



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Acción del vanadato en un modelo de porfiria
aguda**

Nº 411

Daniela Nicolás

Tutor: Hernán Javier Aldana Marcos

Departamento de Investigaciones
Septiembre 2010

Agradecimientos

Especialmente a la Dra. Esther Gerez y a la Lic. Leda Oliveri por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por compartir conmigo toda su experiencia.

A todo el personal del CIPyP por las constantes ayudas y consejos.

A mis profesores por el esfuerzo y la dedicación que caracterizaron cada clase.

A Belén por acompañarme en cada momento.

A mi familia por darme la fuerza para lograr todo lo que me proponga.

A Lolo por el apoyo incondicional, por estar siempre ahí para mí.

Índice

Abreviaturas	4
Resumen	5
Capítulo I: Porphirinas y metabolismo del hemo	5
I.1. Porphirinas	5
I.2. Biosíntesis del hemo	5
I.3. Regulación de la síntesis del hemo.....	7
I.4. Catabolismo del hemo.....	8
I.5. Hemoproteínas.....	8
Capítulo II: Las Porphirias	10
II.1. Porphirias humanas.....	10
II.2. Porphiria experimental.....	12
Capítulo III: Regulación transcripcional del ALA-S1	13
III.1. Inducción por drogas de la transcripción del ALA-S1.....	14
III.2. Regulación nutricional de la transcripción del ALA-S1.....	15
Capítulo IV: Vanadato y Vitamina E.....	16
IV.1. Vanadio.....	16
IV.2. Vitamina E	18
Referencias	19
Objetivos.....	22
Materiales y Métodos	22
Capítulo I: Diseño experimental	22
Capítulo II: Determinaciones bioquímicas	23
Capítulo III: Métodos moleculares	25
Capítulo IV: Purificación de la succinil CoA sintetaza	27
Referencias	29
Capítulo I: Acción del vanadato sobre la expresión del ALA-S1 en un modelo de porfiria aguda inducida con AIA.....	30
I.1. Tiempos de ayuno	30
I.2. Efecto del vanadato en un modelo de porfiria aguda.....	30
I.3. Efecto del vanadato en los animales tratados con AIA	31
Capítulo II: Acción de la vitamina E sobre la expresión del ALA-S1 en un modelo de porfiria aguda inducida con AIA.....	41
II.1. AIA y vitamina E.....	41
Capítulo III: Acción del vanadato y la vitamina E sobre la catalasa en un modelo de porfiria aguda inducida con AIA.....	43
III.1. Catalasa	43
III.2. Sp1 y EGR1.....	45
Capítulo IV: Conclusiones	47
Referencias	49

Abreviaturas

α -TTP: Proteína de transferencia de α -tocoferol hepática
AADEAL: Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio
ADRES: Secuencia enhancer de respuesta a drogas de ácido aminolevúlico sintetasa
AIA: Alilisopropilacetamida
Akt: Proteína quinasa B
ALA: Ácido δ -aminolevúlico
ALA-D: Ácido δ -aminolevúlico deshidrogenasa
ALA-S: δ -aminolevúlico sintetasa
ATP: Trifosfato de adenosina
BSA: Seroalbúmina bovina
CAR: Receptor activo constitutivamente, (Constitutively Active Receptor)
CIPYP: Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias
CPGasa: coproporfirinógeno III oxidasa
CPH: Coproporfiria Hereditaria
CREB: Proteínas de unión a AMPc
CYP: Citocromo P450
DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dehidrocolina
ECL: Enhanced. Chemiluminiscent System
Fe-Quel: Ferroquelatasa
FOXO: Forkhead box class O
Glc6P: Glucosa 6 fosfatasa
Gris: Griseofulvina
GSH: Glutati6n
HO: Hemo-oxigenasa
IR: Receptor de insulina
IRE: Elemento de respuesta a insulina
IRS-1: Sustrato 1 del receptor de la insulina
NADPH: Nicotinamida-adenina dinucle6tido fosfato
NPA: Nueva Porphiria Aguda
NR: Receptores nucleares hu6rfanos
NRF-1: Factor respiratorio nuclear-1
PAI: Porphiria Aguda Intermitente
PB: Fenobarbital
PBG: Porfobilin6geno
PBG-D: Porfobilin6geno deaminasa
PCE: Porphiria Cong6nita Eritropoy6tica
PCT: Porphiria Cut6nea Tarda
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC-1 α : Proliferator-activated receptor y coactivador 1 α
PHE: Porphiria Hepatoeritropoy6tica
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI 4,5P: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3: Fosfatidilinositol trifosfato
PPE: Protoporphiria Eritropoy6tica
PPox: Protoporfirin6geno IX oxidasa
PTK: Proteína tirosina quinasa de IR
PTPasas: Fosfatasa de tirosinas
PV: Porphiria Variegata
PXR: Pregnane xenobiotic receptor
RXR: 9-cis retinoic acid receptor
SDS: Dodecilsulfato s6dico
TBS-T: Tris base/NaCl/Tween 20
TCA: 6cido tricloroac6tico
URO-D: Uroporfirin6geno III decarboxilasa
UROgen III: Uroporfirin6geno III
URO III-S: Uroporfirin6geno III sintetasa

Resumen

La porfiria aguda intermitente (PAI) se caracteriza por un aumento en la expresión de la primera enzima del camino del hemo, la ácido δ -aminolevulínico sintetasa 1 (ALA-S1) y la consiguiente acumulación de intermediarios tóxicos de esta vía.

Se ha demostrado la participación de los factores de transcripción PGC1 α y FOXO1 en el control de la expresión del ALA-S1. Así mismo, se han identificado sitios de unión a los NR PXR y CAR en el promotor del gen de dicha enzima. Estudios previos han mostrado que el vanadato (V) inhibe la expresión del ALA-S hepática en un modelo de diabetes a través de la vía PI3K/Akt/FOXO1. En base a estos resultados, se decidió investigar los efectos del V en la regulación del ALA-S1 en un modelo de PAI inducida con allisopropilacetamida (AIA) y la vinculación con la vía PI3K/Akt. Además, tomando en cuenta la conocida capacidad de la vitamina E para contrarrestar la inducción de ALA-S1 observada en la porfirias hepáticas, se evaluó el efecto de la vitamina E sobre la actividad y niveles de expresión del ALA-S1 en este modelo.

En los animales tratados con AIA la actividad y los niveles de proteína de ALA-S1 aumentaron significativamente respecto al control. El V y la vitamina E previnieron el aumento de actividad del ALA-S1 y disminuyeron los niveles de proteína. Los niveles de fosforilación de IRS1 y Akt no se vieron afectadas por la administración de AIA mientras que el tratamiento con V causó un incremento de ambos parámetros. Tanto en los animales tratados con AIA como con AIA+V el nivel de FOXO1 nuclear disminuyó con respecto al grupo control, mientras que PGC1 α se mantuvo inalterado en ambos grupos.

Con el objetivo de investigar el rol de los factores CAR y PXR en la regulación del ALA-S1 se midieron los niveles de expresión de CYP3A y CYP2B1, cuyos genes son blancos de dichos factores de transcripción y se observó que ambas proteínas co-varían con ALA-S1 ante los tratamientos con AIA y V.

Uno de los principales efectos tóxicos descritos para el V se relaciona con su capacidad para causar estrés oxidativo y alterar el sistema de defensa antioxidante. Se evaluaron los efectos del V y la vitamina E sobre la actividad de la enzima antioxidante catalasa. La actividad de la catalasa disminuyó al tratar a los animales con AIA y disminuyó aún más al administrarles V. La administración de AIA y vitamina E no modificó la actividad con respecto a la administración de AIA indicando un menor impacto de la vitamina E sobre el sistema de defensa antioxidante con respecto al vanadato.

Un tratamiento combinado con vanadato y vitamina E podría resultar en un descenso de la actividad y de los niveles de proteína del ALA-S1 sin afectar al sistema de defensa antioxidante.

Capítulo I. Porphirinas y metabolismo del hemo

I.1 Porphirinas

Las porfirinas reúnen ciertas propiedades físicas, químicas y biológicas que les conceden una gran importancia en el funcionamiento de los seres vivos. Estos compuestos son los precursores del hemo en el reino animal y de la clorofila en el reino vegetal (Nordmann & Puy, 2002), por lo que son metabolitos clave en los procesos de respiración y fotosíntesis, respectivamente.

Las porfirinas son heterociclos formados por cuatro anillos pirrólicos (designados A, B, C y D) interconectados por cuatro puentes meteno (llamados α , β , γ y δ), que además contienen cadenas laterales sustituyentes en los carbonos β de cada pirrol. Estos compuestos poseen dobles enlaces conjugados y por lo tanto son coloreados. Son de estructura planar rígida, aromáticos y relativamente grandes, estas características le confieren a la molécula hidrofobicidad. Los sustituyentes laterales aportan grupos alifáticos y carboxílicos que modifican la condición anterior, haciendo que el compuesto sea hidrofílico.

Las porfirinas pueden coordinar metales, como hierro y magnesio en su cavidad central generando así los grupos prostéticos de la hemoglobina y la clorofila, respectivamente.

I.2 Biosíntesis del hemo

El hemo es el grupo prostético de una gran variedad de proteínas involucradas en el transporte y transferencia de oxígeno (hemoglobina), la protección de las células contra especies oxidantes tóxicas (catalasa) y la transferencia de electrones (citocromos) (Bonkowsky et al., 1979).

El hemo es un tetrapirrol cíclico con un hierro coordinado (Figura I.1) y su camino biosintético y su compartimentación subcelular parecen ser idénticos en todas las células de mamíferos.

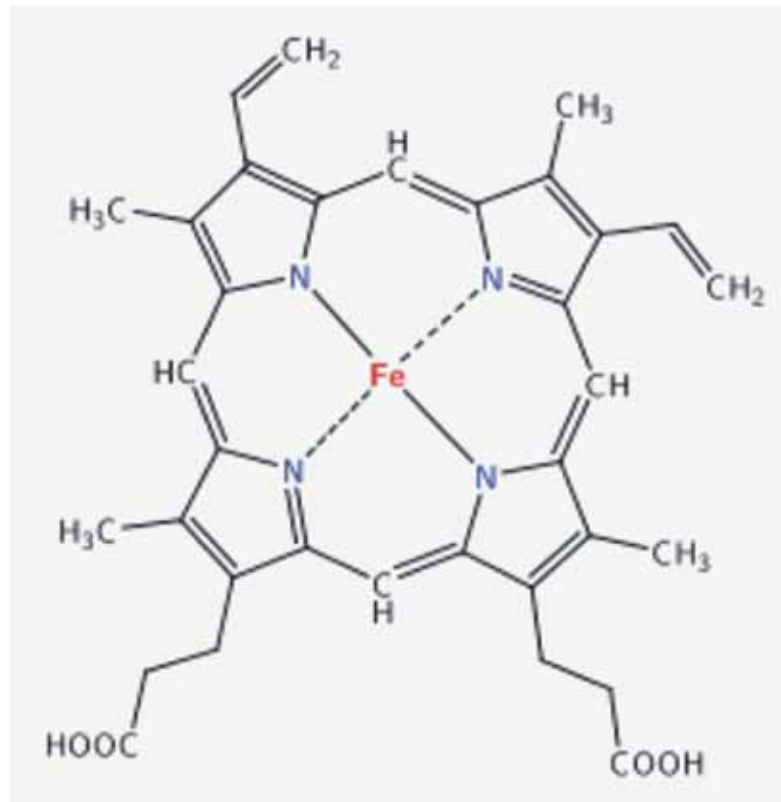


Figura I.1: Estructura del hemo.

En su síntesis están involucradas ocho enzimas, de las cuales cuatro son mitocondriales, y las restantes son citosólicas (Figura I.2). El primer paso es catalizado por ácido δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S), ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de succinil CoA y glicina para formar ácido δ -aminolevúlico (ALA). Los siguientes cuatro pasos ocurren en el citosol. El ALA dehidrasa (ALA-D) convierte dos moléculas de ALA en el monopirrol porfobilinógeno (PBG). Cuatro de estas moléculas se unen por acción de la porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), formando hidroximetilbilano, el cual por acción de la enzima uroporfirinógeno III sintetasa (URO III-S) se isomeriza y cicla para formar el uroporfirinógeno III (UROgen III). La enzima citosólica uroporfirinógeno III decarboxilasa (URO-D), decarboxila las cadenas laterales acetilo del tetrapirrol para formar el coproporfirinógeno III, que es luego transportado a la mitocondria, donde la coproporfirinógeno III oxidasa (CPGasa) lo convierte en protoporfirinógeno IX. La protoporfirinógeno IX oxidasa (PPox) elimina luego seis átomos de hidrógeno para formar la protoporfirina IX. La última etapa en la biosíntesis del hemo implica la inserción del hierro ferroso en el anillo porfirínico por la acción de la ferroquelatasa (Fe-Quel). El hemo, producto final de esta secuencia, es utilizado para formar los citocromos respiratorios y el citocromo P450 (CYP) mitocondrial, o es transportado fuera de la mitocondria para cumplir otra función celular (Battle & Magnin, 1988).

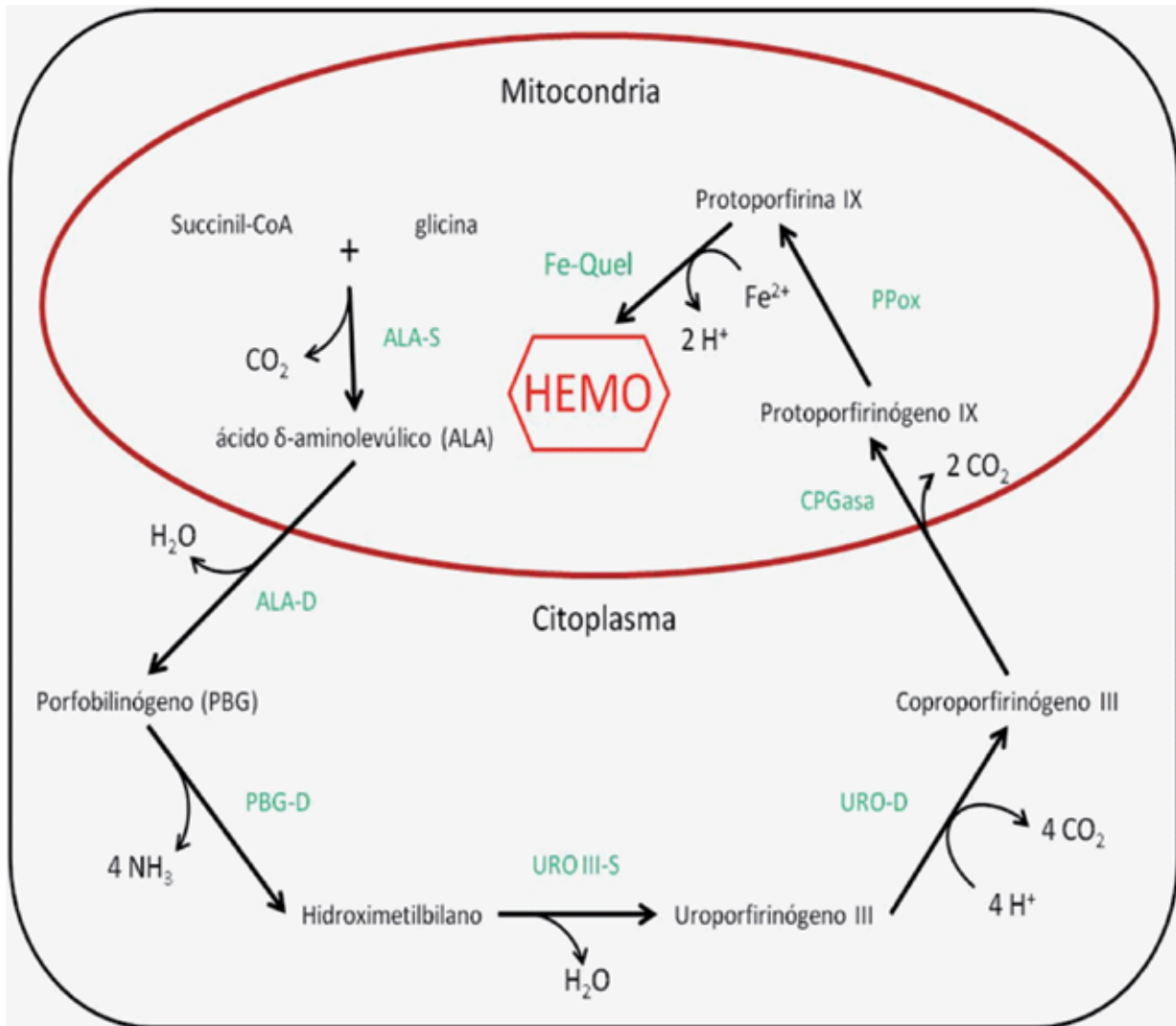


Figura 1.2: Esquema del camino metabólico del hemo.

I.3 Regulación de la síntesis del hemo

Todas las células necesitan hemo, algunas en mayor grado que otras, particularmente en respuesta a factores endógenos y exógenos. Además, considerando que el exceso de hemo intracelular es altamente tóxico para las células (Taketani, 2005), su síntesis está regulada de acuerdo a los requerimientos específicos de las mismas.

El hemo es sintetizado mayoritariamente en el hígado y en el tejido eritroide. La máxima producción de hemo ocurre en los eritrocitos en desarrollo, allí se sintetiza aproximadamente el 85% del hemo total. El segundo tejido en importancia es el hígado, con una diferencia entre ambos, de aproximadamente un orden en la velocidad de síntesis.

Existen dos isoenzimas del ALA-S, codificadas por diferentes genes ubicados 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.

La síntesis de hemo en el hígado ha sido extensamente estudiada y se comprobó que está regulada por la primera enzima de su camino biosintético, el ALA-S1. Los niveles de ALA-S1 son controlados por un mecanismo de retroinhibición por el producto final hemo (Hayashi et al., 1972).

El peso molecular del ALA-S1 en el citosol es considerablemente mayor que el del ALA-S1 en la mitocondria, sugiriendo que la enzima citosólica es convertida en una proteína más pequeña antes de ser transferida a la mitocondria (Furuyama et al., 2007).

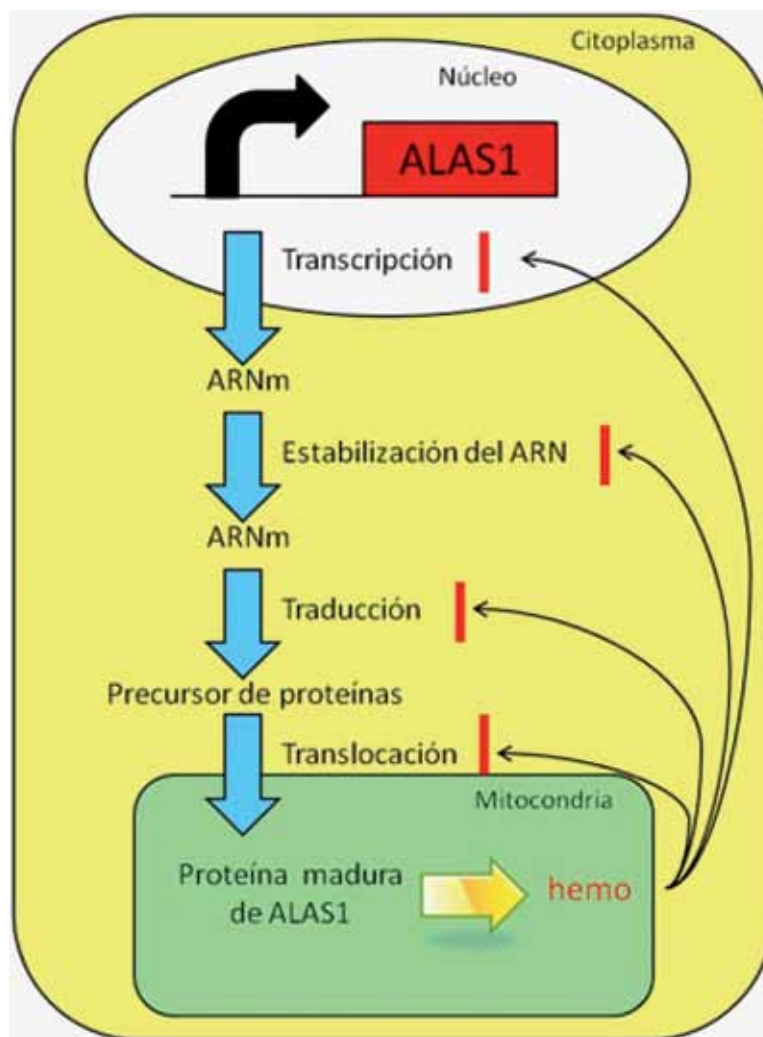


Figura I.3: Regulación de la expresión del ALA-S.

La regulación negativa del ALA-S1 ocurre en varios niveles incluyendo reducción de la transcripción y traducción, desestabilización del ARNm e inhibición del transporte a la mitocondria del precursor de la proteína (Furuyama et al., 2007) (Figura I.3).

I.4 Catabolismo del hemo

El hemo, además de ser el grupo prostético de numerosas enzimas, juega un rol importante en la transcripción, traducción y translocación de proteínas y en la diferenciación eritroide (Chandra et al., 1996); por otro lado el exceso de hemo puede ser tóxico para las células produciendo daño en lípidos y proteínas por oxidación (Taketani, 2005), por lo cual no sólo la síntesis sino también la degradación del hemo se encuentran bajo un estricto mecanismo de regulación celular.

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima clave del catabolismo del hemo. Se halla localizada en el retículo endoplasmático y, junto con la NADPH citocromo P450 reductasa, produce el clivaje del hemo, eliminando el puente meteno como CO, liberando el átomo de hierro y formando el pigmento biliar, biliverdina. La biliverdina que se genera por la degradación del hemo no se acumula y sufre la acción de la biliverdina reductasa que la convierte en bilirrubina (Maines, 1988).

El primer paso del proceso de degradación del hemo es su oxidación a α -hidroxihemo, requiriendo O₂ y dos electrones. El segundo paso, que también requiere O₂ y un electrón, es la formación de α -ferrohemo ferroso con la concomitante liberación de CO. El tercer paso es la conversión de α -ferrohemo ferroso a biliverdina férrica, requiriendo O₂ y tres electrones. En el último paso, el hierro férrico de la biliverdina es reducido y finalmente se libera biliverdina más hierro ferroso (Matsui et al., 2005).

I.5 Hemoproteínas

Como ya se mencionó anteriormente, el grupo hemo se encuentra como grupo prostético de numerosas proteínas donde juega roles estructurales y funcionales (Tsiftoglou et al., 2006).

En mamíferos, el hemo es principalmente utilizado para la síntesis de hemoglobina en eritrocitos, mioglobina en las células musculares y CYP en el hígado. En el hígado, el 65% del hemo es incorporado en el CYP (Padmanaban et al., 1989), y una menor fracción es utilizada para la síntesis de otras hemoproteínas como por ejemplo la catalasa, peroxidasa, la oxido nítrico sintetasa, la guanilato ciclasa y en factores transcripcionales (Tsiftoglou et al., 2006). La principal función de la hemoglobina es el transporte de oxígeno. La mioglobina está localizada principalmente en células musculares y une oxígeno con mayor afinidad que la hemoglobina. Varios citocromos constituyen componentes de la cadena respiratoria en mitocondrias donde transportan electrones desde flavoproteínas hasta citocromo oxidasa.

1.5.1 Citocromo P-450

Las reacciones de biotransformación de sustratos endógenos o exógenos a metabolitos polares o hidrofílicos, para que puedan ser excretados, son agrupadas en reacciones de Fase I y de Fase II. Los CYP median las reacciones de Fase I, las cuales consisten en oxidación, reducción e hidrólisis de drogas, carcinógenos y esteroides.

Los CYP son una de las más grandes superfamilias de hemoproteínas. Sus rasgos estructurales más conservados están relacionados con la unión al hemo y con sus propiedades catalíticas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Las enzimas del CYP han sido clasificadas en familias y subfamilias en base a su secuencia de aminoácidos. Las familias se indican por la sigla CYP, seguida por un número arábigo. Los miembros de una familia comparten el 40% de su secuencia aminoacídica. Dentro de cada familia, las enzimas que tienen una homología del 50% forman una subfamilia. Las subfamilias están indicadas por una letra. Los genes que codifican para una isoenzima específica tienen un segundo número arábigo después de la letra que caracteriza a la subfamilia (Nelson et al., 1996).

Además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, el CYP participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroides y ácidos grasos (Chang & Kam, 1999). La denominación citocromo P450 proviene de la característica de que el espectro de absorbancia de esta hemoproteína en su forma reducida y unida a monóxido de carbono, presenta un máximo a 450 nm (Omura & Sato, 1964).

En mamíferos, todos los CYP están unidos a membrana y son los componentes terminales del sistema enzimático de oxigenasas de función mixta. La mayoría se encuentra localizada en el retículo endoplasmático, aunque algunas isoformas se hallan asociadas a la membrana interna de las mitocondrias (Guengerich, 2003).

Los CYP se encuentran principalmente en el hígado y en menor medida en tejidos extrahepáticos, como en intestino delgado, páncreas, encéfalo, pulmones, glándula adrenal, gónadas y piel (Krishna & Klotz, 1994) y catalizan una amplia variedad de reacciones de oxidación, incluyendo epoxidaciones, N-deaquilaciones, O-deaquilaciones, S-oxidaciones e hidroxilaciones de sustratos aromáticos y alifáticos (van der Weide & Steijns, 1999).

Aunque la principal función del CYP es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo excretado por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo.

1.5.2 Catalasa

La catalasa es una hemoproteína que forma parte de los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante y se presenta mayoritariamente en los peroxisomas de las células de mamíferos. Es una enzima tetramérica que consiste en cuatro subunidades idénticas de 60 kDa ordenadas tetraédricamente, cada subunidad contiene en su sitio activo un grupo hemo y NADPH. La catalasa posee dos actividades enzimáticas dependiendo de la concentración de H₂O₂. Si ésta concentración es alta, la catalasa actúa catalíticamente: remueve H₂O₂ formando H₂O y O₂. Sin embargo, a bajas concentraciones de H₂O₂ y en presencia de un dador de hidrógeno apropiado como el etanol, el metanol, el fenol y otros, la catalasa actúa peroxidativamente, removiendo H₂O₂, pero oxidando a su sustrato (Scibior & Czczot, 2006).

Dentro de la secuencia promotora del gen de la enzima se encuentran varias secuencias de reconocimiento para factores de transcripción, entre ellas, CCAAT boxes y secuencias de unión de EGR1, una de las cuales se encuentra solapada por una secuencia de reconocimiento de Sp1 (Nenoi et al., 2001).

Se ha descrito que la interrelación entre los factores de transcripción EGR1 y Sp1 media la regulación transcripcional de varios genes. Extensivos estudios indican que el mecanismo molecular que gobierna la interacción entre EGR1 y Sp1 está controlado a través de la competencia por la unión a la región de

reconocimiento dentro del promotor. Por lo tanto la sobreexpresión o la inducción de uno de los factores, que lleva a un aumento de su concentración celular, resultará en el desplazamiento del otro factor de la unión a los sitios solapados. Tal desplazamiento de Sp1 por EGR1, o viceversa, puede llevar a una activación o represión transcripcional dependiendo del promotor en particular y del contexto celular (Zhang & Liu, 2003).

Estudios demuestran que la expresión de catalasa está fuertemente regulada a nivel transcripcional por Sp1 y factores de reconocimiento de CCAAT. La interacción del factor EGR1 con las secuencias de reconocimiento solapadas, Sp1/EGR1, localizadas en el promotor pueden llevar a una inactivación del promotor al interferir o competir con la capacidad de Sp1 para inducir la transcripción (Neno et al., 2001).

Capítulo II. Las porfirias

II.1 Porfirias humanas

Las porfirias son desordenes metabólicos resultantes de una deficiencia, hereditaria o adquirida, de una de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo. Mutaciones heredadas dominante o recesivamente en alguno de los genes que codifican a estas enzimas llevan a alteraciones de la síntesis del hemo con la consiguiente acumulación y excreción de porfirinas y/o sus precursores (Bickers et al., 2003).

Estos desordenes pueden ser clasificados según el órgano afectado por la deficiencia enzimática y/o según la sintomatología. De acuerdo al tejido principalmente afectado las porfirias son hepáticas, eritropoyéticas o hepatoeritropoyéticas. En cuanto al síntoma primario, se las divide en cutáneas y agudas, existiendo además algunas porfirias de sintomatología mixta (Tabla II.1).

Al desarrollarse estas enfermedades, la acumulación de intermediarios de este camino metabólico se concentra en un dado tejido. Por lo tanto, cuando una porfiria es hepática esto indica que el principal sitio de acumulación de porfirinas es el hígado y cuando es eritropoyética, el principal sitio de acumulación son los eritrocitos. No obstante también existe una variante en la que estos intermediarios se acumulan tanto en hígado como en tejido eritroideo.

El signo característico de la mayoría de las porfirias es la fotosensibilización cutánea resultante de la acción de la luz sobre las porfirinas acumuladas en la piel. Este síntoma se observa en todas las porfirias con excepción de la porfiria aguda intermitente (PAI) y la nueva porfiria aguda (NPA).

La PAI, la porfiria variegata (PV), la coproporfiria hereditaria (CPH) y la NPA se caracterizan por ataques agudos con síndrome neuroabdominal, asociados a una masiva producción y excreción urinaria de los precursores ALA y PBG en las tres primeras y de ALA en la NPA.

Tipo de Porfiria		Enzima deficiente	Clasificación según sintomatología	
Hepáticas	Porfiria Aguda Intermitente (PAI)	PBG-D	Agudas	No Cutáneas
	Nueva Porfiria Aguda (NPA)	ALA-D		
	Porfiria Variegata o mixta (PV)	PPox		
	Coproporfiria Hereditaria (CPH)	CPGasa		
	Porfiria Cutánea Tardía (PCT) <ul style="list-style-type: none"> • Hereditaria • Adquirida 	URO-D	No Agudas	Cutáneas
Eritropoyéticas	Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)	URO III-S		
	Protoporfiria Eritropoyética (PPE)	Fe-Quel		
Hepato eritropoyéticas	Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE)	URO-D		

Tabla II.1: Clasificación de las Porfirias.

La mayoría de las porfirias se heredan con carácter autosómico dominante, excepto la porfiria cutánea eritropoyética (PCE) y la NPA, que lo hacen como un mendeliano recesivo y la porfiria cutánea tardía (PCT) que puede existir en dos formas, hereditaria (dominante) o adquirida. Ésta última forma está generalmente asociada a la exposición a agentes químicos inductores.

La sobreproducción de porfirinas y/o sus precursores es la responsable de las manifestaciones clínicas de las porfirias. Los mecanismos patogénicos en las diferentes porfirias varían y no existe un tratamiento universal (Battle & Magnin, 1988).

II.1.1 Porfirias agudas

Las porfirias agudas se caracterizan por la posibilidad de presentar crisis o ataques agudos. Clínicamente el ataque agudo consiste en dolor abdominal, habitualmente asociado a vómitos debido a la neuropatía autonómica que lo acompaña. Se observa también un síndrome neuropsíquico, de variable intensidad y consecuencias, que involucra parálisis, disestesias, hiponatremia, hipertensión arterial y taquicardia.

Esta patología depende de la presencia de una mutación sin embargo sus síntomas generalmente son desencadenados por exposición a una gran variedad de fármacos comunes.

Desde el punto de vista bioquímico estos desordenes se caracterizan por un defecto en enzimas específicas de la ruta biosintética del hemo con la consiguiente inducción hepática del ALA-S y el aumento de sus precursores tóxicos, ALA y PBG, en plasma y orina.

Entre las porfirias agudas se encuentran la PAI, CPH, PV y NPA (Battle, 1997) y las deficiencias enzimáticas se hallan a nivel de las enzimas: PBG-D, CPGasa, PPox y ALA-D respectivamente (tabla II.1)

II.1.2 Porfiria aguda intermitente

La PAI se produce como consecuencia de una deficiencia a nivel de la PBG-D. La reducción de hasta un 50% de la actividad de esta enzima provoca un aumento compensador del sustrato y de la actividad

de ALA-S, por lo que es característico un exceso de ALA y PBG en sangre y orina, y de porfirinas (uro-porfirina) en orina (Battle, 1997).

Al igual que las otras porfirias agudas, comienza con dolor abdominal agudo, intenso en el abdomen inferior, que va aumentando en forma progresiva en uno o dos días, de tipo cólico, continuo o con exacerbaciones y períodos de calma que puede simular una apendicitis. Suele acompañarse de náuseas, anorexia, vómitos y estreñimiento. Las manifestaciones intestinales son consideradas de origen neurogénico. Pueden observarse convulsiones y estado confusional como manifestación primaria. En ocasiones fenómenos motores con paresias o parálisis de extremidades, laríngeos, y deglutorios, parálisis ascendente de Landry, algias musculares, hipotónia, hiporreflexia e impotencia funcional (Battle & Magnin, 1988).

Los ataques agudos se precipitan por una amplia variedad de drogas, siendo las más usuales: barbituratos, estrógenos, progesterona, sulfonamidas, metildopa, danazol, diazepam, fenitoína, carbamezepina, sulfonilureas, cloramfenicol, tetraciclinas, algunos antihistamínicos y algunos anestésicos (Thadani et al., 2000; <http://www.drugs-porphyrina.org>, <http://www.porphyrina-europe.com>). También existen otros factores capaces de desencadenar los ataques, entre ellos está la ingestión de alcohol, el ayuno, algunas infecciones, los tratamientos hormonales y el estrés.

El tratamiento consiste en la prevención de los episodios neurológicos. Para ello es necesario detectar a los portadores a quienes hay que instruir sobre el hecho de evitar el ayuno y la ingesta de las drogas que pueden desencadenar ataques. Las manifestaciones neurológicas pueden mejorar e incluso desaparecer al: eliminar la droga causante, administrar dextrosa endovenosa, corregir los cambios electrolíticos administrando soluciones hipertónicas, clorpromazina, meperidina, propanolol en dosis pequeñas y en los casos severos se aconseja la administración de hematina endovenosa (Battle & Magnin, 1988).

La terapia estándar para los ataques severos de porfiria aguda consiste en infusiones tempranas de hemo o hidratos de carbono, combinados con drogas autorizadas sin riesgo para estos pacientes (Battle, 1997; Lindberg et al., 1999). Este tratamiento reduce rápidamente la producción y excreción de precursores del hemo tales como el ALA. En nuestro país se emplea casi exclusivamente el tratamiento con ácido fólico -que activa la PBG-D-, hidratos de carbono, y una combinación de vitaminas y antioxidantes (Battle, 1986), sin efectos colaterales. Este tratamiento ha reducido el índice de mortalidad, que en el mundo alcanza el 10 %, a un 4 % en la Argentina. Los efectos benéficos de la terapia con hemo son presumiblemente causados por su capacidad de suprimir la inducción del ALA-S y/o reconstituir las hemoproteínas. Los aspectos negativos de esta terapia son su alto costo, la necesidad de administrarlo por vía intravenosa lo que requiere de hospitalización, efectos colaterales (tromboflebitis, disturbios de la coagulación, sobrecarga de hierro) y la observación de que muchos pacientes entran en un estado de recurrencia frecuente de los ataques agudos (Tenhunen & Mustajoki, 1998).

II.1.2.1 Efecto glucosa

Se conoce que el ayuno es uno de los agentes causales de los ataques de porfiria aguda en pacientes con porfiria latente. Un alto consumo de glucosa mejora los signos bioquímicos y clínicos así como los síntomas del ataque agudo en numerosos pacientes (Stein & Tschdy, 1970). Subsecuentemente se demostró que otros carbohidratos tienen un marcado efecto sobre el metabolismo de las porfirinas en humanos con porfiria aguda tanto en la fase latente como durante los ataques (Brodie et al., 1977).

La ingesta de grandes cantidades de carbohidratos provoca un aumento en la producción de insulina en las células beta del páncreas. Una de las hipótesis que se plantean para explicar el efecto de la glucosa es que la insulina reprimiría la expresión del ALA-S hepática provocando una disminución en la producción de precursores de porfirinas y disminuyendo así los síntomas del ataque agudo.

La inducción de la porfiria experimental en animales de laboratorio mediante la administración de un agente porfirinogénico de acción rápida, como el AIA (alilisopropilacetamida) o el DDC (3,5-dietoxicarbonil-1,4-dehidrocolina) ocurre sólo cuando el animal está en estado de ayuno. La administración de varios carbohidratos contrarresta el efecto porfirinogénico de estas drogas (Bonkowsky et al., 1973). Éste fenómeno se denomina "efecto glucosa" y se debe a que la glucosa o su metabolismo inhiben o previenen la inducción del ALA-S1 hepática producida por las drogas porfirinogénicas. Las bases bioquímicas de este fenómeno aun no han sido dilucidadas a pesar de los extensos estudios realizados en animales con porfiria hepática experimental inducida químicamente.

II.2 Porfiria experimental

II.2.1 Drogas porfirinogénicas

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.

Las drogas porfirinogénicas son capaces de provocar una porfiria aún en ausencia de una predisposición genética, produciendo anomalías metabólicas similares a las observadas durante el ataque agudo de las porfirias hereditarias humanas (Battle, 1997).

Todos los compuestos porfirinogénicos tienen en común la propiedad de estimular marcadamente la actividad del ALA-S1 y, además, de disminuir el contenido de hemo hepático, ya sea por la inhibición de su síntesis, acelerando su degradación o induciendo las apoproteínas (De Matteis, 1971a).

Entre los compuestos porfirinogénicos más estudiados que actúan a nivel de alguna de las enzimas de la síntesis de hemo podemos mencionar AIA, fenobarbital (PB), DDC, Griseofulvina, y los hidrocarburos poli-halogenados.

II.2.1 Porfiria experimental por AIA

Una de las drogas más empleadas en la investigación del metabolismo del hemo tanto en animales de experimentación como en cultivo de tejidos es el AIA (Figura III.1), un análogo del Sedormid, que tiene la ventaja de carecer de sus propiedades hipnóticas (Golberg et al., 1955).

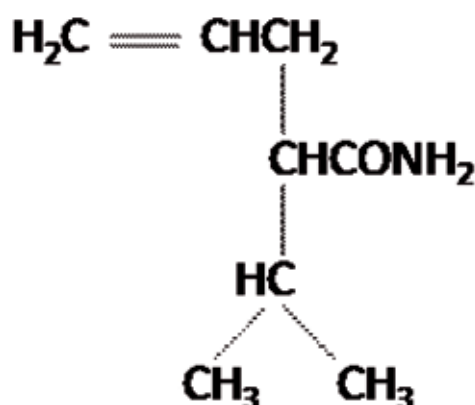


Figura III.1: Estructura del AIA

De un análisis de la composición química de estos compuestos se estableció que la estructura necesaria para actuar como inductores era la de una acetamida dialquil sustituida o de un ureido cíclico, además, por lo menos uno de los sustituyentes debía ser un grupo alilo (Abbritti & De Matteis, 1972).

El AIA provoca la pérdida del CYP como consecuencia de la destrucción de su grupo prostético hemo, la cual conduce a una disminución de la concentración del "pool" de hemo regulatorio y consecuentemente, un aumento de actividad de ALA-S1 por pérdida del control de la regulación (Marks et al., 1988). 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-S1 (Bonkowsky et al., 1980).

El AIA aumenta la actividad del ALA-S1, estimulando la síntesis de su ARNm y aumentando su estabilidad sin afectar la vida media de la proteína (Sassa & Granick, 1970).

La administración de AIA a ratas, ratones y conejos ha proporcionado en cuanto al cuadro bioquímico y clínico un modelo muy cercano para el estudio de la PAI (Goldberg et al., 1955).

Capítulo III. Regulación transcripcional del ALA-S1

La síntesis de hemo y su degradación están finamente controladas de manera tal que la cantidad de hemo disponible sea aproximadamente la misma cantidad requerida por la célula. En hepatocitos, el mayor punto de control en la síntesis del hemo ocurre mediante la represión del ALA-S1 por un "pool" de hemo regulatorio que actúa por diferentes mecanismos de retroinhibición, incluyendo la reducción de la transcripción, reducción de la estabilidad del mRNA e inhibición del transporte del ALA-S1 a la mitocondria.

En los últimos años se han hecho responsables de uno de los mecanismos de control de la actividad del ALA-S1 a proteínas de unión al DNA capaces de transformar estímulos externos y metabólicos en programas de transcripción génica (Thunell, 2006).

El gen del ALA-S1 humano está ubicado en el brazo corto del cromosoma 3, en la posición 21.1 (Figura IV.1).



Figura IV.1: Ubicación del gen del ALA-S1.

Trabajos realizados en cultivos celulares establecieron que las secuencias que dirigen la máxima expresión del gen residen en la región del promotor entre -479 y 1pb y en el primer intrón. Los elementos de control encontrados en el promotor incluyen un TATA box en la posición -30pb, dos sitios NRF-1 adyacentes en las posiciones -59 y -88pb, un CAAT box en posición -330pb (Braidotti et al., 1992), una región de respuesta a la insulina (IRE) localizada entre -459 a -354pb y una secuencia de unión para CREB (proteínas de unión a AMPc) (Scassa et al., 2004). También se encuentran secuencias de unión para receptores nucleares huérfanos (Thunell, 2006).

III.1 Inducción por drogas de la transcripción del ALA-S1

Como ya se mencionó, cuando animales de experimentación son tratados con drogas como PB o AIA, se produce un gran aumento en los niveles hepáticos de la proteína ALA-S1 (Granick, 1966). A través de ensayos de transcripción nuclear se determinó que las drogas aumentan la velocidad de transcripción del gen del ALA-S1 en el hígado de embrión de pollo (Dogra et al. 1993) e hígado de rata, pero se desconoce el mecanismo de esta inducción. Estas drogas porfirinogénicas también inducen CYPs específicos, particularmente en el hígado.

Los CYPs juegan un importante rol en la metabolización de las drogas. Debido a que los CYPs son hemoproteínas, su inducción provoca un aumento en la demanda de hemo. Puede postularse entonces la existencia de un mecanismo de inducción coordinado de CYPs y ALA-S1 que aseguraría un suministro adecuado de hemo para las apoproteínas CYPs (May et al., 1995).

Se conocen diferentes mecanismos para la inducción de los CYPs. Uno de ellos no involucra una respuesta transcripcional sino que afecta la vida media de la holoenzima formada. Con esta excepción, la inducción de los CYPs se debe a un aumento en los niveles basales de transcripción del gen. Esta inducción es mediada por proteínas receptoras intranucleares, que llevan a un aumento de los niveles de proteína enzimática dentro de la célula. Dado que sus ligandos fisiológicos naturales se desconocían, estas proteínas de unión al ADN fueron llamadas receptores nucleares huérfanos (NRs). Los NRs se activan al unirse a sus ligandos específicos como por ejemplo un xenobiótico o una hormona esteroide (Thunell, 2006). Luego de la activación se unen al receptor nuclear RXR (9-cis retinoic acid receptor). El complejo de heterodimerización resultante se une a sitios de reconocimiento dentro de secuencias enhancer en sus genes blanco, incrementando sus niveles de transcripción en forma coordinada (Podvinec et al., 2004).

En humanos el receptor CAR (constitutively active receptor) y el receptor PXR (pregnane xenobiotic receptor) median la mayoría de las respuestas transcripcionales de los CYPs inducidas por xenobióticos (Thunell, 2006).

La respuesta a PB y AIA está mediada por la acción de los CYPs hepáticos inducibles más abundantes CYP2B y 3A cuyos genes son activados por CAR y PXR (Marks et al., 1988; Czekaj, 2000).

Los genes CYP2B contienen dos sitios de unión a NR que permiten la unión de CAR cuando éste se encuentra activado por drogas y heterodimerizado a RXR. El receptor nuclear CAR se encuentra sequestrado en el citosol celular y es normalmente excluido del núcleo. Su capacidad para inducir a CYP es dependiente de su grado de translocación nuclear así como de su activación por el ligando (Thunell, 2006).

Las zonas promotoras del gen CYP3A contienen sitios en donde los heterodímeros PXR-RXR y CAR-RXR activados por ligando se pueden unir, incrementando la transcripción. En contraste con CAR, la proteína PXR reside constitutivamente en el núcleo y no necesita translocarse para acceder a su gen blanco, por lo que el paso limitante en la activación de la transcripción por PXR es esencialmente el grado de unión al ligando (Thunell, 2006).

Se demostró in-vivo que los genes CYP incluyendo CYP2A5, CYP2B10, CYP3A1, pero no CYP2E1 y CYP2D6 son genes target de RXR (Cai et al., 2002).

El gen ALA-S1 contiene un elemento transcripcional enhancer, la secuencia enhancer de respuesta a drogas de ácido aminolevúlico sintetasa (ADRES) que contiene sitios de reconocimiento para CAR y PXR (Podvinec et al., 2004). La transcripción de ALA-S1 es por lo tanto estimulada por los mismos NRs que inducen la transcripción de los genes apoCYPs involucrados en el metabolismo de drogas, permitiendo una inducción coordinada en respuesta a la acción de xenobióticos (Thunell, 2006).

III.2 Regulación nutricional de la transcripción del ALA-S1

Bajo diferentes formas de estrés, la inducción del ALA-S1 se efectúa a través de la activación de factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas FOXO, los cuales traducen estímulos ambientales y metabólicos a través de cambios en los programas de expresión génica.

Las diferentes funciones de FOXO se regulan por modificaciones post-traduccionales de la proteína, que son controladas a través de fosforilaciones y acetilaciones que determinan su localización nuclear o citoplasmática. Los blancos de FOXO son genes que controlan la generación hepática de glucosa así como la producción de ALA-S1 (Barthel et al. 2005). Su localización intracelular y activación son dirigidas por las hormonas claves en la homeostasis de la glucosa, como el glucagón, que activa las vías de liberación hepática de glucosa y de transcripción del ALA-S1 durante el ayuno, y la insulina que los bloquea (Perrot & Rechler, 2005).

La insulina inhibe la transcripción del ALA-S1 estimulada por FOXO1 al activar la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (Akt) (Handschin et al., 2005) (Figura IV.2). En concordancia con estos resultados, estudios previos en nuestro laboratorio en un modelo de diabetes, demostraron que el agente insulino-mimético vanadato estaría actuando sobre el ALA-S1 a través de la misma vía.

PI3K es probablemente la enzima de la cascada de señalización de insulina más extensamente estudiada. Es una proteína dimérica con una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). La subunidad p85 se une al sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) fosforilado y eso hace que cese su actividad inhibitoria sobre la subunidad p110 (Ueki et al., 2002).

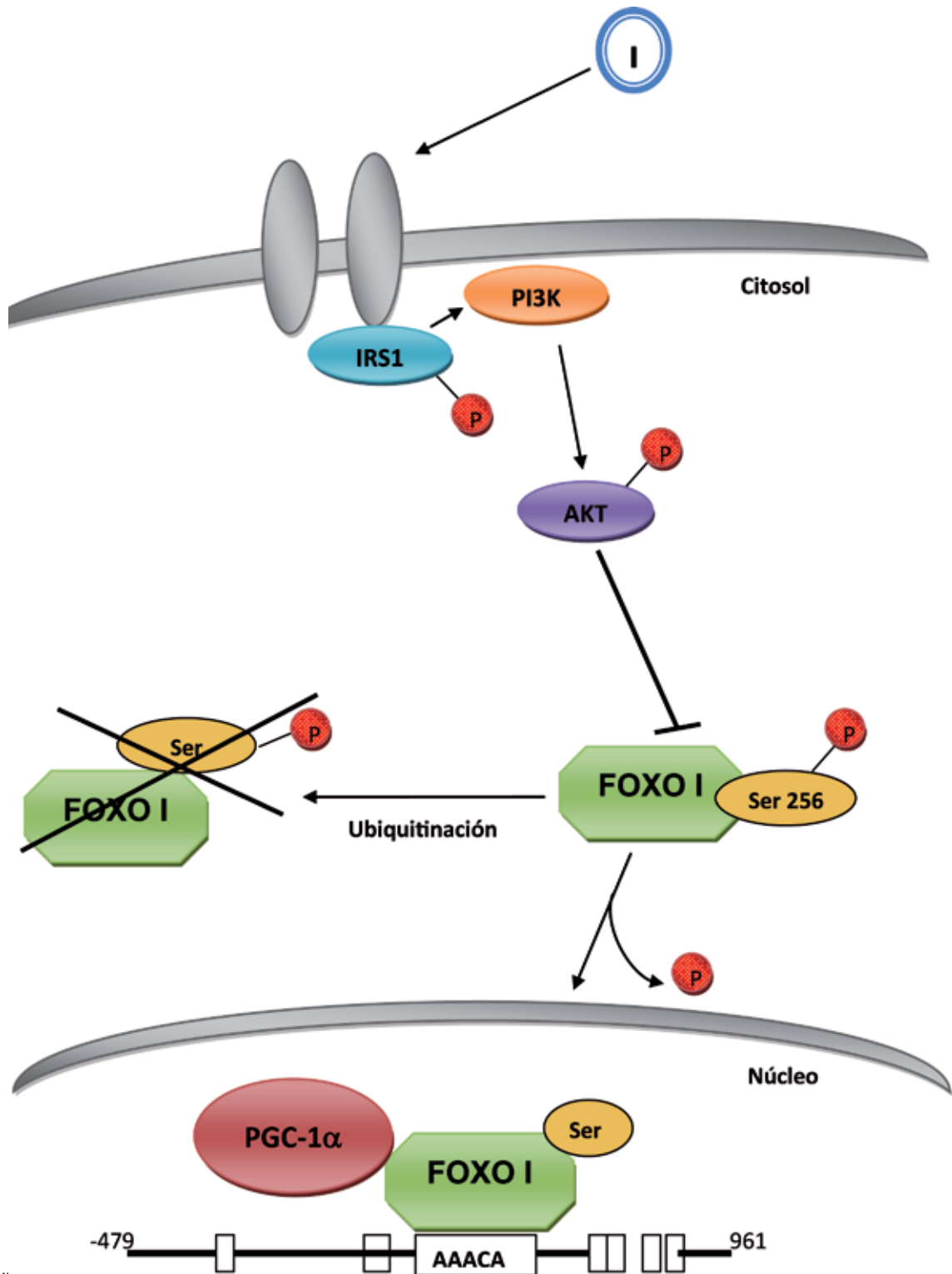
IRS-1 es una proteína rica en regiones de unión a tirosinas fosforiladas (regiones PTB), que le permiten unirse al receptor y ser fosforilado por él en sus residuos de tirosina (Giovannone et al., 2000).

La subunidad p110 desinhibida fosforila varios fosfolípidos de membrana, principalmente el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI 4,5P) para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). El PIP3 es el encargado de fijar a la membrana y activar a Akt, una enzima quinasa de serinas y treoninas que media algunos de los efectos metabólicos de la insulina (Currie et al., 1999). La fosforilación de FOXO1 mediada por Akt en los sitios Thr24, Ser253 y Ser316 reduce la transcripción del gen blanco y estimula la exportación de FOXO1 del núcleo hacia el citoplasma (Perrot & Rechler, 2005) donde es vulnerable a la degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma (Thunell, 2006).

En ausencia de insulina, FOXO1 es importado y retenido en el núcleo (Matsuzaki et al., 2005) incrementando la transcripción de sus genes blanco.

PGC-1 α (Proliferator-activated receptor y coactivador 1 α) es un coactivador de receptores nucleares y otros factores de transcripción (Puigserver & Spiegelman, 2003). Se induce en el hígado en condiciones de ayuno y de ejercicio físico extenuante, efectuando transcripciones co-reguladas de los genes de ALA-S1 y de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y Glc6P. Es inducido por glucagón que, junto con los glucocorticoides, responde a la reducción de los niveles de glucosa en plasma (Thunell, 2006).

PGC-1 α es reclutado a sus genes blanco por el factor respiratorio nuclear-1 (NRF-1), un factor de transcripción que incrementa la expresión de genes mitocondriales codificados en el núcleo. Ésta vía que lleva a la liberación de glucosa hepática así como a la inducción del ALA-S1 no es sensible a la insulina. En contraste, la vía de PGC-1 α paralela, que lleva a la gluconeogénesis hepática y a la transcripción de ALA-S1, que procede a través de FOXO1, el cual es reclutado al elemento de respuesta a insulina (IRE) dentro del promotor de sus genes blanco, se encuentra activa sólo en estado de ayuno. La resultante liberación de glucosa por el hígado eventualmente inhibe la producción de glucagón, inhibiendo la vía de PGC-1 α -FOXO1 (Thunell, 2006).



Figur

Capítulo IV. Vanadato y vitamina E

IV.1 Vanadio

El vanadio es un elemento situado en grupo V de la tabla periódica de los elementos. Es un metal de transición que puede existir en cuatro estados de oxidación, +2, +3, +4 y +5. El vanadio puede encontrarse como vanadil (VO_2^+) cuando el pH es inferior a 3,5 y en soluciones básicas su forma predominante es el orthovanadato (VO_4^{3-}). También se encuentra como VO_4^- en soluciones neutras. El metavanadato (VO_3^-) es la especie predominante en los fluidos corporales (Barceloux, 1999).

IV.1.1 Efecto insulino-mimético de los compuestos del vanadio

La primera documentación acerca de los efectos insulino-miméticos de la sal inorgánica del vanadio, el orthovanadato de sodio (Na3VO4) fue publicada por Lyonnet et al. en 1899, 22 años antes del descubrimiento de la insulina. Observaron que la administración oral de Na3VO4 causaba un descenso de la glucosuria en 2 de cada 3 pacientes diabéticos. Desde entonces numerosos estudios han revelado varios efectos insulino-miméticos de compuestos del vanadio in vitro e in vivo, incluyendo la estimulación del transporte y oxidación de la glucosa, la síntesis de glucógeno, la lipogénesis así como la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis (Srivastava & Mehdi, 2004).

En algunos casos la terapia con vanadio fue asociada con diarreas severas, sin embargo esto se corrigió administrando sales de vanadio en soluciones de NaCl 0,5%. También se observó que el descenso en los niveles de glucosa en plasma, en orina y en el volumen urinario y el mejoramiento en la tolerancia a la glucosa oral fueron similares sin importar el tipo de sal de vanadio utilizada (Srivastava & Mehdi, 2004).

IV.1.2 Mecanismo molecular de acción del vanadio

A nivel molecular, el mecanismo preciso a través del cual el vanadio ejerce efectos insulino-miméticos y anti-diabéticos no ha sido completamente dilucidado. Como las sales de vanadio son potentes inhibidores de proteínas fosfatasa de tirosinas (PTPasas), y la activación del receptor de la insulina (IR) requiere un aumento en la fosforilación de tirosinas de su subunidad β, se sugirió que al prevenir la desfosforilación de la subunidad IR-β, el vanadio podría activar la proteína tirosina kinasa de IR (PTK). La activación de IR-PTK fosforila sustratos de IR (IRSs) en múltiples residuos de tirosina. La fosforilación de IRS1 lleva a la activación de la vía ya mencionada en el capítulo anterior que involucra la activación de PI3K y de la proteína kinasa de serinas y treoninas Akt (Figura V.1), la cual ha sido implicada en numerosas respuestas fisiológicas de la insulina a nivel de transporte de glucosa, de glucógeno y de síntesis de proteínas (Srivastava & Mehdi, 2004).

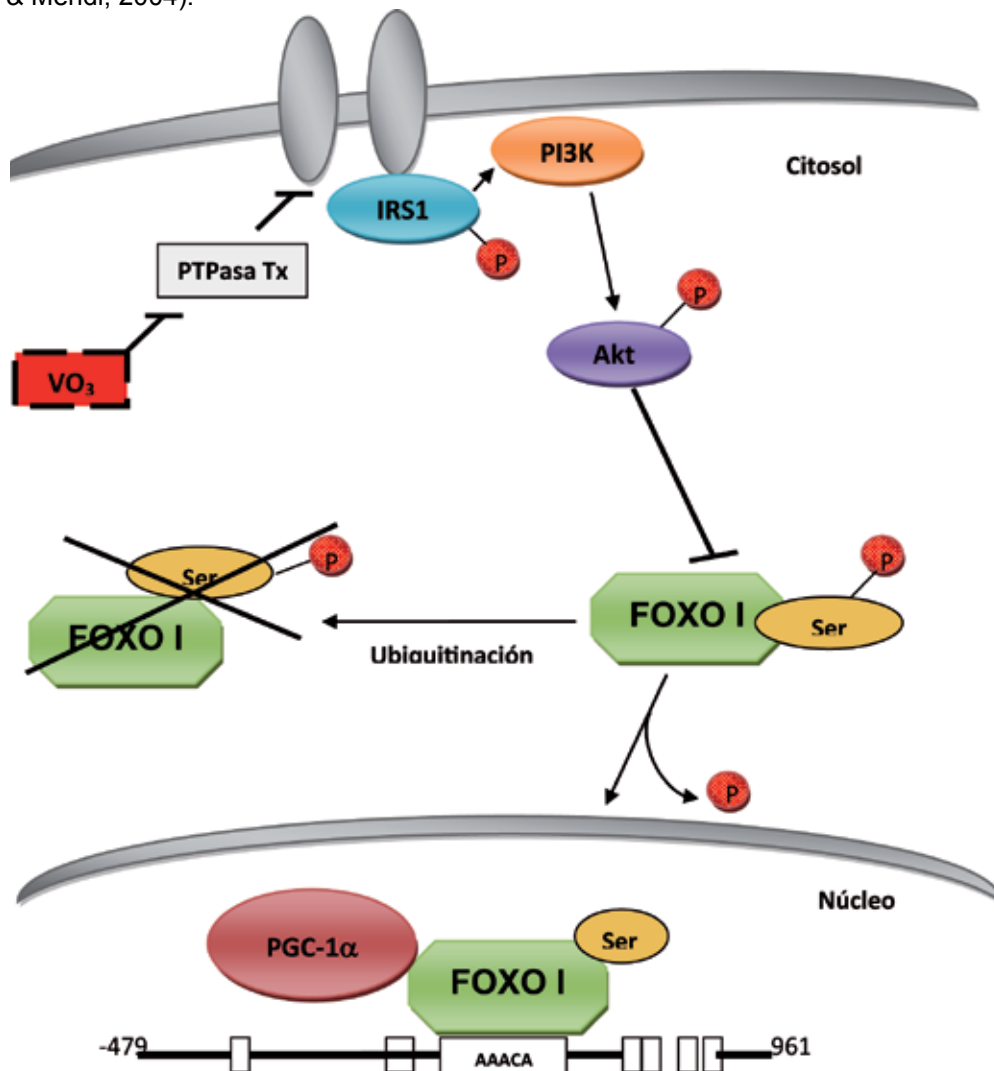


Figura V.1: Mecanismo de acción del vanadato.

IV.1.3 Toxicidad del vanadio

A pesar de sus propiedades anti-diabéticas, los compuestos del vanadio han sido asociados con numerosos efectos tóxicos. Los más comunes son diarrea, descenso en la ingesta de líquidos y alimentos y deshidratación (Srivastava & Mehdi, 2005).

Además de las molestias gastrointestinales, otros efectos tóxicos de las sales de vanadio incluyen hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad. Éstas estimulan la mitogénesis y la proliferación celular en cultivos celulares y por lo tanto tienen el potencial de ejercer actividad carcinogénica y tumorigénica. En contraste, trabajos recientes no encontraron cambios significativos en la histopatología de numerosos tejidos, incluyendo el hígado, el bazo, el estómago, el corazón y los pulmones, en animales tratados con sales de vanadio. En pacientes tratados con sales de vanadio, el efecto tóxico más común fue la molestia gastrointestinal, la cual pudo ser corregido al bajar la dosis (Srivastava & Mehdi, 2005).

Además, los metales de transición, como el vanadio, son conocidos agentes generadores de radicales libres a través de los cual ejercen efectos deletéreos sobre los sistemas biológicos. Diferentes estudios han asociado al vanadio con la producción de especies reactivas de oxígeno llevando a la peroxidación lipídica y a la alteración del sistema de defensa antioxidante (Soares et al., 2008). En particular, Rus-sanov et al. (1994) han demostrado que la administración de vanadato a ratas causa un incremento en la peroxidación lipídica así como una marcada inhibición de las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.

IV.2 Vitamina E

La vitamina E se presenta como un aceite amarillo claro, soluble en grasas e insoluble en agua.

Existen varios vitámeros que pueden considerarse derivados de una estructura básica llamada tocol. El tocol posee un núcleo cromano con un hidroxilo y una cadena lateral de 16 carbonos que puede considerarse como constituida por la unión de tres unidades de isopreno saturado. Los tocoferoles, derivados metilados del tocol, se designan con letras griegas. Los más importantes son el α (Figura V.2), el β y el γ tocoferol, que difieren entre sí en el número y posición de los grupos metilos unidos al anillo bencénico.

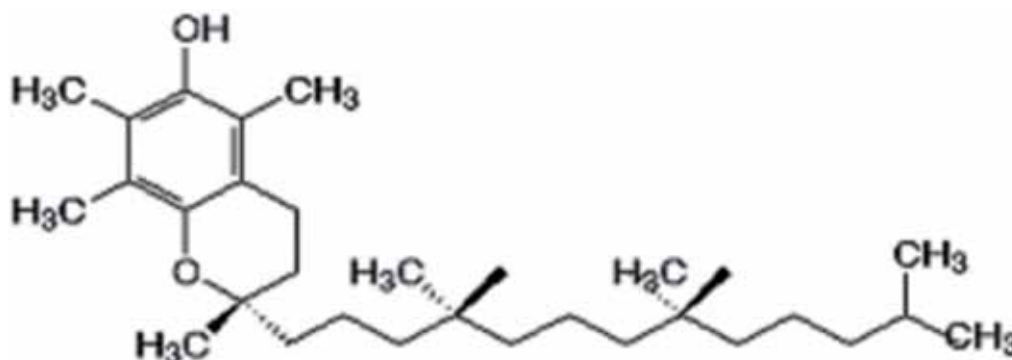


Figura V.2: Estructura del α -tocoferol.

La absorción de los tocoferoles, como la de otras vitaminas liposolubles, requiere la presencia de bilis y de secreciones pancreáticas para poder formar micelas que serán absorbidas por el intestino. Desde la mucosa intestinal es transportado por la sangre, probablemente en los quilomicrones, captado por el hígado y posteriormente liberado a la circulación unido a lipoproteínas.

La propiedad más notable de la vitamina E es su capacidad antioxidante y a pesar que todos los tocoferoles poseen actividades antioxidantes similares, sólo el α -tocoferol cumple los requerimientos humanos de vitamina E, los demás son pobremente reconocidos por la proteína de transferencia de α -tocoferol hepática (α -TTP) (Traber, 2007).

α -TTP es responsable de mantener la concentración de α -tocoferol en plasma. El mecanismo por el cual esto ocurre permanece bajo intensa investigación, pero está claro que en ausencia de α -TTP, ocurre una acumulación lisosomal de α -tocoferol en lugar de ser secretado en el plasma, como puede observarse en pacientes con una α -TTP defectuosa (Traber & Atkinson 1993).

Es sabido que en los tejidos pueden formarse, como productos del metabolismo, peróxidos, superóxido (O_2^-) y radicales libres que desarrollan una acción nociva en las células. Son particularmente sensibles a estos agentes, los ácidos grasos poliinsaturados, que constituyen los lípidos complejos de membranas celulares. La vitamina E, conjuntamente con la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y las catalasas, constituyen un sistema de defensa contra aquellos productos oxidantes.

IV.2.1 Vitamina E y regulación de la síntesis del hemo

La demostración de Dinning & Day en 1957 de que monos con deficiencia de vitamina E sufrían de anemia nutricional no solo probó que un primate necesita esta vitamina sino que también advirtió su posible rol en la biosíntesis del hemo y de hemoproteínas.

Algunos estudios llevaron a la observación de que la vitamina E coopera en un sistema de tipo inducción-represión en tejidos hepáticos a nivel de dos enzimas, ALA-S1 y ALA-D (Nair, 1972).

La administración de vitamina E deprime la excreción urinaria de porfirinas y precursores en conejos intoxicados con plomo, en ratas con porfiria inducida por AIA y en humanos con porfiria cutánea tarda. Algunos estudios revelaron que la vitamina E contrarresta el proceso de inducción del ALA-S1 que caracteriza a las porfirias hepáticas, tanto humanas como experimentales, probablemente a nivel genético. Además, también se demostró que bajo condiciones idénticas de edad y de dosis de AIA, la inducción de ALA-S1 en ratas deficientes en vitamina E tratadas con AIA fue varias veces más alta que en animales control normales. Esto se llamó el efecto "permisivo" de la deficiencia de vitamina E en la inducción del ALA-S1 por AIA (Nair, 1972).

También se observó que en animales deficientes en vitamina E, la actividad del ALA-D hepática es significativamente más baja que en los animales controles (Nair, 1972).

Referencias

- Abbritti G, De Matteis F. (1972) Decreased levels of cytochrome P-450 and catalase in hepatic porphyria caused by substituted acetamides and barbiturates. Importance of the allyl group in the molecule of the active drugs. *Chem Biol Interact.* 4: 281-286.
- Barceloux DG. (1999) Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol.* 37: 265-278.
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 16: 183-189.
- Battle AM del C, Magnin P. (1988) Porfirias y Porfirinas. Aspectos Clínicos y Bioquímicos. Sem: Actualizaciones Médico-Bioquímicas. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer. Suplemento 2.*
- Battle AM del C. (1997) Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular. Sem.: Actualizaciones Médico-Bioquímicas. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer. Suplemento 3.*
- Bickers DR, Frank J. The porphyrias. In: Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. *Dermatology in general medicine*, edition 6. McGraw Hill, 2003: 1435-1466.
- Bonkowsky H., Sinclair P., Sinclair J. (1979) Hepatic heme metabolism and its control. *Yale J Biol Med.* 52: 13-37.
- Bonkowsky HL, Collins A, Doherty JM, Tschudy DP. (1973) The glucose effect in rat liver: studies of delta-aminolevulinic synthase and tyrosine aminotransferase. *Biochim Biophys Acta.* 320: 561-575.
- 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.
- Braidotti G, Borthwick IA, May BK. (1993) Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic synthase from rat. *J Biol Chem.* 268: 1109-1117.
- Brodie MJ, Moore MR, Thompson GG, Goldberg A. (1977) The treatment of acute intermittent porphyria with laevulose. *Clin Sci Mol Med.* 53: 365-371.
- Cai Y, Konishi T, Han G, Campwala KH, French SW, Wan YJ. (2002) The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. *Eur J Pharm Sci.* 15: 89-96.
- Chandra R, Malhotra R, Dhawan M, Kumaria N. (1996) In heme catabolism C2 and C4 vinyl groups reduction of cobalt protoporphyrin forms cobalt mesoporphyrin and alters the nature of action of the metalloporphyrin in vivo. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 21: 269-274.
- Chang GW, Kam PC. (1999) The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia.* 54: 42-50.
- Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J. (1999) Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J.* 337: 575-583.
- Czekaj P. (2000) Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim Pol.* 47: 1093-1105.
- De Matteis F. (1971a) Drugs and Porphyrias. *South Afr. J. Lab. & Clin. Med.* 17: 126-134.

- Dinning JS, Day PL. (1957) Vitamin E deficiency in the monkey. I. Muscular dystrophy, hematologic changes, and the excretion of urinary nitrogenous constituents. *J Exp Med.* 105: 395-402.
- Dogra SC, Hahn CN, May BK. (1993) Superinduction by cycloheximide of cytochrome P4502H1 and 5-aminolevulinic synthase gene transcription in chick embryo liver. *Arch Biochem Biophys.* 300: 531-534.
- Giovannone B, Scaldaferrì ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. (2000) Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev.* 16: 434-441.
- Goldberg A., Rimington C, Fenton JBC. (1955). Experimentally produced porphyria in animals. *Proc. Roy Soc. , Series B.* 143: 257-280.
- Granick S. (1966) The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J Biol Chem.* 241: 1359-1375.
- Guengerich FP. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv.* 3: 194-204.
- Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell.* 122: 505-515.
- Krishna DR, Klotz U. (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* 26: 144-160.
- Lindberg RL, Martini R, Baumgartner M, Erne B, Borg J, Zielasek J, Ricker K, Steck A, Toyka KV, Meyer UA. (1999) Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J Clin Invest.* 103: 1127-1134.
- Lyonnet B, Martz M, Martin E. (1899) L'emploi thérapeutique des derives du vanadium. *La Presse Médicale.* 32: 191-192.
- Maines MD. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557-2568.
- Marks GS, McCluskey SA, Mackie JE, Riddick DS, James CA. (1988) Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450. *Faseb J.* 2: 2774-2783.
- Matsui T, Nakajima A, Fujii H, Matera KM, Migita CT, Yoshida T, Ikeda-Saito M. (2005) O₂- and H₂O₂-dependent verdoheme degradation by heme oxygenase: reaction mechanisms and potential physiological roles of the dual pathway degradation. *J Biol Chem.* 280: 36833-36840.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. (2005) Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 11278-11283.
- Matsuzaki H, Ichino A, Hayashi T, Yamamoto T, Kikkawa U. (2005) Regulation of intracellular localization and transcriptional activity of FOXO4 by protein kinase B through phosphorylation at the motif sites conserved among the FOXO family. *J Biochem.* 138: 485-491.
- May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, Bottomley SS. (1995) Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 51: 1-51.
- Nair PP. (1972) Vitamin E and metabolic regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 203: 53-61.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 6: 1-42.
- Nenoï M, Ichimura S, Mita K, Yukawa O, Cartwright IL. (2001) Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res.* 61: 5885-5894.
- Nordmann Y., Puy H. (2002) Human hereditary hepatic porphyrias. *Clinica Chimica Acta.* 325: 17-37.
- Omura T, Sato R. (1964) The carbon-monoxide binding pigment by liver microsomes. *J Biol Chem.* 239: 2379-2385.
- Padmanaban G, Venkateswar V, Rangarajan PN. (1989) Haem as a multifunctional regulator. *Trends Biochem Sci.* 14: 492-496.
- Perrot V, Rechler M. (2005) The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription. *Mol Endocrinol.* 19: 2283-2298.
- Podvinec M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 9127-9132.
- Puigserver P, Spiegelman BM. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 24: 78-90.
- Russanov E, Zaporowska H, Ivancheva E, Kirkova M, Konstantinova S. (1994) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol*

- Endocrinol. 107: 415-421.
- Scassa ME, Guberman AS, Ceruti JM, Cánepa ET. (2004) Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinic synthase gene expression and are involved in insulin repression. *J Biol Chem.* 279: 28082-28092.
 - Scibior D, Czacot H. (2006) Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw.* 60: 170-180.
 - Soares SS, Martins H, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M. (2008) Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 147: 168-178.
 - Srivastava AK, Mehdi MZ. (2005) Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet Med.* 22: 2-13.
 - Stein JA, Tschudy DP. (1970) Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine.* 49:1-16.
 - Taketani S. (2005) Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med.* 205: 297-318.
 - Tenhunen R, Mustajoki P. (1998) Acute porphyria: treatment with heme. *Semin Liver Dis.* 18: 53-55.
 - Thadani H, Deacon A, Peaters T. (2000) Diagnosis & management of porphyria. *B.M.J.* 320: 1647-1652.
 - Thunell S. (2006) (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria. *Physiol Res.* 55: 43-66.
 - Traber MG, Atkinson J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 43: 4-15.
 - Traber MG. (2007) Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 27: 347-362.
 - Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther.* 111: 327-345.
 - Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR. (2002) Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol.* 22: 965-977.
 - van der Weide J, Steijns LS. (1999) Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem.* 36: 722-729.
 - Werck-Reichhart D, Feyereisen R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1(6): reviews3003.
 - Zhang X, Liu Y. 2003 Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284: 1216-1225.

Objetivos

En el presente estudio nuestro objetivo general es investigar la eficacia y el mecanismo de acción del vanadato y de la vitamina E como una estrategia terapéutica para el tratamiento de la PAI. Para ello, utilizando un modelo de PAI inducida con AIA nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Investigar los efectos del vanadato sobre la expresión del ALA-S1.
- Determinar la participación de la vía PI3K/Akt/FOXO1 en la regulación del ALA-S1.
- Investigar los efectos de la vitamina E sobre la expresión del ALA-S1.
- Determinar los efectos del vanadato y la vitamina E sobre la catalasa, como marcador del estrés oxidativo, a través de la medición de los niveles de actividad y expresión de la catalasa bajo los tratamientos indicados.

Materiales y métodos

Capítulo I. Diseño experimental

Animales

Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa CF1 con un peso de aproximadamente 30-35 g que fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura e iluminación.

Los animales fueron tratados según las normas establecidas por el comité de la Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEAL).

Tratamientos

Los animales recibieron los siguientes tratamientos:

- Ayuno: Los animales fueron privados de alimento 24 o 48 horas antes del sacrificio.
- AIA: Los animales recibieron una única dosis de 240 mg (i.p) (en etanol: NaCl 0,9 %; 1:3 v/v) 16 horas antes del sacrificio.
- AIA + Vanadato: El V se administró en el agua de bebida durante los 6 o 9 días (150 mg de V + 2,34 g de NaCl en 500 ml de agua) previos a la inyección de AIA.
- AIA + Vitamina E: Los animales recibieron una dosis diaria de vitamina E de 60 mg/kg (i.p) (en aceite de maíz) durante los 4 días previos a la inyección de AIA.
- Controles: Los animales recibieron el vehículo correspondiente a cada tratamiento y se sacrificaron a los tiempos indicados.

Preparación de los tejidos

En la Figura 1 se muestra el esquema con los diferentes procedimientos efectuados para obtener las distintas fracciones y los parámetros medidos en cada una de ellas:

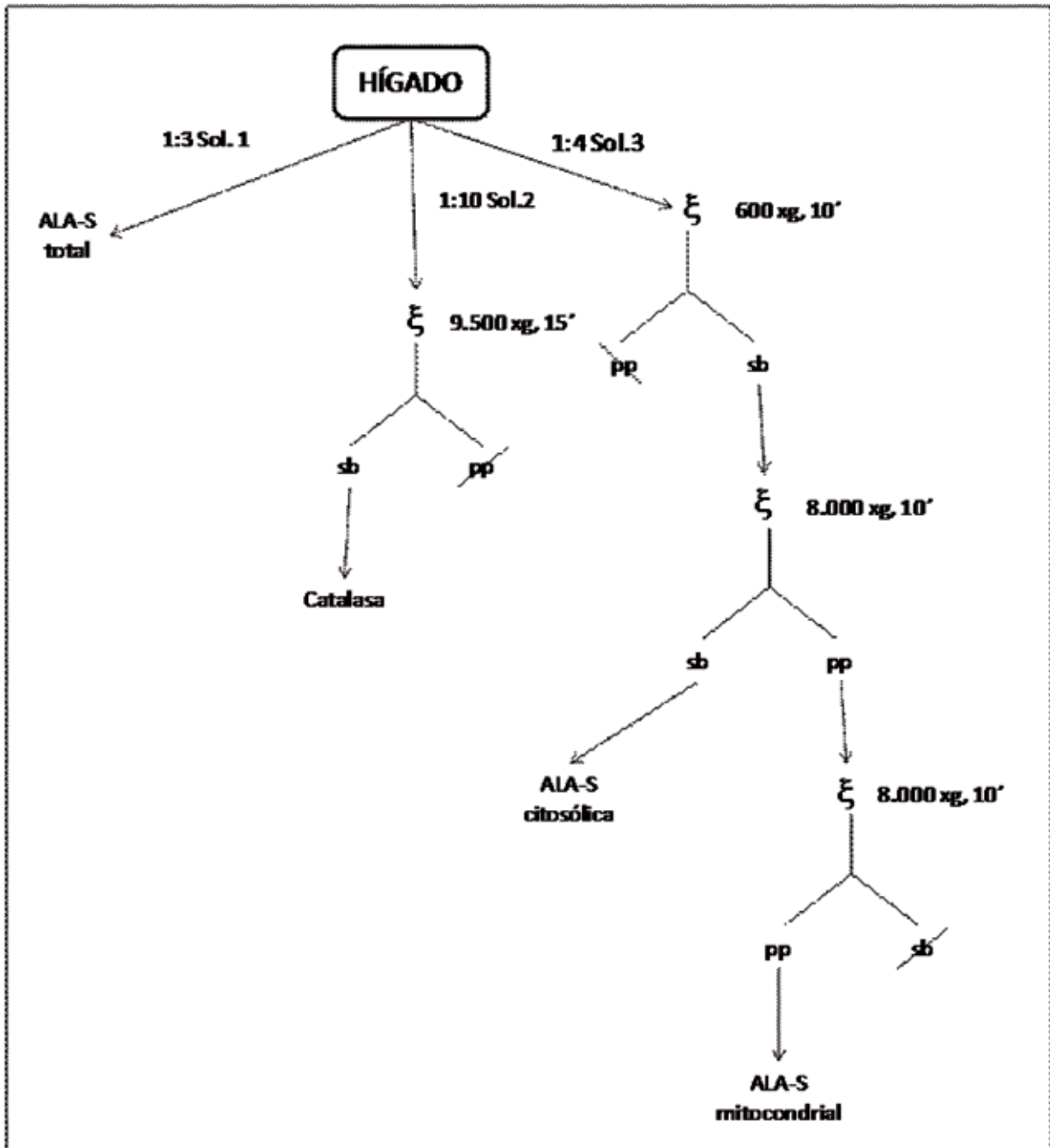


Figura 1: Esquema del fraccionamiento subcelular realizado en hígado y parámetros medidos en cada fracción

Sol. 1: NaCl 0,9 %, buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 y EDTA 0,5 mM; **Sol 2:** buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4. **Sol 3:** sacarosa 0,25 M, buffer Tris-HCl 0,02 M pH 8, EDTA 0,1 mM y fosfato de piridoxal 0,1 mM.

Capítulo II. Determinaciones bioquímicas

Actividad de la δ-aminolevulónico sintetasa (ALA-S1)

La actividad de ALA-S1 total se determinó según el método descrito por Marver et al. (1966). El procedimiento para obtener la muestra de enzima se esquematiza en la Figura 1.

El sistema de incubación contenía en un volumen final de 2 ml: buffer Tris- HCl 0,075 M pH 7,4, glicina 0,1 M, EDTA 10 mM y 0,5 ml de extracto enzimático. 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 g durante 20 min. El ALA contenido en 1 ml 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 (1 g 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 555 nm entre los 8-30 min. de ocurrencia de la reacción. La cantidad de ALA formado se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/ml homogenato} = \frac{A^{555} \times \text{vol f} \times \text{dil}}{\text{vol enz} \times \epsilon}$$

A^{555} : absorbancia a 555 nm

Vol f: volumen final

Vol enz: volumen de solución enzimática incubada

ϵ : coeficiente de extinción = 58 mM⁻¹ cm⁻¹

dil: dilución producida por el agregado de los reactivos

Actividad de la δ -aminolevulónico sintetasa citoplasmática y mitocondrial

La actividad de ALA-S1 se determinó según el método descrito por Hayashi et al. (1969). El procedimiento para obtener la muestra de enzima se esquematiza en la Figura 1.

El sistema contenía en un volumen final de 2 ml: glicina 0,1 M, Tris-HCl 0,075 M pH 7,4, ATP 0,01 M, MgCl₂ 0,005 M, ácido succínico 0,1 M pH 7,4, EDTA 0,01 M, CoA 0,15 mM, succinil CoA sintetasa que cataliza la formación de 10 μ mol de succinil CoA y 1 ml de extracto enzimático. 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 g durante 20 min. El ALA contenido en 1 ml 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 (1 g 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 555 nm entre los 8-30 min de ocurrencia de la reacción. La cantidad de ALA formado se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/ml homogenato} = \frac{A^{555} \times \text{vol f} \times \text{dil}}{\text{vol enz} \times \epsilon}$$

A^{555} : absorbancia a 555 nm

Vol f: volumen final

Vol enz: volumen de solución enzimática incubada

ϵ : coeficiente de extinción = 58 mM⁻¹ cm⁻¹

dil: dilución producida por el agregado de los reactivos

Actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa se determinó según el método cinético de Chance y Maehly (1954). El procedimiento para obtener la muestra de enzima se esquematiza en la Figura 1.

El volumen final de la mezcla de reacción fue de 3 ml. A 2,9 ml de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 conteniendo H₂O₂ 30 % (suficiente como para obtener una lectura de absorbancia inicial a 240 nm de aproximadamente 0,500) se le agregaron 0,1 ml de solución enzimática. La actividad de la catalasa se determinó midiendo el tiempo requerido para conseguir una disminución de la absorbancia del H₂O₂ desde 0,450 a 0,400.

$$\text{nmoles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos/min.ml} = \frac{(\text{pend.} \times 60 \times \text{vol f} \times 10^9 \times \text{dil})}{(\text{vol enz} \times \epsilon)}$$

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

vol f: volumen final

vol enz: volumen de solución enzimática incubada

ϵ : coeficiente de extinción=39,4 mM⁻¹ cm⁻¹

60: factor de conversión de seg. a min.

Determinación del contenido proteico

Lowry

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas se determinó empleando el método descrito por Lowry et al., (1951).

A 0,4 ml de una dilución apropiada de la proteína en H₂O destilada se le agregaron 2 ml de una solución compuesta por 50 ml de Na₂CO₃ 2 % en NaOH 0,1 N, 0,5 ml de tartrato de sodio y potasio 1 % y 0,5 ml de CuSO₄ · 5H₂O 0,5 %. Luego de 10 min. se agregaron 0,2 ml de una dilución 1:2 del reactivo de Folin stock, cuyo factor había sido determinado previamente mediante una curva de calibración. 30 min. después, la cuantificación de las proteínas en las muestras se realizó mediante la medición de la absorbancia a 660 nm contra un blanco preparado con 0,4 ml de H₂O destilada en lugar de la muestra.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg de proteína/ml} = A^{660} \times f \times \text{dil.}$$

A⁶⁶⁰: absorbancia de a 660nm

f: factor = 0,36 mg/ml

dil: dilución de la muestra

Bradford

El contenido proteico de las preparaciones para Western Blot se determinó empleando el método de Bradford (1976).

A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl se le agregan 2 ml de una solución compuesta por 0,01 % (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % de etanol (95 %) y 8,5 % (p/v) de ácido fosfórico (85 %). Se puede medir la absorbancia a 595 nm, luego de transcurridos 10 min., contra un blanco preparado con 0,1 ml del buffer correspondiente y 2 ml del reactivo. El color se mantiene durante 60 min.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg de proteína/ml} = A^{595} \times f \times \text{dil.}$$

A⁵⁹⁵: absorbancia de a 595nm

f: factor = 0,99 mg/ml

dil: dilución de la muestra

Análisis estadístico

Se calcularon el promedio y el desvío de cada variable para cada grupo experimental estudiado. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron usando el análisis de varianza para una variable (ANOVA), estableciéndose un nivel de probabilidad menor a 0,05 para considerar diferencias significativas. En los casos donde la ANOVA mostró diferencias significativas se evaluó la diferencia entre grupos utilizando el test a posteriori de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples.

Capítulo III. Métodos moleculares

WESTERN BLOT

Preparación Homogenatos

Homogenato total

Se realizó un homogenato 1:10 en buffer homogenato (1 % triton, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 10 mM EDTA, cocktail inhibidor de proteasas SIGMA P8340). Se centrifugó una vez a 13500 g durante 30 min. Se descartó el pellet. El sobrenadante se fraccionó y guardó a -70 °C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

Homogenato núcleos

Se realizó un homogenato 1:8 en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7,6, conteniendo inhibidores de proteasas. Se centrifugó durante 5 min a 24 g. Se descartó el pellet. El sobrenadante se centrifugó durante 5 min. a 855 g. El pellet obtenido correspondiente a la fracción nuclear se resuspendió en 0,5 ml de buffer homogenato. Se fraccionó y guardó a -70 °C. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976).

Corrida Electroforética

Se prepararon geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, de distinto porcentaje de acuerdo a la proteína estudiada. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min. a 100 °C por el agregado de buffer de siembra (1 ml glicerol, 0,5 ml β -mercaptoetanol, 3 ml SDS 10 %, 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,7 y 1 mg azul bromofenol en una relación 1:1 (v/v)). Para la corrida electroforética se utilizó buffer de electroforesis 1X (3 g Tris base, 14,4 g glicina, 10 ml SDS 10 %, el pH se llevó con HCl a 8,3, en un volumen final de 1 litro). Se corrió a voltaje constante en un rango de 100-250 V, no excediendo los 300 V. Se consideró la corrida completa cuando el frente de corrida alcanzó la base del gel.

El porcentaje del gel se especifica en la leyenda de cada figura.

Transferencia

Luego de la corrida electroforética, se sumergió el gel de poliacrilamida en buffer de transferencia o Towbin-buffer (3,0 g Tris base, 14,4 g glicina, 20 % (v/v) metanol, se ajustó el pH a 8,3 con HCl y se llevó a un volumen final de 1 litro) durante 10-20 min. La transferencia se realizó sobre membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL Amersham). La membrana se pre-humedeció en agua destilada y posteriormente en buffer Towbin durante 10 min. Se armó el cassette de electroblotting, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfirió con Towbin-buffer a voltaje constante (35 V) durante 45 min. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se dejó secar al aire y se guardó entre dos papeles Whatman envuelta en papel film, a 4 °C.

Inmunodetección

Se humedecieron las membranas en TBS-T 1X 0,2 % (2,42 g Tris base, 8,0 g NaCl, se ajustó el pH a 7,6 con HCl, 2 ml Tween 20 y se llevó a un volumen final de 1 litro) durante 10 min. a temperatura ambiente y se tiñeron con rojo ponceau (0.1 % Ponceau en ácido acético 5 % (v/v)) para confirmar una buena transferencia.

Se bloquearon con BSA (seroalbúmina bovina) 5 %, disuelta en 1X 0,2 % TBS-T, o leche descremada en polvo 5 % disuelta en el mismo medio, durante 1 hora a temperatura ambiente. La elección del bloqueante dependió del origen del primer anticuerpo. Se lavaron con 1X 0,2 % TBS-T a temperatura ambiente durante 30 min.

Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo en la dilución apropiada en 1X 0,2 % TBS-T para dar un resultado óptimo. Estas diluciones se optimizaron para cada anticuerpo por medio de un análisis de dot blot. Los tiempos y las temperaturas de incubación variaron dependiendo del anticuerpo. Se lavaron 1X 0,2 % con TBS-T a temperatura ambiente. El tiempo de lavado dependió de cada anticuerpo.

Se incubaron con el segundo anticuerpo, conjugado con peroxidasa (IgG-HRP Horse-Radish Peroxidase), 1 hora a temperatura ambiente. La elección del segundo anticuerpo dependió del origen del primero. Se emplearon diluciones en 1X 0,2 % TBS-T que optimizaron la señal y disminuyeron el background. El tiempo de lavado dependió de cada anticuerpo.

Para revelar se empleó el sistema de detección de Western Blot ECL Amersham (Enhanced Chemiluminiscent System), basado en el principio de quimioluminiscencia, compuesto por dos reactivos. Se mezclaron cantidades iguales de los reactivos para obtener un volumen final equivalente a 0,125 ml/cm² para recubrir completamente la membrana. Se dejó reaccionar durante 1 min. Se recubrió la membrana con un film y se expuso a placas radiográficas AGFA. El tiempo de exposición (desde 1 min. a 1 hora) dependió de la cantidad de señal emitida. Posteriormente las placas se colocaron en solución reveladora durante 3 min., se lavaron con agua y se fijaron durante otros 3 min.

Los anticuerpos utilizados fueron: ALA-S (generado en el laboratorio); IRS1, p-IRS1, PGC1 α , Akt1, pAkt, anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse, CYP3A, Sp1, EGR1, catalasa Santa Cruz Biotechnology; Foxo1 Cell Signaling; CYP2B1/2 Chemicon international; CYP2E1 Stressgen.

Las autoradiografías, se cuantificaron en unidades de scanner relativas. Los resultados se expresaron como el % del valor control promedio, tomado como 100 %.

Capítulo IV. Purificación de la succinil CoA sintetasa

Cultivo y crecimiento de *rhodospseudomonas spheroides*

Se hicieron crecer las bacterias en el medio Weaver EL. Dicho medio se prepara a partir de las siguientes soluciones:

Sol.A-	Ácido D-L-málico 20 %	pH 6,8
Sol.B-	EDTA disódico	1 %
Sol.C-	Sulfato de magnesio. 7 H ₂ O	20 %
Sol.D-	SO ₄ Mg	397,5 mg
	Ac. Bórico	700 mg
	NO ₃ Cu 3 H ₂ O	10 mg
	SO ₄ Zn 7 H ₂ O	60 mg
	MoO ₄ Na 2 H ₂ O	187,5 mg

Llevar a 250 ml con agua destilada.

Sol.E- Cl₂Ca 2 H₂O 7,5 %

Sol.F- Sulfato ferroso 7 H₂O 0,5 %

Sol.G-	Colina	550 mg
	Tiamina	165 mg
	Ac. Nicotínico	580 mg
	Pantotenato de sodio	100 mg
	Biotina	0,6 mg
	PABA	160 mg
	Mesoinositol	600 mg
	Vitamina B12	40 mg
	Riboflavina	100 mg

Llevar a 1 litro con agua destilada.

Sol.H- Buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6,8

Sol.I- Sulfato de amonio 1 M

Para preparar 1 litro de medio se mezclan las soluciones en la siguiente relación:

10 ml	solución A
2 ml	solución B
1 ml	solución C
1 ml	solución D
1 ml	solución E
2,4 ml	solución F
1 ml	solución G
15 ml	solución H
10 ml	solución I

Se agregan 0,5 g/L de extracto de levadura

Se esteriliza con vapor, antes del agregado de la solución G, a 1,5 atm durante 20 min. La solución G se filtra antes de ser agregada.

Para el cultivo aeróbico en oscuridad, las células se incubaron en frascos erlenmeyer, con agitación y con un volumen no mayor a 1/10 del volumen total del erlenmeyer, a 30 °C durante 48 horas (Figura 2).



Figura 2: Cultivo aeróbico en oscuridad de *Rhodospirillum rubrum*.

El crecimiento en medio líquido se efectuó a partir de punciones de un cultivo en medio semisólido crecido en semianaerobiosis y con luz continua provista por lamparitas incandescentes (1100 Joule/m²), los cuales se transfieren luego a erlenmeyers de 200 ml. De esta forma se obtiene una densidad suficiente de inóculo para repicar a erlenmeyers de 1 litro utilizando un 5 % de inóculo.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 13500 g durante 10 min. y se almacenan a -70 °C hasta el momento de su uso.

Esquema de purificación

Las bacterias se resuspendieron en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4.

La suspensión se sonicó durante 15 min. a intervalos de 5 min. en frío. La fracción obtenida se denominó Homogenato (H). Por centrifugación del H a 21000 g durante 30 min. se separaron la fracciones Sobrenadante (S) y Pellet (P).

Se llevó el sobrenadante S a 40 % de saturación con SO₄(NH₄)₂. Luego de 20 min. de agitación, se centrifugó 20 min. a 13500 g descartándose el precipitado. Se trabajó siempre en frío.

El nuevo sobrenadante se llevó a 45 % de saturación con SO₄(NH₄)₂, dejándose agitar durante 20 min. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores descartándose el precipitado. El nuevo sobrenadante se llevó a 65 % de saturación con SO₄(NH₄)₂ dejándose agitar durante 20 min. en baño de hielo. Se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, el precipitado se resuspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se dializó contra agua overnight en frío.

Durante toda la purificación se mantuvo el pH en 7 con NH₃.

Considerando las unidades enzimáticas totales de la etapa inicial como el 100% se puede calcular el rendimiento de cada etapa refiriendo las unidades totales de cada paso a las iniciales.

Para calcular el grado de purificación debe obtenerse primero el valor de actividad específica alcanzado en cada paso. Si se considera la actividad específica inicial como unidad de purificación, el grado de purificación de cada etapa se calcula haciendo el cociente entre la actividad específica de dicha etapa y la del primer paso.

Bajo estas condiciones la enzima fue purificada 2,62 veces con un rendimiento de 25 % (Tabla 1).

El paso de 40 a 45 % de saturación se realiza para precipitar el ALA-S de la bacteria.

Fracción	Proteínas (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (μmol)	Rendimiento (%)	Purificación
Sonicado	1044	1,03	1075	100	1,00
Sobrenadante	545	1,60	872	81	1,55
Sobrenadante 0-40 %	380	1,30	494	46	1,26
Sobrenadante 40-45 %	431,6	1,08	466	43	1,05
Precipitado 45-65 % sin dializar	128,4	2,7	347	32	2,62
Precipitado 45-65 % dializado	99,6	2,7	269	25	2,62

Tabla 1: Cuadro de purificación de succinil CoA sintetasa.

Actividad de la succinil COA sintetasa

La actividad de la succinil CoA sintetasa se determinó según el método descrito por Kauffman (1955).

El sistema contenía en un volumen final de 2 ml: NH₂OH 2,4 M, H₂O, buffer Tris-HCl 1 M pH 7,4, succinato de potasio 1 M, ATP 0,1 M, CoA 1,3 mM, GSH 0,2 M, MgCl₂ 0,1 M y 200 μl de extracto enzimático. La incubación se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de la mezcla de FeCl₃ 5 %, HCl 3 N y TCA 12 % en cantidades iguales. Se removió el precipitado por centrifugación y se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. La cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de ácido succinilhidroxámico en 30 min. a 37 °C (1 unidad) se calculó según la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol de ácido succinilhidroxámico} / \mu\text{l} \times 30 \text{ min.} = \frac{A^{540}}{0,238 \times \text{vol enz}}$$

A⁵⁴⁰: Absorbancia a 540 nm

vol enz: volumen de solución enzimática incubada

Referencias

- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Hayashi N, Yoda B, Kikuchi G. (1969) Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria. IV. Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 131: 83-91.
- Kaufman S. (1955) Studies on the mechanism of the reaction catalyzed by the phosphorylating enzyme. *J Biol Chem.* 216: 153-64.
- Maehly AC, Chance B. (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal.* 1: 357-424.
- Marver HS, Tschudy DP, Perloth MG, Collins A. (1966) Delta-aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in liver homogenates. *J Biol Chem.* 241: 2803-9.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Capítulo I. Acción del vanadato sobre la expresión del ALA-S1 en un modelo de porfiria aguda inducida con AIA

I.1 Tiempos de ayuno

Como ya se ha discutido en la introducción, la inducción de la porfiria experimental en animales de laboratorio mediante la administración de AIA ocurre sólo cuando el animal está en estado de ayuno. La administración de varios carbohidratos contrarresta el efecto porfirinogénico de estas drogas (Rose et al., 1961; Bonkowsky et al., 1973).

Con el fin de determinar el tiempo de ayuno necesario para obtener tal inducción se midieron los niveles de expresión de ALA-S1 hepática en ratones tratados con AIA, ayunados 24 y 48 horas (Figura I.1).

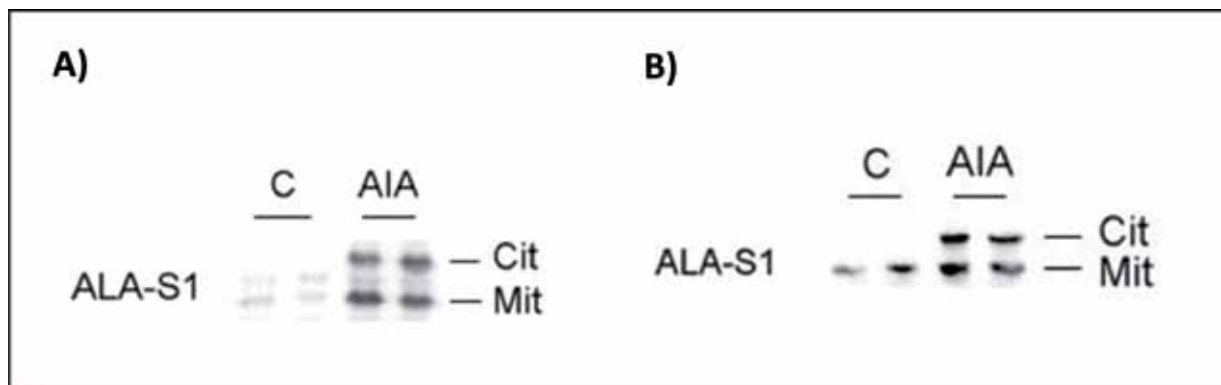


Figura I.1: Niveles de expresión de proteína de ALA-S1 hepática en ratones tratados con AIA , ayunados A) 24 hs y B) 48 hs antes del sacrificio.

C: Control, Cit: citoplasmática PM: 75 kD, Mit: mitocondrial PM: 65 kD. Análisis por Western Blot de la expresión de ALA-S1 hepática. Gel de poliacrilamida 7,5 %

Tanto en los ratones ayunados 24 hs como en los ayunados 48 hs se observó una inducción importante del ALA-S1. En base a este resultado se decidió continuar trabajando con un ayuno de 24 hs para lograr la inducción del ALA-S1 por AIA ya que los animales serán tratados con vanadato, cuyo efecto hipoglucemiante sumado a largas horas de ayuno, puede causar la muerte del animal.

I.2 Efecto del vanadato en un modelo de porfiria aguda

Con el propósito de determinar el efecto del vanadato sobre la expresión del ALA-S1 inducida por AIA, los animales se trataron con vanadato en el agua de bebida durante 6 y 9 días, previos a la intoxicación con el agente porfirinogénico (Figura I.2).

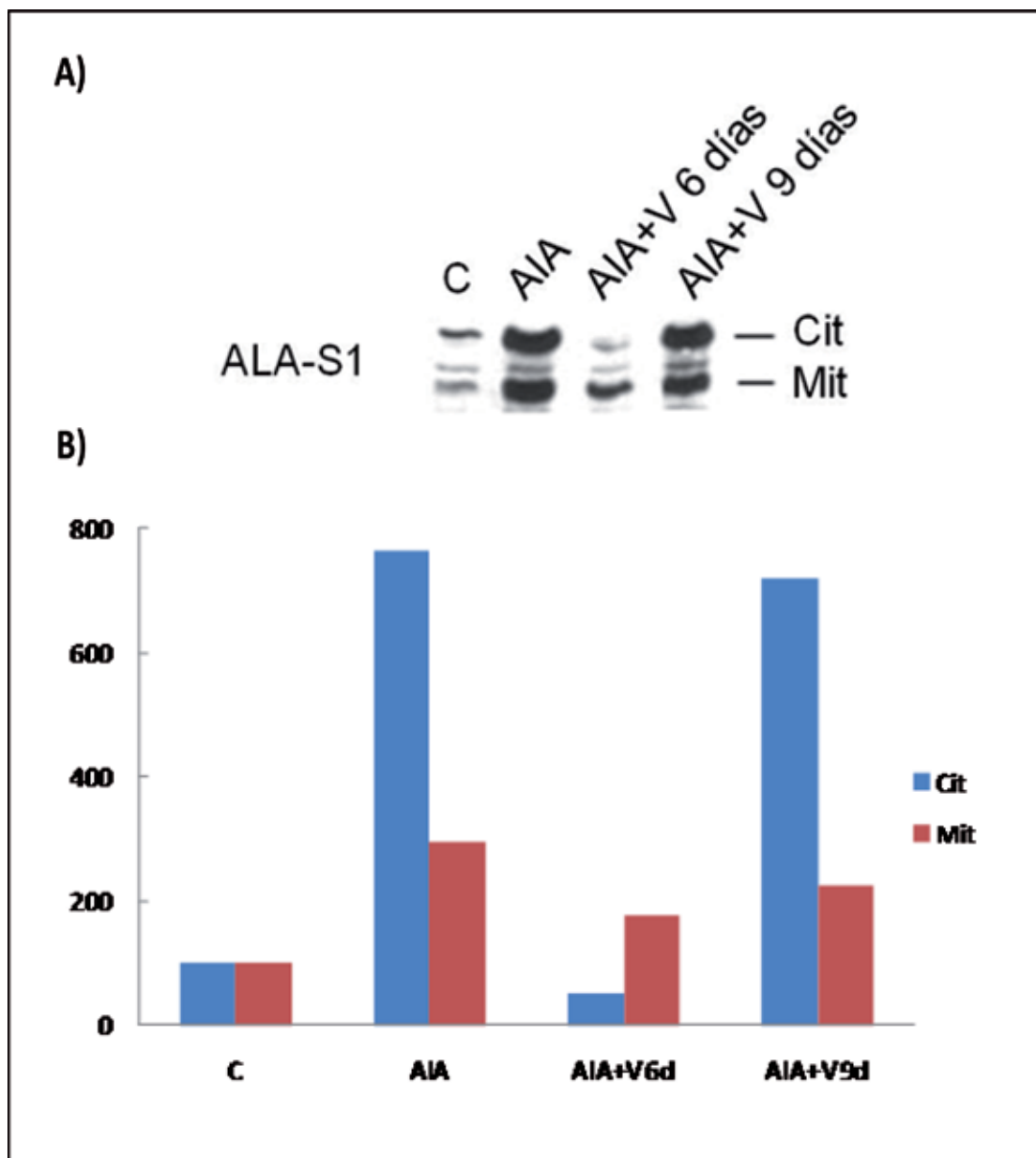


Figura I.2: Niveles de expresión de ALA-S1 hepática en ratones tratados con AIA y vanadato durante 6 y 9 días.

C: control, V: vanadato, Cit: citoplasmática PM 75 kD, Mit: mitocondrial PM: 65 kD. A) Análisis por Western Blot de la expresión de ALA-S1 hepática. Gel de poliacrilamida 7,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de ALA-S1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

Como se observa en la Figura I.2, cuando los animales fueron tratados con vanadato durante 6 días los niveles de expresión del ALA-S1 disminuyeron en forma significativa, sin embargo, el tratamiento con vanadato durante 9 días no previno la inducción del ALA-S1 provocada por el agente porfirinogénico. En base a éste resultado se decidió continuar trabajando con la administración de vanadato durante 6 días.

I.3 Efecto del vanadato en los animales tratados con AIA

I.3.1 ALA-S1

Con el propósito de investigar los efectos del vanadato sobre el ALA-S1 en el modelo de porfiria aguda inducida con AIA, se determinó la actividad y niveles de expresión de la proteína de dicha enzima en el hígado de animales tratados con AIA y AIA+V. (Figura I.3 y I.4).

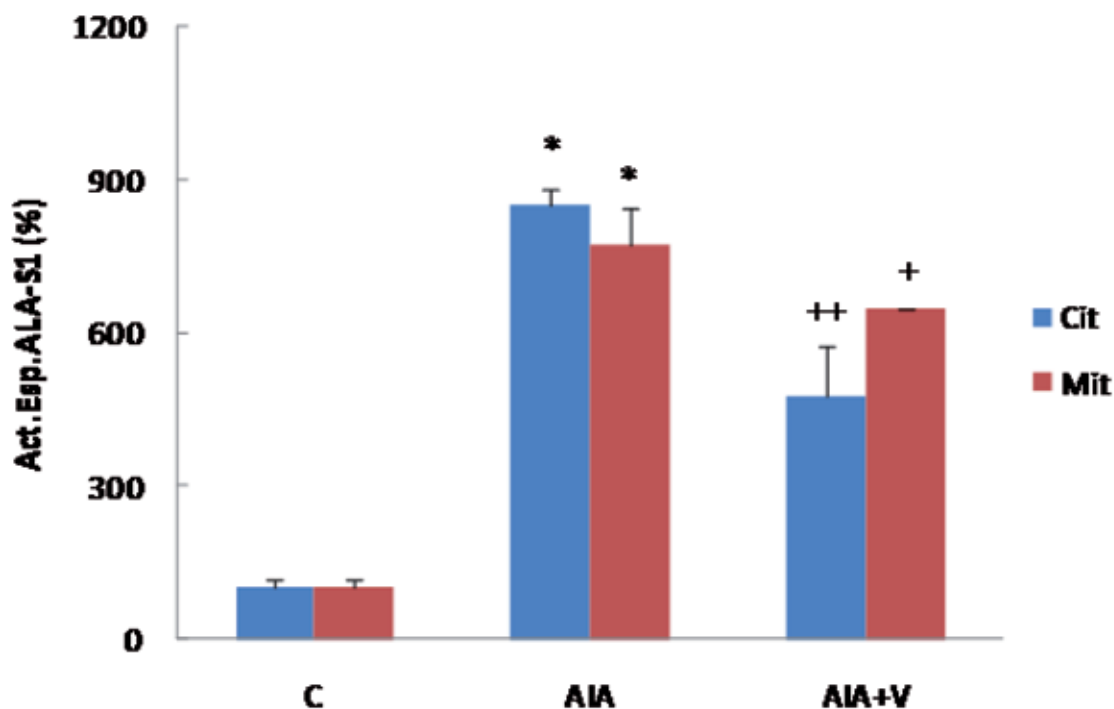


Figura I.3: Actividad del ALA-S1 hepática en animales tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato, Cit: citoplasmática, Mit: mitocondrial. La actividad de ALA-S1 se expresa como % tomando al control como 100 %. (*) indica diferencia significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo control. (+) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo AIA. (++) indica diferencia significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo AIA.

La actividad de ALA-S1 en los animales tratados con AIA se incrementó 8 veces con respecto a los controles. Esta inducción se redujo en forma significativa (44 % en citoplasma y 15 % en mitocondrias) cuando los animales recibieron previamente vanadato en el agua de bebida.

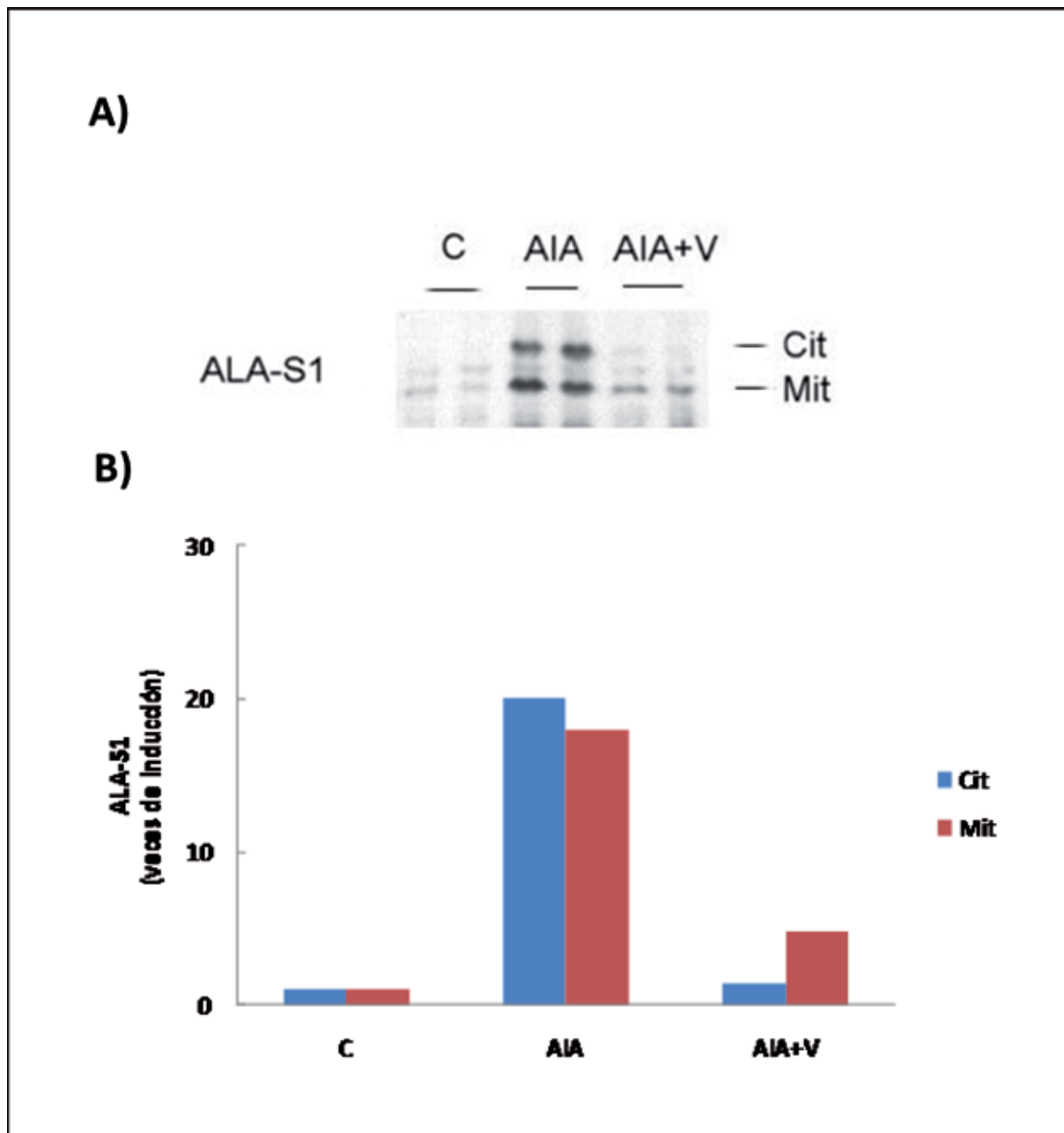


Figura 1.4: Niveles de expresión de proteína de ALA-S1 hepática en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato, Cit: citoplasmática PM: 75 kD, Mit: mitocondrial PM: 65 kD. A) Análisis por Western Blot de la expresión de ALA-S1 hepática. Gel de poliacrilamida 7,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de ALA-S1. Las columnas se expresan como veces de inducción tomando al control como 1X.

En los animales tratados con AIA el contenido de proteína de ALA-S1 citoplasmática aumentó 20 veces y el de ALA-S1 mitocondrial 18 veces respecto al control. El vanadato llevó los niveles de proteína citoplasmática y mitocondrial a 1,4 y 4,8 veces el valor control, respectivamente.

La falta de correlación observada entre los niveles de inducción de la proteína y la actividad de la misma, podría deberse a que una porción significativa de la proteína que se sobreexpresa no adquiere la conformación necesaria para tener actividad enzimática.

1.3.2 IRS-1

En el hígado, la unión de la insulina a su receptor activa al mismo mediante un aumento en la fosforilación de residuos de tirosina de su subunidad beta. A su vez, el receptor activado actúa como tirosina quinasa fosforilando a su sustrato endógeno IRS1 en múltiples residuos de tirosina lo cual resulta en la activación de la vía PI3K. La inhibición de la fosfatasa de tirosina por vanadato o pervanadato activa al

receptor lo que provocaría un aumento en la fosforilación de IRS1 y la activación de la vía PI3K/Akt/FOXO1.

Con el objeto de determinar si la vía PI3K se haya involucrada en el mecanismo por el cual el vanadato previene la inducción del ALA-S1 en los animales tratados con AIA, se decidió determinar los niveles de fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS1 en los diferentes grupos experimentales (Figura I.5).

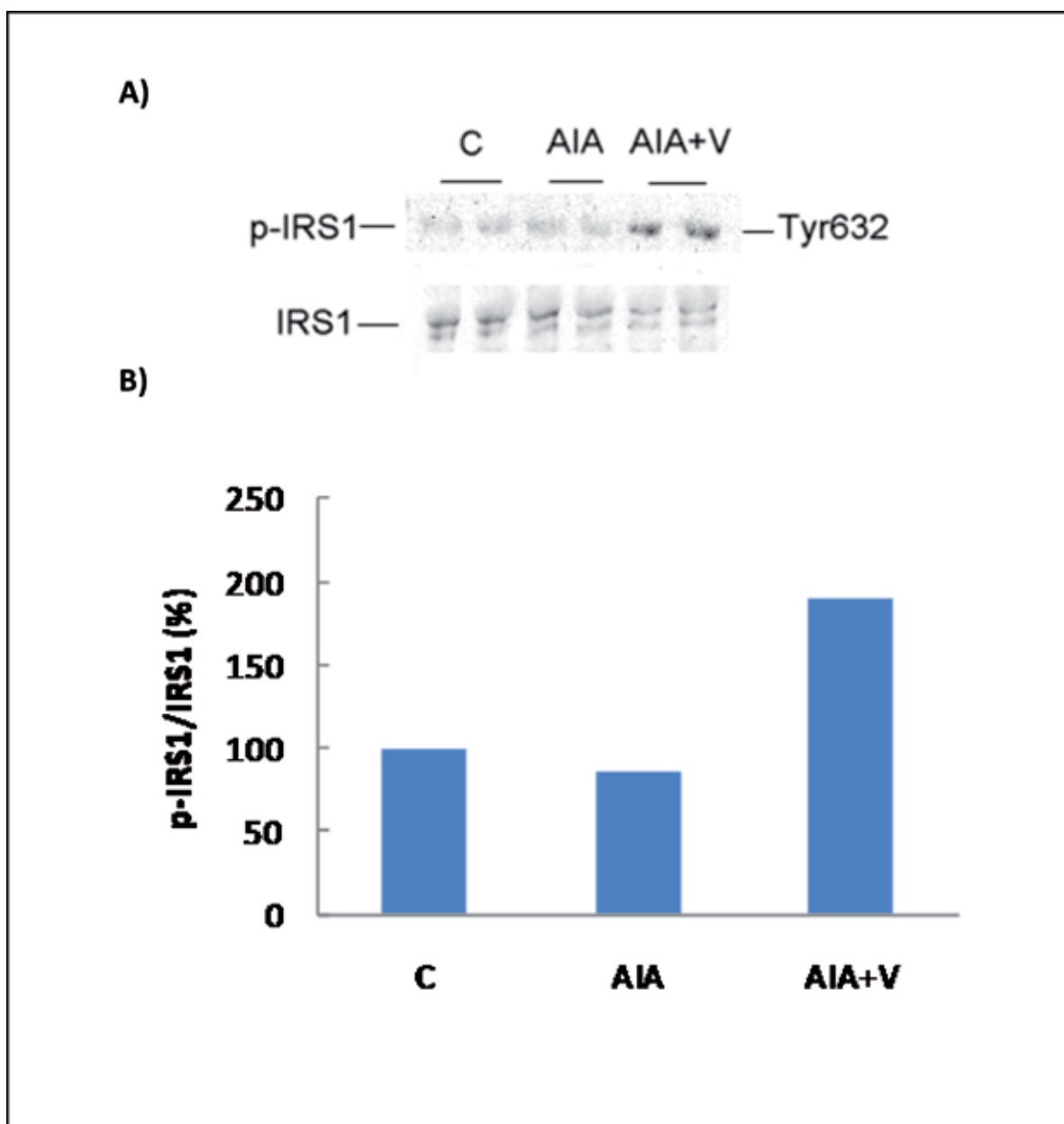


Figura I.5: Efecto del tratamiento con vanadato sobre la fosforilación de IRS1 (Tyr632) en ratones tratados con AIA.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de IRS1 y p-IRS1 (Tyr632) PM: 160 kD. Gel de poliacrilamida 6 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de p-IRS1/IRS1total. Las columnas se expresan en %, como valores relativos de p-IRS1 respecto a IRS1 total tomando al valor del control como el 100 %.

En los animales tratados con AIA los niveles de fosforilación y contenido de IRS1 no variaron respecto al control. Sin embargo cuando los animales fueron tratados con vanadato los niveles de fosforilación en la tirosina 632 de IRS1, se vieron aumentados en un 90 %. Esta fosforilación es esencial para la unión de IRS1 a la subunidad p85 de PI3K, lo cual desencadenaría la cascada de fosforilaciones que podría tener como resultado la inhibición de la expresión del ALA-S1 (Andreozzi et al., 2004).

I.3.3 Akt

Continuando con la cascada de señalización, se midieron los niveles de fosforilación de Akt (Figura I.6).

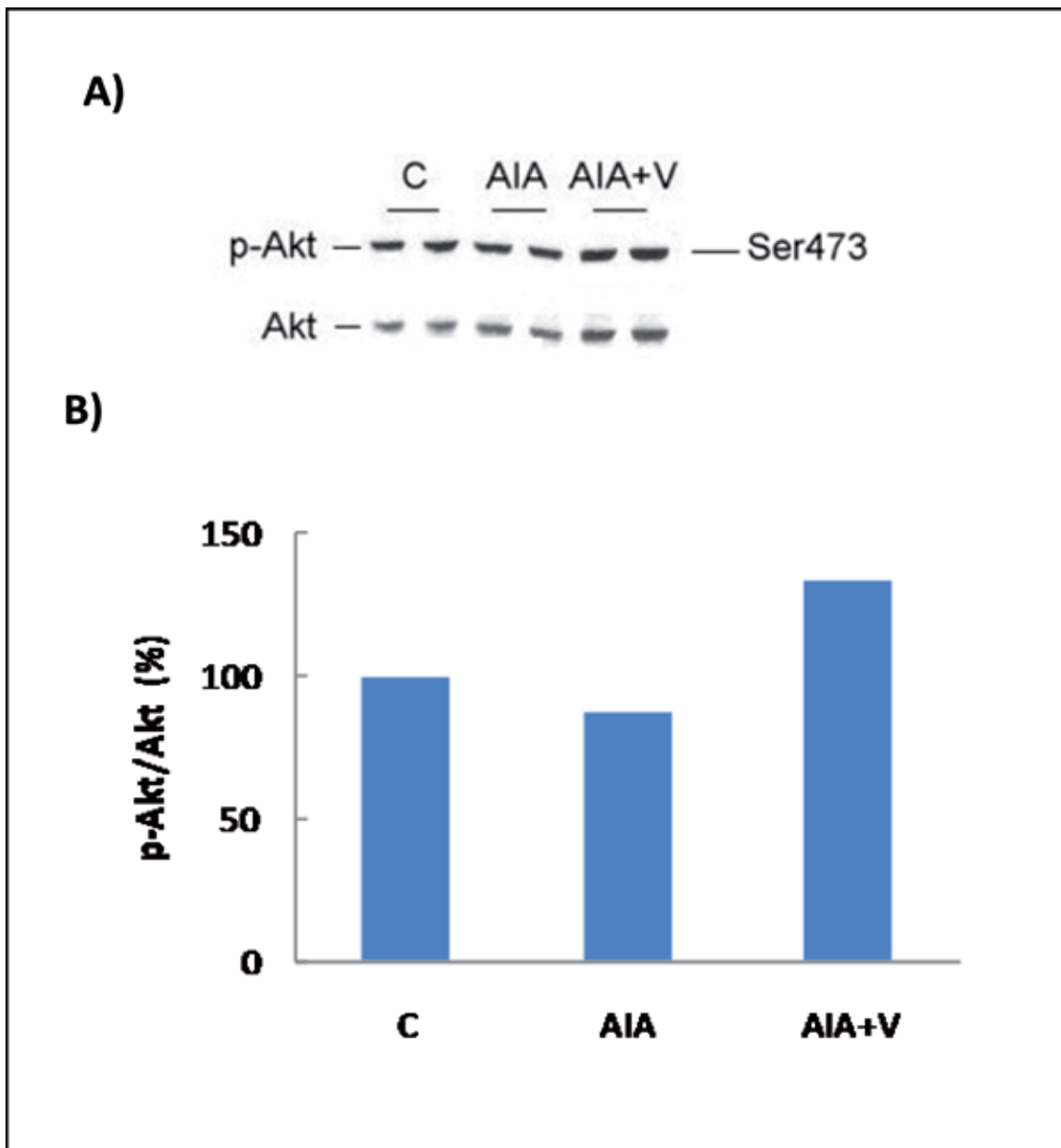


Figura I.6: Efecto del tratamiento con vanadato sobre la fosforilación de Akt en ratones tratados con AIA.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de Akt y p-Akt (Ser473). PM: 60 kD. Gel de poliacrilamida 8,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de p-Akt/Akt total. Las columnas se expresan en %, como valores relativos de p-Akt respecto a Akt total tomando al valor del control como el 100 %.

En el grupo AIA los niveles de fosforilación de Akt (Ser473) no se encontraron modificados con respecto al grupo control. Consistente con el aumento en los niveles de fosforilación de Tyr632 de IRS1, en el grupo de AIA+V los niveles de fosforilación de Akt en la Ser473 se vieron aumentados en un 33 %. Estos resultados son concordantes con estudios previos donde la administración de vanadato en cardiomiocitos, células HepG2 y adipocitos 3T3-L1 incrementa la actividad de Akt (Bhuiyan & Fukunaga, 2009, Vardatsikos et al., 2009). La fosforilación y activación de Akt requiere la presencia de PIP3, el cual se genera tras la activación de PI3K (Le Roith & Zick, 2001; Currie et al., 1999), y es necesaria para producir la fosforilación de FOXO1 (Perrot & Rechler, 2005) que lleva a su exclusión del núcleo.

I.3.4 FOXO1 Y PGC-1 α

El factor de transcripción PGC-1 α coopera con FOXO1 en la activación de genes en el hígado que participan en la gluconeogénesis. La activación de estos genes por PGC-1 α depende de FOXO1, lo cual se ha demostrado en mutantes de dicho factor de transcripción. Además, la regulación de estos genes por insulina depende fuertemente de FOXO1, y está basada en la cooperación de FOXO1 con PGC-1 α (Handschin et al., 2005).

Handschin y colaboradores han demostrado que la represión del gen del ALA-S1 por insulina está controlada por la interacción entre FOXO1-PGC-1 α .

Nosotros proponemos que el vanadato suprime el aumento en los niveles de ALA-S1 en los animales tratados con AIA, a través de la inactivación de FOXO1.

Como ya fue discutido en la introducción, la fosforilación de FOXO1 mediada por Akt en los sitios Thr24, Ser253 y Ser316 reduce la transcripción del gen blanco estimulando la exportación de FOXO1 del núcleo hacia el citoplasma (Perrot & Rechler, 2005) donde es vulnerable a la degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma (Thunell, 2006).

Para determinar si el aumento observado en los niveles de fosforilación de IRS-1 y Akt se traducen en un aumento en la fosforilación de FOXO1 y por lo tanto en su exclusión del núcleo, se midieron los niveles de expresión de FOXO1 en el núcleo (Figura I.7).

Tanto en el grupo AIA como en el grupo AIA+V los niveles de proteína de FOXO1 en el núcleo se encontraron disminuidos (75 % y 74 % respectivamente) con respecto al grupo control. A diferencia de los niveles de ALA-S1, los niveles de FOXO1 en el núcleo no variaron en el grupo AIA+V con respecto al grupo AIA.

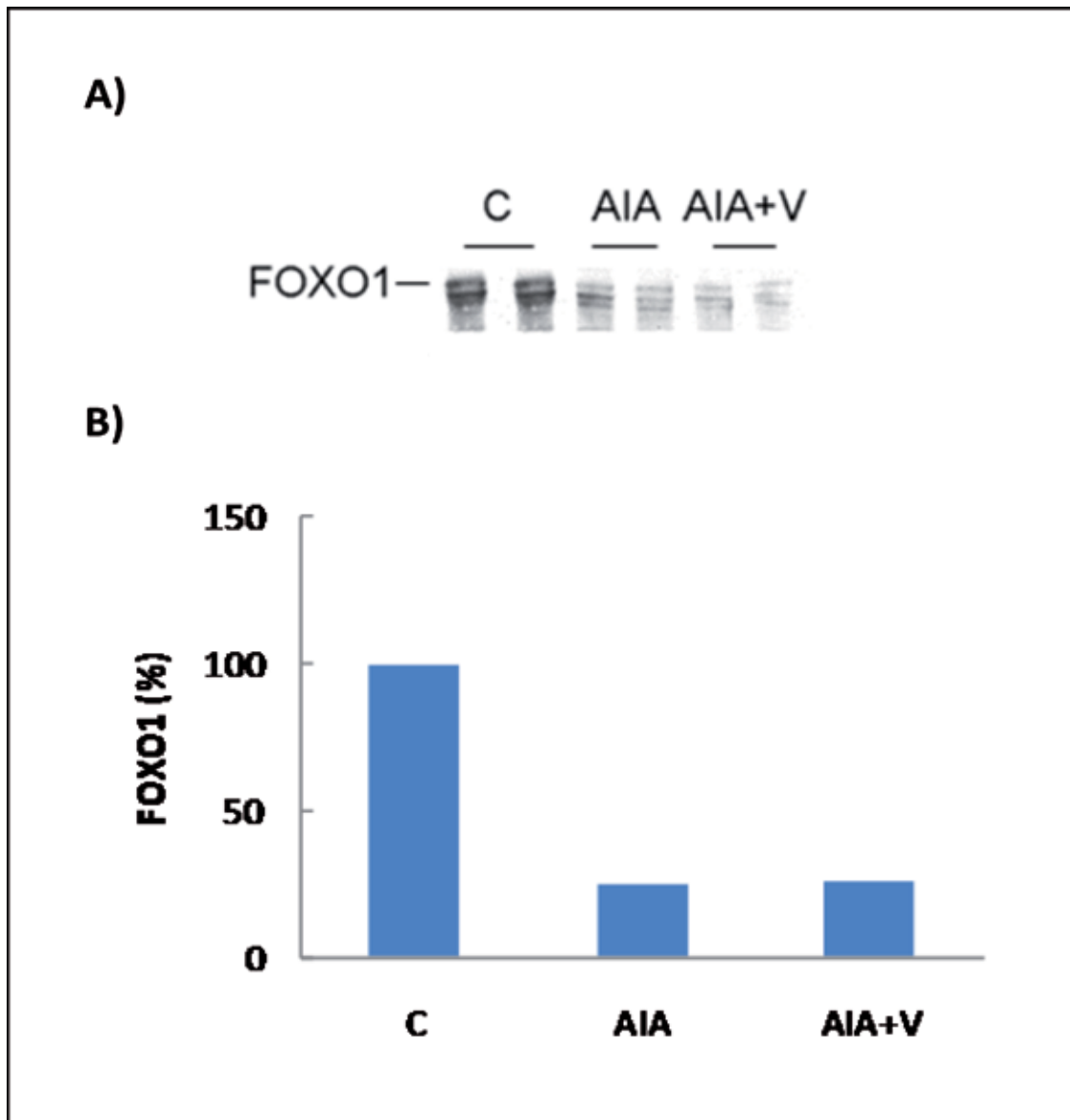


Figura I.7: Niveles de expresión de FOXO1 en el núcleo en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de FOXO1 en el núcleo. PM: 75 kD. Gel de poliacrilamida 7 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de FOXO1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

Con el propósito de determinar el rol del coactivador PGC-1 α en la expresión del ALA-S1 bajo los tratamientos correspondientes se analizaron los niveles de expresión de la proteína PGC-1 α en el núcleo (Figura I.8).

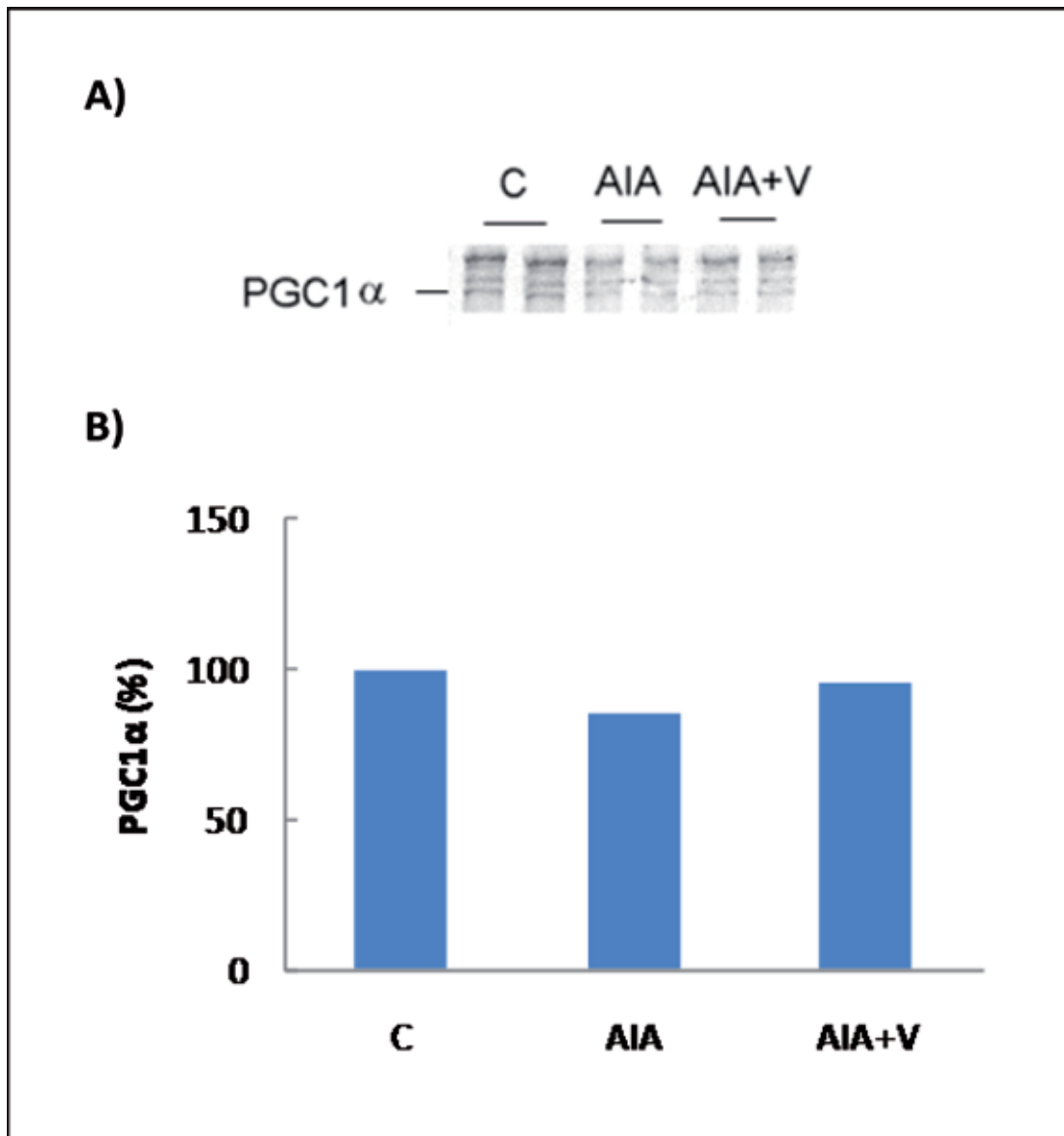


Figura I.8: Niveles de expresión de PGC-1 α en el núcleo en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de PGC-1 α en el núcleo. PM: 90 kD. Gel de poliacrilamida 7 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de PGC-1 α . Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

Ninguno de los tratamientos realizados en los animales modificó los niveles del coactivador PGC-1 α con respecto al control.

Contrariamente a lo esperado, en los animales tratados con AIA los niveles de FOXO1 en el núcleo se encontraron disminuidos en un 75%. En el grupo AIA+V también se observó una caída en los niveles de FOXO1 de magnitud similar a la observada con el AIA. Estos resultados indican que el aumento del ALA-S1 provocado por el agente porfirinogénico, no estaría mediado por un aumento de FOXO1 en el núcleo. Tampoco sería a través de los niveles de FOXO1 en el núcleo que el vanadato impide la inducción de ALA-S1 provocada por el AIA.

I.3.5 CYP3A y CYP2B1

Como ya se mencionó en la introducción, las zonas promotoras de los genes CYP3A y 2B así como el promotor del gen de ALA-S1 contienen sitios en donde los heterodímeros PXR-RXR y CAR-RXR activados por ligando se pueden unir, incrementando en forma coordinada la transcripción de dichos genes. Esta inducción simultánea de CYP y ALA-S1 ha sido demostrada para el caso del PB (Handschin et al., 2005, Podvinek et al., 2004). Tomando en cuenta estos antecedentes, y habiendo descartado la participación de FOXO1 en la inducción de ALA-S1 observada en nuestro modelo, se decidió investigar el posible rol de los NRs en dicha inducción. Para ello, se midieron los niveles de expresión de CYP3A y CYP2B1 los cuales podrían darnos una pista acerca del estado de CAR y PXR bajo los tratamientos correspondientes (Figura I.9 y I.10)

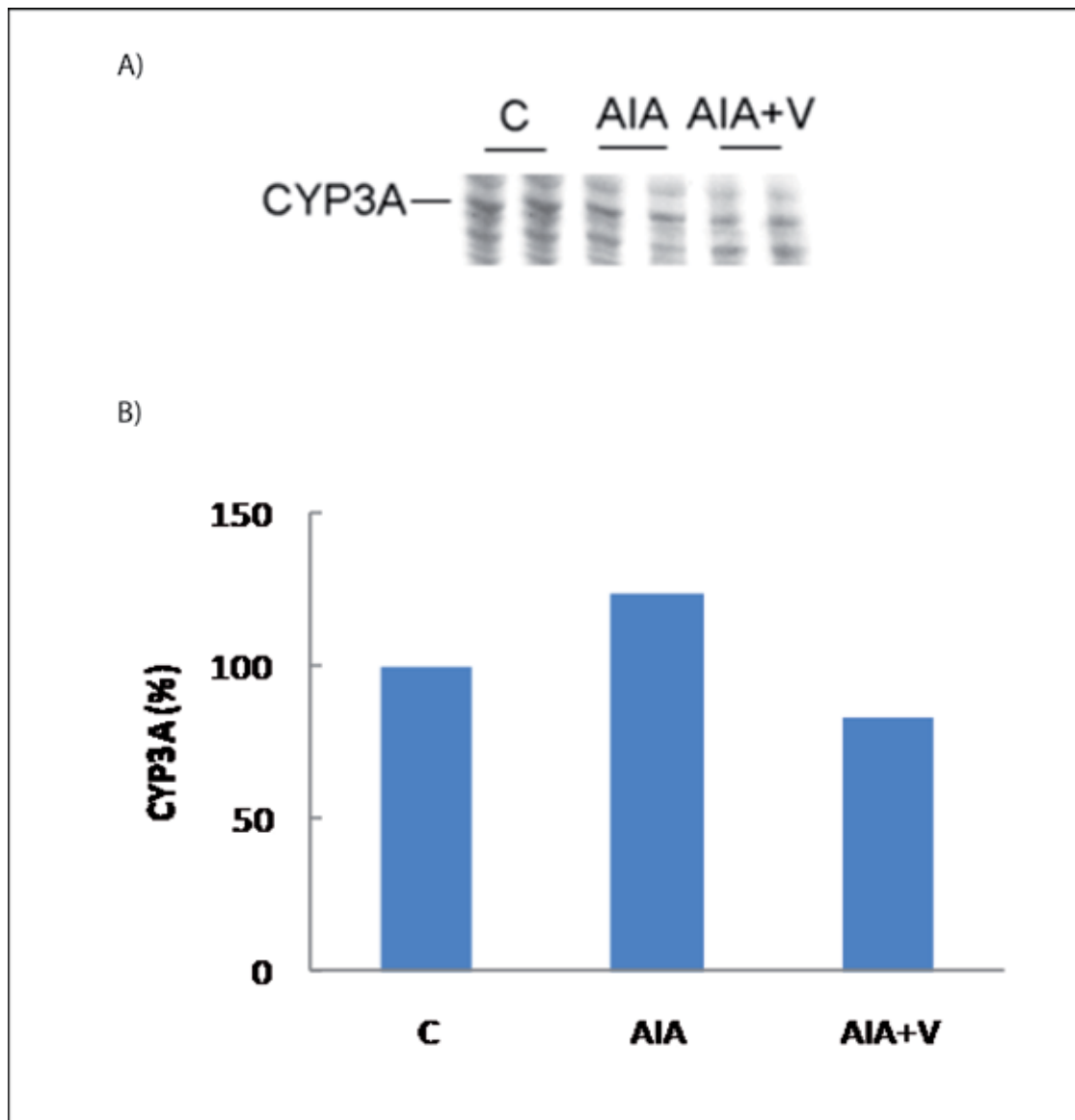


Figura I.9: Niveles de expresión de CYP3A en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de CYP3A. PM: 55 kD. Gel de poliacrilamida 8,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de CYP3A. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

En los animales tratados con AIA se observó un aumento del 24 % en los niveles de expresión de CYP3A mientras que en los animales tratados con AIA y vanadato estos niveles vuelven a valores control.

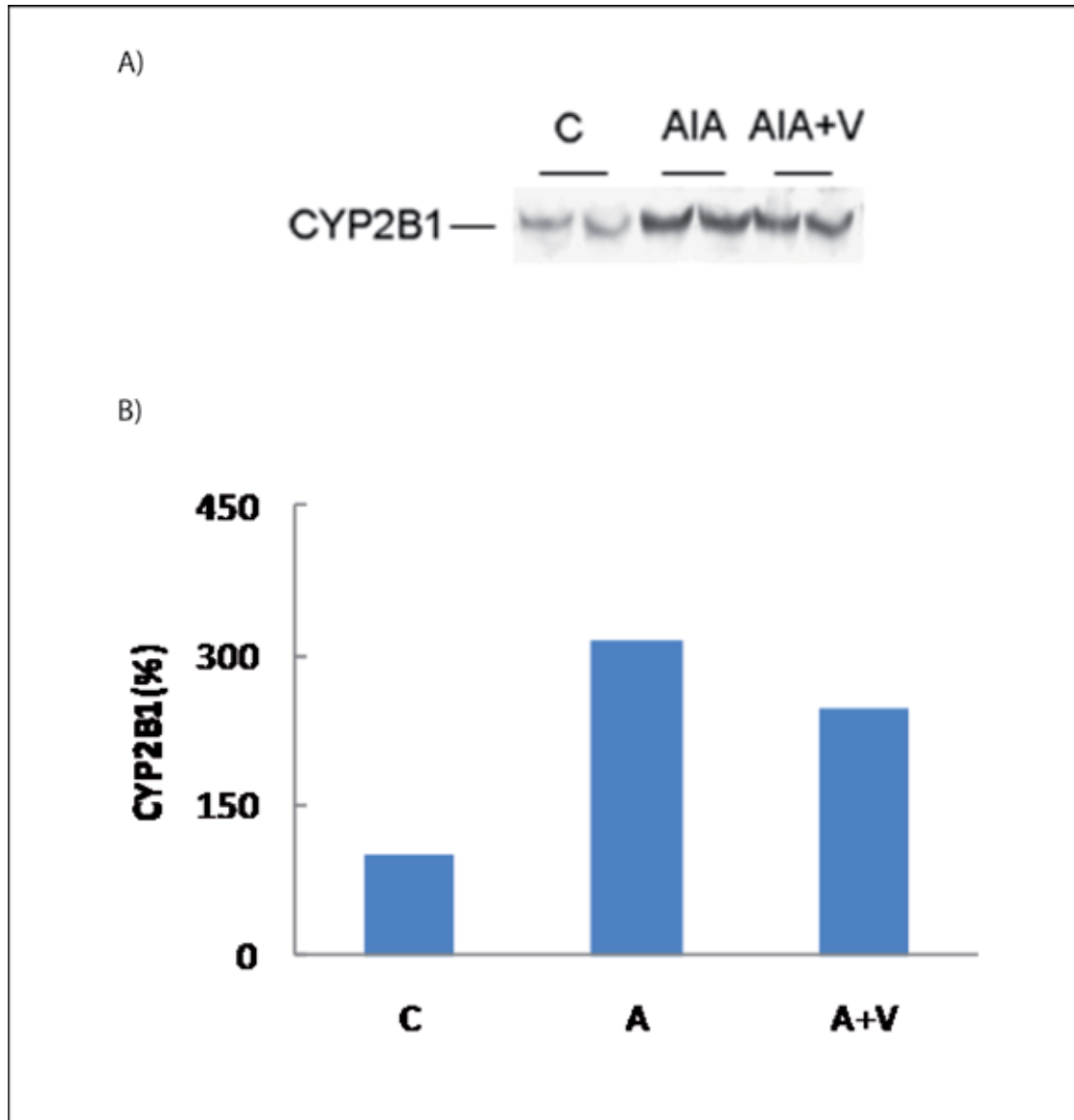


Figura 1.10: Niveles de expresión de CYP2B1 en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de CYP2B1. PM: 50 kD. Gel de poliacrilamida 8,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de CYP2B1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

Los niveles de proteína de CYP2B1 aumentaron en un 200 % cuando se trataron a los animales con AIA. Este aumento se previno en un 70 % en el grupo AIA+V.

Estos resultados muestran una inducción coordinada de ambos citocromos y de ALA-S1 bajo el tratamiento con AIA, así como una disminución simultánea de los mismos bajo el tratamiento con AIA y vanadato. Esta coordinación podría deberse a una regulación, por parte de las drogas indicadas, de los factores CAR y PXR que, según numerosos estudios (Thunell, 2006), estarían involucrados en la activación de los tres genes.

I.3.6 CYP2E1

Como ya se mencionó en la introducción, el gen CYP2E1 no es un gen target de RXR, por lo que no está regulado por los factores de transcripción CAR o PXR.

El análisis de la expresión de CYP2E1 (Figura I.11) se utilizó como control negativo.

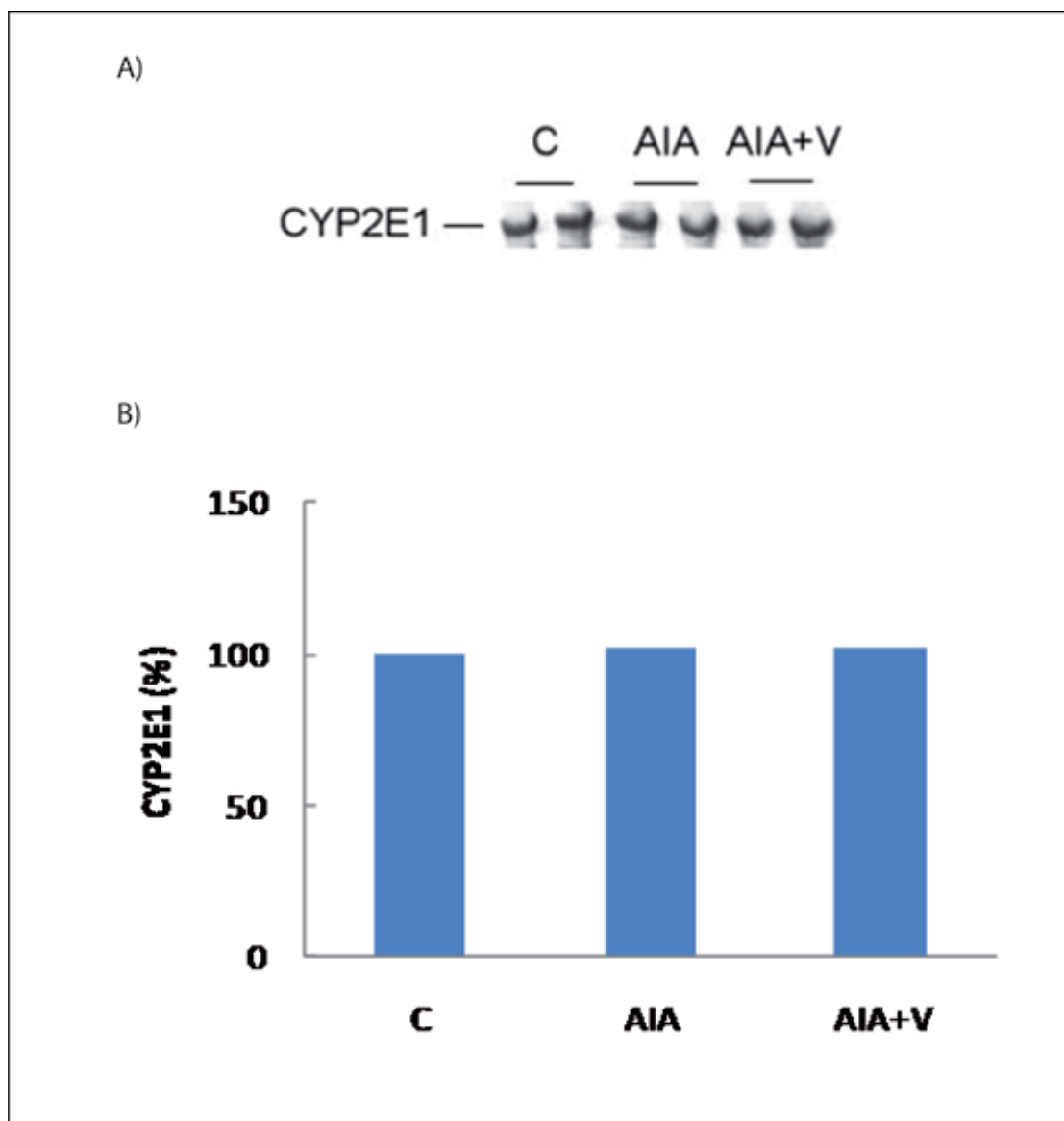


Figura I.11: Niveles de expresión de CYP2E1 en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de CYP2E1. PM: 55 kD. Gel de poliácridamida 8,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de CYP2E1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

Los niveles de expresión de CYP2E1 no se modificaron bajo ninguno de los tratamientos. Gracias a este resultado podemos descartar que los tratamientos indicados resulten en un aumento de los CYPs en general, dándole mayor validez al resultado obtenido del análisis de CYP3A y CYP2B1.

Capítulo II. Acción de la vitamina E sobre la expresión de ALA-S1 en un modelo de porfiria aguda inducida con AIA

II.1 AIA y VITAMINA E

II.1.2 ALA-S1

Como ya se mencionó en la introducción, la vitamina E, conocido agente antioxidante, contrarresta el proceso de inducción del ALA-S1 que caracteriza a las porfirias hepáticas tanto humanas como experimentales por lo que se decidió investigar la actividad y niveles de expresión de la proteína de ALA-S1 en el hígado de animales tratados con AIA y AIA+vitamina E. (Figura II.1 y II.2).

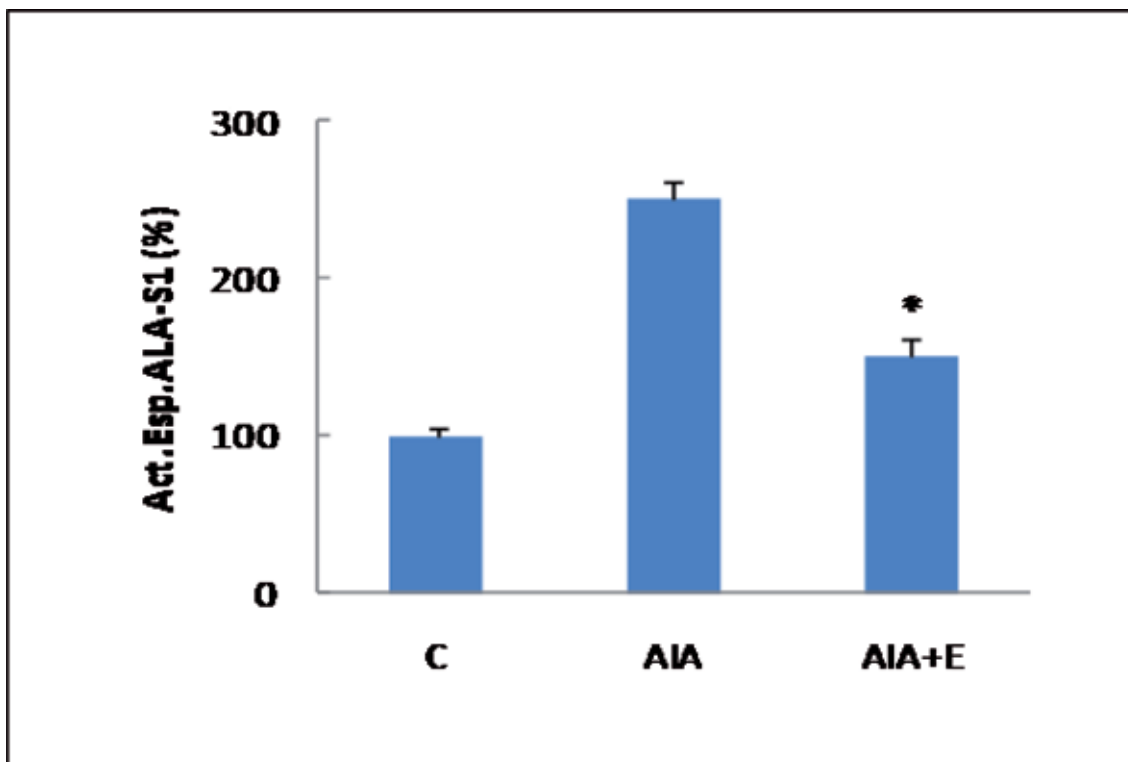


Figura II.1: Actividad del ALA-S1 hepática total en animales tratados con AIA y vitamina E.

C: control, E: vitamina E, La actividad de ALA-S1 se expresa como % tomando al control como 100%. (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo AIA.

Como ya se mencionó, la actividad del ALA-S1 se incrementó de forma significativa en los animales tratados con AIA. La vitamina E resultó un tratamiento exitoso al prevenir el aumento de la actividad del ALA-S1 en un 40 %.

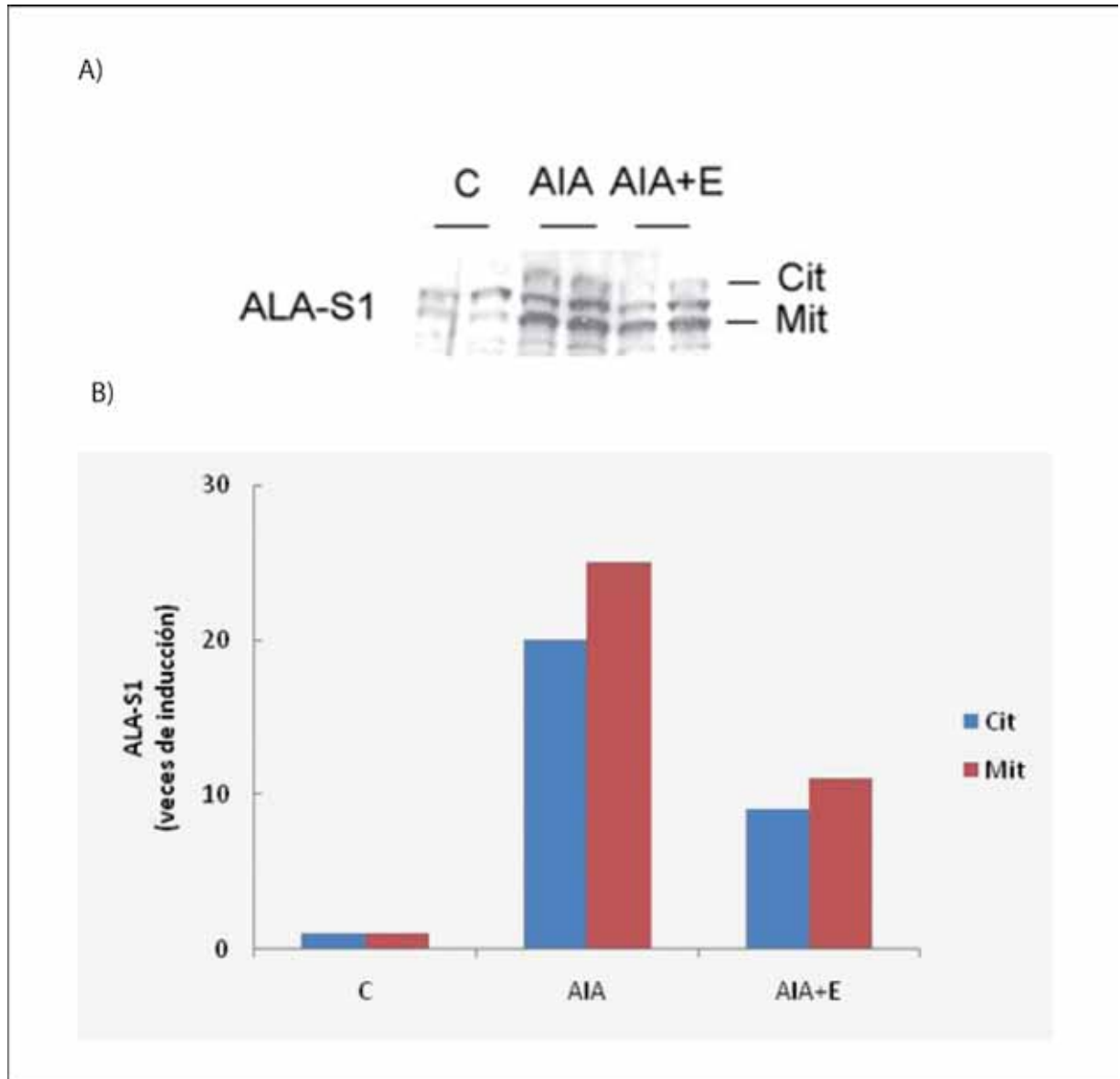


Figura II.2: Niveles de expresión de proteína de ALA-S1 hepática en ratones tratados con AIA y vitamina E.

C: control, E: vitamina E, Cit: citoplasmática PM: 75 kD, Mit: mitocondrial PM: 65 kD. A) Análisis por Western Blot de la expresión de ALA-S1 hepática. Gel de poliacrilamida 7,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de ALA-S1. Las columnas se expresan como veces de inducción tomando al control como 1X.

En los animales tratados con AIA el contenido de proteína de ALA-S1 citoplasmática aumentó veinte veces y el de ALA-S1 mitocondrial 25 veces respecto al control. La vitamina E previno en forma significativa el aumento provocado por AIA, disminuyendo los niveles de proteína citoplasmática 9 veces y mitocondrial 11 veces con respecto al valor control.

Capítulo III. Acción del vanadato y la vitamina E sobre la catalasa en un modelo de porfiria inducida con AIA

III.1 Catalasa

Con el propósito de investigar los efectos del vanadato y la vitamina E sobre el stress oxidativo en el modelo de porfiria aguda inducido con AIA, se midieron la actividad y los niveles de proteína de la catalasa en el hígado en los animales sometidos a los tratamientos indicados (Figura III.1 y III.2).

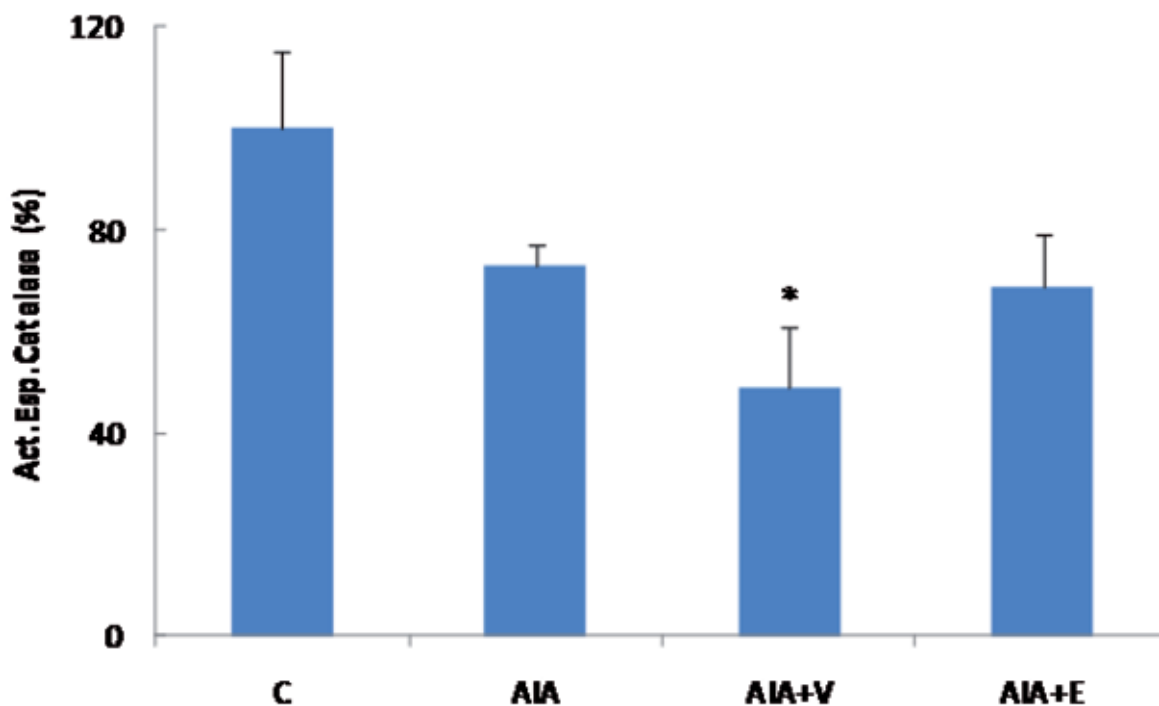


Figura III.1: Actividad de la catalasa en ratones tratados con AIA, vanadato y vitamina E.

C: control, V: vanadato, E: vitamina E. La actividad de la catalasa se expresa como % tomando al control como 100 %.(*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

En los animales tratados con AIA y AIA + vitamina E, la actividad de la catalasa no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (27% y 31% respectivamente). Sin embargo en el grupo AIA+V la caída fue del 51 %.

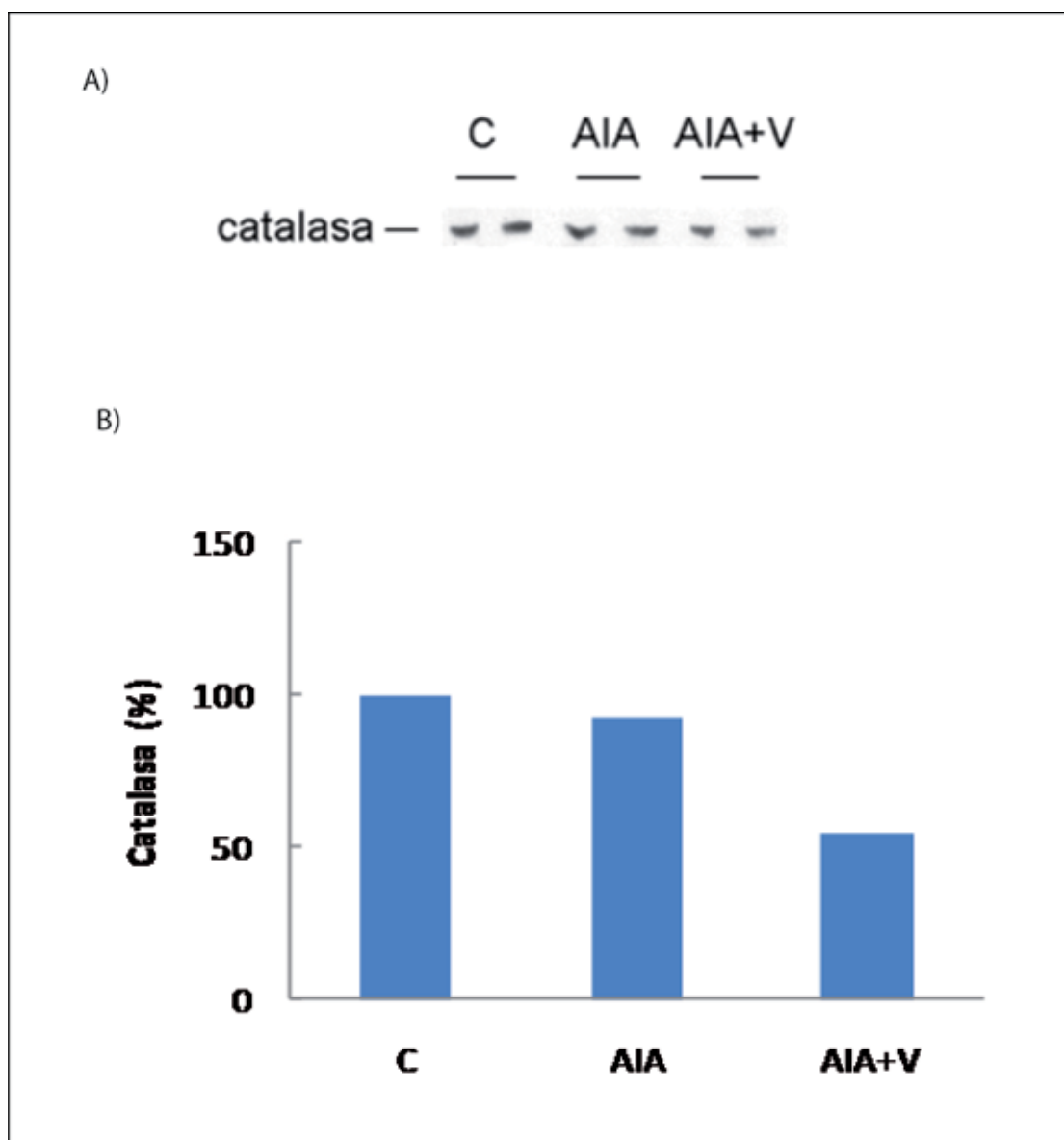


Figura III.2: Niveles de expresión de catalasa en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de catalasa. PM: 64 kD. Gel de poliacrilamida 8,5 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de catalasa. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

El tratamiento con AIA no modificó significativamente los niveles de proteína de catalasa, sin embargo el tratamiento con AIA y vanadato resultó en una caída del 46 %.

Estos resultados muestran que la disminución en la actividad de la catalasa causada por el tratamiento con AIA y vanadato podría deberse a la disminución en los niveles de expresión de la misma.

III.2 Sp1 Y EGR1

Con el propósito de determinar si la caída en los niveles de proteína y de actividad de la catalasa en el hígado de los ratones tratados con AIA y vanadato fue debido a cambios en los niveles de expresión de los factores de transcripción Sp1 y EGR1, se estudiaron dichos factores en extractos nucleares provenientes de los animales tratados (Figura III.3).

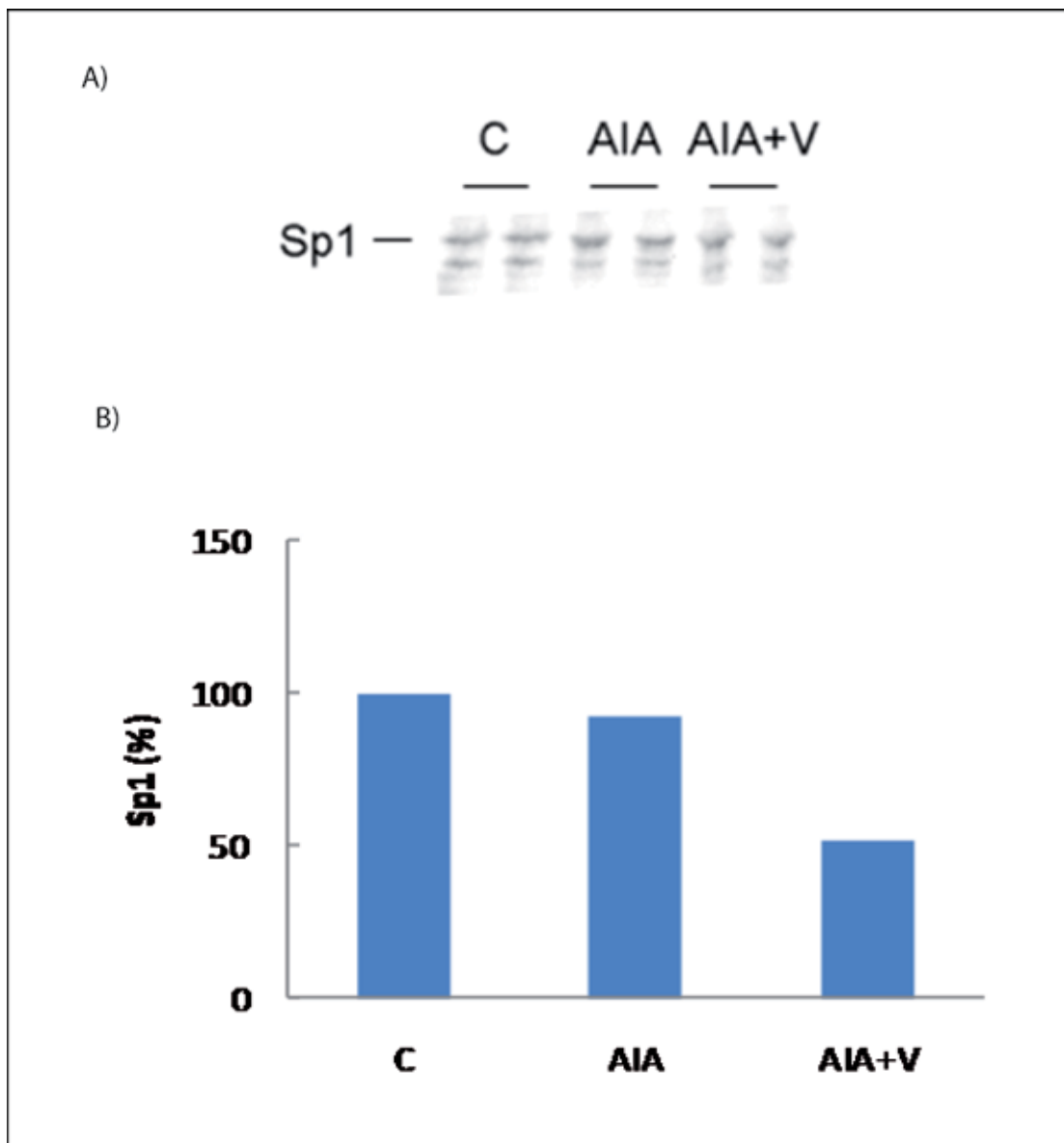


Figura III.3: Niveles de expresión de Sp1 en el núcleo en ratones tratados con AIA y vanadato

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de Sp1 en el núcleo. PM: 106 kD. Gel de poliacrilamida 7 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de Sp1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

El tratamiento con AIA no modificó significativamente los niveles de proteína del factor de transcripción Sp1, sin embargo el tratamiento con AIA y vanadato provocó una caída del 48 %.

Los resultados de la determinación de la expresión de EGR1 en el núcleo se muestran en la Figura III.4.

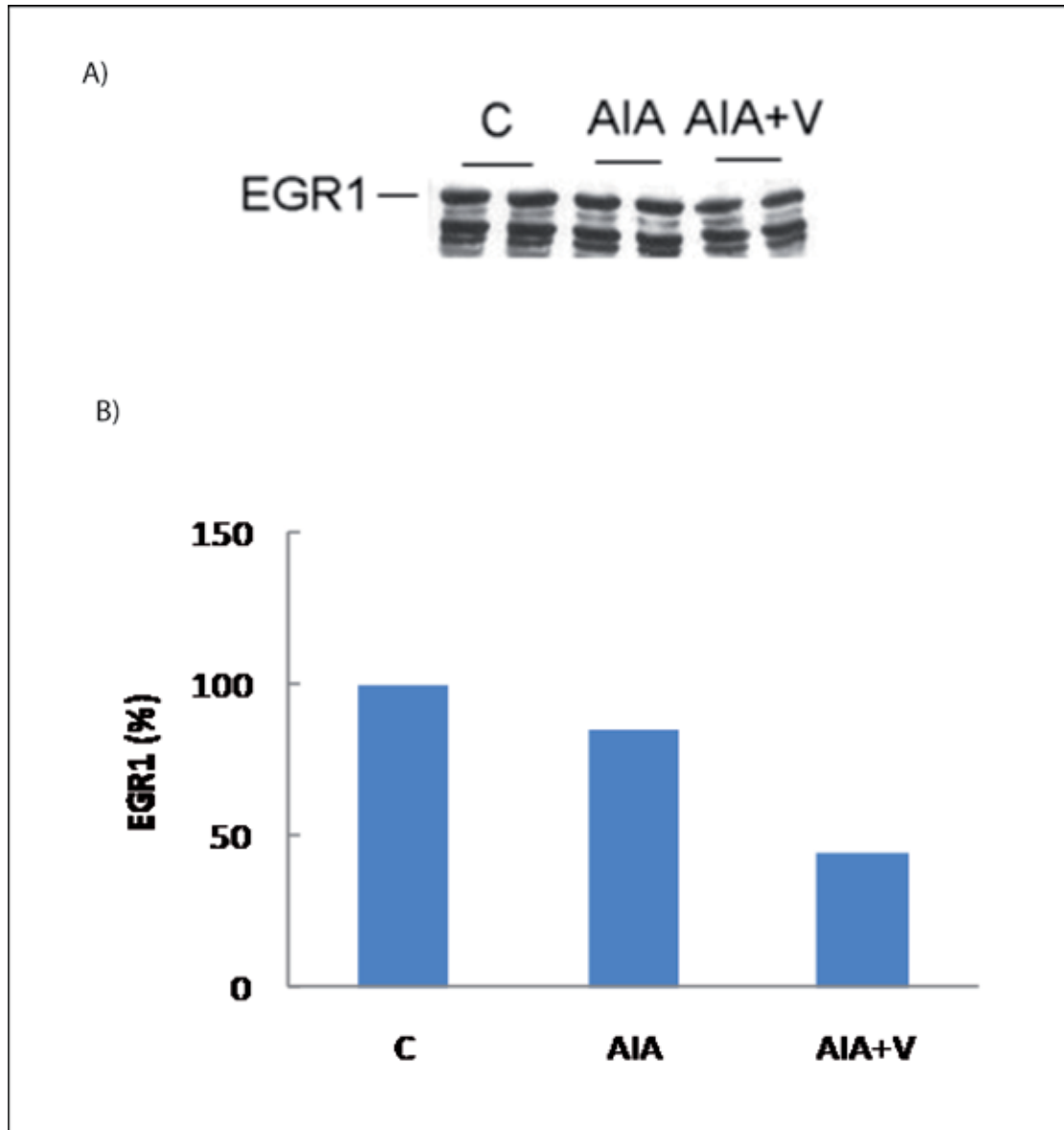


Figura III.4: Niveles de expresión de EGR1 en el núcleo en ratones tratados con AIA y vanadato.

C: control, V: vanadato. A) Análisis por Western Blot de la expresión de EGR1 en el núcleo. PM: 75 kD. Gel de poliacrilamida 7 %. B) Cuantificación de los niveles de proteínas de EGR1. Las columnas se expresan como % tomando al grupo control como 100 %.

El tratamiento con AIA no modificó significativamente los niveles de proteína del factor de transcripción EGR1, sin embargo el tratamiento con AIA y vanadato provocó una caída del 56 %.

El factor de transcripción Sp1 regula la expresión de la catalasa (Nenoi et al., 2001). Los resultados obtenidos indicarían que la disminución de Sp1 sería la causa de la disminución de los niveles de expresión de la hemoproteína y no un aumento de EGR1 que interferiría con la unión de Sp1 a los sitios de reconocimiento dentro del promotor.

Capítulo IV. Conclusiones

El vanadato, conocido agente insulino-mimético, previno el aumento en la actividad y en los niveles de proteína de ALA-S1 en los ratones tratados con AIA (Figuras I.3 y I.4). Estos resultados sugieren que la fosforilación/desfosforilación de tirosinas jugaría un rol importante en la regulación de la expresión del ALA-S1 en este modelo.

Los resultados de Western Blot mostraron que la vía PI3K/Akt no participaría en el aumento del ALA-S1 provocado por el AIA.

Los resultados de FOXO1 en los animales tratados con AIA sugieren que otros factores de transcripción estarían involucrados en los cambios de expresión del ALA-S1 provocados por la caída del pool de hemo hepático.

Los resultados de CYP3A y CYP2B1 sugieren que CAR y PXR podrían estar involucrados en la regulación del ALA-S1, tanto en su aumento provocado por el AIA como en su disminución luego del tratamiento con vanadato.

El vanadato indujo la vía PI3K/Akt, sin embargo su efecto sobre el ALA-S1 parece ser independiente de los niveles de FOXO1.

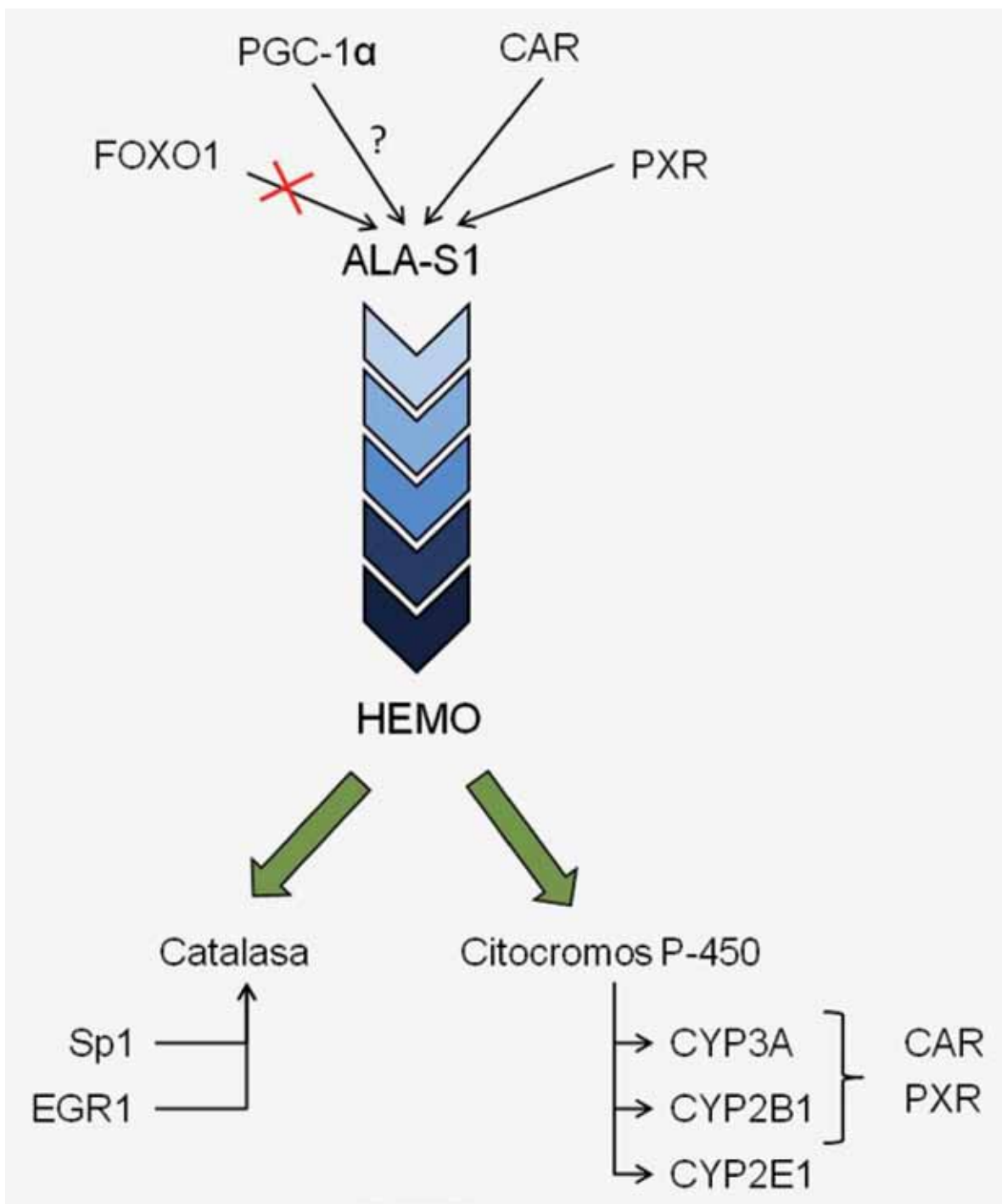
El vanadato provocó una caída en la actividad y en los niveles de proteína de la catalasa. Ésta caída puede llegar a ser el reflejo de la caída de los niveles de expresión del factor de transcripción Sp1.

La vitamina E previno, aunque en menor dimensión que el vanadato, el aumento en la actividad y en los niveles de proteína de ALA-S1 en los ratones tratados con AIA (Figuras II.1 y II.2). Por otro lado, la vitamina E no afectó la actividad de la catalasa (Figuras III.1 y III.5). Por lo tanto sería interesante evaluar el efecto de un tratamiento conjunto del vanadato y la vitamina E. Podemos suponer que al remplazar parte de la dosis de vanadato con la vitamina, el sistema de defensa antioxidante se vería menos afectado.

Desafortunadamente, a causa de la elevada ingesta de carbohidratos utilizada como terapia, los pacientes con porfirias hepáticas son propensos al aumento de peso. Perder el exceso de peso resulta muy difícil para algunos de estos pacientes a causa de los ataques agudos inducidos por ayuno (Handschin et al., 2005). La utilización de tratamientos más específicos resultaría de gran utilidad en estos casos. Los resultados obtenidos en éste trabajo nos permiten proponer la futura investigación del vanadato y la vitamina E como posibles terapias para el tratamiento de estos pacientes.

La toxicidad del vanadato resulta un importante inconveniente para su uso en pacientes, sin embargo, ésta se encuentra asociada con los tratamientos a largo plazo como insulino-mimético por lo que sería factible su uso en períodos cortos, como por ejemplo durante los ataques agudos, además, la reducción de la dosis y la complementación con vitamina E también se presentan como opciones a tener en cuenta para la disminución de la toxicidad.

Finalmente consideramos que un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de acción del vanadato y la vitamina E es indispensable para su puesta a punto como terapias para tratar ésta enfermedad.



Referencias

- Andreozi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. (2004) Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 94: 1211-1218.
- Bhuiyan MS, Fukunaga K. (2009) Cardioprotection by vanadium compounds targeting Akt-mediated signaling. *J Pharmacol Sci.* 110: 1-13.
- Bonkowsky HL, Collins A, Doherty JM, Tschudy DP. (1973) The glucose effect in rat liver: studies of delta-aminolevulinic acid synthase and tyrosine aminotransferase. *Biochim Biophys Acta.* 320: 561-575.
- Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J. (1999) Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J.* 337: 575-583.
- Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell.* 122: 505-515.
- Le Roith D, Zick Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care.* 24: 588-597.
- Neno M, Ichimura S, Mita K, Yukawa O, Cartwright IL. (2001) Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res.* 61: 5885-5894.
- Perrot V, Rechler M. (2005) The coactivator p300 directly acetylates the forkhead transcription factor Foxo1 and stimulates Foxo1-induced transcription. *Mol Endocrinol.* 19: 2283-2298.
- Podvinec M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 9127-9132.
- Rose JA, Hellman ES, Tschudy DP. (1961) Effect of diet on induction of experimental porphyria. *Metabolism.* 10: 514-521.
- Thunell S. (2006) (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria. *Physiol Res.* 55: 43-66.
- Vardatsikos G, Mehdi MZ, Srivastava AK. (2009) Bis(maltolato)-oxovanadium (IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses. *Int J Mol Med.* 24: 303-309.

