

Tesis de Posgrado

Estudio químico de porfirinas excretadas por orina en estados de porfiria

Nacht, Sergio

1963

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

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

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

Cita tipo APA:

Nacht, Sergio. (1963). Estudio químico de porfirinas excretadas por orina en estados de porfiria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1178_Nacht.pdf

Cita tipo Chicago:

Nacht, Sergio. "Estudio químico de porfirinas excretadas por orina en estados de porfiria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1178_Nacht.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio Químico de Porfirinas Excretadas por
Orina en Estados de Porfiria

SERGIO NACHT

RESUMEN DE LA
TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA

ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

— 1963 —

RESUMEN DE TESIS

Las porfirinas son pigmentos tetrapirrólicos, precursores normales en el camino biosintético que conduce a Protoporfirina IX, Clorofila, Catalasa, etc., que se excretan por orina y heces en cantidades anormalmente elevadas en estados patológicos denominados porfirias.

Existen diversos tipos de ellas y se las clasifica de acuerdo a su distinta sintomatología clínica, existiendo un cuadro químico particular asociado a cada tipo de porfiria.

Los casos estudiados en la presente investigación pertenecían todos al tipo más frecuente en nuestro país: Porfiria hepática, tipo cutánea tarda. Se caracterizan por presentar fotosensibilidad, apareciendo eritemas en las partes expuestas a la luz y, posteriormente, necrosis. Generalmente está asociada a algún tipo de disfunción hepática y aparece en la edad adulta.

La orina de estos enfermos es de un color oscuro, emite intensa fluorescencia roja a la luz U.V. y, espectrocópicamente, se observan bandas de absorción características de complejos metálicos de porfirinas.

En el momento de comenzar la investigación, existían diversos interrogantes sobre la composición química del complejo porfirínico excretado por orina en estos casos; a saber :

a) La composición cuali-cuantitativa del mismo.

b) La composición de la llamada Porfirina de Waldenström.

Esta es una sustancia extraíble de la orina de pacientes porfirícos, llevada a pH 3.0-3.2, por acetato de etilo, la que, según

investigadores del grupo de Watson, está constituida fundamentalmente por Uro I, con pequeñas cantidades de otra porfirina a la que denominaban Porfirina 208 ó Firiaporfirina.

En cambio, para los del grupo de Rimington, el principal componente de la Porfirina de Waldenström es Uro III.

c) La composición de la fracción Uroporfirina que se obtenía de orinas porfíricas.

d) La estructura isomérica de la Firiaporfirina (porfirina de 7 carboxilos).

e) La naturaleza de dos porfirinas que se aislaban de las mismas orinas y que tenían en su estructura sólo 5 y 6 carboxilos.

f) La estructura isomérica de la fracción Coproporfirinas, también provenientes de orinas de porfirias hepáticas.

Además, por disponer de orinas de ratas a las que se había intoxicado por la administración diaria de hexaclorobenceno durante 6 meses, las que comenzaron a excretar cantidades apreciables de porfirinas por orina a partir del tercer mes de comenzar a drogarlas, se estudió también la composición cuali-cuantitativa del total de porfirinas urinarias.

Para llevar a cabo los estudios necesarios para aclarar estos puntos en cuestión, se procedió primero a extraer las porfirinas de las orinas, llevando las mismas a pH 3.0-3.2 (punto isoeléctrico de las porfirinas) y adsorbiéndolas luego con talco o bien extrayéndolas con acetato de etilo.

Posteriormente, se las esterificaba con una mezcla de

III

metanol - SO_4H_2 (19:1) durante 24-48 horas y luego se las pasa a cloroformo.

Las soluciones clorofórmicas se analizaron por cromatografía en columnas de carbonato de calcio, usando como solvente de desarrollo una mezcla de benceno-cloroformo (4:1) y por cromatografía sobre papel según el método de Falk y Benson, estudiándolas además cuantitativamente por medio de una variante de esta técnica para microcantidades desarrollada por Batlle y Grinstein.

También se las cristalizaba, observando su forma cristalina al microscopio y determinando los micropuntos de fusión; asimismo, se procedió a descarboxilarlas por el método de Edmonson y Schwartz, estudiando luego los productos de descarboxilación y determinando la estructura isomérica de la porfirina original mediante la observación de la Coproporfirina obtenida.

Para determinar el tipo isomérico de la Coproporfirina, se la cristalizaba, observaba al microscopio, determinaba su P.F. y se la sometía a una cromatografía sobre papel, según el método de Eriksen para porfirinas libres, que permite distinguir los isómeros I y III de la Copro.

Además, se determinaron espectrofotométricamente los máximos y espectros de absorción de las porfirinas obtenidas.

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos se pueden esquematizar de la siguiente manera :

A) Cromatografía de los extractos totales de porfirinas de orina:

La mezcla total de porfirinas obtenidas de las orinas por adsorción con talco y esterificación, se cromatografió en columnas de carbonato de calcio, obteniéndose cromatogramas de 8

bandas, de las que las 5 inferiores correspondían respectivamente a Uro, Firia, Hexa, Penta y Copro, como se comprobó cromatografiando cada fracción sobre papel.

Se efectuó también una cromatografía cuantitativa sobre papel de las porfirinas obtenidas de dichas bandas, la que dió valores coincidentes en los 4 casos investigados. Los resultados obtenidos fueron aproximadamente: Uro I: 40%; Uro III: 10%; Firia: 15%; Hexa: 5%; Penta: 8% y Copro: 22%.

B) Composición de la Porfirina de Waldenström:

La porfirina de Waldenström extraída de orina según el método original indicado por este autor, fué cromatografiada en columna, obteniéndose fundamentalmente una banda de Uro y otra de Firia.

La cromatografía sobre papel de la primera de ellas, indicó que estaba constituida por una mezcla de Uro I y Uro III.

Otra muestra de P.W. se trató por extracción con acetato de etilo, obteniéndose una fracción insoluble, compuesta por Uro I y una pequeña cantidad de una porfirina soluble, la que estaba formada por Uro III y Firia.

La cromatografía cuantitativa sobre papel de la P.W. dió como resultados: Uro I: 65%; Uro III: 15% y Firia: 20% aproximadamente.

La descarboxilación de esta porfirina dió fundamentalmente Copro I, con una pequeña cantidad de Copro III.

C) Composición de la Uroporfirina de orinas porfíricas:

Una fracción Uro obtenida por cromatografía en columna de un extracto total de porfirinas de orina, se cromatografió len-

tamente para obtener una banda ancha y difusa, se cortó la misma en dos partes y se analizó por cromatografía en papel para ver si existía diferencias entre ellas. La inferior tenía menos Uro III. También se trató de separar Uro I y Uro III por cristalización fraccionada. Se logró obtener Uro III, con algo de Firia, pero libre de Uro I.

También se analizó por el método cuantitativo de cromatografía sobre papel, hallando que estaba formada por una mezcla de Uro I y Uro III en la proporción de 4:1.

D) Estudio de la Firiaporfirina:

Se la aisló por cromatografía en columna de carbonato de calcio de las porfirinas totales de orina y se la cristalizó, identificó según los métodos habituales y, posteriormente, descarboxiló, obteniéndose únicamente Copro III. Por lo tanto, se concluyó que se trata de Firia III.

E) Estudio de la Hexa y Pentaporfirina:

Se las aisló por el mismo procedimiento anterior y analizó de igual manera. En el caso de la Hexa, por descarboxilación se obtuvo sólo Copro III, por lo que se la identificó como Hexa III. En cambio, en el descarboxilado de Penta se halló una mezcla de Copro I y III; en consecuencia la fracción Penta debía de ser también mezcla de isómeros I y III.

Asimismo, se determinaron espectrofotométricamente los espectros de absorción.

F) Identificación de las Coproporfirinas:

Siguiendo el mismo procedimiento de aislación anteriormente descrito y cromatografiando la Copro obtenida por el método de Eriksen sobre papel, se comprobó que era una mezcla de isómeros I

y III.

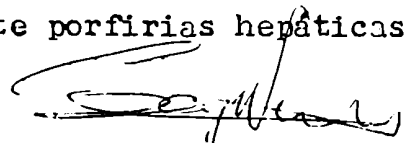
G) Investigación cuali-cuantitativa de porfirinas de orinas de ratas:

Las porfirinas extraídas por adsorción con talco de orinas de ratas intoxicadas por hexaclorobenceno, se cromatografiaron en columna de carbonato de calcio y cuali- y cuantitativamente sobre papel, obteniendo resultados similares a los hallados en los casos de porfiria humana.

En base a los resultados obtenidos en los estudios de porfirias humanas, se sugiere que, en lo que se refiere a las porfirinas de tipo isomérico III, la acumulación de Copro provocaría la aparición de Penta III y Hexa III, probablemente por un mecanismo de regulación enzimática tipo "feed back"; en cambio la acumulación de Firia III se explicaría por inhibición del sistema enzimático responsable de su descarboxilación, hallándose Uro III también debido a un mecanismo "feed back".

En cuanto a las porfirinas de la serie I, al hallarse gran cantidad de Uro I, apreciable cantidad de Copro I y poca Penta I, se piensa que la acumulación de Uro I que se encuentra, puede ser debida a poca actividad del sistema enzimático descarboxilante para esta porfirina, siendo éste el paso limitante de la velocidad en esta serie isomérica. En cuanto a la Copro I, se acumularía por ser el producto final del metabolismo de porfirinas de tipo I, apareciendo algo de Penta I, también aquí, como consecuencia de un "feed back".

Es de interés la semejanza entre el cuadro químico de las porfirinas de orinas de ratas y las extraídas de casos humanos, dado que, de confirmarse ésta en posteriores estudios, indicaría la posibilidad de producir experimentalmente porfirias hepáticas del tipo cutánea tarda.



FCEN-BA.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio Químico de Porfirinas Excretadas por

Orina en Estados de Porfiria

SERGIO NACHT

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA

ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

Ex 15: 1178

— 1963 —

1

Padrino de Tesis:

Dr. MOISES GRINSTEIN

Profesor titular de Química Biológica



... mis padres

... mi esposa

... mis hijos

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

Este trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Química Biológica I de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, bajo la permanente e inestimable dirección del Profesor Dr. Moisés Grinstein, para cuyo interés, dedicación y valiosos consejos no bastan las simples palabras de mi agradecimiento

A la Licenciada Leonor San Martín, quien mucho me ayudó en la parte final de la investigación.

Al Dr. Emilio Rivas, quien tuvo la amabilidad de corregir los originales.

A la Dra. Carmen B. de Lossio, de la Cátedra de Genética de esta Facultad, quien tuvo la cortesía de tomar las microfotografías.

Al Licenciado Eduardo Charreau, quien desinteresada y gentilmente me facilitó la orina de las ratas intoxicadas con hexaclorobenceno.

Y, en general, a todos los integrantes de la Cátedra, quienes con su amistad, inteligencia y compañerismo, me han alentado y colaborado de una u otra forma, para que el presente trabajo se realizara.

Noviembre de 1963.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Uro	o U	:	Uroporfirina
Firia	o F	:	Firiaporfirina
Hexa	o H	:	Hexaporfirina o porfirina de 6 carboxilos
Penta	o P	:	Pentaporfirina o porfirina de 5 carboxilos
Copro	o C	:	Coproporfirina
Proto	o Pr	:	Protoporfirina
Etio		:	Etioporfirina
P.W.		:	Porfirina de Waldenström.
PsU		:	Pseudouroporfirina
ALA		:	Acido delta amino levúlico
PBG		:	Porfobilinógeno
UPG		:	Uroporfirinógeno
FPG		:	Firiaporfirinógeno
HPG		:	Hexaporfirinógeno
PPG		:	Pentaporfirinógeno
CPG		:	Coproporfirinógeno.
U.V.		:	Ultravioleta
P.F.		:	Punto de fusión

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

PORFIRIA

El término "porfiria" comprende un conjunto de enfermedades caracterizadas por un trastorno profundo del metabolismo de las porfirinas, en las que se encuentra muy aumentada la biosíntesis de estas sustancias o sus precursores.

Garrod (1) la denomina un "inborn error of metabolism", indicando que se trataría de una anomalía del tipo congénita; aunque, a la luz de los conocimientos actuales, Watson (2) opina que la porfiria podría ser a veces una enfermedad adquirida, más que una anomalía constitucional.

Apoyaría esta presunción, la posibilidad de producir estados de porfiria experimental en animales de laboratorio, en los que nunca se habían observado anomalías de este tipo, por el suministro de sustancias adecuadas (3,4,5).

El término "porfirina" fué utilizado por primera vez por Hoppe-Seyler (6) para designar a la sustancia libre de hierro que aparecía cuando se trataba sangre con ácido sulfúrico concentrado, que denominó "hematoporfirina" y fué luego cristalizada por Nencki y Sieber (7).

Aunque ya en el siglo pasado se habían observado casos de elevada excreción urinaria de porfirinas, Günther (8,9) fué el primero en estudiar la enfermedad a la que él llamó "hematoporfiria" en el hoy famoso caso del paciente denominado Perty.

Posteriormente, distintos autores (10,11,12,13,14,15) estudiaron un gran número de pacientes y enunciaron distintas clasificaciones de las porfirias, agrupándolas en base a su diversa sintomatología clínica. Entre ellas, las más aceptadas son:

Clasificación de Günther (1922)

Porfirias genuinas o agudas

Porfirias tóxicas

Porfirias crónicas

Porfirias congénitas

Clasificación de Micheli - Dominici (1931)

Porfiria idiopática

Abdominal

Nerviosa

Cutánea

Porfiria tóxica

Clasificación de Waldenström (1937)

Porfiria congénita

Porfiria cutánea tarda

Porfiria aguda

a) latente

b) forma abdominal

c) forma nerviosa

d) aguda clásica

e) forma comatosa

Estudios posteriores de Schmid y colab.(16), quienes efectuaron investigaciones histoquímicas de médula ósea e hígado de pacientes porfíricos de distintos tipos y los propios estudios de Watson realizados en un gran número de casos, induje-

ron a este último a enunciar una nueva clasificación, la que es hoy generalmente aceptada como la más correcta y que vamos a adoptar y describir en algún detalle en el presente trabajo.

Clasificación de Watson (1951)

- I - Porfiria eritropoyética
- II - Porfiria hepática
 - a) aguda
 - b) cutánea tarda
 - c) tipo mixto o combinado
 - d) latente

Porfiria eritropoyética:

Es la forma más rara y su ejemplo típico es el "caso Petry", clasificado por Günther como porfiria congénita.



Figura 1. (x)
Caso Petry

(x) Reproducida de: THANNHAUSER, S.J.: Tratado de metabolismo y enfermedades de la nutrición, pág. 576 (Ed. Labor, Buenos Aires, 1932).

Watson prefiere darle el nombre de eritropoyética, dado que a veces sus síntomas no aparecen hasta después de transcurrido un cierto tiempo de vida (aun años), lo que pone un signo de interrogación sobre el real valor del término "congénita".

Debido a que está caracterizada por una gran fotosensibilidad, muchas veces se confunden casos de este tipo con los del "fotosensible hepática o cutánea tarda" y viceversa (17), no obstante que en los de este último tipo los síntomas suelen aparecer recién en la edad adulta.

La fotosensibilidad es el síntoma más evidente y a veces aparece a los pocos días de nacer, aunque lo frecuente es que ocurra al año o dos. En algunos casos, la orina sólo se oscurece o toma color rojo luego de exponerla a la luz.

Se producen alteraciones profundas de la piel en las partes expuestas a la luz, especialmente en la cara y manos, por lo que en la literatura más antigua se describía la enfermedad como parecida al pénfigo o la lepra.

Luego se producen mutilaciones, que con el tiempo se van haciendo más extensas, con pérdida de dedos, partes de la nariz, orejas, etc.; sin embargo, las partes de la piel no expuestas a la luz, permanecen sin afectar.

Aunque este aspecto de la enfermedad es espectacular, rara vez es el fatal, pues la muerte generalmente sobreviene a consecuencia de alguna otra enfermedad intercurrente o por anemia de tipo hemolítico y, probablemente, este trastorno y la esplenomegalia forman parte del síndrome pues, tarde o temprano, aparecen en la mayoría de los casos (18).

La excreción de porfirinas en orina y heces es muy alta y, casi en forma absoluta, del tipo isomérico I.

También se observa hiperplasia de la médula ósea y una gran concentración de porfirinas en la misma (19). En general, los distintos autores (11,13,20) coinciden en que hay una gran acumulación de uroporfirinas, que probablemente es debida a un fenómeno de insolubilización, como lo sugiere el hecho de que las porfirinas sean precipitadas "in vitro" por el fosfato de calcio (21,22).

Si se les extirpa el bazo a estos pacientes, generalmente disminuye la hemólisis, la médula ósea retorna a la normalidad y la formación de porfirinas desciende a una fracción ínfima comparada con la anterior a la operación; por consiguiente, la fotosensibilidad desaparece (16,23). En otros casos el efecto no es tan espectacular, pero, por lo general, siempre se nota una mejoría en la sintomatología.

Si la cantidad de porfirinas es suficientemente grande, se observa eritrodoncia debido a que se depositan en los dientes y, en los casos en que éstos no tienen coloración a la luz natural, iluminándolos con luz U.V. exhiben una intensa fluorescencia roja.

Porfiria hepática:

Este es el grupo más numeroso; al respecto, Watson (2) indica que de 160 casos estudiados, 155 pertenecían a este grupo, aunque la incidencia relativa de los subtipos del grupo hepático parece depender, en cierta forma, de influencias geográficas o de raza.

Por ejemplo, en nuestro país la forma predominante es

la cutánea tarda, mientras que en los casos estudiados por Watson, el tipo agudo predominaba en proporción de 3 ó 4 a 1.

Se observa en general una disfunción hepática y a veces aparece ictericia, especialmente en las porfirias del tipo cutánea tarda o combinadas. En la mayoría de los casos hay una marcada retención de bromosulfaleína, aun cuando no se observe pigmentación.

Los conocimientos actuales no permiten hacer una exacta interrelación entre la porfiria y los trastornos hepáticos, pero, por la sugestiva incidencia familiar de la enfermedad, parecería factible que las afecciones hepáticas fueran un factor secundario o bien que la aparición de una enfermedad intercurrente, precipitara las manifestaciones activas en un individuo con porfiria latente. Al respecto, Brunsting (24) hace notar ^{la} relativa frecuencia con que se halla alcoholismo, hígado graso o cirrosis en casos de porfiria crónica o cutánea tarda.

La distinta sintomatología permite clasificar los casos de porfiria hepática en los siguientes subtipos:

Porfiria aguda intermitente: Como su nombre lo indica, está caracterizada por la presencia de ataques de duración más o menos prolongada, cólicos abdominales, trastornos nerviosos, anomalías psíquicas y convulsiones, pudiendo estos síntomas presentarse aislados o combinados (25,26) y con períodos de remisión.

Esto hace que la porfiria aguda adopte formas tan diversas que dificulta su diagnóstico clínico y por ello, Waldenström (27) le dió a esta enfermedad el sobrenombre de "pequeña simuladora". Además, la posibilidad de confusión de estos síntomas con los de apendicitis, cólico renal o biliar, úlcera per-

forada, pancreatitis, obstrucción intestinal, etc., ha hecho que Calvy (28) y Rentschler (29) pusieran especial énfasis en la importancia de la porfiria en el diagnóstico quirúrgico. Otras veces, la porfiria se enmascara bajo la apariencia de esquizofrenia o un estado maniaco o depresivo.

En cambio, lo realmente característico es la presencia en la orina, en todos los casos, de precursores de porfirinas (ALA y PBG), los que pueden ser determinados cuali y cuantitativamente (5), siendo muy baja o nula la excreción de porfirinas y no presentando fotosensibilidad (30).

Los adultos de edad intermedia son los más frecuentemente atacados, siendo rara en la infancia o luego de los 60 años y, asimismo, diversos autores (11,12,13) han observado una mayor incidencia de este tipo de porfiria en el sexo femenino.

Es sintomática la incidencia familiar de esta enfermedad (12,14) y al respecto Waldenström (31) considera a la porfiria hepática como hereditaria dominante, en oposición a la eritropoyética que parece ser recesiva, hipótesis que coincide con lo hallado por otros investigadores que encontraron frecuentemente síntomas latentes de porfiria en distintos miembros de las familias de pacientes y a través de varias generaciones (2,32,33).

No se conoce el mecanismo por el cual una porfiria latente se convierte en la forma aguda (es decir, aparece un ataque), pero actualmente no hay dudas de que existen factores desencadenantes, como pueden ser ciertas drogas del tipo del sulfonal, trional, barbitúricos, etc. (9,12,34,35).

Porfiria cutánea tarda: Este nombre fué usado por Waldenström para los casos que Günther designaba en su clasifica -

ción como "crónicos" y la actual denominación es preferible, pues expresa mejor el síntoma más notable de la enfermedad: la aparición tardía de fotosensibilidad y lesiones cutáneas y, aunque es cierto que esta forma es eminentemente crónica, también existe cronicidad en las eritropoyéticas y aun en algunas formas agudas intermitentes; por ello, es preferible no utilizar los términos "crónica" y "congénita".

En la mayoría de los casos de este tipo, la fotosensibilidad recién aparece luego de los 30 ó 40 años de vida; las lesiones cutáneas son semejantes a las del tipo eritropoyético, aunque la mutilación por lo general no es tan grave y puede deberse simplemente a la prolongada duración de la enfermedad.

También en este tipo existe una relación hereditaria y, al respecto, podemos mencionar un estudio realizado por Holti y colab. (50) en 19 miembros de cuatro generaciones de una misma familia, en la que pudieron hacer un diagnóstico presuntivo de porfiria cutánea tarda en 9 de sus integrantes, siendo el décimo el caso evidente que los condujo a hacer la investigación, por lo que concluyen que la transmisión hereditaria parecería ser a través de un gen dominante no ligado al sexo.

Por otra parte, en este tipo de porfirias la porfirinemia es mucho menos marcada que en la eritropoyética y, mientras que en esta última la Uro excretada por orina es casi absolutamente del tipo I, en la forma cutánea tarda la preponderante es la llamada "Uro tipo Waldenström", cuya constitución discutiremos más adelante.

Es además fundamental indicar que el contenido de la médula ósea es absolutamente normal en estos casos, en evidente

contraste con la forma eritropoyética.

Es frecuente que la piel tome una coloración marrón , a veces con matices púrpura o violáceos (15) y que se presente melanosis y cambios en la coloración del cabello.

Generalmente, en este grupo hay un trastorno hepático manifiesto, apareciendo cirrosis hepática, hígado graso, etc. Además, es sintomática la frecuencia de casos de alcoholismo en estos pacientes.

Químicamente, el síntoma más notable es la elevada excreción de porfirinas urinarias, tomando la orina un color rojo parduzco más o menos intenso, mientras que, a diferencia con la forma aguda, no se detecta la presencia de precursores de porfirinas.

Tipo mixto o combinado: Como su nombre lo indica, esta forma presenta manifestaciones cutáneas, abdominales y/o nerviosas, pudiendo estas últimas ser o no concurrentes con la fotosensibilidad.

En el hígado de estos pacientes se halla exceso de porfirinas o precursores, mientras que el contenido en médula ósea y eritrocitos es normal o levemente aumentado.

Uno de estos pacientes, estudiado por Schmid y colab. (16), presentaba una elevada fotosensibilidad durante un período, mientras que tenía escasos síntomas abdominales o nerviosos y, al siguiente, la situación se invertía. Estudiando el hígado del enfermo se halló que, durante el lapso de fotosensibilidad, contenía fundamentalmente porfirinas y presentaba una intensa fluorescencia roja a la luz U.V.; en cambio, en el otro período, el

hígado contenía una gran cantidad de un compuesto pirrólico no fluorescente, que era precursor de porfirinas, pues se convertía en éstas por calentamiento de un homogenato del hígado; es decir, que era PBG.

La evidente relación entre la variación de la proporción de precursores y porfirinas preformadas, hallada en un mismo paciente en distintos períodos y la sintomatología presentada durante los mismos, le sugirió a Watson la existencia de una relación íntima entre los tipos agudo intermitente y cutánea tarda, siendo los del tipo combinado una forma de transición.

En forma independiente, Nesbitt y Watkins (36), Garcin y Lapresle (25) y otros, habían comunicado la observación de casos de porfiria aguda que presentaban fotosensibilidad y también es notable la existencia de familias en las que algunos miembros sufrían de porfiria aguda, mientras que otros presentaban sólo fotosensibilidad o manifestaciones del tipo cutánea tarda (37,38).

Esto apoya evidentemente el concepto de Watson de que tanto la porfiria aguda, como la cutánea tarda, son tipos distintos de la misma forma hepática.

En cambio, Rimington y sus colaboradores (39, 40) consideran a las dos formas como fundamentalmente distintas y clasifican a las porfirias del tipo mixto o combinado como formas cutáneas, completamente independientes de las agudas, basándose especialmente en el concepto de que las mixtas, durante los períodos de remisión, contienen mucha mayor cantidad de porfirinas en materia fecal que las agudas.

Sin embargo, este hecho no puede considerarse de importancia primordial, dado que en el tipo agudo la mayor parte de los pirroles anormalmente sintetizados se eliminan exclusivamente por orina (como PBG), mientras que en la cutánea tarda no hay excreción de precursores y, en cambio, la mayor parte de la Copro y toda la Proto excretada están en materia fecal.

Nicholas y Rimington (41) se basan además para clasificar las porfirias, en la distinta composición de la porfirina de Waldenström excretada en los dos casos, lo que se discute "in extenso" más adelante.

En general, podemos resumir los datos clínicos y químicos de los tres grupos fundamentales de porfirias como se observa en la Figura 2:

CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS			
	PORFIRIA ERITROPOYETICA	PORFIRIA HEPATICA	
		Aguda intermitente	Cutánea tarda
Edad de comienzo	Infancia	Adulta	Adulta avanzada
Síntomas clínicos	Fotosensibilidad Eritrodoncia Hipertricosis Hiperplasia medular Esplenomegalia Anemia hemolítica	Cólico abdominal Parésia y parálisis Trastornos psíquicos Hipertensión Oliguria	Fotosensibilidad Pigmentación de la piel Disfunción hepática
Datos químicos			
Orina	Color rojo; fluorescencia roja a la luz U.V.; espectro de absorción de porfirinas libres Gran cantidad de Uro.I y Cop.I NO CONTIENE ALA y PBG (*)	Color: puede ser normal y se oscurece con el tiempo. Por lo general, no emite fluorescencia roja a la luz U.V. Espectro de absorción de complejo metálico. Excreta porfirinógenos y porfirina de Waldenström como complejo de zinc. Cop.III aumentada. GRAN CANTIDAD DE ALA y PBG	Color rojo. Fluorescencia roja a la luz U.V. Espectro de absorción de complejo metálico. Gran cantidad de porfirinas de Waldenström (constituida fundamentalmente por Uro.I, algo de Uro. III y Piriaporfirina III) en forma de complejo de zinc. ALA y PBG NO ESTAN AUMENTADOS.
Sangre	Eritrocitos: contienen Uro.I, Cop.I y Prot.IX aumentados.	Normal	Normal
Médula	Gran cantidad de Uro.I, Cop.I y Prot.IX	Normal	Normal
Hígado	Contiene porfirinas en cantidad ligeramente aumentada.	Gran cantidad de porfirinas y precursores (porfirinógenos).	Gran cantidad de porfirinas.
Bazo	Gran cantidad de Uro.I, Cop.I y Prot.IX		

(*) ALA: ácido delta amino levulico ; PBG: Porphobilinógeno

Figura 2(x)

(x):Reproducida, con algunas modificaciones, de : GRINSTEIN,M.:

Rev. Asoc. Med. Arg., 73, 518 (1959).

No obstante, es necesario mencionar que, posteriormente, Waldenström (42) sugirió que la porfiria aguda debería ser denominada como una "pirrolia", ya que el PBG (precursor pirrólico de las porfirinas) siempre se hallaba aumentado en la orina y, en base a esta sugestión, Eales (43) la llamó "pirroloporfiria".

Hace unos meses, Waldenström et al. (44), en base a sus estudios sobre porfiria aguda en Suecia y a los efectuados por el grupo de Dean en Sudáfrica (32,45,46,47), propuso la existencia de un nuevo tipo de porfiria a la que denominó "Protocoproporfiria o Porfiria Variegata", la que si bien sería similar en ciertos aspectos a la aguda intermitente, se caracterizaría por su alto contenido de Proto y Copro en heces y a este tipo corresponderían, según los trabajos de Barnes (48) y Eales (47), los casos sudafricanos.

Asimismo, Waldenström clasifica en este grupo ciertos casos de porfiria cutánea, a los que se resiste a denominar "tarda" por la aparición de fotosensibilización a edades relativamente tempranas, como ser los estudiados por el grupo de Rington en Inglaterra (49,50) y Tio en Holanda (51), los que habían sido denominados originalmente como del tipo cutánea tarda.

Waldenström, en base a estudios genéticos realizados, reclasifica a las porfirias en:

- a) Porfiria aguda intermitente
- b) Protocoproporfiria o Porfiria variegata
- c) Porfiria cutánea tarda
- d) Porfiria congénita (de la que no observa ningún caso en Suecia)

Finalmente, hace notar el caso de una familia sueca, recientemente estudiada por Haeger-Aronsen (52,53), compuesta por el paciente, de 39 años y sus dos hijas de 8 y 14 años de edad, en la que todos sus miembros sufrían de fotosensibilidad desde la infancia y tenían un alto contenido de Proto en eritrocitos y gran cantidad de normoblastos fluorescentes en médula ósea. La madre y hermana del paciente tenían significativamente aumentada la cantidad de Proto en glóbulos rojos, pero como nunca habían evidenciado fotosensibilización, se las consideró como típicos casos latentes.

Por consiguiente, la enfermedad identificada a través de tres generaciones de una misma familia, parecería transmitirse a través de un gen dominante.

Waldenström denomina a este tipo "Protoporfiria eritropoyética" y la clasifica como un nuevo tipo de trastorno del metabolismo de las porfirinas; otros casos similares fueron previamente descritos en Alemania (54) y en Inglaterra (55).

En consecuencia, concluye en que habría por lo menos cinco tipos genéticos distintos de "inborn errors" del metabolismo de las porfirinas.

PORFIRINAS

Las porfirinas existen en la naturaleza tanto libres como combinadas. Ejemplos de estas últimas son la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasa, que son todos complejos porfirínicos hierro-protéicos.

Asimismo, en el ser humano aparecen Copro y Uro como complejos de zinc y también se encuentran pequeñas cantidades de

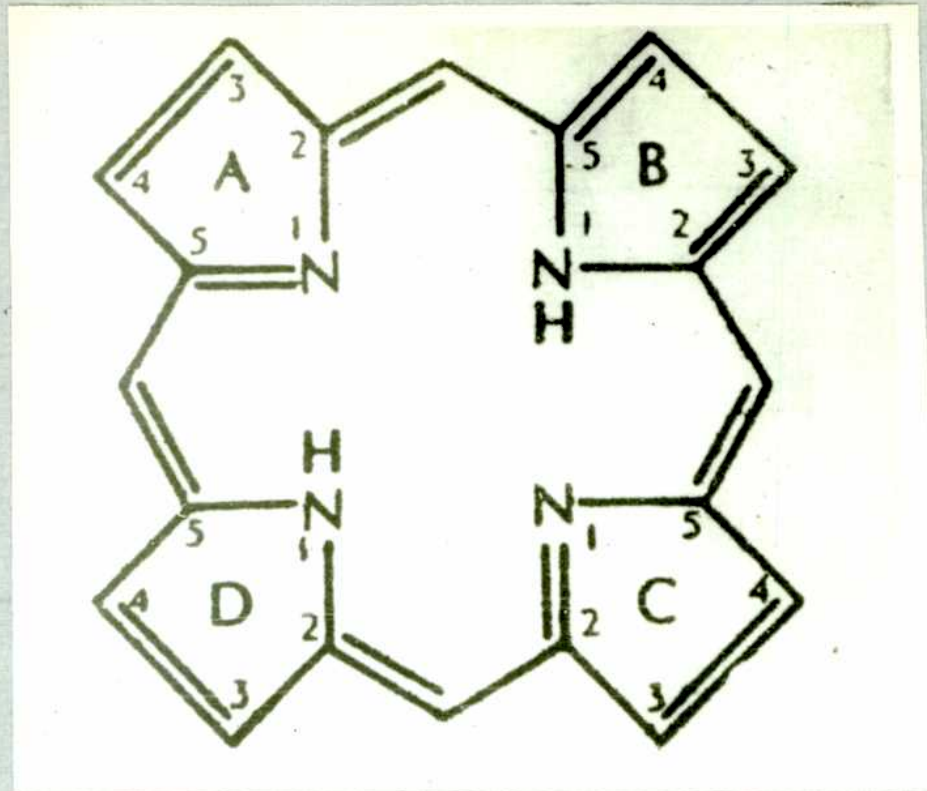


Figura 3 : Porfina

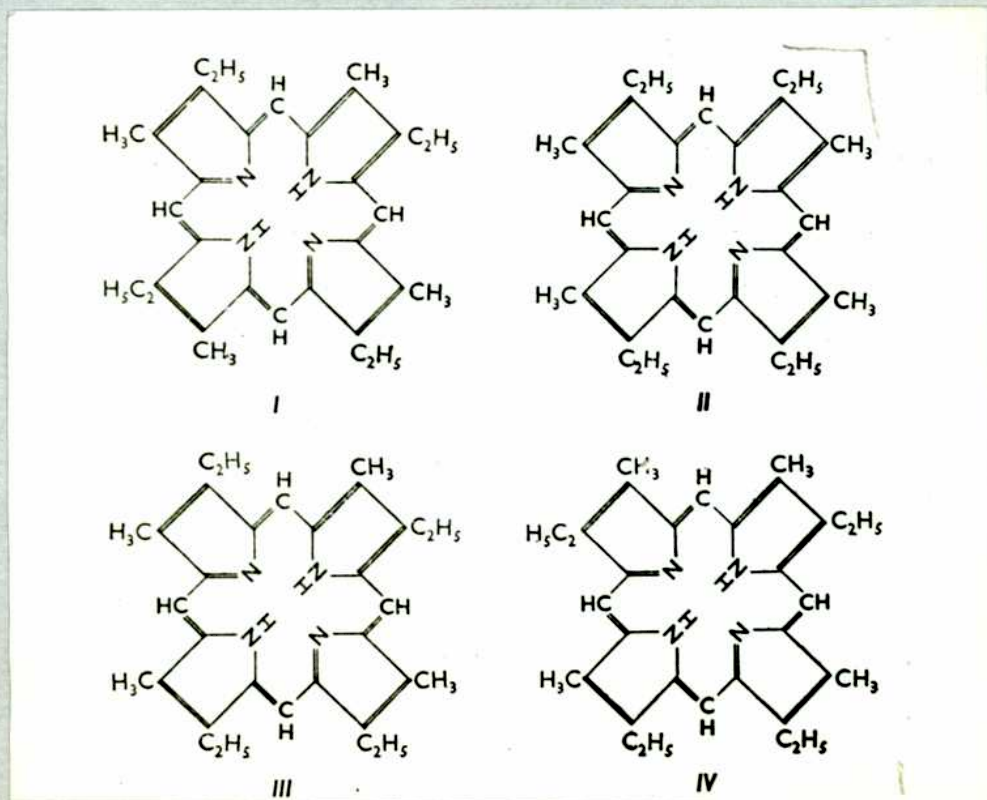


Figura 4 : Etioporfirinas

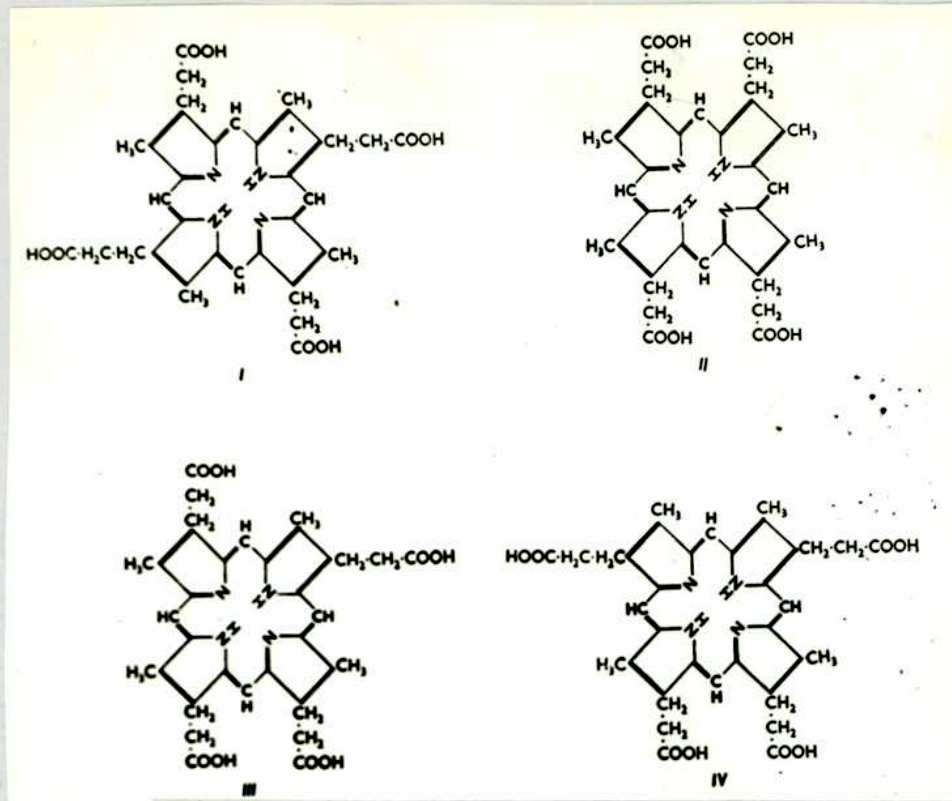


Figura 5 : Coproporfirinas

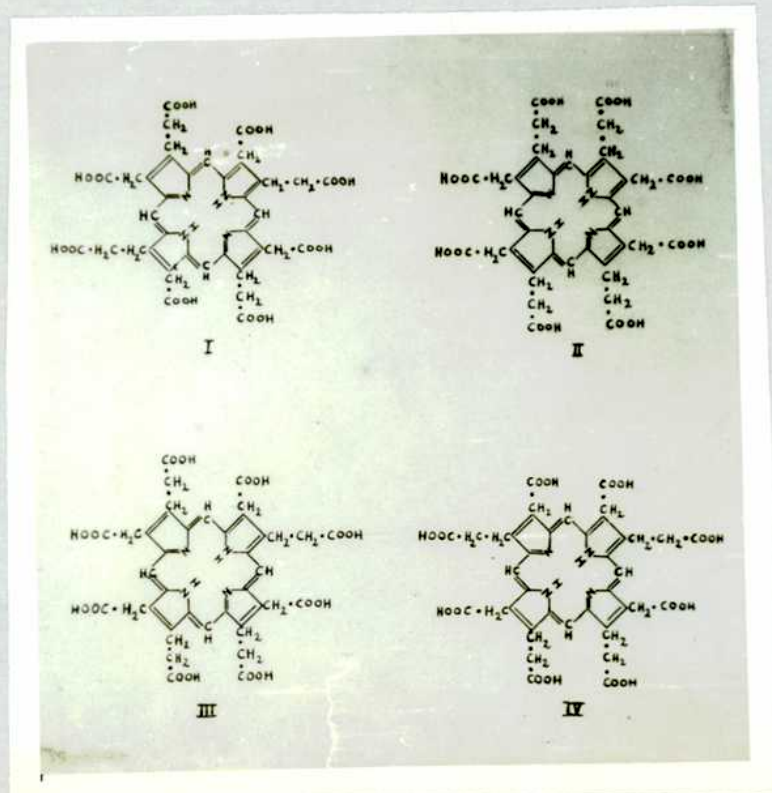


Figura 6 : Uroporfirinas

Proto y Copro libres de eritrocitos, médula ósea e hígado.

En el reino vegetal la porfirina más difundida es la clorofila, que es un complejo de magnesio.

El estudio químico de estas sustancias, comenzó con los trabajos ya citados de Hoppe-Seyler (6) y Nencki y Sieber (7) sobre la hematoporfirina y durante muchos años se pensó que ésta era la sustancia excretada por orina en los casos patológicos, pues la espectroscopía de entonces no permitía diferenciarlas.

Recién en 1915, Hans Fischer logra aislar en forma pura y cristalina las dos principales porfirinas excretadas por el caso Petry y demuestra que son diferentes a la hematoporfirina.

A la eliminada fundamentalmente en las heces y soluble en éter etílico la denomina Coproporfirina y a la otra, que encuentra en su mayor parte en orina y era insoluble en éter etílico, la llama Uroporfirina (56,57,58).

Luego en las dos décadas siguientes, aclara la estructura de la mayor parte de las porfirinas aisladas de material biológico, pues al sintetizar los cuatro isómeros posibles de las etio y coproporfirinas (Fig. 4 y 5), puede demostrar que la Proto IX es de tipo isomérico III (con relación a las etio); asimismo, la sintetiza y, en 1929, logra sintetizar la hemoglobina (59,60).

La comparación de la Copro obtenida del caso Petry con las sintetizadas químicamente, le permite identificarla como Copro I y el estudio de la Uro proveniente del mismo paciente, lo conduce a establecer sus propiedades físicas, químicas y, poste-

riormente, su estructura.

Así determina que es insoluble en éter etílico y en la mayoría de los solventes orgánicos comúnmente usados en porfirinas y que tiene un punto de fusión de 293°C . También indica que contiene 8 carboxilos en la molécula, de los que 4 se pierden cuando se la descarboxila por el método de Fischer y Zerweck (61), obteniéndose una Copro que, comparada con las sintéticas, identifica como tipo I.

Por éstos y otros estudios químicos realizados, propone como estructura más probable de las Uro, la de una porfina (Fig. 3) con los hidrógenos beta de los anillos pirrólicos sustituidos por cuatro restos acéticos y cuatro propiónicos, siendo la aislada del caso Petry, Uro I (porfina-1-3-5-7-tetracética-2-4-6-8-tetrapropiónica), proposiciones que fueron luego comprobadas por MacDonald y Stedman (62), quienes lograron sintetizarla, confirmando la fórmula de Fischer (Fig. 6).

De esta manera, Fischer demuestra por primera vez la existencia de porfirinas de tipo isomérico I en materiales biológicos, a pesar de que la única porfirina de utilidad fisiológica conocida es la Proto IX, de tipo isomérico III.

En el ínterin, van den Bergh (63) en 1928, logra identificar Copro III en un caso de "porfiria congénita", observación confirmada por otros investigadores (13,64) quienes comprueban que, tanto la Copro I como la III, son componentes constantes y frecuentes en materiales biológicos animales y vegetales, aun en condiciones normales

Asimismo, primero Fischer (65) y más recientemente Ni-

cholas y Rimington (66), han podido demostrar la presencia de Uro I, en cantidades del orden de microgramos por litro, en orinas humanas normales.

Es importante aclarar que, en ningún caso, pudo demostrarse la existencia de una Proto de tipo isomérico I.

PORFIRINA DE WALDENSTRÖM

En 1935, Waldenström (67,68) informa haber aislado de orinas de porfirias agudas una porfirina que, si bien tenía algunas propiedades similares a la Uro I, presentaba un comportamiento químico bien distinto a ésta.

Se asemejaba a la Uro I en que era insoluble en éter etílico, tenía el mismo espectro de absorción y el análisis elemental de C, H y N coincidía con el de ésta.

En cambio, su éster metílico fundía a 258-260°C (en lugar de 290-293°C de la Uro I) y era extraíble de la orina llevada a pH 3.0-3.2 por acetato de etilo.

Si bien el índice de metoxilo hallado era algo menor de 26,3 (valor correspondiente a 8 carboxilos), ésto era atribuido a un error sistemático del método.

Descarboxilando esta porfirina según el método de Fischer y Zerweck, Waldenström obtuvo un producto cuyo éster metílico fundía a 165°C y cuyo espectro era idéntico al de las Copro.

En base a estos resultados, la consideró Uro III e indicó que toda porfirina insoluble en éter etílico y extraíble de la orina, previamente llevada a pH 3.0-3.2, por acetato de etilo, debía ser identificada como Uro III; es decir, como una porfina-1-3-5-8-tetracética-2-4-6-7-tetrapropiónica (Fig.6).

Poco después, Mertens (69,70) obtuvo resultados similares, pero llama la atención que haya aislado la supuesta Uro III por simple precipitación, previa acidificación con ácido acético, método similar al empleado por Fischer para la Uro I y, además, el escaso rendimiento de Copro III que obtenía por descarboxilación de cantidades relativamente grandes de Uro.

Como resultado de estos trabajos, la presencia de Uro III en orina de porfíricos fué pronto aceptada universalmente y se sucedieron una serie de investigaciones tendientes a identificar esta porfirina en diversos materiales biológicos.

Así, Rimington (71) encuentra Uro III en material correspondiente a "ocronosis bovina" y luego (72) identifica como complejo cúprico de Uro III a la porfirina de la turacina (pigmento rojo que colorea las plumas del ave llamada Turacus) y que previamente había sido considerada por Fischer y Hilger (73) como Uro I.

Pero, en 1945, Grinstein, Schwartz y Watson (74) re-examinan la naturaleza de la P.W., introduciendo en el campo de las porfirinas la técnica cromatográfica de columna de carbonato de calcio y encuentran que no se comporta como una entidad química, sino como una mezcla, pues partiendo del éster metílico de la P.W., obtienen cromatogramas de más de una banda.

En algunos casos, partiendo de una P.W. que ellos denominan "Tipo A", consiguen fraccionarla en dos en la columna de carbonato de calcio. A la de la banda superior, la denominan Uro I y, luego de varias recromatografías y recristalizaciones, obtienen un punto de fusión de 284°C.

La inferior era también recromatografiada y recristalizada, fundiendo a 207-208°C, por lo que fué denominada "Porfirina 208".

Esta porfirina, de forma cristalina distinta a la Uro I o a las Copro y soluble en acetato de etilo a pH 3.0-3.2, daba un índice de metoxilo coincidente con el de una porfirina hepaticarboxílica y, por descarboxilación, parecía tener una estructura isomérica tipo III, pues se obtenía fundamentalmente Copro III.

De esta manera, se informa por primera vez la existencia de una porfirina de número de carboxilos intermedio entre 4(Copro) y 8(Uro).

Pero en otros casos de porfiria, Watson, Schwartz y Hawkinson (75) no consiguen fraccionar la P.W., pese a usar las mismas técnicas. No obstante, una vez descarboxilada, daba fundamentalmente Copro I.

Por lo tanto, concluyen que la P.W. que se comporta como una entidad cromatográfica es, muy probablemente, una combinación molecular de la Uro I y la Porfirina 208 y denominan a este complejo "Porfirina de Waldenström tipo B".

Posteriormente, distintos trabajos realizados en el laboratorio de Watson parecen confirmar estas investigaciones. Por ejemplo, hallan (76) que la P.W. tipo A también puede ser fraccionada en Uro I y Porfirina 208 por electroforésis; la determinación del número de carboxilos en distintas P.W. les dá valores que oscilan entre 7.5 y 7.7 (76); la inyección a un paciente de porfiria hepática, de Uro I-N¹⁵, aislada por Grinstein y colab.

(77) de un caso de porfiria eritropoyética, les conducía a hallar incorporación de N¹⁵ en la P.W. excretada (78).

Mientras tanto, estudios realizados por varios grupos de investigadores durante ese período (79,80,81,82), coinciden en que la P.W. está constituida fundamentalmente por Uro I (pues obtienen gran cantidad de Copro I por descarboxilación), pero no consiguen fraccionarla en Uro I y Porfirina 208.

Poco después, Nicholas (83) retoma la investigación y cromatografía las porfirinas en columnas de óxido de magnesio, técnica adoptada en lo sucesivo en el laboratorio de Rimington, pues indica no obtener buenos resultados con las de carbonato de calcio (aunque no dá detalles del por qué).

Asimismo, utilizan las técnicas de cromatografía en papel de Nicholas y Rimington (66) y de Falk y Benson (84) como métodos para controlar el estado de pureza de las porfirinas y si se trata de una entidad química o de una mezcla.

La primera de ellas, permite separar porfirinas libres mediante un solvente formado por lutidina-agua, siendo los Rf inversamente proporcional al número de carboxilos.

La de Falk y Benson, que se describe en detalle más adelante, separa los ésteres metálicos de porfirinas, siendo su principal ventaja la de distinguir los isómeros I y III de la Uro.

De los trabajos realizados por Falk y Benson (84), Nicholas y Rimington (41), Kennard y Rimington (85) y Canivet y Rimington (86), este último concluye que:

- a) La P.W. aislada de orina de porfirias agudas, es

una mezcla de aproximadamente 75% de Uro III y 25% de Uro I.

b) La P.W. aislada de porfirias cutánea tarda está formada principalmente por Uro I, con pequeñas cantidades de Uro III.

c) Al examinar una muestra de P.W. tipo A que les fuera suministrada por Watson, no consiguen fraccionarla en la columna de óxido de magnesio pero, por cromatografía en papel usando lutidina-agua, logran fraccionarla en un constituyente que corresponde a una porfirina de 8 carboxilos y en otro, que correspondería a una de 6.

d) Al recromatografiar la mancha principal, correspondiente a Uro, por el método de Falk y Benson, encuentran que se trata de Uro I, con una pequeña impureza de Uro III.

e) De una muestra de Uro I, también suministrada por Watson, obtienen un P.F.: 292-293°C y no 284°C (como informa éste) y confirman por cromatografía que se trata de Uro I.

f) Al cromatografiar una muestra de Porfirina 208 de la misma procedencia, encuentran que se comporta como una hexacarboxílica.

g) En ningún caso obtienen de medios biológicos una porfirina similar a la "208".

h) Al reestudiar una Uro aislada por Gray (82) e identificada como Uro I, concluyen en que es principalmente Uro III.

Las conclusiones a las que arribó la escuela de Rimgington, estimularon nuevos trabajos del grupo de Watson en los que aplicaron algunas de las técnicas usadas por aquellos, comparándolas con las propias y utilizando algunas técnicas nuevas,

como la de descarboxilación cuantitativa de Edmonson y Schwartz (87).

Los resultados obtenidos, detallados en los trabajos de Watson (2) y Watson y Berg (88), les permitieron concluir que, si bien la P.W. tipo A era fraccionable por el método de la columna de carbonato de calcio, se comportaba como una entidad cromatográfica utilizando óxido de magnesio en las condiciones aconsejadas por Nicholas (83), lo que explicaría por qué no encuentra Rimington Porfirina 208.

Además, una P.W. tipo A aislada de orina y cromatografiada en papel, según el método de Falk y Benson, se comportaba a veces como una Uro III.

Si se agregaba una mezcla preformada de 80% de Uro I y 20% de Porfirina 208 a una orina normal a pH 8, se dejaba a 4°C hasta el día siguiente y luego se extraían las porfirinas con acetato de etilo, habiendo llevado previamente la orina a pH 3.2, la P.W. así extraída se comportaba como una del tipo B y la cromatografía en papel indicaba que sería una Uro III.

Al efectuar un nuevo estudio de la porfirina de Gray antes citada, por el método de descarboxilación de Edmonson y Schwartz, encuentran un 80% de Copro I y un 20% de Copro III aproximadamente.

Pero la objeción fundamental que Watson hace sobre los trabajos de Rimington, es que éste pone especial énfasis en todas sus publicaciones en aclarar que, en los casos de porfiria aguda estudiados, las orinas "dadas" que el PEG es el principal producto excretado en porfirias agudas, fueron o bien precalentadas en baño de agua hirviente durante 20 minutos a pH 4.2, o

dejadas varios días a temperatura ambiente, hasta que todo el PBG se convirtiera en Uro" (41).

Importa hacer notar que el término "Porfirina de Waldenström" fué usado por primera vez por Grinstein y colab. (74) y Watson y colab. (75) para designar a la porfirina aislada por el método de Waldenström u otros, pero siempre sobre orinas sin calentar y, más aún, sobre orinas frescas o, como lo hizo Gray (82), conservadas en la heladera.

No cabe duda que la formación de Uro a partir de PBG por calentamiento de la orina, puede conducir a otros isómeros que no necesariamente deben ser los naturales y, en este caso, la divergencia entre los dos grupos de investigadores se debería a que el laboratorio de Rimington ha estudiado un producto que es artificial. Apoya esta opinión un trabajo de Cookson y el mismo Rimington (89) en el que indican que, por calentamiento a 100°C de soluciones de PBG, obtienen una Uro artificial, a la que ellos llaman P.W. (no indican por qué) y que parece tener las características de una Uro III.

Posteriormente, Grinstein (90) estudia una serie de casos de porfiria cutánea tarda, obteniendo la conclusión de que en estos casos se excreta por orina principalmente Uro I y Porfirina 208. Asimismo, encuentra cantidades menores de Copro I y III y dos porfirinas que parecerían ser, por su ubicación en la columna de carbonato de calcio, de 5 y 6 carboxilos.

Además, por su asociación especial con el estado de porfiria, sugiere la denominación de Firiaporfirina III para la Porfirina 208.

Finalmente indica que no pudo identificar alguna porfirina que tuviera las características de la Uro III.

Chu y Chu (91) publican en 1957 un trabajo en el que informan haber obtenido buenas separaciones de porfirinas, cromatografiando extractos de orinas de porfirias cutáneas y agudas en columnas de Hyflo-Super-Cel, marca comercial de una tierra de diatomeas.

Las fracciones que obtienen, las controlan por cromatografía en papel, según los métodos de Falk y Benson (84) y de Chu, Green y Chu (92).

Hacen extractos totales, bien por absorción con talco (ver la parte de métodos), o según el método de Waldenström (68) y encuentran que, según sus resultados, la P.W. parecería ser un grupo de porfirinas extraíbles por acetato de etilo y que estaría formada por proporciones variables de Uro I, Uro III, una porfirina que ellos llaman "7III" y, probablemente, por algo de "7I".

A la porfirina "7III", la hallan semejante a la "208" de Watson, pero dudan algo de su identidad, pues notan algunas diferencias en el punto de fusión y número de ácido clorhídrico.

La "7I" sería una porfirina heptacarboxílica de la serie I.

Además, sugieren que, en algunos casos, la cantidad de "7III" podría ser tan pequeña, que el producto fuera similar a la P.W. tipo B de Watson.

Porfirinas Hepta-, Hexa- y Pentacarboxílicas

Como ya hemos indicado antes, en 1945 Grinstein y col.

(74) aislaron de orina de porfirias cutánea tarda una porfirina heptacarboxílica, que denominaron "Porfirina 203", a la que identificaron como de tipo isomérico III.

Posteriormente, Falk y col. (93, 94, 95) en una serie de artículos, demuestran la formación de varias porfirinas por incubación de eritrocitos de pollo, o sus hemolizados, con ALA o PBG.

Entre las porfirinas formadas, separan e identifican una, a la que ellos llaman Pseudouroporfirina, que también estaba presente en casi todas las muestras provenientes de orinas de distintos tipos de porfiria (96).

Si bien Falk al estudiar comparativamente su PsU y una muestra de Porfirina 208 suministrada por Watson, halla algunas diferencias entre ambas (84), los estudios recientemente publicados por Battle y Grinstein (97) confirman la identidad entre la obtenida de orinas humanas patológicas y la biosintética y que ésta es de tipo isomérico III.

Asimismo, estos autores proponen definitivamente el nombre de Firiaporfirina III, que ya fuera sugerido por Grinstein (90), para esta porfirina, denominación que adoptaremos en el presente trabajo.

Por otra parte, en 1959 Chu y Chu (98) estudian en mayor detalle las porfirinas de orina de porfirias cutánea tarda, que Grinstein (90) obtuviera por cromatografía en columnas de carbonato de calcio como bandas ubicadas entre las de Uro y Copro y que denominara Firia III y Porfirinas X y concluyen que se trata de tres porfirinas de 7, 6 y 5 carboxilos, siendo cada una mezclas de distintas proporciones de isómeros I y III. Así,

las denominan 7I III, 6I III y 5I III.

Biosíntesis de Porfirinas

En los últimos años se han publicado numerosas puestas al día sobre este tema (99,100,113), por lo que sólo nos referiremos someramente a los aspectos más destacados que conducen al camino biosintético conocido hasta la fecha.

Shemin y col., en base a una serie de investigaciones que desarrollaron, propusieron en 1955 (101) la existencia de un ciclo que permite interpretar la formación de ALA a partir de glicocola y succinato como precursores, el que estaría relacionado con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Asimismo, Shemin y Russell (102) ya habían demostrado en 1953 que el ALA podía reemplazar a la glicocola y al "succinato activo" en la biosíntesis de porfirinas y Dresel y Falk (103) probaron su conversión en PBG y, posteriormente, en porfirinas.

Por otra parte, la formación de éstas a partir de PBG ya había sido sugerida por Waldenström y Valquist (104) en 1939 y demostrada por Westall (105) y otros autores (95,106).

De esta forma, es actualmente un hecho que la Uro III es el producto de oxidación de la primera de las porfirinas que se forma en el camino biosintético normal, el UPG III, lo que, en su momento, revolucionó las ideas existentes sobre el metabolismo de las porfirinas, pues resultó evidente el significado anabólico de las mismas, en completa oposición a los pigmentos biliares, que son productos del catabolismo del hemo.

Posteriormente, diversas hipótesis se elaboraron para explicar la formación enzimática de un compuesto asimétrico, co-

mo lo es la Uro III, por condensación de un único precursor monopirrólico, el PBG (104,106,107,108).

Ya en 1949, Grinstein y col.(77) hallaron que la Uro es un producto anabólico asociado a la biosíntesis del hemo. Posteriormente (109) sugiere en 1950 que la Copro III es el precursor inmediato de la Proto IX. No obstante, no cabe ya duda de que los verdaderos intermediarios en la biosíntesis de ésta son los porfirinógenos (110,111,112,113), es decir las formas reducidas de las porfirinas.

De acuerdo a ello, el camino biosintético actualmente conocido se puede esquematizar como se ve en la Fig. 7 :

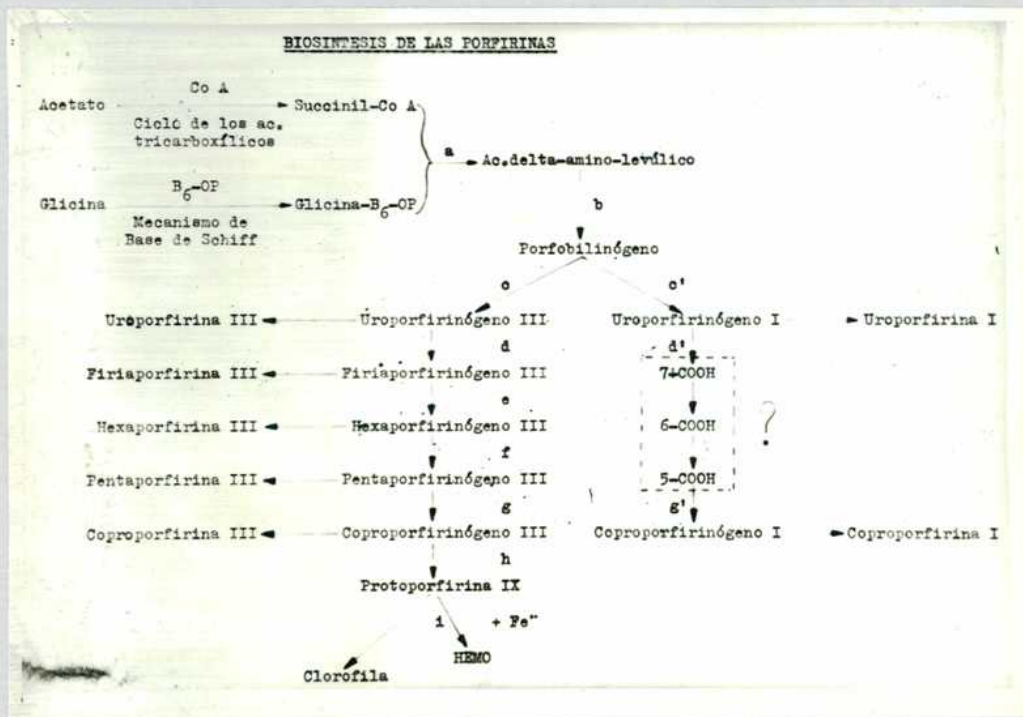


Figura 7

Es de destacar que la existencia del FPG III como intermediario normal en el camino metabólico del hemo, ha sido recientemente demostrada por Battle (113) en nuestro laboratorio.

En cuanto a la serie isomérica I, sería el resultado

de una biosíntesis secundaria a la de la serie III, que adquiere especial importancia en las anomalías metabólicas que se distinguen como porfirias.

No está aclarado aún si la transformación de UPG I a CPG I se hace por etapas de una descarboxilación, pasando por los intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos.

Porfiria por intoxicación con Hexaclorobenceno

Antes de 1956, la porfiria no se conocía en Turquía, pero, durante el verano de ese año, aparecieron un gran número de casos, sobre todo en el sudeste del país.

Si bien, según comenta Schmid (114), se clasificaron en un primer momento como eritropoyéticas, a medida que el número de casos aumentaba se hacía evidente que el síndrome correspondía más al de la porfiria cutánea tarda.

Sin embargo, resultaba muy sospechoso que la incidencia fuera mucho mayor en niños y adolescentes que en adultos, a la inversa de lo que ocurre comúnmente con esta enfermedad.

Una investigación sistemática, llevó a la conclusión de que todos los pacientes habían ingerido pan elaborado con trigo tratado con un fungicida a base de hexaclorobenceno, por lo que se sospechó que esta droga era la que producía un estado intoxicativo similar a la porfiria.

Ockner y Schmid (115) confirmaron esta suposición al conseguir producir porfiria experimental en ratas por administración de hexaclorobenceno. Además de los síntomas clínicos, observaron un aumento en la excreción urinaria de porfirinas y precursores.

Posteriormente, De Matteis, Prior y Rimington (116) estudiaron la porfiria producida por hexaclorobenceno en conejos, cobayos, ratones y ratas, detallando la sintomatología y analizando las porfirinas excretadas por orina, las que dividían en dos fracciones : Uro y Copro.

Indican que en orina de conejos encuentran principalmente Uro y Firia y buena cantidad de Hexa, Penta y Copro, lo que les lleva a sugerir la semejanza con una porfiria hepática en la que estuviera inhibido el mecanismo de descarboxilación de UPG.

En cambio, en la orina de ratas encuentran fundamentalmente Copro III, con sólo trazas, si las hay, de porfirinas intermedias entre ésta y Uro.

OBJETO DEL TRABAJO

El estado de los conocimientos sobre este tema en el momento de comenzar el presente trabajo, que es el descrito hasta aquí, nos condujo a pensar en la conveniencia de aclarar diversos puntos en controversia, a saber :

1º) La proporción relativa en que se excretan las distintas porfirinas en orinas de porfirias cutánea tarda.

2º) La verdadera composición de la P.W.

3º) Si la fracción Uro, que tanto Watson como Grinstein clasificaban como Uro I, no sería realmente una mezcla de Uro I y III, ya que era sugestivo que informaran como punto de fusión constante de esta fracción 284°C , en lugar de $292-293^{\circ}\text{C}$, que es el P.F. aceptado para la Uro I.

4º) Determinación de la estructura isomérica de la Firia III excretada por orina.

5º) Aislamiento y determinación de la estructura isomérica de las porfirinas Hexa y Penta.

6º) Interpretación de los resultados en base a los conocimientos actuales sobre biosíntesis de porfirinas y

7º) A raíz de que el Lic. Eduardo Charreau había intoxicado un grupo de ratas con hexaclorobenceno y recogido las orinas correspondientes, con miras a una investigación que, por causas fortuitas, tuvo que suspender, nos pareció interesante estudiar la composición cuali-cuantitativa del complejo porfirínico excretado por orina y así compararlo con el material de casos humanos patológicos.

Por consiguiente, éstos han sido los objetos de la presente investigación.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

M E T O D O S

A) DETERMINACION CUALITATIVA DE PORFIRINAS Y PRECURSORES

Cantidades anormalmente altas de porfirinas en orina fueron determinadas en forma cualitativa por observación directa con un espectroscopio marca Winkel - Zeiss.

Para ello se tomó un volumen adecuado de orina en un tubo de ensayos o, si la concentración de porfirinas era menor, en un recipiente de diámetro adecuado (5 - 10 cm) y se observó si el espectro presentaba las bandas de absorción a 578 y 539 $m\mu$, que corresponden a complejos metálicos de porfirinas.

En caso afirmativo y para descartar la posibilidad de que fuera oxihemoglobina, se agregó unas gotas de ácido clorhídrico concentrado; si eran porfirinas urinarias, se obtenía un espectro con una banda intensa y ancha a 553 $m\mu$ y otra más débil a 598 $m\mu$ aproximadamente, mientras que si lo que contenía la orina era oxihemoglobina, se observaba el espectro de la hematina en medio ácido con una banda intensa en la zona del rojo (630 - 640 $m\mu$).

Además se observó si las orinas presentaban fluorescencia roja a la luz U.V.

La existencia de precursores de porfirinas (ALA y PBG) en orina, se determinó mediante el reactivo normal de Ehrlich (5).

B) CONCENTRACION DE LAS PORFIRINAS DE ORINA

Para extraer las porfirinas de orina, se utilizaron dos métodos descritos con anterioridad por el grupo de investiga-

res del laboratorio de Watson (74, 90, 117).

1º) Método de extracción:

Se realizó según el método original de Waldenström (12), descrito en detalle por Grinstein (90), con algunas modificaciones; es decir, una vez llevada la orina a pH 3.0 - 3.2 (color gris del papel de Rojo Congo) con ácido clorhídrico concentrado, se extrajeron las porfirinas con sucesivas porciones de éter etílico, hasta fluorescencia negativa en el extracto.

Luego se extrajo la orina con acetato de etilo, con suave agitación para evitar la formación de emulsiones, también hasta fluorescencia negativa.

Los extractos etéreos, a los que se denominó "Fracción Copro", se destilaron al vacío hasta sequedad. Los extractos de acetato de etilo, rotulados "Porfirina de Waldenström", o bien se evaporaron en desecador al vacío si el volumen era pequeño, o se extraían con sucesivas porciones de ácido clorhídrico acuoso al 10%, llevando luego los extractos a pH 3.0 - 3.2 con acetato de sodio puro y adsorbiendo las porfirinas con talco, como se describe a continuación.

2º) Método de adsorción con talco:

A las orinas, previamente llevadas a pH 3.0 - 3.2 como en el caso anterior, se les agregó una cantidad suficiente de talco para adsorber las porfirinas en forma cuantitativa.

Se halló que la cantidad necesaria de talco varía entre 20 y 50 gramos por litro de orina, de acuerdo a la concentración de porfirinas.

En todos los casos, se controló si la adsorción había sido total, filtrando un pequeño volumen de la suspensión de tal-

co y observando espectroscópicamente. Si se veían bandas de absorción, se agregaba más talco y se repetía la operación.

Luego se filtró el volumen total por un embudo Büchner de tamaño adecuado (lo más grande posible) y el talco se prensó para eliminar la mayor cantidad de líquido posible; éste es un detalle importante para obtener el mejor rendimiento posible en la esterificación posterior.

Se utilizó talco puro, lavado, de distintas procedencias, sin encontrar diferencias apreciables en la operación.

Este método de adsorción, resultó muy conveniente para la extracción de volúmenes grandes de orina (5 a 10 litros por vez).

C) ESTERIFICACION DE LAS PORFIRINAS

Las porfirinas se eluyeron del talco suspendiéndolo, lo más homogéneamente posible, en un volumen adecuado de una mezcla formada por 19 volúmenes de metanol y uno de ácido sulfúrico concentrado.

La suspensión se filtró por embudo Büchner y la extracción se repitió tantas veces como fuera necesario para obtener un filtrado con fluorescencia negativa.

Valoraciones de la concentración de ácido en la mezcla esterificante, antes y después de suspender talco en ella, indicaron que había una pérdida de acidez durante la elución del talco; por ello se agregó 2 ml más (aproximadamente) de sulfúrico concentrado por cada 100 ml de mezcla en esterificación, encontrando que, de esta manera, disminuía la cantidad de material que quedaba sin esterificar.

La solución de porfirinas en metanol-sulfúrico se dejó

esterificar de 24 a 48 horas, en la oscuridad; al cabo de este tiempo, se pasaron las porfirinas a cloroformo de la siguiente forma : a la mezcla esterificada se le agregó un volumen igual de cloroformo y tres volúmenes de agua destilada; se agitó convenientemente y luego se dejó en reposo hasta que se separaran dos capas por decantación (1 a 3 horas).

Se separó la capa clorofórmica, la que se lavó dos veces con un volumen igual de agua, una vez con amoníaco al 10% , nuevamente dos veces con agua y, por último, con solución de cloruro de sodio al 7%, para romper eventuales emulsiones.

Finalmente, la capa clorofórmica se filtró por papel embebido en cloroformo y se destiló la solución al vacío, hasta sequedad.

De esta forma, se obtenía el extracto final de porfirinas para su ulterior purificación e identificación de sus componentes.

D) PURIFICACION Y SEPARACION DE LAS DISTINTAS PORFIRINAS POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE CARBONATO DE CALCIO

La técnica utilizada se basa en el método descrito originalmente por Tswett y adaptado para porfirinas en el laboratorio de Watson (74).

Se utilizaron tubos cromatográficos de diferentes medidas, del tipo descrito por Zechmeister y Cholnoky (118), como se puede observar en la figura 8. Las medidas más usuales fueron 22 mm de diámetro por 240 mm de largo; 19 mm x 190 mm y 7 mm x 150 mm.

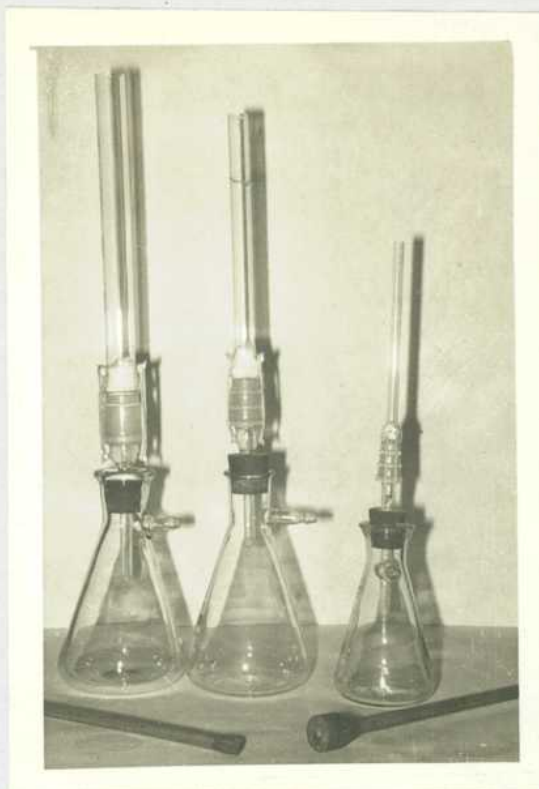


Figura 8

Tubos cromatográficos tipo Zechmeister-Cholnoky

Se utilizaron diversas partidas de carbonato de calcio precipitado pesado de distintas procedencias, pero entre uno puro que simplemente respondía a las exigencias de la farmacopea y otro May & Baker para cromatografía, se halló sólo leves diferencias (por ejemplo, velocidad de pasaje del solvente) atribuibles a discrepancias en el grado de división de ambos. En ningún caso se encontró diferencias en la separación de las distintas porfirinas.

La operación cromatográfica se puede dividir en las siguientes etapas:

a) Preparación de la columna: Una vez armado el tubo sobre el Kitasato como se ve en la figura 8, se introduce en su base un trozo de algodón tal que, apretado, llegue hasta donde el

tubo adquiere diámetro uniforme (arriba de la soldadura del esmeril).

Luego se conecta el Kitasato a la línea de vacío y se comienza a agregar carbonato de calcio por la parte superior del tubo, golpeando suavemente las paredes para lograr un asentamiento uniforme y compacto y se incrementa gradualmente la succión aplicada.

Cuando el carbonato de calcio agregado llega casi al borde superior, se presiona suavemente mediante pequeños golpes aplicados en la superficie con un pistón que se adapte lo mejor posible al diámetro interior del tubo.

Se utilizaron pistones de madera o bien confeccionados con una varilla de vidrio gruesa a la que se le adaptó en la punta un tapón de goma, de superficie lo más plana posible, y de diámetro adecuado (ver figura 8).

Es importante hacer notar que, una vez aplicado el vacío, éste no se debe interrumpir hasta finalizar la cromatografía pues sino se producen resquebrajaduras en la columna, arruinándose la operación. El vacío aplicado debe estar aproximadamente entre 10 y 40 mm de mercurio.

b) Adsorción de la muestra en la parte superior de la columna: Los ésteres metílicos secos obtenidos como se indicó anteriormente, se deben disolver en benceno. Como en general, son poco solubles, se humedece previamente el residuo seco con 2 ó 3 gotas de cloroformo y luego se agrega un volumen tal de benceno caliente como para lograr una solución homogénea.

Esta solución se agrega por la parte superior de la columna, se deja adsorber casi por completo y luego se va agregando

pequeñas porciones de benceno caliente, hasta que el líquido en la cabeza de la columna quede incoloro.

La columna siempre debe tener líquido sobre su superficie pues si se seca, el carbonato se despegas de la pared del tubo, escurriendo el solvente por el intersticio, en lugar de pasar a través de la columna.

En este momento, se comienza el agregado del solvente de desarrollo.

c) Desarrollo de la cromatografía: El solvente de desarrollo más comúnmente usado fué una mezcla de benceno-cloroformo en la proporción de 4:1. No obstante, cuando se trataba de recromatografiar fracciones para purificarlas, se variaban las proporciones según se quisiera aumentar o disminuir la velocidad de desplazamiento de las porfirinas.

Por ejemplo, para purificar Copro se usó benceno puro o aún agregándole éter de petróleo, para retardar todavía más su avance; en cambio, cuando se trataba de Uro, se aumentaba la proporción de cloroformo en la mezcla hasta 5:2 o aún más.

A medida que va pasando el solvente de desarrollo, las porfirinas van avanzando y, gradualmente, separándose; se continúa el agregado de solvente hasta obtener un cromatograma estable en cuanto al número y separación de las bandas (lo que se controla fácilmente siguiendo la cromatografía por fluorescencia con una lámpara de luz U.V.), o bien hasta que la porfirina de mayor desplazamiento haya recorrido las $3/4$ partes del largo útil de la columna.

En este momento se suspende el agregado de solvente y se deja secar la columna hasta que no gotée más en el Kitasato

(por lo menos, 20 ó 30').

d) Expulsión de la columna, revelado y separación de las distintas porfirinas: Una vez seca la columna, se desconecta el vacío, se desarma el tubo, se saca el algodón de su base y se expulsa la columna de carbonato colocando el tubo sobre un papel apergaminado apoyado sobre una superficie plana y haciendo una suave, pero continuada presión, con el pistón sobre la base de la columna.

De esta forma, la columna sale entera en forma de vela y, observándola en la oscuridad con luz U.V., las bandas de porfirinas aparecen como zonas de intensa fluorescencia roja, pudiéndose las cortar separadamente con un bisturí, con las debidas precauciones para que la columna no se disgregue.

e) Elución de las porfirinas: Las porfirinas adsorbidas en cada una de las bandas, se eluyen del carbonato de calcio suspendiéndolo en cloroformo y filtrando la suspensión por un embudo de placa filtrante de porosidad media. La elución se repite tantas veces como sea necesario para obtener fluorescencia negativa en el eluido.

Luego se reúnen todos los eluidos correspondientes a una misma fracción y se concentran hasta sequedad por destilación al vacío.

Cada una de las fracciones obtenidas según el método descrito, se recromatografiaron hasta obtener una única banda.

E) SEPARACION DE URO I Y URO III POR EXTRACCION CON ACETATO DE ETILO

Este método se empleó sobre una fracción Uro obtenida en

la columna de carbonato de calcio y sobre una P.W., aprovechando para la separación la propiedad que tiene la Uro III de ser soluble en acetato de etilo, mientras que la Uro I no lo es.

Por lo tanto, el éster metílico de la Uro se saponificó con ácido clorhídrico al 25% durante 24 horas y luego se diluyó la solución hasta una concentración final de ácido del 5% aproximadamente.

Se agregó unos mililitros de cloroformo y agitó; no se observó fluorescencia en la capa clorofórmica, por lo que se consideró que la saponificación era total.

Por lo tanto, se decantó el cloroformo y la capa acuosa se neutralizó con acetato de sodio sólido hasta color gris del papel Rojo Congo. La solución se extrajo repetidas veces con acetato de etilo, hasta fluorescencia negativa en la capa de éster.

La fase acuosa se filtraba cada vez por papel para recoger el precipitado de porfirinas que se formaba; lo mismo se hacía por separado con la capa de acetato de etilo.

La solución de acetato de etilo se lavó 3 veces con agua destilada y luego se extrajo con ácido clorhídrico al 10% (0.5 a 1 ml por vez) hasta fluorescencia negativa en el acetato de etilo.

Todas las capas acuosas se reunieron y, luego de observarlas a la luz U.V., se descartaron pues presentaban una leve fluorescencia que sólo era apreciable en completa oscuridad.

La solución clorhídrica se llevó a pH 3.0-3.2 con acetato de sodio y las porfirinas se adsorbieron con talco, esterificaron y pasaron a cloroformo según el método habitual ya descrito.

Por otra parte, el precipitado insoluble en acetato de etilo que se recogió en el papel de filtro, se secó y disolvió en mezcla esterificante y, luego, el éster metílico se pasó también a cloroformo.

Las porfirinas obtenidas se identificaron luego utilizando los métodos descriptos a continuación.

F) IDENTIFICACION DE LAS PORFIRINAS

Para ello se aplicaron distintos criterios, a saber :

1º) Por cromatografía en papel de los ésteres metílicos:

Se utilizó la variación del método original de Falk y Benson (84) descripta por Batlle (113) y adoptada habitualmente en nuestro laboratorio.

El método consiste en hacer correr las porfirinas, cargadas en forma de manchas sobre una tira de papel Whatman Nº1 de 9 cm x 23 cm y con testigos adecuados, en forma ascendente en dos solventes distintos, uno a continuación del otro, secando y cortando la parte inferior de la tira (para eliminar las impurezas) entre una y otra corrida.

El primer solvente consiste en una mezcla de 2 partes de kerosene (fracción 190-250°C destilada sobre Cl_2Ca) y 3 partes de cloroformo etanólico al 1%. Se deja correr 15' en atmósfera saturada de cloroformo, con el objeto de eliminar las impurezas, que quedan en la parte inferior de la tira sobre la línea de base.

Luego se saca el papel, se lo seca con aire caliente, se revela a la luz U.V. y se corta entre la mancha de menor Rf y la línea de partida de la cromatografía.

El papel se coloca entonces en el segundo solvente, que consiste en una mezcla de kerosene-dioxano en la proporción de 2:1

y se deja correr, en atmósfera saturada de dioxano, de 2 a 2 1/4 horas, tiempo en el que el frente del solvente avanza unos 20 cm.

El papel, igual que luego de la corrida anterior, se seca con aire caliente y revela a la luz U.V.

2º) Por cromatografía en papel de las porfirinas libres:

Se efectuó según el método original de Nicholas y Rimington (66), modificado por Eriksen (119), con leves variaciones introducidas por Batlle (113) en nuestro laboratorio. Ofrece la utilidad de separar los isómeros I y III de la Copro. No separa los isómeros de las demás porfirinas, por lo que se utilizó principalmente para identificar las fracciones Copro obtenidas por cromatografía en columna de los extractos de orina o de los descarboxilados de porfirinas de mayor número de carboxilos.

Las porfirinas libres, en solución de amoníaco al 10% , se cargan en forma de manchas en una tira de papel Whatman Nº 1 de 7 cm x 30 cm, a la que se le ha marcado previamente una línea de base a 2 cm del borde inferior.

Se aconseja cargar hasta 1 µg. por mancha; asimismo, se colocan testigos adecuados y luego se hace correr el solvente, en forma ascendente, durante 14-18 horas en la oscuridad.

El solvente de desarrollo consiste en una mezcla de 2-6-lutidina y agua en relación 7:3 y se coloca en la cuba cromatográfica 1/2 hora antes de introducir el papel. La cuba debe ser previamente saturada con amoníaco durante 24 horas.

Luego de desarrollado el cromatograma, se saca la tira, se la seca con aire caliente y se revela a la luz U.V. En general, en estas condiciones se obtuvieron buenas separaciones.

Se hace notar que los dos métodos descriptos permiten diferenciar las porfirinas, libres o esterificadas, de acuerdo al número de carboxilos.

3º) Por cristalización: Los ésteres metílicos de las distintas porfirinas obtenidas, una vez purificados, se cristalizaron a partir de sus soluciones clorofórmicas por el agregado de metanol y evaporación a baño maría. Eliminado el cloroformo, se dejó enfriar lentamente, obteniéndose las formas cristalinas que se utilizaron para identificar las porfirinas y, ulteriormente, para determinar sus P.F.

Además, aprovechando la mayor solubilidad en metanol del éster metílico de la Uro III sobre el de la Uro I, se intentó en un caso la separación por cristalización fraccionada, separando por filtración con papel lo que cristalizaba en metanol caliente y dejando luego enfriar lentamente para obtener la fracción más soluble.

Los resultados obtenidos se detallan más adelante.

4º) Por determinación de los puntos de fusión: Se tomaron con un microscopio provisto de platina termocalentada del tipo Koeffler o, para cantidades mayores, con un aparato Fischer-Johns.

Los aparatos fueron previamente calibrados, por lo que los valores que se indican en cada caso, son los corregidos.

5º) Por descarboxilación: Para determinar el tipo isomérico de las distintas porfirinas obtenidas, se las descarboxiló según el método de Edmonson y Schwartz (87), con algunas variaciones. De esta manera, por identificación de la Copro obtenida se determinó la composición isomérica de la porfirina original.

Para ello, se colocó una cantidad dada de la porfirina,

en solución clorofórmica, en un tubo de Carius (Fig. 9) mediante una pipeta capilar; se destiló el cloroformo al vacío en baño maría, hasta sequedad y se le agregó de 3 a 15 ml de HCl al 1% (0.3 N); según la cantidad de porfirina a tratar.



Figura 9

Arriba: Tubo de Carius

Abajo : Idem conectado a la llave

El tubo se sumergió en baño de hielo, se conectó a una llave de dos vías para alto vacío, como se observa en la figura 9, la que se unió a una bomba de vacío. Se le aplicó una succión tal como para obtener un vacío de aproximadamente 1 mm de mercurio, el que se mantuvo durante 20' como mínimo, agitando frecuentemente el tubo para facilitar el desprendimiento de las burbujas adheridas a las paredes. Luego se desconectó la succión, habiendo previamente cerrado la llave para que se mantuviera el vacío en el interior del tubo y se lo selló en su estrangulación mediante un soplete de gas-oxígeno, teniendo especial precaución de que no entrara aire en ese momento.

El tubo sellado se colocó en una estufa, en la que se

elevó la temperatura lo más rápidamente posible a 180° C (20-30'), la que se mantuvo durante 4 horas; luego se dejó descender lentamente la temperatura y, una vez frío, se retiró el tubo.

De acuerdo al volumen y cantidad de porfirina de que se hubiera partido, se seguían posteriormente distintos procedimientos: si el volumen era pequeño, se llevaba a sequedad en un desecador al vacío, conteniendo Cl_2Ca e HOK como adsorbentes y a continuación se esterificaba. Si el volumen de líquido y la cantidad de porfirina era mayor, se lo llevaba a pH 3.0-3.2 y se dejaba precipitar; luego se centrifugaba el precipitado, se lavaba con agua destilada, se secaba y esterificaba. Por último, si el volumen era más o menos grande, pero la concentración era pequeña, luego de llevar la solución al pH isoelectrico se adsorbían las porfirinas con talco y posteriormente se eluían con mezcla esterificante.

En todos los casos, luego se procedió al estudio completo.

6º) Por determinación de los máximos y curvas de absorción: Cuando se obtenía una fracción pura, se determinaban los máximos de absorción o la curva completa (en la Penta y Hexa), utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo DU. Se trabajó con soluciones clorofórmicas de porfirinas.

G) VALORACION CUANTITATIVA DE PORFIRINAS

Se efectuó utilizando una variación del método de Falk y Benson (84) desarrollada en nuestro laboratorio por Batlle y Grinstein (120).

Es un micrométodo que permite valorar los distintos componentes de una mezcla de ésteres metílicos de porfirinas, separándolos previamente por cromatografía en papel.

Para ello, se determinó la concentración de la solución clorofórmica a valorar espectrofotométricamente y luego, con una micropipeta, se colocó en el papel un volumen tal de mezcla que contuviera entre 1 y 5 μ g. de porfirina, en forma de pincelada.

A continuación se procedió a desarrollar el cromatograma de la misma forma indicada para el método de Falk y Benson cualitativo y, luego de revelado, se recortó cada una de las manchas introduciendo los papeles en tubos de ensayo pequeños y eluyendo de ellos las porfirinas con 3 ml de cloroformo en cada tubo.

Las soluciones así obtenidas se llevaron al Beckman, donde se determinó su concentración utilizando los coeficientes de extinción detallados por Salum, Batlle y Grinstein (121).

Como se conocía la cantidad total de porfirinas sembrada, se pudo calcular fácilmente el porcentaje y cantidad absoluta de cada componente en la mezcla. Los ensayos de recuperación efectuados dieron valores del orden del 90 al 95%.

TESTIGOS

- Uro I : de orinas de porfiria eritropoyética.
- Uro III : de turacina o sintetizada por MacDonald.
- Firia III : de orinas porfíricas.
- Copro I : de orinas de porfiria eritropoyética.
- Copro III : de orinas de intoxicados por plomo.

SOLVENTES

- Cloroformo : lavado 3 veces con agua, secado 48 horas sobre Cl_2Ca y destilado.
- Benceno : destilado.
- Metanol : secado 48 horas sobre Cl_2Ca y destilado.

- Kerosene : incoloro, lavado con agua, secado 48 horas sobre Cl_2Ca y destilado; fracción 190-250° C.
- Etanol : absoluto.
- Dioxano : para cromatografía Merck.
- 2-6-Lutidina : para cromatografía Merck o BDH.
- Amoníaco : para análisis.

MICRO - FOTOGRAFIAS

Fueron tomadas en el Laboratorio de la Cátedra de Genética de esta Facultad, con un microscopio Leitz provisto de cámara interior.

MATERIAL ESTUDIADO

a) Porfirinas de orinas humanas:

Se estudiaron porfirinas extraídas de orinas de 7 pacientes de porfiria cutánea tarda.

Las orinas fueron recogidas sobre tolueno o cloroformo y conservadas en heladera hasta el momento de su utilización.

Además, se estudió una Porfirina de Waldenström obtenida por el Dr. Moisés Grinstein de orina de uno de los pacientes de porfiria estudiados.

b) Porfirinas de orina de ratas:

A cuatro ratas hembra de raza Wistar, alimentadas con Forramex, se les suministró de 40 a 60 mg diarios de hexaclorobenceno (puro BDH) por sonda intragástrica, durante 6 meses.

Se controló la eliminación de porfirinas en orina, espectroscópicamente y por fluorescencia a la luz U.V. La aparición de precursores se investigó mediante el reactivo normal de Ehrlich.

Aproximadamente a los 3 meses de iniciado el suministro de droga, comenzaron a eliminar porfirinas y algo de precursores, tomando la orina un intenso color rojo y presentando una fuerte fluorescencia a la luz U.V.

A partir de ese momento, se recolectaron las orinas, guardándolas en heladera y agregándoles toluol para evitar la fermentación. Cuando el volumen coleccionado lo justificaba, se extraían las orinas según el método de adsorción por talco, se esterificaban y, luego de pasarlas a cloroformo, se guardaban previo llevado a sequedad.

RESULTADOS

1º- CROMATOGRAFIA DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE PORFIRINAS DE ORINA

Los extractos totales esterificados de porfirinas urinarias, obtenidos por adsorción con talco, se cromatografiaron en columna de carbonato de calcio, obteniéndose en todos los casos un cromatograma similar al que muestra la fig. 10.

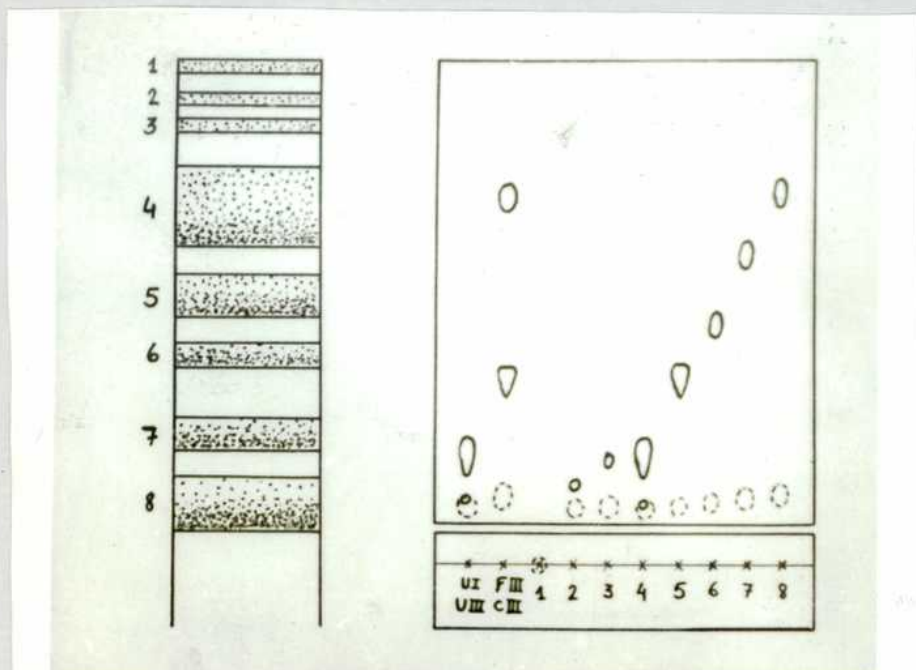


Figura 10

Figura 11

Cada fracción fué recromatografiada en columna tantas veces como fuera necesario hasta obtener una única banda y luego controladas por cromatografía sobre papel, según el método de Falk y Benson. En la fig. 11 se puede ver el cromatograma obtenido, utilizando como testigos, como en todos los demás casos, Uro I, Uro III, Firia III y Copro III.

La fracción 1 se comportó como una porfirina parcialmente esterificada, por lo que se la reesterificó y recromatografió, obteniéndose entonces un cromatograma similar al de la fig.10.

En todos los casos descriptos a continuación, se procedió de la misma manera con esta fracción.

Las fracciones 2 y 3 dieron manchas ubicadas entre las de Uro I y Uro III. Por estar presentes en cantidades muy escasas, no fué posible efectuar más estudios con ellas, por lo que se las denominó X e Y, indicando así su naturaleza desconocida.

Se hace notar, no obstante, que se intentó cristalizarlas, sin éxito.

La fracción 4, que es la más importante cuantitativamente, está constituida por Uro I y Uro III, encontrándose en varios casos vestigios de Firia III.

Es oportuno hacer notar que, en las cromatografías sobre papel efectuadas por el método de Falk y Benson, las superficies de las manchas de las Uro no son proporcionales a las cantidades presentes de cada isómero.

Las fracciones 5, 6, 7 y 8 están compuestas por Firia, Hexa, Penta y Copro, respectivamente.

2º- COMPOSICION CUANTITATIVA DEL COMPLEJO PORFIRINICO

Se determinaron los porcentajes de cada porfirina en la mezcla total, mediante la modificación cuantitativa del método de Falk y Benson descripta en la pág. 49.

En todos los casos fué necesario cromatografiar previamente el extracto total de orina en columna de carbonato de calcio para una primera purificación pues, de no hacerlo, no se obtenía buena separación en la cromatografía sobre papel y la fracción Uro se ubicaba a la altura de la Uro III, con una estela fluorescente que llegaba hasta la mancha inferior, ubicada por encima de la posición de la Uro I. (Ver fig. 12)

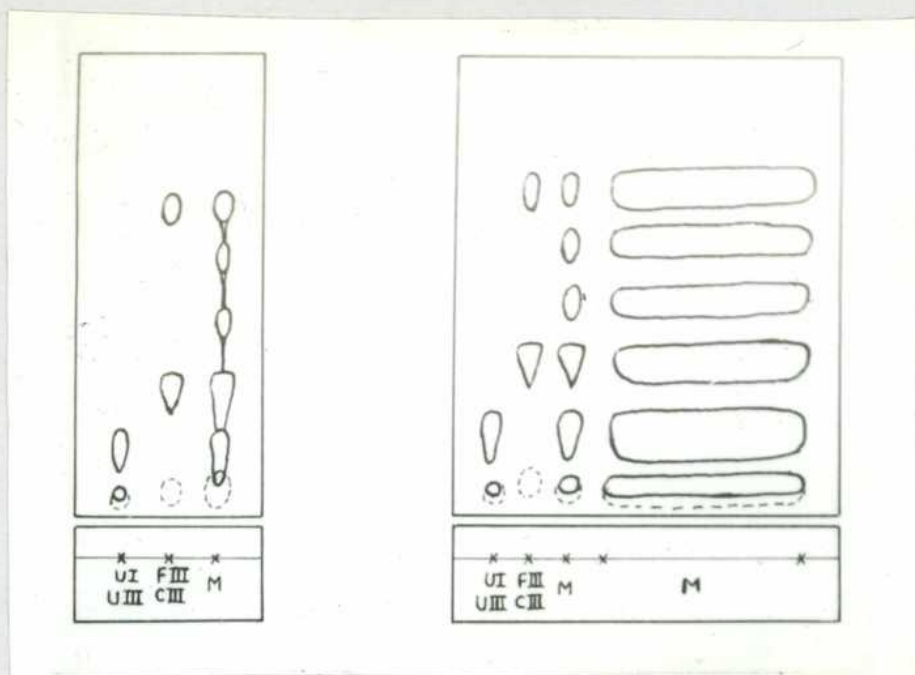


Figura 12
M: mezcla total de porfirinas.

Figura 13
M: mezcla total de porfirinas.

En cambio, si se cromatografiaba primero en columna y se tomaban las bandas 4 a 8 (fig. 10), eluyéndolas con cloroformo y luego recién se cromatografiaban sobre papel, se obtenía un cromatograma nítido, como el de la fig. 13.

Luego de cortada y eluída cada banda, se determinaron las cantidades de cada una de las porfirinas espectrofotométricamente, hallándose los valores detallados en la Tabla I.

Se hace notar que para calcular las concentraciones de Hexa y Penta se utilizaron coeficientes de extinción promedio entre los de Firia y Copro, por no conocerse los valores de la constante.

Por consiguiente, los valores indicados para estas dos sustancias están afectados de un cierto error que sólo podrá ser evaluado exactamente cuando se disponga de los coeficientes de extinción reales.

TABLA I : Composición cuantitativa del extracto total de porfirinas de orina

	Uro I		Uro III		Piria		Hexa		Penta		Copro	
	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%
Caso 1	3,899	39,57	1,086	11,02	1,306	13,25	0,535	5,43	0,819	8,31	2,209	22,42
Caso 2	3,965	41,16	0,953	9,89	1,418	14,72	0,605	6,28	0,689	7,15	2,003	20,79
Caso 3	3,531	36,34	1,177	12,11	1,548	15,93	0,395	4,07	0,895	9,21	2,171	22,34
Caso 4	3,616	36,44	1,044	10,52	1,388	13,99	0,562	5,66	0,872	8,79	2,441	24,60

3º- COMPOSICION DE LA PORFIRINA DE WALDENSTRÖM

Para determinar la verdadera composición de la P.W. se efectuaron los siguientes ensayos:

a) Se extrajo una orina según el método de Waldenström descripto en la pág. 37. Las fracciones P.W. y Copro se cromatografiaron en columna de carbonato de calcio y sobre papel, según el método de Falk y Benson, obteniéndose los cromatogramas que se observan en las figuras 14 y 15, respectivamente.

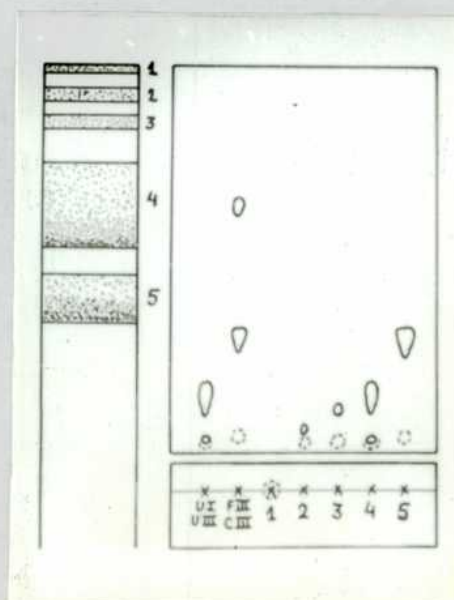


Figura 14: Fracción P.W.

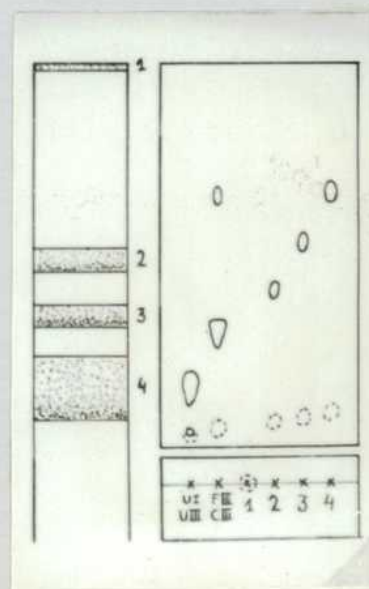


Figura 15: Fracción Copro

b) La fracción P.W. obtenida y una Porfirina de Waldenström suministrada por el Dr. Grinstein, se trataron según el método de extracción con acetato de etilo indicado en la pág. 43, obteniéndose en ambos casos resultados similares.

A las porfirinas provenientes del extracto de acetato de etilo se las denominó Solubles (Sol.), mientras que al precipitado que quedó retenido en el papel de filtro se lo llamó Insoluble (Ins.).

La solución clorofórmica de la fracción Insoluble era fuertemente coloreada y presentaba intensa fluorescencia a la luz U.V., mientras que la de la fracción Soluble sólo tenía un débil color rosado y la fluorescencia era mucho menor.

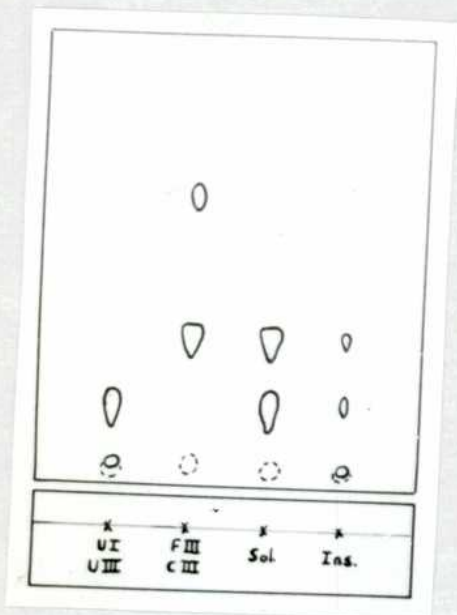


Figura 16

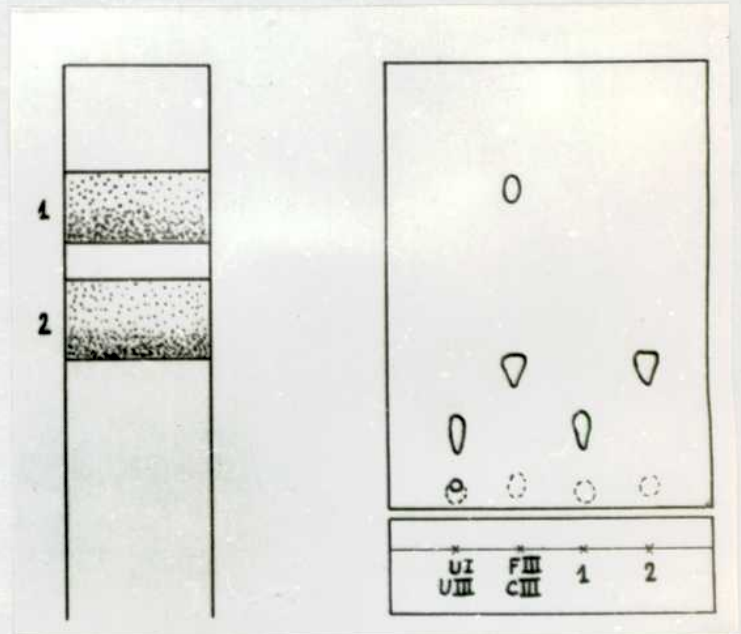


Figura 17: Fracción Soluble

La fig. 16 muestra el cromatograma sobre papel obtenido con las soluciones clorofórmicas de ambas fracciones. La fracción Soluble contenía solamente Uro III y Firia, en proporciones casi iguales, mientras que la Insoluble era fundamentalmente Uro I ,

con vestigios leves de Uro III y Firia.

La fracción Soluble se recromatografió en columna, utilizando una mezcla de benceno-cloroformo en proporción 5:3, como solvente de desarrollo y luego cada banda se cromatografió sobre papel. Los resultados se indican en la fig. 17.

La banda 1 era Uro III pura y la 2, Firia. No se pudieron cristalizar por la pequeña cantidad de que se disponía.

La fracción Insoluble se recrystalizó cinco veces de metanol, hasta que se obtuvo P.F. constante 292-293°C. De cada cristalización se tomaron sólo los cristales de porfirina que se formaban mientras la solución se enfriaba y antes de que se alcanzara la temperatura ambiente. En la fig. 18 se puede observar el aspecto de los cristales obtenidos, cuya pureza se controló por cromatografía sobre papel, que dió una única mancha de Uro I.



Figura 18
Uro I (P.F. 292-293°C)

c) La misma P.W. obtenida de orina y la cedida por el Dr. Grinstein, a la que denominaremos en lo sucesivo P.W.(G), que ya se estudiaron, se descarboxilaron según el método de Edmonson y Schwartz (pág.47). El descarboxilado de la P.W.(G) se llevó a pH isoeléctrico y el precipitado se centrifugó y secó en deseca-

dor al vacío.

Como el sobrenadante tenía una apreciable fluorescencia a la luz U.V., se trató con acetato de etilo para extraer las porfirinas y la capa de éster se extrajo con ClH 2N. La solución clorhídrica se neutralizó con acetato de sodio, se dejó una noche en heladera y el precipitado se centrifugó, secó y unió al anterior.

Las porfirinas se esterificaron y cromatografiaron en columna, previo pasaje de los ésteres metílicos a cloroformo, utilizando la mezcla de desarrollo normal.

La fig. 19 representa el cromatograma obtenido y en la fig. 20 se puede observar la cromatografía sobre papel de cada banda.

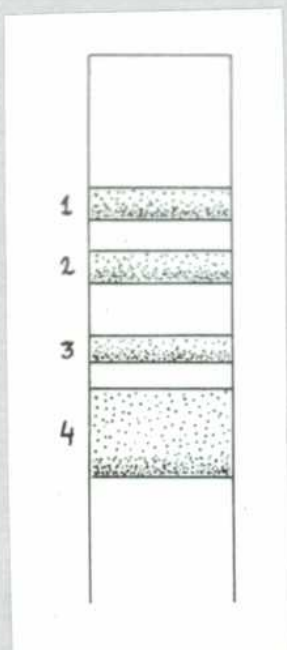


Figura 19

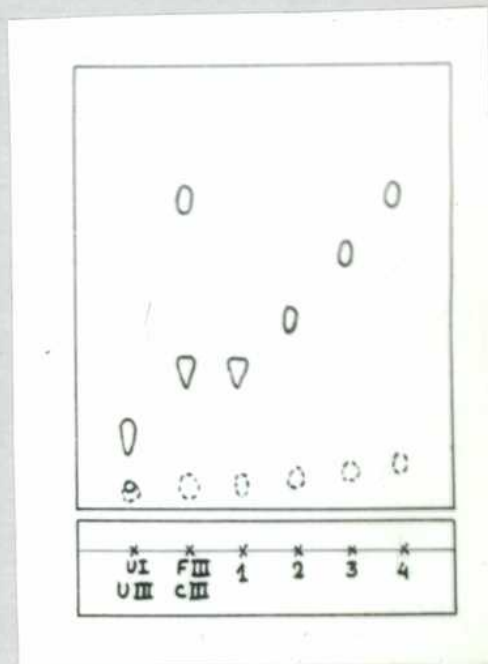


Figura 20

Se observa que no quedó nada de Uro sin descarboxilar; sin embargo, pese a que las bandas 1, 2 y 3 representaban una fracción mucho menor que la 4 (aun reunidas), eran cuantitativa -

mente importantes pues su color era visible en la columna a simple vista.

Se atribuye el no haber obtenido una descarboxilación más completa a que, durante el calentamiento en la estufa, la temperatura no se mantuvo constantemente sobre los 180°C , sino que a ratos, por deficiencias en el suministro de energía eléctrica, descendía, llegando en una oportunidad hasta 165°C .

En cambio, en posteriores oportunidades en que no se tuvo este inconveniente, sólo se obtuvieron leves vestigios de porfirinas de 5, 6 y 7 carboxilos.

La banda 4, que era la que interesaba, demostró estar compuesta por Copro y algo de Penta. Se cristalizó y tomó el P.F., obteniéndose una fusión irregular entre $236-242^{\circ}\text{C}$.

Los cristales se saponificaron con ClH 25%, se llevó luego a pH 3.0-3.2 y una pequeña parte del precipitado obtenido se disolvió en NH_3 2N y cromatografió sobre papel por el método de Eriksen (pág. 46).

El cromatograma obtenido (fig. 21) correspondió fundamentalmente a una Copro I, con algo de Copro III y de una porfirina de mayor número de carboxilos (Penta).

El resto del precipitado se reesterificó y cromatografió en columna, obteniéndose dos bandas distintas (fig. 22).

La banda 4" se eluyó, concentró y cristalizó de metanol. Se cristalizó 5 veces y luego se tomó el P.F. de los cristales, obteniéndose $246-248^{\circ}\text{C}$. La fig. 23 muestra la forma típica de Copro I de los cristales obtenidos.

Para confirmar los resultados obtenidos, la porfirina

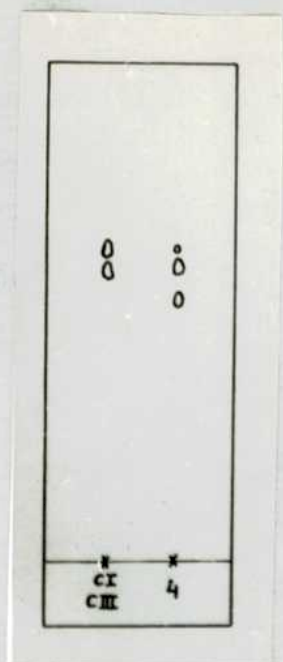


Figura 21

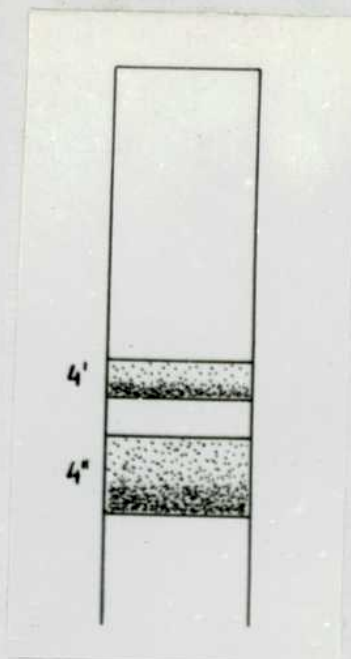


Figura 22



Figura 23
Copro I (P.F. 246-248°C)

se cromatografió sobre papel por los dos métodos habitualmente utilizados y lo mismo se hizo con la que se obtuvo de reunir todos los sobrenadantes de las cristalizaciones y llevarlos a sequedad ($4_s''$).

En la fig. 24 se pueden ver los resultados de estas cromatografías.

El mismo procedimiento se practicó con la otra muestra de P.W., pero por triplicado. Cuando se esterificó el precipitado obtenido luego de la descarboxilación y se cromatografió sobre pa-

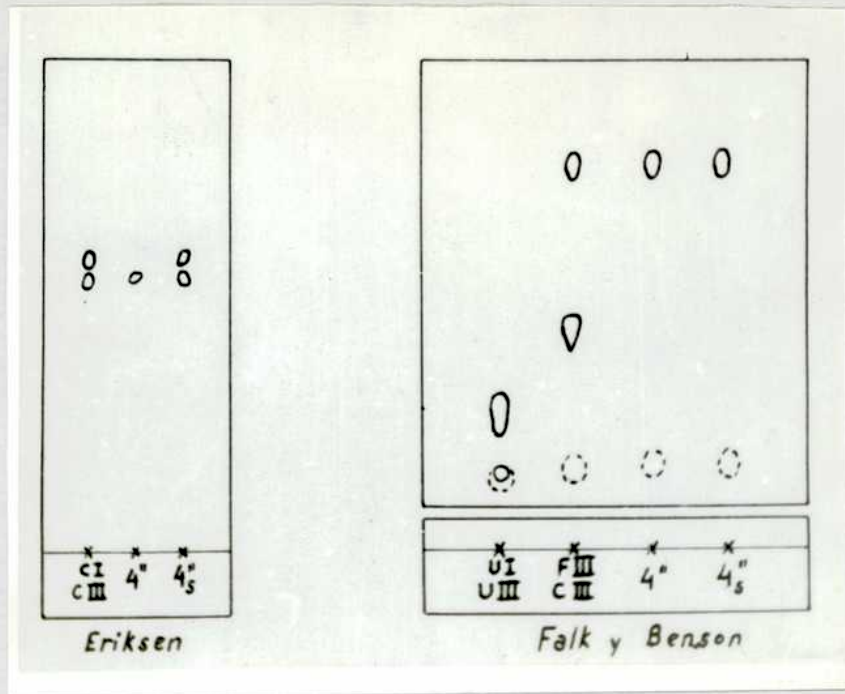


Figura 24

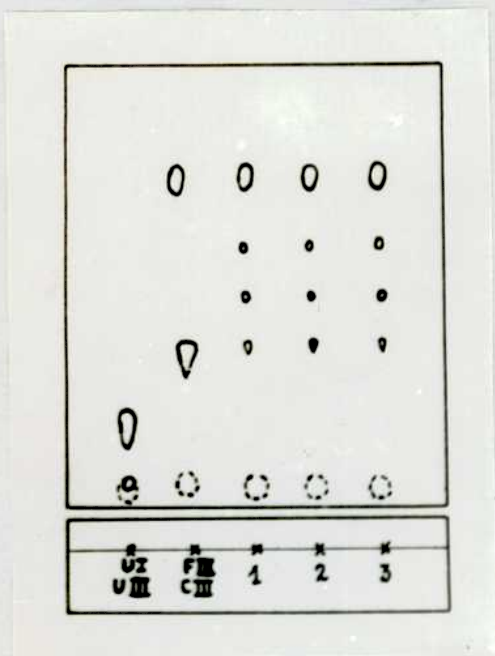


Figura 25

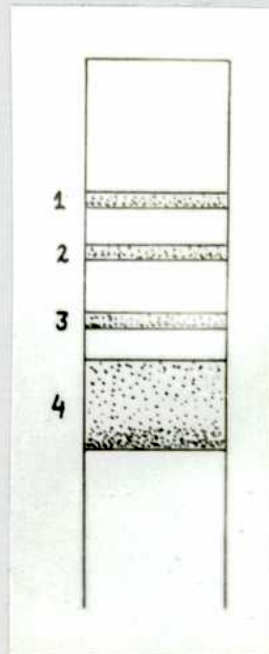


Figura 26

pel, se obtuvieron tres cromatogramas idénticos (fig. 25). Es decir, esencialmente Copro y leves vestigios de Penta, Hexa y Firia.

Por lo tanto, se reunieron las tres muestras y se cromat-

tografiaron en columna.

La figura 26 representa la cromatografía en columna, resuelta en 4 bandas, pero las tres primeras sólo eran observables como una leve fluorescencia a la luz U V. en completa oscuridad.

La porfirina de la banda 4 se eluyó y recromatografió en columna dos veces; luego se cristalizó de metanol, recristalizándola 5 veces. Los cristales presentaban el mismo aspecto al microscopio de los de la fig. 23 y fundían a 248-250°C.

Al igual que en el caso anterior, los sobrenadantes de las cristalizaciones se reunieron, concentraron y dejaron cristalizar en baño de hielo. El precipitado que se obtuvo presentaba el aspecto de agujas de Copro I, mezcladas con formas semejantes a rosetas de Copro III (fig. 27) y fundía irregularmente a 224-228°C.

La Copro obtenida inicialmente (C) y la de sobrenadante (C_s) se sometieron a una cromatografía de lutidina, según se representa en la figura 28.

El cromatograma confirmó que la Copro obtenida era isómero I puro, mientras que en el sobrenadante de las cristalizaciones había quedado la Copro III y algo de Copro I.

d) Finalmente, se determinó la composición cuantitativa de la P.W., aplicando el micrométodo de Falk y Benson modificado a las dos muestras en investigación.

Para evitar los inconvenientes que pudieran presentar las porfirinas X e Y (bandas 2 y 3 de la fig. 14), se las cromatografió en columna y se tomaron sólo las dos bandas inferiores (4 y 5 de la fig. 14), las que se eluyeron juntas.

En la fig. 29 se ve el cromatograma obtenido en ambos

casos, mientras que en la Tabla II están indicados los resultados obtenidos.



Figura 27
Copro I - Copro III

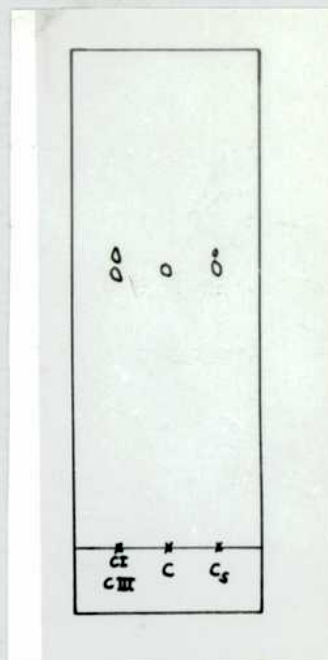


Figura 28

TABLA II: Composición cuantitativa de la Porfirina de Waldenström

	P. W.		P.W. (G)	
	μg	%	μg	%
Uro I	5,881	62,58	6,085	61,13
Uro III	1,523	16,20	1,774	17,82
Firia	1,994	21,22	2,096	21,05
Total	9,398	100	9,955	100

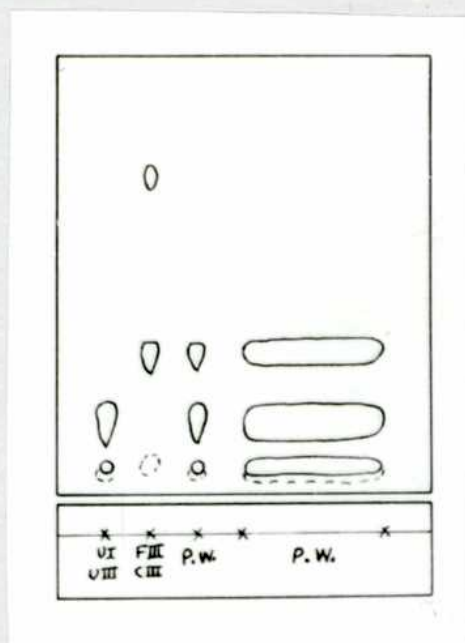


Figura 29

4º- COMPOSICION DE LA UROPORFIRINA DE ORINAS PORFIRICAS

Para demostrar la presencia de isómero III en la Uro obtenida por fraccionamiento en columna de carbonato de calcio del complejo porfirínico extraído de orinas de porfirias cutánea tarda, se pensó en aplicar dos métodos:

a) Cromatografía prolongada en columna y cristalización fraccionada: Una fracción Uro obtenida de columna de carbonato de calcio, se recromatografió por el mismo método 5 veces, hasta tener la absoluta seguridad de que se trataba de una banda única. Se utilizó una mezcla de desarrollo compuesta por benceno-cloroforno en proporción 5:2 ó 5:2,5 para aumentar la velocidad de desplazamiento de las porfirinas de menor número de carboxilos.

Luego se recrystalizó la Uro cinco veces de metanol y se la denominó U₁.

Otra fracción similar se recromatografió de la misma manera hasta obtener una única banda y luego se la sometió a una cromatografía lenta en columna, durante 3 horas. Se aplicó una succión menor y se utilizó benceno-cloroformo 4:1. Se obtuvo una banda difusa y ancha (fig. 30) que se cortó en dos partes,

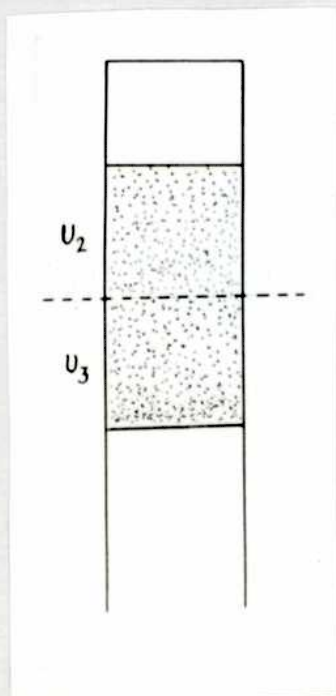


Figura 30

las que se recrystalizaron de metanol por separado, 5 veces. A la superior se la llamó U₂ y a la inferior, U₃.

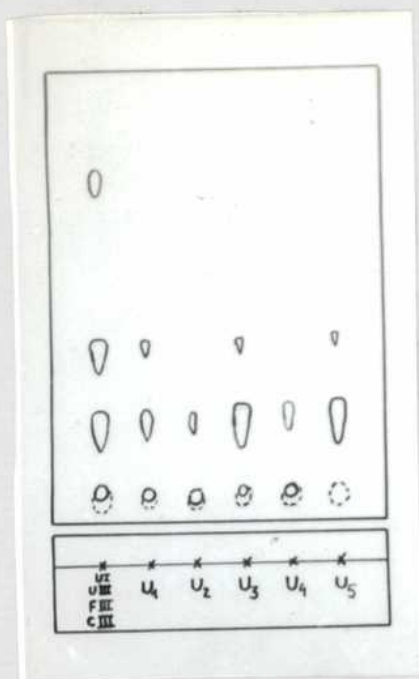
Otra fracción se recromatografió también hasta banda única y se cristalizó de metanol, separando los cristales que se formaban dentro de los 5' de iniciada la cristalización, de los que cristalizaban más lentamente.

A la porfirina de rápida cristalización se la indica como U₄; a la de cristalización lenta, como U₅.

Las 5 fracciones obtenidas se sometieron a una cromatografía de Falk y Benson y se determinaron sus P.F.

De la comparación de la fig. 31 y la Tabla III surge que, a mayor proporción de Uro III en la mezcla (U₃ y U₄), correspondieron los menores puntos de fusión y, viceversa, a menor proporción de Uro III hallado (U₁ y U₂), se obtuvieron mayores P.F. En el caso de la muestra U₅ en que no se detectó la presencia de Uro I, se obtuvo un P.F. que era casi el de la Uro III pura, debiéndose probablemente la diferencia a la pequeña cantidad de Firia que contenía.

TABLA III



Porfirina	P. F. (°C)
U ₁	279 - 281
U ₂	281 - 283
U ₃	272 - 274
U ₄	278 - 280
U ₅	259 - 261
Uro I	291 - 293
Uro III	261 - 264

Figura 31

b) Cromatografía cuantitativa sobre papel: Dos Uro del mismo origen y obtenidas por idéntico procedimiento al descrito en el párrafo anterior, se recromatografiaron hasta banda única y cristalizaron hasta obtener P.F. constante 282-284°C.

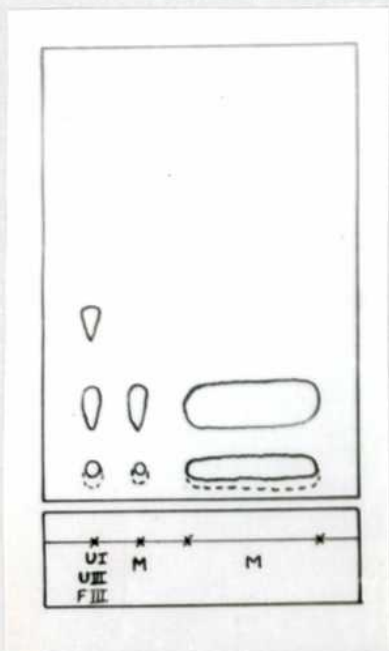
Luego se disolvieron en cloroformo en forma tal de obtener una solución de una concentración aproximada a 0,5 µg/µl, la que posteriormente se determinó con exactitud por medición espectrofotométrica.

Se cargaron por separado dos tiras de papel con los testigos habituales, una mancha de la muestra (para controlar que la separación fuera correcta) y, con una micropipeta, se colocó una mancha en forma de banda conteniendo 20 ul de la solución. Los dos cromatogramas, totalmente similares, se representan en la fig. 32.

Las bandas obtenidas se cortaron y eluyeron con cloro -

formo de la forma habitual y la concentración de las soluciones se midió con el Beckman. En la Tabla IV se indican los resultados obtenidos.

TABLA IV: Composición de la fracción Uroporfirina



	Muestra 1		Muestra 2	
	μg	%	μg	%
Uro I	7,559	83,97	7,429	81,26
Uro III	1,443	16,03	1,713	18,74
Total	9,002	100	9,142	100

Figura 32
M ; muestra

5º- ESTUDIO DE LA FIRIAPORFIRINA

La fracción Firia obtenida en la cromatografía de los extractos totales de porfirinas urinarias (banda 5, fig. 10), se recromatografió varias veces hasta obtener una única banda, se recristalizó 5 veces de metanol y los cristales se observaron al microscopio, determinando posteriormente su P.F.

Se observaron formas típicas de Firia, similares a las originalmente descritas en el (74), que fundían a 215-216°C y que, sometidas a la cromatografía de Falk y Benson, daban una única mancha correspondiente a Firia (fig. 33).

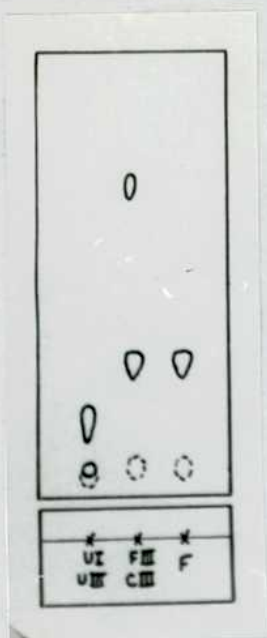


Figura 33

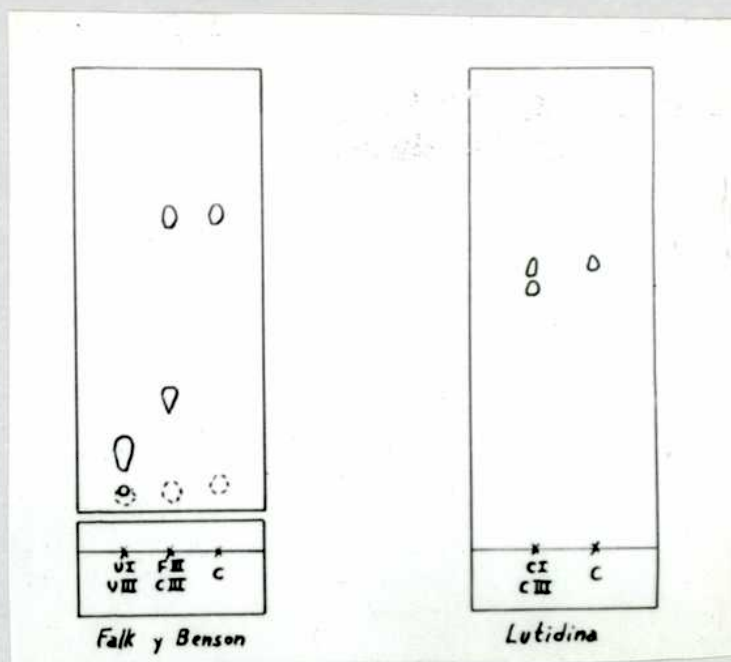


Figura 34

Se descarboxiló una muestra de esta porfirina según el método habitual, obteniéndose finalmente una porfirina que, re - cristalizada hasta P.F. constante, fundía a $140-142^{\circ}\text{C}$, con una segunda fusión 170°C y cuyo aspecto al microscopio era el de típicas rosetas de Copro III.

Con estos cristales se realizaron cromatografías sobre papel según los métodos de Falk y Benson y de lutidina (fig. 34), confirmando los resultados obtenidos que se trataba de Copro III pura.

6º- ESTUDIO DE LA HEXA Y PENTAPORFIRINA

Las fracciones 6 y 7 de las cromatografías en columna de los extractos totales de porfirinas (fig. 10), se recromatografiaron repetidamente por separado hasta obtener una única banda. Las porfirinas obtenidas se sometieron a cromatografía sobre papel, según se ve en la fig. 35, comprobándose que se trataba de

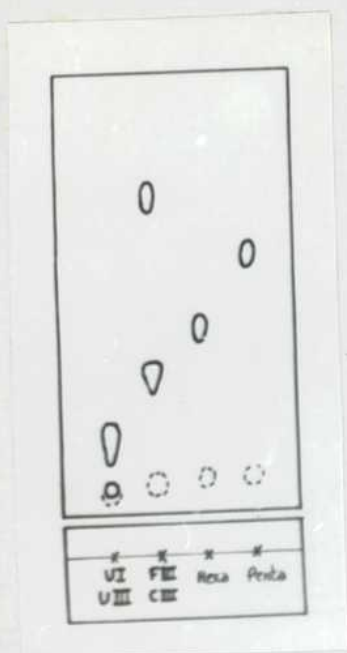


Figura 35

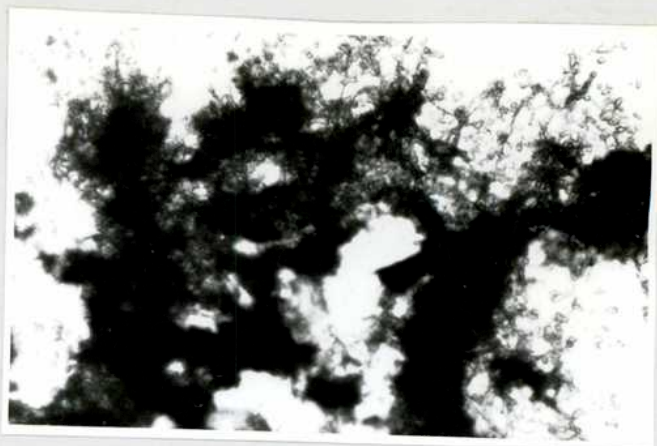


Figura 36 : Hexa



Figura 37 : Penta

fracciones puras.

Por lo tanto, se las cristalizó de metanol y observó al microscopio; las figuras 36 y 37 son microfotografías de los cristales obtenidos.

Se determinaron los P.F. que se indican, junto con los de los respectivos productos de descarboxilación, en la Tabla V.

Ambas porfirinas fueron sometidas a la descarboxilación y los productos se cromatografiaron en columna; se denominó C_6 al producto de descarboxilación de la Hexa y C_5 a la Copro obtenida de la Penta. Ambas se cromatografiaron sobre papel, tanto por el método de Falk y Benson, como por el de lutidina, obtenién-

dose los cromatogramas indicados en la fig. 38.

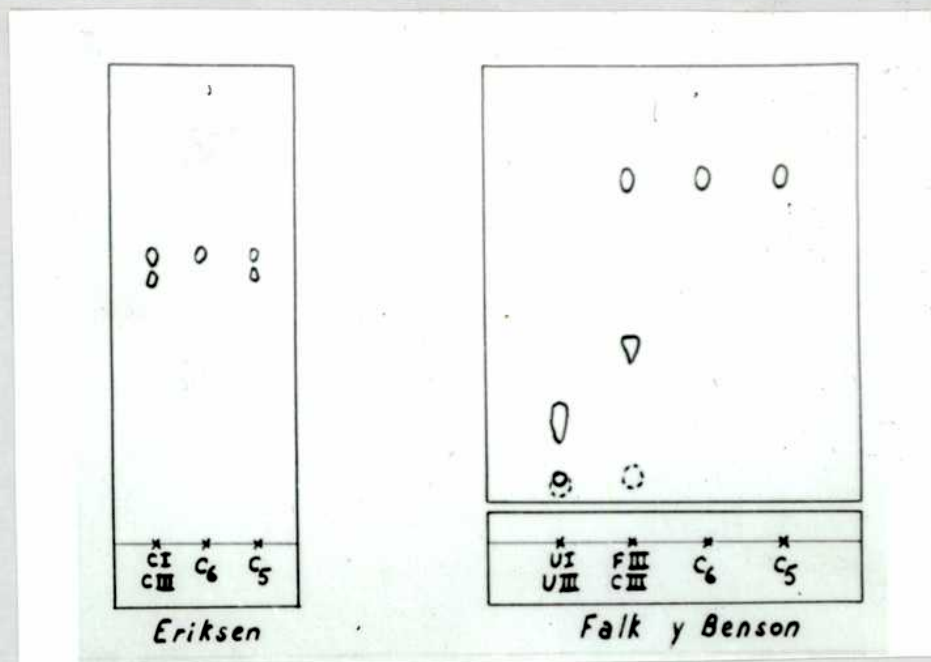


Figura 38

Se cristalizaron de metanol las dos Copro, obteniéndose en el caso de la C₆ formas típicas de Copro III, mientras que en el de la C₅ se obtuvieron cristales de Copro I, mezclados con Copro III, en forma similar a la presentada en la fig. 27.

No se las pudo recrystalizar más de una vez, por la escasa cantidad de que se disponía.

En la Tabla V se resumen los P.F. obtenidos, indicando además los de la Copro I y Copro III puras. Asimismo, se determinaron los máximos de absorción de los descarboxilados en solución clorofórmica los que, como se observa en la misma tabla, coincidieron con los de la Copro.

También se indican los máximos correspondientes a la Penta y Hexa, cuyos espectros de absorción en solución clorofórmica están representados en la fig. 39.

TABLA V : Puntos de fusión y máximos de absorción de la Penta, Hexa y sus productos de descarboxilación

	P. F. °C	Máximos de absorción (m μ)				
		I	II	III	IV	V
Penta	202 - 205	622.5	568	537	500	402.5
Descarboxilado de Penta	236 - 245	621	566	533	498	400.5
Hexa	156 - 160	622.5	569	536	500.5	404.5
Descarboxilado de Hexa	142 (166)	621	566	533	498	400.5
Copro I	252 - 254	621	566	533	498	400-401
Copro III	142 (172)	621	566	533	498	400-401

7º- IDENTIFICACION DE LA COPROPORFIRINA

Las fracciones Copro obtenidas de orinas (banda 8, fig. 10), se recromatografiaron hasta obtener una banda única, lo que se controló por cromatografía sobre papel (fig. 40).

La porfirina se cristalizó, obteniéndose una mezcla de Copro I y Copro III, similar a la de la fig. 27, que fundía irregularmente entre 215 y 224°C.

La cromatografía por el método de Eriksen de los cristales obtenidos confirmó que se trataba de una mezcla de los dos isómeros de la Copro (fig. 41).

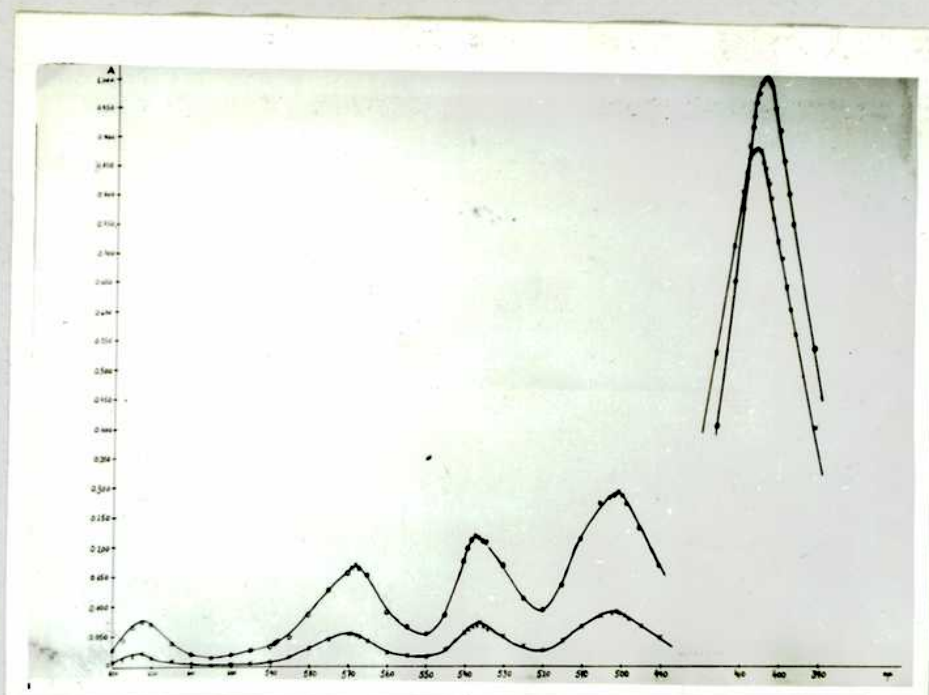


Figura 39 : Espectros de absorción de los ésteres metílicos de la Penta (o) y Hexa (x).

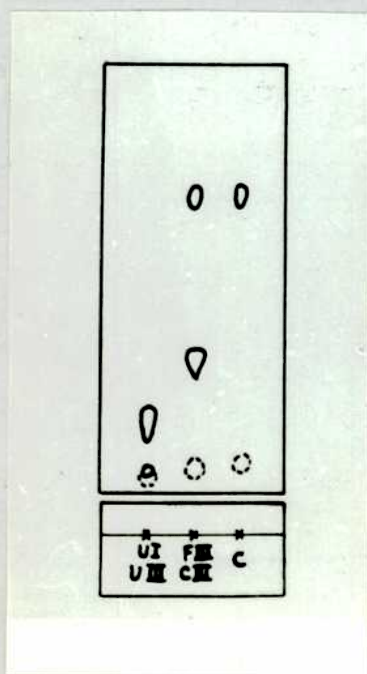


Figura 40

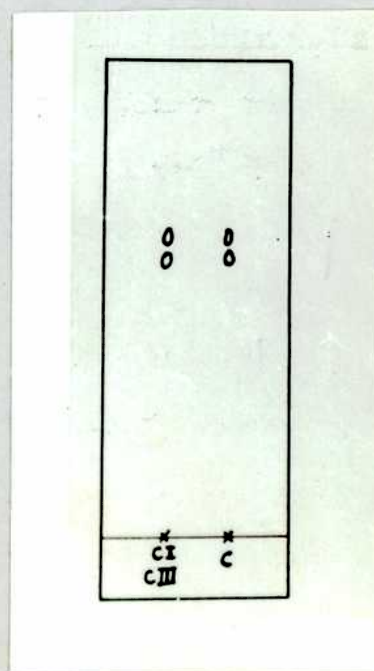


Figura 41

8º- PORFIRINAS DE ORINA DE RATAS

De un "pool" de orinas de ratas intoxicadas con hexa - clorobenceno, se extrajeron las porfirinas por adsorción con talco. Se esterificaron y trataron en la forma habitual para obtener la solución clorofórmica de los ésteres metílicos, la que se cromatografió en columna, resultando un cromatograma completamente similar al de la fig. 10.

Las bandas 4, 5, 6, 7 y 8 se cortaron y eluyeron juntas, se destiló el cloroformo y el extracto seco se recromatografió en una columna de mayor longitud y con una mezcla de benceno-cloroformo en proporción 21:4 como solvente de desarrollo. Una parte se guardó para someterla a la cromatografía sobre papel.

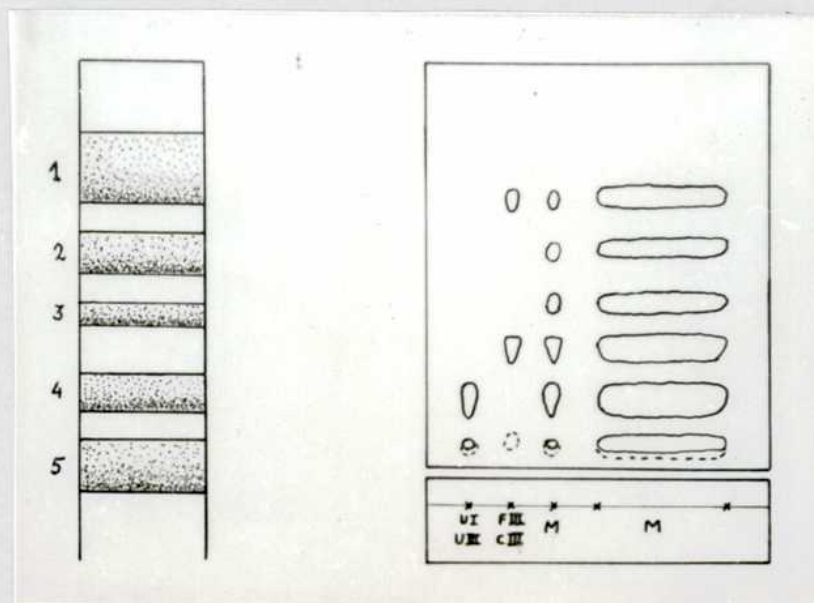


Figura 42

Figura 43

Las cinco bandas del cromatograma obtenido (fig. 42) se cortaron y eluyeron por separado, concentrando las soluciones clo-

rofórmicas y llevándolas luego a un volumen adecuado en matraces aforados.

Se determinó la cantidad de porfirina presente en cada fracción, por medición espectrofotométrica; los resultados se indican en la Tabla VI.

Asimismo, en la misma tabla figuran los resultados hallados mediante una cromatografía cuantitativa sobre papel efectuada con la mezcla total que se había reservado al efecto, representando la fig. 43 el cromatograma obtenido.

TABLA VI : Cromatografías cuantitativas de porfirinas de orinas de ratas

PORPIRINA	EN PAPEL		EN COLUMNA	
	μ E	%	μ E	%
Uro I	2,773	37,47	3.615,942	49,88
Uro III	0,672	9,08		
Firia	1,091	14,74	1.162,785	16,04
Hexa	0,513	6,93	390,736	5,39
Penta	0,613	8,29	532,822	7,35
Copro	1,739	23,49	1.546,997	21,34
TOTAL	7,401	100	7.249,282	100

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Del examen de los resultados de las experiencias realizadas, detallados en el capítulo precedente, se puede concluir lo siguiente :

1ª) De acuerdo a las investigaciones cuali-cuantitativas efectuadas sobre las porfirinas aisladas de orinas correspondientes a estados de porfiria del tipo cutánea tarda, se comprueba que estos pacientes excretan fundamentalmente Uro I y cantidades menores de Uro III, Firia, Hexa, Penta y Copro (figuras 10 y 11).

En todos los casos analizados, se encontró cuantitativamente la misma distribución relativa entre las distintas porfirinas. Según se deduce de la figura 13 y de la Tabla I, ésta, indicada en orden decreciente, fué :

Uro > Copro > Firia > Penta > Hexa

2ª) Las investigaciones que se hicieron sobre la naturaleza de la Porfirina de Waldenström demostraron que está constituida por una mezcla de Uro I, Uro III y Firia III, en una proporción de aproximadamente 65:15:20 (Tabla II y figuras 14, 16 y 29).

Ninguno de los ensayos realizados ha sugerido la posibilidad de la existencia de una asociación molecular entre los isómeros de la Uro o la Firia, pues siempre se pudo fraccionar la P.W. obtenida según el método original de este autor, por cromatografía en columna de carbonato de calcio, aunque frecuentemente hubo que variar las proporciones de la mezcla de desarrollo, de

acuerdo al caso.

Por lo tanto, la P.W. sería simplemente una mezcla de porfirinas extraíbles de la orina por acetato de etilo.

Además, el hecho mencionado en la página 54 de que cromatografías sobre papel, según el método de Falk y Benson, de porfirinas que no habían sido previamente cromatografiadas en columna, dieron cromatogramas semejantes al indicado en la figura 12 que, aparentemente, indicarían que la fracción Uro sería principalmente isómero III, puede haber sido una de las causas de que distintos autores (41,66,83) hallaran éste como el constituyente fundamental de la P.W.

Por otra parte, en las experiencias efectuadas por extracción por solventes (pág. 56), se obtuvieron cantidades significativas de Uro I, cuya forma cristalina (figura 18) y el P.F. (pág. 58) coinciden con los indicados en la literatura para el isómero puro.

Las descarboxilaciones realizadas sobre distintas muestras de P.W. (pág. 58), han sido coincidentes y concordaron con lo que se podía preveer en base a los resultados citados precedentemente, pues el producto principal fué Copro I, cuyos cristales pueden observarse en la figura 23, con algo de Copro III, de acuerdo a los cromatogramas de lutidina indicados en las figuras 24 y 28.

Asimismo, la experiencia confirmó que el rendimiento del método descarboxilativo de Edmonson y Schwartz disminuye sensiblemente si la temperatura no se mantiene en el valor adecuado.

3º) Se estudió la composición de la fracción Uro que se obtuvo por cromatografía en columna, para lo que se aplicaron diversos métodos, confirmando todos los resultados obtenidos que se tra-

taba de una mezcla de Uro I y Uro III (pág. 65, figuras 30 y 31 y Tabla III).

Esto explica el bajo P.F. (282-284°C) que se obtiene cuando se aísla esta fracción por cromatografía en columna de carbonato de calcio.

El análisis cuantitativo realizado según el micrométodo cromatográfico sobre papel, cuyos resultados se indican en la figura 32 y en la Tabla IV, confirmaron que predomina el isómero I sobre el III en proporción de 4:1.

Se hace notar que estos datos son coincidentes con los hallados para Uro I y Uro III en la P.W.

Como diversos autores (88,112) han objetado la validez de los resultados basados en el método cromatográfico sobre papel de Falk y Benson, es oportuno hacer notar que Cornford y Benson (122) efectuaron un minucioso y exhaustivo estudio al respecto, publicado hace unos meses, confirmando que, para diversas proporciones de Uro I y Uro III mezcladas, el método perdía validez y se hacía necesario aplicar los nomogramas o las fórmulas de corrección que los autores indican en el trabajo citado; pero, para mezclas de los isómeros I y III de alrededor de 80:20, el método era exacto, dentro del margen del lógico error experimental.

Estos resultados y la buena sensibilidad que posee esta técnica cromatográfica sobre papel, son los que justifican haberla empleado en la presente investigación.

4º) En cuanto a la fracción Firiaporfirina, se determinó su estructura isomérica por descarboxilación, Los resultados confirmaron que la Firia de orina de porfíricos es de tipo isomérico III puro, pues en ningún caso se logró detectar la presencia de

Copro I en los descarboxilados (página 68), en desacuerdo con los resultados obtenidos por Chu y Chu (98).

5º) Se estudiaron también las porfirinas Hexa y Penta - carboxílicas obtenidas, cristalizándolas (las formas cristalinas se indican en las figuras 36 y 37), determinando sus P.F. y máximos de absorción (Tabla V) y los espectros completos de absorción en solución clorofórmica (figura 39).

Además, se las descarboxiló para determinar su estructura isonérica, llegando a la conclusión de que la Hexa era isómero III puro, pues sólo se obtuvo Copro III, mientras que la Penta era una mezcla de isómeros I y III, dado que se obtuvieron mezclas de las dos Copro en el descarboxilado.

6º) En cuanto a la Copro de orina, se la cristalizó y determinó su P.F., el que no correspondió al de ninguno de los isómeros puros (página 72), por lo que se confirmó por el método de Eriksen que se trataba de una mezcla de Copro I y III (figura 41).

7º) Resultó de interés estudiar la composición del complejo porfirínico excretado por ratas intoxicadas con hexacloro - benceno, lo que se hizo por cromatografía en columna y sobre papel.

Los resultados obtenidos, que figuran en la Tabla VI y en las figuras 42 y 43, indican que es cuali- y cuantitativamente similar al que se obtiene de orinas humanas de porfirias hepáticas, aunque los animales no presenten una sintonatología clínica semejante.

Aunque hubiera sido conveniente confirmar si la estructura isonérica de cada fracción también era similar a la de orinas humanas, no fué posible efectuar tal estudio debido a la escasa

cantidad de material de que se disponía y al largo tiempo de drogado que requieren las ratas antes de comenzar a excretar porfirinas.

No obstante, como "a priori" la composición de la fracción Uro es semejante en ambos casos, la determinación de las estructuras isoméricas será objeto de un trabajo posterior.

En cuanto a la composición cuali-cuantitativa del complejo porfirínico urinario de casos humanos, se encontró una acumulación de porfirinas de la serie isomérica III, en cantidades que están en el siguiente orden decreciente :

Firia III > Uro III > Copro III > Hexa III > Penta III

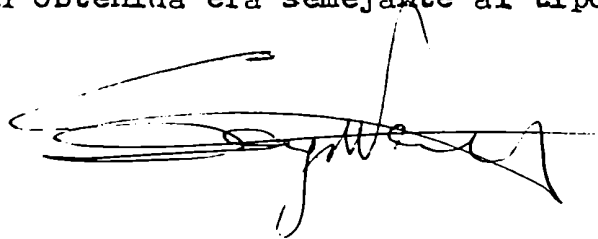
El examen del mapa metabólico correspondiente a la biosíntesis de porfirinas y los resultados encontrados, parecerían indicar que, al estar aumentada en general la biosíntesis de porfirinas y existir más Copro de la necesaria, aparece Penta III y Hexa III, probablemente por un mecanismo de regulación enzimática tipo "feed back"; en cambio, la acumulación de Firia III se explicaría por inhibición del sistema enzimático responsable de su descarboxilación, encontrándose Uro III también por un mecanismo "feed back".

En cuanto a las porfirinas de la serie I halladas, son Uro I (gran cantidad), algo de Penta I y una cantidad significativa de Copro I. No se halló nada de Firia I y Hexa I.

Esto sugiere que el sistema enzimático descarboxilante de la Uro es muy poco activo para el isómero I, siendo este paso

el limitante de la velocidad en dicha serie isomérica. En cuanto a la acumulación de Copro I, es lógica debido a que representaría el producto final del metabolismo de la serie isomérica I, apareciendo algo de Penta I, también aquí, como consecuencia de un "feed back".

Finalmente, si, como se presume, se confirma la similitud del cuadro químico de las porfirinas excretadas por ratas intoxicadas con hexaclorobenceno y por seres humanos enfermos de porfiria hepática tipo cutánea tarda, se concretaría así la posibilidad de producir experimentalmente estados semejantes a este tipo de porfiria, lo que sería de interés pues, si bien se ha informado la existencia de varias drogas inductoras de porfiria (5, 123, 124, 125), la enfermedad obtenida era semejante al tipo agudo.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'N. J. ...' with a stylized flourish at the end.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. J. ...' with a long horizontal stroke and a flourish at the end.

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

- 1) GARROD, A.E.: Inborn errors of metabolism (2d. ed.; London: Henry Frowde, ed., 1923).
- 2) WATSON, C.J.: Advanc. intern. Med.; 6, 235 (1954).
- 3) SCHWARTZ, S.; KEPRIOS, M. & SCHMID, R.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med.; 79, 463 (1952).
- 4) SCHMID, R. & SCHWARTZ, S.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med.; 81, 685, (1952).
- 5) TIGIER, H.A.: Metabolismo del Porfobilinógeno. Tesis. Fac. Cs. Exactas y Naturales. Univ. Bs. Aires (1962).
- 6) HOPPE-SEYLER, F.: Med. Chem. Untersuch. a. d. Lab. zu Tübingen; 4, 525 (1871).
- 7) NENCKI, M. & SIEBER, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol.; 24, 430 (1888).
- 8) GÜNTHER, H.: Deutsches Arch. klin. Med.; 105, 89 (1911).
- 9) GÜNTHER, H.: Ergebn. allg. Path. u. path. Anat.; 20, 607 (1922).
- 10) MICHELI, F. & DOMINICI, G.: Deutsches Arch. klin. Med.; 171, 154 (1931).
- 11) MASON, V.R.; COURVILLE, C. & ZISKIND, E.: Medicine; 12, 355 (1933).
- 12) WALDENSTRÖM, J.: Acta med. scandinav.; supp. 82 (1937).
- 13) DOBRINER, K. & RHOADS, C.P.: Physiol. Rev.; 20, 416 (1940).
- 14) WATSON, C.J. & LARSON, E.A.: Oxford Medicine (New York: Oxford University Press, 1951); Vol. IV, Pt. II, p. 228.
- 15) WATSON, C.J.: Porphyrin Metabolism, in Duncan, G.G. (ed.): Diseases of Metabolism (3d. ed.; Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1952).
- 16) SCHMID, R.; SCHWARTZ, S. & WATSON, C.J.: A.M.A. Arch. Int. Med.; 93, 167 (1954).
- 17) SCHMID, R., SCHWARTZ, S. & SUNDBERG, R.D.: Blood; 10, 416 (1955).
- 18) MACKEY, L. & GARROD, A.E.: Quart. J. Med.; 19, 357 (1926).
- 19) SCHMID, R.; SCHWARTZ, S. & WATSON, C.J.: Acta haematol.; 10, 150 (1953).

- 20) MÜLLER, A.H.: Ztschr.klin.Med.; 127, 460 (1934)
- 21) ERIKSEN, L.: Scandinv.J.Clin. & Lab.Invest.; 3, 121 (1951).
- 22) SVEINSSON, S.L.; RIMINGTON, C. & BARNES, H.D.: Scandinv.J. Clin.& Lab.Invest.; 1, 2 (1949).
- 23) ALDRICH, R.A.; HAWKINSON, V.; GRINSTEIN, M. & WATSON, C.J.: Blood; 6, 685 (1951)
- 24) BRUNSTING, L.A.; MASON, H.L. & ALDRICH, R.A.: J.A.M.A.; 146, 1207 (1951).
- 25) GARCIN, R. & LAPRESLE, J.: Semaine Méd.Paris; 26, 3404 (1950).
- 26) SCHMIDT, P.R.: Fortsch.Neurol. u.Psychiat.; 20, 422 (1952).
- 27) WALDENSTRÖM, J.: Acta psychiat.et neurol.; 14, 375 (1939).
- 28) CALVY, G.L.: Surg., Gynec. & Obst.; 90, 716 (1950)
- 29) RENTSCHLER, E.H.: Am. Surgeon; 18, 758 (1952)
- 30) GRINSTEIN, M.: Rev.Asoc.Med.Arg.; 73, 518 (1959).
- 31) WALDENSTRÖM, J. & VALQHIST, B.: Acta med.scandinav.; 117, 1 (1944).
- 32) DEAN, G.: Brit.M.J.; 2, 1291 (1953).
- 33) DEAN, G. & BARNES, H.H.: Brit.M.J.; 2, 89 (1955).
- 34) JØRGENSEN, J. & WITH, T.K.: Nord.med.; 27, 1341 (1945).
- 35) DUESBERG, R.: Münchener Med.Wochschr.; 29, 1821 (1932).
- 36) NESBITT, S. & WATKINS, C.H.: Am.J.M.Soc.; 203, 74 (1942).
- 37) LARJANKO, J.: Acta Soc.med.fenn."Duodecim", (Ser.B.), Vol.21, fasc.2 (1935).
- 38) CALVY, G.L.; JARNSZEWSKI, E.J. & CARROLL, H.H.: Ann.Int.Med.; 34, 767 (1951).
- 39) MACGREGOR, A.G.; NICHOLAS, R.E.H. & REMINGTON, C.: Arch.Int. Med.; 90, 505 (1952).
- 40) REMINGTON, C.: Acta med.scandinav.; 143, 161 y 177 (1952).
- 41) NICHOLAS, R.E.H. & RIMINGTON, C.: Biochem.J.; 55, 109 (1953).
- 42) WALDENSTRÖM, J.: Amer.J.Med.; 22, 758 (1957).

- 43) EALES, L.: Ann.Rev.Med.; 12, 251 (1961).
- 44) WALDENSTRÖM, J. & HAEGGER-ARONSEN, B.: Brit.M.J.; N° 5352, 272 (1963).
- 45) DEAN, G. & BARNES, H.H.: Brit.M.J.; 2, 1291 (1958).
- 46) DEAN, G. & BARNES, H.H.: S.Afr.med.J.; 33, 246 (1959).
- 47) EALES, L.: S.Afr.J.Lab.clin.Med.; 105, 89 (1960).
- 48) BARNES, H.H.: S.Afr.med.J.; 32, 680 (1958).
- 49) WELLS, G.C. & RIMINGTON, C.: Brit.J.Derm.; 65, 337 (1953).
- 50) HOLTI, G.; RIMINGTON, C.; TATE, B.C. & THOMAS, G.: Quart.J.Med.; 27, 1 (1958).
- 51) TIO, T.H.: University of Amsterdam; M.D. Thesis (1956).
- 52) HAEGGER-ARONSEN, B.: Lancet; 1, 1073 (1961).
- 53) HAEGGER-ARONSEN, B.: Amer.J.Med.; en prensa (1963).
- 54) KOSENOW, W.: Med.Klin.; 49, 1099 (1954).
- 55) MAGNUS, I.A.; JARRETT, A.; PRANKERD, T.A.J. & RIMINGTON, C.: Lancet; 2, 448 (1961).
- 56) FISCHER, H.: Z.physiol.Chem.; 95, 34 (1915).
- 57) FISCHER, H.: Z.physiol.Chem.; 96, 148 (1915).
- 58) FISCHER, H.: Z.physiol.Chem.; 97, 109 (1916).
- 59) FISCHER, H. & ORTH, H.: Die Chemie des Pyrrols; vol. 2 (1937).
- 60) FISCHER, H. & ZEILE, S.: Ann. der Chem.; 468, 98 (1929).
- 61) FISCHER, H. & ZERWECK, W.Z.: Z. physiol.Chem.; 137, 242 (1924).
- 62) MACDONALD, S.F. & STEDMAN, D.: J.Am.Chem.Soc.; 75, 3040 (1953).
- 63) VAN DEN BERGH, A.A.H.; REGNIERS, S. & MÜLLER, P.: Arch. f. Verdaungs; 42, 302 (1928).
- 64) WATSON, C.J. & LARSON, E.A.; Physiol.Rev.; 27, 478 (1947).
- 65) FISCHER, H. & ZERWECK, W.Z.: Z.physiol.Chem.; 137, 176 (1924).
- 66) NICHOLAS, R.E.H. & RIMINGTON, C.: Scand.J.Clin.Lab.Invest.; 1, 12 (1949).

- 67) WALDENSTRÖM, J.: Deutsch.Arch.f.Klin.Med.; 178, 39 (1935).
- 68) WALDENSTRÖM, J.; FINK, H. & HOERBURGER, W.: Z. physiol. Chem.; 233, 1 (1935).
- 69) MERTENS, E.: Z. physiol. Chem.; 238, 1 (1936).
- 70) MERTENS, E.: Z. physiol. Chem.; 250, 57 (1937).
- 71) RIMINGTON, C.: Onderspoort J. Vet. Sci.; 2, 567 (1936).
- 72) RIMINGTON, C.: Proc. Roy. Soc. B.; 127, 106 (1939).
- 73) FISCHER, H. & HILGER, J.: Z. physiol. Chem.; 128, 167 (1923).
- 74) GRINSTEIN, M.; SCHWARTZ, S. & WATSON, C. J.: J. Biol. Chem.; 157, 323 (1945).
- 75) WATSON, C. J.; SCHWARTZ, S. & HAWKINSON, V.: J. Biol. Chem.; 157, 345 (1945).
- 76) WATSON, C. J.; LOWRY, P. T.; SCHMID, R.; HAWKINSON, V. & SCHWARTZ, S.: Trans. Assoc. of Amer. Physicians, Lxiv, 345 (1951).
- 77) GRINSTEIN, M.; ALDRICH, R.; HAWKINSON, V. & WATSON, C. J.: J. Biol. Chem.; 179, 983 (1949).
- 78) WATSON, C. J.: Lancet; March 10, 539 (1951).
- 79) PRUNTY, F. T. G.: Arch. Int. Med.; 77, 623 (1946).
- 80) GIBSON, Q. H. & HARRISON, D. C.: Biochem. J.; 46, 154 (1950).
- 81) MACSWINEY, R. R., NICHOLAS, R. E. H. & PRUNTY, F. T. G.: Biochem. J.; 46, 147 (1950).
- 82) GRAY, C. H.: Arch. Int. Med.; 85, 459 (1950).
- 83) NICHOLAS, R. E. H.: Biochem. J.; 48, 309 (1951).
- 84) FALK, J. E. & BENSON, A.: Biochem. J., 55, 101 (1953).
- 85) KENNARD, O. & RIMINGTON, C.: Biochem. J., 55, 105 (1953).
- 86) CANIVET, J. & RIMINGTON, C.: Biochem. J., 55, 867 (1953).
- 87) EDMONSON, P. R. & SCHWARTZ, S.: J. Bio. Chem.; 205, 605 (1953)
- 88) WATSON, C. J. & BERG, M.: J. Biol. Chem.; 214, 537 (1955).
- 89) COOKSON, G. H. & RIMINGTON, C.: Biochem. J.: 57, 476 (1954)
- 90) GRINSTEIN, M.: La Prensa Méd. Arg.; 42, 2863 (1955).

- 91) CHU, T.C. & CHU, E.J.-H.: J. Biol. Chem.; 227, 505 (1957).
- 92) CHU, T.C.; GREEN, A.A. & CHU, E.J.-H.: J. Biol. Chem.; 205, 605 (1953).
- 93) DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E.: Biochem. J.; 56, 156 (1954).
- 94) DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E.: Biochem. J.; 63, 72 y 80 (1956)
- 95) FALK, J.E.; DRESEL, E.I.B.; BENSON, A. & KNIGHT, B.C.: Biochem. J.; 63, 87 (1956).
- 96) FALK, J.E.; DRESEL, E.I.B. & REMINGTON, C.: Nature; 172, 292 (1953).
- 97) BATLLE, A.M. del C. & GRINSTEIN, M.: Biochem. Biophys. Acta; 57, 191 (1962).
- 98) CHU, T.C. & CHU, E.J.-H.: J. Biol. Chem.; 234, 2741, 2747 y 2751 (1959).
- 99) SHEMIN, D.: Currents in Biochemical Research Int., N.Y. (1958)
- 100) RIMINGTON, C.: Rev. of pure and applied Chemistry; 8, 129 (1958).
- 101) SHEMIN, D.; RUSSELL, C.S. & ABRAMSKY, T.: J. Biol. Chem.; 215, 615 (1955).
- 102) SHEMIN, D. & RUSSELL, C.S.: J. Am. Chem. Soc.; 75, 4873 (1953).
- 103) DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E.: Nature, 172, 1093 (1953).
- 104) WALDENSTRÖM, J. & VALQHIIST, B.: Z. physiol. Chem.; 260, 189 (1939).
- 105) WESTALL, R.G.: Nature; 170, 614 (1952).
- 106) COOKSON, G.H. & RIMINGTON, C.: Biochem. J.; 57, 476 (1954).
- 107) BOGORAD, L.: J. Biol. Chem.; 233, 501 (1958).
- 108) BOGORAD, L.: J. Biol. Chem.; 233, 510 (1958).
- 109) GRINSTEIN, M.; KAMEN, M.D.; WIKOFF, H.M. & MOORE, C.V.: J. Biol. Chem.; 182, 175 (1950).
- 110) NEVE, R.A.; LABBE, R.F. & ALDRICH, R.A.: J. Am. Chem. Soc.; 78, 691 (1956).
- 111) SANO, S. & GRANICK, S.: J. Biol. Chem.; 236, 1173 (1961).
- 112) BOGORAD, L. & MARKS, G.S.: Biochim. Biophys. Acta; 41, 356 (1960)

- 113) BATLLE, A.M. del C.: Biosíntesis de Porfirinas. Tesis, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Univ. Bs. Aires (1962).
- 114) SCHMID, R.: New Engl. J. Med.; 263, 397 (1960).
- 115) OCKNER, R.K. & SCHMID, R.: Nature, 189, 499 (1961).
- 116) DE MATTEIS, F.; PRIOR, B.E. & RIMINGTON, C.: Nature; 191, 363 (1961).
- 117) GRINSTEIN, M.: Anal. Asoc. Quím. Arg.: 28, 232 (1940).
- 118) ZECHMEISTER, L. & CHOLNOKY, L.: Principles and practice of chromatography; New York (John Wiley & Sons, Ed.) (1941).
- 119) ERIKSEN, E.: Scandinv. J. Clin. & Lab. Inv.; 10, 314 (1958).
- 120) BATLLE, A.M. del C. & GRINSTEIN, M.: VIII° Congreso Latinoamericano de Química (Buenos Aires); pág. 107 (1962).
- 121) SALUM, Y., BATLLE, A.M. del C. & GRINSTEIN, M.: An. Asoc. Quím. Arg.; 49, 269 (1961).
- 122) CORNFORD, P.A.D. & BENSON, A.: J. Chromatog.; 10, 141 (1963)
- 123) SCHMID, R.; HANSON, B. & SCHWARTZ, S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 79, 463 (1952)
- 124) TALMAN, E.L.; CASE, J.D.; NEVE, R.; LABBE, R.F. & ALDRICH, R.A.: J. Biol. Chem.; 212, 663 (1955).
- 125) GOLDBERG, A. & RIMINGTON, C.: Proc. Roy. Soc. B.; 143, 257, (1955).

I N D I C E

PAGINA

Padrino de Tesis	1
Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Abreviaturas utilizadas	4

INTRODUCCION

Porfiria	5
Clasificaciones de las porfirias	6
Porfiria eritropoyética	7
Porfiria hepática	9
Porfiria aguda intermitente	10
Porfiria cutánea tarda	11
Tipo mixto o combinado	13
Porfirinas	17
Porfirina de Waldenström	22
Porfirinas Hepta-,Hexa-y Pentacarboxílicas	29
Biosíntesis de porfirinas	31
Porfiria por intoxicación con Hexaclorobenceno	33
Objeto del trabajo	34

PARTE EXPERIMENTAL

Métodos	36
A) Determinación cualitativa de porfirinas y pre - cursores	36
B) Concentración de las porfirinas de orina	36
1º) Método de extracción	37
2º) Método de adsorción con talco	37
C) Esterificación de las porfirinas	38
D) Purificación y separación de las distintas por- firinas por cromatografía en columnas de carbonato de calcio	39

E) Separación de Uro I y Uro III por extracción con acetato de etilo	43
F) Identificación de las porfirinas	45
1º) Por cromatografía en papel de los ésteres metílicos	45
2º) Por cromatografía en papel de las porfirinas libres	46
3º) Por cristalización	47
4º) Por determinación de los puntos de fusión	47
5º) Por descarboxilación	47
6º) Por determinación de los máximos y curvas de absorción	49
G) Valoración cuantitativa de porfirinas	49
Testigos	50
Solventes	50
Microfotografías	51
Material estudiado	51

RESULTADOS

1º) Cromatografía de los extractos totales de porfirinas de orina	53
2º) Composición cuantitativa del complejo porfirínico.	54
3º) Composición de la Porfirina de Waldenström	56
4º) Composición de la Uroporfirina de orinas porfíricas	65
5º) Estudio de la Firiaporfirina	68
6º) Estudio de la Hexa y Pentaporfirina	69
7º) Identificación de la Coproporfirina	72
8º) Porfirinas de orina de ratas	74

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Bibliografía	82
Indice	88

