 0,03
Con	23,50 ± 4,41 **	29,59 ± 5,78 ** ☐☐	30,13 ± 8,15 ** ☐☐	18,77 ± 2,57 ** ☐☐	17,88 ± 3,78 ** ☐☐

Los resultados se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Mel con respecto al grupo tratado con Mel: (☐☐)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.9](#) y en Materiales y Métodos.

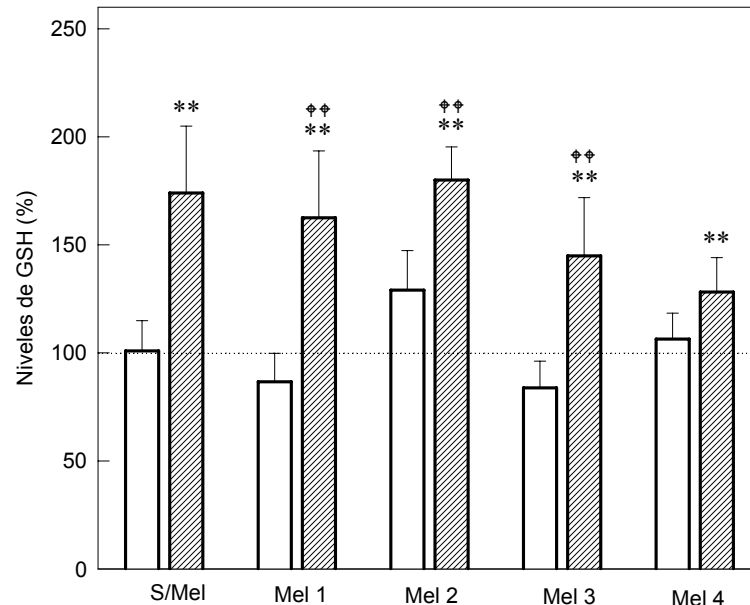
Cuando se administró Mel a animales controles no se produjeron diferencias significativas en la cantidad de PROTO IX. Mientras que en los animales tratados con Gris y Gris más Mel el contenido de PROTO IX superó entre 43 a 73 veces ( $p < 0,01$ ) al del grupo control.

### II.2.3.2 Efecto sobre el Sistema de Defensa Antioxidante

En las [Figuras II.10, II.11, II.12, II.13 y II.14](#) se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la Mel vía i.p. sobre distintos parámetros del sistema de defensa antioxidante.

La administración de las distintas dosis estudiadas de Mel a animales controles no produjo diferencias significativas en ninguno de los índices de estrés oxidativo medidos ([Figuras II.10 a II.14](#)).

El aumento en los niveles de GSH producido por Gris (74% ( $p<0,01$ )) no se alteró por la administración de Mel (Figura II.10).

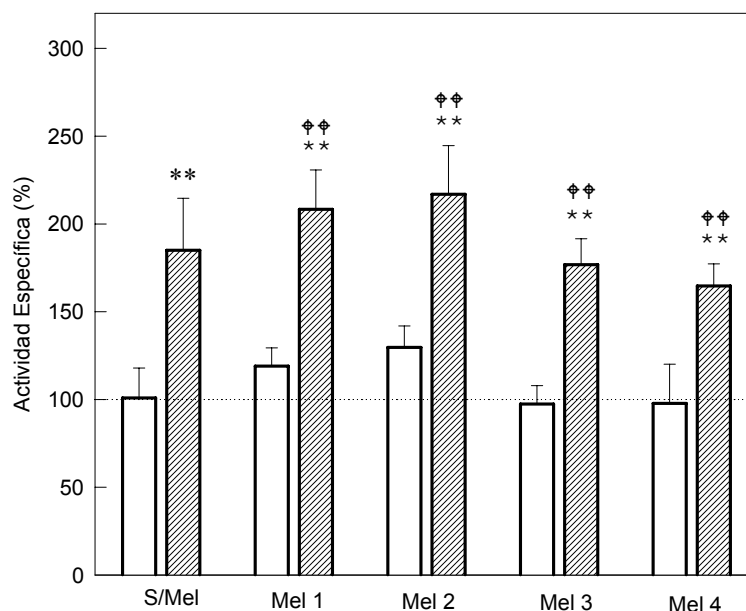


**Figura II.10.: Efecto de la Melatonina sobre los niveles de Glutation Reducido**

Control  Gris  , S/Mel: sin Melatonina

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $24,37 \pm 3,40$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con Mel: (††)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura II.9 en Materiales y Métodos.

La actividad de GRed que se encontraba inducida (85%,  $p<0,01$ ) en presencia de Gris, tampoco varió por el tratamiento con las distintas dosis de Mel (Figura II.11)



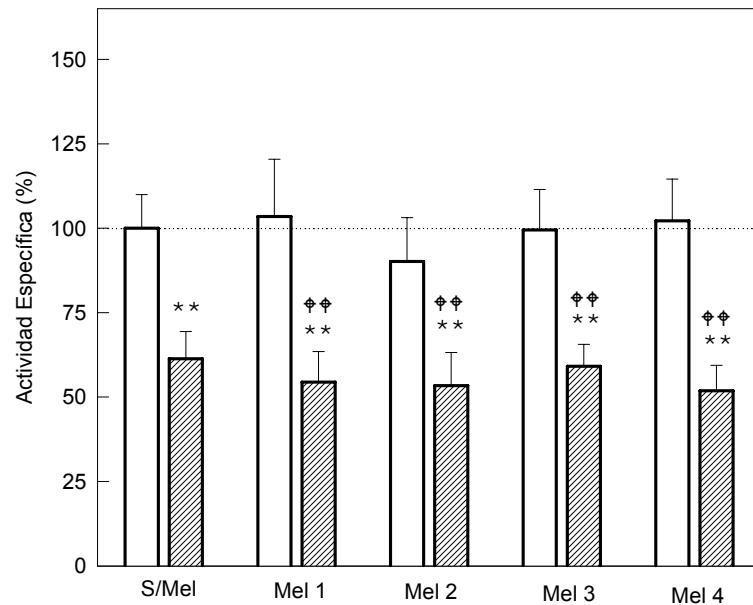
**Figura II.11.: Efecto de la Melatonina sobre a actividad enzimática de la Glutathion Reductasa**

Control  Gris , S/Mel: sin Melatonina

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $37,24 \pm 6,33$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (◆◆)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura II.9](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando se midió la actividad de la Catalasa, ninguna de las dosis de Mel estudiadas pudo revertir la disminución del 40% ( $p < 0,01$ ) que produjo el antimicótico ([Figura II.12](#)).



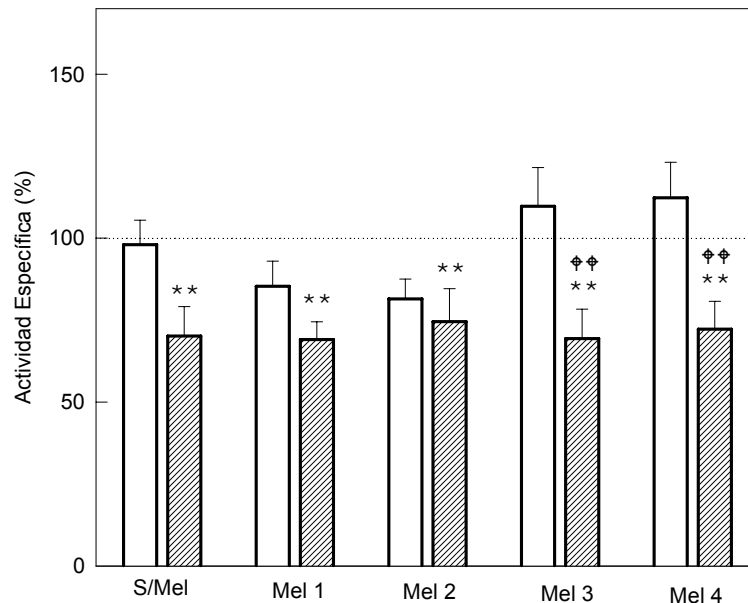


**Figura II.12.: Efecto de la Melatonina sobre a actividad enzimática de la Catalasa**

Control  Gris  S/Mel: sin Melatonina

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $85,77 \pm 8,49$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con Mel: (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura II.9](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de GPx, disminuida 30% ( $p < 0,01$ ) por la Gris, no fue revertida por la administración de Mel en ninguna de las dosis estudiadas ([Figura II.13](#)).

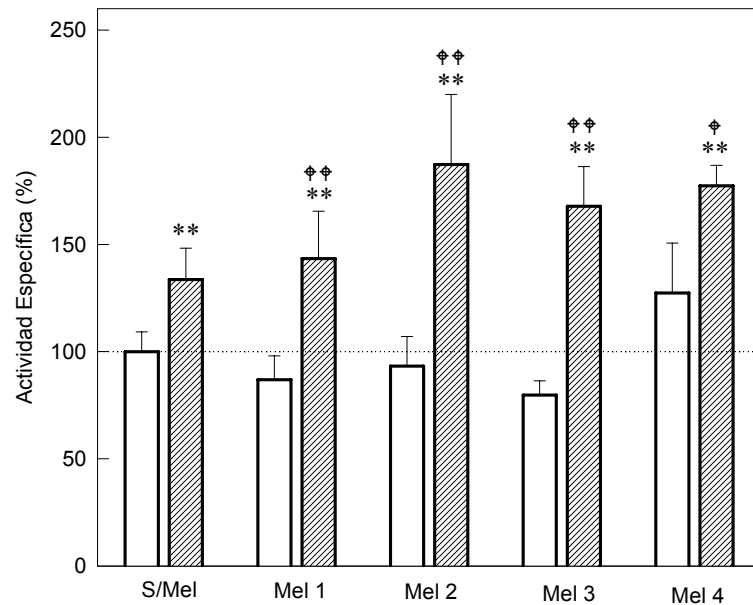


**Figura II.13:** Efecto de la Melatonina sobre a actividad enzimática de la Glutathione Peroxidasa

Control  Gris , S/Mel: sin Melatonina

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $620,84 \pm 46,38$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con Mel: (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura II.9](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de la GST, inducida por la Gris (35%,  $p < 0,01$ ), tampoco se modificó por la administración de Mel ([Figura II.14](#)).



**Figura II.14.: Efecto de la Melatonina sobre a actividad enzimática de la Glutation-S-Transferasa**

Control Gris S/Mel: sin Melatonina

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $45,67 \pm 4,21$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Mel respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Mel respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (Φ)  $p < 0,05$  y (ΦΦ)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura II.9](#) y en [Materiales y Métodos](#).

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la Mel no reduciría el efecto de la Gris sobre la inhibición de la biosíntesis del hemo. No se evidenció una alteración en las enzimas antioxidantes que indique un restablecimiento del equilibrio entre el estrés oxidativo producido por la intoxicación y la defensa antioxidante por parte de las células. Por lo tanto, la administración de MEL vía i.p. no logró revertir el severo daño oxidativo inducido por Gris.

## II.2.4 Conclusiones

Se estudió la capacidad de Mel para prevenir y/o revertir el daño hepático producido por la acumulación de porfirinas.

La Mel *per se* no produjo modificaciones ni en el camino del hemo ni en las enzimas antioxidantes independientemente de la vía de administración.

La administración i.p. de la hormona a ratones intoxicados con Gris no revirtió la acumulación de PROTO IX en el hígado. Si bien la actividad de ALA-S inducida por Gris se redujo cuando la Mel se suministró vía i.p., 1 hora antes del sacrificio de los animales, no se modificó al aumentar la dosis ni con la administración vía oral de la hormona.

En los ratones intoxicados que recibieron la hormona los niveles de GSH hepático no se redujeron; ni se observaron variaciones significativas en la actividad de las enzimas GRed, Catalasa, Gpx y GST.

Si bien diversas publicaciones indican que la Mel es un potente secuestrante de radicales libres y un antioxidante (Reiter, 1998a; Hardeland *et al.*, 2003; Hardeland & Pandi-Perumal, 2005; Tan *et al.*, 2007), en este estudio no se comprobó una modificación sustancial de la actividad de las enzimas antioxidantes que puedan hacer suponer que la Mel sea capaz de restablecer el mecanismo de defensa antioxidante de la célula, en ratones intoxicados, ni ejercer un efecto protector contra el daño inducido por la Gris.

## II.3. PROTECCIÓN POR POLIFENOLES

### II.3.1 Introducción

Los polifenoles son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y están generalmente involucrados en su defensa contra la radiación UV o la agresión por patógenos (Manach *et al.*, 2004).

Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que estos compuestos, presentes en ciertas frutas y verduras, poseen propiedades antioxidantes incluyendo el secuestro de ROS e inhibición de la peroxidación lipídica, exhibiendo además, efectos anticancerinogénicos, antimutagénicos, antibacteriales, antivirales y antiinflamatorios (Chen *et al.*, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006).

Los polifenoles son los antioxidantes que se consumen en mayor cantidad, aproximadamente 1 g/día (Scalbert et al. 2005). Los más abundantes en las plantas son los ácidos fenólicos, flavonoides estilbenos y lignanos; de los cuales los flavonoides y los ácidos fenólicos representan el 60% y el 30% respectivamente, del total de los polifenoles incorporados en la dieta.

Los derivados de los ácidos fenólicos más abundantes en las plantas son los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.

El contenido de ácidos hidroxibenzoicos en las plantas comestibles es generalmente muy bajo, a excepción de ciertas frutas y vegetales como los rábanos y las cebollas. Un representante de este grupo es el ácido Gálico, cuya fuente más importante es el té.

Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos, entre ellos se encuentran principalmente los ácidos Cafeico, Ferúlico y Clorogénico (formado por la combinación de los ácidos Cafeico y Quínico).

El ácido Cafeico, libre o esterificado, es el más abundante de los ácidos fenólicos y representa entre el 75% y el 100% del contenido total de ácidos hidroxicinámicos de la mayoría de las frutas.

El ácido ferúlico es un ácido fenólico que se encuentra en mayor cantidad en los granos de cereal, donde representa el 90% del total de los polifenoles (Sosulski *et al.*, 1982; Lempereur *et al.*, 1997).

El ácido Clorogénico se encuentra en muchos tipos de frutas como arándano, kiwis, ciruelas, frambuesas y manzanas; también existe en elevada concentración en el café (Clifford, 1999).

Los flavonoles son los más ubicuos de los flavonoides en los alimentos, uno de sus principales representantes es la Quercetina. Las fuentes más ricas en este compuesto son cebolla puerro, brócoli y arándanos. El vino tinto y el té también contienen grandes cantidades de este polifenol.

El ácido Elágico es otro compuesto flavonoide cuya fuente principal son las nueces y frutas como uvas, fresas, frutillas, frambuesas, zarzamoras y arándanos.

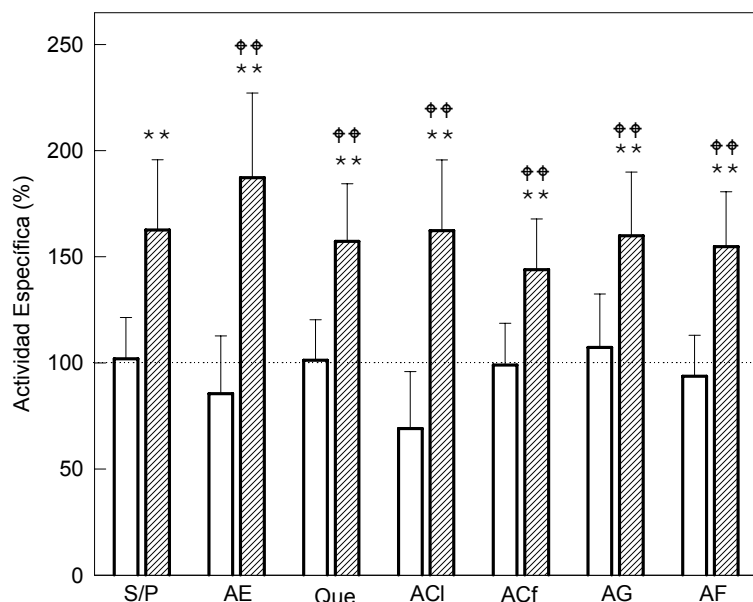
Con el objeto de estudiar la acción de algunos polifenoles vegetales sobre el estrés oxidativo inducido en ratones por la Gris, se investigó el efecto de la Quercetina y los ácidos Elágico, Clorogénico, Cafeico, Gálico y Ferúlico.

### II.3.2 Efectos sobre la Ruta Biosintética del Hemo

En la [Figura II.15](#) y en la [Tabla II.4](#) se muestran los resultados obtenidos cuando se evaluó el efecto de los polifenoles indicados sobre la actividad de ALA-S y los niveles de PROTO IX en el hígado respectivamente.

Ninguno de los polifenoles estudiados modificaron la actividad de ALA-S ni la cantidad de PROTO IX en los animales controles ([Figura II.15](#), [Tabla II.4](#)).

Los compuestos estudiados no evitaron tampoco, la inducción del 60% ( $p<0,01$ ) en la actividad de ALA-S producida por la Gris ([Figura II.15](#)).



**Figura II.15:** Efecto de los polifenoles sobre la actividad del Ácido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa

Control  Gris  S/P: sin polifenol

Los animales recibieron en el agua de bebida: Acido Elágico (AE) (300mg/l), Quercetina (Que) (50mg/l), Acido Clorogénico (ACI) (50mg/l), Acido Cafeico (ACf) (650mg/l), Acido Gálico (AG) (50mg/l) ó Acido Ferúlico (AF) (60mg/l) y en la dieta: alimento estándar o suplementado con Gris (0,5% p/p) sola o más uno de los polifenoles, durante 14 días. Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $0,143 \pm 0,027$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (ΦΦ)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

**Tabla II.4:** Efecto de los polifenoles sobre el nivel de PROTO IX en hígado

		Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)					
Gris	Sin antioxidante	AE	Que	ACI	ACf	AG	AF
sin	0,42±0,04	0,45±0,01	0,41±0,03	0,44±0,03	0,47±0,05	0,36±0,04	0,48±0,03
con	20,37±3,46 **	22,63±4,21 **☐☐	18,62±3,84 **☐☐	19,76±4,02 **☐☐	24,16±5,20 **☐☐	19,57±3,65 **☐☐	21,96±3,98 **☐☐

Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más antioxidante respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto al grupo tratado con antioxidante: (☐☐)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en en la leyenda de la [Figura II.13](#) y en Materiales y Métodos.

El tratamiento con Gris sola o combinada con los polifenoles produjo un nivel de PROTO IX acumulada 50 veces ( $p < 0,01$ ) superior al de los animales controles ([Tabla II.4](#)).

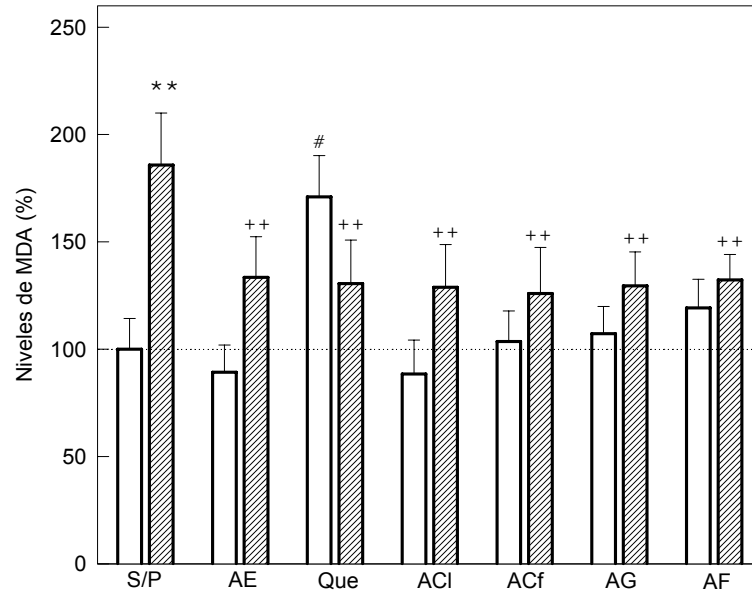
### II.3.3 Efecto de los Polifenoles sobre el Sistema de Defensa Antioxidante

En el Capítulo I demostramos que el pool de hemo y los niveles de Catalasa y GPx están muy disminuidos en los ratones tratados con Gris y atribuimos dicha reducción de las actividades enzimáticas a una síntesis disminuida de las hemoproteínas. También observamos que antioxidantes como Tx, Se, Asc y Mel no fueron capaces de revertir el efecto de la Gris sobre la actividad de estas dos enzimas ni sobre la biosíntesis del hemo. Dado que ninguno de los polifenoles estudiados modificaron las alteraciones producidas por la Gris sobre el camino biosintético del hemo, decidimos no evaluar las actividades enzimáticas de Catalasa y GPx en los siguientes estudios.

En las [Figuras II.16, II.17, II.18, II.19 y II.20](#) se representaron los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de Quercetina, y los ácidos Elálgico, Clorogénico, Cafeico, Gálico y Ferúlico sobre los niveles hepáticos de MDA y de GSH y de las actividades de GRed, SOD y GST, respectivamente.

Los niveles de MDA, en los animales controles, aumentaron 70% ( $p < 0,05$ ) por acción de la Quercetina mientras que no variaron por acción de los otros compuestos. Todos los polifenoles administrados junto con Gris provocaron una disminución del 30%

( $p < 0,01$ ) de los niveles alcanzados por el antimicótico, pero sin llegar a los niveles basales. (Figura II.16).



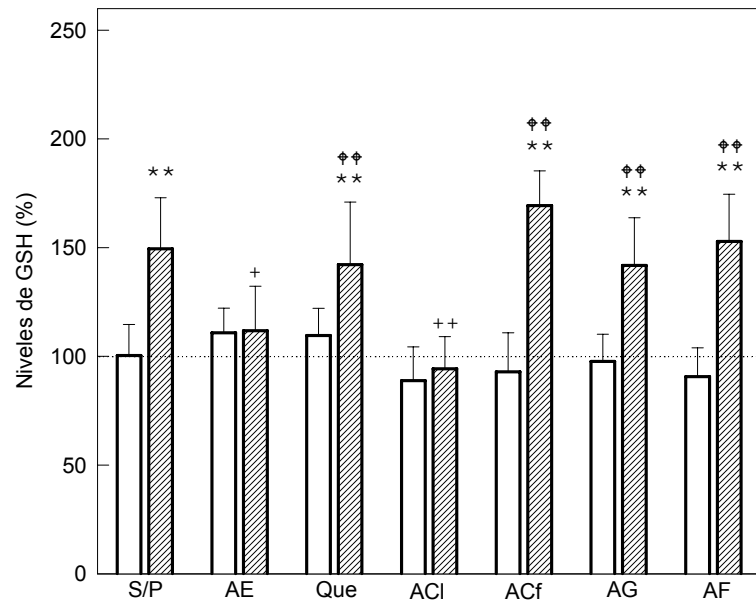
**Figura II.16:** Efecto de los polifenoles sobre los niveles de Malondialdehído

Control Gris S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA del grupo control (---). Valor medio control  $5,099 \pm 0,073$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con polifenol respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo que recibió sólo Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (◆◆)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura II.15 y en Materiales y Métodos.

Los niveles de GSH no se modificaron cuando se suministraron los polifenoles a ratones controles. El tratamiento con Gris, sola o combinada con Quercetina, o los ácidos Cafeico, Ferúlico y Gálico, produjo un aumento del 50% ( $p < 0,01$ ) en el contenido de GSH hepático. En cambio, tanto el ácido Elágico como el ácido Clorogénico mantuvieron los niveles del tripéptido dentro de los valores basales, revirtiendo así el efecto de la Gris (Figura II.17).



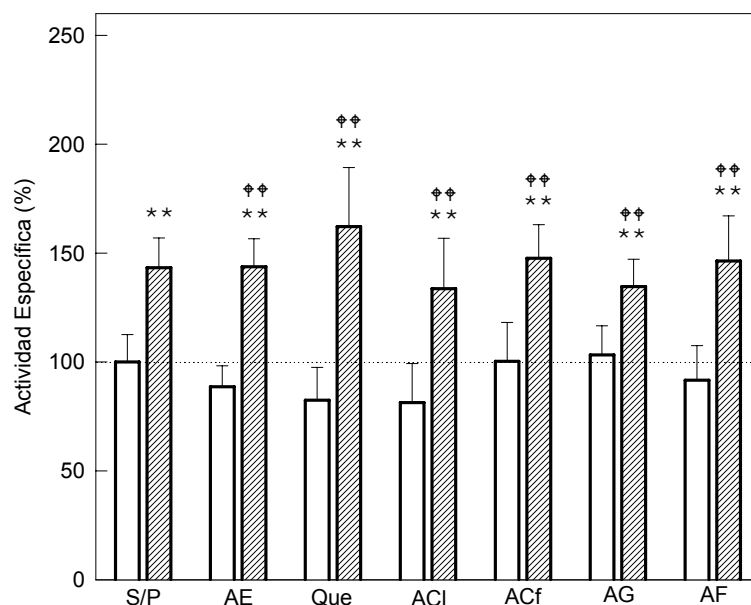


**Figura II.17:** Efecto de los polifenoles sobre los niveles de Glutathion Reducido

Control  Gris  S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $25,42 \pm 3,64$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo que recibió sólo Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.15](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de GRed no se modificó en el grupo control debido a los polifenoles. La administración de los antioxidantes tampoco evitó la inducción del 40% ( $p < 0,01$ ) que produjo la Gris ([Figura II.18](#))

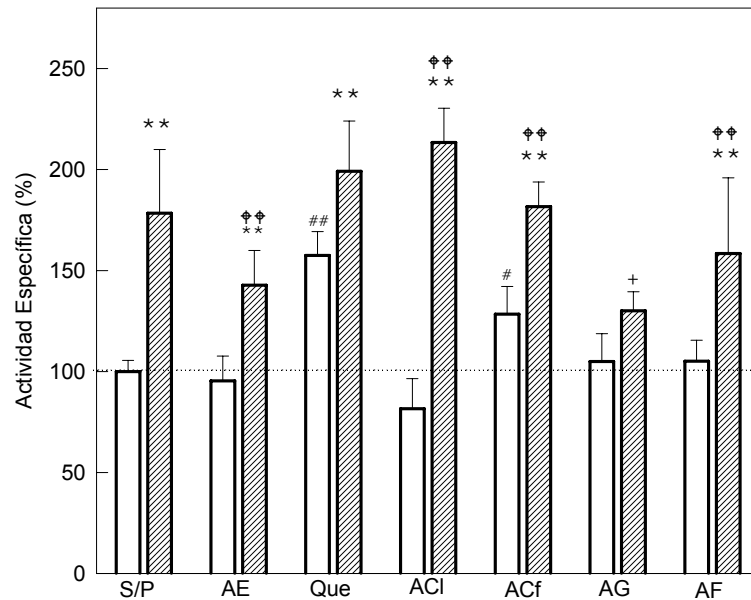


**Figura II.18:** Efecto de los polifenoles sobre los niveles la actividad enzimática de la Glutathione Reductasa

Control  Gris  S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $43,76 \pm 5,53$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (ΦΦ)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.15](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de SOD aumentó 57% ( $p < 0,01$ ) y 28% ( $p < 0,05$ ), en el grupo control, por la acción de la Quercetina y el ácido Cafeico, respectivamente, mientras que no se produjeron variaciones por la administración de los otros ácidos ensayados. La Quercetina, y los ácidos Elágico, Cafeico y Ferúlico no evitaron el aumento del 80% ( $p < 0,01$ ) en la actividad enzimática que produjo la Gris; en cambio en el grupo que recibió ácido Gálico más Gris, la actividad de la SOD disminuyó 30% ( $p < 0,01$ ) con respecto al grupo que sólo recibió el antimicótico. Por otro lado, en los animales tratados con ácido Clorogénico y Gris la actividad se incrementó en un 17% ( $p < 0,05$ ) en relación al grupo que recibió sólo el antifúngico. ([Figura II.19](#)).

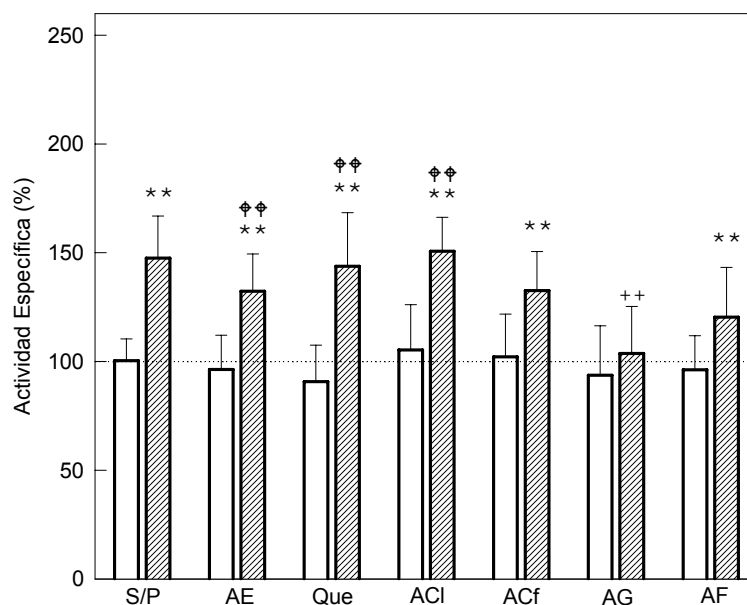


**Figura II.19:** Efecto de los polifenoles sobre la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa

Control  Gris  S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $85,43 \pm 4,69$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con polifenol respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo que recibió sólo Gris: (+)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.15](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de GST no varió en el grupo control por la administración de los polifenoles. Cuando estos compuestos se suministraron junto con Gris se produjo una inducción de la actividad enzimática de alrededor del 50% ( $p < 0,01$ ), similar a la que se observó en el grupo que recibió sólo el antimicótico, a excepción del ácido gálico que revirtió la actividad del nivel basal. ([Figura II.20](#)).



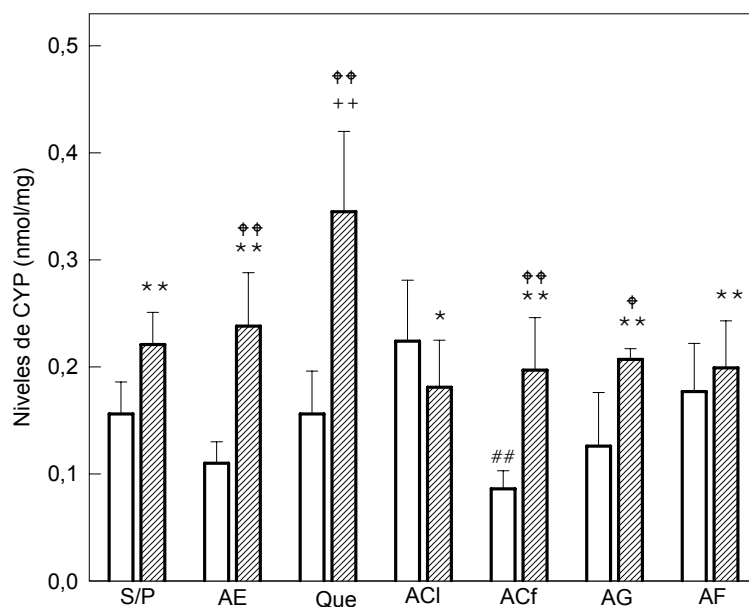
**Figura II.20:** Efecto de los polifenoles sobre los niveles la actividad enzimática de la Glutathione-S-Transferasa

Control Gris S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $44,27 \pm 4,40$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*). Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo que recibió sólo Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura II.15](#) y en Materiales y Métodos.

### II.3.4 Efecto de los Polifenoles sobre el Sistema Metabolizante de Drogas de Fase I - Citocromo P450

En la [Figura II.21](#) se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de los polifenoles sobre el CYP.



**Figura II.21:** Efecto de los polifenoles sobre los niveles de Citocromo P450.

Control  Gris  S/P: sin polifenol

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  DE. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más polifenol respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,05$  y (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con polifenol respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo que recibió sólo Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y polifenol respecto del grupo tratado sólo con polifenol: (†)  $p < 0,05$  y (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura II.15 y en Materiales y Métodos.

Los niveles de CYP disminuyeron un 45% ( $p < 0,01$ ) en el grupo control por acción del ácido Cafeico. El tratamiento de Quercetina junto con Gris produjo un aumento del 56% ( $p < 0,01$ ) en el contenido de CYP con respecto al grupo que sólo recibió el antimicótico, mientras que el resto de los polifenoles no produjeron diferencias significativas.

### II.3.5 Conclusiones

Debido a que la Gris forma N-metil porfirinas que son las causantes de la inhibición de la Fe-Quel, se produjo la acumulación de porfirinas hepáticas y la concomitante inducción de la actividad de ALA-S en los animales que recibieron el antimicótico. Por lo tanto, era de esperar que los polifenoles no tuvieran un efecto protector sobre la inducción de la actividad de ALA-S y la acumulación de porfirinas hepáticas causadas por la Gris.

Tampoco se observó acción alguna de los antioxidantes estudiados sobre el daño hepático inducido por Gris. Aunque en algunos casos la actividad de GST fue menor que en los animales que recibieron solamente Gris, en los ratones que recibieron Gris más un polifenol la actividad enzimática fue mayor que la de los controles.

La administración de Gris, a través de la acumulación de porfirinas, induce la peroxidación de lípidos. Debido a que los polifenoles son agentes reductores, éstos serían capaces de proteger a las células contra la peroxidación lipídica. Por lo tanto, y de acuerdo a lo esperado, la peroxidación lipídica inducida por Gris fue prevenida por todos los polifenoles estudiados.

Diferentes investigaciones confirman la potente actividad de los compuestos estudiados sobre la peroxidación lipídica y el secuestro del radical  $H_2O_2$  (Tseng *et al.*, 1996; Raneva, *et al.*, 2001; Sroka & Cisowski, 2003).

Se ha descrito que el efecto protector de los flavonoides es dependiente de la estructura. Así, el secuestro de radicales libres por parte de estos compuestos depende de su capacidad de donar un hidrógeno, que puede producirse por la presencia de un grupo catecol en el anillo B, por la quelación del metal, evitando la catálisis de reacciones de ROS, y secuestrando RNOs vía nitración u oxidación dependiendo de su estructura. También se propuso la existencia de otros mecanismos de protección, no como antioxidantes, tales como unión a receptores o a moléculas señalizadoras, y la modulación de expresión de genes (Rice-Evans, 2004, Yao *et al.*, 2007)

Se ha sugerido que el consumo de Quercetina puede estabilizar las biomembranas en ratones, reducir la peroxidación lipídica y secuestrar radicales libres (Kawagoe & Nakagawa, 2000; Yao *et al.*, 2007). Además, aumenta la capacidad antioxidante en plasma (Serafini *et al.*, 1998), ejerce un efecto gastroprotector (Kahraman *et al.*, 2003) y hepatoprotector (Molina *et al.*, 2003). Debido a sus propiedades de donador de hidrógeno en

reacciones de secuestro (apagado) de ROS, tiene influencia en las vías de señalización (Yao *et al.*, 2007) e interacciona indirectamente con el sistema de defensa antioxidante endógeno (Chen *et al.*, 2005). El potente efecto hepatoprotector de los flavonoides está asociado a la inducción de HO-1 protegiendo de esta forma al hepatocito del estrés oxidativo (Yao *et al.*, 2007).

Los niveles hepáticos de GSH, aumentados por efecto de la Gris, revirtieron al valor control cuando los animales recibieron simultáneamente Gris y ácido Elálgico o ácido Clorogénico. Previamente habíamos demostrado que la actividad de GRed estaba muy aumentada en animales tratados con Gris en la dieta. También encontramos que el pool de hemo y los niveles de Catalasa y GPx estaban muy disminuidos, y atribuimos la reducción de estas actividades a una síntesis disminuida de hemoproteínas. Esto explicaría también el aumento en los niveles de GSH observado en estos animales. Por lo tanto, el efecto ejercido sobre los niveles de GSH por dichos ácidos no se debería a un aumento del consumo del tiol por la GPx, sino a otro mecanismo funcional que podría contribuir a la prevención de la peroxidación lipídica.

La actividad de SOD aumentó significativamente en todos los animales que recibieron Gris o Gris con polifenoles. Aunque los polifenoles pueden secuestrar radicales libres, estos resultados indicarían la incapacidad de estos compuestos para secuestrar los radicales superóxido generados como consecuencia de la administración del antimicótico.

Se sabe que los CYPs tienen función de oxidasas y juegan un rol clave en el metabolismo de sustratos endógenos hidrofóbicos (esteroles, prostaglandinas, ácidos grasos) y compuestos ajenos ingeridos, xenobióticos (ej. drogas, carcinógenos, compuestos alimenticios, polulantes) (Nebert & Dieter, 2000). Si bien los CYPs convierten xenobióticos en productos menos tóxicos, la reacción frecuentemente involucra la formación de intermediarios o permite la fuga de radicales libres capaces de causar toxicidad. Los polifenoles interaccionan con estas proteínas ya sea porque inducen la biosíntesis de algunos CYPs, modulan (inhiben o estimulan) la actividad enzimática o porque son metabolizados por ellos (Hodek *et al.*, 2002). En este trabajo se observó que la Quercetina fue el único de los compuestos estudiados que modificó el aumento de los niveles de CYP que produce la Gris, por lo que podríamos suponer que la metabolización del antimicótico podría estar afectada por el tratamiento con el flavonoide.

Debido a que el estrés oxidativo observado en animales tratados con Gris es inducido por las porfirinas acumuladas en el hígado tras la inhibición de la Fe-Quel y que

los polifenoles protegieron al hígado contra la peroxidación lipídica, pero no previenen otros daños oxidativos inducidos por las porfirinas; sería interesante evaluar si la administración simultánea de polifenoles y compuestos capaces de acelerar la excreción de porfirinas, como los ácidos biliares, podrían reducir el daño hepático observado en los animales tratados con Gris.

## **II.4 REFERENCIAS**

- Brigelius-Flohé R, Traber MG. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*3(10): 1145-1155.
- Burton GW, Ingold KU, Thompson KE. (1981). An improved procedure for the isolation of ghost membranes from human red blood cells. : *Lipids* 16(12): 946.
- Carr A., Frei B. (1999). Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *FASEB J.* 13: 1007–1024
- Chen JC , Ho FM, Pei-Dawn LC, Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee ST, Wu, WT, Lin WW. (2005). Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I $\kappa$ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 521: 9–20.
- Clifford MN. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*79: 362–372.
- Cuzzocrea S, Thiemermann C., Salvemini D. (2004). Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 11: 1147–1162.
- De Duve C, Hayaishi O. (1978). Tocopherol, oxygen and biomembranes. Elsevier Amsterdam, NL
- Diplock AT. (1981). Metabolic and functional defects in selenium deficiency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 294(1071): 105-117
- Gerez E, Vazquez E, Caballero F, Polo C, Batlle A. (1997). Altered heme pathway regulation and drug metabolizing enzyme system in a mouse model of hepatocarcinogenesis: effect of veronal. *Gen Pharmacol.* 29(4): 569-573
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1986). Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press; Oxford, UK.
- Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. (2003). Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiol. Int.* 20: 921–962.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR. (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab. (Lond).* 2: 1–15.
- Hodek P, Trefil P, Stiborová M. (2002). Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 139: 1-21.



- Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. (2003). The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 183: 133–142.
- Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. (2001). Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33(8): 735-753.
- Kawagoe M, Nakagawa K. (2000). Attenuation of luminol-amplified chemiluminescent intensity and lipid peroxidation in the livers of quercetin-fed mice. *Toxicol. Lett.* 114(1-3): 189-196.
- Ko KM, Yick PK, Poon MK, Ip SP. (1994). Prooxidant and antioxidant effects of Trolox on ferric ion-induced oxidation of erythrocyte membrane lipids. *Mol. Cell. Biochem.* 141(1): 65-70.
- Kojo S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11: 1041–1064.
- Lempereur I, Rouau X, Abecassis J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *J. Cereal Sci.* 25:103–110.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5):727-747.
- Mickle DA, Li RK, Weisel RD, Birnbaum PL, Wu TW, Jackowski G, Madonik MM, Burton GW, Ingold KU. (1989). Myocardial salvage with trolox and ascorbic acid for an acute evolving infarction. *Ann. Thorac. Surg.* 47(4): 553-557.
- Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. (2003). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1398–1402.
- Nebert DW, Dieter MZ. (2000). The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* 61: 124-135
- Ng TB, Liu F, and Zhao L. (2000). Antioxidative and free radical scavenging activities of pinealindoles. *J. Neural. Transm.* 107:1243–1251.
- Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sc. Nutr.* 46: 161-183.
- Poljšak B; Raspor P. (2007) The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *J Appl Toxicol.* En prensa
- Raneva V, Shimasaki H, Ishida Y, Ueta N, Niki E.. (2001). Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and caffeic acid in rat plasma. *Lipids* 36(10): 1111-1116.
- Reiter RJ. (1998a). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, *Prog. Neurobiol.* 56: 359–384.
- Reiter RJ. (1998b). Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect.* 11: 291–296.
- Reiter RJ. (1999). Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *Neuroendocrinol. Lett.* 10: 145–150.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. (1997a). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms (Review). *Horm. Metab. Res.* 29: 363-372.

- Reiter RJ, Tang L, García, JJ, Muñoz Hoyos A. (1997b). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60: 2255-2271.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J. Biomed. Sci.* 7:444–458.
- Rice-Evans C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic. Biol. Med.* 36(7): 827-828.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 215S–217S.
- Schrauzer GN. (2000). Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1864–1873.
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in human. *J. Nutr.* 128: 1003–1007.
- Sosulski F, Krygier K, Hogge L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *J. Agric. Food Chem.* 30: 337–340.
- Sroka Z, Cisowski W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 41(6):753-758
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?. *J. Pineal Res.* 42:28–42.
- Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A. (2004). Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Front. Biosci.* 9: 2029–2044.
- Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, Chu HY. (1996). Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 101(2): 137-148.
- Wu TW, Hashimoto N, Wu J, Carey D, Li RK, Mickle DA, Weisel RD. (1990). The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem. Cell. Biol.* 68(10): 1189-1194.
- Wu TW, Hashimoto N, Au JX, Wu J, Mickle DA, Carey D. (1991). Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology.* 13(3): 575-580.
- Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N. (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J. Hepatol.* 47(2): 253-261.

## CAPÍTULO III

### TRATAMIENTO CON ÁCIDOS BILIARES

#### III.1 INTRODUCCIÓN

La PROTO IX es una macro molécula tetrapirrólica, hidrofóbica, con una fuerte tendencia a formar agregados consigo misma; y dado que no es alterada enzimáticamente ni conjugada en el hígado (Bloomer, 1988), se elimina del organismo exclusivamente por la vía biliar, seguida por excreción fecal (Cox, 1997). El mecanismo responsable de la incorporación de PROTO IX a la bilis aún no está totalmente dilucidado, pero en este proceso de eliminación, la secreción canalicular parece ser el paso limitante de la velocidad (Avner & Berenson, 1982a).

En la protoporfiria humana, la mayor parte del exceso de PROTO IX se produce en los eritrocitos. En algunos pacientes, cantidades variables del total de porfirinas acumuladas pueden pasar al hígado y ocasionar desórdenes en la síntesis hepática de hemo (Scholnick *et al.*, 1971; Lamon *et al.*, 1980; Poh-Fitzpatrick *et al.*, 1983). La PROTO IX de ambas fuentes se excreta por la ruta hepatobiliar-fecal y puede pasar a la recirculación enterohepática (Ibrahim & Watson, 1968). La entrada de PROTO IX al hígado no es saturable; cuando su excreción por la bilis no llega a eliminar el exceso producido en la médula ósea y en el hígado se acumula en los hepatocitos.

Los pacientes con PPE son susceptibles a desarrollar colelitiasis temprana (Cripps & Scheuer, 1965). Los depósitos hepáticos de PROTO IX causan fibrosis portal y cirrosis, que pueden eventualmente conducir a la falla hepática (Wagner *et al.*, 1989; Frank & Doss, 1995) y, en condiciones extremas, a la necesidad de un trasplante de hígado (Polson *et al.*, 1988; Bloomer *et al.*, 1989; Shehade *et al.*, 1991; Mion *et al.*, 1992; Steinmüller *et al.*, 1992). Sin embargo, el órgano transplantado puede aún dañarse por los efectos tóxicos de la PROTO IX, debido a que en médula ósea el incremento de la producción de la porfirina aún persiste (Meerman *et al.*, 1999).

Estudios en ratas y en hígados de roedores perfundidos, muestran que la secreción biliar de PROTO IX es similar a la de fosfolípidos y colesterol y por lo tanto, está relacionada con la secreción de ácidos biliares (Avner & Berenson, 1982a, b; Poh-

Fitzpatrick *et al.*, 1983; Perez-Barriocanal *et al.*, 1989, Berenson *et al.*, 1995). Beukeveld *et al.*, 1996), demostraron la asociación de PROTO IX con vesículas de colesterol/fosfolípidos en la bilis de roedores y humanos, sugiriendo que éstas podrían actuar como transportadores en estas soluciones acuosas. También encontraron que, en roedores, la reducción de la secreción de lípidos biliares está relacionada con una secreción biliar limitada de la porfirina, indicando que estos procesos están acoplados, y la excreción de PROTO IX puede ser afectada por drogas, la dieta y otros factores que alteren la excreción biliar de lípidos.

En ratones, la Gris produce un incremento progresivo del contenido de porfirinas en hígado y colestasis, debido a la disminución de la actividad de la Fe-Que1 (Gschmait *et al.*, 1975; Brady & Lock, 1992; Polo *et al.*, 1997). Este modelo imita la disfunción hepatobiliar observada en la PPE; a diferencia de la porfiria humana, la sobreproducción de PROTO IX comienza en el hígado y no en la médula ósea. (Nakao *et al.*, 1967, Poh-Fitzpatrick *et al.*, 1983). Paralelamente a la acumulación de porfirinas, la administración de Gris induce la reducción del flujo biliar y como resultado del daño hepático, se acumulan ácidos biliares endógenos tóxicos, como el ácido taurocólico y taurodeoxicólico en los hepatocitos (Hertz *et al.*, 1975; Hatoff & Hardison, 1981).

La bilis, responsable de la eliminación de muchos productos de desecho del organismo, está compuesta por sales biliares, electrolitos, pigmentos biliares, colesterol y otros lípidos. Las sales biliares aumentan la solubilidad de las grasas y los compuestos liposolubles. Diariamente, se excretan al intestino grandes cantidades de ácidos biliares, pero sólo cantidades relativamente pequeñas se eliminan del organismo, debido a que el 95% de los ácidos biliares que llegan al duodeno son reabsorbidos en el íleon. Se ha observado que la PROTO IX impide la secreción a la bilis de fosfolípidos y colesterol, pero no la de ácidos biliares (Perez-Barriocanal *et al.*, 1989).

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas, por lo tanto poseen una cadena hidrofílica y una hidrofóbica que le confieren la habilidad de solubilizarse en medios lipídicos y acuosos. (Litter, 1986; Broughton, 1994). Poseen principalmente acciones digestivas y coleréticas (Litter, 1986). En humanos, las sales biliares son usadas como catárticos, para promover el flujo biliar después de la cirugía biliar y para revertir la formación de cálculos (Harvey, 1970). En pacientes con PPE se han utilizado ácidos biliares para aumentar la excreción de porfirinas hepáticas y mejorar la colestasis (Gross *et al.*, 1998). También se han usado incluso en la cirrosis establecida, mejorando la función

hepática (Frank & Doss, 1995; Pirlich *et al.*, 2001). Avner & Berenson (1979, 1982b), observaron en estudios de perfusión de hígado, que la limitación de la secreción de PROTO IX a la bilis se puede aumentar por sales biliares, apoyando la hipótesis acerca de que las sales biliares coleréticas, podrían también incrementar la secreción de PROTO IX en la protoporfiria.

El Queno es un ácido biliar primario, sintetizado directamente a partir de colesterol. Al igual que el Urso, son considerados coleréticos simples, debido a que no aumentan la concentración total de ácidos biliares en la bilis (Litter, 1986).

El Urso es epímero del Queno y es uno de los constituyentes de la bilis humana que se encuentra en menor cantidad. En la mayoría de los vertebrados generalmente representa el 1-5% del total de ácidos biliares presentes en la bilis (Tammar, 1970, Haslewood, 1978, Hagey, 1992). El Urso es un ácido biliar altamente hidrofílico, con baja acción detergente sobre las membranas celulares, que se utiliza en el tratamiento de la colestasis hepática. El efecto terapéutico de esta molécula se atribuye a la protección de los colangiocitos contra la citotoxicidad de los ácidos biliares hidrofóbicos (Paumgartner & Beuers, 2002), la inhibición de la apoptosis hepática (Qiao *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2003; Schoemaker *et al.*, 2004), la estimulación de la secreción biliar y la neutralización de la colestasis (Paumgartner & Beuers, 2004). En humanos también se utiliza para disolver cálculos de colesterol y en el tratamiento de la cirrosis biliar (Poupon *et al.*, 1994, Paumgartner & Beuers, 2004).

El ADx es un ácido biliar natural no conjugado, formado por la acción de las bacterias sobre el ácido cólico. Se usa como colerético y como detergente para solubilizar grasas que luego se absorben en el intestino (Litter, 1986).

El ADh es un ácido biliar semisintético, no conjugado, obtenido por la oxidación del ácido cólico, donde los tres grupos hidroxilos pasan a ser grupos cetónicos, lo que le confiere una mayor acción colerética al ADx (Litter, 1986).

Tanto el ADx como el ADh tienen acción hidrocolerética, es decir, aumentan el volumen de secreción biliar por el hígado, incrementando el contenido acuoso de la bilis y disminuyendo la concentración de sus componentes (Litter, 1986)

Debido a que el estrés oxidativo observado en animales tratados con Gris podría ser inducido por las porfirinas acumuladas en el hígado tras la inhibición de la Fe-Quel, y que los polifenoles protegieron al hígado contra la peroxidación lipídica, pero no fueron

capaces de prevenir otros daños oxidativos; consideramos que la administración simultánea de polifenoles y compuestos capaces de acelerar la excreción de porfirinas, tales como los ácidos biliares, podrían reducir el daño hepático observado en los animales tratados con Gris.

Se estudió el efecto de los ácidos Urso, Queno, ADx y ADh sobre el metabolismo del hemo y el sistema de defensa antioxidantes en ratones alimentados con Gris 0,5% durante 14 días.

## **III.2 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS PRODUCIDAS POR LA GRIS**

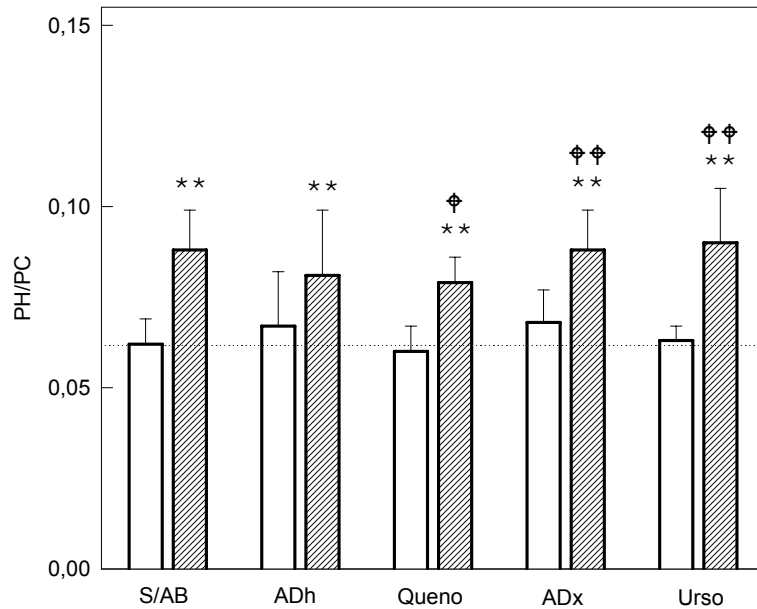
### **III.2.1 Relación entre el peso del hígado y el peso corporal**

En la [Figura III.1](#), se muestran los datos obtenidos al estudiar el efecto de los ácidos biliares sobre la relación peso hígado/peso corporal en ratones intoxicados con Gris.

Cuando se suministraron los cuatro ácidos biliares a animales controles no se observaron diferencias significativas en este parámetro. La administración de Gris produjo un incremento del 40% ( $p < 0,01$ ) en la relación peso del hígado/peso corporal, que no fue revertido por ninguno de los ácidos investigados.

### **III. 2.2 Alteraciones Histológicas**

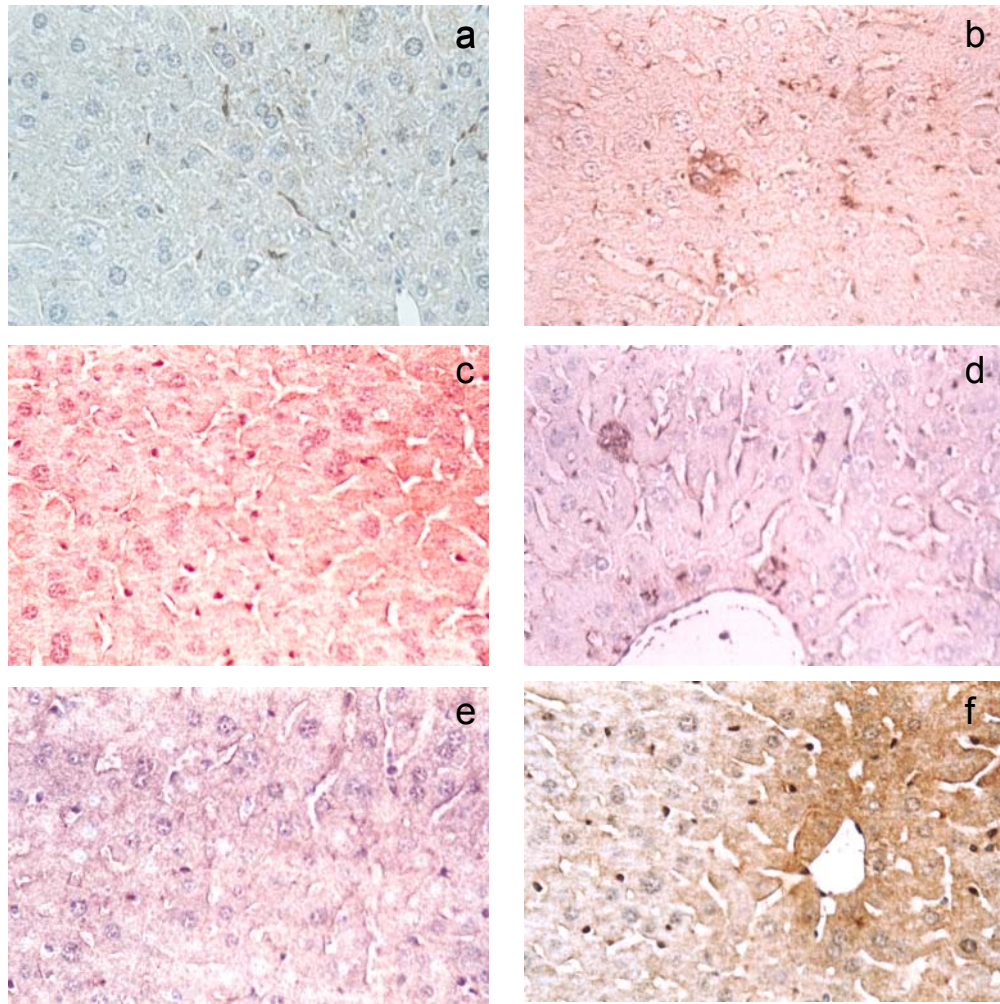
Los estudios histológicos de los hígados de ratones tratados con los ácidos biliares conjuntamente con Gris mostraron lesiones morfológicas y expresión de HO-1 similares a las que presentan los hígados de los animales a los que sólo se les administró Gris, y que se describieron en el Capítulo I de Resultados en los ítems I.2.2 y I.7 ([Figura III.2](#))



**Figura III.1:** Efecto de los ácidos biliares sobre la relación entre el peso del hígado y el peso corporal en ratones intoxicados con Gris.

Control  Gris  , S/AB: sin ácido biliar

Los animales recibieron en la dieta: Gris (0,5% p/p), ADh (0,33% p/p), Queno (0,01% p/p), ADx (0,33% p/p), Urso (0,20% p/p) o Gris más uno de los ácidos biliares, durante 14 días. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: ( $\phi$ )  $p < 0,05$  y ( $\phi\phi$ )  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.



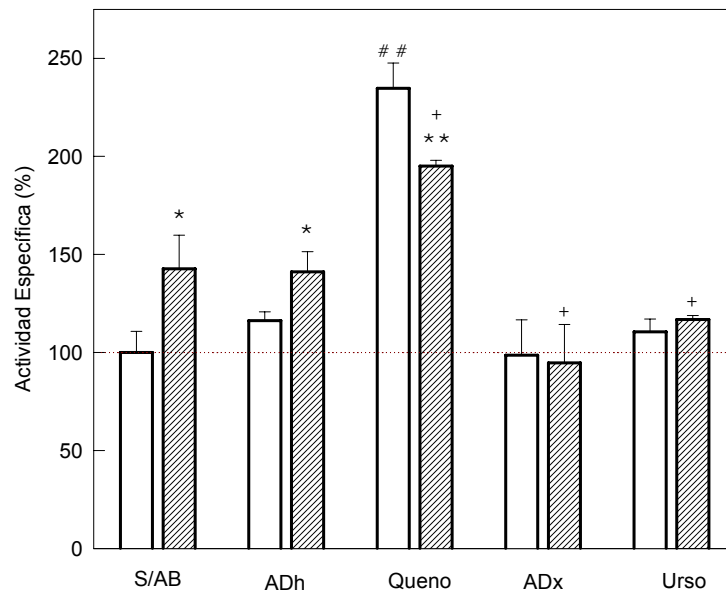
**Figura III.2:** *Cortes histológicos de hígado: lesiones morfológicas y expresión de Hemo Oxygenasa-1*

a) Control, b) Gris 0,5%, c) Gris 0,5% y ADh, d) Gris 0,5% y Queno, e) Gris 0,5% y ADh, f)Gris 0,5% y Urso. Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura III.1](#) y en Materiales y Métodos.



### III.3 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE COLESTASIS

En la [Figura III.3](#) se observan los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de los ácidos biliares sobre actividad de  $\gamma$ -GT.



**Figura III.3:** Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de la  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidasa en ratones intoxicados con Gris.

Control  Gris , S/AB: sin ácido biliar

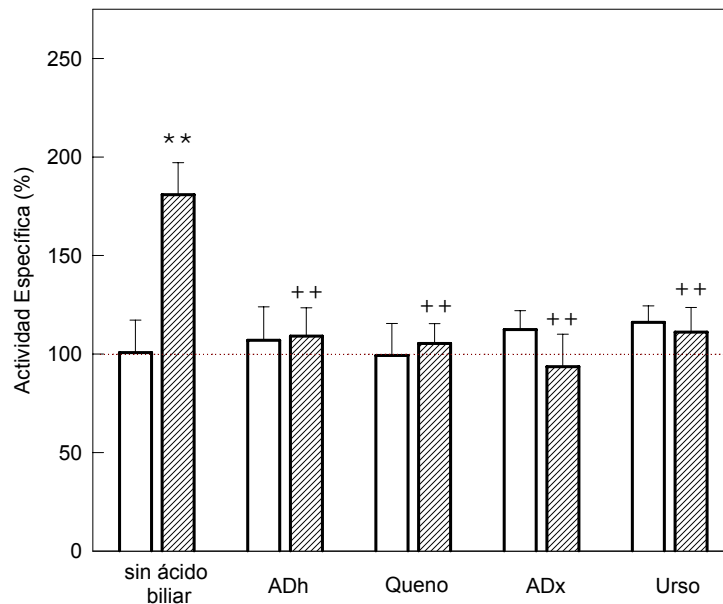
Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $38,97 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-3}$  mU/ml. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ácido biliar respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (+)  $p < 0,05$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura III.1](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando se suministró ADh, ADx o Urso a ratones controles, no se observaron diferencias significativas en la actividad de la enzima. Sin embargo, el Queno produjo un

aumento del 130% ( $p < 0,01$ ) sobre la actividad de la  $\gamma$ -GT, efecto que también se produjo en los animales que recibieron este ácido biliar conjuntamente con Gris detectándose un aumento del 40% ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo tratado sólo con el antimicótico.

La administración de ADh no produjo diferencias significativas sobre la elevada actividad debido al Gris. En cambio, el ADX y URSO evitaron significativamente ( $p < 0,05$ ) la inducción de la  $\gamma$ -GT provocada por la Gris, alcanzándose los niveles basales de actividad.

La Figura III.4 muestra los resultados obtenidos cuando investigó el efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de la FAlc.



**Figura III.4:** Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de la Fosfatasa Alcalina en ratones intoxicados con Gris.

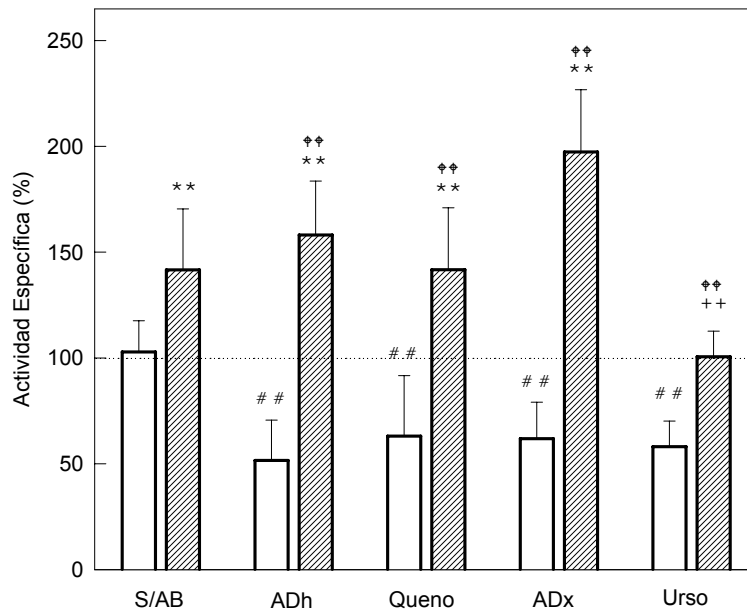
Control  Gris  S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $421,5 \pm 59,7$  mU/ml. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la Figura III.3 y en Materiales y Métodos.

Todos los ácidos biliares estudiados previnieron el aumento de actividad del 80% ( $p<0,01$ ), de la FAlc, inducido por Gris.

### III.4 ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL METABOLISMO DEL HEMO

En la [Figura III.5](#) se observan los resultados obtenidos cuando se investigó el efecto de los ácidos biliares sobre la actividad del ALA-S.



**Figura III.5:** Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática del Ácido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa.

Control  Gris  S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $0,131 \pm 0,019$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (◆◆)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.3](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando los ácidos biliares estudiados se administraron a ratones controles se observó una disminución en la actividad enzimática del ALA-S de alrededor del 40% ( $p < 0,01$ ).

En los animales que recibieron Gris conjuntamente con Queno, ADx o ADh, no se observaron variaciones significativas en la actividad de ALA-S, respecto del grupo que recibió sólo Gris. Sin embargo, el Urso revirtió significativamente ( $p < 0,01$ ) la inducción del ALA-S provocada por la Gris, alcanzando los niveles basales de actividad siendo aún significativa ( $p < 0,01$ ) la diferencia respecto de los que recibieron sólo este ácido biliar.

En la [Tabla III.1.](#) se muestran los resultados obtenidos cuando se investigó el efecto de los ácidos biliares sobre los niveles de PROTO IX acumulada en el hígado de los ratones.

**Tabla III.1.: Nivel de PROTO IX en hígado**

	Contenido de PROTO IX (ng/mg proteínas)				
Gris	Control	ADh	Queno	ADx	Urso
Sin	0,42 ± 0,04	0,47 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,43 ± 0,09	0,51 ± 0,07
Con	20,25 ± 3,58 **	2,88 ± 0,68 ++ ⚡⚡	20,94 ± 2,11 ** ⚡⚡	1,11 ± 0,20 ++ ⚡⚡	27,59 ± 3,58 ** ⚡⚡

Los resultados se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*) $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++) $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (⚡⚡) $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura III.1.](#) y en Materiales y Métodos.

En los grupos que recibieron sólo el ácido biliar, la cantidad de PROTO IX hepática fue similar a la de los animales que sólo se alimentaron con dieta control.

Cuando los animales recibieron Gris el contenido de PROTO IX en el hígado fue 50 veces mayor ( $p < 0,01$ ) que el del grupo control. Resultados similares se observaron en los grupos que se le adicionó Queno o Urso al antimicótico. Sin embargo, la administración de ADh o ADx, logró disminuir en aproximadamente un 90% ( $p < 0,01$ ) el incremento de la porfirina producido por Gris, aunque sin llegar a los niveles basales.

En la [Tabla III.2.](#) se muestran los resultados obtenidos al evaluar el contenido de PROTO IX en la materia fecal de los animales estudiados.

Cuando se administraron los ácidos biliares estudiados a los grupos controles no se produjeron diferencias significativas en el contenido de PROTO IX, a excepción, del Queno que provocó un aumento de excreción 3 veces superior a la del grupo control.

La administración de Gris provocó un incremento del 400% ( $p < 0,01$ ) en la excreción de PROTO IX.

El tratamiento con ADh o ADx, conjuntamente con Gris, produjo una excreción 3 veces mayor ( $p < 0,01$ ) que la excretada por los animales que sólo recibieron el antimicótico. Por el contrario, cuando la Gris se suministró simultáneamente con QUENO o URSO, el contenido de PROTO IX en las heces fue similar a los niveles de sus respectivos controles.

**Tabla III.2.: Nivel de PROTO IX excretada en materia fecal**

	ng de PROTO IX ng/mg heces				
GRIS	CONTROL	ADh	QUENO	ADx	URSO
Sin	2,22 ± 0,04	3,88 ± 0,06	6,58 ± 0,08 ##	2,53 ± 0,04	2,07 ± 0,05
Con	10,25 ± 0,42 **	32,12 ± 0,57 ++ ☐☐	6,85 ± 0,06	31,82 ± 0,38 ++ ☐☐	4,55 ± 0,05 ++ ☐☐

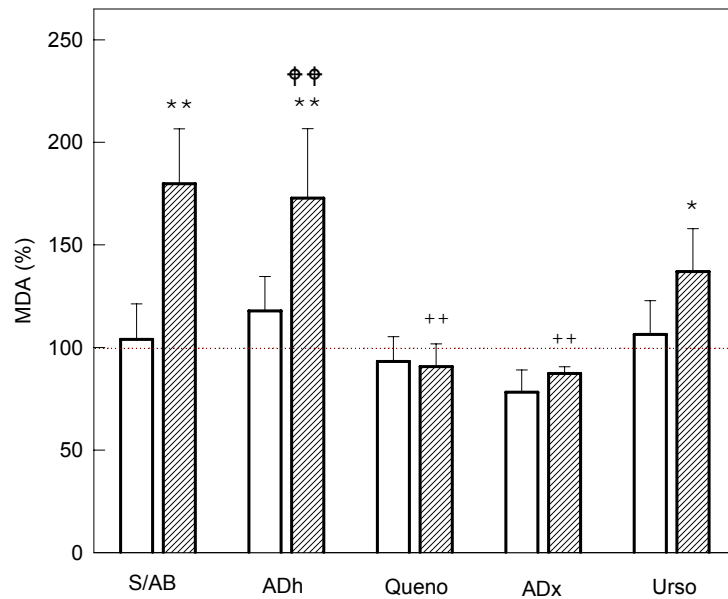
Los resultados se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (☐☐)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura III.1.](#) y en Materiales y Métodos.

### III.5. ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

En la [Figura III.6](#) se observan los resultados obtenidos cuando investigó el efecto de los ácidos biliares sobre los niveles de MDA.

Cuando los ácidos biliares se administraron a ratones controles, no se observaron diferencias significativas entre ellos.

En los animales que recibieron Gris, el aumento en los niveles de MDA fue del 80% ( $p<0,01$ ); un valor similar se observó cuando se administró ADh conjuntamente con Gris. Mientras que el Urso produjo una disminución del 40% ( $p<0,05$ ) respecto del grupo que recibió sólo Gris, el tratamiento con Queno o ADx revirtió significativamente ( $p<0,01$ ) a los niveles basales, el incremento de MDA provocado por el antimicótico.



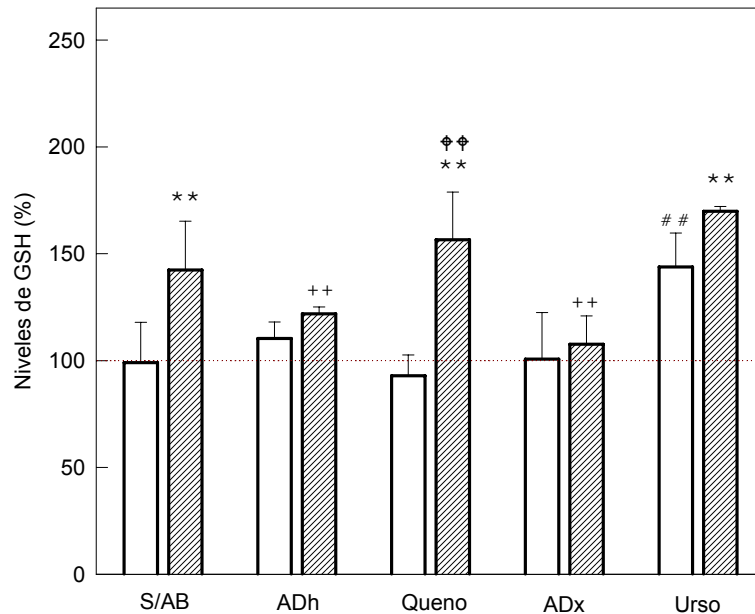
**Figura III.6:** Efecto de los ácidos biliares sobre los niveles de Malondialdehído.

Control Gris , S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA del grupo control (---). Valor medio control  $7,94 \pm 1,39$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: Diferencia significativa del grupo tratado con Gris respecto del grupo control: (\*)  $p<0,05$ , (\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (ϕϕ)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.1](#) y en Materiales y Métodos.

En la [Figura III.7](#) se muestran los resultados obtenidos cuando se estudió el contenido de GSH hepático por el tratamiento con ácidos biliares.

Cuando se administró Urso a animales controles se observó un aumento del 40% ( $p<0,01$ ) en el contenido de GSH hepático, mientras que con Queno, ADh o ADx no se detectaron variaciones significativas en relación a los niveles basales.



**Figura III.7:** Efecto de los ácidos biliares sobre los niveles de Glutathion Reducido.

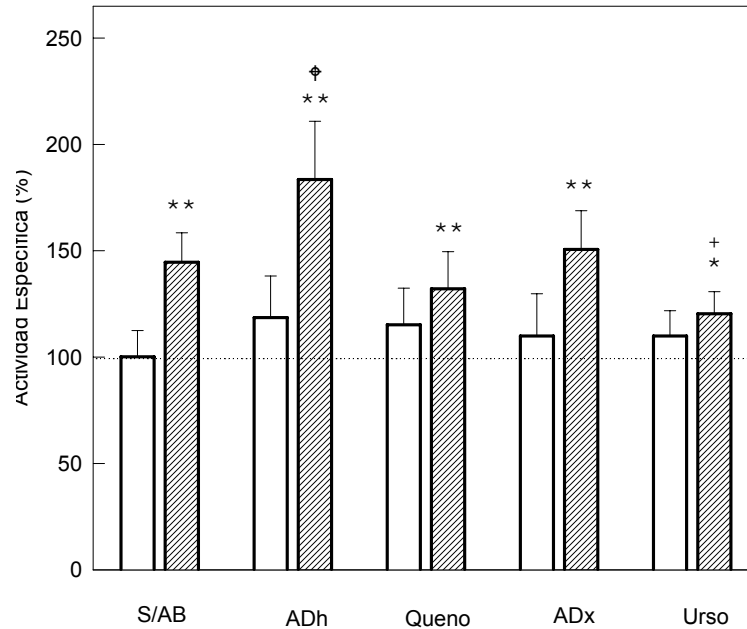
Control Gris , S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $27,05 \pm 5,11$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (##)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.1](#), y en Materiales y Métodos.

La administración de Gris produjo un aumento del 40% ( $p<0,01$ ) con respecto a los animales controles; valores similares se observaron cuando se suministró Queno o Urso junto con Gris. Si bien el tratamiento con ADh y Gris produjo niveles de GSH inferiores a los encontrados cuando se suministró sólo el antimicótico, esta diferencia no fue

significativa. En cambio la administración conjunta de Gris con ADx, disminuyó el contenido de GSH hepático en un 40% ( $p<0,01$ ) respecto de la cantidad del tripéptico producida por la Gris, manteniendo los niveles dentro de los valores controles.

En la [Figura III.8](#) se representaron los valores obtenidos cuando se investigó el efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de GRed.



**Figura III.8:** Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de la Glutathione Reductasa.

Control □ Gris ▨, S/AB: sin ácido biliar

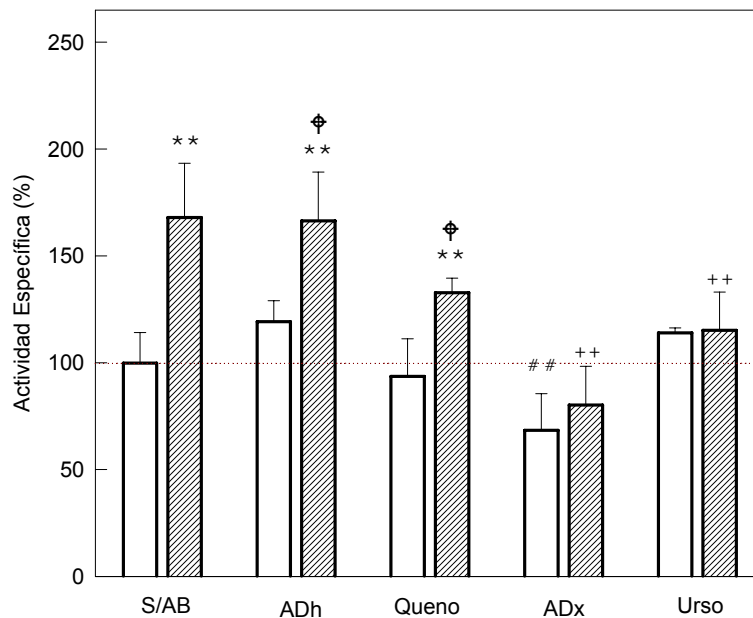
Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $40,11 \pm 4,96$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (+)  $p<0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (ϕ)  $p<0,05$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.3](#) y en Materiales y Métodos.

Cuando los ácidos biliares se administraron a ratones controles, no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática basal.



El tratamiento con Gris produjo una inducción de la GRed del 45% ( $p < 0,01$ ). En los animales que recibieron Gris conjuntamente con Queno, ADh o ADx, no se observaron variaciones significativas en la actividad de la enzima, respecto del grupo que recibió sólo Gris. Mientras que la administración de Urso más Gris, disminuyó la actividad en un 20% ( $p < 0,01$ ) en relación a la observada en los animales que sólo recibieron el antimicótico.

En la Figura III.9 se muestran los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática de la SOD.



**Figura III.9.: Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática del Superóxido Dismutasa.**

Control Gris , S/AB: sin ácido biliar  
 Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $71,95 \pm 10,23$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris con ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (†)  $p < 0,05$ . Los detalles experimentales se describen en la Figura III.3 y en Materiales y Métodos.

La administración de ADh, Queno, o Urso no produjo variaciones significativas en la actividad de la SOD; sin embargo, el ADx causó una disminución del 20% ( $p < 0,05$ ) en la actividad enzimática.

En los animales que recibieron Gris se produjo un aumento de actividad del 70% ( $p < 0,01$ ) comparado con el grupo control. No se observaron diferencias significativas cuando se administró Gris conjuntamente con ADh o Queno. Cuando los ratones recibieron ADx o Urso conjuntamente con Gris, la actividad de SOD disminuyó un 70% ( $p < 0,01$ ) y un 50% ( $p < 0,01$ ) respectivamente, en relación a la observada por efecto de la Gris sola y alcanzando de esta forma, los valores de sus respectivos controles.

En la Figura III.10 se representaron los valores obtenidos cuando se determinó la actividad enzimática de la GST.

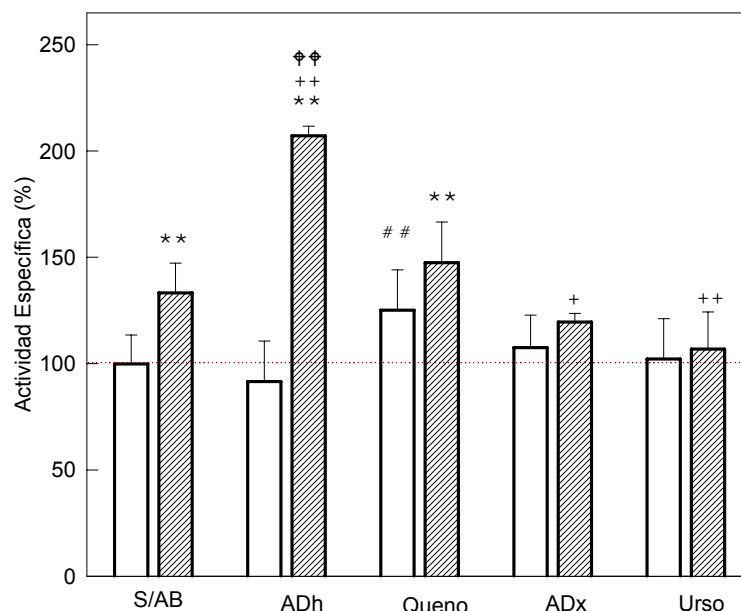
Cuando los ácidos biliares estudiados se suministraron a animales controles, se observó un aumento en la actividad de la enzima del 25% ( $p < 0,01$ ) debido al Queno, mientras que el resto de los compuestos estudiados no alteró significativamente los valores basales.

La administración de Gris, produjo una inducción de la actividad de la GST de aproximadamente un 30% ( $p < 0,01$ ); un valor similar se obtuvo cuando los animales recibieron Queno más Gris.

El ADh incrementó en un 60% ( $p < 0,01$ ) la inducción producida por el antimicótico. Mientras que ADx y Urso revirtieron significativamente ( $p < 0,01$ ) la inducción de la GST provocada por la Gris, alcanzando los niveles basales de actividad

### **III.6. ACCIÓN DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE EL SISTEMA METABOLIZANTE DE DROGAS DE FASE I- CITOCROMO P450**

En la Figura III.11, se muestran los resultados obtenidos cuando se determinó el contenido de CYP hepático.



**Figura III.10.: Efecto de los ácidos biliares sobre la actividad enzimática del Glutathion-S-Transferasa.**

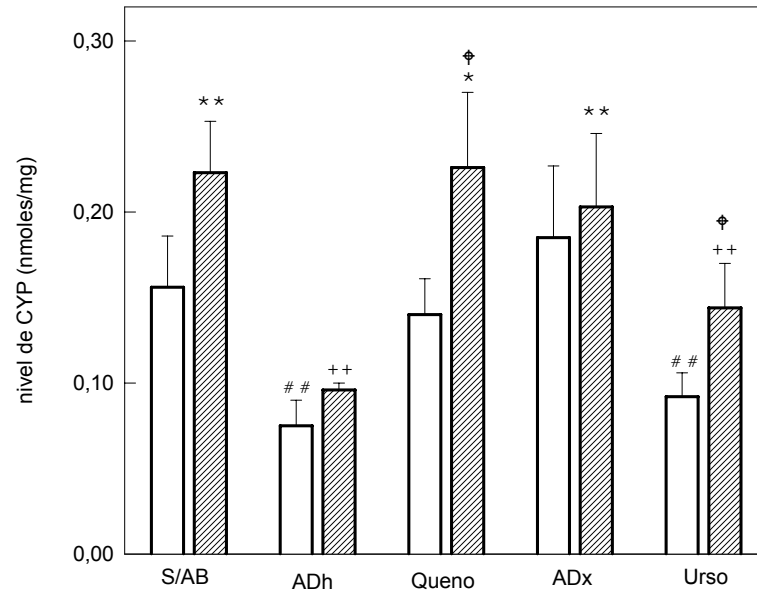
Control □ Gris ▨, S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (□). Valor medio control  $26,47 \pm 3,60$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris con ácido biliar respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (+)  $p < 0,05$  y (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (♦)  $p < 0,05$  y (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.3](#) y en Materiales y Métodos.

La administración de ADh o Urso a animales controles produjo una disminución del 40% ( $p < 0,01$ ) en el contenido de CYP; mientras que cuando se suministró Queno o ADx no se observaron variaciones significativas sobre dichos niveles.

La Gris indujo un aumento del 40% ( $p < 0,01$ ) en los niveles de CYP hepático, que se mantuvo cuando el antimicótico se administró simultáneamente con QUENO o con ADx.

La administración de ADh simultáneamente con Gris disminuyó un 130% ( $p < 0,01$ ) el contenido de CYP hepático producido por el antimicótico.



**Figura III.11:** Efecto de los ácidos biliares sobre los niveles de Citocromo P450.

Control Gris , S/AB: sin ácido biliar

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  DE. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ácido biliar respecto del grupo control: (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ácido biliar respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo tratado con Gris sola: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y ácido biliar respecto del grupo que recibió sólo ácido biliar: (†)  $p < 0,05$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura III.1](#) y en Materiales y Métodos.

Sólo el URSO fue capaz de mantener el contenido de CYP dentro de los valores normales cuando se lo administró simultáneamente con Gris.

### III.7 CONCLUSIONES

El estudio del efecto de las sales biliares sobre la función hepatobiliar no es simple. En humanos, Queno y Urso parecen mejorar la condición de los pacientes con PPE (Van Hattum *et al.*, 1986; Pirlich *et al.*, 2001). Rademakers *et al.* (1990) encontraron que la administración de Queno a pacientes con PPE, no mejoró el daño en las organelas y en las células del parénquima hepático o del sistema de canaliculos biliares, pero produjo una disminución de los depósitos cristalinos de PROTO IX en el hígado. Van Hattum *et al.* (1986) postularon que en pacientes con PPE, el Queno inhibe la producción de PROTO IX en el hígado.

En ratones, el efecto del tratamiento con ácidos biliares es controversial. Algunos autores publicaron que el tratamiento con Urso puede tener un efecto citoprotector y colerético sobre la injuria hepática inducida por Gris (Berenson *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1991); otros, en cambio, no observaron ningún efecto por la administración del ácido biliar en el mismo modelo murino (Irifune *et al.*, 1991). En ratones knock-out para el gen *mdr2* P-Glicoproteína, un modelo de enfermedad colestática hepática, la administración de Urso mejoró la patología hepática y disminuyó la proliferación ductal y la inflamación portal (Van Nieuwkerk *et al.*, 1996). En el modelo de PPE en ratones con deficiencia en el gen de la Fe-Quel, la dosis comúnmente usada de 0.5% de Urso fue tóxica, mientras que dosis menores no mejoraron la condición hepática de estos ratones (Abitbol *et al.*, 2006). En hígados de rata profundidos con PROTO IX, la infusión con ADx y Queno incrementó la excreción de esta porfirina, observándose un efecto más incipiente (Berenson *et al.*, 1988).

La Gris inhibe la actividad de Fe-Quel, y como consecuencia el ALA-S, está muy inducida. En nuestro estudio, la administración de ácidos biliares junto con Gris no impidió la inducción en la actividad del ALA-S, aunque cuando se administraron solos redujeron la actividad enzimática. Por lo que podemos inferir que estos ácidos biliares no revierten ni previenen la interacción de la Gris con el camino biosintético del hemo.

El ADx aumentó la excreción fecal de porfirinas y disminuyó su contenido total en hígado, siendo así, el único de los ácidos biliares estudiados que redujo la acumulación hepática de PROTO IX inducida por Gris.

Se acepta, generalmente, que los ácidos biliares hidrofóbicos, tales como el ADx, son capaces de producir hepatocitotoxicidad asociada con cambios colestáticos tanto en

humanos (Attili *et al.*, 1986; Hofman, 1990) como en roedores (Poo *et al.*, 1992; Vitale *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995; Chen & Farrell, 1996; Orellana *et al.*, 1997; Tateishi *et al.*, 1998). En esta forma de colestasis están inducidas muchas enzimas hepáticas entre ellas GOT; GPT y lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol 7 $\alpha$  -hidroxilasa y 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. Sin embargo, luego de la administración de Urso a pacientes con cirrosis biliar primaria, los índices relacionados con colestasis o citolisis tales como GOT, GPT,  $\gamma$ GT y LHD mejoran (Tanaka *et al.*, 1999). En experimentos con animales, el Urso tuvo un efecto protector contra la colestasis inducida por ácidos biliares hidrofóbicos tales como Queno y ADx (Galle *et al.*, 1990; Heuman *et al.*, 1991; Tsukahara *et al.*, 1993). En nuestro estudio, con la administración simultánea de los ácidos biliares con Gris, sólo ADx fue capaz de prevenir la inducción de  $\gamma$ -GT y FAlc.

Se ha descrito que el Urso posee propiedades antioxidantes, mientras que los ácidos biliares hidrofóbicos generan ROS y por lo tanto, son pro oxidantes (Sokol *et al.*, 1993, 1995; Ljubuncic *et al.*, 1996, 2005). En estudios *in vivo*, en la enfermedad hepática producida por ligaduras de ductos biliares en ratas, un modelo ampliamente utilizado de colestasis de hígado, la administración de Urso suprimió el aumento de la peroxidación lipídica (Ljubuncic *et al.*, 2000) y disminuyó el daño oxidativo (Serviddio *et al.*, 2004). Otros estudios han establecido que el Urso produce un aumento de la biosíntesis de GSH y de proteínas que contienen tioles en hepatocitos (Mitsuyoshi *et al.*, 1999; Rodríguez-Ortigosa *et al.*, 2002). También es capaz de secuestrar radicales oxhidrilo y superóxido (Lapenna *et al.*, 2002; Ljubuncic *et al.*, 2005).

Nuestros resultados indican que el ADh y el ADx mantuvieron los niveles de GSH dentro de los valores controles cuando se administraron junto con Gris. Estos hallazgos no reflejaron la alta actividad de GRed observada en estos animales. En el Capítulo I de Resultados observamos que la actividad de GPx disminuía significativamente en ratones tratados con Gris, por lo que podemos suponer que otras enzimas están consumiendo GSH.

La actividad de SOD se mantuvo dentro de los valores control en los ratones tratados con ADx o Urso más Gris.

Como se esperaba, de acuerdo a los niveles de porfirinas acumuladas en el hígado de los animales tratados con ADx más Gris, no se observó aumento de los niveles de TBARS, mientras que cuando se administró ADh o Urso con Gris, el nivel de TBARS fue significativamente elevado, en paralelo con las porfirinas acumuladas. Por otro lado,

QUENO conjuntamente con Gris no indujo un aumento de TBARS aunque hubo un gran incremento de porfirinas acumuladas en estos animales.

En presencia de colestasis, las enzimas del sistema metabolizante de drogas de Fase I, están afectadas tanto en humanos (George *et al.*, 1995) como en modelos animales (Chen *et al.*, 1995; Orellana *et al.*, 1997; Tateishi *et al.*, 1998). El contenido de CYP total y de diferentes isoformas se encontraron disminuidas en ratas tratadas con 1% de ADx (Tanaka, *et al.* 1999) y en el modelo de injuria hepática por ligaduras de ductos biliares en ratas (Chen *et al.*, 1995; Chen & Farrel 1996; Tateishi *et al.*, 1998). En estos modelos la reducción del CYP total puede llegar hasta un 50% (Orellana *et al.*, 1997; Dahlström-King *et al.*, 1992). En pacientes con enfermedad hepática crónica con colestasis, el contenido total de CYP, la actividad enzimática y la cantidad de proteínas de las isoformas 1A2, 2C y 2E1 están alteradas diferencialmente (George *et al.*, 1995). Tanaka *et al.* (1999) sugirieron que en el tratamiento con ADx la disminución de los niveles de CYP puede ocurrir por la presencia de colestasis y además puede reflejar la toxicidad del ácido biliar.

Se sabe que la Gris inactiva las isoformas 2A6 y 3A4 del CYP. Las alteraciones derivan de la interacción directa del citocromo con el antimicótico, pero existen datos contradictorios acerca del efecto de Gris sobre la concentración microsomal del CYP. Hemos observado aquí, un aumento en el nivel hepático de CYP en los animales tratados con Gris sola. Este incremento no se observó cuando los ratones recibieron simultáneamente Gris y ADh, ADx, o Urso.

Debido a que ADx redujo efectivamente la acumulación de porfirinas inducida por Gris, la concentración hepática de GSH no aumentó sobre los valores controles, aunque la actividad de GRed se mantuvo elevada. Además, como resultado de la baja acumulación de porfirinas, no se observó peroxidación lipídica, y la actividad de las enzimas hepáticas  $\gamma$ -GT y FAlc se mantuvieron dentro de los valores basales. El sistema metabolizante de drogas no se alteró en los ratones que recibieron ADx más Gris. Todos estos hallazgos indicarían que, en este modelo, el daño hepático inducido por Gris sería parcialmente prevenido por la administración simultánea de ADx.

En base a estos resultados, se observa que ADx sería un potencial candidato para disminuir el daño hepático inducido por Gris:

### **III.8 REFERENCIAS**

- Abitbol M, Puy H, Sabaté JM, Guénet JL, Deybach JCh, Montagutelli X. (2006). Ursodesoxycholic Acid and Heme-Arginate are Unable to Improve Hematopoiesis and Liver Injury in an Erythropoietic Protoporphyrin Mouse Model. *Physiol. Res.* 55 (Suppl. 2): S93-S101
- Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. (1986). Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med. Hypotheses.* 19(1): 57-69.
- Avner D L Berenson MM. (1979). Hepatic extraction and biliary excretion of protoporphyrin. *Gastroenterology* 76: 1274.
- Avner DL, Berenson MM. (1982a). Hepatic clearance and biliary secretion of protoporphyrin in the isolated, in situ perfused rat liver. *J. Lab. Clin. Med.* 99: 885–894.
- Avner DL, Berenson MM. (1982b). Effect of cholagogues on canalicular transport of protoporphyrin in the rat liver. *Am. J. Physiol.* 242(4): G347–G353.
- Berenson MM, Marin JJ, Larsen R, Avner D. (1987). Effect of bile acids on hepatic protoporphyrin metabolism in perfused rat liver. *Gastroenterology* 93(5): 1086-1093.
- Berenson MM, Garcia Marin JJ, Gunther C. (1988). Effect of bile acid hydroxylation on biliary protoporphyrin excretion in rat liver. *Am. J. Physiol.* 255(3 Pt 1): G382-G388.
- Berenson MM, Welch V, Garcia-Marin JJ. (1991). Importance of bile acid structure in amelioration of griseofulvin-induced murine protoporphyrin hepatopathy. *J. Lab. Clin. Med.* 118(1): 89-98.
- Berenson MM, El-Mir MY, Zhang L-K. (1995). Mechanism of bile acid facilitation of biliary protoporphyrin excretion in rat liver. *Am. J. Physiol.* 268: G754–G763.
- Beukeveld GJ, In 't Veld G, Havinga R, Groen AK, Wolthers BG, Kuipers F. (1996). Relationship between biliary lipid and protoporphyrin secretion; potential role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary organic anion transport. *J. Hepatol.* 24(3):343-52.
- Bloomer JR. (1988). The liver in protoporphyrin. *Hepatology* 8(2): 402-407
- Bloomer JR, Weimer MK, Bossenmaier IC, Snover DC, Payne WD, Ascher NL. (1989). Liver transplantation in a patient with protoporphyrin. *Gastroenterology* 97(1): 188-194.
- Brady AM, Lock EA. (1992). Inhibition of ferrochelatase and accumulation of porphyrins in mouse hepatocyte cultures exposed to porphyrinogenic chemicals. *Arch. Toxicol.* 66: 175-181.
- Broughton G 2nd..(1994). Chenodeoxycholate: the bile acid. The drug. A review. *Am. J. Med. Sci.* 307(1): 54-63.
- Chen J, Farrell GC. . (1996). Bile acids produce a generalized reduction of the catalytic activity of cytochromes P450 and other hepatic microsomal enzymes in vitro: relevance to drug metabolism in experimental cholestasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11(9): 870-877.
- Chen J, Murray M, Liddle C, Jiang XM, Farrell GC. (1995). Downregulation of male-specific cytochrome P450s 2C11 and 3A2 in bile duct-ligated male rats: importance to reduced hepatic content of cytochrome P450 in cholestasis. *Hepatology* 22(2): 580-587.



- Choi SW, Han Jh, Lim Kt, Cho Hm, Chung Kw, Sun Hs, Park Dh, Kim Bs, Seo EJ. (1991). Effect of ursodeoxycholic acid on experimental hepatic porphyria induced by griseofulvin. *J. Korean Med. Sci.* 6: 146-156.
- Cox TM. (1997). Erythropoietic protoporphyria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20(2): 258-269.
- Cripps D J., and Scheuer RJ. (1965). Hepatobiliary changes in erythropoietic protoporphyria. *Arch. Pathol.* 80: 500-508.
- Dahlström-King L, Couture J, Plaa GL. (1992). Influence of agents affecting monooxygenase activity on tauroolithocholic acid-induced cholestasis. *Toxicol. Lett.* 63(3): 243-252.
- Frank M, Doss MO. (1995). Liver cirrhosis in protoporphyria: bile acid therapy and liver transplantation. *Z. Gastroenterol.* 33(7): 399-403
- Galle PR, Theilmann L, Raedsch R, Otto G, Stiehl A. (1990). Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12(3 Pt 1): 486-491
- George J, Murray M, Byth K, Farrell GC. (1995). Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology* 21(1): 120-128.
- Gross U, Frank M, Doss MO. (1998). Hepatic complications of erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 14(2): 52-75.
- Gschnait F, Konrad K, Honigsman H, Denk H, Wolff K. (1975). Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyrin crystals. *J. Invest. Dermatol.* 65: 290-299.
- Hagey LR. (1992). Bile acid biodiversity in vertebrates: chemistry and evolutionary implications. Ph.D.Diss., University of California, San Diego, CA.
- Harvey, S. L. (1970). Gastric antacids and digestants. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. L. S. Goodman and A. Gilman, editors. Macmillan, Inc. New York. 1002-1019.
- Haslewood GAD. (1978) *The biological Utility of Bile Salt*. North Holland Publishing Co, Amsterdam.
- Hatoff DE, Hardison WG. (1981). Bile acids modify alkaline phosphatase induction and bile secretion pressure after bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology* 80(4): 666-672.
- Hertz R., Paumgartner G., Peisig R. (1975). Inhibition of bile formation by high doses of taurocholate in the perfused rat liver. *Scand J. Gastroenterol.* 11: 741-746.
- Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. (1991). Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 14(5): 920-926.
- Hofman AF. (1990) Bile acid hepatotoxicity and the rationale of UDCA therapy in chronic cholestatic liver disease; some hypotheses. In: Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L, Roda E. editors. *Strategies for the treatment of hepatobiliary diseases*. Kluwer Academic Publishers; Lancaster. P.43-56.
- Ibrahim G W, Watson CJ. (1968). Enterohepatic circulation and conversion of protoporphyrin to bile pigment in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 890-895.

- Irifune H, Tsukazaki N, Watanabe M, Nonaka S. (1991). The influence of ursodesoxycholic acid (URSO) on griseofulvin (GF)-induced protoporphyria. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 101: 813-817.
- Lamon, J. M., M. B. Poh-Fitzpatrick, and A. A. Lamola. (1980). Hepatic protoporphyrin production in human protoporphyria: alteration of protoporphyrin levels in blood and feces with intravenous hematin and analysis of red cell protoporphyrin distribution. *Gastroenterology* 79: 115-125.
- Lapenna D, Ciofani G, Festi D, Neri M, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cucurull o F. (2002). Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1661-1667
- Litter M. (1986). *Farmacología. Eperimental y Clínica.* 7° ed: Ed. El Ateneo, Buenos Aires
- Ljubuncic P, Fuhrman B, Oiknine J, Aviram M, Bomzon A. (1996). A Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipidperoxidation in cultured macrophages. *Gut.* 39: 475-478
- Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. (2000). Ursodeoxycholic acid suppresses extent of lipid peroxidation in diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1921-1928
- Ljubuncic P, Song H, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *J. Ethnopharmacol.* 22;100(1-2): 198-204.
- Meerman L, Haagsma EB, Gouw AS, Slooff MJ, Jansen PL. (1999). Long-term follow-up after liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11(4): 431-438.
- Mion FB, Faure JL, Berger F, McGregor B, Perrot H, Paliard P. (1992). Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. Report of a new case with subsequent medium-term follow-up. *J. Hepatol.* 16(1-2): 203-207.
- Mitsuyoshi H, Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Inaba K, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K. (1999). Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 263: 537-542
- Nakao K, Wada O, Takaku F, Sassa S, Yano Y, Urata G. (1967). The origin of the increased protoporphyrin in erythrocytes of mice with experimentally induced porphyria. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 923-932.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdes E. (1997). Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol.* 28(4): 525-529.
- Paumgartner G, Beuers U. (2002). Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 36(3): 525-531.
- Paumgartner G, Beuers U. (2004). Mechanisms of action and therapeutic efficacy of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease. *Clin. Liver Dis.* 8: 67-81.
- Perez-Barriocanal F, Redondo-Torres JG, Villanueva GR, Arteché E, Berenson MM, Marin JJ (1989). Protoporphyrin IX-induced impairment of biliary lipid secretion in the rat. *Clin. Sci. (Lond).* 77(5):473-8

- Pirlich M, Lochs H, Schmidt HH. (2001) Liver cirrhosis in erythropoietic protoporphyria: improvement of liver function with ursodeoxycholic acid. *Am. J. Gastroenterol.* Dec. 96(12): 3468-3469
- Poh-Fitzpatrick MB, Sklar JA, Goldsman C, Lefkowitz JH. (1983). Protoporphyrin hepatopathy. Effects of cholic acid ingestion in murine griseofulvin-induced protoporphyria. *J. Clin. Invest.* 72(4): 1449-1458.
- Polo CF, Buzaleh AM, Vazquez ES, Afonso SG, Navone NM, Batlle AM. (1997). Griseofulvin-induced hepatopathy due to abnormalities in heme pathway. *Gen Pharmacol.* 29(2): 207-210.
- Polson RJ, Lim CK, Rolles K, Calne RY, Williams R.(1988). The effect of liver transplantation in a 13-year-old boy with erythropoietic protoporphyria. *Transplantation* 46(3): 386-389.
- Poo JL, Feldmann G, Erlinger S, Braillon A, Gaudin C, Dumont M, Lebrec D. (1992). Ursodeoxycholic acid limits liver histologic alterations and portal hypertension induced by bile duct ligation in the rat. *Gastroenterology* 102(5): 1752-1759.
- Poupon RE, Poupon R, Balkau B. (1994). Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCAPBC Study Group. *N Engl. J. Med.* 330: 1342-1347.
- Qiao L, Yacoub, A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, Dent P. (2002). Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 35: 779-789
- Rademakers LPHM, Cleton MI, Kooijman C, Baart de la Faille H, van Hattum J. (1990). Early involvement of hepatic parenchymal cells in Erythropoietic Protoporphyria. An ultrastructural study of patients with and without overt liver disease and the effect of chenodeoxycholic acid treatment. *Hepatology* 11: 449-457.
- Rodrigues CM, Sola S, Nan Z, Castro RE, Ribeiro PS, Low WC, Steer CJ. (2003). Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13;100(10): 6087-6092.
- Rodriguez-Ortigosa CM, Cincu RN, Sanz S, Ruiz F, Quiroga J, Prieto J. (2002). Effect of ursodeoxycholic acid on methionine adenosyltransferase activity and hepatic glutathione metabolism in rats. *Gut.* 50: 701-706
- Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. (2004). Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 39(6): 1563-1573.
- Scholnick, P., H. S. Marver, and R. Schmid. (1971). Erythropoietic protoporphyria. Evidence for multiple sites of excess protoporphyrin formation. *J. Clin. Invest.* 50: 203- 207.
- Serviddio G, Pereda J, Pallardo FV, Carretero J, Borrás C, Cutrin J, Vendemiale G, Poli G, Vina J, Sastre J. (2004). Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. *Hepatology* 39: 711-720
- Shehade SA, Chalmers RJ, Prescott RJ. (1991). Predictable and unpredictable hazards of erythropoietic protoporphyria. *Clin. Exp. Dermatol.* 16(3): 185-187.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17: 869-881

Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim JM. (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* 109: 1249-1256

Steinmüller T, Doss MO, Steffen R, Blumhardt G, Bechstein WO, Frank M, Sieg I, Kretschmar R, Neuhaus P. (1992) Liver transplantation in erythrohepatic protoporphyria. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 117(28-29): 1097-1102.

Tammar AR. (1970) A comparative study of steroids with special reference to bile salts. Ph.D.Diss., University of London, London, UK.

Tanaka M, Nakura H, Tateishi T, Watanabe M, Nakaya S, Kumai T, Kobayashi S. (1999). Ursodeoxycholic acid prevents hepatic cytochrome P450 isozyme reduction in rats with deoxycholic acid-induced liver injury. *J. Hepatol.* 31(2): 263-270.

Tateishi T, Watanabe M, Nakura H, Tanaka M, Kumai T, Kobayashi S. (1998). Liver damage induced by bile duct ligation affects CYP isoenzymes differently in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 82(2): 89-92.

Tsukahara K, Kanai S, Ohta M, Kitani K. (1993). Taurine conjugate of ursodeoxycholate plays a major role in the hepatoprotective effect against cholestasis induced by taurochenodeoxycholate in rats. *Liver* 13(5): 262-269.

Van Hattum J, Baart De La Faille H, Van Den Berg Jw, Edixhoven-Bosdijk A, Wilson Jh. (1986). Chenodeoxycholic acid therapy in erythrohepatic protoporphyria. *J. Hepatol.* 3: 407-412.

Van Nieuwkerk Cm, Elferink Rp, Groen Ak, Ottenhoff R, Tytgat Gn, Dingemans Kp, Van Den Bergh Weerman Ma, Offerhaus Gj. (1996). Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 111: 165-171.

Vitale GC, Siow Y, Baker PR, Cuschieri A. (1992). Reversible bile acid changes in bile duct obstruction and its potential for hepatocellular injury. *J. Hepatol.* 14(2-3): 151-156.

Wagner S, Doss MO, Wittekind C, Backer U, Meessen D, Schmidt FW. (1989). Erythrohepatic protoporphyria with rapidly progressing liver cirrhosis *Dtsch Med Wochenschr.* 114(47): 1837-41.

## CAPITULO IV

### TRATAMIENTO CON DESFERRIOXAMINA, CIMETIDINA Y COLESTIRAMINA

#### IV.1 INTRODUCCIÓN

Para el tratamiento de pacientes con PPE con disfunción hepática, se han utilizado distintas alternativas terapéuticas que si bien no han revertido completamente su condición (Ishibasi *et al.*, 1999), en algunos casos mejoraron leve y temporariamente el cuadro clínico.

Entre estos tratamientos se describe la utilización de ácidos biliares, que facilitan la excreción biliar de PROTO IX, la combinación de transfusión de eritrocitos lavados y plasmaféresis (Spiva & Lewis, 1984; van Wijk *et al.*, 1988), la ferroterapia por la administración de Desferrioxamina, (Bloomer, 1992), y la administración de hematina (Bloomer & Pierach, 1982), para inhibir la acumulación de PROTO IX. También se han utilizado la Colestiramina, para suprimir la circulación enterohepática de porfirinas (Poh-Fitzpatrick, 1978) y la Cimetidina (Horie *et al.*, 1987) que disminuye la actividad del ALA-S.

Se decidió entonces estudiar el efecto de la Desferrioxamina, Cimetidina y Colestiramina en ratones con protoporfiria inducida por Gris.

#### IV. 2 TRATAMIENTO CON DESFERRIOXAMINA

##### IV.2.1 INTRODUCCIÓN

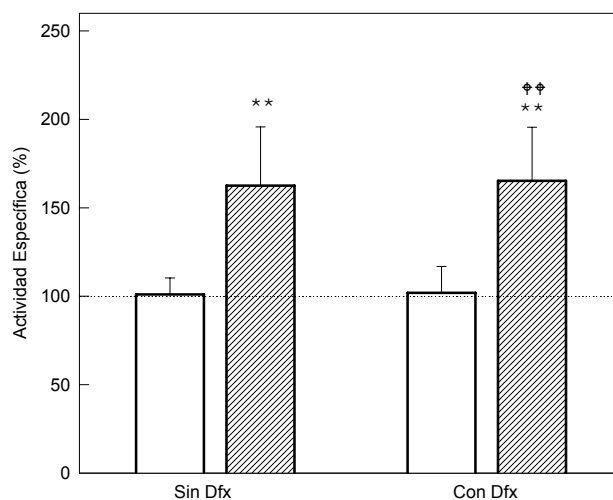
Sabemos que la inhibición de la Fe-Quel por Gris produce acumulación de PROTO IX y de hierro. Como se ha descrito en el Capítulo II de la Introducción, este metal cataliza la reacción de Fenton, cuyo producto es el radical oxhidrilo, el más fuerte oxidante conocido, para el cual no existe ningún sistema de defensa en los organismos vivos. La Desferrioxamina (N'-[5-[[4-[[5-(acetilhidroxiamino) pentil] amino]-1,4 dioxobutil] hidroxiamino]pentil-n-(5-aminopentil)-N-hidroxiбутanodiamida) es un quelante de hierro

altamente específico (Berg *et al.*, 1996). Es de esperar entonces que la administración de este quelante, al sustraer el exceso de hierro del medio, disminuya el daño hepático inducido por el exceso de PROTO IX.

Se investigó así esta posibilidad secuestrando del medio el Fe acumulado mediante la administración de Desferrioxamina (75mg/Kg, vía i.p.) 72, 48, 24 y 1 horas antes del sacrificio, a animales intoxicados con Gris.

#### IV.2.2 EFECTO SOBRE EL CAMINO BIOSINTÉTICO DEL HEMO

La [Figura IV.1](#) muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Desferrioxamina sobre la actividad del ALA-S.



**Figura IV.1:** Efecto de la Desferrioxamina sobre la actividad enzimática del Ácido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa

Control  Gris

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) durante 14 días, recibieron además Desferrioxamina (Dfx) (75mg/kg, i.p.) 72, 48, 24, y 1 hora antes del sacrificio. Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (□). Valor medio control  $0,133 \pm 0,012$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Dfx respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Dfx respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La administración de Desferrioxamina a animales controles no tuvo efecto sobre la actividad de ALA-S. Cuando se suministró a animales tratados con Gris tampoco impidió la inducción de 60% ( $p < 0,01$ ) producida por el antimicótico.

En la [Tabla IV.1](#) se muestran los efectos sobre la acumulación de PROTO IX en el hígado. El contenido de PROTO IX no se modificó por el tratamiento con Desferrioxamina en animales controles. Su administración conjuntamente con Gris tampoco tuvo efecto sobre el incremento de 46 veces de los niveles de PROTO IX producido por la Gris ([Tabla IV.1](#))

**Tabla IV.1: Efecto de la Desferrioxamina sobre el nivel de PROTO IX en hígado de ratones intoxicados con Gris**

	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)	
	sin Desferrioxamina	con Desferrioxamina
<b>Gris</b>		
<b>Sin</b>	0,41 ± 0,07	0,45 ± 0,09
<b>Con</b>	23,41 ± 3,98 **	18,73,41 ± 3,45 ** <sup>††</sup>

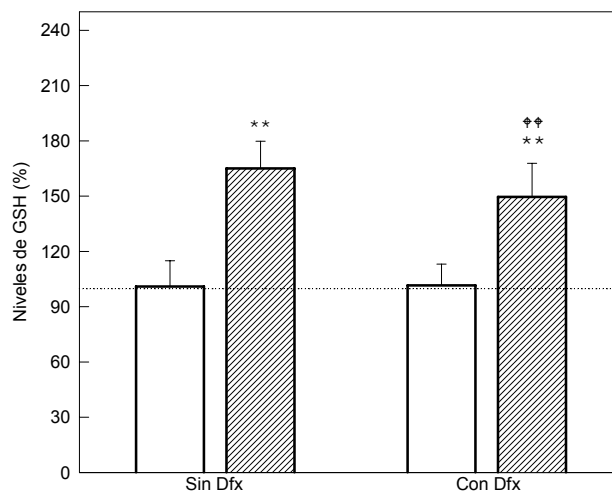
Los resultados muestran el promedio de 8 animales y se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más Dfx respecto del grupo control: (\*\*) $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más antioxidante con respecto al grupo tratado con antioxidante: (††) $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.1](#) y en Materiales y Métodos.

#### **IV.2.3. EFECTO SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y LA ENZIMA DEL SISTEMA METABOLIZANTE DE DROGAS DE FASE II, GST**

Las [Figuras IV.2, IV.3 y IV.4](#) muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Desferrioxamina sobre los niveles de GSH hepático, las actividades enzimáticas de GRed y SOD y la actividad enzimática de la GST, respectivamente.

Cuando se administró Desferrioxamina a animales controles no se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH ([Figura IV.2](#)) ni en las actividades enzimáticas de GRed ([Figura IV.3.a](#)) ni de SOD ([Figura IV.3.b](#)), aunque se produjo un aumento de la actividad de la GST del 38% ( $p < 0,01$ ) con respecto al grupo que no recibió este compuesto ([Figura IV.4](#)).

Los niveles de GSH en los ratones tratados con Gris más Desferrioxamina fueron los mismos que los del grupo tratado sólo con Gris, donde se había observado un aumento del 50% ( $p < 0,01$ ) ([Figura IV. 2](#)).



**Figura IV.2.: Efecto de la Desferrioxamina sobre los niveles de Glutation**

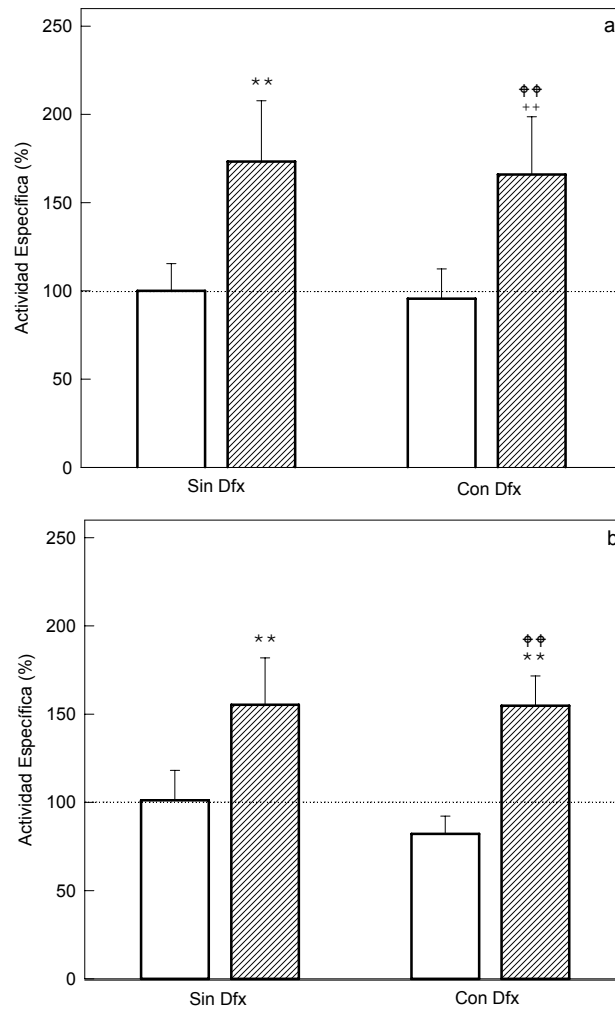
Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% Los niveles de GSH del grupo control (.....). Valor medio control  $26,2 \pm 3,6$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Dfx respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Dfx respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (♦♦)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.1](#) y en Materiales y Métodos.



Las actividad enzimática de GRed se incrementó alrededor del 50% ( $p < 0,01$ ) en los grupos que recibieron Gris, ya sea sola o con Desferrioxamina. ([Figura IV. 3a](#)).

La actividad de SOD se mantuvo inducida (70%, ( $p < 0,01$ ), independiente de que los animales recibieran Gris o Gris más Desferrioxamina ([Figura IV.3b](#)).



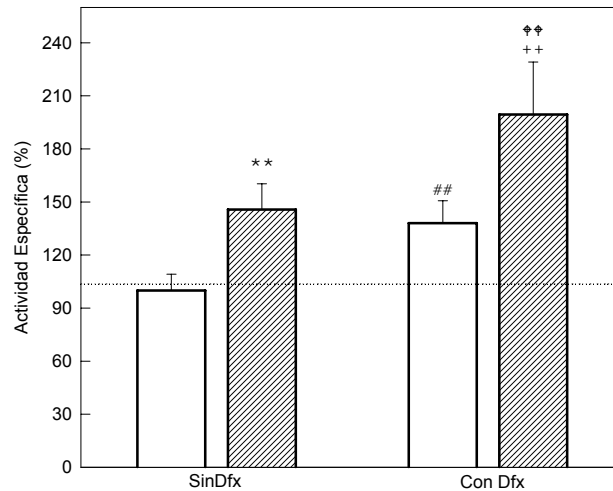


**Figura IV.3: Efecto de la Desferrioxamina sobre las actividades enzimáticas de Glutathione Reductasa (a), Superóxido Dismutasa (b)**

Control  Gris 

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (□). Valor medio control GRed:  $39,60 \pm 6,13$  nmol/mg, SOD:  $75,64 \pm 12,8$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Dfx respecto del grupo control: (\*\*).  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Dfx con respecto del grupo que recibió Gris: (††)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Dfx respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.1](#) y en Materiales y Métodos

La actividad de la GST aumentó un 37% adicional ( $p < 0,01$ ) por el tratamiento con Desferrioxamina en relación al grupo que sólo recibió el antimicótico. (Figura IV.4)



**Figura IV.4:** Efecto de la Desferrioxamina sobre la actividad enzimática de Glutathione-S-Transferasa.

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $46,79 \pm 4,30$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Dfx respecto del grupo control: (\*\*) $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Dfx con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cim con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Dfx respecto del grupo tratado sólo con antioxidante: (◆◆)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura IV.1 y en Materiales y Métodos

#### IV.2.4 CONCLUSIONES

La Desferrioxamina es un quelante del hierro que se ha utilizado en pacientes con uroporfiria y con PCT, y en diferentes modelos animales de porfiria, con resultados contradictorios. En algunos estudios la Desferrioxamina contribuyó a aumentar la excreción urinaria de precursores y de porfirinas, disminuyendo la actividad del ALA-S,

mientras que en otros casos no produjo efectos relevantes (Muñoz *et al.*, 1990; Stockenhuber *et al.*, 1990; Rocchi *et al.*, 1991; van Gelder *et al.*, 1993).

En el presente estudio la Desferrioxamina no tuvo ningún efecto sobre la inducción de ALA-S ni disminuyó el contenido hepático de PROTO IX, ambos parámetros aumentados por la Gris.

Cuando se evaluaron los efectos de la Desferrioxamina adicionada a la Gris, sobre el sistema antioxidante, únicamente se detectó un aumento en la actividad de GST.

Por lo tanto, la administración de Desferrioxamina no modificó las alteraciones en la biosíntesis del hemo producidas por la Gris; tampoco mejoró el cuadro de estrés oxidativo ni el daño hepático causado por el antimicótico.

Estos resultados podrían indicar que el hierro no sería el único factor responsable del estado de estrés oxidativo ya que su eliminación del medio celular, mediante un quelante específico como la Desferrioxamina, no redujo el daño hepático.

## **IV. 3 TRATAMIENTO CON CIMETIDINA**

### **IV.3.1 INTRODUCCIÓN**

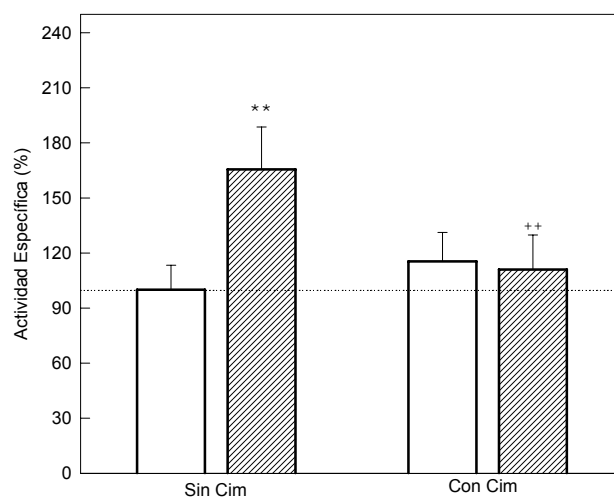
La Cimetidina, es un antagonista del receptor de histamina H<sub>2</sub>, se utiliza en el tratamiento de úlceras pépticas, en ataques de porfiria aguda y en porfirias cutáneas tales como PCT y PPE (Tanigawa *et al.*, 1994; Horie *et al.*, 1995, 1996).

La Cimetidina (N - Ciano- N' - metil - N'' - [2 - [[(5-metil-1H-imidazol-4-il)metil] tio] etil] guanidina) se utiliza en el tratamiento de la PAI debido a que inhibe la actividad de ALA-S y de la HO hepática (Marcus *et al.*, 1984; Baccino *et al.*, 1989; Horie *et al.*, 1995). También se ha demostrado su capacidad para reducir la excreción urinaria de URO y COPRO, así como para reducir las actividades de  $\gamma$ -GT, GOT y GPT y ferritina en el suero de pacientes con PCT (Horie, *et al.*, 1996). Yamamoto *et al.* (1993) observaron que la Cimetidina administrada en forma oral también reduce los niveles de PROTO IX en eritrocitos de pacientes con PPE. Por lo tanto, resultó de interés investigar el efecto de la Cimetidina vía oral (72 mg/ml, en el agua de bebida) sobre el camino biosintético del hemo y el sistema de defensa antioxidante en ratones tratados con Gris.

### IV.3.2 EFECTO SOBRE EL CAMINO BIOSINTÉTICO DEL HEMO

La [Figura IV.5](#) muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Cimetidina sobre la actividad del ALA-S.

La administración de Cimetidina a animales controles no produjo diferencias significativas en la actividad de ALA-S. En cambio cuando se suministró junto con Gris disminuyó en un 33% ( $p < 0,01$ ) la inducción ocasionada por el antimicótico, alcanzando los niveles basales.



**Figura IV.5:** Efecto de la Cimetidina sobre la actividad del Ácido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa

Control  Gris

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) durante 14 días, recibieron además Cimetidina (Cim) en el agua de bebida (72mg/ml). Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $0,205 \pm 0,027$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cim respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

En la Tabla IV.2 se muestran los efectos sobre la acumulación de PROTO IX en el hígado.

**Tabla IV.2:** Efecto de la Cimetidina sobre el nivel de PROTO IX en hígado de ratones intoxicados con Gris

Gris	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)	
	sin Cimetidina	con Cimetidina
sin	0,45 ± 0,09	0,38 ± 0,07
con	21,2 ± 2,80 **	0,54 ± 0,10 ++

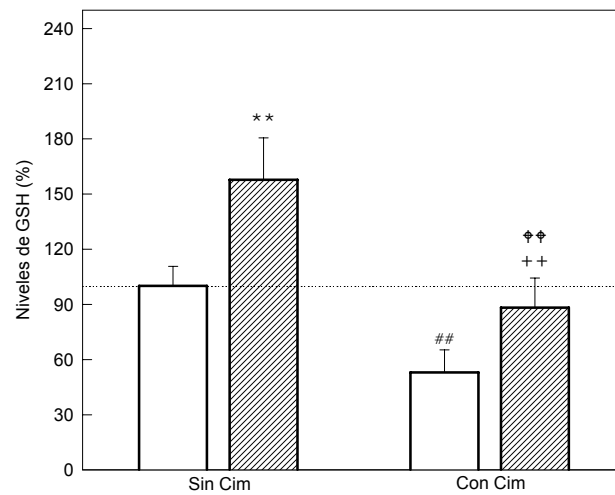
Los resultados muestran el promedio de 8 animales y se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cim respecto del grupo control: (\*\*)  
p<0,01. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado con Gris: (++) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura IV.4 y en Materiales y Métodos.

En los grupos que recibieron Cimetidina, sola o con Gris, el contenido de PROTO IX hepática fue similar a los valores basales produciendo, de esta forma, una disminución significativa (p<0,01) en la cantidad de porfirinas que acumula la Gris en el hígado.

### IV.3.3 EFECTO SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y LA ENZIMA DEL SISTEMA METABOLIZANTE DE DROGAS DE FASE II, GST

Las Figuras IV.6, IV.7 y IV.8 muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Cimetidina sobre los niveles de GSH en hígado, las actividades enzimáticas de GRed y SOD y la actividad enzimática de GST, respectivamente.

Los niveles de GSH en el grupo control disminuyeron un 50% (p<0,01) por efecto de la administración de Cimetidina. Cuando este compuesto se suministró junto con Gris los niveles de GSH retornaron a los valores basales, compensando así, el aumento del 65% (p<0,01) causado por la Gris (Figura IV.6).

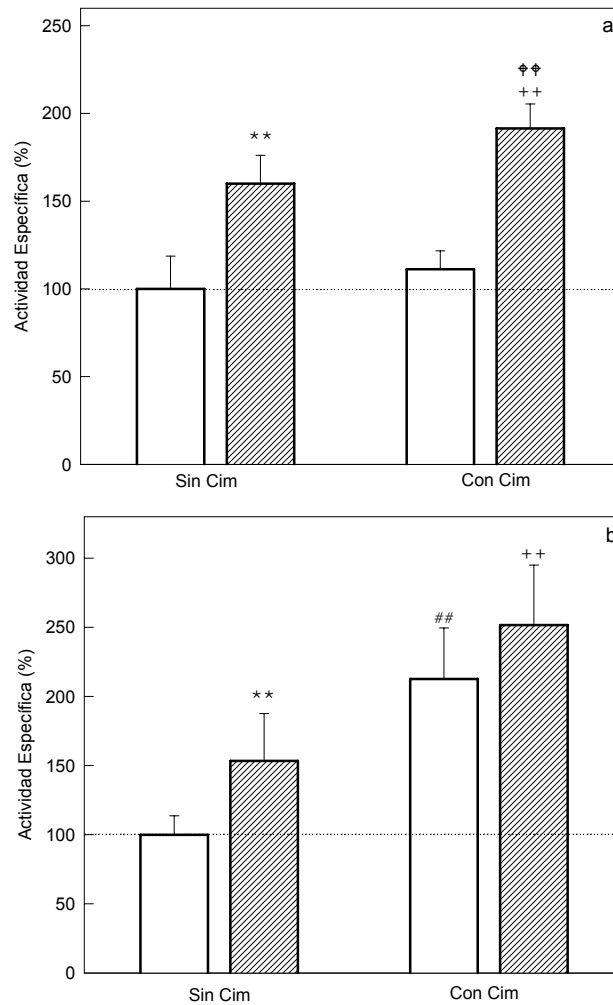


**Figura IV.6.: Efecto de la Cimetidina sobre los niveles de Glutacion Reducido en ratones intoxicados con Gris.**

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $28,46 \pm 3,04$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cim respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cim con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado sólo con Cim: (@@)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura IV.4](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de la GRed no se modificó cuando se administró Cimetidina a animales controles, mientras que cuando los ratones recibieron Cimetidina junto con Gris la actividad enzimática aumentó un 20% ( $p < 0,01$ ), con respecto al grupo que sólo recibió el antimicótico. ([Figura IV. 7a](#)).



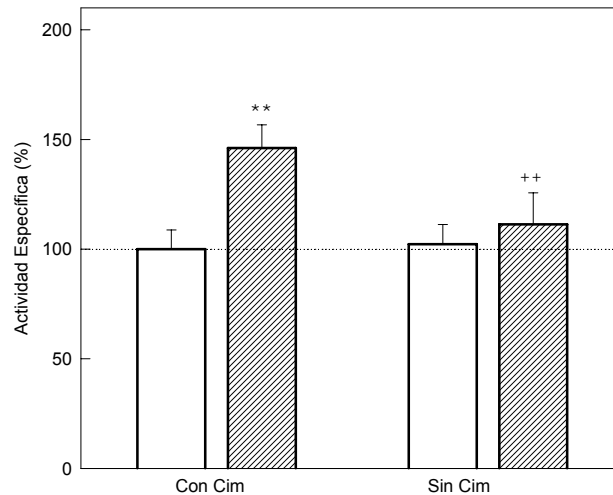
**Figura IV.7:** Efecto de la Cimetidina sobre las actividades enzimáticas de Glutathione Reductasa (a) y Superóxido Dismutasa (b)

Control Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control GRed:  $50,12 \pm 9,40$  nmol/mg y SOD:  $78,45 \pm 10,79$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cim respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cim con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado sólo con Cim: (††)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado con Gris: (†††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.4](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de la SOD se incrementó 112% ( $p<0,01$ ) cuando la Cimetidina se administró a animales controles. Por otro lado, la administración de este compuesto junto con Gris produjo un aumento de la actividad enzimática del 64% ( $p<0,01$ ) por encima de los valores que se obtuvieron en el grupo que sólo recibió Gris (Figura IV.7b).

La actividad de la GST se mantuvo en los niveles basales cuando la Cimetidina se suministró sola o con Gris, revirtiendo así la inducción del 46% ( $p<0,01$ ) provocada por la Gris (Figura IV. 8).



**Figura IV.8:** Efecto de la Cimetidina sobre las actividades enzimáticas de Glutathione-S-Transferasa

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $52,52 \pm 4,60$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cim respecto del grupo control: (\*\*)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cim con respecto del grupo control: (##)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado sólo con Cim: (◆◆)  $p<0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cim respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p<0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura IV.4 y en Materiales y Métodos.



#### **IV.3 4 CONCLUSIONES**

En este estudio observamos que la administración de Cimetidina evitó el aumento de actividad del ALA-S y la acumulación de PROTO IX hepática que produce la Gris.

Se ha descrito que la Cimetidina disminuye la excreción urinaria de ALA en pacientes con PAI (Horie *et al.*, 1987). El efecto inhibitorio de la Cimetidina sobre la síntesis del CYP hepático y la actividad de la HO se debe a la disminución del consumo de hemo con la consecuente inhibición del ALA-S a través de un mecanismo de feedback negativo (Baccino *et al.*, 1989; Siepmann *et al.*, 1993; Rogers, 1997).

La Cimetidina disminuyó el contenido de GSH hepático evitando el aumento de los niveles del tripéptido que produjo la Gris. Por otro lado, si bien fue capaz de disminuir la actividad enzimática de la GRed en animales controles, no pudo impedir la inducción de la enzima que produce la Gris. Tampoco modificó la inducción de las actividades de SOD y de GST provocada por el antimicótico.

Por lo tanto, si bien la Cimetidina revierte las alteraciones en el camino biosintético del hemo y mejora levemente el daño hepático producido por la Gris, no es capaz de revertir el daño oxidativo causado por la Gris. Este último hecho podría deberse a que la Cimetidina dificulta la eliminación de drogas que son metabolizadas en el hígado por monooxigenasas microsomales, probablemente a través de la unión al grupo hemo del CYP (Klotz & Reimann, 1980; Patwardhan *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1981; Speeg *et al.*, 1982). Dado que la Gris se metaboliza a través del CYP, el tratamiento con Cimetidina podría alterar la degradación de dicha droga y de esta forma impedir la reversión del daño oxidativo, a pesar de aumentar la excreción de PROTO IX.

#### **IV. 4 TRATAMIENTO CON COLESTIRAMINA**

##### **IV.4.1 INTRODUCCIÓN**

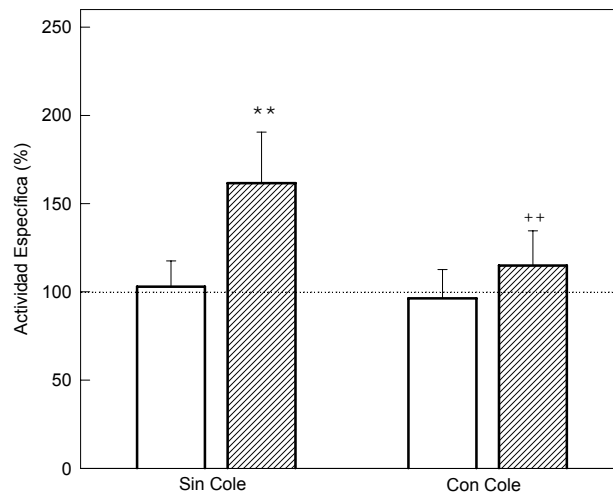
Como hemos señalado, la Colestiramina es una resina de intercambio iónico que a nivel intestinal bloquea el ciclo enterohepático de las sales biliares impidiendo que se reabsorba la PROTO IX (Poh-Fitzpatrick, 1978; Van Hattum *et al.*, 1986).

Por lo tanto, fue de interés investigar el efecto de la Colestiramina sobre el camino biosintético del hemo y el sistema de defensa antioxidante en ratones intoxicados con Gris.

#### IV.4.2 EFECTO SOBRE EL CAMINO BIOSINTÉTICO DEL HEMO

La Figura IV.9 muestra los resultados obtenidos al investigar el efecto de la Colestiramina sobre la actividad del ALA-S.

La administración de Colestiramina a animales controles no alteró la actividad de ALA-S, sin embargo cuando se la administró junto con Gris impidió la inducción de 60% ( $p < 0,01$ ) en la actividad enzimática inducida por la Gris.



**Figura IV.9:** Efecto de la Colestiramina sobre la actividad enzimática del Acido  $\delta$ -aminolevúlico Sintetasa en ratones intoxicados con Gris. .

Control  Gris

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) sola o Gris más Colestiramina (Cole) (0,125% p/p). durante 14 días. Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $0,218 \pm 0,032$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

En la [Tabla IV.3](#) se muestran los efectos de la Colestiramina sobre la acumulación de PROTO IX en el hígado.

**Tabla IV.3: Efecto de la Colestiramina sobre el nivel de PROTO IX en hígado**

Gris	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)	
	sin Colestiramina	con Colestiramina
sin	0,42 ± 0,05	0,39 ± 0,08
con	20,4 ± 3,21 **	13,04 ± 2,79 ++ ††

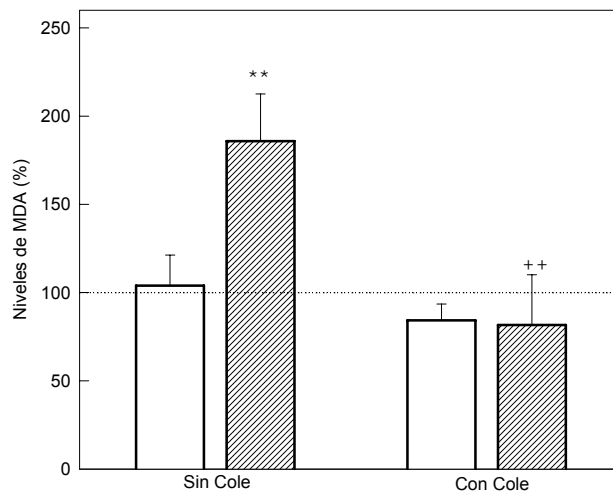
Los resultados muestran el promedio de 8 animales y se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*).  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Cole con respecto al grupo tratado con Cole: (††)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.7](#) y en Materiales y Métodos.

El tratamiento con Colestiramina no modificó el contenido de PROTO IX hepática en los animales controles, pero su administración junto con Gris disminuyó en un 36% ( $p < 0,05$ ) el aumento que produce el antimicótico, aunque sin alcanzar los niveles basales ([Tabla IV.3](#))

#### IV.4.3 EFECTO SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y LA ENZIMA DEL SISTEMA METABOLIZANTE DE DROGAS DE FASE II, GST

Las [Figuras IV.10, IV.11, IV.12 y IV.13](#) muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la Colestiramina sobre los niveles de MDA y GSH, las actividades enzimáticas de GRed y SOD y la actividad enzimática de GST, respectivamente.

La administración de Colestiramina, sola o con Gris, no produjo diferencias significativas en los niveles de MDA con respecto a los animales que no recibieron tratamiento. De manera que la Colestiramina disminuyó un 44% ( $p < 0,01$ ) el aumento del contenido de MDA que había provocado el antimicótico ([Figura IV. 10](#)).

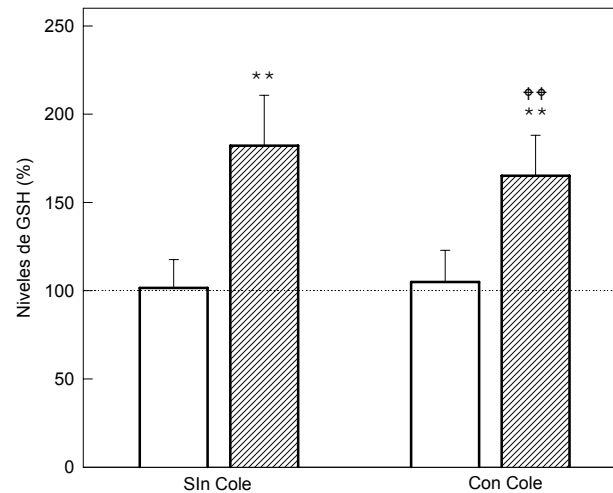


**Figura IV.10:** Efecto de la Colestiramina sobre los niveles de Malóndialdehído en ratones intoxicados con Gris.



Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA del grupo control (---). Valor medio control  $3,29 \pm 0,57$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura IV.7](#) y en Materiales y Métodos.

El contenido de GSH no se modificó significativamente cuando a ratones controles se les suministró Colestiramina, mientras que cuando se la administró junto con Gris tampoco pudo evitar el aumento del 80% ( $p < 0,01$ ) inducido por el antimicótico ([Figura IV.11](#)).



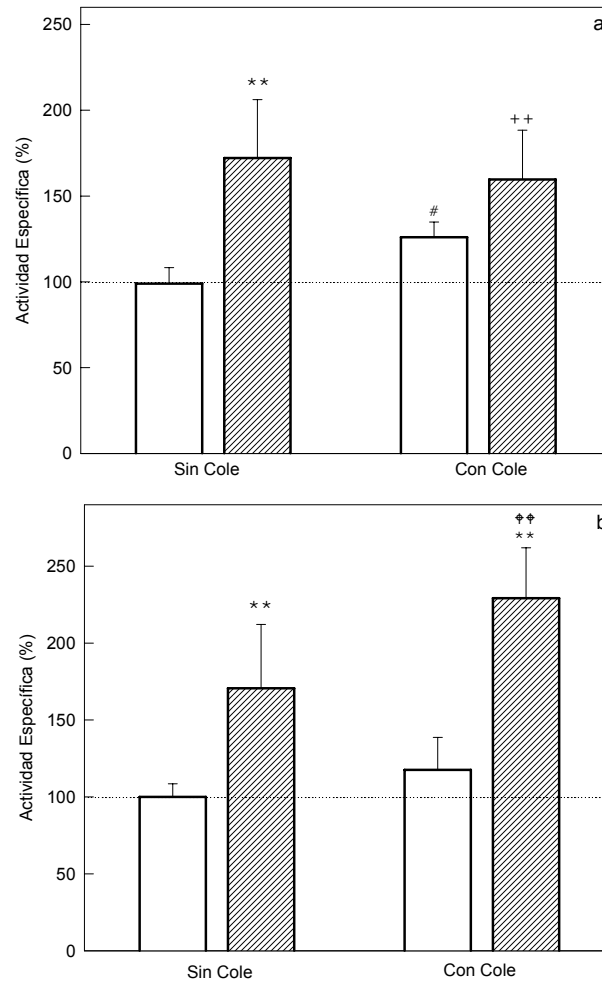
**Figura IV.11:** Efecto de la Colestiramina sobre los niveles de Glutacion Reducido en ratones intoxicados con Gris.

Control  Gris 



Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de GSH del grupo control (---). Valor medio control  $25,47 \pm 4,09$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (◆◆)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado sólo con Cim: (◆◆)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la [Figura IV.7](#) y en Materiales y Métodos.

La administración de Colestiramina a animales controles provocó un aumento del 25% ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la GRed ([Figuras IV.12.a](#)), mientras que no produjo diferencias significativas en las actividades de SOD ([Figuras IV.12.b](#)) ni de GST ([Figuras IV.13](#)).

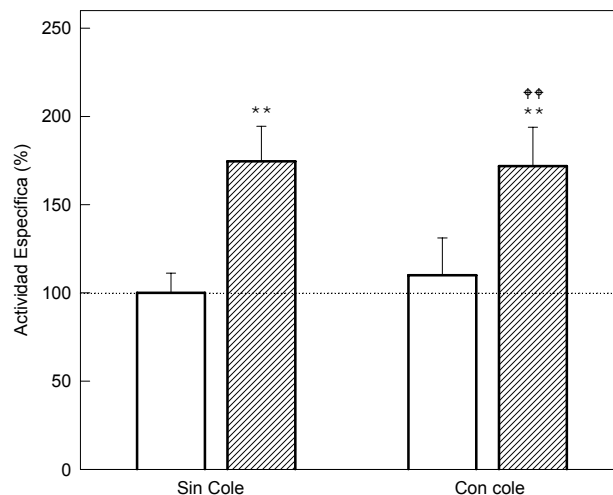
Cuando la resina se suministró con Gris no pudo impedir la inducción de las actividades de las tres enzimas causada por el antimicótico.



**Figura IV.12:** Efecto de la Colestiramina sobre las actividades enzimáticas de Glutathione Reductasa (a) y Superóxido Dismutasa (b)

Control  Gris 

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control GRed:  $42,44 \pm 3,94$  nmol/mg y SOD:  $77,32 \pm 6,65$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cole con respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado sólo con Cim: (††)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.7](#) y en [Materiales y Métodos](#).



**Figura IV.13:** Efecto de la Colestiramina sobre la actividad enzimática Glutathione-S-Transferasa

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control  $42,28 \pm 4,73$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Cole respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Cole con respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado sólo con Cim: (♦♦)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Cole respecto del grupo tratado con Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura IV.7](#) y en Materiales y Métodos.

#### IV.4.4 CONCLUSIONES

La Colestiramina no evitó el aumento de la actividad del ALA-S, que produjo la Gris, pero redujo significativamente la cantidad de PROTO IX acumulada en el hígado, aunque sin llegar a los niveles basales. Se ha descrito que el tratamiento con la resina, sola o combinada con ácidos biliares, en pacientes con PPE y con afección hepática produjo un incremento de la excreción fecal de PROTO IX (Mc Cullough *et al.*, 1988; Wagner *et al.*, 1989; Steinmüller *et al.*, 1992)

La disminución de la cantidad de porfirina hepática se tradujo en una reducción de la peroxidación lipídica en los animales tratados con Gris más la resina.

La Colestiramina mantuvo elevados los niveles de GSH y las actividades enzimáticas de la GRed, la SOD y la GST que indujo la Gris.

Por lo tanto, si bien la Colestiramina es capaz de evitar, parcialmente, la acumulación de PROTO IX, responsable en gran medida del daño oxidativo que se produce en el hígado por el tratamiento con Gris, no revierte totalmente los efectos dañinos producidos por el antimicótico.

#### **IV. 5 REFERENCIAS**

- Baccino E, Lan Cheong Wah LSH, Bressollette L, Mottier D. (1989). Cimetidine in the treatment of acute intermittent porphyria. *JAMA*. 262 (21): 3000.
- Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. (1996). The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br. J. Cancer* 74: 688-697.
- Bloomer JR. (1992). The liver in protoporphyria. *Hepatology* 8: 402-407
- Bloomer JR, Pierach CA. (1982). Effect of hematin administration to patients with protoporphyria and liver disease. *Hepatology*. 2(6): 817-821.
- Horie Y, Udagawa M, Hirayama C. (1987). Clinical usefulness of Cimetidine for the treatment of acute intermittent porphyria - a preliminary report. *Clin. Chim. Acta* 167: 267-261.
- Horie Y, Okano J, Kitaoka S, Tajima F, Kawasaki H. (1995). Treatment of the porphyrias. *Nippon Rinsho*. 53(6): 1456-1462.
- Horie Y, Tanaka K, Okano J, Ohgi N, Kawasaki H, Yamamoto S, Kondo M, Sassa S. (1996). Cimetidinaetidine in the treatment of Porphyria Cutanea Tarda. *Intern. Med.* 35(9): 717-719.
- Ishibashi A, Ogata R, Sakisaka S, Kumashiro R, Koga Y, Mitsuyama K, Kuromatsu R, Uchimura Y, Ijyuin H, Tanaka K, Iwao T, Ishii K, Sata M, Inoue Y, Kin Y, Oizumi K, Nishida H, Imaizumi T, Tanikawa K. (1999). Erythropoietic protoporphyria with fatal liver failure. *J. Gastroenterol.* 34(3): 405-409.
- Klotz U, Reimann I. (1980). Delayed clearance of diazepam due to Cimetidine. *N Engl. J. Med.* 302: 1012-1014
- Marcus DL, Halbrecht JL, Bourque AL, Lew G, Nadel H, Freedman ML. (1984). Effect of Cimetidine on 5-aminolevulinic acid synthetase and microsomal oxygenase in the liver. *Biochem Pharmacol* 33: 2005-2008
- McCullough AJ, Barron D, Mullen KD, Petrelli M, Park MC, Mukhtar H, Bickers DR. (1988). Fecal protoporphyrin excretion in erythropoietic protoporphyria: effect of cholestyramine and bile acid feeding. *Gastroenterology*. 94(1): 177-181
- Muñoz JJ, Garcia-Cabezas J, Martinez-Verano J, Perez-Oteyza C, Enriquez de Salamanca R. (1990). Desferrioxamine in the treatment of porphyria cutanea tarda: ineffectiveness of intramuscular administration. *J. Dermatol.* 17(5): 329-331



- Patwardhan RV, Johnson RF, Sinclair AP, Schenker S, Speeg KV Jr. (1981). Lack of tolerance and rapid recovery of Cimetidine inhibited chlordiazepoxide (Librium) elimination. *Gastroenterology* 81: 547-551.
- Poh-Fitzpatrick, MB. (1978). Erythropoietic protoporphyria. *Int. J. Dermatol.* 17: 359-369.
- Roberts RK, Grice J, WoodL, PetroffV, McGuffie C. (1981). Cimetidine impairs the elimination of theophylline and antipyrine. *Gastroenterology* 81: 19-21.
- Rocchi E, Cassanelli M, Borghi A, Paolillo F, Pradelli M, Pellizzardi S, Vezzosi A, Gallo E, Baccarani Contri M, Ventura E. (1991). Liver iron overload and desferrioxamine treatment of porphyria cutanea tarda. *Dermatologica.* 182(1): 27-31
- Rogers PD. (1997). Cimetidine in the treatment of acute intermittent porphyria. *Ann. Pharmacother.* 31: 365-367.
- Siepmann M, Stolzel U, Sieg I, Leo-Rossberg I, Riecken EO, Doss MO. (1993). Cimetidine in treatment of acute intermittent porphyria. *Z. Gastroenterol.* 31: 246-249.
- Speeg KV, Patwardhan RV, Avant GR, Mitchell MC, Schenker S. (1982). Inhibition of microsomal drug metabolism by histamine H2-receptor antagonists studied in vivo and in vitro in rodents. *Gastroenterology* 82: 89-96.
- Spiva DA, Lewis CE. (1984). Erythropoietic protoporphyria: therapeutic response to combined erythrocyte exchange and plasmapheresis. *Photodermatol.* 1(5): 211-220.
- Steinmüller T, Doss MO, Steffen R, Blumhardt G, Bechstein WO, Frank M, Sieg I, Kretschmar R, Neuhaus P. (1992). Liver transplantation in erythrohepatic protoporphyria. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 117(28-29): 1097-1102.
- Stockenhuber F, Kurz R, Grimm G, Moser G, Balcke P. (1990). Successful treatment of hemodialysis-related porphyria cutanea tarda with deferoxamine. *Nephron.* 55(3): 321-324
- Tanigawa K, Yamashita S, Nakata K, Nagataki S. (1994). Cimetidine in erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Gastroenterol.* 89(5): 811-812.
- Van Hattum J, Baart de la Faille H, Van den Berg JW, Edixhoven-Bosdijk A, Wilson JH. (1986). Chenodeoxycholic acid therapy in erythrohepatic protoporphyria. *J. Hepatol.* 3(3): 407-412.
- van Gelder W, Siersema PD, Voogd A, de Jeu-Jaspars NC, van Eijk HG, Koster JF, de Rooy FW, Wilson JH. (1993). The effect of desferrioxamine on iron metabolism and lipid peroxidation in hepatocytes of C57BL/10 mice in experimental uroporphyrin. *Biochem. Pharmacol.* 46(2): 221-228
- van Wijk HJ, van Hattum J, Baart de la Faille H, van den Berg JW, Edixhoven-Bosdijk A, Wilson JH. (1988). Blood exchange and transfusion therapy for acute cholestasis in protoporphyria. *Dig. Dis. Sci.* 33(12): 1621-1625.
- Wagner S, Doss MO, Wittekind C, Bäcker U, Meessen D, Schmidt FW. (1989). Erythrohepatic protoporphyria with rapidly progressing liver cirrhosis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 14(47): 1837-1841.
- Yamamoto S, Hirano Y, Horie Y. (1993). Cimetidine reduces erythrocyte protoporphyrinin erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Gastroenterol.* 88: 1465-1466.

# CAPÍTULO V

## TRATAMIENTO CONJUNTO CON ÁCIDOS BILIARES Y POLIFENOLES

### V.I INTRODUCCIÓN

En el Capítulo II de esta sección hemos observado que ninguno de los antioxidantes estudiados fue capaz de impedir, totalmente, el estado de estrés oxidativo producido por la Gris. Sin embargo, el Tx, y el Asc, solos o combinados, y los polifenoles ensayados produjeron efectos beneficiosos sobre los animales intoxicados con el antimicótico.

En el Capítulo III de esta misma sección, se llegó a la conclusión que el ADx fue el único de los ácidos biliares que aumentó la excreción fecal de PROTO IX y disminuyó su contenido en hígado. También evitó el aumento de MDA, el incremento del contenido de GSH y la inducción de las actividades de la SOD y la GST provocados por la Gris.

Existen numerosos estudios, tanto en humanos como en animales, sobre el uso de antioxidantes en diferentes tipos de porfirias (Thunell *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1997; Gorman *et al.*, 2007; Székely *et al.*, 2007), sin embargo también se ha documentado que tanto el Tx, como la vitamina E, y el Asc poseen efectos pro-oxidantes además de sus propiedades antioxidantes (Ko *et al.*, 1994; Poljšak & Raspor, 2007). Por lo que la aplicación de estos antioxidantes como agentes terapéuticos debe considerarse con precaución (Ko *et al.*, 1994).

Si bien todos los polifenoles estudiados produjeron efectos similares sobre los parámetros analizados, se consideró que el ácido Clorogénico fue el más beneficioso sobre el sistema de defensa antioxidante.

Considerando que las porfirinas acumuladas en el hígado podrían ser la mayor causa del daño oxidativo que produce la Gris, se decidió estudiar si la administración simultánea de polifenoles y compuestos capaces de acelerar la excreción de porfirinas, tales como los ácidos biliares, podrían reducir el daño hepático observado en los animales tratados con el antimicótico.

Para ello se evaluaron los efectos del tratamiento conjunto de ADx con ácido Clorogénico sobre los ratones intoxicados con Gris y se compararon con los resultados

obtenidos luego del tratamiento con Urso, el ácido biliar que produjo menor excreción de porfirinas, con el mismo polifenol.

## V.2 TRATAMIENTO CON ACIDO DESOXICÓLICO Y ÁCIDO CLOROGÉNICO

En la Tabla V.1 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del tratamiento con ADx más ácido Clorogénico sobre el contenido de PROTO IX hepático.

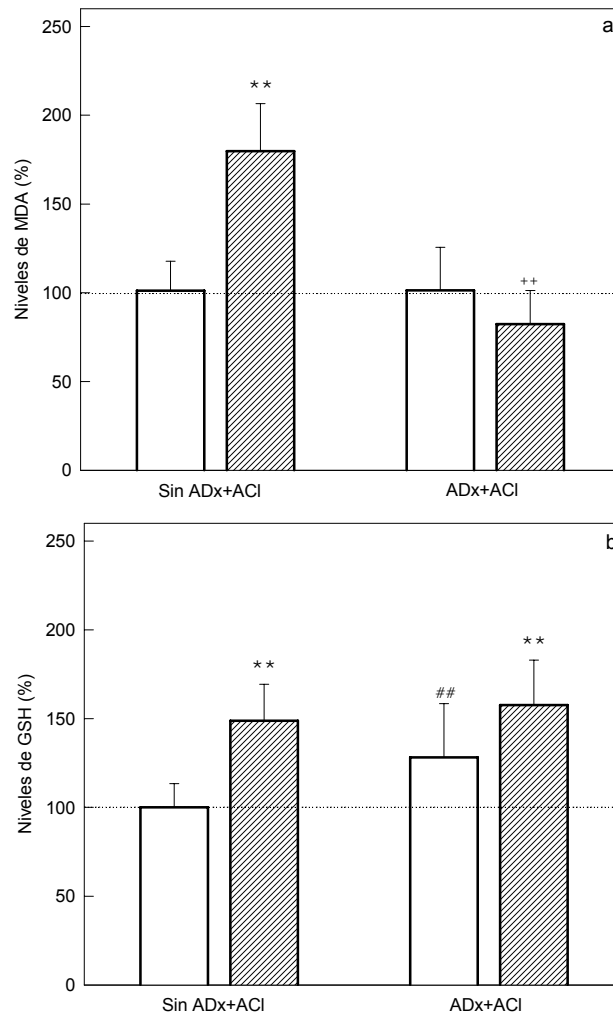
**Tabla IV.1: Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Desoxicólico y Ácido Clorogénico sobre los niveles de PROTO IX en hígado**

Gris	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)	
	sin ADx +Clorogénico	con ADx + Clorogénico
Sin	0,45 ± 0,08	0,49 ± 0,07
Con	21,31 ± 2,82 **	0,98 ± 0,17 <sup>††</sup>

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) durante 14 días, recibieron además ácido Desoxicólico (0,33% p/p) y ácido Clorogénico (50mg/l) (ADx+Cl). Los resultados se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más ADx y ACI respecto del grupo control: (\*\*\*) p<0,01. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más ADx y ACI con respecto al grupo tratado con antioxidante: (††) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Cuando los animales controles recibieron ADx junto con el polifenol no hubo diferencias significativas en el contenido de PROTO IX; mientras que cuando se administraron estos compuestos con Gris, los niveles de esta porfirina disminuyeron drásticamente (95%, p<0,01) con respecto a los animales que habían recibido el antimicótico solo.

La Figura V.1 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto del ADx más ácido Clorogénico sobre los niveles de MDA y el contenido de GSH.



**Figura V.1:** Efecto del tratamiento conjunto con *Ácido Desoxicólico* y *Ácido Clorogénico* sobre los niveles de *Malóndialdehido* (a) y *Glutation Reducido* (b)

Control  Gris

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5%p/p) durante 14 días, recibieron además ácido desoxicólico (0,33%p/p) y ácido Clorogénico (50mg/l) (ADx+Cl). Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA y GSH del grupo control (---), respectivamente. Valor medio control MDA:  $2,99 \pm 0,47$  nmol/mg, GSH:  $24,51 \pm 3,28$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ADx y ACI respecto del grupo control: (\*\*).  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris y Dfx respecto del grupo tratado sólo con ADx y ACI: (ΦΦ)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El contenido de MDA en el grupo control no se modificó por la administración de los compuestos estudiados. Cuando los animales recibieron ADx más ácido Clorogénico junto con Gris, los niveles de MDA disminuyeron un 45% ( $p < 0,01$ ) con respecto al grupo que sólo recibió Gris, alcanzando de esta forma los niveles basales (Figura V.1.a).

Los niveles de GSH aumentaron 28% ( $p < 0,01$ ) cuando se suministró ADx y ácido Clorogénico al grupo control. Cuando estos compuestos se administraron junto con Gris el contenido de GSH aumentó un 55% ( $p < 0,01$ ) con respecto a los niveles basales, por lo que no se produjeron diferencias significativas con respecto al grupo que sólo recibió Gris. (Figura V.1.b).

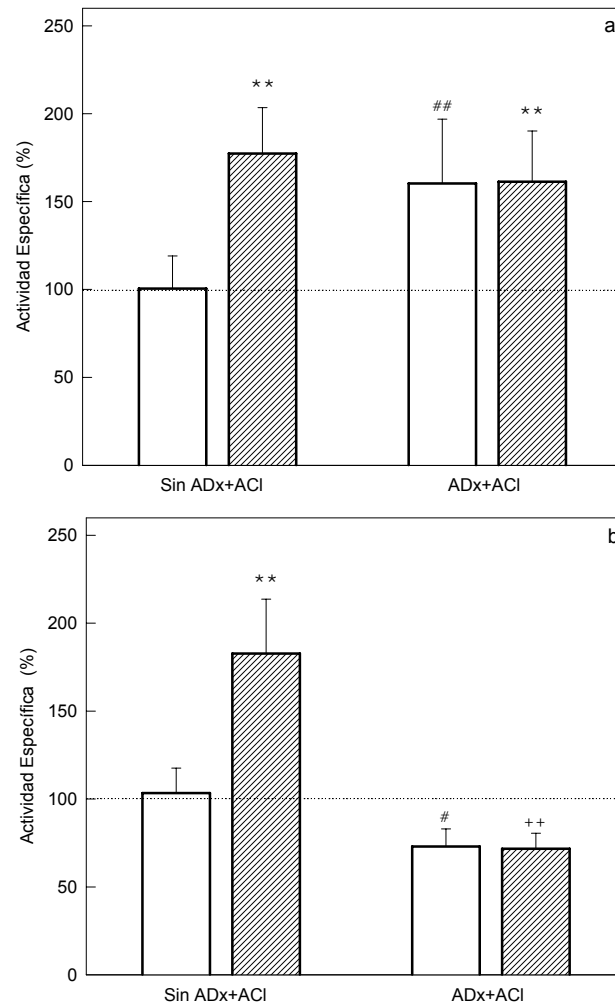
En la Figura V.2 se representaron los valores obtenidos al investigar el efecto del ADx junto con el ácido Clorogénico sobre las actividades de GRed y SOD.

La actividad de GRed aumentó alrededor del 60% ( $p < 0,01$ ) cuando se administraron los compuestos solos o junto con Gris. Estos valores fueron similares a los obtenidos en el grupo que sólo recibió el antimicótico (Figura V.2.a).

La actividad de SOD disminuyó un 30% ( $p < 0,01$ ) cuando administró el ADx más el ácido Clorogénico a los animales controles y a los tratados con Gris. De esta forma el tratamiento con estos compuestos en forma conjunta impidió el aumento del 80% ( $p < 0,01$ ) que produjo la Gris sobre la actividad de la enzima evaluada (Figura V.2.b).

En la Figura V.3 se muestran los valores obtenidos al estudiar el efecto de ADx y el ácido Clorogénico sobre la actividad de la GST.

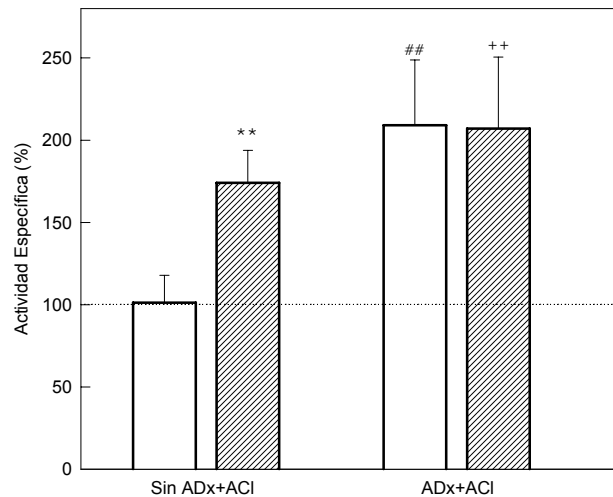
La actividad de la GST se incrementó en un 100% ( $p < 0,01$ ) cuando a animales controles o a los intoxicados con Gris se les administró ADx más ácido Clorogénico, por lo que el tratamiento no evitó la inducción de la actividad de la enzima producida por la Gris (Figura V.2.c).



**Figura V.2:** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Desoxicólico y Ácido Clorogénico sobre las actividades enzimáticas de Glutathione Reductasa (a) y Superóxido Dismutasa (b).

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control GRed.  $45,17 \pm 8,35$  nmol/mg, SOD:  $71,65 \pm 14,22$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ADx y ACI respecto del grupo control: (\*\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ADx y ACI con respecto del grupo control: (#)  $p < 0,05$ , (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más ACI con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura V.1](#) y en Materiales y Métodos.



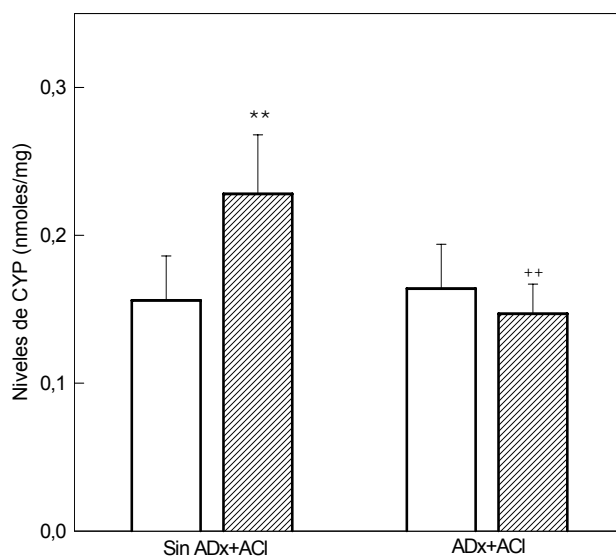
**Figura V.3** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Desoxicólico y Ácido Clorogénico sobre la actividad enzimática de la Glutathione-S-Transferasa

Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control GST:  $17,28 \pm 2,89$   $\mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más ADx y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con ADx y ACI con respecto del grupo control: (##)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Dfx con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura V.1](#) y en Materiales y Métodos.

En la [Figura V.4](#) se muestran los valores obtenidos al evaluar el efecto del ADx junto con ácido Clorogénico sobre el contenido de CYP hepático.

Cuando los compuestos estudiados se administraron a ratones controles no se observaron diferencias significativas en los niveles de CYP. El tratamiento con estos compuestos junto con Gris produjo una disminución del 35% ( $p < 0,01$ ) en el contenido de CYP, con respecto a los ratones que sólo recibieron el antimicótico, alcanzando de esta forma los niveles basales.



**Figura V.4:** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Desoxicólico y Ácido Clorogénico sobre los niveles de Citocromo P450.

Control  Gris

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  DE. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más los ADx y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más ADx y ACI con respecto del grupo que recibió Gris: (++)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura V.1](#) y en Materiales y Métodos.

### V.3 TRATAMIENTO CON ÁCIDO URSODEOXICÓLICO Y ÁCIDO CLOROGÉNICO

En la [Tabla V.2](#) se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del tratamiento con URSO más ácido Clorogénico sobre el contenido de PROTO XI hepático.

Cuando se administraron Urso y ácido Clorogénico a ratones controles no se observaron diferencias significativas en el contenido de PROTO IX; mientras que cuando se administraron estos compuestos con Gris, los niveles de porfirina fueron similares a los que se observaron en el grupo que sólo recibió el antimicótico.



**Tabla V.2.: Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Ursodeoxicólico y Ácido Clorogénico sobre los niveles de PROTO IX en hígado**

Gris	Contenido de PROTO IX (ng/mg de proteína)	
	sin Urso +Clorogénico	con Urso + Clorogénico
Sin	0,43 ± 0,08	0,56 ± 0,08
Con	20,93 ± 3,02 **	17,90 ± 1,65 ††

Los animales alimentados con dieta estándar o suplementada con Gris (0,5% p/p) durante 14 días, recibieron además ácido Ursodeoxicólico (0,20% p/p) y ácido Clorogénico (50mg/l) (Urso+Cl). Los resultados muestran el promedio de 8 animales y se expresan como el valor medio ± D.E. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o con Gris más Urso y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Urso y ACI con respecto al grupo tratado con Urso y ACI: (††)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

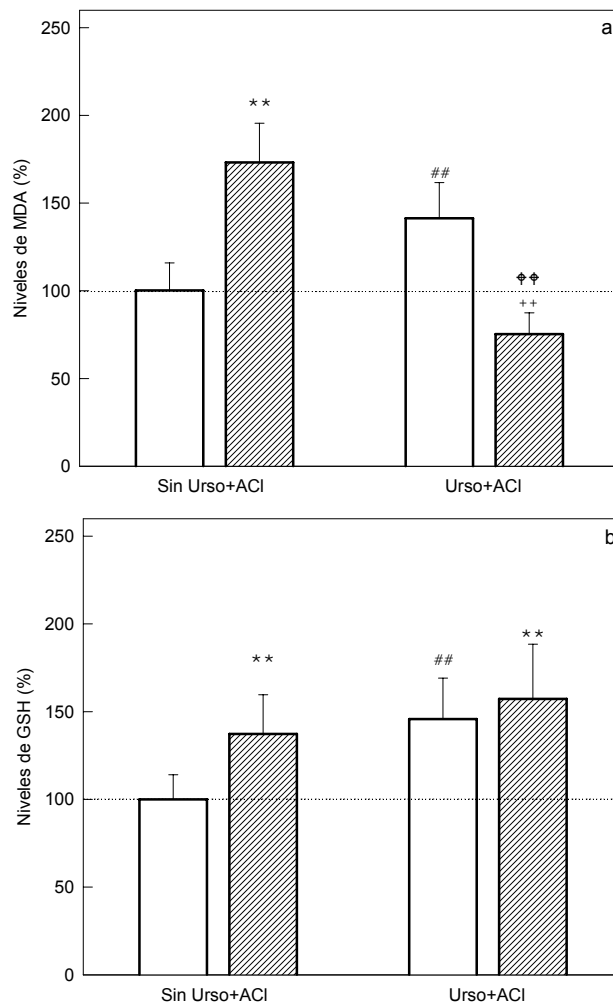
En la [Figura V.5](#) se representaron los resultados obtenidos cuando se estudiaron los efectos del Urso más ácido Clorogénico sobre los niveles de MDA y de GSH.

Los niveles de MDA en animales controles tratados con Urso más Clorogénico aumentaron un 40% ( $p < 0,01$ ); en cambio cuando estos compuestos se administraron junto con Gris el contenido de MDA disminuyó impidiendo el aumento producido por la Gris, llegando a valores aún inferiores a los basales ([Figura V.5.a](#)).

El contenido de GSH se incrementó alrededor del 50% ( $p < 0,01$ ) por la administración de los compuestos estudiados, tanto al grupo control como al que recibió conjuntamente Gris. De esta forma el ácido biliar más el polifenol no evitaron el incremento que produjo el antimicótico ([Figura V.5.b](#)).

En la [Figura V.6](#) se muestran los resultados obtenidos al evaluar los efectos del tratamiento con Urso más ácido Clorogénico sobre las actividades de GRed y SOD.

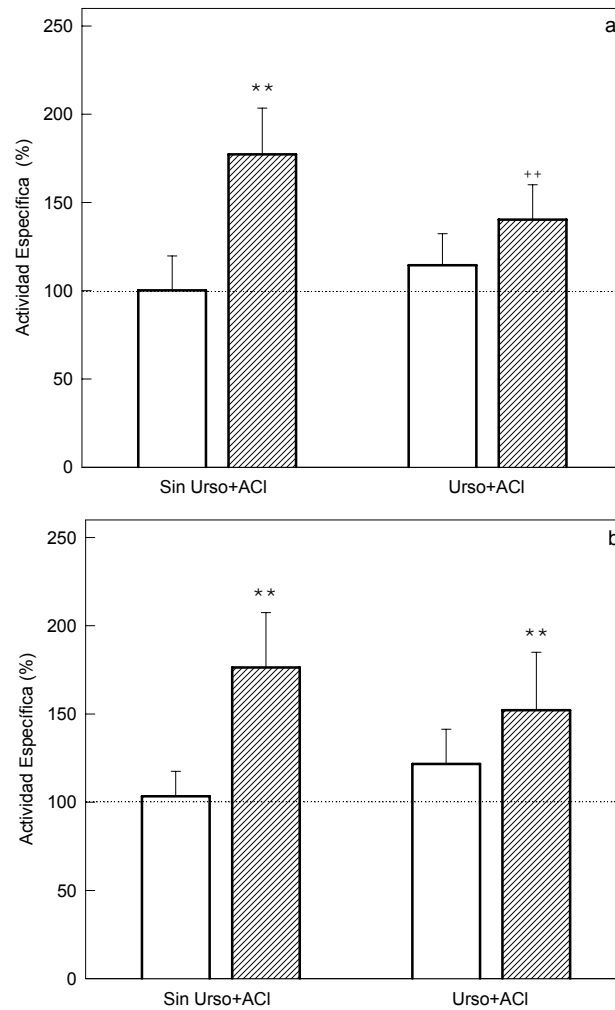
La actividad de GRed no se modificó significativamente cuando se suministró la combinación estudiada a animales controles. El tratamiento a animales intoxicados con Gris de Urso y Clorogénico, redujo 21% ( $p < 0,05$ ) la actividad inducida por la Gris ([Figura V.6.a](#)).



**Figura V.5:** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Ursodeoxicólico y Ácido Clorogénico sobre los niveles de Malondialdehído (a) y Glutation Reducido (b)

Control □ Gris ▨

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% los niveles de MDA y GSH del grupo control (□), respectivamente Valor medio control MDA:  $2,99 \pm 0,47$  nmol/mg, GSH:  $24,51 \pm 3,28$  nmol/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Urso y ACI respecto del grupo control: (\*\*). Diferencia significativa del grupo tratado con Urso y ACI con respecto del grupo control: (##). Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Urso y ACI con respecto al grupo tratado con Urso y ACI: (♦♦). Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Urso y ACI con respecto del grupo que recibió Gris: (++)). Los detalles experimentales se describen en la [Tabla V.1](#) y en Materiales y Métodos.



**Figura V.6: Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Ursodeoxicólico y Ácido Clorogénico sobre las actividades enzimáticas de Glutathione Reductasa (a) y Superóxido Dismutasa (b)**

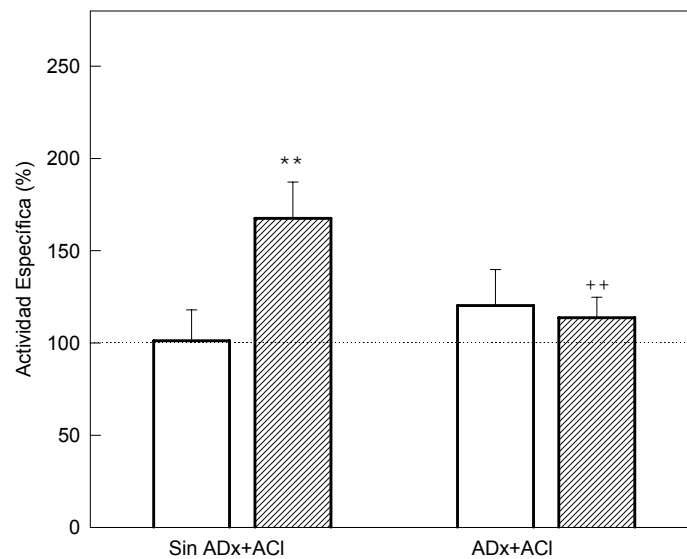
Control  Gris

Los resultados se expresan como porcentaje  $\pm$  DE tomando como 100% la actividad específica del grupo control (---). Valor medio control GRed.  $45,17 \pm 8,35$  nmol/mg, SOD:  $71,65 \pm 14,22$  U/mg. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Urso y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura V.4](#) y en Materiales y Métodos.

La actividad de SOD no sufrió alteraciones cuando se administró Urso más el polifenol a animales controles, mientras que tampoco evitó la inducción del 70% ( $p < 0,01$ ) que produjo la Gris (Figura V.6b).

En la Figura V.7 se representaron los resultados obtenidos al estudiar el efecto del tratamiento con Urso y Clorogénico sobre la actividad de la GST.

La actividad de la GST se mantuvo dentro de los niveles basales cuando la combinación estudiada se administró a animales controles y a tratados con Gris, evitando así la inducción del 67% ( $p < 0,01$ ) provocada en los ratones que recibieron sólo Gris.



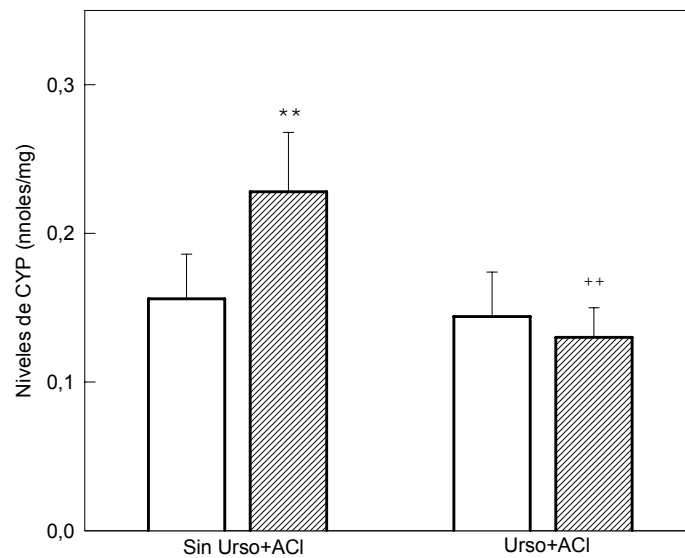
**Figura V.7:** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Ursodeoxicólico y Ácido Clorogénico sobre las actividad enzimática de Glutathione-S-Transferasa.

Control  Gris

Los resultados representan los porcentaje con respecto a los animales controles. Valor medio control:  $14,85 \pm 2,48 \mu\text{mol/mg}$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más Urso y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Urso y ACI con respecto del grupo que recibió Gris: (\*\*+)  $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la Figura V.4 y en Materiales y Métodos.

En la [Figura V.8](#) se representaron los valores obtenidos cuando se estudió el efecto de tratamiento conjunto de Urso con ácido Clorogénico sobre los niveles del CYP hepático.

Cuando se administró ambos compuestos a animales controles y a tratados con Gris el contenido de CYP se mantuvo dentro de los niveles basales, evitando así, la inducción del 35% ( $p < 0,01$ ) que produce la Gris.



**Figura V.8:** Efecto del tratamiento conjunto con Ácido Ursodeoxicólico y Ácido Clorogénico sobre los niveles de Citocromo P450 en ratones intoxicados con Gris.

Control  Gris

Los resultados se expresan como valor medio  $\pm$  DE. Diferencia significativa del grupo tratado con Gris sola o Gris más los Urso y ACI respecto del grupo control: (\*\*)  
 $p < 0,01$ . Diferencia significativa del grupo tratado con Gris más Urso y ACI con respecto del grupo que recibió Gris: (\*\*)  
 $p < 0,01$ . Los detalles experimentales se describen en la leyenda de la [Figura V.4](#) y en Materiales y Métodos.

## **V.4 CONCLUSIONES**

La combinación de ADx más ácido Clorogénico junto con Gris redujo el contenido de PROTO IX en el hígado, en forma similar a la disminución que produjo el ácido biliar cuando se lo suministró sólo con Gris (Capítulo III de Resultados y Discusión). Paralelamente se produjo una importante disminución de la peroxidación lipídica.

Si bien ambos compuestos disminuyeron el contenido hepático de GSH cuando se administraron en forma separada, la combinación de ambos produjo un aumento de los niveles del tripéptido en los animales tratados con Gris. La actividad de la GRed tampoco disminuyó por el tratamiento conjunto.

En cambio la actividad de SOD se redujo significativamente a pesar de que ambos compuestos administrados en forma separada no evitaron la inducción que produjo la Gris.

La combinación del ácido biliar y el polifenol no evitó el aumento de la actividad de GST que produjo la Gris. Sin embargo el contenido de CYP disminuyó significativamente, lo que implicaría que el metabolismo de Gris se ve afectado por alguno de los dos compuestos.

Por lo expuesto podemos concluir que el tratamiento con ADx más ácido Clorogénico evitó parcialmente el daño oxidativo que produce la Gris en estos animales pero, no fue capaz de evitar totalmente los efectos nocivos del antimicótico.

La combinación de Urso más ácido Clorogénico y Gris produjo una acumulación de PROTO IX en el hígado similar a la que produce el antimicótico sólo, sin embargo los niveles de MDA disminuyeron significativamente.

Los niveles de GSH y la actividad de SOD se mantuvieron elevados en los animales que recibieron el tratamiento conjunto; mientras que la actividad de GRed se redujo parcialmente pero sin llegar a los niveles que produjeron los compuestos cuando se suministraron en forma independiente. Si bien el ácido Clorogénico no afectó la actividad de la GST cuando se lo administró junto con Gris, el tratamiento del polifenol más el Urso produjo una disminución considerable de la actividad de la enzima. El tratamiento conjunto redujo los niveles de CYP en forma similar a la que produjeron ambos compuestos cuando se administraron independientemente.

Por todo esto podemos concluir que:

Los depósitos de PROTO IX no serían la principal causa del estrés oxidativo que se produce en los animales por efecto de la Gris, si bien el aumento de la excreción de la porfirina mejora significativamente, al menos en algunos parámetros, el estado de estos animales.

## **V.5 REFERENCIAS**

Gorman N, Zaharia A, Trask HS, Szakacs JG, Jacobs NJ, Jacobs JM, Balestra D, Sinclair JF, Sinclair PR. (2007). Effect of iron and ascorbate on uroporphyrin in ascorbate-requiring mice as a model for porphyria cutanea tarda. *Hepatology*. 45(1): 187-194

Ko KM, Yick PK, Poon MK, Ip SP. (1994). Prooxidant and antioxidant effects of Trolox on ferric ion-induced oxidation of erythrocyte membrane lipids. *Mol. Cell. Biochem*. 141(1): 65-70.

Poljšak B; Raspor P. (2007) The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *J. Appl. Toxicol.* En prensa

Sinclair PR, Gorman N, Shedlofsky SI, Honsinger CP, Sinclair JF, Karagas MR, Anderson KE. (1997). Ascorbic acid deficiency in porphyria cutanea tarda. *J. Lab. Clin. Med.* 130(2): 197-201.

Székely E, Vereckei A, Almási A, Rapavi E, Tasnádi G, Várnai K, Pallai Z, Lugasi A, Blázovics A. (2007). Effects of vitamin E administration on the hemorheological status and redox homeostasis of patients with porphyria cutanea tarda treated with phlebotomy. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 36(1): 13-23.

Thunell S, Andersson D, Harper P, Henrichson A, Floderus Y, Lindh U. (1997). Effects of administration of antioxidants in acute intermittent porphyria. *Eur. J. Clin. Chem .Clin. Biochem.* 35(6): 427-433.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES FINALES**

Con el objetivo de optimizar el modelo animal de protoporfiria inducida por Gris se suministraron tres dosis diferentes (0,5%,1.0% y 2,5%) del antimicótico durante 7 y 14 días. La administración de Gris produjo tempranamente en los ratones, y aún con las menores dosis, alteraciones significativas en el hígado. El aumento de la actividad del ALA-S y la acumulación de PROTO IX en hígado, sangre y heces, reflejó la desregulación del camino metabólico del hemo.

Como resultado de la metabolización del xenobiótico con las dosis menores de Gris se incrementó el contenido de CYP y en particular de las isoformas 2A6 y 3A4, lo que está implicando un aumento de la síntesis de hemo y por ende un incremento de la actividad de ALA-S. Debido a que Gris actúa como sustrato suicida, concentraciones elevadas del agente tóxico provocaron el agotamiento del CYP y del sistema de detoxificación. El aumento del consumo de hemo por parte del CYP y la inhibición de la Fe-Quel provocarían una disminución de los requerimientos de este compuesto para hemoproteínas en general y en particular la Catalasa y la GPx, como se confirmó por el aumento de la actividad de TRP .

Cambios morfológicos y alteraciones bioquímicas reflejan un daño hepático significativo aún con bajas dosis de Gris. Los estudios histológicos y las actividades aumentadas de GOT, GPT, FAlc,  $\gamma$ -GT y GST reflejan daño celular, necrosis, degeneración funcional y obstrucción de ductos biliares.

Elevados niveles de radicales libres y de peroxidación lipídica indican un alto grado de estrés oxidativo producido por el agente porfirinogénico. El aumento de ROS sería responsable de alteraciones en el sistema de defensa antioxidante. Los niveles de GSH y las actividades SOD, GRed, GST y HO se incrementaron para hacer frente al daño oxidativo

Con el fin de investigar la posibilidad de evitar el efecto de la Gris sobre el metabolismo del hemo y el desarrollo de estrés oxidativo se evaluó el efecto de diferentes compuestos (Resumen en Tabla VI.1).



**Tabla VI.I:** Resumen de los resultados obtenidos al investigar los efectos de los tratamientos con antioxidantes y/o ácidos biliares en ratones intoxicados con Gris

	Gris 0,5%	Antioxidantes													Ácidos Biliares				ACI +	
		Tx	Se	Tx + Se	Asc	Tx + Asc	Mel oral	Mel i.p.	AE	Que	ACI	ACf	AG	AF	ADh	Queno	ADx	Urso	ADx	Urso
<b>ALA-S</b>	↑↑	↓↓			↓↓	↓↓		↓↓										↓↓		
<b>PROTO IX H</b>	↑↑														↓↓		↓↓		↓↓	
<b>PROTO IX MF</b>	↑↑														↑↑		↑↑	↓↓		
<b>MDA</b>	↑↑	↓	↓	↓	↓	↓		↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓		↓↓	↓↓
<b>GSH</b>	↑↑				↓↓	↓↓		↓		↓↓					↓		↓↓			
<b>GRed</b>	↑↑	↓↓																↓		↓↓
<b>SOD</b>	↑↑	↓						↓					↓				↓↓	↓↓	↓↓	
<b>GST</b>	↑↑		↓↓		↓↓	↓↓							↓↓		↑↑		↓	↓↓	↑↑	↓↓
<b>CYP</b>	↑↑														↓↓			↓↓	↓↓	↓↓

**PROTO IX H:** Contenido de PROTO XI en hígado; **PROTO IX MF:** Contenido de PROTO XI en materia fecal; ↑↑ Aumento producido por el efecto de la Gris; ↑ o ↓ Aumento o disminución por efecto del tratamiento con antioxidantes y/o ácido biliares más Gris con respecto al grupo tratado con Gris sola; ↑ o ↓ P<0,05; ↑↑ o ↓↓ P<0,01

La administración conjunta de Gris con Tx, Asc, la combinación de ambos o Melatonina provocaron efectos fundamentalmente sobre el camino biosintético del hemo, produciendo una disminución de la actividad de ALA-S aumentada por Gris, mientras que los polifenoles Quercetina, y los ácidos Elálgico, Clorogénico, Cafeico, Ferúlico, Gálico, ejercieron acción protectora sobre el estrés oxidativo disminuyendo el grado de peroxidación lipídica y la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

Debido a la propiedad colerética de los ácidos biliares se investigó la capacidad de los ácidos Desoxicólico, Dehidrocólico, Quenodeoxicólico y Ursodeoxicólico para eliminar el exceso de PROTO IX formada en el hígado de los ratones intoxicados con Gris y su efecto sobre el estrés oxidativo.

La administración de los diferentes ácidos biliares a estos animales produjo diferentes efectos. De los 4 ácidos biliares estudiados, el Desoxicólico y el Dehidrocólico fueron los únicos que produjeron un aumento en la excreción de PROTO IX, pero sólo el primero trajo aparejado la disminución de la peroxidación lipídica, los niveles de GSH, y las actividades de SOD y GST. El ácido Ursodeoxicólico, aunque no evitó la acumulación de porfirinas, disminuyó la actividad de ALA-S, aumentando un efecto sobre el metabolismo del hemo, además actuó como un antioxidante, ya que disminuyó las actividades de las enzimas del sistema de defensa antioxidante estudiadas.

La Desferrioxamina, Cimetidina y Colestiramina, utilizados en la terapia de pacientes con PPE, no revirtieron las alteraciones producidas por la Gris.

La administración conjunta de Gris con los ácidos Clorogénico más Desoxicólico o Ursodeoxicólico evitaron, parcialmente, el aumento de la peroxidación lipídica, las actividades enzimáticas de algunas enzimas antioxidantes y los niveles de CYP, pero en ningún caso pudieron evitar totalmente el daño hepático producido por la Gris.

En este modelo de protoporfiria, el estrés oxidativo permanente llevaría a cambios irreversibles en el sistema de defensa celular e importante daño de las células que ninguno de los compuestos ensayados pudo evitar en su totalidad.

La susceptibilidad a porfirinopatías varía ampliamente entre animales, el animal más sensible a la Gris es el ratón. La Protoporfiria en ratas y hamster tiene menor grado de severidad que en ratones. Se ha publicado que la gravedad de la porfirinopatía varía ampliamente en algunas especies de ratones (Shimoyama & Nonaka, 1987; Yamashita *et al.*, 1988) en este estudio observamos, en relación a lo publicado, que en la cepa *CFI* la

Gris produce efectos importantes en menor tiempo y con una concentración menor de antimicótico que en las cepas utilizadas en los trabajos citados en esta tesis.

Si bien el modelo de Protoporfiria desarrollado por la Gris ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores, a diferencia de los trabajos publicados, en esta tesis se ha hecho una puesta a punto exhaustiva del modelo, realizando un estudio dosis respuesta y tiempo respuesta evaluando los efectos de la Gris sobre diferentes metabolismos y/o parámetros marcadores de daño hepático. Es de notar que en la mayoría de los trabajos no se había demostrado el desarrollo de estrés oxidativo y la respuesta del sistema antioxidante. Las últimas publicaciones comparan el modelo de Gris y el modelo genético de deficiencia de la actividad de la Fe-Quel encontrando diferencias significativas en ambos modelos (Davies *et al.*, 2005; Abitbol *et al.*, 2006). Es importante tener en cuenta este hecho ya que si bien se sugiere que la falla hepática en pacientes con PPE puede atribuirse a la cristalización de PROTO IX depositada en el hígado, en el modelo de protoporfiria inducida por Gris la toxicidad de la Gris es la principal causa de daño hepático en los ratones y los depósitos de PROTO IX en hígado jugarían un rol menor. Sin embargo estos animales pueden emplearse en experimentos donde se investigue la eliminación química de porfirinas en hígado.

El trasplante de hígado es efectivo para pacientes con enfermedad hepática en estadio terminal, sin embargo más del 50% sólo sobrevive 6 meses pues desarrollan PPE con enfermedad hepática recurrente, debido a que el exceso de producción de PROTO IX en la médula ósea continúa (Mc Guire *et al.*, 2005). Es por ello que es importante continuar con estudios que permitan encontrar una alternativa terapéutica que lleve a la eliminación del exceso de PROTO IX en hígado y la reversión del daño oxidativo producido por la porfirina.

## **REFERENCIAS**

Abitbol M, Puy H, Sabaté JM, Guénet JL, Deybach JC, Montagutelli X. (2006). Ursodesoxycholic acid and heme-arginate are unable to improve hematopoiesis and liver injury in an erythropoietic protoporphyria mouse model. *Physiol. Res.* 55 Suppl. 2:S93-101.

Davies R, Schuurman A, Barker CR, Clothier B, Chernova T, Higginson FM, Judah DJ, Dinsdale D, Edwards RE, Greaves P, Gant TW, Smith AG. (2005). Hepatic gene expression in protoporphyric Fech mice is associated with cholestatic injury but not a marked depletion of the heme regulatory pool. *Am. J. Pathol.* 166(4): 1041-1053.

McGuire BM, Bonkovsky HL, Carithers RL Jr, Chung RT, Goldstein LI, Lake JR, Lok AS, Potter CJ, Rand E, Voigt MD, Davis PR, Bloomer JR. (2005). Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria liver disease. *Liver Transpl.* (12): 1590-1596.

Yamashita K. (1988). Induction of experimental protoporphyria in hairless mice griseofulvin--strain differences in murine protoporphyria. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi.* (7): 677-681.

Shimoyama T, Nonaka S. (1987). Biochemical Studies on griseofulvin- induced protoporphyria. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 514: 160-169.