



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Químicas**

**Estudios bioquímicos y genéticos en pacientes
diagnosticados con porfiria congénita
eritropoyética**

Nº 418

María Belén Piñeiro Pauwels

Tutora: Hernán Aldana

Departamento de Investigaciones
Octubre 2010

Agradecimientos

A las Dras. María Victoria Rossetti y Esther Gerez por dirigir y acompañar este trabajo, por enseñarme y, por sobre todas las cosas, por confiar en mí.

Al grupo humano del CIPYP, porque cada uno de ellos contribuyó de alguna manera a este trabajo y por esas relajantes mesas redondas del mediodía, que hicieron más amenas las frustraciones.

A Cuqui, por siempre ayudarme y enseñarme, por escuchar hasta mis ideas más delirantes y reflexionar conmigo.

A la Dra. M. del C. Martínez, por esas largas tardes de café y HPLC.

A las chicas, Xoana, Gaby y Dani, por escucharme, ayudarme, darme aliento y por su amistad.

A mis afectos, por estar siempre.

A Fer, mi compañero, mi amor, por apoyarme, permitirme siempre tener mí espacio y darme esos pequeños empujoncitos, que a veces hicieron falta.

A mis hermanos, por ser compañeros y amigos incondicionales.

A mi papá, por todo, que no es poco.

A mi mamá, por seguir cuidándome.

A todos ellos, gracias.

Contenidos

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
I. PORFIRINAS Y BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO.....	8
I.1 PORFIRINAS.....	8
I.1.1 Importancia biológica de las porfirinas.....	8
I.1.2 Estructura y propiedades de las porfirinas y sus precursores.....	8
I.2 EL GRUPO HEMO.....	9
I.2.1 Biosíntesis del hemo.....	9
I.2.2 Regulación de la síntesis de hemo.....	12
I.2.3 Catabolismo del hemo.....	14
II. DESORDENES EN EL METABOLISMO DEL HEMO. PORFIRIAS.....	15
II.1 LAS PORFIRIAS Y SU CLASIFICACIÓN.....	15
II.2 GENERALIDADES DE LAS PORFIRIAS.....	16
II.3 PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.....	18
II.4 PORFIRIA CONGÉNITA ERITROPOYÉTICA.....	18
II.4.1 Uroporfirinógeno III sintetasa.....	19
II.4.2 Mutaciones en el gen de la Uroporfirinógeno III sintetasa.....	19
III. REFERENCIAS.....	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
I. PRESENTACIÓN DE CASOS CLÍNICOS.....	23
I.1 PACIENTE LTO.....	23
I.2 PACIENTE GST.....	23
II. ESTUDIOS GENÉTICO.....	25
II.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	25
II.2 DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA.....	25
II.3 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	26
II.4 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	26
II.5 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	26
III. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.....	26
III.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA.....	26
III.1.1 Preparación de la PBG-deaminasa.....	27
III.1.2 Medición de la actividad de la enzima URO III-sintetasa.....	27
III.1.3 Identificación de los isómeros URO I y URO III por RP-HPLC.....	27
III.1.4 Cuantificación de URO I en el blanco de PBG.....	27
III.1.5 Cuantificación de proteínas en glóbulos rojos utilizando el método de Lowry.....	27
III.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE LOS ISÓMEROS URO I Y URO III EN ORINA POR RP-HPLC.....	28
III.3 INHIBICIÓN DE LA ENZIMA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE HIERRO.....	28
III.3.1 Inhibición de la enzima URO III-sintetasa por hierro.....	28
IV. REFERENCIAS.....	29
RESULTADOS	29
I. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA.....	29
I.1 PROMOTOR ERITROIDE.....	29
I.2 EXONES.....	30
II. PACIENTE LTO Y FAMILIA.....	34
I.1 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE LOS ISÓMEROS URO I Y URO III EN ORINA POR HPLC.....	34

II.2 ACTIVIDAD DE UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA	36
II.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO.....	40
III. Paciente GST	44
III.1 Determinación del perfil de excreción de los isómeros URO I y URO III EN ORINA POR HPLC.....	44
III.2 Actividad de Uroporfirínogeno III sintetasa.....	45
III.3 Diagnóstico genético	47
III.4 Inhibición de la enzima Uroporfirínogeno III sintetasa por concentraciones crecientes de hierro	47
DISCUSIÓN	53
I. MARCO TEÓRICO.....	53
II. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA	53
III. PACIENTE LTO Y FAMILIA	53
IV. PACIENTE GST	54
V. REFERENCIA	55

ABREVIATURAS

ALA: Ácido δ- aminolevúlico
ALA-D: Ácido δ aminolevúlico deshidrogenasa
ALA-S: δ-aminolevúlico sintetasa
COPROgen I: Coproporfirínogeno I
COPROgen III: Coproporfirínogeno III
CPGasa: Coproporfirinogenasa
CPH: Coproporfiria hereditaria
DMSO: Dimetil sulfóxido
Fe-Quel: Ferroquelatasa
HH: Hemocromatosis hereditaria
HMB: Hidroximetilbilano
HMB-S: Hidroximetilbilano sintetasa
HO: Hemo-oxigenasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
IRE: Elemento de respuesta a hierro (Iron-Responsive Element)
IRP: Proteínas reguladoras del hierro (Iron Regulatory Protein)
NADPH: Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NPA: Nueva porfiria aguda
PAI: Porfiria aguda intermitente
PBG: Porfobilinógeno
PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa
PBG-S: Porfobilinógeno sintetasa
PCE: Porfiria congénita eritropoyética
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCT: Porfiria cutánea tarda
PHE: Porfiria hepatoeritropoyética
PPE: Protoporfiria eritropoyética
PPGox: Protoporfirínogeno oxidasa
PROTO IX: Protoporfirina IX
PROTOgen IX: Protoporfirínogeno IX
PV: Porfiria variegata
RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa
SRE: Sistema retículo endotelial
Taq: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE: Tris/borato/EDTA
TCA: Ácido tricloroacético
URO-D: UROgen decarboxilasa
UROgen I: Uroporfirínogeno I
UROgen III: Uroporfirínogeno III
URO III-S: Uroporfirínogeno III sintetasa

Resumen

Las porfirias son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas, hereditarias o adquiridas, consecuencia de una deficiencia primaria parcial de una de las enzimas del camino del hemo. La Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) es una porfiria cutánea, autosómica recesiva, debida a mutaciones en el gen de la Uroporfirinógeno III-sintetasa (URO III-S) que lleva a una marcada disminución de su actividad y a la acumulación del isómero no fisiológico, URO I. Se presenta con eritrodoncia, anemia hemolítica, eritema, prurito, hiperpigmentación y ampollas, que en casos severos, pueden derivar en mutilaciones. La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es causada por una deficiencia parcial de la enzima Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), cuya consecuencia final es la acumulación de los precursores ALA y PBG. Es una patología autosómica dominante, caracterizada por ataques agudos neuro-abdominales. En las Porfirias Duales (PD), existe una deficiencia simultánea en dos enzimas del camino biosintético del hemo en un individuo, lo cual, se ve reflejado en la coexistencia de la sintomatología clínica y los parámetros bioquímicos vinculados a cada una de las porfirias individualmente. En este trabajo se desarrollaron y optimizaron los protocolos de amplificación del gen URO III-S, para el diagnóstico genético de la PCE. Además, se procedió al estudio genético y enzimático de dos pacientes diagnosticados con PCE. La paciente GST manifestó dolor abdominal, síntomas cutáneos leves, eritrodoncia y esplenomegalia. Este cuadro y los valores bioquímicos sugirieron la coexistencia de PCE y PAI. Tenía, además, elevados valores de ferritina sérica. La presencia de la mutación p.G111R en PBG-D fue concordante con la actividad hallada para esta enzima y confirmó el diagnóstico de PAI. El objetivo fue confirmar el diagnóstico bioquímico de PCE midiendo la actividad de la enzima involucrada e identificando las mutaciones responsables. El análisis del gen de la URO III-S, descartó la existencia de mutaciones en el promotor eritroide, en los exones y regiones adyacentes, y fue consistente con el valor normal de actividad obtenido. Dado que existen trabajos que indican que el hierro inhibe la URO III-S hepática en pacientes con Porfiria Cutánea Tarda (PCT) y que la paciente presentaba valores elevados de ferritina se ensayó, *in vitro*, el efecto de este metal sobre la actividad dicha enzima en glóbulos rojos. Se encontró una relación inversa entre la actividad de la enzima y la concentración de hierro. Este resultado sugirió una posible explicación al desencadenado del cuadro compatible con PCE. Se estudió, además, un paciente (LTO) diagnosticado con PCE en los primeros meses de vida, portador de las mutaciones c.627ins28/p.C73R, en los exones 10 y 4, respectivamente, del gen de la URO III-S. A los 6 años de edad, el niño fue sometido a un trasplante de médula ósea utilizando a su hermana mayor como donante compatible. Inicialmente, se observó una notable mejoría tanto en los valores bioquímicos como en la sintomatología, sin embargo, los estudios realizados 2 años post-trasplante indicaron un aumento del contenido de porfirinas en orina y plasma. Con el objeto de explicar esta recidiva, se realizaron estudios enzimáticos y genéticos en el paciente y sus familiares. El análisis genético del paciente reveló la presencia de ambas mutaciones y una actividad de la URO III-S del 53% con respecto al valor control. La madre y ambos hermanos resultaron portadores de la mutación p.C73R y el padre de la c.627ins28. La medición de la actividad enzimática confirmó la correlación genotipo-fenotipo, obteniéndose valores de actividad cercanos al 50% para los portadores de la p.C73R, asociada a una sintomatología severa en homocigosis, y del 74% para la c.627ins28. Estos resultados pusieron en evidencia la presencia en el paciente de un quimérismo incompleto, que podría asociarse a la proliferación de sus células y las provenientes de la donante.

Introducción

I. PORFIRINAS Y BIOSÍNTESIS DEL GRUPO HEMO

I.1 PORFIRINAS

I.1.1 Importancia biológica de las porfirinas

Las porfirinas poseen un papel central en los sistemas vivos debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Estos compuestos intervienen en procesos de captura y utilización de energía que ocurren en la biosfera (Adler *et al.*, 1975).

En las plantas verdes, la clorofila es el compuesto responsable de la conversión de la energía luminosa del sol en energía química, que es "almacenada" en los enlaces de los carbohidratos. La característica estructural esencial de las clorofilas es un sistema de cuatro anillos de pirrol unidos por puentes que contienen un único átomo de carbono. Este sistema de anillos, conocido como porfina, también aparece en los grupos hemo. Las porfinas presentes en los grupos hemo y las clorofilas presentan varios sustituyentes en los anillos pirrólicos y reciben el nombre general de porfirinas. La porfirina, con los cuatro átomos de nitrógeno de los anillos de pirrol dirigidos hacia el centro del macrociclo, compleja fuertemente iones metálicos. En el grupo hemo (Figura I.1) el ion es hierro (II); en las clorofilas es el ion magnesio (Ege, 1998).

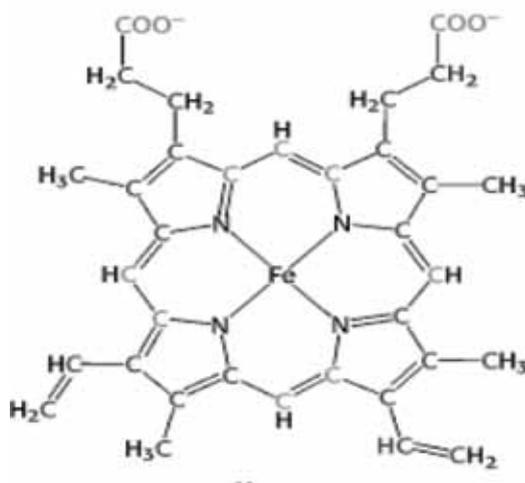


Figura I.1: Estructura química del grupo hemo

El hemo es una molécula esencial para las células aerobias; en combinación con ciertos polipeptidos, juega un rol fundamental en importantes procesos fisiológicos. Es el grupo protético en numerosas hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, citocromos, óxido nítrico sintetasa, etc.) y posee un importante rol en el control de la síntesis de ciertas proteínas (globina, enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo, hemo-oxigenasa 1 y receptores de transferrina) y en la diferenciación celular (Ponka, 1997; Ponka, 1999).

Las hemoproteínas se encuentran involucradas en un amplio espectro de funciones biológicas cruciales, que incluyen la unión a oxígeno (hemoglobina y mioglobina), el metabolismo celular del oxígeno (oxididasas, peroxididasas, catalasas e hidroxilasas) y la transferencia de electrones (citocromos).

I.1.2 Estructura y propiedades de las porfirinas y sus precursores

El ácido δ- aminolevúlico (ALA) y el porfobilinógeno (PBG) se identifican comúnmente como los precursores de las porfirinas y llevan específicamente a la síntesis de los tetrapirroles. ALA y PBG son moléculas relativamente simples altamente solubles en agua, por lo cual se excretan fácilmente por orina.

Las porfirinas son, en cambio, tetrapirroles cíclicos que contienen 4 anillos pirrólicos designados como A, B, C y D, unidos a través de cuatro puentes metileno α, β, γ y δ (Figura I.2). Poseen una estructura planar rígida, con cadenas laterales sustituidas en las posiciones β- de los carbonos de cada núcleo pirrólico, estas posiciones se enumeran de 1 a 8, comenzando por el anillo A. El tipo y número de cadenas laterales determina las propiedades físicas de las porfirinas resultantes.

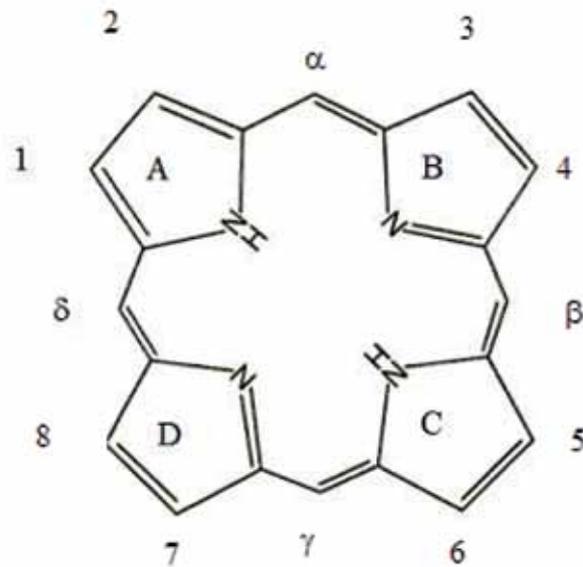


Figura 1.2: Núcleo de la porfirina

Los intermediarios normales en la célula, no son las porfirinas, sino los porfirinógenos, en los cuales los cuatro puentes metilénicos están reducidos. De esta forma, mientras las porfirinas exhiben una estructura altamente conjugada de dobles enlaces alternados y por ello presentan una notable coloración y emiten una intensa fluorescencia roja a la luz UV, los porfirinógenos son incoloros y no fluorescen. Estas propiedades son de suma utilidad para su detección, identificación y cuantificación en muestras biológicas.

1.2. EL GRUPO HEMO

1.2.1 Biosíntesis del hemo

La síntesis de porfirinas ocurre en prácticamente todas las células vivas. En los mamíferos, dicha síntesis, ocurre principalmente en tejido eritropoyético e hígado.

La síntesis del grupo hemo ([Figura 1.3](#)) involucra ocho enzimas, siendo la primera y las tres últimas mitocondriales y las cuatro restantes citoplasmáticas. Probablemente, el camino biosintético y su compartimentación subcelular sean idénticas en todos los mamíferos (Ponka, 1997).

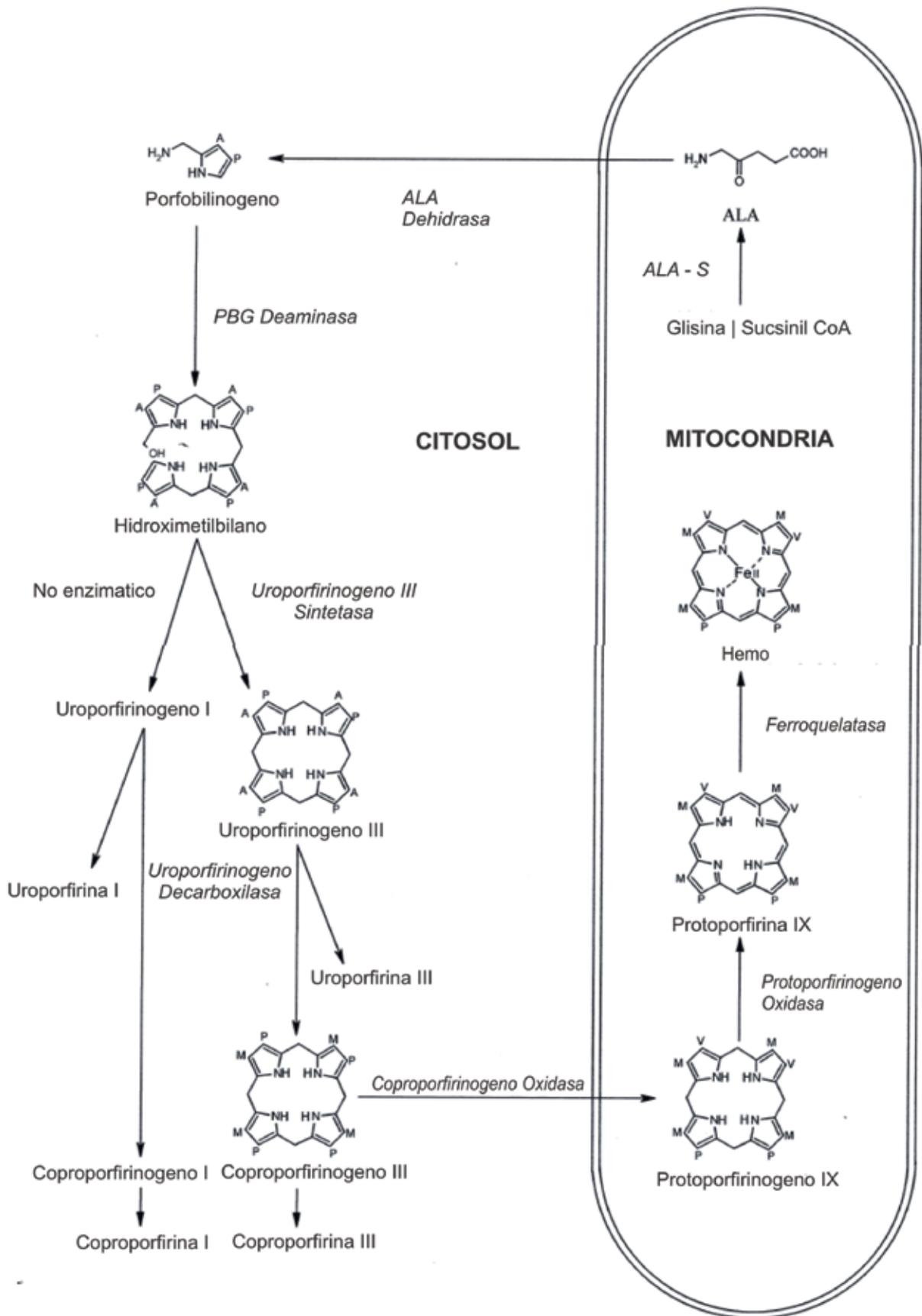


Figura I.3: Esquema del camino biosintético del hemo (A: acetilo, M: metilo, P: propilo, V: vinilo)

El primer paso en la síntesis del hemo implica la condensación, catalizada por la enzima δ-aminolevúlico sintetasa (ALA-S), de glicina y succinil CoA para formar una molécula de ácido δ-aminolevúlico (ALA)

(Figura 1.4). Esta reacción es la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de hemo, debido a la existencia de un control por retroinhibición y represión ejercido por el pool de hemo, que reprime al ALA-S.

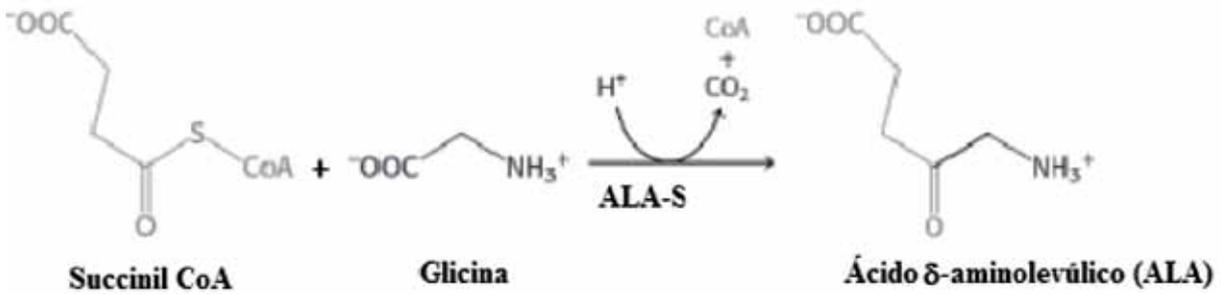


Figura 1.4: Reacción de condensación para la obtención de ALA

El ALA formado es transportado activamente al citoplasma (Bermúdez Moretti *et al.*, 1993). En el citosol, la enzima Ácido δ -aminolevúlico deshidrogenasa (ALA-D), también llamada Porfobilinógeno sintetasa (PBG-S), cataliza la condensación de dos moléculas de ALA en un monopirrol llamado porfobilinógeno (PBG) (Ponka, 1997). Posteriormente, cuatro moléculas de PBG se condensan en forma repetitiva cabeza-cola, con eliminación de amonio, para formar un tetrapirrol lineal inestable denominado hidroximetilbilano (HMB). Esta reacción es catalizada por la enzima Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), que también recibe el nombre de Hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S).

El HMB sirve como sustrato para la Uroporfirinógeno III sintetasa (URO III-S) o isomerasa, que cataliza la conversión del tetrapirrol a uroporfirinógeno III (UROgen III) por inversión del anillo D de HMB, seguida por el cierre del macrociclo en forma asimétrica. También puede ocurrir la ciclación simétrica espontánea de HMB, pero el producto, uroporfirinógeno I (UROgen I), es biológicamente inactivo y sólo se acumula en el organismo en condiciones patológicas (Figura 1.5).

El esqueleto de la porfirina ya se encuentra formado, y las reacciones siguientes alteraran las cadenas laterales y el grado de saturación del anillo de porfirina.

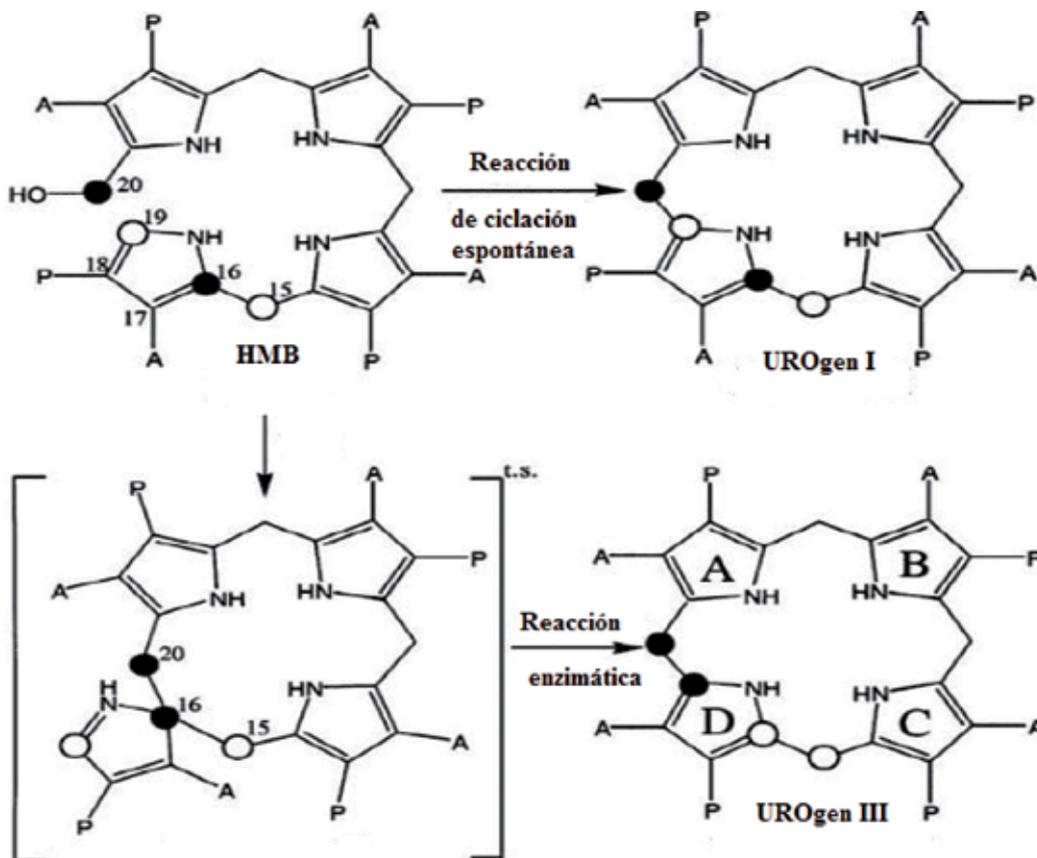


Figura 1.5: Síntesis de uroporfirinógeno III y I (UROgen III y UROgen I). (A: acetato, P: propionato)

El paso siguiente consiste en la decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales de ácido acético ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) del UROgen III por acción de la enzima citosólica UROgen decarboxilasa (URO-D) (Figura I.6). Esta decarboxilación en etapas, se realiza partiendo de un compuesto de ocho carboxilos (UROgen III), pasando por intermediarios de siete (firia o heptaporfirinógeno III), seis (hexaporfirinógeno III) y de cinco carboxilos (pentaporfirinógeno III), hasta llegar a un compuesto de cuatro carboxilos (coproporfirinógeno III o COPROgen III). La URO-D posee la capacidad de actuar sobre el UROgen I produciendo el COPROgen I, sin embargo este compuesto no puede ser utilizado como sustrato por las demás enzimas de la vía metabólica, por lo cual en las condiciones patológica en las que se forma COPROgen I, este se acumula y, finalmente, es excretado.

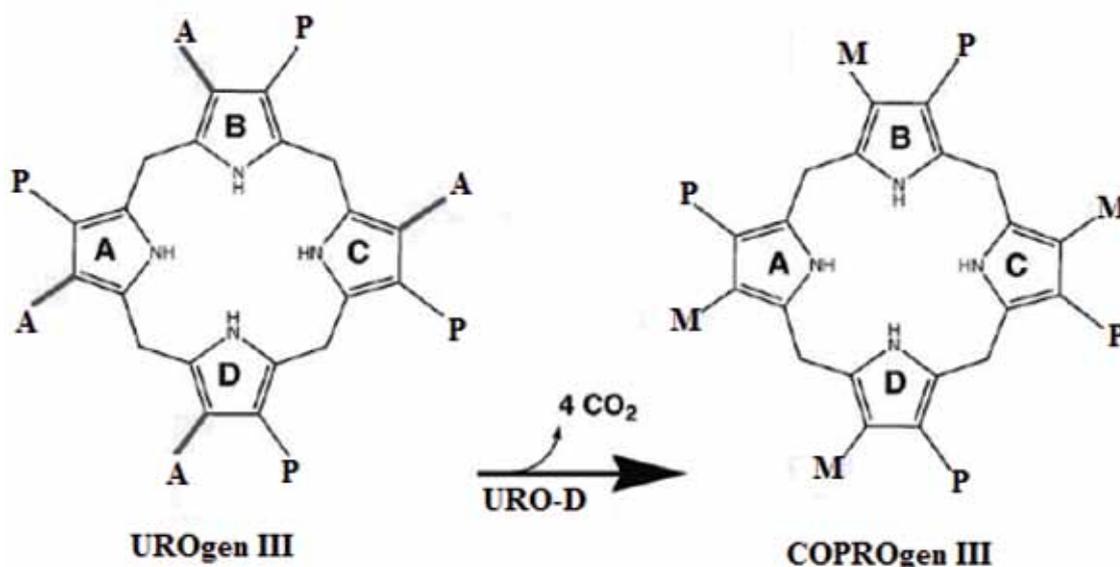


Figura I.6: Síntesis del COPROgen III. (A: acetato, P: propionato, M: metilo)

El COPROgen III es transportado a la mitocondria, donde la enzima mitocondrial Coproporfirinogenasa (CPGasa) es la encargada de catalizar la decarboxilación oxidativa de dos cadenas laterales de ácido propiónico del COPROgen III para producir el protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX).

El PROTOgen IX se oxida a protoporfirina IX (PROTO IX) por la acción de la enzima mitocondrial Protoporfirinógeno oxidasa (PPGox). En la reacción de oxidación la PPGox elimina seis átomos de hidrógenos utilizando oxígeno como aceptor terminal de electrones.

La última etapa de este camino metabólico implica la inserción de un ión ferroso en el anillo porfirínico de la PROTO IX por acción de la enzima mitocondrial Ferroquelatasa (Fe-Quel) para generar un grupo hemo.

I.2.2 Regulación de la síntesis de hemo

Los niveles celulares de hemo están estrictamente regulados, lo que se logra mediante un delicado equilibrio entre la biosíntesis y el catabolismo (Ponka, 1999). Los requerimientos de hemo varían significativamente entre las distintas células y tejidos. La máxima producción de hemo ocurre en los eritrocitos en desarrollo, mientras que el hígado es el segundo órgano en importancia en su síntesis.

Los mecanismos de regulación de la biosíntesis del hemo son tejido específicos. Diferencias en el metabolismo de hierro y en los genes que codifican para las dos isoenzimas de ALA-S son responsables de las diferencias en la regulación y velocidad de síntesis en células eritroides y no eritroides. El gen que codifica para ALA-S1, ubicado en el cromosoma 3, se expresa ubicuamente, aunque fundamentalmente en el hígado, mientras que la expresión del gen de ALA-S2, ubicado en el cromosoma X, es específica para células eritroides (Bishop *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1990; Cotter *et al.*, 1992). Las dos isoenzimas ALA-S muestran una amplia similitud, pero es sólo de 75% en el extremo C-terminal de la proteína madura. La región C-terminal probablemente representa el dominio catalítico de todas las proteínas de ALA-S. Tanto la expresión de ALA-S1 como la de ALA-S2 son reguladas transcripcionalmente por mecanismos completamente diferentes.

En el hígado, el hemo se forma en un pequeño exceso por encima de las necesidades metabólicas. Este pool de hemo libre sirve como precursor y regulador de su síntesis, ejerciendo una regulación por retroalimentación negativa sobre la transcripción, traducción y actividad del ALA-S. La represión de la transcripción del gen de ALA-S1 se da por activación, dependiente de hemo, de un represor de este gen.

A nivel post-transcripcional, el hemo disminuye significativamente la estabilidad del ARNm de ALA-S1 (Drew & Ades, 1989; Hamilton *et al.*, 1991). Además, el hemo bloquea la translocación de los precursores de la proteína ALA-S1 a la mitocondria, donde se genera el sustrato de la enzima (succinil- CoA), lo cual constituye un mecanismo de regulación post-transcripcional (Scholnick *et al.*, 1972; Kikuchi & Hayashi, 1981). La represión post-traducciona es mediada por el hemo, que es capaz de inhibir la enzima al unirse a ella en un sitio distinto al sitio activo.

En células eritroides, el hemo no inhibe ni la síntesis ni la actividad del ALA-S2 (Sassa & Nagai, 1996; Ponka, 1997), pero sí regula el suministro de hierro desde la transferrina e induce la síntesis de la hemoglobina (Ponka & Neuwirt, 1969; Ponka *et al.*, 1974, 1988; Schulman *et al.*, 1974; Iacopetta & Morgan, 1984; Cox *et al.*, 1985; Hradilek & Neuwirt, 1989; Ponka, 1997). La regulación transcripcional del ALA-S2 es mediada por factores eritroides específicos, los cuales interactúan con una secuencia en la región promotora (GATA-1, CACCC box y el sitio de unión del factor nuclear eritroide-2, NF-E2), presente en muchos genes regulados diferencialmente en células eritroideas (Srivastava *et al.*, 1988).

La región 5' no traducible (5'UTR) del ARNm de ALA-S2 contiene la secuencia de respuesta a hierro (IRE) (iron-responsive element), cuya localización indica que la translocación del ARNm de ALA-S2 depende de la disponibilidad de hierro. La proteína IRP (iron regulatory protein) es capaz de reconocer estas secuencias e interactuar con ella, controlando de este modo la traducción del ARNm de ALA-S2 (Klausner *et al.*, 1993; Hentze & Kühn, 1996; Ponka, 1997). Es decir que, a bajos niveles de hierro, IRP puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE bloqueando la traducción de ALA-S2; en cambio, cuando los niveles de hierro aumentan, la conformación de IRP varía, lo cual le impide interactuar con las secuencias IRE de los ARN, lo cual permite que ALA-S2 sea traducido.

El IRE también se encuentra en la región 5' no codificante de los ARNm específicos de la ferritina, proteína encargada del almacenamiento de hierro, y en la región 3' no codificante del receptor de la transferrina (Dierks, 1990; Cox *et al.*, 1991; Dandekar *et al.*, 1991). Por lo tanto, la traducción de estas proteínas también depende de la disponibilidad de hierro. De este modo, cuando los niveles celulares de hierro son bajos, se favorece la traducción del receptor de transferrina y se impide la traducción de ALA-S2 y ferritina, lo cual frena la utilización del metal. Un mecanismo inverso opera ante una sobrecarga de hierro (Figura 1.7).

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

Por otra parte, el hemo inhibe de forma no competitiva a la ferroquelatasa a concentraciones que pueden ser fisiológicamente relevantes (es decir, 10 mol / L), pero no está claro aún si la síntesis general de hemo o el metabolismo celular del hierro son moduladas por este efecto del hemo sobre dicha enzima (Koller *et al.*, 1977; Dailey & Fleming, 1983; Rossi *et al.*, 1990).

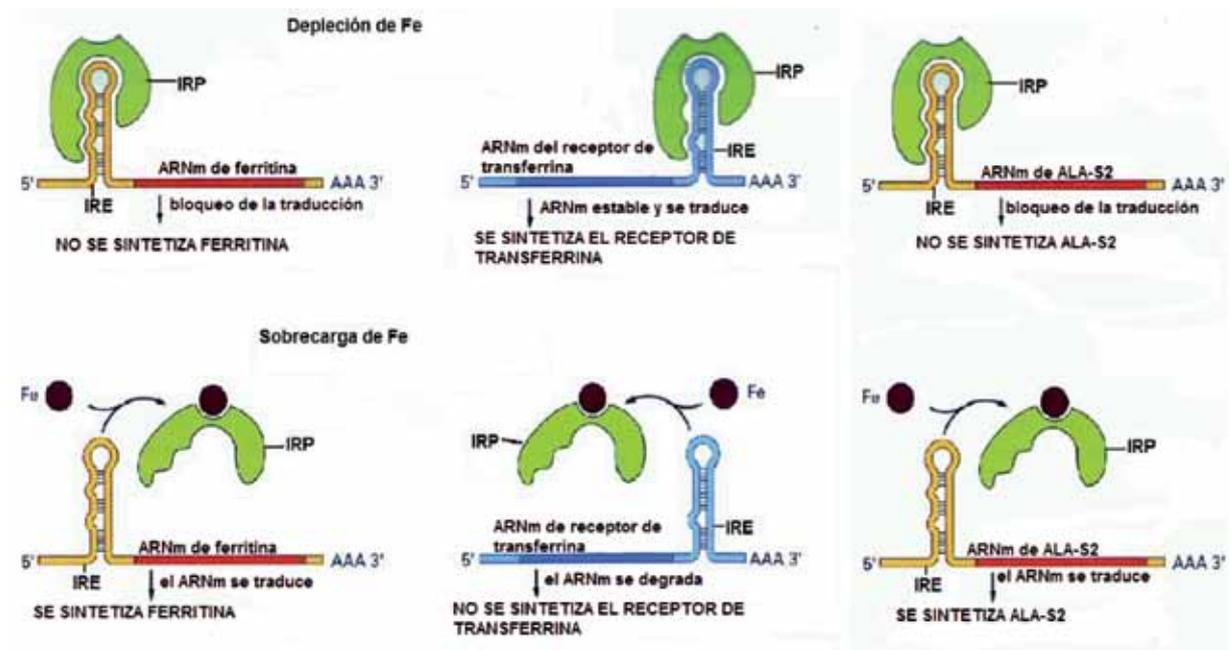


Figura 1.7: Mecanismo de traducción regulada por hierro del receptor de transferrina, ALA-S2 y ferritina en células eritroides

I.2.3 Catabolismo del hemo

Los glóbulos rojos tienen una vida media de 120 días. Las células senescentes son reconocidas por cambios en la membrana y son fagocitadas y eliminadas por las células del sistema retículo endotelial (S.R.E) principalmente en las paredes vasculares de hígado y bazo, y en médula ósea.

La destrucción de los glóbulos rojos senescentes, y la ruptura de la molécula de hemoglobina y de otras hemoproteínas (citocromos, peroxidasas, catalasas y triptófano-pirrolasa) producen moléculas de hemo que se degradan junto con el hemo libre. La parte proteica es hidrolizada por proteasas pancreáticas, mientras que el grupo hemo sufrirá transformaciones secuenciales.

El único mecanismo fisiológico de degradación del hemo es mediado por el complejo multienzimático llamado sistema microsomal Hemo-oxigenasa (HO). En mamíferos, este complejo cataliza la oxidación del hemo a biliverdina, CO e hierro libre (Ponka, 1999), que es normalmente reciclado quedando disponible para la síntesis de hemoglobina.

El complejo microsomal está constituido por las enzimas Hemo-oxigenasa y NADPH- citocromo P450 reductasa, y cataliza la conversión secuencial del complejo hierro-protoporfirina IX a biliverdina IXa (Tadashi *et al.*, 1982) (Figura I.8).

La Hemo-oxigenasa es altamente estereoespecífica, clivando exclusivamente en el puente α -meso a hemo para dar biliverdina IXa. Para esta reacción son consumidas tres moléculas de O₂ y un grupo reductor NADPH. El α -meteno es eliminado como CO y la molécula de hierro es liberada (Tenhunen *et al.*, 1969).

La biliverdina se convierte rápidamente en bilirrubina por la enzima citosólica NADPH-biliverdina reductasa, presente en el hígado, riñón, músculo, cerebro, con consumo de NADPH (Krishnan & Mahin, 1981) (Figura I.8).

Tanto la bilirrubina como la biliverdina son poderosos antioxidante fisiológico, protegiendo a los tejidos del estrés oxidativo, pero la bilirrubina en altas concentraciones es tóxica para las células neuronales (Roy-Chowdhury *et al.*, 2007).

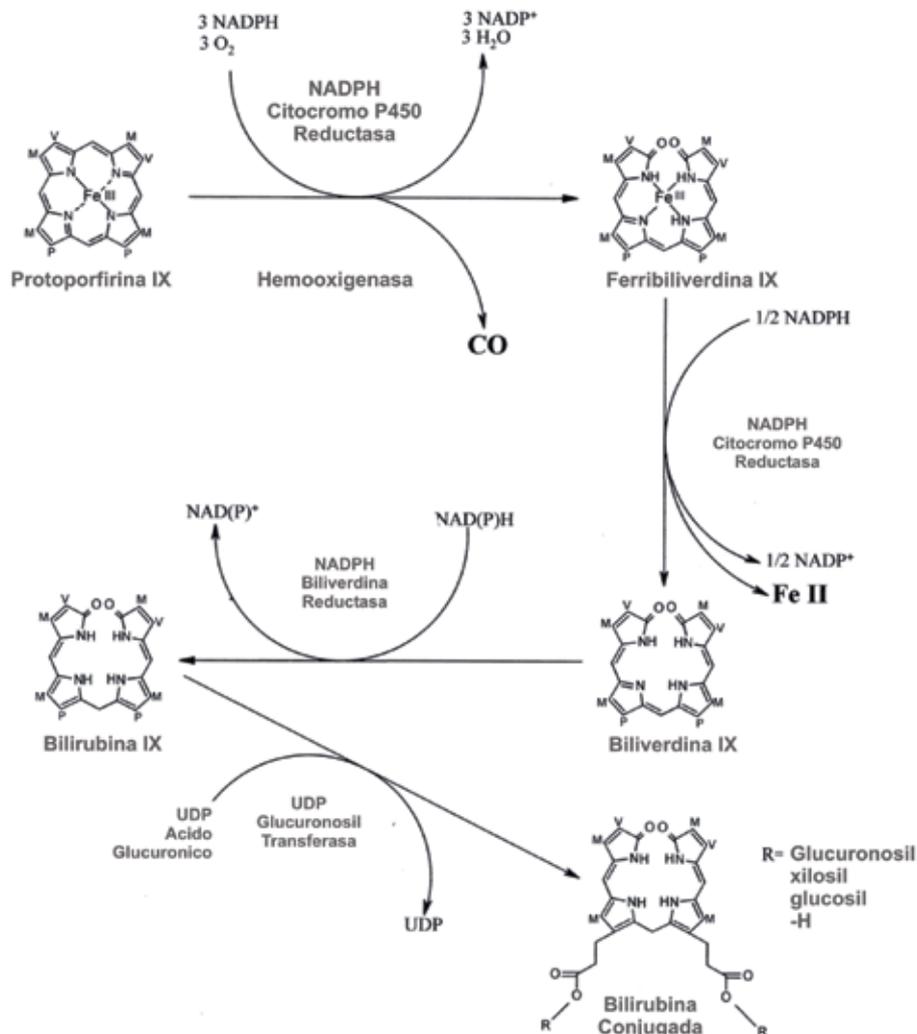


Figura I.8: Degradación del hemo

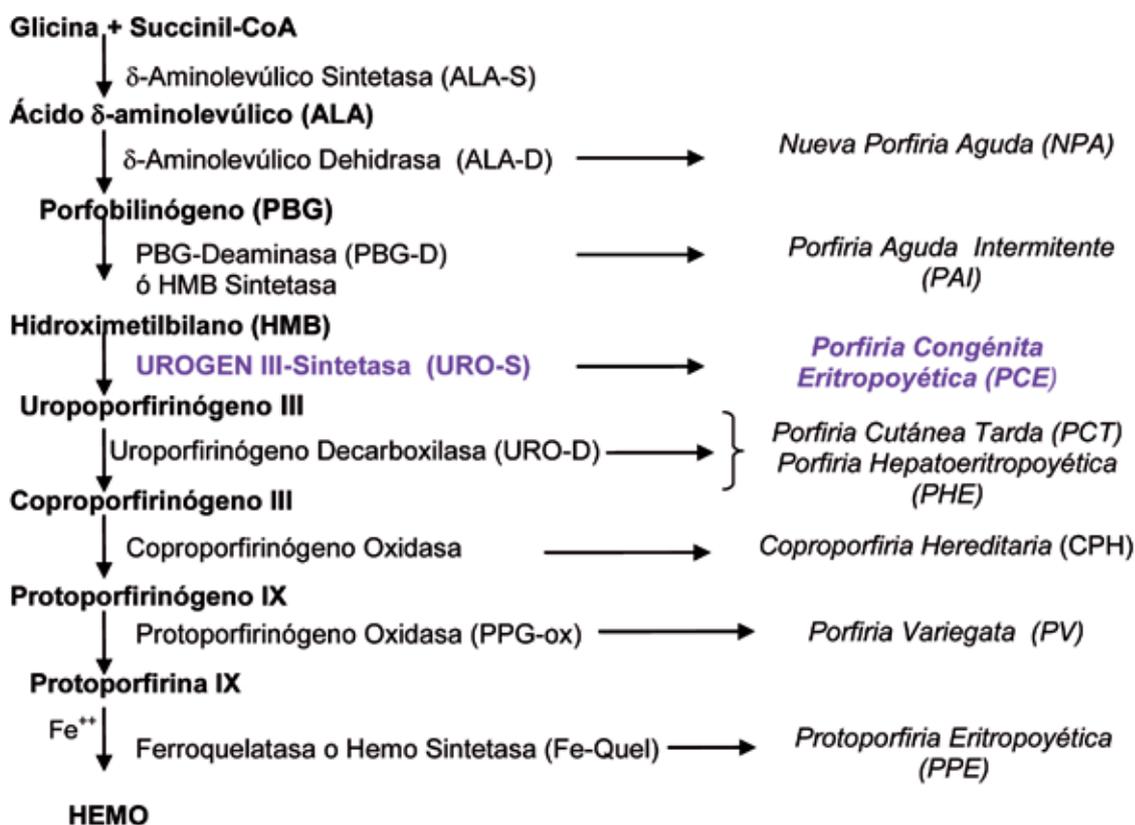
El monóxido de carbono, segundo producto de la reacción, es una molécula gaseosa considerado actualmente como un segundo mensajero involucrado en procesos de apoptosis, inflamatorios, aterosclerosis, contracción vascular y protección celular (Sánchez *et al*, 2005).

Finalmente, el hierro ferroso liberado por la HO es normalmente reciclado y pasa a formar parte del pool de hierro disponible para la síntesis de hemoglobina y otras hemoproteínas, ya que solo el 1-3% del hierro utilizado diariamente en la síntesis de células de la serie roja proviene de la dieta (Uzel & Conrad, 1998). Por lo dicho anteriormente, la HO juega un rol vital en la homeostasis de este metal.

II. Desórdenes en el metabolismo del hemo. Porfirias

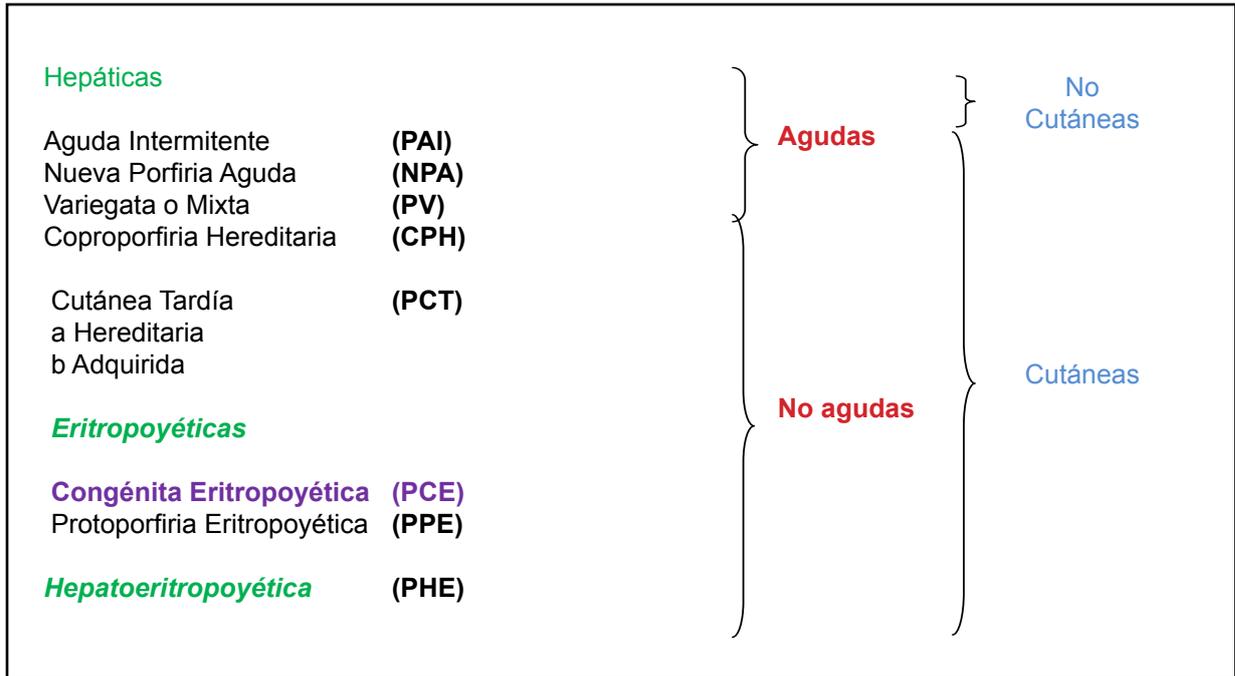
II.1 Las porfirias y su clasificación

Las porfirias son un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas, hereditarias o adquiridas, consecuencia de una deficiencia primaria parcial de una de las enzimas del camino del hemo (Esquema II.1) y se caracteriza por un patrón específico de excreción de intermediarios del hemo que refleja la sobreproducción y/o acumulación del sustrato sobre el cual actúa la enzima defectuosa (Batlle, 1997).



Esquema II.1: Enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo y porfirias asociadas

La tradicional clasificación de las porfirias en hepáticas o eritropoyéticas, según cual fuere el sitio de principal expresión de la falla metabólica, o bien en cutáneas o agudas de acuerdo a las principales manifestaciones clínicas, era insuficiente, de allí la propuesta (Batlle, 1997) de sumar al primer criterio, la división en agudas y no agudas es una forma más satisfactoria para subdividir e identificar a este grupo de enfermedades. En la actualidad se ha llegado a la siguiente clasificación (Moore *et al.*, 1987) (Esquema II.2):



Esquema II.2: Clasificación de las Porfirias

II.2 Generalidades de las porfirias

Todas las porfirias son desórdenes genéticos, con la única excepción de la PCT, que puede presentarse también en forma adquirida o esporádica (tipo I). Cinco porfirias se heredan en forma autosómica dominante (PAI, PCT, PV, PPE, CPH), con penetrancia muy variable y en general, los portadores del gen afectado pueden permanecer asintomáticos durante toda su vida. Las tres porfirias restantes se heredan en forma autosómica recesiva ([Tabla II.1](#)) (Anderson *et al.*, 2001).

Los genes que codifican para las enzimas del metabolismo del hemo han sido clonados y caracterizados ([Tabla II.1](#)) (Batlle, 1997; Anderson *et al.*, 2001). En cada una de ellas se han detectado diversas mutaciones responsables de las diferentes porfirias. La mayoría de las mutaciones provocan una deficiencia enzimática parcial, aunque la actividad enzimática es suficiente para mantener el requerimiento fisiológico de hemo en los pacientes. Factores adicionales que afectan el camino biosintético del hemo serían responsables de las manifestaciones clínicas ([Tabla II.1](#)).

	NPA	PAI	PCE	PCT	PHE	CPH	PV	PPE
Clasificación	Aguda	Aguda	Cutánea	Cutánea	Cutánea	Mixta	Mixta	Cutánea
Déficit enzimático	ALA-D	PBG-D	URO-S	URO-D	URO-D	CPGasa	PPG ox	Fequelatasa
Locus	9q34	11q23.3	10q25.3-q26.3	1p34	1p34	3q12	1q22-23	16q21.3
Modo de herencia	Autosómica recesiva	Autosómica dominante	Autosómica recesiva	Autosómica dominante /adquirida	Autosómica recesiva	Autosómica dominante	Autosómica dominante	Autosómica dominante
Incidencia	Poco frecuente	Frecuente en países nórdicos	Muy rara	Frecuente	Muy rara	Rara	Poco frecuente	Poco frecuente
Edad de inicio	Infancia	15-40 años	Primera infancia	30-40 años	Infancia	15-40 años	15-40 años	Edad escolar
Fotosensibilidad	No	No	Extrema	Moderada a grave	Severa	Moderada	Moderada	Moderada a grave
Síndrome cutáneo	No	No	Ampolosoerosivo crónico Hipertricosis Atrofia y mutilaciones	Ampolosoerosivo crónico Hipertricosis Hiperpigmentación	Fragilidad cutánea Hipertricosis Erosiones	Ampolosoerosivo crónico	Ampolosoerosivo crónico	Eritematoedematoso agudo Prurito Engrosamiento cutáneo
Crisis aguda	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No
Otros datos	Neuropatía crónica	—	Entrodoncia	Siderosis	Variante homocigota de la PCT	—	—	Colelitiasis
Sitio de sobreproducción de precursores de hemo	Hígado	Hígado	Células eritroides	Hígado	Hígado Células eritroides	Hígado	Hígado	Células eritroides

Tabla II.1: Principales características de las porfirias

Las porfirias hepáticas agudas se caracterizan por ataques agudos, que consisten en un conjunto de síntomas abdominales, neurológicos y psiquiátricos. El dolor abdominal agudo, con mayor intensidad en abdomen inferior, de tipo cólico se presenta de forma súbita y suele ser acompañado por anorexia, náuseas, vómito y constipación. Los síntomas neurológicos pueden incluir convulsiones, mialgias, parestias y parálisis de miembros superiores o inferiores, laríngeas y deglutarias. Generalmente, el paciente puede presentar también taquicardia sinusal e hipertensión. Los cuadros psiquiátricos consisten, la mayoría de las veces, en síntomas mentales como excitación, ansiedad, depresión, manía, esquizofrenia e insomnio, y cuadros de psicosis aguda. Estas alteraciones extracutáneas se deben a la acumulación de los precursores de las porfirinas, ALA y PBG (Kappas *et al.*, 1989; Batlle, 1997; Ferrándiz, 2008). Las porfirias agudas son ejemplos de enfermedades fármaco-genéticas, ya que los ataques agudos suelen ser desencadenados por exposición a una gran variedad de fármacos comunes. Los ataques agudos son idénticos en las cuatro porfirias agudas (PAI, CPH, PV y NPA) y ponen en riesgo la vida del paciente. La Porfiria Variegata (PV) y la Coproporfiria Hereditaria (CPH) son desordenes también hepáticos y mixtos, es decir, además del cuadro agudas también presentar síntomas cutáneos.

Las porfirias cutáneas presentan como principal signo clínico fotosensibilización cutánea debida a la acumulación de porfirinas en la piel. En las áreas de la piel expuestas al sol estas porfirinas son excitadas por la radiación sol y producen radicales libres al volver a su estado basal. Estos radicales libres provocan daños celulares que conllevan a lesiones cutáneas que van desde fragilidad cutánea, formación de vesículas y ampollas, hiperpigmentación hasta mutilaciones de leves a severas en los pacientes con Porfiria Congénita Eritropoyética y con Porfiria Hepatoeritropoyética (Batlle, 1997; Ferrándiz, 2008).

Además, se han reportado combinaciones de porfirias, denominadas Porfirias Duales (PD), en las cuales existe una deficiencia simultánea en dos enzimas del camino biosintético del hemo en un individuo (Poblete-Gutiérrez *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos se encuentran defectos en la enzima URO-D en combinación con defectos en PBG-D o CPGasa o PPGox, respectivamente, lo cual es razonable ya que la PCT, donde el gen de URO-D se ve afectado, es el tipo de porfiria más frecuente. También se han descrito porfirias duales debidas a deficiencias de CPGasa y de URO-S.

II.3 PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE (PAI)

La PAI es causada por una deficiencia parcial de la enzima PBG-D (Strand *et al.*, 1970; Brodie *et al.*, 1977), que trae aparejada una disminución del producto final del camino metabólico del hemo y un aumento de la actividad del ALA-S, lo cual produce a su vez, la sobreproducción y acumulación de los precursores ALA y PBG. Esta enfermedad se hereda como un carácter autosómico dominante con penetrancia incompleta. La incidencia de este desorden varía entre los distintos países, pero en la mayoría de las poblaciones se presenta en 1 de cada 10.000 individuos.

La expresión clínica ocurre después de la pubertad y más frecuentemente en mujeres que en hombres. La mayoría de los pacientes gozan de buena salud (PAI latentes) pero pueden desarrollar ataques agudos severos (PAI sintomáticos) al exponerse a ciertos factores, como por ejemplo, estrés, drogas terapéuticas, ayuno, ingestión de alcohol, hormonas sexuales o infecciones.

Los individuos con PAI sintomáticos excretan niveles incrementados de ALA y PBG, lo cual permite un fácil diagnóstico bioquímico. Asimismo, la mayoría de los portadores de la enfermedad tienen una actividad de PBG-D disminuida en una 50%, aunque este dato no puede ser utilizado para el diagnóstico, ya que existen individuos normales con bajos valores de actividad enzimática y pacientes con valores de actividad altos. La asociación del dato de actividad enzimática en asociación con el estudio de la familia entera permite el diagnóstico de entre un 80 y un 90% de los individuos con PAI latente (Astrup, 1978; Lamon *et al.*, 1979). En la actualidad, los estudios, principalmente de individuos latentes, se basan en el empleo de técnicas de identificación moleculares.

El mejor tratamiento para la PAI es establecer un diagnóstico preciso de los portadores de la enfermedad y evitar la exposición a agentes que precipitan los ataques agudos. Sin embargo, una vez precipitado el ataque, el objetivo del tratamiento es la reposición del hemo intracelular y así disminuir la síntesis del ALA, PBG y porfirinas. Estas medidas consisten en la administración de dextrosa endovenosa, la administración de soluciones hipertónicas, clorpromazina, meperidina, propanolol en dosis pequeñas y, en casos severos, hematina endovenosa (Batlle, 1997). El ácido fólico que actúa como un activador de la PBG-D, se ha empleado con éxito en el tratamiento de pacientes con PAI (Juknat de Geralnik *et al.*, 1981).

II.4 Porfiria congénita eritropoyética (PCE)

La PCE o enfermedad de Günther (Esquema II.1), es una porfiria cutánea extremadamente rara, de carácter autosómico recesivo, de la cual solo se han descrito mundialmente alrededor de 200 casos. La PCE es causada por mutaciones en el gen de la Uroporfirinógeno III-sintetasa (URO III-S), enzima que cataliza la ciclación e isomerización del tetrapirrol lineal hidroximetilbilano (HMB) a uroporfirinógeno III (UROgen III). Dichas mutaciones provocan una marcada disminución de la actividad de la enzima y, en consecuencia, se produce una rápida acumulación del isómero no fisiológico uroporfirinógeno I (UROgen I), el cual es decarboxilado para dar el coproporfirinógeno I (COPROgen I). Ambos compuestos son oxidados no enzimáticamente a sus correspondientes porfirinas, uroporfirina I (URO I) y coproporfirina I (COPRO I), cuya acumulación es extremadamente tóxica para el organismo (Romeo & Levin, 1969; Burton *et al.*, 1979; Jordan *et al.*, 1979; Battersby *et al.*, 1980; Kappas *et al.*, 1995; Desnick *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2001; Rossetti *et al.*, 2007).

La URO I se acumula en eritrocitos produciendo hemólisis de los mismo, y la porfirina liberada se deposita en diferentes tejidos y huesos produciendo eritrodoncia y aumento de la fragilidad ósea. Además, es un compuesto fotorreactivo, por lo cual la exposición al sol u otras fuentes de radiación UV causa daños en los tejidos expuestos; estos daños abarcan un amplio rango de lesiones, entre las que se encuentran los eritemas, prurito, hiperpigmentación, hipertricosis y ampollas, que pueden llegar a causar mutilaciones (Bickers *et al.*, 1987). También puede verse comprometida la zona ocular con graves lesiones en la cornea y la conjuntiva que pueden devenir en ceguera (Hillenkamp *et al.*, 2001). *Las porfirinas se acumulan además en hígado, bazo, intestino y riñones, y son excretadas en grandes cantidades por orina (Batlle, 1997).*

*La enfermedad se manifiesta generalmente en los primeros años de vida, aunque existen en la literatura internacional registros de al menos 13 casos de manifestación tardía de la misma (Kontos *et al.*, 2003). Los pacientes con manifestaciones severas suelen ser transfusión-dependiente toda su vida, presentar un hiperesplenismo secundario y, debido al importante compromiso cutáneo, suelen estar desfigurados (Nordmann & Deybach, 1982).*

Los pacientes PCE no son totalmente deficientes en actividad de URO III-S ya que deben poseer una actividad enzimática residual suficiente para sintetizar el UROgen III mínimo necesario para la producción del hemo que necesita el organismo para la síntesis de sus hemoproteínas. Presumiblemente, aunque no es posible predecirla desde el punto de vista bioquímico, la cantidad de actividad residual de la enzima determinaría primariamente la severidad de la enfermedad y esto depende de las mutaciones presentes en el gen existiendo así una relación genotipo / fenotipo (Batlle, 1997).

En general, el pronóstico para la enfermedad es malo, con una expectativa de vida de no más de 3 ó 4 décadas, y la muerte suele ser el resultado de la falla de múltiples órganos. Los tratamientos de la PCE son inespecífico, y consisten en evitar la luz del sol y utilizar protectores solares para minimizar las lesiones de la piel y la esplenectomía o transfusiones crónicas de la hemolisis. La protección de la piel de la luz solar y de traumatismos menores son de gran importancia, y el tratamiento agresivo con antibióticos de las infecciones es esencial para minimizar las cicatrices y las mutilaciones. Para los pacientes transfusión-dependientes las transfusiones crónicas de sangre son fundamentales, aunque este tratamiento sólo es efectivo hasta la pubertad, ya que en esta etapa del desarrollo la producción de porfirinas puede aumentar, y entonces se hace necesario aplicar un tratamiento más agresivo para reducir la producción de porfirinas en la médula ósea (Tezcan *et al.*, 1998; Rossetti *et al.*, 2007; Robert Richard *et al.*, 2008).

En la actualidad, existen diversas líneas de investigación sobre terapia génica aplicada al tratamiento de la PCE, aunque el único tratamiento comprobadamente efectivo en la disminución de los niveles de porfirinas y, por ende, en la reducción de la sintomatología cutánea en pacientes PCE es el trasplante alogénico de médula ósea, que se basa en sustituir los eritroblastos de la médula corrigiendo así el defecto enzimático.

II.4.1 Uroporfirinógeno III-Sintetasa

La enzima URO III-S humana ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de eritrocitos y se encontró que es una proteína monomérica de un peso molecular aparente de 29,5kDa (Tsai *et al.*, 1987). Posteriormente, fue aislado y secuenciado el cDNA que codifica para los 265 aminoácidos que contiene esta enzima. Este cDNA está compuesto por 1269 pb y presenta en los extremos 5' y 3' no codificantes dos secuencias de 196 y 302 pb respectivamente (Tsai *et al.*, 1988).

El gen que codifica para la URO III-S, de aproximadamente 34 kb, fue localizado en el brazo largo del cromosoma 10, en la posición 10q25.3 q26.3 (Astrin *et al.*, 1991). Su aislamiento, caracterización y secuenciación reveló que posee dos promotores alternativos, un para la expresión constitutiva, localizado río arriba del extremo 5' del exón 1, y otro para la expresión en células eritroides, ubicado en el intrón 1. Además, el gen se encuentra organizado en 10 exones, el exón 1 no traducible housekeeping o el exón 2A no traducible eritroide y 9 exones codificantes, 2B a 10. (Aizencang *et al.*, 2000). El análisis de la secuencia del gen reveló también, que todos los límites exón/intrón obedecen las reglas GT/AG (Breathnach & Chambon, 1981).

Por otra parte, se ha aislado también el cDNA que codifica para la Uro III-S en ratón. La comparación de las secuencias de aminoácidos del cDNA humano y de ratón reveló una identidad del 80,5% en nucleótidos y 77,8% en aminoácidos (Bensidhoum *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995). Esta comparación permitió determinar que todas las mutaciones en regiones codificantes registradas para la PCE, excepto la V28F, involucran aminoácidos conservados en ambas secuencias, humana y de ratón (Batlle, 1997).

II.4.2 Mutaciones en el gen de la Uroporfirinógeno III-Sintetasa

Hasta la fecha se han identificado alrededor de 40 mutaciones (Human Gene Mutation Database, 2009) en el gen responsables de PCE. Estas incluyen 23 mutaciones de cambio de sentido y sin sentido, grandes y pequeñas deleciones e inserciones, mutaciones en regiones promotoras y mutaciones en sitios de empalme. La distribución de las mutaciones entre los pacientes es bastante homogénea (con un valor medio de dos pacientes por mutación) excepto para la p.C73R que se presenta en cerca de un tercio del total de los casos reportado.

La expresión de la mayoría de las mutaciones del gen URO III-S en sistemas bacterianos permitió establecer una relación entre genotipo y fenotipo, haciendo posible establecer una correlación entre la actividad residual de la enzima y la severidad de la manifestación clínica de la PCE. El homoalelismo para la mutación p.C73R se asocia con el fenotipo más severo, siendo estos individuos generalmente dependientes de trasfusiones desde el nacimiento. Los pacientes heteroalélicos para esta mutación también suelen presentar fenotipos severo o moderadamente, dependiendo de la actividad residual que expresa la mutación que acompaña a la p.C73R (Batlle, 1997; Freeseemann *et al.*, 1998).

El análisis integrado de la actividad enzimática y los datos de estabilidad cinética permitió establecer la vinculación entre la posición de la mutación en la secuencia de aminoácidos y la sintomatología en pacientes PCE. Se determinó que aquellas mutaciones que involucraban aminoácidos en una región helicoidal de la molécula (p.T62A, p.A66V, p.A69T, p.C73R), esencial para mantener la estabilidad cinética de la conformación plegada, eran responsables de fenotipos más severos (Fortian *et al.*, 2009).

III. Referencias

- Adler, A.D.; Varadi, V.; Wilson, N. *Porphyrins power and pollution.* (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **244**: 685.
- Aizencang, G.I.; Solis, C.; Bishop, D.F.; Warner, C.; Desnick, R.J. *Human uroporphyrinogen III synthase: genomic organization, alternative promoters and erythroid-specific expression.* (2000) *Genomics.* **70**: 223.
- Anderson, K.E.; Sassa, S.; Bishop, D.F.; Desnick, R.J. *Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias.* (2001) In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., et al (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pag.: 2991.
- Astrup, E.G. *Family studies on the activity of uroporphyrinogen I synthase in the diagnosis of acute intermittent porphyria.* (1978) *Clin. Sci. Mol. Med.* **54**: 251.
- Battle, A.M. del C. *Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular.* (1997) Serie: Actualizaciones Médico-Bioquímicas. *Acta Bioquim. Latinoamer. Sup.* **3**.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Marchand, G.W.J.; McDonald, E. *Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle.* (1980) *Nature.* **285**: 17.
- [Bensidhoum, M.; Ged, C.M.; Poirier, C.; Guenet, J.L.; Verneuil, H. *The cDNA sequence of mouse uroporphyrinogen III synthase and assignment to mouse chromosome 7.* \(1994\) *Mamm. Genome.* **5**: 728.](#)
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Ramos, E.; Battle, A.M. del C. *δ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*.* (1993) *Int. J. Biochem.* **25**: 1917.
- Bickers, D.R. MAP: The Porphyrias. In: Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolf K., Freedberg I.M., Austen K.F. (eds): *Dermatology in General Medicine.* (1987) New York: Mc Graw- Hill. pag.: 1.679.
- Bishop, D.F.; Henderson, A.S.; Astrin, K.H. *Human δ -aminolevulinic acid synthase: Assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome.* (1990) *Genomics* **7**: 207.
- Braidotti, G.; Borthwick, I.A.; May, B.K. *Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic acid synthase from rat.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 1109.
- Breathnach, R.; Chambon, P. *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.* (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 349.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Thompson, G.G. *The treatment of acute intermittent porphyria with laevulose.* (1977) *Clin. Sci. Mol. Med.* **53**: 364.
- Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M.; Scott, A.I. *^{13}C -NMR evidence for a new intermediate, preuroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and III.* (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **5**: 202.
- Conboy, J.G.; Cox, T.C.; Bottomley, S.S.; Bawden, M.J.; May, B.K. *Human erythroid 5-aminolevulinic acid synthase. Gene structure and species-specific differences in alternative RNA splicing.* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 18753.
- Cotter, P.D.; Willard, H.F.; Gorski, J.L.; Bishop, D.F. *Assignment of human erythroid δ -aminolevulinic acid synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X_i autosome translocations.* (1992) *Genomics.* **13**: 211.
- Cox, T.M.; O'Donnell, M.W.; Aisen, P.; London, I.M. *Hemin inhibits internalization of transferrin by reticulocytes and promotes phosphorylation of the membrane transferrin receptor.* (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82**: 5170.
- Cox, T.C.; Bawden, M.J.; Abraham, N.G.; Bottomley, S.S.; May, B.K.; Baker, E.; Chen, L.Z.; Sutherland, G.R. *Erythroid 5-aminolevulinic acid synthase is located on the X chromosome.* (1990) *Am J Hum Genet.* **46**: 107.
- Cox, T.C.; Bawden, M.J.; Martin, A.; May, B.K. *Human erythroid δ -aminolevulinic acid synthase: Promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA.* (1991) *EMBO J.* **10**: 1891.
- Dailey, H.A. & Fleming, J.E. *Bovine ferrochelatase. Kinetic analysis of inhibition by N-methylprotoporphyrin, manganese and heme.* (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 11453.
- Dandekar, T.; Stripecke, R.; Gray, N.K.; Goossen, B.; Constable, A.; Johansson, H.E.; Hentze, M.W. *Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid δ -aminolevulinic acid synthase mRNA.* (1991) *EMBO J.* **10**: 1903.
- Desnick, R.J.; Glass, I.A.; Xu, W.; Solis, C.; Astrin, K.H. *Molecular genetics of congenital erythropoietic porphyria.* (1998) *Semin. Liver Dis.* **18**: 77.
- Dierks, P. *Molecular biology of eukaryotic δ -aminolevulinic acid synthase,* (1990) in Dailey H.A. (ed): *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls.* New York, NY, McGraw-Hill, pag.: 201.
- Drew, P.D. & Ades, I.Z. *Regulation of the stability of chicken liver delta-aminolevulinic acid synthase mRNA by hemin.* (1989) *B.B.R.C.* **162**: 102.
- Ege, Seyhan. *Química Orgánica: Estructura y Reactividad* (vol. 2). (1997) Barcelona, Reverté. pag.: 1100.

- Ferrándiz, C. *Dermatología clínica* (2008) 3^a ed, España, Ed. Elsevier. pag.: 315
- [Fortian, A.](#); [Castaño, D.](#); [Ortega, G.](#); [Lain, A.](#); [Pons, M.](#); [Millet, O.](#) *Uroporphyrinogen III synthase mutations related to congenital erythropoietic porphyria identify a key helix for protein stability.* (2009) *Biochemistry*. **48(2)**: 454.
- Freesemann, A.G.; Gross, U.; Bensidhoum, M.; De Verneuil, H.; Doss, M.O. *Immunological, enzymatic and biochemical studies of uroporphyrinogen III synthase deficiency in 20 patients with congenital erythropoietic porphyria.* (1998) *Eur. J. Biochem.* **257**: 149.
- Hamilton, J.W.; Bement, W.J.; Sinclair, P.R.; Sinclair, J.F.; Alcedo, J.A.; Wetterhahn, K.E. *Heme regulates hepatic 5-aminolevulinic synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription.* (1991) *A.B.B.* **289**: 387.
- Hentze, M.W. & Kühn, L.C. *Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 8175.
- Hillenkamp, J.; Reinhard, T.; Fritsch, C.; Kersten, A.; Bocking, A.; Sundmacher, R. *Ocular involvement in congenital erythropoietic porphyria (Gunther's disease): cytopathological evaluation of conjunctival and corneal changes.* (2001) *Br. J. Ophthalmol.* **85(3)**: 371.
- Hradilek, A. & Neuwirt, J. *Inhibition of cellular iron uptake by haem in mouse erythroleukaemia cells.* (1989) *Br. J. Haematol.* **73**: 410.
- Iacopetta, B. & Morgan, E.H. *Hemin inhibits transferrin endocytosis in immature erythroid cells.* (1984) *Biochem. Biophys. Acta.* **805**: 211.
- Jordan, P.M.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.M.; Pryde, L.; Scott, A.I. *Preuroporphyrinogen: a substrate for uroporphyrinogen III cosynthase.* (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **5**: 204.
- Junknat de Geralnik, A.A.; Rossetti, M.V.; Battle, A.M. del C. *Porphyria biosynthesis in Euglena gracilis IV. An endogenous factor controlling enzymic synthesis of porphyrinogens and its possible role in treatment of some porphyrias.* (1981) *Inst. J. Biochem.* **13**: 343.
- Kappas, A.; Sassa, S.; Galbraith, R.A.; Nordmann, Y. *The Porphyrins, in Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.* ed. *The Metabolic Basis of Inherited Disease.* (1989) McGraw-Hill. New York 6th edn. pag.: 1305.
- Kappas, A.; Sassa, S.; Galbraith, R.A.; Nordmann, Y. *The Porphyrins.* In: Scriver C.S., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. ed. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases.* (1995) McGraw-Hill. Mc Graw-Hill. 7th ed. pag.: 2.103.
- Kikuchi G & Hayashi N. *Regulation by heme of synthesis and intracellular translocation of delta-aminolevulinic synthase in the liver.* (1981) *Mol. Cell. Biochem.* **37**: 27.
- Klausner, R.D.; Rouault, T.A.; Harford, J.B. *Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism.* (1993) *Cell* **72**: 19.
- Koller, M.E. & Romslo, I. *Studies on the ferrochelatase activity of mitochondria and submitochondrial particles with special reference to the regulatory function of the mitochondrial inner membrane.* (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* **461**: 283.
- Kontos, A.P.; Ozoq, D.; Bichakjian, C.; Lim, H.W. *Congenital erythropoietic porphyria associated with myelodysplasia presenting in a 72-year-old man: report of a case and review of the literature.* (2003) *Br. J. Dermatol.* **148**: 160.
- Krishnan, R.K. & Mahin, D.M. *Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver.* (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 3956.
- Lamon, J.M.; Frykholm, B.C.; Hess, R.A.; Tschudy, D.P. *Hematin therapy for acute porphyria.* (1979) *Medicine.* **58(3)**: 252.
- Moore, M.R.; Mc Coll, K.E.L.; Rimington, C.; Sir Goldberg, A. *Disorders of porphyrin Metabolism.* (1987) Plenum Medical Book Co. NY & London.
- Nordmann, Y & Deybach, J.C. *Congenital Erythropoietic Porphyria.* (1982) *Semin. Liver Dis.* **2**: 154.
- Poblete-Gutierrez, P.; Badeloe, S.; Wiederholt, T.; Merk, H.F.; Frank, J. *Dual porphyrias revisited.* (2006) *Experimental Dermatology.* **15(9)**: 685.
- Ponka, P. & Neuwirt, J. *Regulation of iron entry into reticulocytes. I. Feedback inhibitory effect of heme on iron entry into reticulocytes and on heme synthesis.* (1969) *Blood* **33**: 690.
- Ponka, P.; Neuwirt, J.; Borova, J. *The role of heme in the release of iron from transferrin in reticulocytes.* (1974) *Enzyme* **17**: 91.
- Ponka, P. *Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells.* (1997) *Blood* **89(1)**: 1.
- Ponka, P. *Cell Biology of Heme.* (1999) *Am. J. Med. Sci.* **318 (4)**: 241.
- Romeo, G. & Levin, E.Y. *Uroporphyrin III cosynthase in human congenital erythropoietic porphyria.* (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **63**: 856.

- Rossetti, M.V.; Parera, V.E.; Melito, V.A.; Batlle, A.M.delC. *Porfiria Congénita Eritropoyética en la Argentina: 4 niños y un caso de manifestación tardía*. (2007) *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **41 (3)**: 359.
- Rossi, E.; Attwood, P.V.; Garcia-Webb, P.; Costin, K.A. *Inhibition of human lymphocyte ferrochelatase activity by hemin*. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1038**: 375.
- Roy-Chowdhury, N.; Lu, C.; Roy-Chowdhury, J. *Bilirubin metabolism*. (2007) *Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*. 3rd ed. / editors, Juan Rodés et al. Malden, Mass.; Oxford: Blackwell Pub. pag.: 165.
- Sassa, S. & Nagai, T. *The role of heme in gene expression*. (1996) *Int. J. Hematol.* **63**: 167.
- Sánchez, C.; Rodeiro, I.; Garrido, G.; Delgado, R. *Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico*. (2005) *Acta Farm. Bonaerense.* **24(4)**: 619.
- Scarpulla, R.C. *Nuclear respiratory factors and the pathways of nuclear-mitochondrial interaction*. (1996) *Trends Cardiovasc. Med.* **6**: 39.
- Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E.; Marver, H.S. *Soluble δ -aminolevulinic acid synthetase of rat liver. II. Studies related to the mechanism of enzyme action and hemin inhibition*. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 4132.
- Schulman, H.M.; Martinez-Medellin, J.; Sidloi, R. *The reticulocyte-mediated release of iron and bicarbonate from transferrin: Effect of metabolic inhibitors*. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.* **343**: 529.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Maguire, D.J.; Elferink, C.J.; Bawden, M.J.; Mercer, J.F.B.; May, B.K. *Regulation of 5-aminolevulinic acid synthase mRNA in different rat tissues*. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 5202.
- Srivastava, G.; Hansen, A.J.; Bawden, M.J.; May, B.K. *Hemin administration to rats reduces levels of hepatic mRNAs for phenobarbitone-inducible enzymes*. (1990) *Mol. Pharmacol.* **38**: 486.
- Strand, L.J. & Marver, H. *Determination of β -aminolevulinic acid synthetase (ALA-S) in cell culture: Naturally occurring inducers in normal human plasma*. (1970) *Clin. Res.* **18**: 345.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S.; Schmid, R. *Microsomal hemoxygenase: characterization of the enzyme*. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**: 6388.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F.; Desnick, R.J. *Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from human erythrocytes*. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 1.268.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F.; Desnick, R.J. *Human uroporphyrinogen III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA*. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **85**: 7049.
- Uzel, C. & Conrad, M. E. *Absorption of heme iron*. (1998) *Semin. Hematol.* **35 (1)**: 27.
- Xu, W.; Kozak, C.A.; Desnick, R.J. *Uroporphyrinogen-III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, expression of a mouse full-length cDNA, and its localization on mouse chromosome 7*. (1995) *Genomics.* **26**: 556.

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar la etiopatogenia en dos pacientes diagnosticados bioquímicamente con PCE

Objetivos específicos:

Desarrollar protocolos de PCR que permitan la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes y promotoras del gen de la Uroporfirinógeno III-Sintetasa para identificación de mutaciones en pacientes diagnosticados con Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE).

Estudiar las causas de la reaparición de la sintomatología en un paciente diagnosticado con PCE sometido a un trasplante de médula ósea, a través de ensayos bioquímicos y genéticos.

Establecer la genealogía de la enfermedad en la familia del paciente.

Confirmar el diagnóstico bioquímico de PCE, mediante medición de la actividad enzimática y la identificación de las mutaciones responsables, en una paciente diagnosticada con Porfiria Dual PCE / PAI.

Materiales y métodos

I. Presentación de casos clínicos

I.1 PACIENTE LTO

El paciente LTO fue diagnosticado con Porfiria Congénita Eritropoyética en los primeros meses de vida, cuando presentaba manifestaciones cutáneas leves (ampollas con contenido seroso y milia), fotosensibilidad y un perfil de excreción de porfirinas concordante con dicho diagnóstico (Tabla I.1). En el año 2001, se realizaron los estudios genéticos del niño, identificándose las mutaciones c.672ins28/p.C73R en los exones 10 y 4, respectivamente, del gen URO III-S (Shady et al., 2002).

Fecha	Edad	ORINA						PLASMA	HECES	GR
		µg porf /24h	%U	%F	%H	%P	%C	IPP λ 619nm	PTMF µg/g	PT µg/100ml GR
25/11/98	5 m	2.073	35	8	2	15	40	4,6	877	445
22/2/99	8 m	2.712	48	4	2	8	38	7,4	----	----
11/12/00	2a, 4m		----	----	----	----	----	9,8	----	609
12/11/01	3a, 5m	9.389	----	----	----	----	----	8,2	----	753
11/11/02	4a, 5m	33.792	----	----	----	----	----	11,3	----	659
10/11/04	6a, 5m	16.587	43	3	3	3	48	7	696	
3/2/05	TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA									
18/5/05	6a, 11m	1.937	----	----	----	----	----	4,1	124	146
16/5/06	7a, 11m	3.908	----	----	----	----	----	4,09	329	265
31/10/06	8a, 4m	6.079	----	----	----	----	----	5,77	259	233
31/7/07	9a, 1m	6716	----	----	----	----	----	8,42	408	209
1/4/08	9a, 10m	10759	----	----	----	----	----	5,54	702	352
4/11/08	10a, 5m	8538	----	----	----	----	----	5,54	445	187
29/06/09	11 a	10.550	----	----	----	----	----	6,55	513	205
Valores normales		20-250	0	0	0	0	100	≤1,30	30-130	150±40

Tabla I.1: Evolución del paciente LTO (Porf.: porfirinas; U: uroporfirina; F: firiaporfirina; H: hexaporfirina; P: pentaporfirina; C: coproporfirina; IPP: índice de porfirinas plasmáticas; PTMF: porfirinas totales en materia fecal; GR: glóbulos rojos; PT: porfirinas totales)

En el año 2005, a los 6 años de edad, debido al agravamiento de la sintomatología cutánea, el paciente fue sometido a un trasplante de médula ósea alogénico, utilizando a su hermana mayor (LCA) como donante histocompatible. Inicialmente, se observó una mejoría tanto en los parámetros bioquímicos como en la sintomatología, pero estudios realizados a los 15 y 27 meses post trasplante indicaron un aumento del contenido de porfirinas en orina y plasma (Tabla I.1), lo cual no coincidía con lo descrito generalmente para trasplantes realizados en niños (Tezcan et al., 1998; Shaw et al., 2001).

Además del paciente, se analizó genética y enzimáticamente sus familiares directos, ninguno de los cuales presentaba sintomatología asociada a PCE (Tabla I.2).

Individuo	Parentesco	Sexo	Sintomatología clínica de PCE	IPP λ 619nm (4/11/2008)
LTO	Paciente	M	SI	5,54
CAL	Madre	F	No	1,00
LJO	Padre	M	No	1,00
LCA	Hermana	F	No	1,10
LVI	Hermano	M	No	----

Tabla III.2: Familia del paciente LTO. Índice de porfirinas plasmáticas (IPP)

I.2 PACIENTE GST

La paciente GST, de 43 años de edad, comenzó a manifestar a partir de los 15 años trastornos abdominales, síntomas cutáneo leves (fotosensibilidad, maculas, hiperpigmentación y costras), eritrodancia (Fotografía I.1 A y B) y esplenomegalia. La sintomatología clínica y los parámetros bioquímicos (Tablas I.3, 4 y 5) llevaron a un diagnóstico de Porfiria Dual PCE/PAI. Además, la paciente presenta anemia

hemolítica de origen desconocido, hepatomegalia y elevados valores de ferritina sérica, lo cual está asociado a elevados niveles de hierro en sangre. A principios del año 2008, la paciente fue sometida a una esplenectomía, con el fin de mejorar su condición general.

Fecha	mg porf /L	ALA mg/24h	PBG mg/24h	%U	%F	%H	%P	%C
1/12/07	13.512	18,00	57,70					
1/1/08	8.879	6,55	21,60					
1/5/08	10.475	9,40	28,80					
1/8/08	5.600	4,40	12,10					
1/1/09	5.344	4,60	19,80					
Valores normales	20-250	<4	<2	0	0	0	0	100

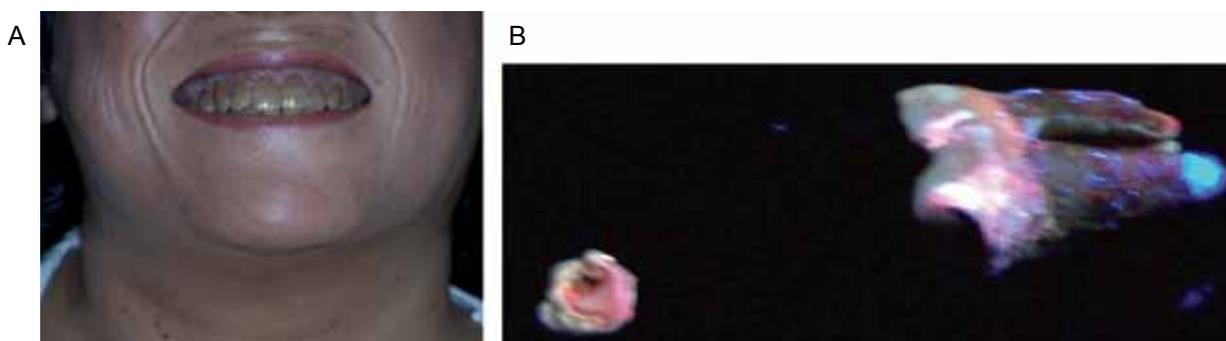
Tabla 1.3: Valores bioquímicos en orina de la paciente GST (Porf.: porfirinas; U: uroporfirina; F: firiaporfirina; H: hexaporfirina; P: pentaporfirina; C: coproporfirina; PTO: porfirinas totales en orina)

Fecha	PTMF µg/g seco	%U	%F	%H	%P	%C	%I	%P
1/2/07	655	5	3	1	1	80	5	5
1/1/08	595							
1/5/08	1.107							
1/8/08	622							
1/1/09	1.283							
Valores normales	30-130	1	1	1	2	35	25	35

Tabla 1.4: Valores bioquímicos en materia fecal de la paciente GST (U: uroporfirina; F: firiaporfirina; H: hexaporfirina; P: pentaporfirina; C: coproporfirina; PTMF: porfirinas totales en materia fecal)

Fecha	PTS µg/100ml GR	IPP λ 619nm
1/2/07	427	5,30
1/1/08	446	3,87
1/5/08	285	4,90
1/8/08	304	3,54
1/1/09	204	4,75
Valores normales	150 ±40	<1,30

Tabla 1.5: Valores bioquímicos en sangre de la paciente GST (PTS: porfirinas totales en sangre; GR: glóbulos rojos; IPP: índice de porfirinas plasmáticas)



Fotografía 1.1: A) Eritrodoncia bajo luz blanca y B) Pieza dental con eritrodoncia bajo luz UV de 400 nm

Los estudios genéticos y enzimáticos realizados para PAI revelaron la presencia de la mutación p.G111R en la enzima PBG-D y un valor de actividad enzimática concordante con este hallazgo, 49,37 U/ml GR mientras que los valores normales están en un rango de 81,51±11,96 U/ml.

Los estudios genéticos para hemocromatosis hereditaria, revelaron que la paciente es portadora de la mutación H63D en heterocigosis en el gen HFE, que codifica para la proteína que lleva ese nombre, reguladora de la absorción de hierro.

II. Estudios genéticos

II.1 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de muestras de sangre periférica se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando un kit comercial (GE Healthcare Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin Kit). La primer etapa de la extracción consiste en la lisis de los glóbulos rojos; para este fin se adicionan 20 µl de solución de Proteinasa K, 200 µl de sangre total y 400 µl de solución de lisis en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se agita por 15 segundos utilizando un vórtex y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se centrifuga a máxima velocidad por unos segundos, se remueve el sobrenadante y con el fluido residual se resuspende el pellet (vórtex), el cual contiene a los glóbulos rojos. En la siguiente etapa, se transfiere la mezcla anterior a una columna, con el fin de que el ADN quede adherido en la matriz de sílica de la misma. La columna se centrifuga por 1 minuto a 11000 g y a continuación se vacía el tubo colector. Luego, se procede al lavado de la columna, agregando 500 µl de solución de lisis y centrifugando nuevamente a 11000 g por 1 minuto; luego se agregan 500 µl de solución de lavado y se centrifuga a máxima velocidad durante 3 minutos. La última etapa consiste en eluir el ADN de la columna y para esto se transfiere la columna a un tubo eppendorf limpio y se agrega directamente sobre la matriz de la columna 150 µl de H₂O desionizada previamente calentada a 70°C, luego se centrifuga a 11000 g durante un minuto, obteniéndose así el ADN purificado en el tubo.

II.2 DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

Se diseñaron 9 pares de primers para la amplificación de los exones codificantes, las regiones intrónicas flanqueantes de dichos exones y la región promotora eritropoyética del gen de la URO III-S (Tabla II.1).

Nombre del fragmento	Primer	Región que abarca	Secuencia (5' → 3')	PM del fragmento
Promotor eritroideo	PrErFw	Promotor eritroideo	ACGAGACCCAAAAGAATTCTAGTG	560pb
	PrErRv	Promotor eritroideo	TACACAAGAAGAAGGCAATCAAATG	
Exón 2-3	UROS-Fw2-3	Exones 2 y 3, intron 2	CCGTCCCCATCGGAAATT	540pb
	UROS-Rv2-3	Exones 2 y 3, intron 2	TGCCATGTTTTAAAGTTTGGGAA	
Exón 4	UROSFw4	Exon 4	CTCCTTGGAAGATGTTGAA	289pb
	UROSRv4	Exon 4	GTCTGTGACCTGATACCA	
Exón 5	UROSFw5	Exon 5	CTAATAGTTTGCTTTGCTCACAG	338pb
	UROSRv5	Exon 5	TCACTGCATTCTTATCAGTAGTA	
Exón 6	UROSFw6	Exon 6	GCATACCTGTGTATTTGCACGTT	267pb
	UROSRv6	Exon 6	ACCAAGAATGCACTGAGGAAA	
Exón 7	UROSFw7	Exon 7	AACTGAGTCCTAGAAGCAGAG	303pb
	UROSRv7	Exon 7	GCTCTCTGCAGGGCCACCCACTT	
Exón 8	UROSFw8	Exon 8	AGCTTCCAAGCAGCTCGTT	390pb
	UROSRv8	Exon 8	CCATTCTAATTCTAGAATCCCAG	
Exón 9	UROSFw9	Exon 9	ACCACTCCTGTGCTAAAACC	346pb
	UROSRv9	Exon 9	TTCTAAGGCACCTGCTAGGC	
Exón 10	UROSFw10	Exon 10	ACGTCACATGAGCAGTAACG	378pb
	UROSRv10	Exon 10	AGGCTTGAGGCAGGAGTCT	

Tabla II.1: Secuencias y características de los primers diseñados para amplificar el gen Uro III-S

Los protocolos para la amplificación por PCR de los exones 4 y 10 habían sido desarrollados previamente en el CIPYP (Tabla II.2; Tabla II.3). Los restantes protocolos fueron desarrollados y puestos a punto partiendo de estos protocolos y realizando las modificaciones necesarias para obtener productos de

PCR de buena intensidad y libres de inespecíficos. Para dichas modificaciones se tomaron en cuenta las temperaturas de annealing teóricas para los primers y el peso molecular de los fragmentos a amplificar. En todos los casos el volumen final fue de 50 μ l; los sistemas de amplificación contenían, además, una concentración final 1X de Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 1 μ l de dNTPs (200 μ M) y 0,5 μ l Taq DNA polimerasa (Recombinant, Invitrogen™); las concentraciones finales de los primers y del magnesio variaron según el fragmento a amplificar.

En la amplificación del fragmento que contenía al exón 7, además de las condiciones antes descriptas, se ensayaron curvas de concentración de magnesio y DMSO, y la utilización de Enhancer solution del kit comercial Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen™).

	H ₂ O (μ l)	Buffer X 10(μ l)	Mix de primer 10 μ M (μ l)	dNTPs (μ l)	Mg ⁺² (μ l)	Taq polimerasa (μ l)	ADN (μ l)
Exón 4	35,5	5	1	1	2	0,5	5
Exón 10	35,5	5	1	1	2	0,5	5

Tabla II.2: Condiciones para la amplificación de los exones 4 y 10. (Mix de primers: Exón 4=UROSFW4 + UROSRV4; Exón 10=UROSFW10+UROSRV10)

Paso n°	Etapa	Exón 4	Exón 10
1	Desnaturalización	3' a 95°C	3' a 95°C
2	Desnaturalización	1' a 95°C	1' a 95°C
3	Annealing	1' a 50°C	1' a 50°C
4	Extensión	30" a 72°C	30" a 72°C
5	Amplificación	35 ciclos al paso 2	29 ciclos al paso 2
6	Extensión final	5' a 72°C	5' a 72°C
7		4°C	4°C

Tabla II.3: Programas de amplificación de los exones 4 y 10 de la Uro III-S

II.3 Visualización de los productos de PCR

Para comprobar la amplificación por PCR de las regiones del gen de URO III-S, se armaron geles de agarosa 1% en buffer TBE 1X. Se corrieron las muestras junto con un marker de peso molecular (100pb-GE Healthcare) durante aproximadamente 40 minutos a 80 voltios.

II.4 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez visualizada la banda correspondiente al tamaño del fragmento deseado, se procedió a la purificación del producto de PCR utilizando un kit comercial (Bioneer Accuprep® PCR Purification Kit). En un eppendorf limpio de 1,5 ml se resuspende el producto de PCR en 5 volúmenes de PCR Binding Buffer. Se transfiere la solución a la columna de unión a ADN y se centrifuga a 13000 g por un minuto. Luego, se tira el eluido, se ensambla nuevamente la columna y se agregan 500 μ l de buffer de lavado. A continuación, se centrifuga la columna por un minuto a 13000 g, se descarta el líquido residual y se repite el lavado con el buffer para este fin. Finalmente, se pasa la columna a un eppendorf limpio de 1,5ml, se agregan 25 μ l se agua desionizada directamente sobre la matriz de la columna y se incuban durante un minuto a temperatura ambiente; se centrifuga la columna un minuto a 13000 g. El líquido recogido es el ADN purificado, en condiciones óptimas para ser secuenciado.

II.5 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los fragmentos fueron secuenciados de forma automática (Macrogen, secuenciador: ABI3730XL) empleando los primers utilizados en las reacciones de PCR (Tabla II.1).

III. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

III.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

La determinación de la actividad de URO III-S eritrocitaria se realizó mediante modificación de la técnica de ensayo acoplado PBG-Deaminasa (PBG-D) / Uroporfirinógeno III-sintetasa (URO III-S) (Tsai *et al.*, 1987). El análisis del tipo isomérico se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante adaptación de la técnica de Lim y col (Lim *et al.*, 1983).

III.1.1 Preparación de la PBG-deaminasa

Se incubaron 2,5 ml de glóbulos rojos con 12,5 ml de Tris- HCl 0,1M pH 8 durante 2 horas en agitación a una temperatura de 60°C. Transcurrido este tiempo, la muestra es centrifugada por 15 minutos a 10000 g, a una temperatura de 4°C. El sobrenadante obtenido es colectado con una pipeta Pasteur, y almacenado para ser utilizado posteriormente como fuente de PBG-D en el protocolo para medición de la actividad de la enzima URO III-S. Para la realización del protocolo propuesto por Tsai y col es ideal que la enzima PBG-D posea la capacidad de producir 60 pmoles de PBG por hora.

III.1.2 Medición de la actividad de la enzima URO III- sintetasa

Para la medición de la actividad enzimática de los pacientes y de los controles, inicialmente se procedió a la ruptura de las muestras de glóbulos rojos mediante congelamiento y descongelamiento rápido. Una vez realizado esto, se realizaron diluciones 1:20 de los glóbulos rojos lisados en buffer Tris- HCl 0,1M pH8, EDTA 1mM y Tween 1%; estas muestras serán las utilizadas para la medición de la actividad.

A continuación, se preincuban en baño de agua durante 5 minutos a 37°C las muestras según el sistema que se muestra en la [Tabla III.1](#):

	PBG-D (µl)	Dilución 1:20 de GR	Tris-HCl 0,1M pH 8
Blanco de PBG	250	-----	5 µl
Muestras	250	5 µl	-----

[Tabla III.1](#): Sistema de preincubación

Luego de la preincubación, se agrega a cada muestra 25 µl de PBG 3,4 mM y se incuba en baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se corta la reacción incorporando 220 µl de TCA 10% en cada tubo. Finalmente, las muestras se centrifugan durante 20 minutos a 4000 g, y el sobrenadante se pasa a un tubo eppendorf de 1,5 ml limpio para ser analizadas posteriormente por RP-HPLC.

III.1.3 Identificación de los isómeros URO I y URO III por RP-HPLC

La identificación de los isómeros URO I y URO III por RP-HPLC se realizó utilizando una columna Merck Lichrospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y de 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm. Como solventes de desarrollo se emplearon un buffer acetato de amonio 1M pH 5,16 y 10% V/V de acetonitrilo, como solvente A, y una solución de 10% V/V de acetonitrilo en metanol, como solvente B. El programa utilizado para la separación de los isómeros en las muestras se describe en la [Tabla III.2](#); los gradientes de elución son lineales.

Tiempo (minutos)	V/V de solvente B (%)	V/V de solvente A (%)
1,00	10	90
13,00	35	65
14,00	10	90
15,00	10	90
15,01	Stop	Stop

[Tabla III.2](#): Programa utilizado para separación de isómeros por HPLC

La velocidad de flujo para la corrida se fijo en 1ml/minuto y las longitudes de onda de excitación y emisión para el detector fluorométrico se fijaron en 404 nm y 618 nm, respectivamente.

III.1.4 Cuantificación de URO I en el blanco de PBG

Para determinar los moles de HMB producidos por la enzima PBG-D durante la reacción de medición de la actividad de URO III-S, se determinaron el número de moles de URO I (producto de la ciclación espontánea, no enzimática del HMB) producidos en el transcurso de dicha reacción en las blancos de PBG. Para este fin se midió, mediante un espectrofotómetro, la absorbancia de dicha muestra a 3 longitudes de onda distintas: $\lambda = 380 \text{ nm}$, 406 nm y 430 nm .

III.1.5 Cuantificación de proteínas en glóbulos rojos utilizando el método de Lowry

A partir de las diluciones 1:20 de glóbulos rojos de pacientes y controles realizadas para la determinación de actividad enzimáticas (punto III.1.2) se hicieron diluciones 1:3000 en H₂O destilada para cuantificar proteínas totales en dichas muestras.

Luego, se prepararon 50 ml de reactivo de Lowry mezclando 50 ml de Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1N con 0,5 ml de tartrato de sodio y potasio 1% y 0,5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5%. Además, se realizó una dilución 1:2 en H_2O destilada del reactivo de Folin stock, cuyo factor había sido determinado previamente.

La cuantificación de las proteínas en las muestras se realizó mediante la medición de la absorbancia a 660 nm de las muestras tratadas según el protocolo de reacción que se muestra en la [Tabla III.3](#).

	Blanco	Muestras
Dilución de GR 1:4000	-----	0,4ml
Reactivo de Lowry	0,2 ml	0,2 ml
H₂O destilada	0,4 ml	-----
Preincubación	10 ´	10 ´
Reactivo de Folin	0,2 ml	0,2 ml
Incubación	30 ´	30 ´

[Tabla III.3:](#) Protocolo para cuantificación de proteínas por el método de Lowry

III.2 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE LOS ISÓMEROS URO I Y URO III EN ORINA DE PACIENTES CON PCE POR RP-HPLC

Para la de los isómeros URO I Y URO III se trató 1 ml de orina de los pacientes con 40 μl de HCl concentrado. Luego de agitar las muestras mediante un vortex, se procedió a centrifugarlas por 10 minutos a 11000 g. El sobrenadante, fue analizado por RP-HPLC, según el protocolo descrito en el inciso III.1.3.

III.3 INHIBICIÓN DE LA ENZIMA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE HIERRO

Para el ensayo de inhibición de la actividad de la enzima URO III-S *in vitro*, se utilizó el protocolo de ensayo acoplado desarrollado para medición de la actividad de dicha enzima con modificaciones basadas en la técnica aplicada por J.P.Kushner y col (Kushner *et al.*, 1972) para el estudio de la inhibición de URO III-S hepática en pacientes PCT.

III.3.1 Inhibición de la enzima URO III- sintetasa por hierro

Para la determinación de la inhibición de la enzima URO III-S por hierro inicialmente se procedió a la ruptura de una muestra de glóbulos rojos de un control normal mediante congelamiento y descongelamiento rápido. Una vez realizado esto, se realizó una dilución 1:20 de los glóbulos rojos lisados en buffer Tris- HCl 0,1M pH8, EDTA 1mM y Tween 1%; esta muestra será la que utilice como fuente de URO III-S.

A continuación, las muestras se preincubaban en baño de agua durante 15 minutos a 37°C según el sistema que se muestra en la [Tabla III.4](#).

	PBG-D (μl)	Dilucion 1:20 de GR (μl)	Tris-HCl 0,1 M pH8 (μl)	Concentración inicial de Fe^{+2}	Volumen de Fe^{+2} (μl)	Concentración final de Fe^{+2}	Cisteina 804mM (μl)
Blanco de Deaminasa	250	-----	25	-----	-----	-----	-----
Blanco de Fe^{+2}	250	-----	20	36mM	2,5	0,3mM	2,5
Blanco de Uro III-S	250	5	20	-----	-----	-----	-----
Muestra 1	250	5	15	9mM	2,5	0,075mM	2,5
Muestra 2	250	5	15	18mM	2,5	0,15mM	2,5
Muestra 3	250	5	15	36mM	2,5	0,3mM	2,5
Muestra 4	250	5	15	54mM	2,5	0,45mM	2,5
Muestra 5	250	5	15	72mM	2,5	0,6mM	2,5
Muestra 6	250	5	15	108mM	2,5	0,9mM	2,5
Muestra 7	250	5	15	144mM	2,5	1,2mM	2,5

[Tabla III.4:](#) Sistema de preincubación para protocolo de inhibición por hierro. [$\text{Fe}^{2+}:(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

Transcurrido el tiempo de preincubación, se agrega a cada muestra 25 µl de PBG 3,4 mM y se incuba en baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Luego de este tiempo, se corta la reacción incorporando 200 µl de TCA 10% en cada tubo. Finalmente, las muestras se centrifugan durante 20 minutos a 4000 g, y el sobrenadante se pasa a eppendorf de 1,5 ml limpio para ser analizado posteriormente por RP-HPLC según el protocolo descrito en el punto III.1.3.

IV. Referencias

Kushner, J.P.; Lee, G.R.; Nacht, S. *The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda* (1972) *The Journal of Clinical Investigation* **51**: 3044.

Lim, C.K.; Rideout, J.M.; Wright, D.J. *High-performance liquid chromatography of naturally occurring 8-, 7-, 6-, 5- and 4-carboxylic porphyrin isomers.* (1983) *J. Chromatogr.* **282**: 629.

Shady, A.A.; Colby, B.R.; Cunha, L.F.; Astrin, K.H.; Bishop, D.F.; Desnick, R.J. *Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of eight novel mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene.* (2002) *Br. J. Haematol.* **117(4)**: 980.

Shaw, P.H.; Mancini, A.J.; McConnell, J.P.; Brown, D.; Kletzel, M. *Treatment of congenital erythropoietic porphyria in children by allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literatura.* (2001) *Bone Marrow Transplantation.* **27**: 101.

Tezcan, I.; Xu, W.; Gurgey, A.; Tuncer, M.; Cetin, M.; Öner, C.; Yetgin, S.; Ersoy, F.; Aizencang, G.; Astrin, K.H.; Desnick, R.J. *Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation.* (1998) *Blood.* **92**: 4053.

Tsai, S.F.; Bishop, D.F.; Desnick, R.J. *Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from human erythrocytes.* (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 1.268.

Resultados

I. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

I.1 PROMOTOR ERITROIDE

Para el fragmento promotor eritroide (560 pb), debido a la temperatura de fusión del par de cebadores se decidió ensayar inicialmente el Protocolo I.1, para el cual la temperatura de annealing es de 50°C, el volumen final fue de 50 µl y contiene una concentración final 1X de *buffer de reacción*, 1 µl de dNTPs 200 µM y 0,5 µl Taq polimerasa. El número de ciclos de amplificación fue de 35.

	Mg ⁺² (µl)	ADN (µl)	Mix de primer 10 mM (1 µl)	dNTPs 200µM (µl)	Annealing	Extensión
Calle 1	Marker	100pb				
Calle 2	2	5	PrErFw + PrErRv	1	1'a 50°C	30" a 72°C

Protocolo I.1: Amplificación del fragmento promotor eritroide

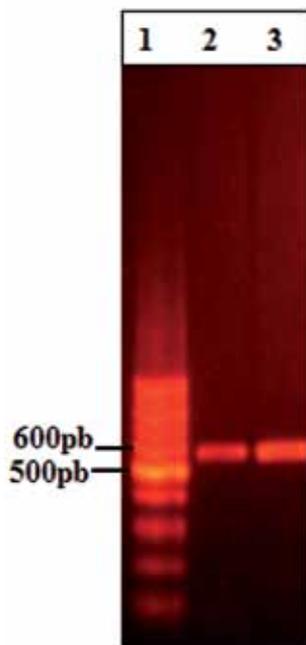


Figura I.1: Amplificación del fragmento Promotor eritroide (Calle 1: Marker 100pb; Calles 2 y 3: amplificación del fragmento promotor eritroide)

Como se observa en la [Figura I.1](#), este protocolo permitió obtener un producto de amplificación de buena intensidad y sin productos inespecíficos, que permitió su empleo para la secuenciación automática del fragmento.

I.2 EXONES

Debido a que las temperaturas de annealing de los pares de primers eran muy similares se decidió ensayar inicialmente el mismo protocolo ([Protocolo I.2](#)) para todos los exones; en todos los casos el volumen final fue de 50 μ l y los sistemas de amplificación contenían una concentración final 1X de *buffer de reacción*, 1 μ l de dNTPs (200 μ M) y 0,5 μ l Taq polimerasa. Además para todos los exones se utilizó un tiempo de extensión de 30 segundos y 35 ciclos de amplificación.

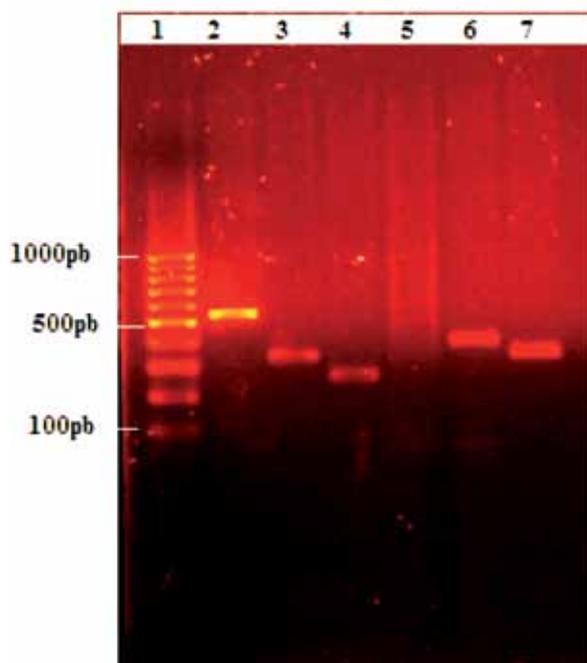


Figura I.2: Amplificación de los fragmentos 2-3, 5, 6, 7, 8 y 9

Protocolo IV.2	Mg ²⁺ (μl)	ADN (μl)	Mix de primer 10 mM (1 μl)	Annealing	Exón	Tamaño del fragmento
Calle 1	Marker	100pb				
Calle 2	2	5	UROSFw2-3+ UROSRv2-3	1'a 50°C	2-3	540 pb
Calle 3	2	5	UROSFw 5+ UROSRv 5	1'a 50°C	5	338 pb
Calle 4	2	5	UROSFw 6 + UROSRv 6	1'a 50°C	6	267 pb
Calle 5	2	5	UROSFw 7 + UROSRv 7	1'a 50°C	7	303 pb
Calle 6	2	5	UROSFw 8 + UROSRv 8	1'a 50°C	8	390 pb
Calle 7	2	5	UROSFw 9 + UROSRv 9	1'a 50°C	9	346 pb

Protocolo I.2: Amplificación de los fragmentos 2-3, 5, 6, 7, 8 y 9.

Como se aprecia en la [Figura I.2](#), se logró una amplificación satisfactoria para los fragmentos 2-3, 5, 6, 8 y 9, es decir, sin productos inespecíficos y con un rendimiento que posibilita la secuenciación automática de dichos fragmentos, pero no se obtuvo producto de amplificación para el fragmento 7. Con este resultado, se resolvió utilizar el [Protocolo I.2](#) para la amplificación de los exones 2, 3, 5, 6, 8 y 9, y ensayar nuevos protocolos para la amplificación del el exón 7.

Para el exón 7 fue necesario ensayar diversos protocolos. Inicialmente, se probó modificando el annealing ([Protocolo I.3](#), [Tabla I.1](#); [Figura I.3](#), [calle 2](#)). Luego, ya que la concentración de magnesio en el medio de reacción afecta tanto la actividad de la Taq polimerasa como la temperatura de annealing de los cebadores, se realizó una curva de concentración de este compuesto aumentando la cantidad de ADN, con el fin de determinar a qué concentración de magnesio se obtenía el mejor rendimiento de la reacción ([Protocolo I.4](#), [Tabla I.1](#); [Figura I.3](#), [calles 3, 4 y 5](#)). Además, como el DMSO ayuda al anealing de los cebadores y a la elongación de las regiones del ADN que presentan estructuras secundarias, se ensayó una curva de magnesio con una concentración fija de DMSO ([Protocolo I.5](#), [Tabla I.1](#); [Figura I.3](#), [calles 6,7 y 8](#)).

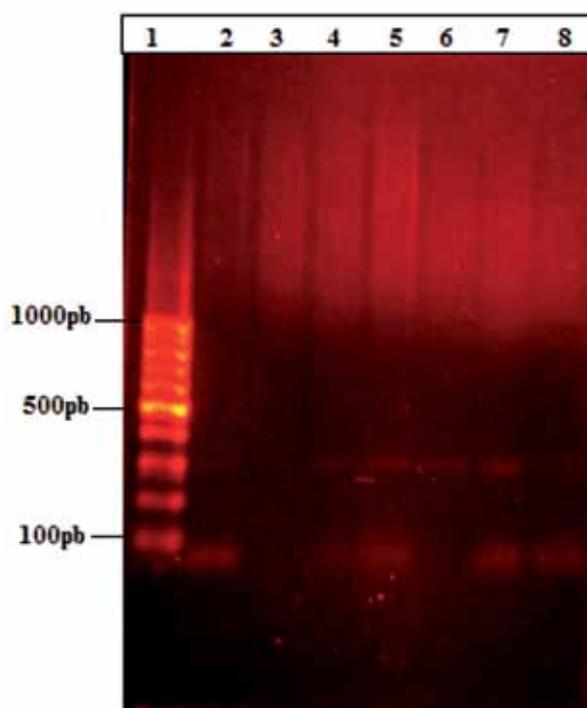


Figura I.3: Amplificación del exón 7

Protocolo IV N°	N° de Calle	Mg ⁺² (μl)	DMSO (μl)	ADN (μl)	Mix UROSFw7 / Rv7 10 mM (μl)	Annealing
	Calle 1	Marker	100pb			
3	Calle 2	2	...	5	1	1'a 55°C
4	Calle 3	1	...	10	1	1'a 55°C
4	Calle 4	2	...	10	1	1'a 55°C
4	Calle 5	3	...	10	1	1'a 55°C
5	Calle 6	1	2,5	5	1	1'a 55°C
5	Calle 7	2	2,5	5	1	1'a 55°C
5	Calle 8	3	2,5	5	1	1'a 55°C

Tabla I.1: Protocolos de amplificación del exón 7.

Posteriormente, se ensayaron tres concentraciones fijas de magnesio distintas concentraciones de DMSO (Protocolo I.6, Tabla I.2 y Tabla I.3; Figura I.4 y Figura I.5, calles 2,3 y 4).

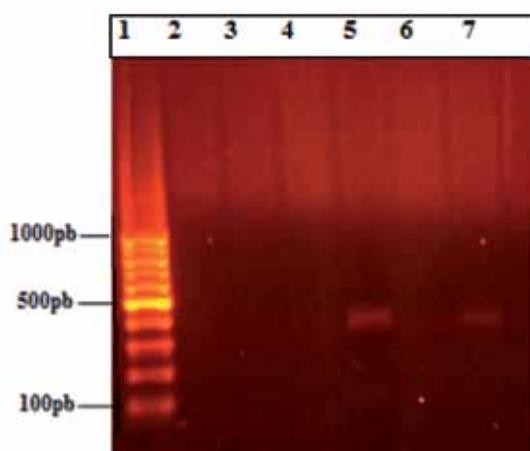


Figura I.4: Amplificación del exón

Protocolo IV N°	N° de Calle	Mg ⁺² (μl)	DMSO (μl)	ADN (μl)	Mix UROSFw7 / Rv7 10 mM (μl)	Annealing
	Calle 1	Marker	100pb			
6	Calle 2	0,5	2	5	1	1'a 55°C
6	Calle 3	0,5	2,5	5	1	1'a 55°C
6	Calle 4	0,5	3	5	1	1'a 55°C
6	Calle 5	1	2	5	1	1'a 55°C
6	Calle 6	1	2,5	5	1	1'a 55°C
6	Calle 7	1	3	5	1	1'a 55°C

Tabla I.2: Protocolos de amplificación del exón 7.

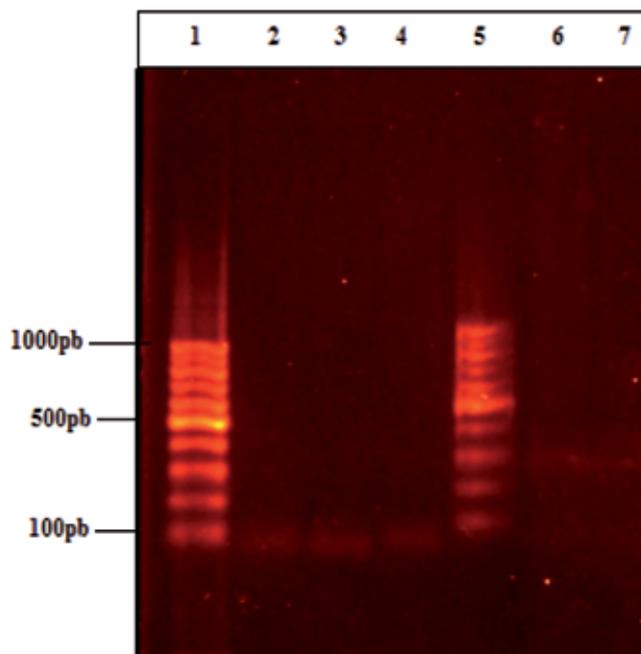


Figura I.5: Amplificación del exón 7

Protocolo IV N°	N° de Calle	Mg ⁺² (µl)	DMSO (µl)	ADN (µl)	Mix UROSFw7 / Rv7 10 mM (µl)	Annealing
	Calle 1	Marker	100pb			
6	Calle 2	2	2	5	1	1'a 55°C
6	Calle 3	2	2,5	5	1	1'a 55°C
6	Calle 4	2	3	5	1	1'a 55°C
	Calle 5	Marker	100pb			
7	Calle 6	1	2	5	1	1'a 54°C
7	Calle 7	1	2	5	1	1'a 56°C

Tabla I.3: Protocolos de amplificación del exón 7.

Finalmente, empleando las concentraciones más convenientes de magnesio y DMSO determinadas (Protocolo I.7, Tabla I.3; Figura I.5, calles 6 y 7) se varió la temperatura de annealing, con el fin de mejorar el rendimiento de la amplificación.

Dado que ninguno de los protocolos ensayados previamente permitieron obtener un producto de reacción que posibilite su secuenciación, se decidió utilizar como aditivo solución enhancer provista por el kit Platinum® Pfx, de composición no especificada por el fabricante (Protocolo I.8, Tabla I.4; Figura I.6).

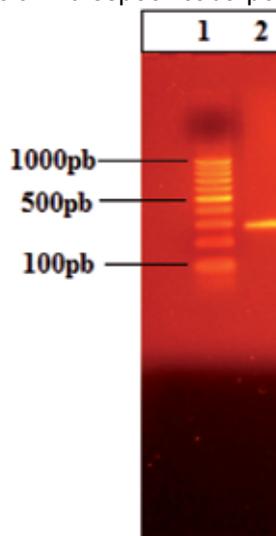


Figura I.6: Amplificación del exón 7

Protocolo IV N°	N° de Calle	Mg ⁺² (μl)	Enhancer solution Platinum® Pfx (μl)	ADN (μl)	Mix UROS-Fw7 / Rv7 10 mM (μl)	Annealing
	Calle 1	Marker	100pb			
8	Calle 2	2	5	7	1,5	1'a 55°C

Tabla I.4: Protocolo de amplificación del exón 7.

Como se observa en la [Figura I.6](#), la utilización del [Protocolo I.8](#) genero un muy buen rendimiento de reacción y, por ende, es el óptimo para la amplificación y posterior secuenciación del exón 7.

II. Paciente LTO y familia

II.1 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE LOS ISÓMEROS URO I Y URO III EN ORINA POR RP-HPLC:

Se corrieron por RP-HPLC las muestras de orina de 24 horas de los pacientes y de un control normal. Para LTO, se analizaron dos muestras, una del año 2007 y otra del año 2009, 2 y 4 años post- transplante, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las [Figuras II.1 a 3](#).

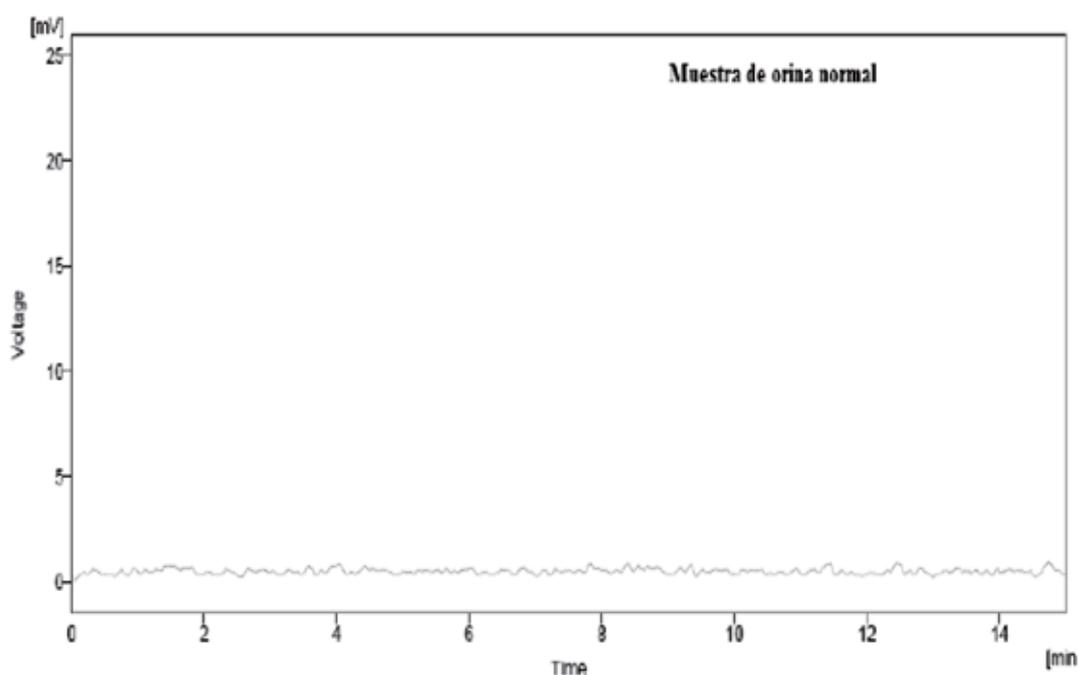


Figura II.1: Cromatograma de orina de individuo normal

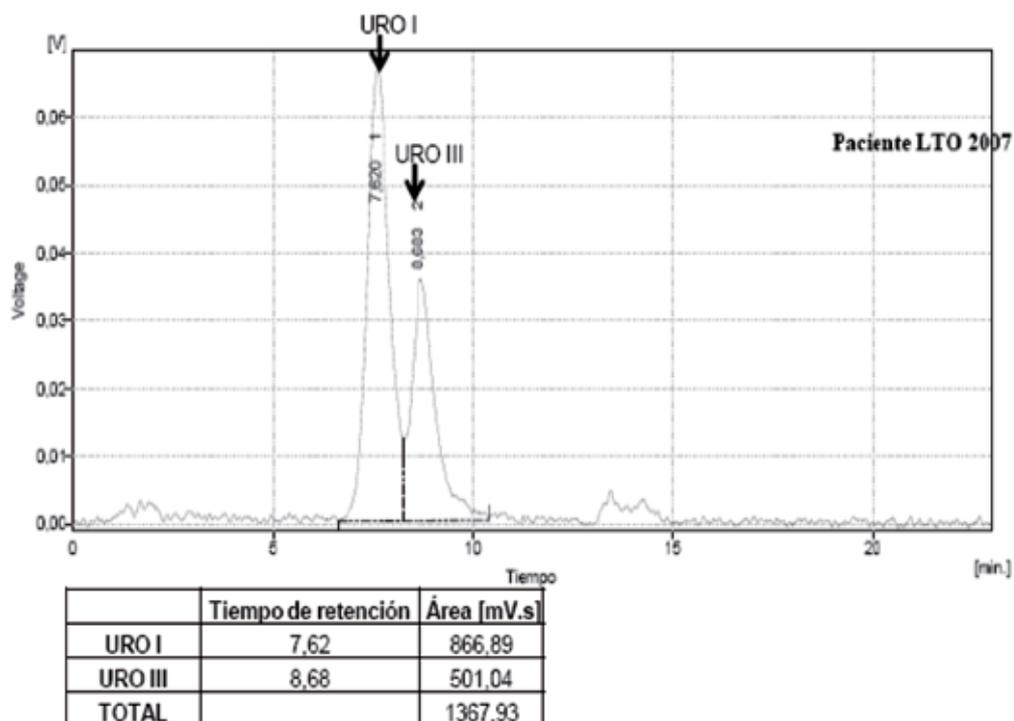


Figura II.2: Cromatograma de orina del paciente LTO 2007

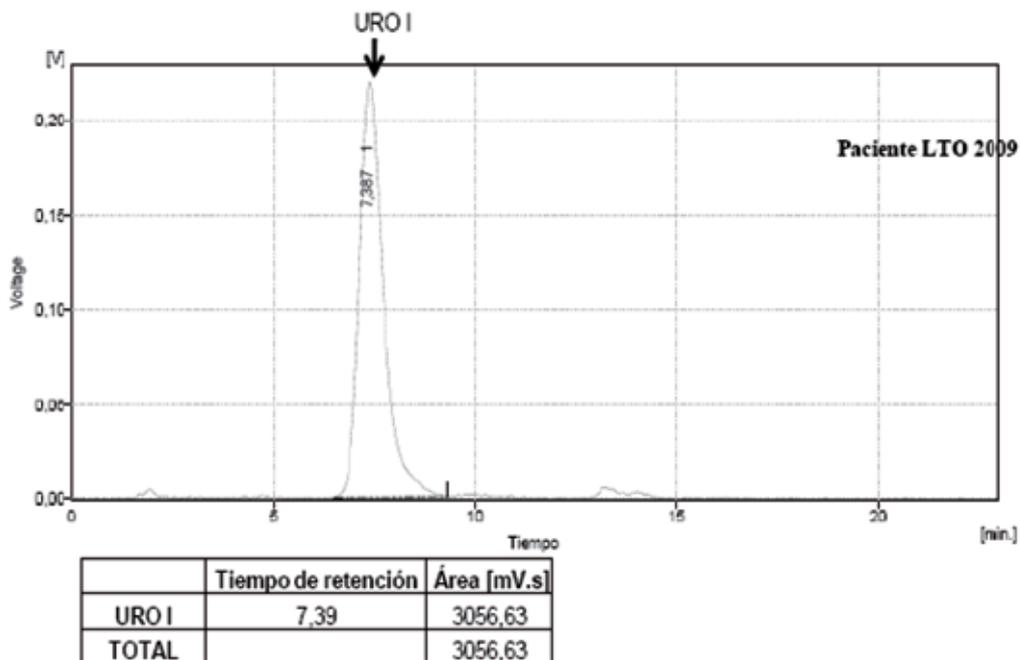


Figura II.3: Cromatograma de orina del paciente LTO 2009

La determinación de los isómeros URO I y URO III en orina de un individuo control, demuestra que en condiciones fisiológicas estos compuestos no se excretan.

Para el paciente LTO, la muestra del año 2007 muestra la presencia de ambos isómeros, lo cual no corresponde al perfil de excreción esperado para un paciente PCE. En cambio, el análisis de la muestra del año 2009 muestra la excreción de exclusivamente URO I, lo cual es esperable para un paciente PCE.

II.2 ACTIVIDAD DE UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

Los cromatogramas obtenidos de la separación de isómeros URO I y URO III por RP-HPLC en las muestras resultantes de la aplicación del protocolo de medición de la actividad de la enzima URO III-sintetasa (ítem III.1.2, de MATERIALES Y MÉTODOS) se muestran en las Figuras II 4 a 11. A partir de los resultados se calcula la cantidad de enzima necesaria para formar 1nmol de URO III por hora, por ml de glóbulos rojos y por mg/ml de proteína y, además, la actividad enzimática porcentual de la muestra con respecto al control.

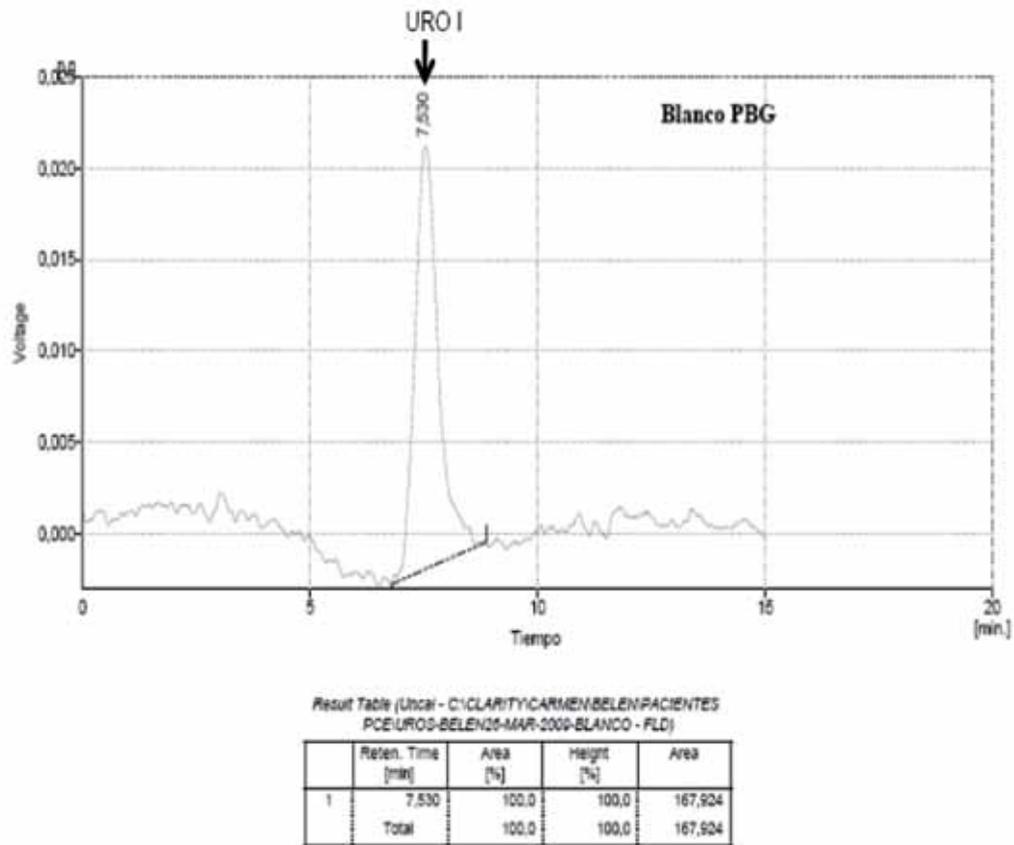


Figura II.4: Cromatograma del Blanco de PBG 1

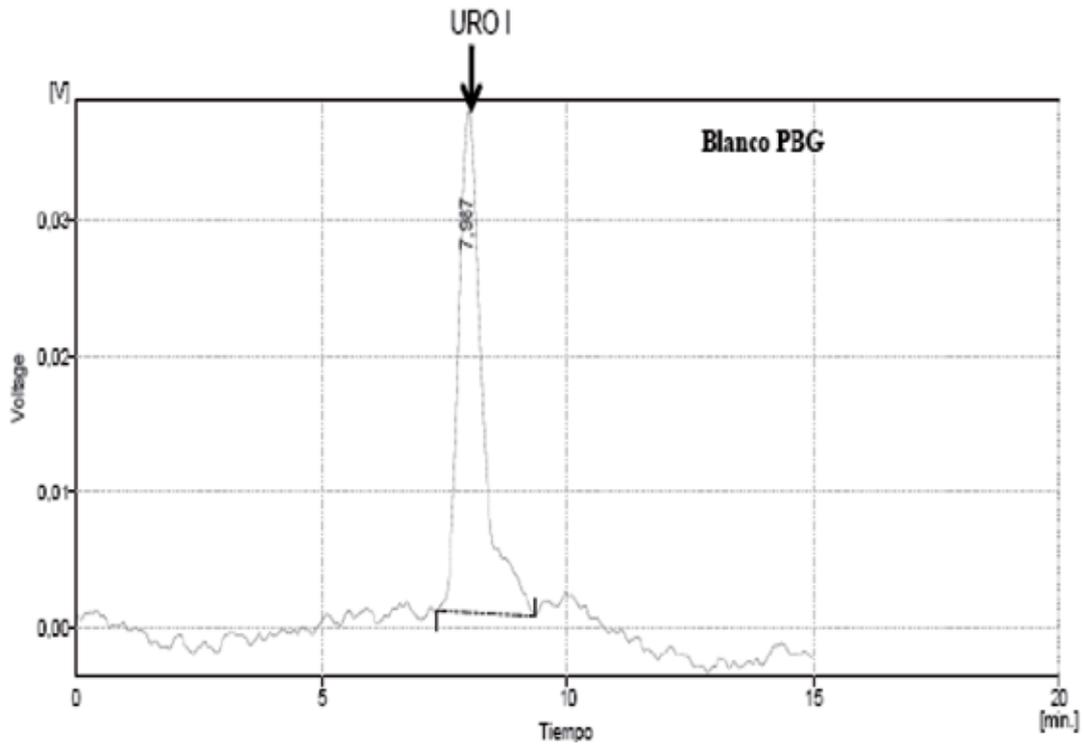
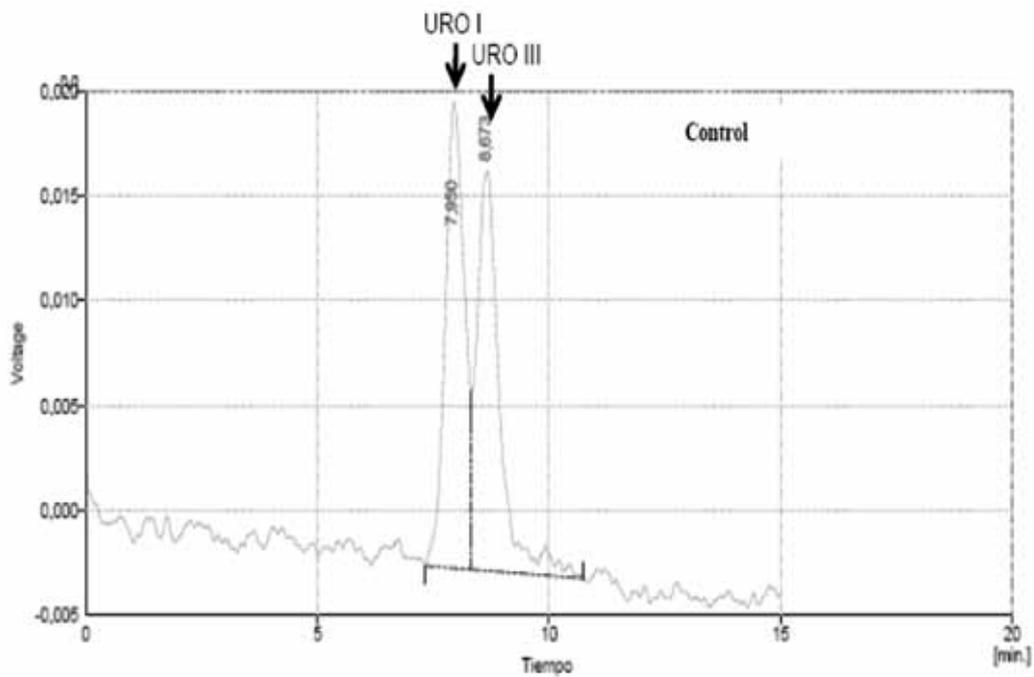


Figura II.5: Cromatograma del Blanco de PBG 2



Result Table (Uncal - C:\CLARITY\CARMENBELEN\PACIENTES
PCEURO-SLEN25-MAR-2009-PMA - FLD)

	Reten. Time [min]	Area [%]	Height [%]	Area
1	7.950	49.3	53.8	128.404
2	8.673	50.7	46.2	131.908
	Total	100.0	100.0	260.332

Figura II.6: Cromatograma del control

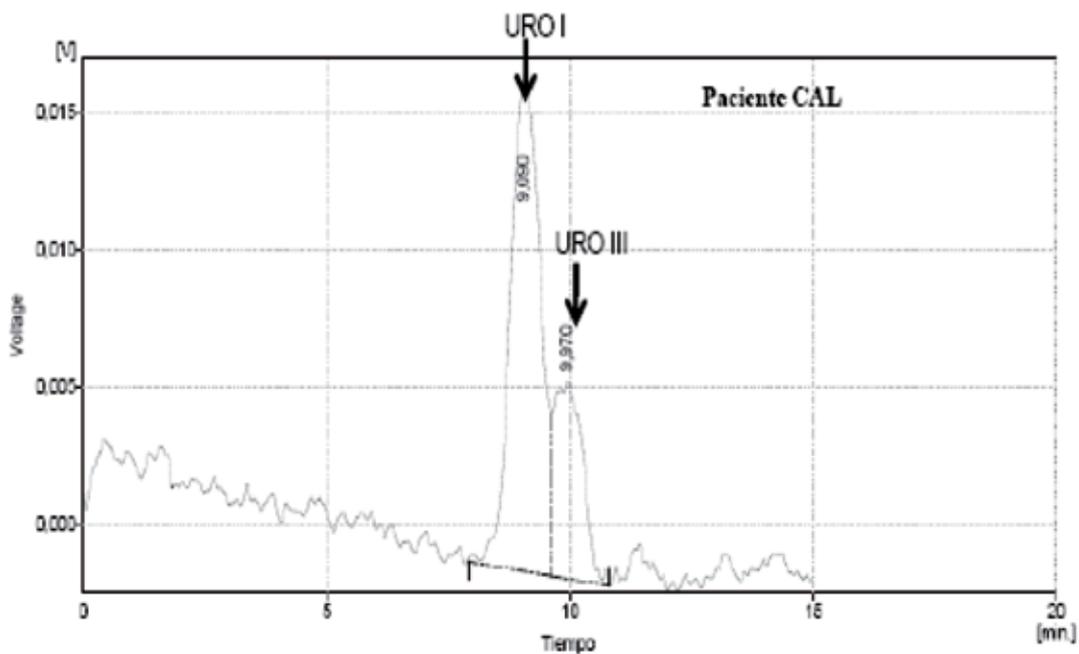
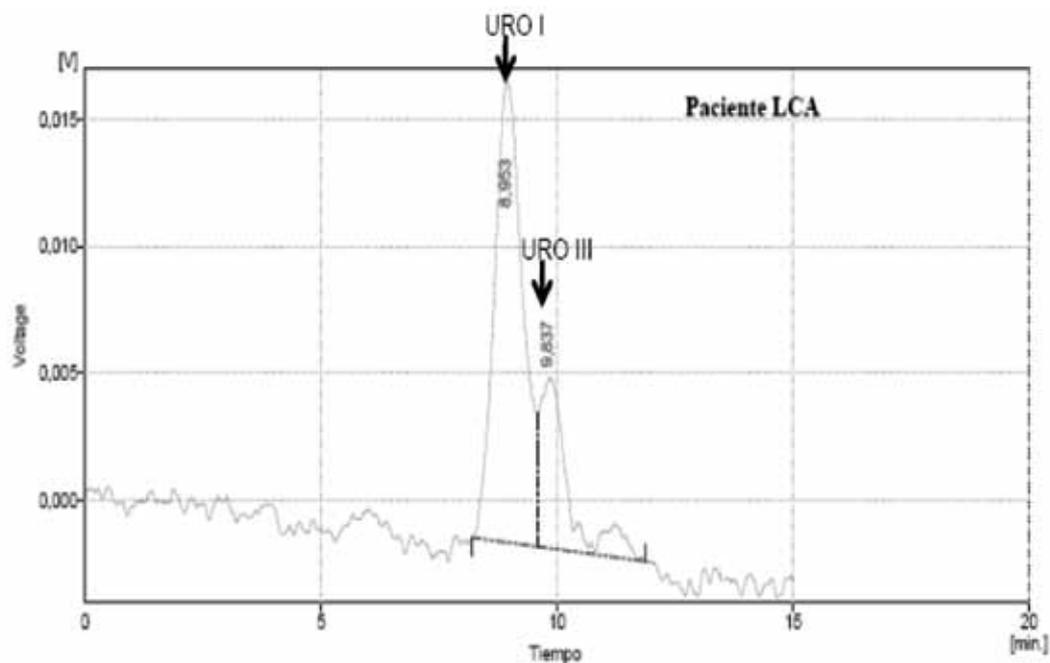


Figura II.7: Cromatograma del paciente CAL (madre)



Result Table (Utical - C:\CLARITY\CARMENBELEN\PACIENTES
PCE\UROS-BELEN\07-ABR-2009-LCA2 - FLD)

	Reten. Time [min]	Area [%]	Height [%]	Area
1	8.953	73.2	72.9	151,814
2	9.837	26.8	27.1	55,448
	Total	100.0	100.0	207,261

Figura II.8: Cromatograma del paciente LCA (hermana)

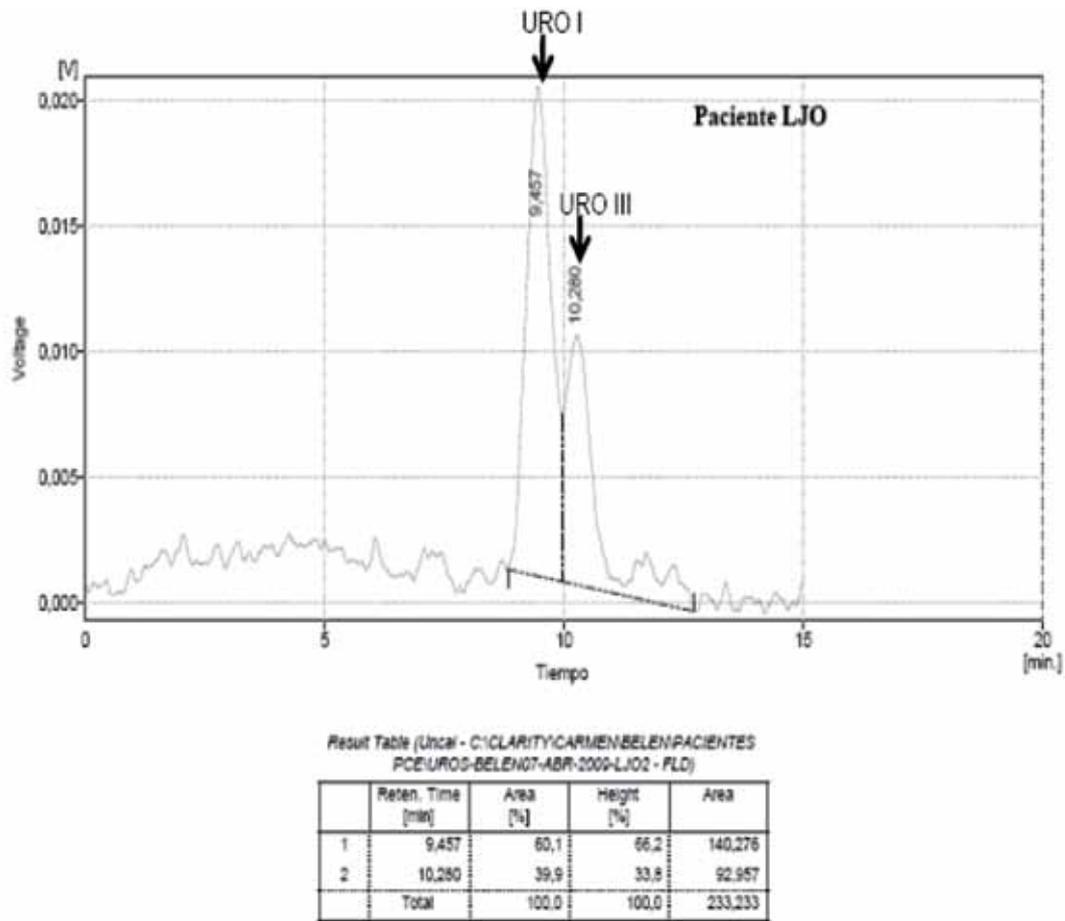


Figura II.9: Cromatograma del paciente LJO (padre)

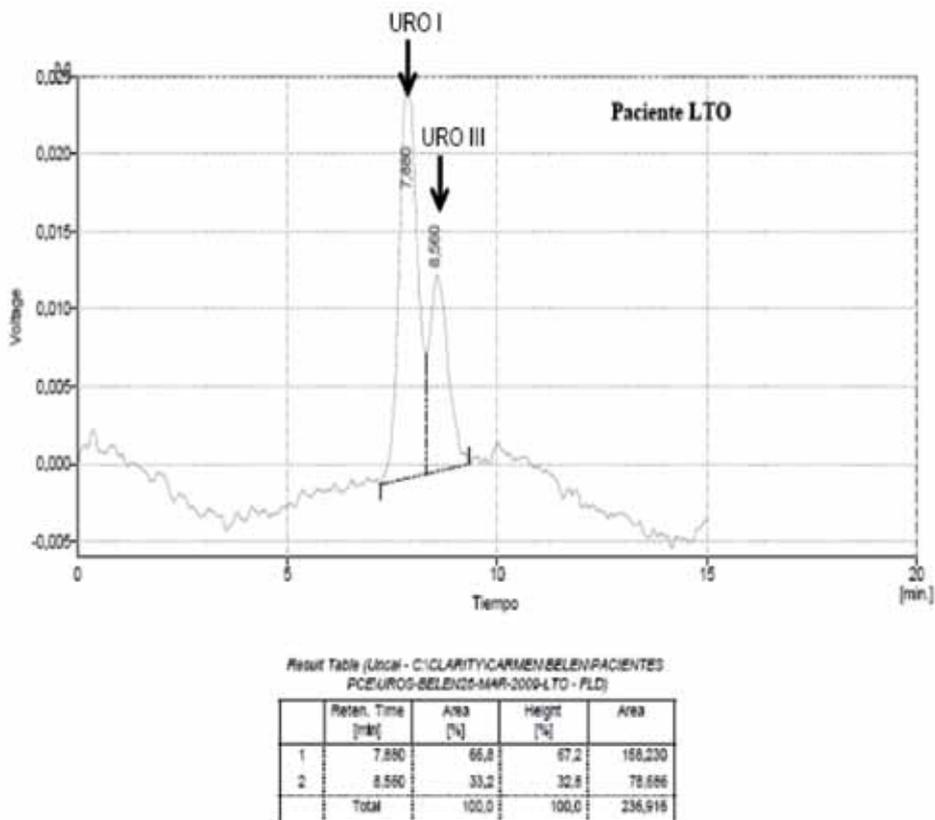
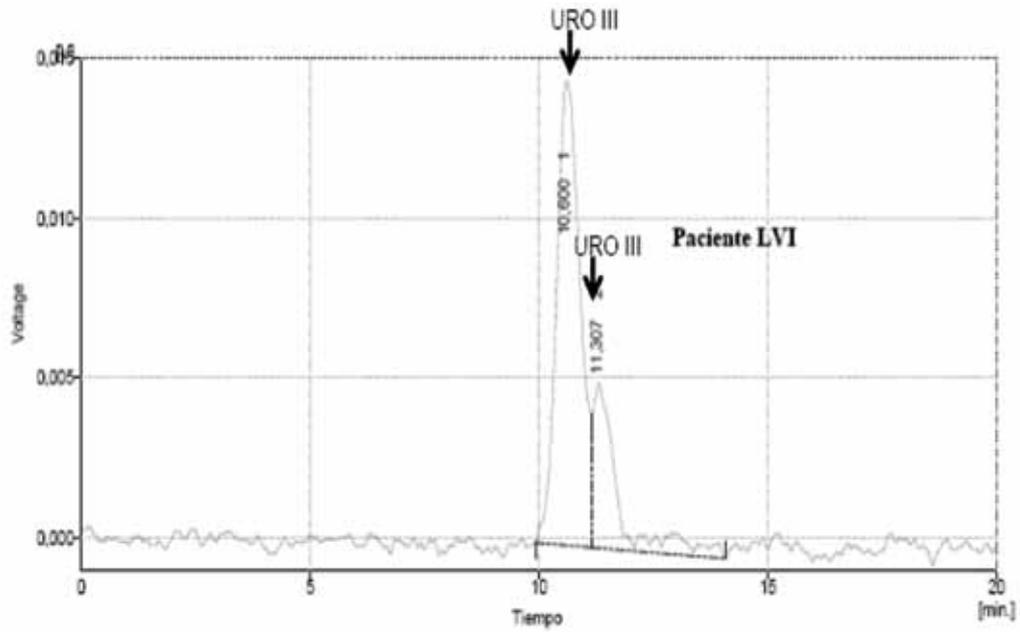


Figura II.10: Cromatograma del paciente LTO (paciente)



Result Table (Uncal - C:\Clarity\Carmen\Beien\Pacientes PCE\UROS-Beien10-May-2009-LV13-5 - FLD)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	WDS [min]	Area
1	10.600	173.649	4.844	72.9	73.9	0.57	173.649
2	11.307	64.657	1.715	27.1	26.1	0.48	64.657
	Total	238.306	6.559	100.0	100.0		238.306

Figura II.11: Cromatograma del paciente LVI (hermano)

En la Tabla II.1 se muestran los valores de UE por ml de glóbulos rojos y el de porcentaje de actividad respecto al control.

INDIVIDUO	PARENTESCO	% de area URO III	mg proteína /ml de GR	UE / mg proteína / ml de GR	%AE
Control	-----	50,7	294,30	3,65	100
CAL	Madre	27,3	304,40	1,97	54
LCA	Hermana	26,8	253,72	2,32	63
LJO	Padre	39,9	302,13	2,91	80
LTO	Paciente	33,2	374,04	1,95	53
LVI	Hermano	27,1	365,56	1,63	45

Tabla II.1: Actividad de la enzima Uro III-S (UE: cantidad de enzima necesaria para formar 1nmol de URO III por hora, por ml de glóbulos rojos y por mg/ml de proteína; %AE: Porcentaje de actividad enzimática respecto al control).

II.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Se realizó la amplificación y purificación de los exones 4 y 10 de del paciente LTO y su familia. Los resultados de se muestran en las Figura II.12 y 13. Los productos de amplificación purificados se enviaron a secuenciar automáticamente.

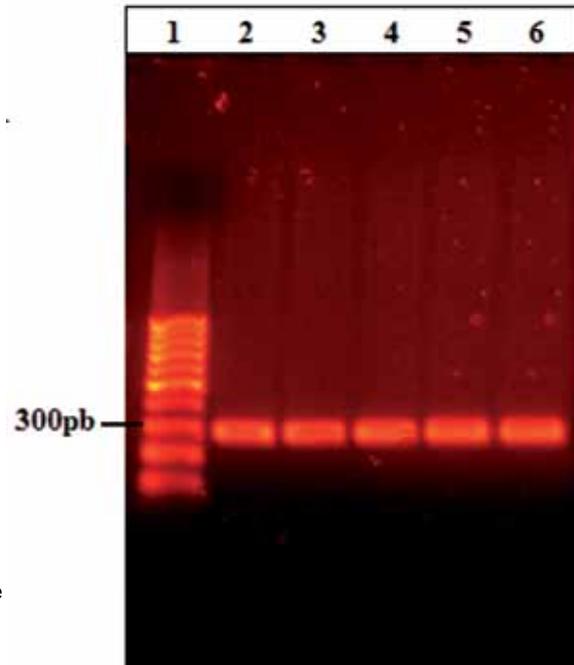


Figura II.12: Amplificación del exón 4 (Calle 1: Marker 100pb; Calle 2: Paciente CAL; Calle 3: Paciente LCA; Calle 4: Paciente LJO; Calle 5: Paciente LTO; Calle 6: Paciente LVI)

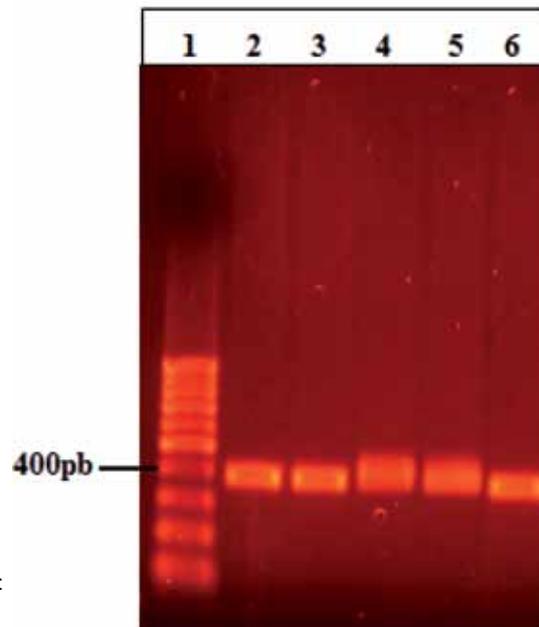


Figura II.13: Amplificación del exón 10 (Calle 1: Marker 100pb; Calle 2: Paciente CAL; Calle 3: Paciente LCA; Calle 4: Paciente LJO; Calle 5: Paciente LTO; Calle 6: Paciente LVI)

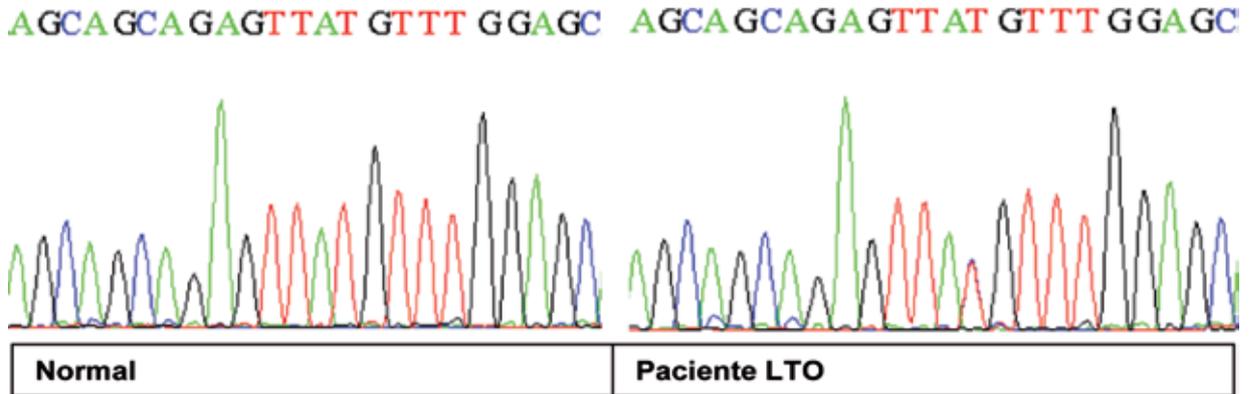


Figura II.14: Secuencia del exón 4 de un individuo normal y del paciente LTO

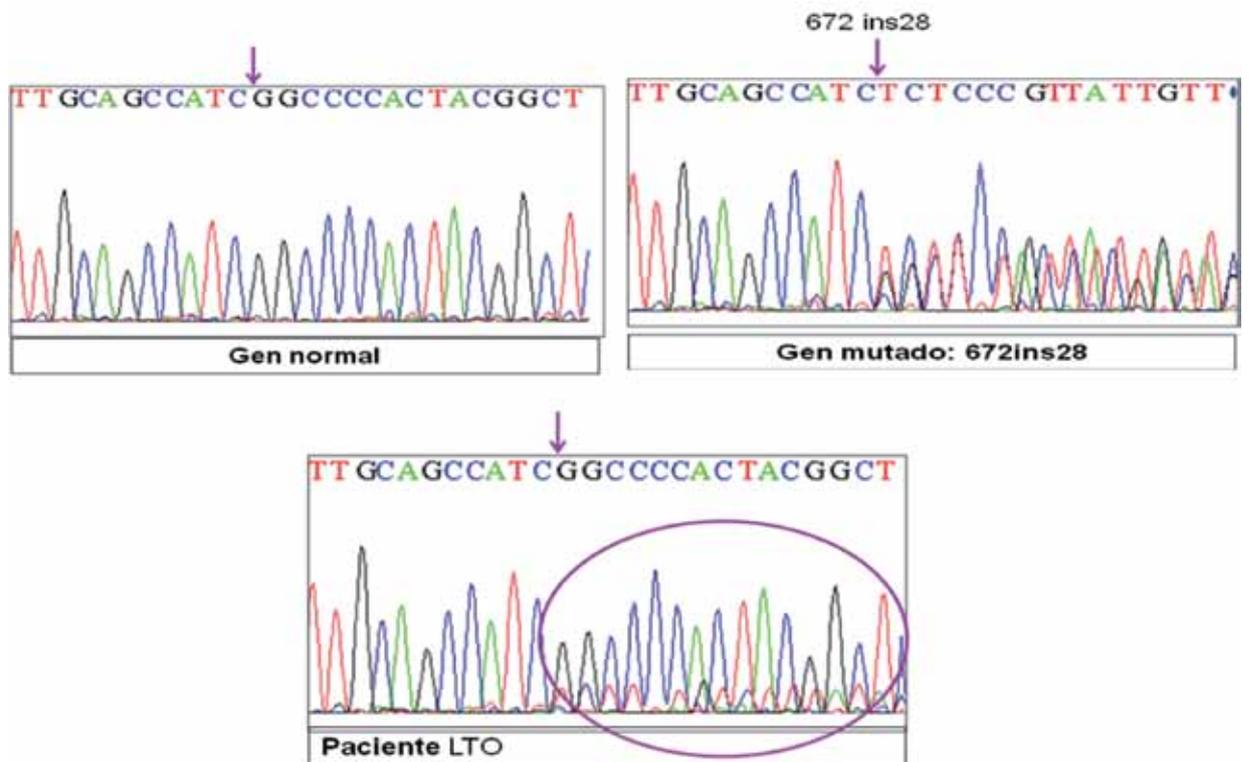
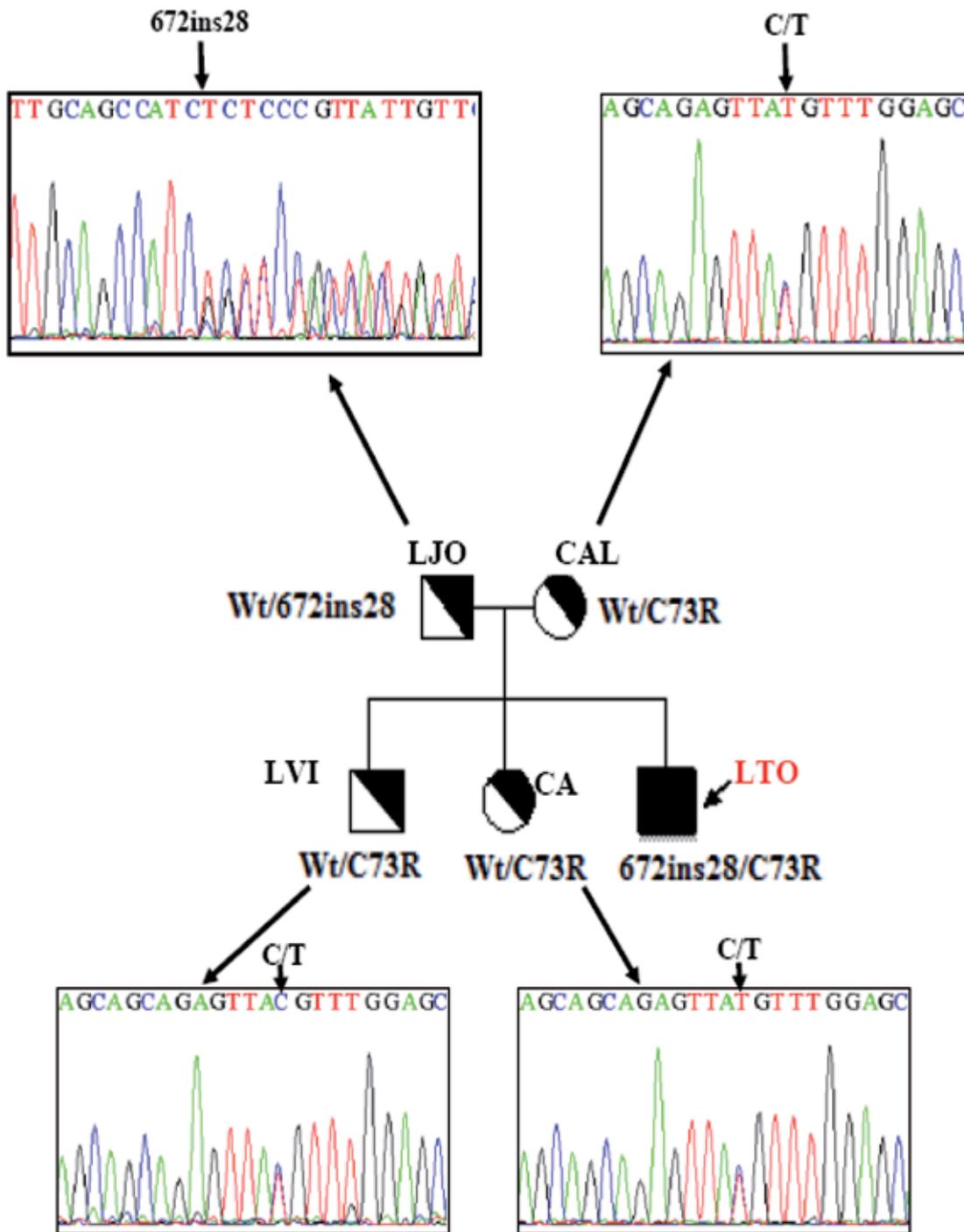


Figura II.15: Secuencia del exón 10 de un individuo normal, paciente portador mutación y del paciente LTO

La secuenciación del ADN del paciente LTO reveló la presencia en el exón 4 de la mutación p.C73R (Figura II.14) y en el exón 10 (Figura II.15) se observa la predominancia del alelo no mutado proveniente de las células del donante y la mutación c.672ins28, de las células del paciente, sugiriendo la presencia de un quimerismo incompleto. Sin embargo, resultó inesperado encontrar la mutación p.C73R en el paciente transplantado en una proporción aproximada del 50%

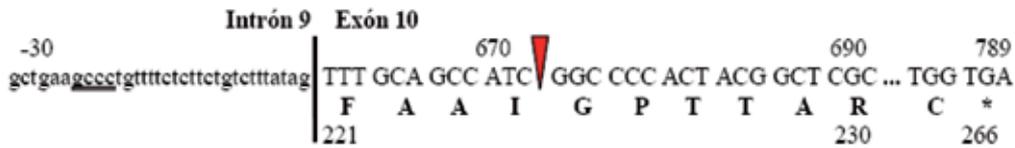
Como se muestra en el Esquema II.1, la secuenciación del ADN de la familia del paciente LTO reveló que tanto la madre como los dos hermanos son portadores de la mutación p.C73R, mientras que el padre es portador de la mutación c.672ins28.



Esquema II.1: Secuenciación y genealogía de la mutación la familia del paciente LTO.

El resultado de la secuenciación del exón 4 del paciente LTO, puede ahora justificarse considerando que su hermana, quien fuera la donante para el trasplante de médula ósea, es portadora de la mutación p.C73R.

El Esquema II.2 muestra como la inserción en el exón 10 modifica el marco de lectura para la proteína, afectando así la funcionalidad e la misma.

672ins28**Gen normal****Gen mutado**

Esquema II.2: Secuencia de nucleótidos normal y mutada, y la secuencia de aminoácido predecida para la mutación c.672ins 28.

III. PACIENTE GST**III.1 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXCRECIÓN DE LOS ISÓMEROS URO I Y URO III EN ORINA POR RP-HPLC**

Se corrieron por RP-HPLC las muestras de orina de 24 horas de la paciente GST del año 2009 y de un control normal. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras III.1 y 2.

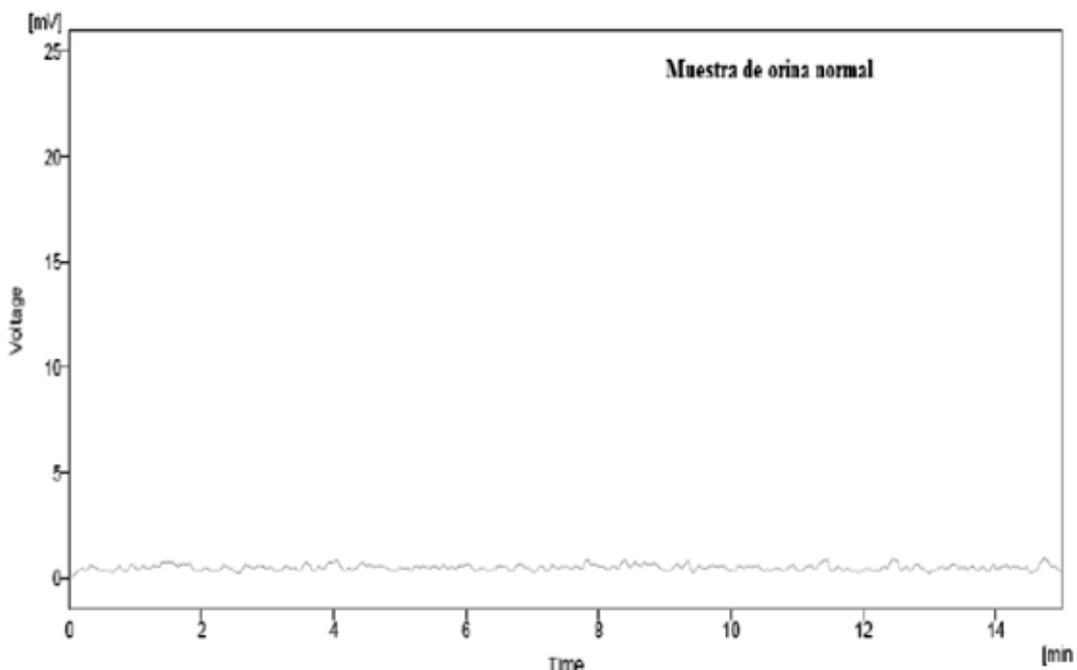


Figura III.1: Cromatograma de orina de individuo normal

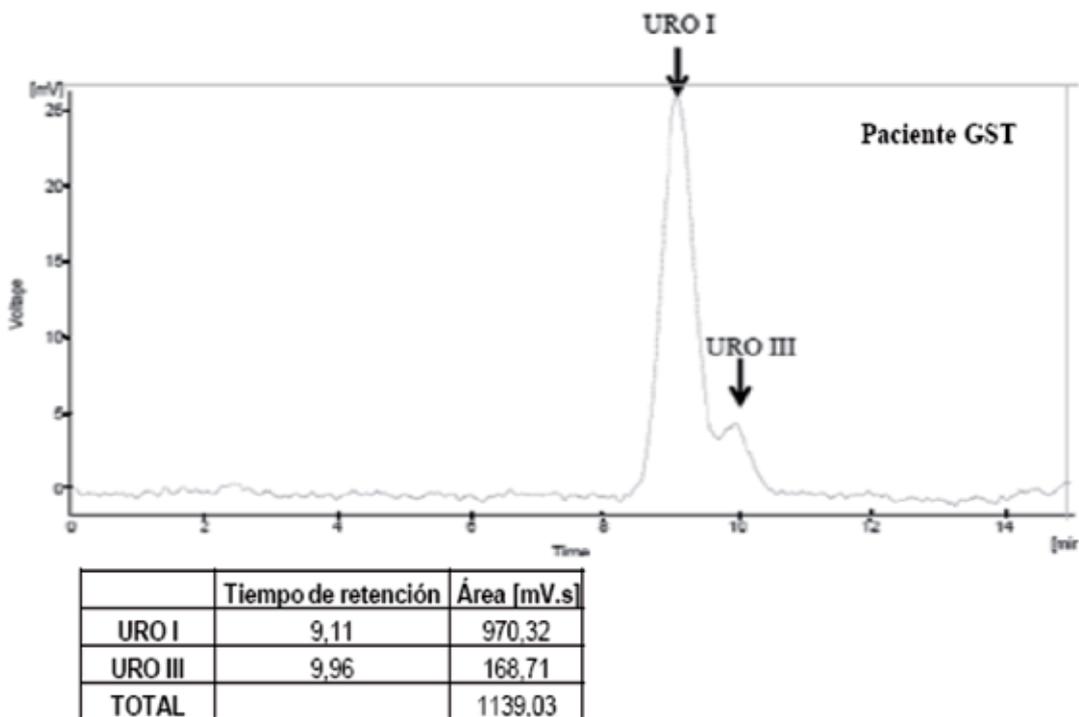


Figura III.2: Cromatograma de orina del paciente GST

Para la paciente GST, el análisis de isómeros en orina muestra la excreción de ambos isómeros, pero predominantemente URO I.

III.2 ACTIVIDAD DE UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

Para la paciente GST se analizaron dos muestras de glóbulos rojos, de diferentes años, con sus correspondientes controles. Los cromatogramas obtenidos de la separación de isómeros URO I y URO III por RP-HPLC en las muestras se muestran en las Figuras III. 3 a 6.

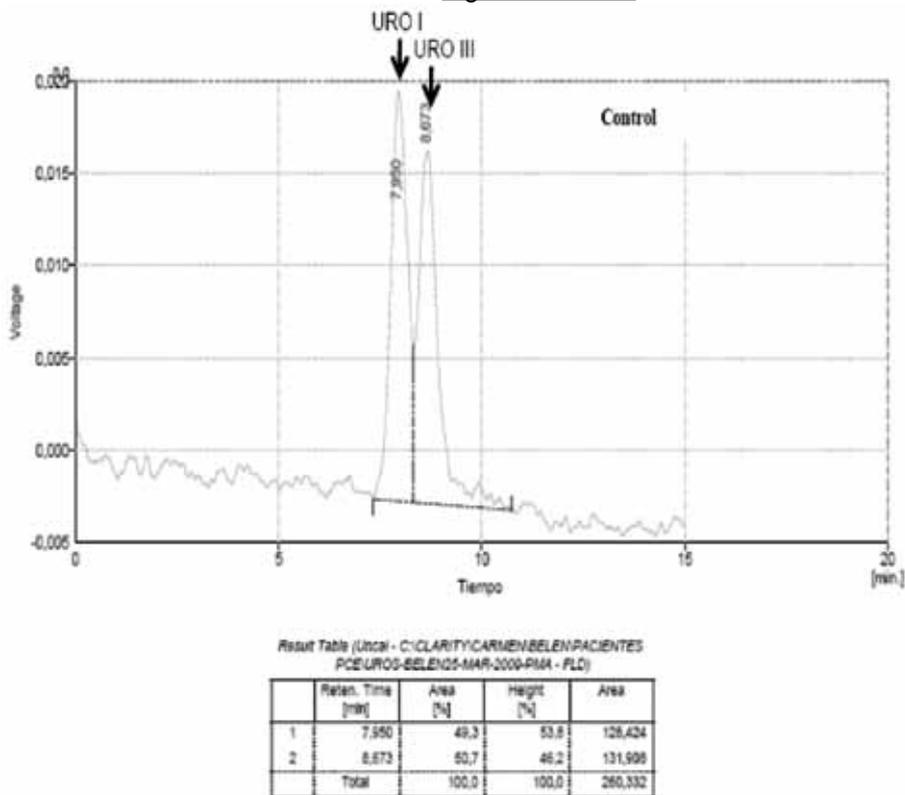


Figura III.3: Cromatograma del control 2009

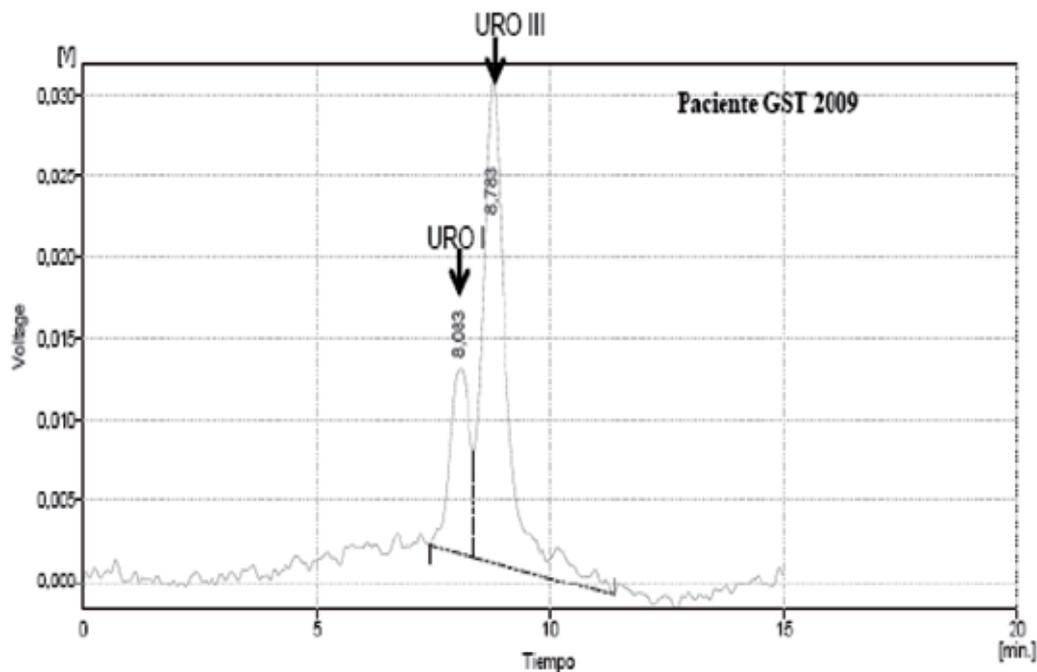


Figura III.4: Cromatograma de la paciente GST 2009

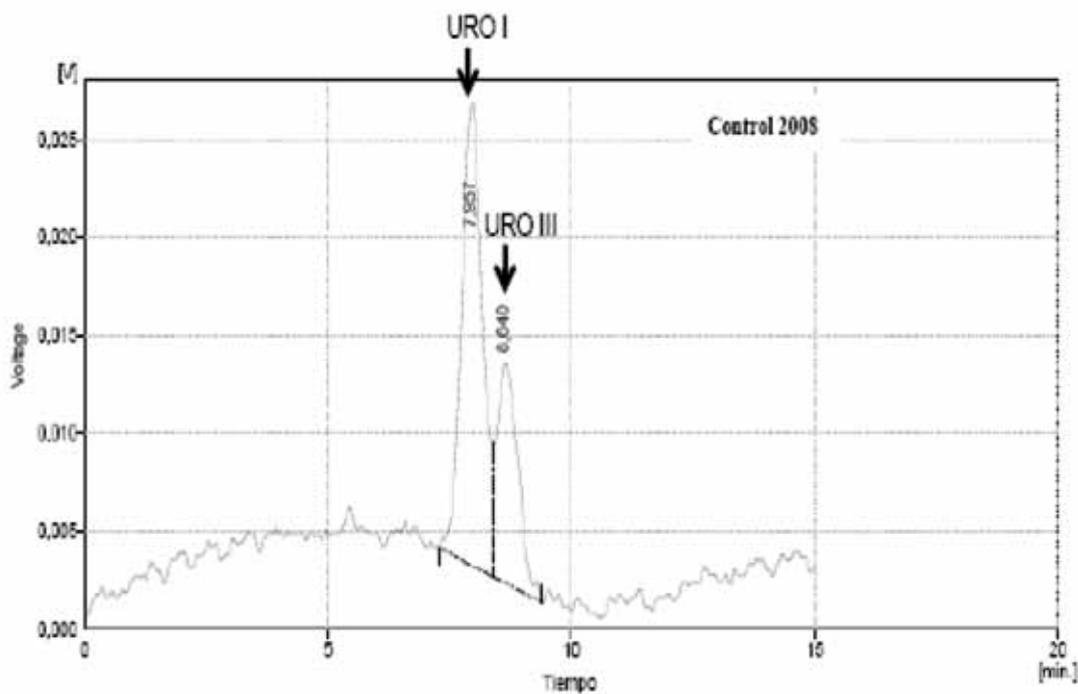


Figura III.5: Cromatograma del control 2008

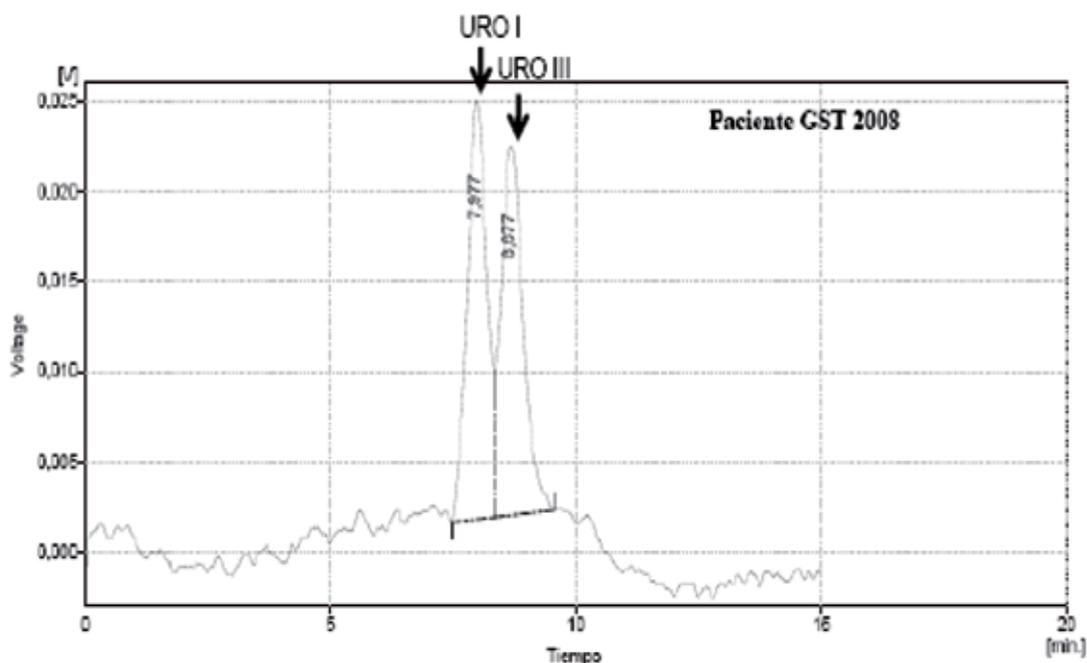


Figura III.6: Cromatograma de la paciente GST 2008

La [Tabla III.1](#) muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de proteínas de las muestras, los valores de unidades enzimáticas por ml de glóbulos rojos y las actividades enzimáticas porcentuales respecto del control hallados para la paciente GST.

PACIENTES	% de area URO III	mg proteína /ml de GR	UE / mg proteína / mlde GR	%AE
Control 2009	50,7	294,30	3,65	100
GST 2009	76,3	325,00	5,16	141
Control 2008	32,2	286,80	2,55	100
GST 2008	49,8	253,72	4,32	169

[Tabla III.1](#): Actividad de la enzima UroIII-S (UE: cantidad de enzima necesaria para formar 1nmol de URO III por hora, por ml de glóbulos rojos y por mg/ml de proteína; %AE: Porcentaje de actividad enzimática respecto al control).

Se observa que la actividad hallada para la paciente se encuentra dentro de los valores normales.

III.3 DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Para la paciente GST la amplificación y secuenciación del gen de la URO III-S, descartó la existencia de mutaciones en el promotor eritroide, en los exones y regiones adyacentes, lo cual no condice con el diagnóstico de PCE.

III.4 INHIBICIÓN DE LA ENZIMA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE HIERRO

Debido a que existen trabajos que indican que elevadas concentraciones de hierro inhiben la URO III-S hepática en pacientes PCT y al hecho de que la paciente presentaba valores elevados de ferritina, se ensayó *in vitro* el efecto de concentraciones crecientes de hierro sobre su actividad en glóbulos rojos.

Se determinó la inhibición de la enzima URO III-S mediante la determinación de su actividad, por RP-HPLC, expresada como porcentaje de conversión de hidroximetilbilano en URO III. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las [Figuras III.7 a 14](#).

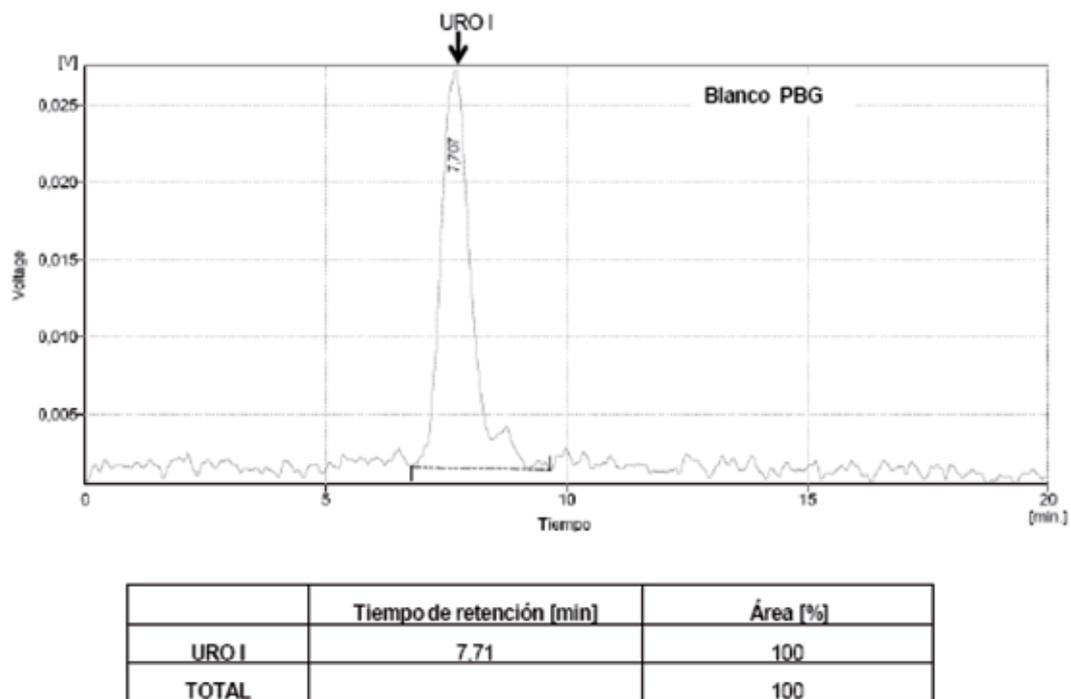


Figura III.7: Cromatograma del blanco de PBG

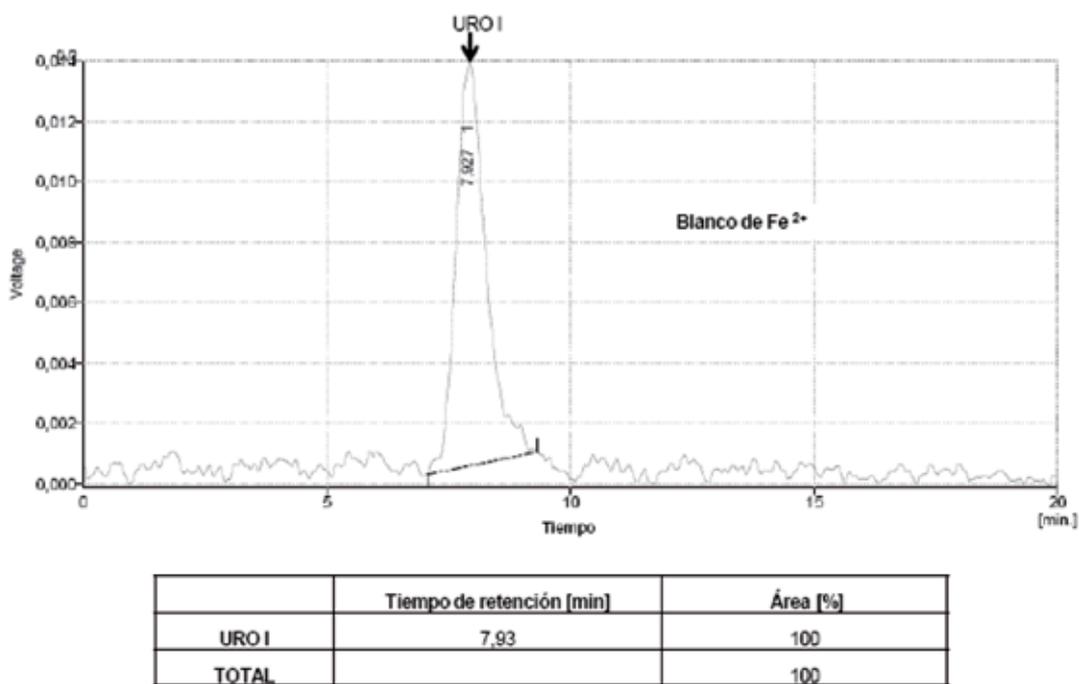


Figura III.8: Cromatograma del blanco de hierro

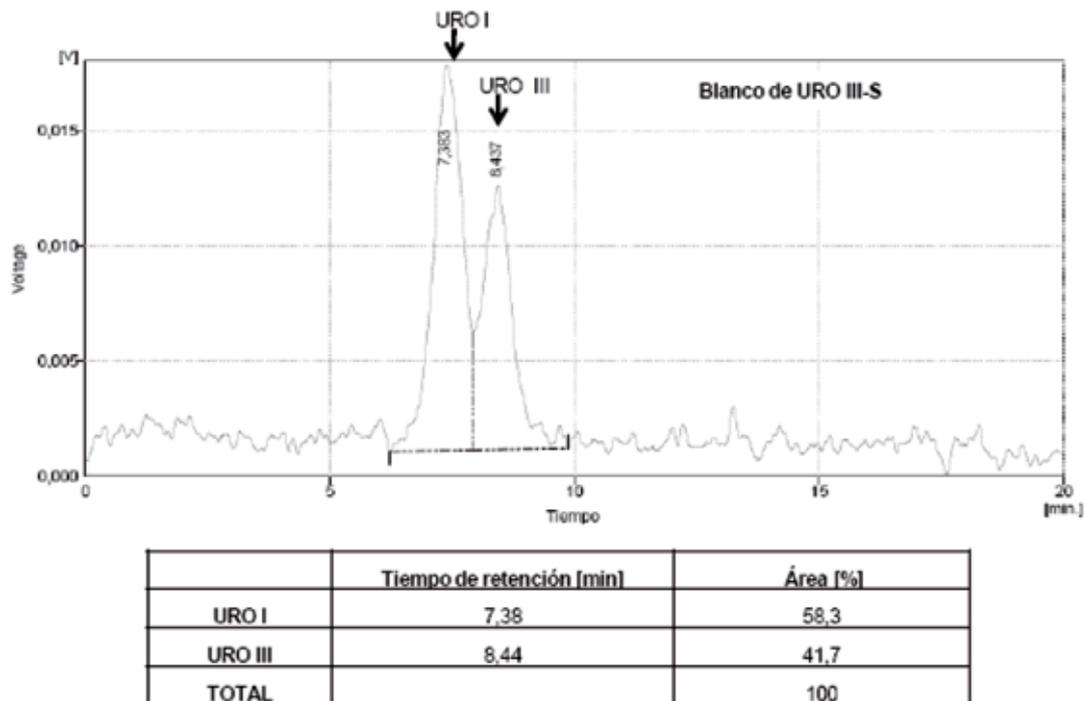


Figura III.9: Cromatograma del blanco de URO III-S

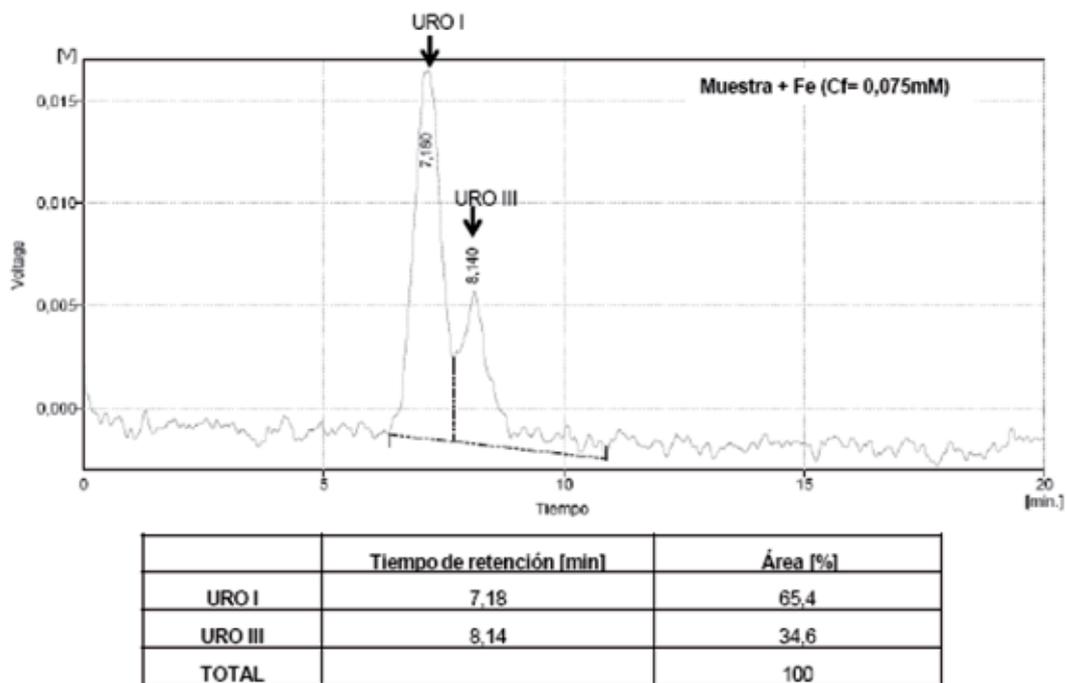


Figura III.10: Cromatograma de incubación con hierro 0,075 mM

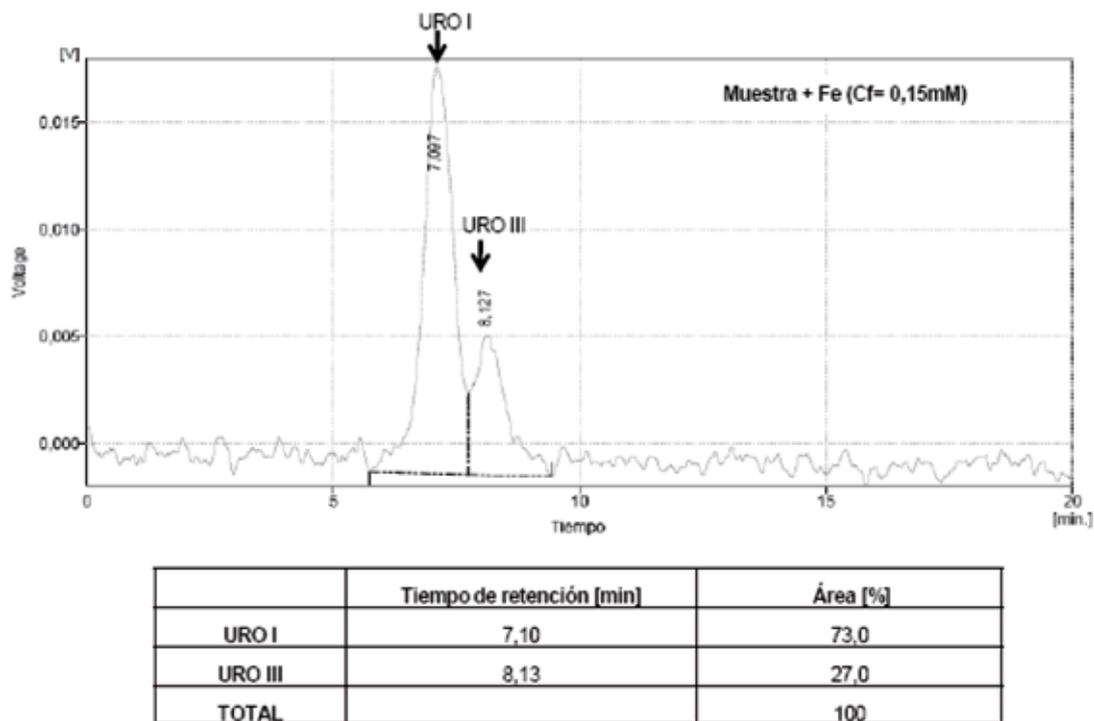


Figura III.11: Cromatograma de incubación con hierro 0,15 mM

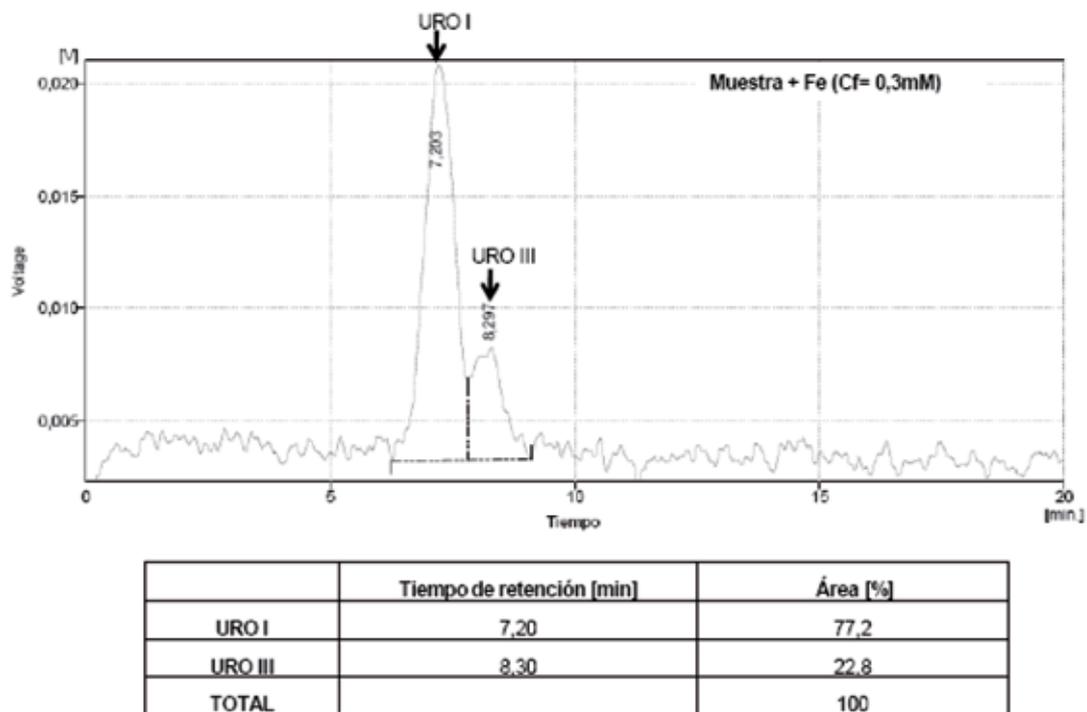


Figura III.12: Cromatograma de incubación con hierro 0,30 mM

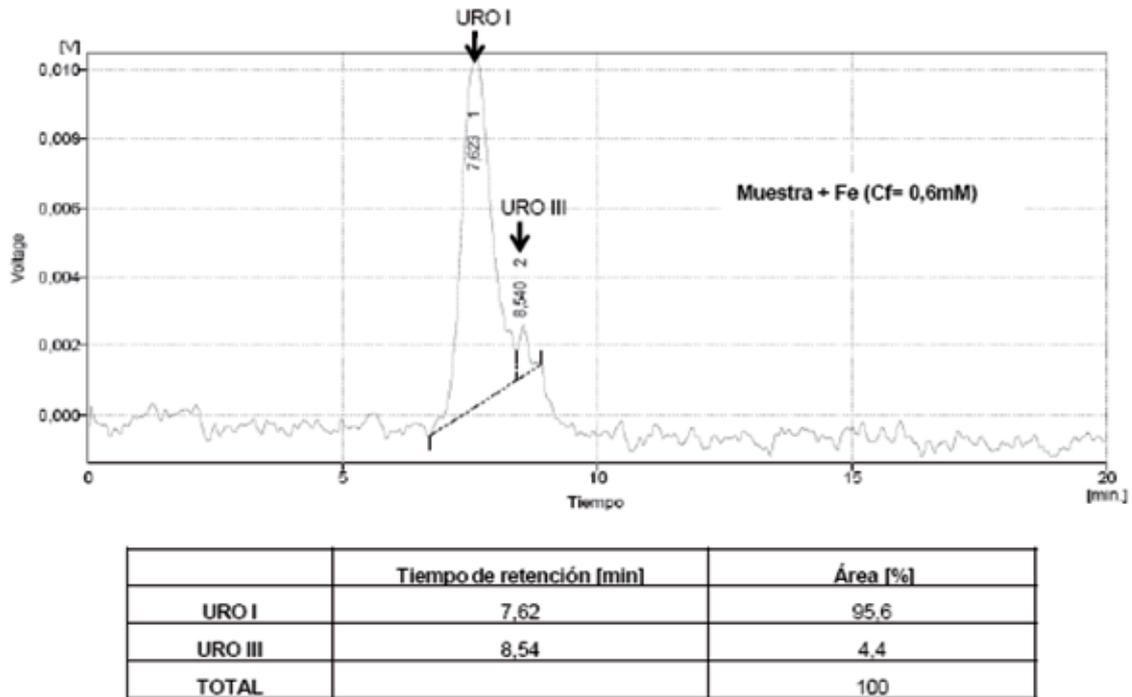


Figura III.13: Cromatograma de incubación con hierro 0,60 mM

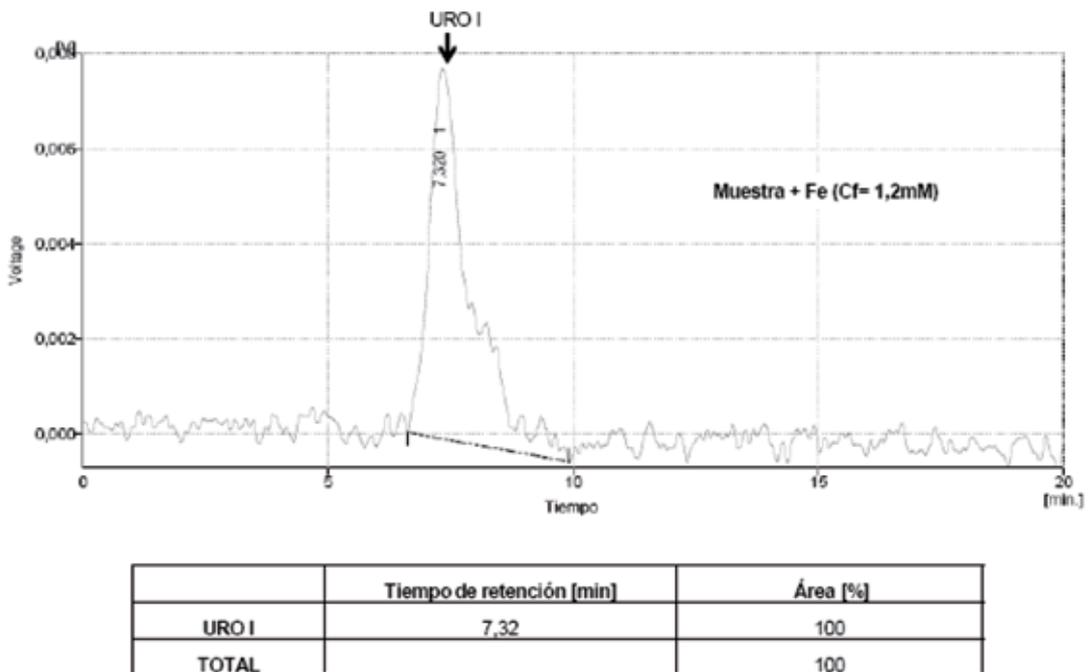


Figura III.14: Cromatograma de incubación con hierro 1,20 mM

En el Gráfico III.1 se resumen los resultados obtenidos para la inhibición de la enzima por hierro.

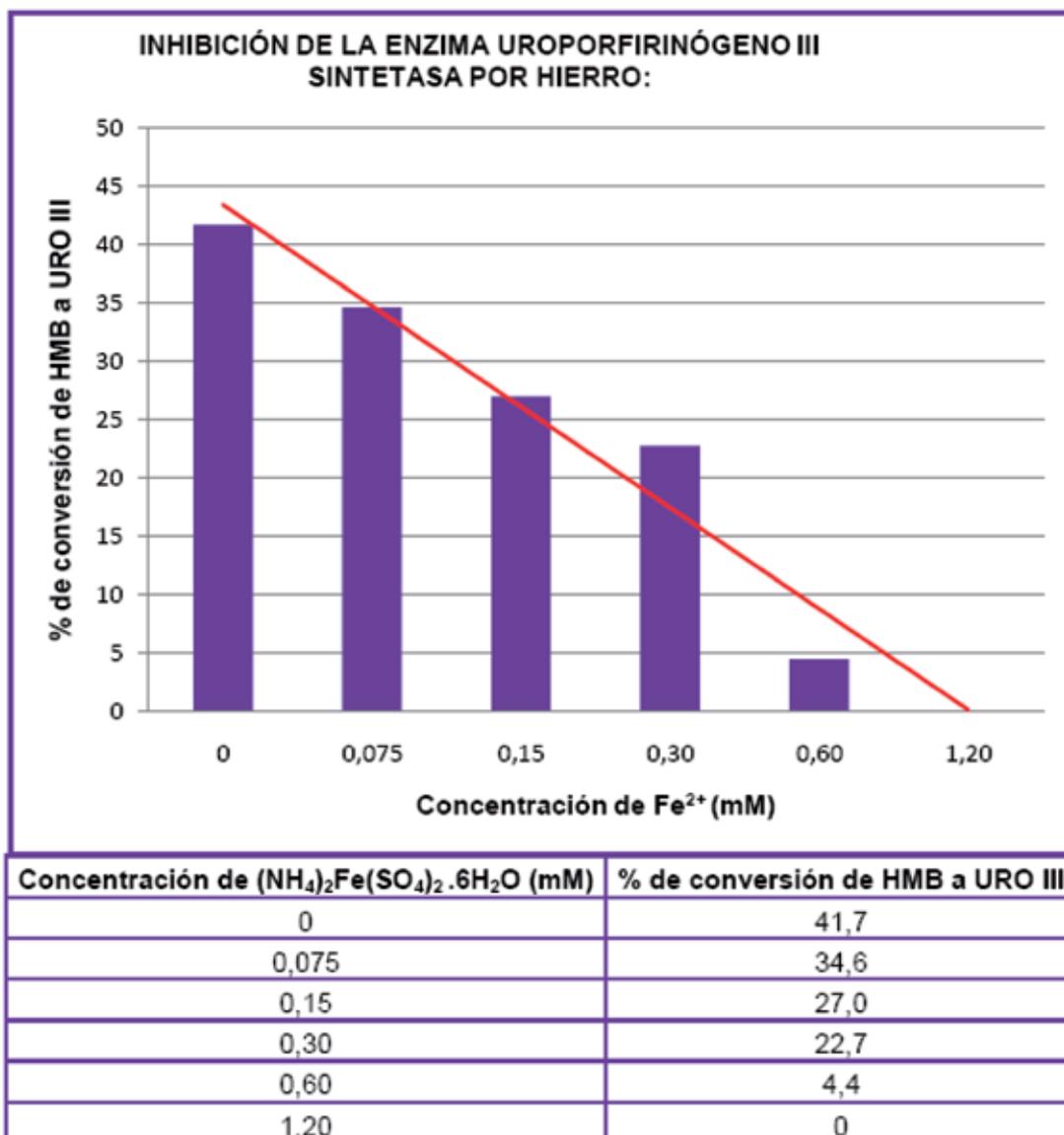


Gráfico III.1: Inhibición de URO III-S

Estos resultados muestran, *in vitro*, una relación inversa entre la actividad de URO III-S y la concentración de hierro, es decir, que concentraciones crecientes de hierro inhiben a la enzima.

Discusión

I. MARCO TEÓRICO

Las porfirias son enfermedades metabólicas de baja incidencia en diferentes poblaciones. La PCE constituye una de las porfirias menos frecuentes, encontrándose sólo 200 casos de este desorden reportados en la bibliografía, de los cuales el 2% corresponden a manifestaciones tardías.

La marcada deficiencia de la enzima URO III-S, causada por mutaciones en el gen que codifica para dicha enzima, es responsable de la producción y acumulación de los isómeros no fisiológicos URO I y COPRO I, especies extremadamente tóxica para el organismo, que causan hemólisis. La porfirina liberada se deposita en diferentes tejidos, como el hígado, bazo, intestino y riñones, y en los huesos causando eritrodoncia y aumento de la fragilidad ósea. La URO I es un compuesto fotorreactivo, por lo tanto la exposición al sol u otras fuentes de radiación UV causa daños en los tejidos expuestos, que van desde eritemas, hiperpigmentación y ampollas, que en casos severos, pueden derivar en mutilaciones. En la actualidad, el trasplante de médula ósea compatible en pacientes severamente afectados, constituye la única opción efectiva, debido a que, la sustitución de los eritroblastos de la médula ósea corrige el defecto enzimático, reduciendo los niveles de porfirinas y disminuyendo la sintomatología cutánea.

Desde el punto de vista bioquímico, la PCE se presenta con un perfil de excreción de porfirinas característico. Los pacientes excretan grandes cantidades de porfirinas por orina, principalmente intermediarios de la serie I, con predominancia de uroporfirina I.

En las Porfirias Duales (PD), existe una deficiencia simultánea en dos enzimas del camino biosintético del hemo en un individuo, lo cual, se ve reflejado en la coexistencia de la sintomatología clínica y los parámetros bioquímicos vinculados a cada una de las porfirias individualmente.

II. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA UROPORFIRINÓGENO III SINTETASA

La genotipificación junto con la medición de la actividad enzimática constituyen herramientas fundamentales para la confirmación del diagnóstico de PCE. A partir de estos resultados puede determinarse el tratamiento adecuado, dependiendo de la severidad de la enfermedad. Además, posibilita tomar medidas preventivas en casos aún no desencadenados de PCE de manifestación tardía y la identificación de los portadores de las mutaciones en heterocigosis.

El desarrollo de los protocolos de amplificación realizados en este trabajo constituyen un rápido y eficiente sistema para la genotipificación de pacientes PCE, ya que posibilita la amplificación de los exones, sus regiones adyacentes y el promotor eritroide con alta eficiencia y rendimiento en sólo 3 programas de PCR, disminuyendo el tiempo requerido para el diagnóstico y los costos de los estudios genéticos.

III. PACIENTE LTO Y FAMILIA

El paciente LTO fue sometido a un trasplante de médula ósea alogénico, utilizando a su hermana mayor (LCA) como donante histocompatible. Inicialmente, se observó una mejoría tanto en los parámetros bioquímicos como en la sintomatología, pero estudios realizados a los 15 y 27 meses post trasplante indicaron un aumento del contenido de porfirinas en orina y plasma, valores no esperados según lo descrito en la literatura para trasplantes realizados en niños (Tezcan *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2001).

De las 40 mutaciones que se han identificado en el gen responsable de PCE, la más frecuente es la p.C73R (30% de los casos), la cual en homocigosis se encuentra asociada con el fenotipo más severo para la patología. La mutación c.672ins28 aun no ha sido expresada en sistemas bacterianos por lo que no se sabe a ciencia cierta cómo esta mutación afecta la funcionalidad de la proteína. Sin embargo, se sabe que es responsable de la inserción de 9 codones y 1 pb luego del codón 224, modificando el marco de lectura y alargando la transcripción en 40 codones (Esquema III.2, en RESULTADOS).

El análisis genético de la familia del paciente reveló que tanto la madre como ambos hermanos son portadores de la mutación p.C73R, mientras que el padre presenta la mutación c.627ins28. La medición de la actividad enzimática confirma la correlación genotipo-fenotipo descrita por diversos autores para PCE, obteniéndose valores de actividad cercanos al 50% para los portadores de la p.C73R y del 80% para el padre, portador de la mutación c.627ins28.

Los estudios genéticos realizados al paciente LTO revelaron la presencia de la mutación p.C73R en un porcentaje del 50%, lo cual no sería esperable en un paciente transplantado de médula ósea, a no ser que el donante fuera portador de la mutación, situación que fue confirmada por los estudios realizados a su hermana. Estos resultados ponen en evidencia la necesidad fundamental de realizar, además de los estudios de histocompatibilidad, la genotipificación de los donantes consanguíneos previamente a realizar el trasplante. Cabe destacar, que antes de realizarse el trasplante, el personal idóneo del CIPYP recomendó la realización del estudio genético de la donante, pero como ésta presentaba parámetros bioquímicos nor-

males, era el único familiar histocompatible y el agravamiento del cuadro del paciente requería una rápida intervención, los médicos tratantes decidieron realizar el trasplante sin el estudio genético previo del donante.

Por otra parte, el resultado observado en la secuenciación del exón 10 del paciente sugiere la presencia de quimérico incompleto, que podría asociarse a la proliferación de sus células y las provenientes del donante. Resultaría conveniente realizar post trasplante estudios cuantitativos del grado de quimerismo del paciente, ya que estos constituyen una herramienta clínica en la evaluación del éxito o fracaso de los trasplantes de células hematopoyéticas. En este caso, el análisis por fluorescencia de la hibridación *in situ* (FISH) de los cromosomas X e Y sería útil, ya que el donante y el paciente son de diferentes sexos.

La actividad enzimática del paciente LTO fue del 53 % con respecto a los controles. Este valor resulta elevado para un paciente PCE pero bajo para un individuo con esta enfermedad transplantado de médula ósea y sería debido probablemente a que la donante es portadora de la mutación p.C73R.

La determinación de los isómeros URO I y URO III en la orina del paciente recolectada en el año 2007 reveló la presencia de ambos, lo cual no constituye un perfil de excreción característico para un paciente PCE, hecho que no puede ser justificado con la información disponible en el centro (CIPYP). En cambio, el perfil de excreción encontrado para la orina recolectada en el año 2009 fue el esperado para un paciente PCE, encontrándose exclusivamente el isómero URO I. Además, las áreas obtenidas de ambos cromatogramas, que son proporcionales a la cantidad de los isómeros en la muestra, pusieron en evidencia un aumento de la excreción del isómero no fisiológico mismo entre estos años.

Es complejo determinar si la reaparición de la sintomatología es debida a la proliferación de las células del paciente y/o a las células del donante; pero sí resulta evidente la necesidad de una genotipificación del donante previa al trasplante, ya que no puede descartarse la influencia de células portadoras de una mutación en la reaparición de la sintomatología.

IV. PACIENTE GST

La paciente GST presentaba sintomatología clínica y los parámetros bioquímicos concordantes con una Porfiria Dual PCE/PAI, siendo este el primer caso descrito a nivel mundial. Además, tenía elevados valores de ferritina sérica, lo cual está asociado a altos niveles de hierro en sangre. La presencia de la mutación p.G111R en el gen de la PBG-D y la reducción en la actividad de dicha enzima en aproximadamente un 50% respecto de los valores normales, confirmó el diagnóstico de Porfiria Aguda Intermitente.

El análisis del gen de la URO III-S, descartó la existencia de mutaciones en el promotor eritroide, en los exones y regiones adyacentes, y los valores de actividad de la enzima resultaron normales respecto de los controles, lo cual no concuerda con el diagnóstico bioquímico de la PCE.

La determinación de los isómeros URO I y URO III mostró un perfil de excreción con predominancia de URO I, característico de esta porfiria cutánea. Se observó una pequeña cantidad de URO III en orina, que podría ser consecuencia de la inhibición reversible de la enzima URO-D, que se sabe que es inhibida por una gran cantidad de compuestos, entre los que se encuentran el hierro, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+} , iodoacetamida, hexaclorobenceno y polihalogenados.

Los estudios genéticos para Hemocromatosis hereditaria (HH), revelaron que la paciente es portadora de la mutación H63D en el gen HFE, que codifica para la proteína que lleva ese nombre, reguladora de la absorción de hierro. La hemocromatosis es una enfermedad autosómica recesiva, pero existen factores que pueden modificar la expresión de la enfermedad, como el aporte de hierro en la dieta, el consumo de [alcohol](#), ciertas infecciones [víricas](#) y [anemias](#) crónicas. La presencia de la mutación H63D no causa habitualmente la expresión de HH, pero ciertos autores proponen que dicha mutación adquiere significado clínico cuando se acompaña de otras alteraciones genéticas u otras condiciones patológicas, como porfiria hepática, hepatitis viral, talasemia.

Debido a que los resultados obtenidos no permitieron llegar al diagnóstico concluyente de PCE, que existen trabajos que indican que el hierro inhibe la UROIII-S hepática y que la paciente presentaba valores elevados de ferritina, se ensayó *in vitro* el efecto de concentraciones crecientes de hierro sobre la actividad de dicha enzima eritroidea. Estos ensayos demostraron que existe una relación inversa entre la concentración de hierro y la actividad de la enzima URO III-S eritroidea. Este resultado sugirió que el cuadro compatible con PCE, podría ser en realidad la consecuencia de una inhibición de la URO III-S, *in vivo*, causada por elevados niveles de hierro.

A pesar que los resultados obtenidos de la inhibición de URO III-S aportan una posible explicación de la sintomatología clínica y bioquímica vinculada al desarrollo de una PCE, en la actualidad se encuentran en desarrollo los protocolos necesarios para la secuenciación del promotor housekeeping. De encontrarse alguna mutación en esta región, está constituiría la primera registrada en este segmento del gen. Si, además, se demuestra que es la responsable de la sintomatología asociada a la PCE estaríamos quizás en presencia de un nuevo tipo de Porfiria.

V. REFERENCIAS

- Shaw, P.H.; Mancini, A.J.; McConnell, J.P.; Brown, D.; Kletzel, M. *Treatment of congenital erythropoietic porphyria in children by allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literatura.* (2001) Bone Marrow Transplantation. **27**: 101.
- Tezcan, I.; Xu, W.; Gurgey, A.; Tuncer, M.; Cetin, M.; Öner, C.; Yetgin, S.; Ersoy, F.; Aizencang, G.; Astrin, K.H.; Desnick, R.J. *Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation.* (1998) Blood.**92**: 4053.

