

Tesis de Posgrado

Bioquímica y genética de la porfiria cutánea hepática

Mendez, Manuel

1998

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:

Mendez, Manuel. (1998). Bioquímica y genética de la porfiria cutánea hepática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3017_Mendez.pdf

Cita tipo Chicago:

Mendez, Manuel. "Bioquímica y genética de la porfiria cutánea hepática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3017_Mendez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



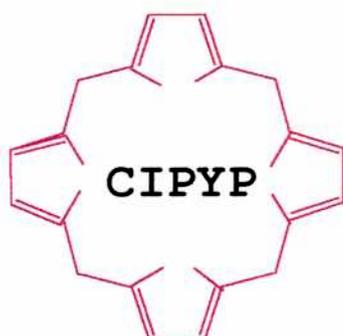
UBA

Universidad de Buenos Aires

BIOQUIMICA Y GENETICA DE LA PORFIRIA CUTANEA HEPATICA

Manuel Mendez

30174



TESIS 1998

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Nº 30174

52

**BIOQUIMICA Y GENETICA DE LA
PORFIRIA CUTANEA HEPATICA**

Manuel Mendez

DIRECTOR: Dra. Victoria Estela Parera

CODIRECTOR: Dra. María Victoria Rossetti

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR de la Universidad de Buenos Aires

1998

a la memoria de mis
PADRES

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi familia, por alentarme a iniciar la Carrera y por el apoyo que recibí en todo momento.

A Vicky por haber confiado en mí y por dirigir mi Tesis

A Alcira por haberme dado la posibilidad de iniciarme en la Investigación

A Maria Victoria por coodirigir mi Tesis y alentarme continuamente.

A mis amigos y compañeros de Facultad que me ayudaron a sobrellevar la Carrera.

A Carina, Adrianita, Marcelo, Laura, Adriana, Alejandra, Cuqui, Guillermo, y Fernando por haberme hecho más agradables estos años en la Investigación.

A Swe por enseñarme a medir la URO-D

A Carina y Fernando por enseñarme a usar el HPLC

A mis compañeros de laboratorio Laura y Adriana y a todos mis compañeros del CIPYP por haberme ayudado siempre que los necesité

A Ana Buzaleh, Adrianita y Fernando por ayudarme en la escritura de la Tesis

A Héctor, Laura y Bety por su colaboración con los pacientes

Al CONICET por las Becas otorgadas

Al Mount Sinai Hospital de Nueva York por haberme dado la posibilidad de realizar una parte de la Tesis.

INDICE

INTRODUCCION

CAPITULO I: BIOSINTESIS DEL HEMO.....	1
I.1 PORFIRINAS Y PRECURSORES.....	1
I.2 BIOSINTESIS DEL HEMO Y SU REGULACION.....	3
I.3 REFERENCIAS.....	7
CAPITULO II: PORFIRIAS HUMANAS.....	11
II.1. PORFIRIAS.....	11
II.2. PORFIRIAS AGUDAS.....	13
II.3. PORFIRIAS NO AGUDAS.....	14
II.4. ASPECTOS MOLECULARES DE LAS PORFIRIAS.....	15
II.5 REFERENCIAS.....	16
CAPITULO III: UROPORFIRINOGENO DECARBOXILASA.....	21
III.1 PROPIEDADES Y MECANISMO DE ACCION.....	21
III.2 LOCALIZACION CROMOSOMICA.....	23
III.3 ESTRUCTURA DEL GEN Y mRNA.....	24
III.4 REFERENCIAS.....	27
CAPITULO IV: PORFIRIA CUTANEA HEPATICA.....	31
IV.1 DEFECTO ENZIMATICO.....	31
IV.2 PORFIRIA CUTANEA TARDIA.....	31
IV.2.1 SIGNOS BIOQUIMICOS.....	33
IV.2.2 SINTOMATOLOGIA.....	33
IV.2.3 TRATAMIENTOS.....	35
IV.2.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA PCT.....	36
IV.3 PORFIRIA HEPATOERITROPOYETICA.....	37
IV.4 GENETICA MOLECULAR DE LA PCT Y PHE.....	38
IV.5 REFERENCIAS.....	42

MATERIALES Y METODOS

I. REACTIVOS Y ENZIMAS.....	52
II.MATERIAL BIOLÓGICO.....	53
II.1 Obtención y procesamiento de la sangre para las determinaciones bioquímicas.....	53
II.2 Conservación de orina para la determinación de porfirinas.....	53
II.3 Obtención de linfocitos para la extracción de ARN y ADN.....	53
III. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN PACIENTES.....	54
III.1 Determinación de porfirinas urinarias totales.....	54
III.2 Extracción y determinación cuantitativa de porfirinas esterificadas.....	55
III.3 Porphirinas plasmáticas.....	56
III.4 Determinación de la actividad de ALA-D.....	57
III.5 Determinación de la actividad de PBGasa yPBG-Deaminasa..	58
III.6 Determinación de la actividad de URO-D.....	59
III.7 Determinación de proteínas.....	61
IV. BUSQUEDA DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES	
PATOLÓGICAS EN EL GEN DE LA URO-D.....	61
IV.1 Extracción del RNA total.....	62
IV.2 Extracción del DNA genómico.....	63
IV.3 Retrotranscripción y Amplificación (RT-PCR)	64
IV.4 Purificación del cDNA amplificado	65
IV.5 Amplificación asimétrica.....	66
IV.6 Amplificación del DNA genómico.....	66
IV.7 Amplificación del gen de la URO-D en un solo fragmento (Long Range PCR)	68
IV.8 Purificación del DNA amplificado para secuenciación.....	69

	Página
IV.9 Secuenciación.....	69
IV.10 Polimorfismo de conformación de simple cadena (SSCP).....	73
V. EXPRESION PROCARIOTICA DE LAS MUTACIONES MISSENSE	74
V.1 Sistema de expresión.....	74
V.2 Preparación de células competentes.....	75
V.3 Determinación de URO-D en bacterias.....	75
V.4 Construcción de los mutantes.....	77
V.5 Determinación de la actividad residual en los clones mutantes.....	83
V.6 Estabilidad a 37 °C.....	84
VI REFERENCIAS.....	84

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I: OPTIMIZACION DE LAS TECNICAS.....	87
I.1 DETERMINACION DE URO-D EN SANGRE.....	87
I.2 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLOGICO PARA ESTUDIOS GENETICOS.....	95
I.3 AMPLIFICACION DEL cDNA.....	96
I.4 AMPLIFICACION DEL DNA GENOMICO.....	99
I.5 SSCP.....	101
I.6 ESTUDIOS DE EXPRESION.....	103
I.7 REFERENCIAS.....	108
 CAPITULO II: PORFIRIA CUTANEA TARDIA EN LA ARGENTINA. ESTUDIOS BIOQUIMICOS.....	 109
II.1-MEDICION DE URO-D EN PACIENTES CON PCT.....	110

	Página
II.2-ASOCIACION PCT-VIRUS DE HEPATITIS	112
II.2.1 Estudios del metabolismo del hemo en pacientes no porfíricos con hepatopatías.....	112
II.2.2 Determinación de URO-D en pacientes PCT con estudio hepático.....	118
II.3 ASOCIACION PCT-VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	121
II.4 REFERENCIAS	124
CAPITULO III: SECUENCIA DEL GEN DE LA URO-D	127
III.1 SECUENCIA NORMAL	127
III.2 POLIMORFISMOS DETECTADOS	132
III.3 REFERENCIAS	136
CAPITULO IV: ESTUDIOS GENETICOS EN PACIENTES CON PCT-F	137
IV.1. PACIENTES ESTUDIADOS	137
IV.2. MUTACIONES ENCONTRADAS	137
IV.3. EXPRESION DE LAS MUTACIONES MISSENSE	153
IV.4. REFERENCIAS	159

INTRODUCCION

CAPITULO I

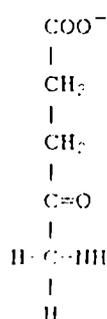
BIOSINTESIS DEL HEMO

I.1 PORFIRINAS Y PRECURSORES

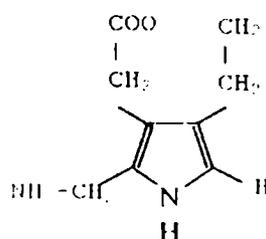
Las porfirinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y participan en procesos metabólicos de fundamental significado biológico tales como fotosíntesis y respiración. Se sintetizan a partir de moléculas relativamente simples, el primer precursor es una molécula lineal de cuatro carbonos, el ácido δ -aminolevúlico (ALA), y el siguiente es el porfobilinógeno (PBG), que es un monopirrol no saturado heterocíclico; ambas presentan una estructura química hidrofílica que les confiere alta solubilidad en agua y por lo tanto se excretan por orina (Figura I.1). Las porfirinas son compuestos cíclicos formados por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D) unidos por puentes meteno (α , β , γ y δ). La existencia de dobles enlaces alternados da lugar a una molécula plana, rígida, resonante y muy estable. Presentan cadenas laterales sustituyentes en las posiciones β - de los carbonos de cada núcleo pirrólico, éstas se numeran de 1 a 8, comenzando por el anillo A. (Figura I.2); el tipo y número de cadenas laterales determinan las propiedades físicas de las porfirinas resultantes. Las primeras porfirinas que se forman en la síntesis del hemo contienen más sustituyentes ácido-carboxílicos que las restantes y son por lo tanto más solubles en agua, razón por la cual la Uroporfirina (con ocho carboxilos) se excreta principalmente por orina, la Coproporfirina (con cuatro carboxilos) por orina y bilis mientras que la Protoporfirina (con dos carboxilos) se excreta solamente por bilis. Las porfirinas presentan fluorescencia roja bajo luz ultravioleta mientras que sus derivados reducidos, los porfirinógenos no son coloreados ni emiten fluorescencia.

Estas moléculas pueden combinarse fácilmente con metales dando quelatos como la clorofila (con magnesio), el hemo (con hierro) y las corrinas (con cobalto). Las clorofilas son esenciales en la captación de luz solar para su conversión a energía química, mientras que el hemo interviene en funciones vitales como transporte de oxígeno, generación de energía celular y reacciones de detoxificación. Entre las proteínas que contienen hemo como grupo prostético (hemoproteínas) encontramos a la hemoglobina, mioglobina, citocromos y enzimas como la peroxidasa y catalasa.

Dado que los metales de transición que están unidos a las porfirinas pueden cambiar su estado de oxidación, estos compuestos pueden actuar en procesos de transporte de electrones aumentando la eficiencia de las reacciones de óxido-reducción, por lo cual las porfirinas tuvieron un papel clave en el paso de una atmósfera anaeróbica a una aeróbica, constituyendo un hecho fundamental en la evolución de nuestro planeta.



Acido δ -aminolevúlico



Porfobilinógeno

FIGURA I.1: Estructura de los precursores de porfirinas

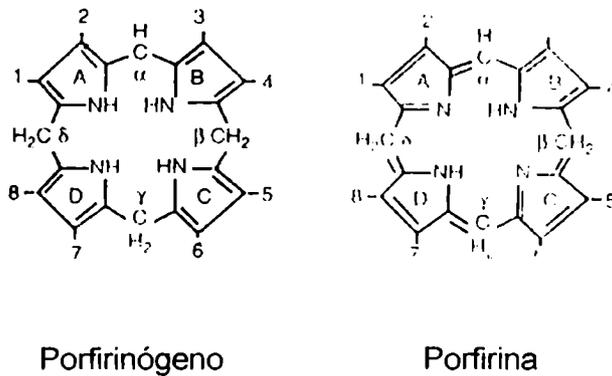


FIGURA I.2: Estructura básica de porfirinógenos y porfirinas

I.2 BIOSINTESIS DEL HEMO Y SU REGULACION:

Mediante estudios con marcadores isotópicos, se pudo dilucidar la secuencia de reacciones que llevan a la síntesis del grupo hemo (Cookson & Rimington, 1953; Granick & Bogorad, 1953; Neuberger & Scott, 1953; Shemin & Russel, 1953; Rimington & Krol, 1955), en el que participan ocho enzimas, la primera y las tres últimas son mitocondriales y las cuatro restantes citosólicas (Figura I.3).

El primer paso es la condensación de la glicina con succinil CoA, para formar el ácido δ -aminolevúlico (ALA), reacción catalizada por la enzima ALA sintetasa (ALA-S), utilizando fosfato de piridoxal como cofactor. Esta es la etapa limitante en esta ruta biosintética, y esta regulada por el pool de hemo libre intracelular. El ALA-S es una enzima muy inestable, con una vida media *in vivo* de alrededor de 60 minutos para la enzima mitocondrial de mamíferos (Granick & Sassa, 1971) y se trata de un homodímero que se sintetiza en el citosol y posteriormente migra a la mitocondria (Yamahuchi et al. 1980); presenta una forma eritroidea y una ubicua, codificadas en humanos por genes diferentes en distintos cromosomas, que en humanos mapean en Xp11.2 y 3p21 respectivamente (Bishop et al. 1981, 1990; Riddle et al. 1989; Cox et al. 1990).

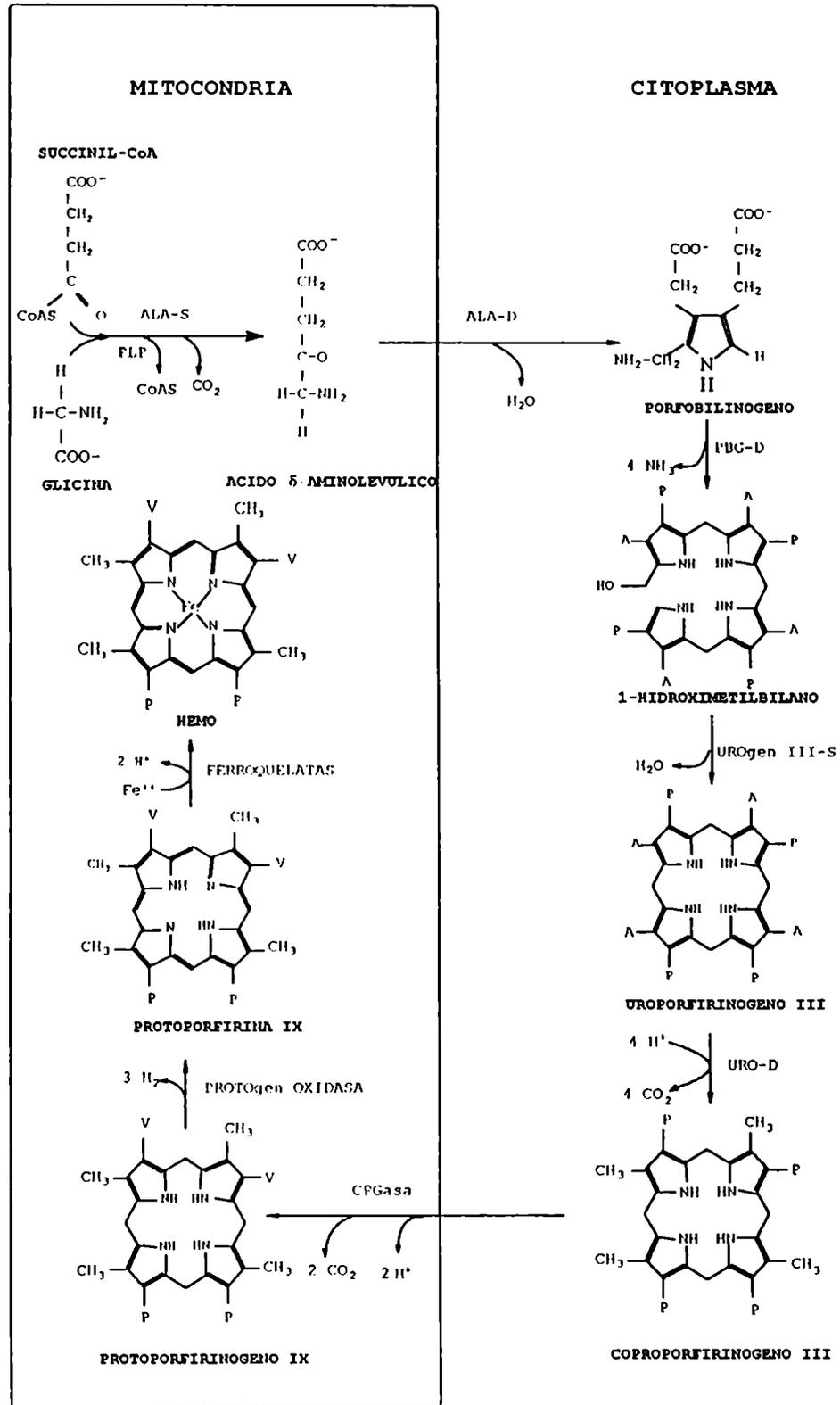


FIGURA I.3: Camino biosintético del hemo

El ALA es transportado activamente al citoplasma (Bermúdez-Moretti et al. 1993) donde una enzima sulfhidrónica, el ALA dehidrasa (ALA-D) forma, a partir de dos moléculas de ALA, un monopirrol, el PBG. El ALA-D es un támara de subunidades idénticas, cada una de las cuales requieren un átomo de zinc, éstos son fundamentales para la estabilidad y actividad catalítica de la enzima, por eso es particularmente sensible al plomo, que desplaza el zinc de la enzima (Jaffe et al. 1991); está codificada por un único gen que en humanos mapea en 9q34 (Potluri et al. 1987)

El paso siguiente es la condensación cabeza-cola de cuatro moléculas de PBG. para dar la primer porfirina de la ruta. En esta etapa participan dos enzimas en forma combinada, la PBG deaminasa (PBG-D) que condensa cuatro moléculas de PBG formando un tetrapirrol lineal llamado hidroximetilbilano (HMB), con un ordenamiento simétrico de sus sustituyentes; en ausencia de la segunda enzima, la isomerasa, el compuesto se cicla espontáneamente dando UROgen I, mientras que en presencia de la isomerasa el anillo D del HMB es invertido antes de la ciclación y se forma la estructura asimétrica UROgen III. La PBG-D es una enzima monomérica, sulfhidrónica, que está codificada por un gen que en humanos mapea en 11q24.1→q24.2 (Namba et al. 1991) y que presenta una forma ubicua y una eritroidea (Grandchamp et al. 1987). La isomerasa humana es termolábil, monomérica y está codificada por un gen que mapea en 10q25.3→q26.3 (Astrin et al. 1991)

Luego ocurre la decarboxilación secuencial de los cuatro grupos acetilo del UROgen III para dar grupos metilo, resultando así intermediarios con siete, seis y cinco carboxilos cuyo producto final, el Coproporfirinógeno III posee cuatro carboxilos. Esta reacción es la última citoplasmática y está catalizada por la Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D).que si bien puede usar como sustrato tanto al isómero I como al III del UROgen, la velocidad de decarboxilación es

mayor cuando utiliza a este último. La URO-D es una enzima sulfhidrónica, cuyo gen en humanos mapea en 1p34 (Dubart et al. 1986); la reciente cristalización reveló que es un homodímero (Phillips et al. 1997).

El COPROgen es transportado a la mitocondria donde la enzima coproporfirinógeno oxidasa (CPG-asa), que sólo actúa sobre el isómero III, decarboxila oxidativamente dos grupos propiónicos (en los anillos A y B) para dar dos grupos vinilo produciendo el protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX) con formación de un intermediario tricarbónico, por lo tanto la decarboxilación es secuencial (Batlle et al. 1965). Esta enzima es un homodímero cuyo gen en humanos mapea en 3q12 (Delfau-Larue et al. 1994)

Posteriormente la enzima Protoporfirinógeno oxidasa (PPG-ox) elimina seis átomos de hidrógeno del PROTOgen IX para dar Protoporfirina IX. Esta enzima es dependiente de oxígeno, sulfhidrónica y se encuentra asociada a la membrana interna de la mitocondria (Deybach et al. 1985); su gen en humanos mapea en 1q23 (Taketani et al. 1995; Roberts et al. 1995)

El último paso, catalizado por la Ferroquelatasa o Hemosintetasa es la inserción de un ión ferroso en el anillo porfirínico formándose así la molécula de hemo. Esta enzima es oligomérica, sulfhidrónica, fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria (McKay et al. 1969; Harbin et al. 1985); su gen en humanos mapea en 18q21.3 (Taketani et al. 1992).

En condiciones normales la cantidad de ALA, PBG y porfirinógenos que se acumula y excreta es muy pequeña lo cual indica que la biosíntesis del hemo se lleva a cabo en una forma perfectamente controlada. Cuando estos controles fallan hay una acumulación elevada de precursores y/o porfirinas con serias consecuencias para el organismo.

El control del camino del hemo se estudió principalmente en células hepáticas: El hemo libre regula su síntesis modulando la cantidad de ALA-S activa, actuando rápidamente por un mecanismo feed-back inhibiendo la actividad del ALA-S (Scholnick et al. 1972) y mediante un proceso más lento actuando a nivel de la síntesis de novo de la enzima. Primeramente se pensó que el hemo reprimía el gen del ALA-S (Yamamoto et al. 1982; Srivastava et al. 1988); hoy se sabe que las concentraciones fisiológicas de hemo no disminuyen la velocidad de transcripción del mRNA del ALA-S aunque producen un descenso en su estabilidad, es decir que ejerce un efecto postranscripcional (Drew & Ades, 1989; Hamilton et al. 1991). El hemo también actúa a nivel de la traslocación del precursor del ALA-S hacia la matriz mitocondrial (Hamilton et al. 1988; Yamauchi et al. 1991). Es decir que existe un pool de hemo libre que contiene el hemo recién sintetizado y del cual a su vez deriva el hemo para la síntesis de hemoproteínas, de manera tal que si este pool supera las necesidades celulares, el exceso ejerce su acción sobre el ALA-S.

I.3 REFERENCIAS:

- Astrin K.H; Warner, C.A; Yoo, H.W; Goodfellow, P.J; Tsai, S.F. & Desnick, R.J. (1991) Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (UROS) gene to chromosome 10q25→q26.3. *Hum Genet.* **87**: 18-22.
- Battle, A. M. del C; Benson, A. & Rimington, C. (1965) Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem. J.* **97**: 731-740.
- Bermúdez Moreti, M; Correa García, S; Ramos, E. & Battle, A. M. del C. (1993) δ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **25**: 1917-1924
- Bishop, D.F; Kitchen, H. & Wood, W.A. (1981) Evidence for erythroid and nonerythroid forms of δ -aminolevulinic acid synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**: 380-391.
- Bishop, D.F; Henderson, A.S; & Astrin, K.H.(1990) Human δ -aminolevulinic acid synthase: Assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics* **7**: 207-214.

Conboy, J.G; Cox, T.C; Bottomley, S.S; Bawden, M.J. & May, B.K. (1992) Human erythroid 5-aminolevulinatase synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 18753-18758

Cookson, G. & Rimington, C. (1953) Porphobilinogen. Chemical constitution. *Nature*, **171**: 875-876.

Cox, T.C. Bawden, M.J; Abraham N.G; Bottomley, S.S; May, B.K, Baker, E. Chen, L.Z. & Sutherland, G.R. (1990) Erythroid 5-aminolevulinatase synthase is located on the X-chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 107-111

Delfau-Laure, M.H; Martasek, P; & Grandchamp, B. (1994) Coproporphyrinogen oxidase gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping. *Hum. Mol. Genet.* **3** (8): 1325-1330.

Deybach, j; Da Silva, V; Grandchamp, B. & Nordman, Y. (1985) The mitochondrial localization of Protoporphyrinogen oxidase. *Eur. J. Biochem.* **149**: 431-435.

Drew, P.D & Ades, I.Z. (1989) Regulation of the stability of chicken embryo liver δ -aminolevulinatase synthase mRNA by henin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 102-107.

Dubart, A.; Mattei, M.G.; Raich, N.; Beaupain, D.; Roméo, P. H.; Mattei, J.F. & Goossens, M. (1986) Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1. *Hum. Genet.* **73** (3): 277-279.

Grandchamp, B; de Verneuil, H; Beaumont, C; Chretien, S; Walter, O & Nordmann, Y. (1987) Tissue specific expression of porphobilinogen deaminase. *Eur. J. Biochem.* **162**: 105-110.

Granick, S. & Sassa, S. (1953) Porphobilinogen a monopyrrole. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 3610

Granick, S. & Sassa, S. " δ -aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis", en Vogel, H. J. (de), *Metabolic Regulation*, vol 5, *Metabolic pathways*, Academic Press, New York, 77-141, 1971.

Hamilton, J.W; Bement, W.J; Sinclair, P.R; Sinclair, J.F. & Wetterhahn, K.E (1988) Expression of 5-aminolaevulinatase synthase and cytochrome P450 mRNA in chicken embryo hepatocytes *in vivo* and in culture. *Biochem. J.* **255**: 267-275.

Hamilton, J.W; Bement, W.J; Sinclair, P.R; Sinclair, J.F; Alcedo, J.A. & Wetterhahn, K.E. (1991) Heme regulates hepatic 5-aminolevulinatase synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* **289** (2): 387-392.

Harbin, B.M. & Dayley, H.A. (1985) Orientation of ferrochelatase in bovine liver mitochondria. *Biochem.* **24**: 366-370

- Jafe, E.K; Bagla, S. & Michini, P.A. (1991) Reevaluation of a sensitive indicator of early lead exposure: Measurement of porphobilinogen synthase in blood. *Biol. Trace. Element. Res.* **28**: 223-231.
- McKay, R; Druyan, R; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969) Intramitochondrial localization of δ -aminolevulinic synthase and ferrochelatase in the rat liver. *Biochem. J.* **114**: 455-461
- Namba, H; Narahara, K; Tsuji, K; Yokoyama, Y. & Senio, Y. (1991) Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1→q24.2 by in situ hybridization and gene dosage studies. *Cytogenet. Cell. Genet.* **57**: 105-108.
- Neuberger, A. & Scott, J. (1953) Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature*, **172**: 1093-1094.
- Phillips, J.D; Whitby, F.G; Kushner, J.P. & Hill, C.P. (1997) Characterization and crystalization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Protein Science* **6**: 1343-1346.
- Potluri, V.R; Astrin, K.H; Wetmur, J.G; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1987). Human δ -aminolevulinic dehydrase: Chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum. Genet.* **76**: 236-239.
- Riddle, R.D; Yamamoto, M. & Engel, J.D. (1989) Expression of δ -aminolevulinic synthase in avian cells: Separate genes encode erythroid-specific and nonspecific isozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**: 792-796.
- Rimington, C. & Krol, C. (1955) Decarboxylation of porphobilinogen and isoporphobilinogen- α -carboxylic acids. *Nature*, **175**: 630-631.
- Roberts, A.G; Whatley, S.D; Daniah, J; Holmans, P; Fenton, I; Owen, M.J; Thompson, P; Long, C. & Elder, G.H. (1995) Partial characterization and assignment of the gene for protoporphyrinogen oxidase and variegate porphyria to human chromosome 1q23. *Hum. Mol. Genet.* **4** (12): 2387-2390
- Scholnick, P.I; Hammaker, L.E. & Marber, H.S. (1972) Soluble δ -aminolevulinic acid synthetase of rat liver. 1. Some properties of the partially purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **247**: 4126-4131.
- Shemin, D. & Russel, C. (1953) δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 4873-4874.
- Srivastava, G; Borthwick, J.A; Maguire, D.J; Efferink, C.J; Bawden, M.J; Mercer, J.F.B. & May, B.K. (1988) Regulation of 5-aminolevulinic synthase mRNA in different rat tissues. *J. Biol Chem.* **263**: 5202-5209.
- Taketani, S; Inazawa, J; Nakahashi, Y; Abe, T; & Tokunaga, R. (1992) Structure of the ferrochelatase gene. *Eur. J. Biochem.* **205**: 217-222.

Tsai, S.F; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1987) Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **262**: 1268-1273.

Yamamoto, M; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1982) Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the δ -aminolevulinate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**: 985-990.

Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) Translocation of δ -aminolevulinate synthetase from the citosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver. *J. Biol. Chem.* **255**: 1746-1751

CAPITULO II

PORFIRIAS HUMANAS

II.1. PORFIRIAS

Las porfirias son desórdenes metabólicos del camino biosintético del hemo, cada tipo de porfiria es el resultado de una deficiencia enzimática parcial primaria de alguna de las enzimas del camino de las porfirinas, caracterizada por un patrón específico de acumulación y excreción de precursores, ácido δ -aminolevúlico (ALA) y porfobilinógeno (PBG) y/o porfirinas. Estos metabolitos son los causantes de las manifestaciones clínicas de estas enfermedades, las cuales pueden presentar cuadros de fotosensibilización, hepatopatías o síndrome neuroabdominal, que en algunos casos son similares a los de otras patologías y eventualmente pueden ser confundidos, por lo cual es fundamental su difusión. El síntoma típico de la mayor parte de las porfirias es la fotosensibilidad cutánea, causada por la acumulación de porfirinas en piel, por efecto de la luz solar estos pigmentos generan radicales libres que dañan las células ocasionando lesiones dermatológicas características. Las porfirias hereditarias o adquiridas son desencadenadas por una serie de factores entre los cuales se encuentran ciertas drogas, el alcohol, el ayuno, el stress; por esta razón existen listas de drogas clasificadas como seguras o prohibidas para su administración a pacientes porfíricos (Batlle & Magnin, 1988).

La deficiencia de una enzima del camino del hemo lleva a su bloqueo con la consiguiente disminución del pool de hemo libre, y la consiguiente desregulación del ALA-S, por lo tanto, todas las porfirias, además de la deficiencia de una enzima del hemo en particular, se caracterizan por un aumento en la actividad del ALA-S.

La evolución del conocimiento de estas enfermedades se refleja en la secuencia de las clasificaciones propuestas desde principios de siglo hasta el presente. (Günther 1911; Waldeström 1937, 1957; Schmid et al. 1954; Watson 1960; Goldberg & Riminton, 1962). La clasificación tradicional de las porfirias en hepáticas o eritropoyéticas, según cual fuera el sitio principal de expresión de la falla metabólica, o bien, en cutáneas o agudas de acuerdo a las principales manifestaciones clínicas, era insuficiente, de allí que una forma más satisfactoria de subdividir e identificar a este grupo de enfermedades es sumar al primer criterio, la división en agudas y no agudas. Con la individualización progresiva de los distintos tipos de porfirias en base a su correlación clínico-patológico-bioquímica y los aportes más recientes en cuanto a la identificación del defecto enzimático específico para cada una de ellas se ha llegado (Moore et al. 1987) a la clasificación que se ilustra en el siguiente Cuadro:

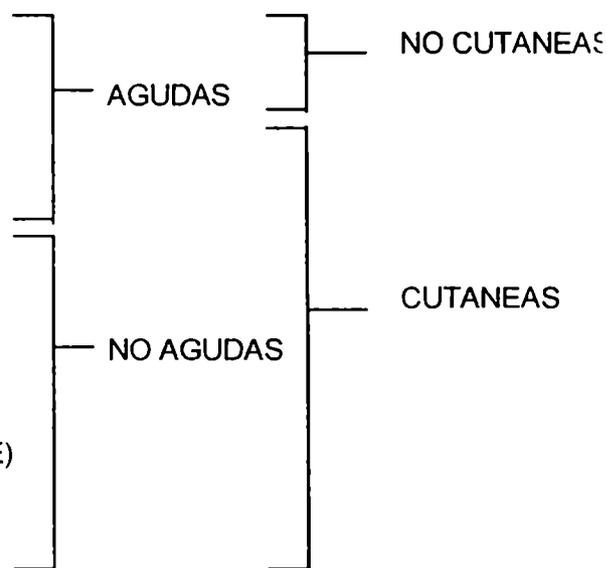
I. HEPATICAS

AGUDA INTERMITENTE (PAI)
 NUEVA PORFIRIA AGUDA (NPA)
 VARIEGATA (PV)
 COPROPORFIRIA HEREDITARIA (CPH)
 CUTANEA TARDIA (PCT)

II. ERITROPOYETICAS

CONGENITA ERITROPOYETICA (PCE)
 PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA (PPE)

III. HEPATOERITROPOYETICA (PHE)



II.2. PORFIRIAS AGUDAS

Estas enfermedades están caracterizadas clínicamente por ataques desencadenados por diversos factores precipitantes como el ayuno, el stress, la ingestión alcohólica, anticonceptivos orales, ciertas hormonas y diversas drogas entre las que se encuentran algunos antibióticos y sedantes, por lo tanto es fundamental un conocimiento de estos agentes para prevenir en pacientes portadores el desencadenamiento de un ataque agudo. De hecho, es importante destacar que muchos pacientes portadores de porfiria aguda pueden vivir sin experimentar jamás un ataque. Clínicamente, las características de estos ataques son dolores abdominales agudos de tipo cólico, anorexia, náuseas, vómitos, constipación a veces alternada con diarreas; a las que se atribuye un origen neurológico. Asimismo se dan convulsiones, parálisis de miembros superiores e inferiores, estados de excitación, ansiedad, depresión, insomnio y alucinaciones. Estos ataques agudos pueden llevar a la parálisis respiratoria y la muerte.

Desde el punto de vista bioquímico, la porfiria aguda intermitente (PAI), que es la más común entre las agudas, se debe a un defecto en la PBG-D (Strand et al. 1970; Broide et al. 1977), dicha falla se transmite en forma autosómica dominante y está acompañada por un aumento del sustrato de la enzima (PBG), así como del ALA, ya que el ALA-S está desregulada, por lo tanto hay un aumento en la excreción urinaria de ALA y PBG, aunque fuera del ataque dichos intermediarios pueden presentar valores cercanos al normal. Se propuso que la sobrecarga de ALA circulante en los pacientes con PAI induciría, por un mecanismo mediado por radicales libres, las manifestaciones clínicas de esta enfermedad (Hermes-Lima et al. 1991; Bechara et al. 1993). La porfiria aguda menos común, caracterizada por un aumento del ALA es la nueva porfiria aguda (NPA), causada por un defecto en el ALA-D y que se transmite en forma autosómica recesiva. (Doss et al. 1979). Es importante destacar el hecho de que el ALA-D es fuertemente inhibida por plomo, razón por la cual, en el saturnismo se

presenta un cuadro semejante a una porfiria aguda (Nakao et al. 1968). La coproporfiria hereditaria (CPH) y la porfiria variegata (PV) son porfirias con sintomatología aguda y cutánea; la primera se debe a un defecto en la CPGasa (Elder et al. 1976) y en la segunda el defecto está a nivel de la PPox (Brenner et al. 1980). Ambas se transmiten en forma autosómica dominante y se caracterizan por un aumento en la excreción urinaria de precursores de porfirinas y Coproporfirina en la fase aguda, así como un aumento de coproporfirina en materia fecal. En la PV además existe un aumento en los niveles de protoporfirina en heces. Existe una forma homocigota de la CPH, la harderoporfiria la cual se caracteriza por niveles elevados del intermediario tricarboxílico (Harderoporfirina) en heces (Nordmann et al. 1983; Doss et al. 1984)

II.2. PORFIRIAS NO AGUDAS

Este grupo de porfirias está caracterizado por la presencia de fotosensibilización cutánea con ausencia del síndrome neuroabdominal que caracteriza a las porfirias agudas. En todas las porfirias de este grupo hay una acumulación de porfirinas y el tipo de porfirina que se encuentra aumentado depende de la enzima afectada en cada caso. La acumulación de porfirinas en la piel ocasiona fotosensibilización ya que al absorber luz, principalmente en la banda de Soret (400-410 nm), las porfirinas pasan a un estado de excitación electrónica reaccionando directamente o mediante especies reactivas de oxígeno sobre estructuras celulares provocando el daño característico (Magnus et al. 1959; Spikes 1975; Moan 1984; von Steveninck et al. 1985). Dentro de este grupo, la más común es la porfiria cutánea tardía (PCT) que está causada por un defecto en la URO-D y se transmite en forma autosómica dominante (Kushner et al. 1976). La misma enzima se encuentra disminuída en la porfiria hepatoeritropoyética (PHE) pero en este caso se trata de una enfermedad recesiva (Piñol Aguade et al. 1969; Elder et al. 1981). En ambas porfirias hay una acumulación de porfirinas altamente

carboxiladas y los individuos afectados pueden progresar hacia un compromiso hepático. Es importante destacar que existe una forma de PCT no hereditaria o adquirida en la cual la disminución en la actividad de la URO-D está restringida al hígado (de Verneuil et al. 1978; Elder et al. 1978).

Existen otras tres porfirias que constituyen el grupo de las porfirias congénitas de las cuales la más importante es la congénita eritropoyética (PCE) que se transmite en forma autosómica recesiva causada por una falla a nivel de la isomerasa o uroporfirinogeno III cosintetasa con lo cual hay una acumulación del isómero no fisiológico del uroporfirinógeno, el URO I (Romeo & Levin, 1969; Nordmann & Deybach, 1982; Deybach et al. 1990). Se presenta con fotosensibilización temprana y progresiva con aparición de ampollas, erosiones, costras, úlceras, cicatrices y mutilaciones en zonas salientes (nariz, dedos de las manos, orejas, párpados); es característica la eritrodontia por la formación de depósitos de porfirinas en los dientes. Hay excreción de niveles elevados de URO y COPRO de la serie I. La protoporfiria eritropoyética (PPE) es una enfermedad de transmisión autosómica dominante y se debe a una falla en la ferroquelatasa presentándose con acumulación de protoporfirina que causa la fotosensibilización cutánea que la caracteriza y puede ser diagnosticada en base a los niveles elevados de protoporfirina en glóbulos rojos y materia fecal (Magnus et al. 1961; Bottomley et al. 1975; Nakahashi et al. 1992) y que puede evolucionar hacia una falla hepática terminal (Bloomer 1982).

II.3. ASPECTOS MOLECULARES DE LAS PORFIRIAS

Durante los últimos años, con el empleo de técnicas de biología molecular en el estudio del camino del hemo se han clonado los cDNA y genes que codifican las enzimas de esta ruta metabólica. Este hecho a su vez permitió estudiar a nivel molecular las fallas genéticas responsables de las distintas porfirias humanas.

EL ALA-D humana está codificada por un gen de 13 exones dentro de una extensión de 16 kb (Kaya et al. 1994) cuyo cDNA codifica para un polipéptido de 330 aminoácidos (Wetmur et al. 1986) y hasta el presente se describieron dos mutaciones de NPA. El cDNA de la PBG-D eritroidea codifica para 344 aminoácidos mientras que el de la forma ubicua para 361 (Raich et al. 1986; Grandchamp et al. 1987); ambos provienen de un mismo gen de 15 exones en 10 kb (Chretien et al. 1988) y se han descrito 84 mutaciones causantes de PAI. La isomerasa está codificada por un gen de 10 exones en 60 kb (Warner et al. 1990) cuyo cDNA codifica para 265 aminoácidos (Tsai et al. 1988); ya se han descrito 17 mutaciones en PCE. El cDNA de la URO-D codifica para 367 aminoácidos (Roméo et al. 1986) cuyo gen, de 3 kb contiene 10 exones (Romana et al. 1987) y hasta el presente se describieron 7 mutaciones en PCT-F y 10 en PHE. El gen de la CPGasa posee 7 exones y 14 kb (Delfau-Larue et al. 1994) con un cDNA que codifica para un polipéptido de 354 aminoácidos (Taketani et al. 1994); hasta el presente se describieron 6 mutaciones en CPH y una en Harderoporfiria. La PP-ox posee un cDNA que codifica para 477 aminoácidos (Nishimura et al. 1995), que se transcribe de un gen que contiene 13 exones en 8 kb (Taketani et al. 1995), y se conocen 5 mutaciones causantes de PV. El gen de la Ferroquelatasa está compuesto por 11 exones y comprende 45 kb (Taketani et al. 1992), su cDNA codifica para 423 aminoácidos (Nakahashi et al. 1990) y se identificaron hasta el momento 22 mutaciones en casos de PPE.

II.4 REFERENCIAS:

Battle, A.M. del C. & Magnin, P. (1988) Porfirias humanas y experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer. Sup. Nro. 2.*

Bechara, E; Medeiros, M; Monteiro, H; Hermes-Lima, M; Pereira, B; Demasi, M; Costa, C; Abdalla, D; Onuki, J; Wendel, C & Di Mascio, P. (1993) A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova*, **10**: 385-392.

Bloomer, J.R; Philips, M.J; Davidson, D.L. & Klatskin, G. (1975) Hepatic disease in erythropoietic protoporphyria. *Am. J. Med.* **58**: 869-882.

- Bloomer, J.R. (1982). Protoporphyrin. *Semin. Liver Dis.* 2: 143-153
- Brenner, D.A. & Bloomer, J.R. (1980) The enzymatic defect in variegate porphyria. Studies with human cultured skin fibroblast. *N. Engl. J. Med.* **302**: 765-769.
- Broide, M.J; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1977) Enzyme abnormalities in the porphyrias. *Lancet. II*: 690-701.
- Chretien, S; Dubart, A; Beaupain, B; Raich, N; Grandchamp, B; Rosa, J; Goossens, M. & Roméo, P.H. (1988) Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6-10.
- De Verneuil, H.; Nordmann, Y.; Phung, N.; Grandchamp, B.; Aitken, G.; Grelier, N. & Noire, J. (1978) Familial and sporadic porphyria cutanea tarda. Two different diseases. *Int. J. Biochem.* **9**: 927-931.
- Delfau-Laure, M.H; Martasek, P; & Grandchamp, B. (1994) Coproporphyrinogen oxidase gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping. *Hum. Mol. Genet.* **3** (8): 1325-1330.
- Deybach, J.C; de Verneuil, H; Boulechar, S; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1990) Point mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria (Günther's disease). *Blood.* **75**: 1763-1765.
- Doss, M; von Tiepermann, R; Schneider, J. & Schmid, H. (1979) New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittent acute clinical manifestation. *Klin. Wochenschr.* **57**: 1123-1127.
- Doss, M; von Tiepermann, R. & Kopp, W. (1984) Harderoporphyrin coproporphyria. *The Lancet. I*: 292
- Elder, G.H; Evans, J.D; Thomas, N; Cox, R; Broide, M.J; Moore, M.D; Goldberg, A. & Nicholson, D.C. (1976) The primary enzymatic defect in hereditary coproporphyria. *Lancet II*: 1217-1219
- Elder, G.; Lee, G. & Tovey, J. (1978) Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N. Engl. J. Med.* **299**: 274-278.
- Elder, G.H.; Smith, S.G.; Herrero, C.; Lecha, M.; Mascaró, J.M.; Muniesa, A.M.; Czamecki, D.B.; Bernan, J. Poulos, V. & Enríquez de Salamanca, R. (1981) Hepatoerythropoietic porphyria: a new uroporphyrinogen decarboxylase defect or homozygous porphyria cutanea tarda? *Lancet I*: 916-919.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962) Diseases of porphyrin metabolism. Thomas Springfield II

- Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1977) Decreased lymphocyte coproporphyrinogen III oxidase activity in hereditary coproporphyrinuria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**: 1089-1095.
- Grandchamp, B; de Verneuil, H; Beaumont, C; Chretien, S; Walter, O & Nordmann, Y. (1987) Tissue specific expression of porphobilinogen deaminase. *Eur. J. Biochem.* **162**: 105-110.
- Günther, H. (1991) Die Haematoporphyrinurie. *Deutsch Arch. Klin. Med.* **105**: 89-146
- Hermes-Lima, M; Valle, V; Vercesi, A. & Bechara, E. (1991) Damage to rat liver mitochondria promoted by delta aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochim. Biophys. Acta.* **1056**: 57-63.
- Kaya, A.H; Plewinska, M; Wong, D.M. Desnick, R.J. & Wetmur, J.G. (1994) Human δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) gene: Structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. *Genomics* **19**: 242-248.
- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. & Lee, R.G. (1976) An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen-decarboxylase activity. *J. Clin. Invest.* **58**: 1089-1097.
- Magnus, I.A; Porter, A.D. & Rimington, C. (1959) The action spectrum for skin lesions in porphyria cutanea tarda. *Lancet I*: 912-914.
- Magnus, Y; Jarrett, A; Prankerd, T.A.J. & Rimington, C. (1961) Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyrinaemia. *Lancet II*: 448
- Moan, J. (1984) The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.* **39**: 445-449.
- Moore, M.R; McColl, K.E.L; Rimington, C. & Goldberg, A. (1987) Disorders of porphyrin metabolism. Plenum Medical Book Co. NY & London.
- Nakahashi, Y; Taketani, S; Okuda, M; Inone, K. & Tokunaga, R. (1990) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferroquelatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 748-755.
- Nakahashi, Y; Furita, H; Taketani, S; Ishida, N; Kappas, A. & Sassa, S. (1992) The molecular defect of ferroquelatase in a patient with erythropoietic protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1): 281-285.
- Nakao, K; Wade, O. & Iano, Y. (1968) Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. *Clin. Chim. Acta.* **19**: 319-328.
- Nishimura, K; Taketani, S. & Inokuchi, H. (1995) Cloning of human cDNA protoporphyrinogen oxidase by complementation *in vivo* of a hemG mutant of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **270** (14): 8076-8080.

- Nordmann, Y. & Deybach, J.C. (1982) Congenital erythropoietic porphyria. *Semin. Liver Dis.* **2**: 154-163.
- Nordmann, Y; Grandchamp, B; de Verneuil, H; Phung, L; Cartigny, B. & Fontain, G. (1983) Harderoporphyria, a variant hereditary coproporphyria. *J. Clin. Invest.* **72**: 1139-1149.
- Piñol Aguadé, J.; Castells Mas, A. & Rodes, J. (1969) A case of biochemically unclassifiable porphyria. *Br. J. Dermatol.* **81**: 270-275.
- Raich, B.N; Roméo, P.H; Dubart, A; Beaupain, D; Cohel-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic. Acids. Res.* **14**: 5955-5968.
- Romana, M.; Dubart, A. Beaupain, D.; Chabret, C.; Goossens, M. & Roméo, P.H. (1987) Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucl. Ac. Res.* **15**(18):1987. 7343-7356
- Roméo, G. & Levin, E.Y. (1969) Uroporphyrinogen III cosynthase in human congenital erythropoietic porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**: 856-863.
- Roméo, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Pryor, M.; Kushner, J.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J. Biol. Chem.* **261** (21): 9825-9831.
- Schmid, R. Schwats, S. & Watson, C. (1954) Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. *Arch. Intern. Med.* **93**: 167-190.
- Spikes, J.D. (1975) Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers. *Ann. NY Acad. Sci.* **244**: 496-508.
- Strand, L.F; Felsher, B.F; Redeker, A.G. & Marver, H.S. (1970) Heme biosynthesis in intermittent acute porphyria: decreased hepatic conversion of porphobilinogen to porphyrins and increased δ -aminolevulinic acid synthetase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **67**: 1315-1320.
- Taketani, S; Inazawa, J; Nakahashi, Y. Abe, T & Tokunaga, R. (1992) Structure of the ferroquelatase gene. *Eur. J. Biochem.* **205**: 217-222.
- Taketani, S; Koho, H; Furukawa, T; Yoshinaga, T. & Tokunaga, R. (1994) Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human coproporphyrinogen oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1183**: 547-549.
- Taketani, S; Imazawa, J; Abe, T; Funikawa, T; Koho, H; Tokunaga, R; Nishimura, K. & Inokuchi, H. (1995) The human protoporphyrinogen oxidase gene (Ppox): Organization and localization to chromosome 1. *Genomics*,**29**: 698-703.

Tsai, S.F; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1988) Human uroporphyrinogen III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a full length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7049-7053.

Van Steveninck, J; Dubbelman, T.M.A.R. & Verweij, H. (1983) Photodynamic membrane damage, in *Porphyrin Photosensibilization*, Plenum, New York. pp 2227-2240.

Waldenström, J. (1937) Studien uber porphyrie. *Acta Med. Scand.* **92** (Suppl): 1-254.

Warner, C.A; Yoo, H.W. Tsai, S.F; Roberts, A.G. & Desnick, R.J. (1990) Congenital erythropoietic porphyria: Characterization of the genomic structure and identification of mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *Am. J. Hum. Genet.* **47**: A83.

Watson, C. (1960) The problem of porphyria - some facts and questions. *N. Engl. J. Med.* **263**: 1205-1215.

Wetmur, J.G; Bishop, D.F; Cantelmo, C. & Desnick, R.J. (1986) Human δ -aminolevulinate dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10444-10448.

CAPITULO III

UROPORFIRINOGENO DECARBOXILASA

III.1 PROPIEDADES Y MECANISMO DE ACCION

La URO-D humana (EC 4.1.1.37) es la quinta enzima del camino biosintético del hemo, está localizada en el citoplasma y cataliza la remoción secuencial de los cuatro grupos carboxilos de las cadenas carboximetilo del UROgen para formar el COPROgen, con la producción de intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicos (Mauzerall & Granick, 1958), (Figura III.1). La URO-D se purificó de numerosas fuentes tales como, bazo de ratón (Romeo & Levin, 1971) eritrocitos humanos (de Verneuil et al. 1983; Elder et al. 1983), eritrocitos de pollo (Kawanishi et al. 1983); hígado de vaca (Straka & Kushner, 1983), *Rhodobacter palustris* (Koopman et al. 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (Felix & Brouillet, 1990), *Rhodobacter sphaeroides* (Hoare & Heath 1959; Jones & Jordan 1993). Estos estudios sugerían que la URO-D era un monómero de alrededor de 40 kD, excepto en eritrocitos de pollo donde se propuso que la proteína era un dímero (Kawanishi et al. 1983). Recientemente la URO-D humana sobreexpresada en un sistema bacteriano se purificó a homogeneidad y cristalizó, demostrándose que es un dímero (Phillips et al. 1997).

Los estudios realizados sobre diferentes fuentes enzimáticas indican que su pH óptimo está en la zona neutra; su punto isoeléctrico entre 4,5 y 6; es termosensible, excepto en *R. palustris* donde un calentamiento a 60 °C durante 15 minutos incrementó su actividad 4 veces y fue incluido como un paso en su purificación (Koopman et al. 1986). La URO-D humana posee un Km para los

isómeros I y III del UROgen, de 0,8 y 0,35 μM respectivamente; se inhibe por reactivos sulfhidrúlicos y metales pesados, indicando la presencia de residuos cisteína en su sitio activo; también es inhibida por hexaclorobenceno y es sensible al oxígeno probablemente por oxidación de su sustrato o por una acción directa del oxidante sobre la enzima. Aunque se postuló la existencia de dos isoformas en eritrocitos humanos (Mukerji & Pimston, 1987; 1992), en general hay coincidencia en cuanto a que no existen isoformas de la enzima.

El mecanismo de acción de esta enzima aún no se conoce; no obstante, utilizando preparaciones parcialmente purificadas se realizaron numerosos trabajos para dilucidarlo. La reacción puede ocurrir sobre los dos isómeros naturales (I y III) del UROgen, aunque la velocidad de decarboxilación es mayor cuando utiliza a este último (Jackson et al., 1976; Smith et al., 1976).; Cuando la decarboxilación ocurre sobre el isómero III, seguiría una ruta preferencial, comenzando con el anillo D y continuando con los otros tres anillos en el sentido de las agujas del reloj (Jackson et al. 1976), con el isómero I la decarboxilación ocurriría indistintamente por cualquiera de las dos rutas posibles (Jackson, et al. 1977). Estudios posteriores realizados sobre eritrocitos humanos sugieren que la decarboxilación no se iniciaría en un anillo preferencial (Luo & Lim 1990), esto sería válido al menos frente a altas concentraciones de sustrato (Jones & Jordan, 1993). Si bien no se estableció el número de sitios activos involucrados en la reacción, se postuló la posibilidad de que existan cuatro centros activos diferentes (Cornford, 1964, de Verneuil et al. 1980), En numerosas fuentes estudiadas, la decarboxilación ocurriría en dos etapas, una rápida que involucraria la eliminación del carboxilo en el anillo D, seguida de una eliminación más lenta de los residuos carboxilos de los anillos A, B, y C, de manera tal que la etapa limitante de la secuencia es la decarboxilación del heptaporfirinógeno a coproporfirinógeno (Mauzerall & Granick, 1958; Battle & Grinstein, 1964; de Verneuil et al. 1980; Tomio et al. 1979; García et al. 1973; Smith & Francis, 1979; Kardish & Woods, 1980). Se observó un comportamiento diferente en *Rp palustris*, (Koopman et al. 1986), en este

organismo, si el sustrato es el isómero III, la reacción sigue el esquema observado en otras fuentes, pero cuando la decarboxilación ocurre sobre el isómero I, la etapa rápida implicaba la pérdida de los tres primeros carboxilos, y por lo tanto la etapa limitante de la reacción era el paso de pentaporfirinógeno a coproporfirinógeno.

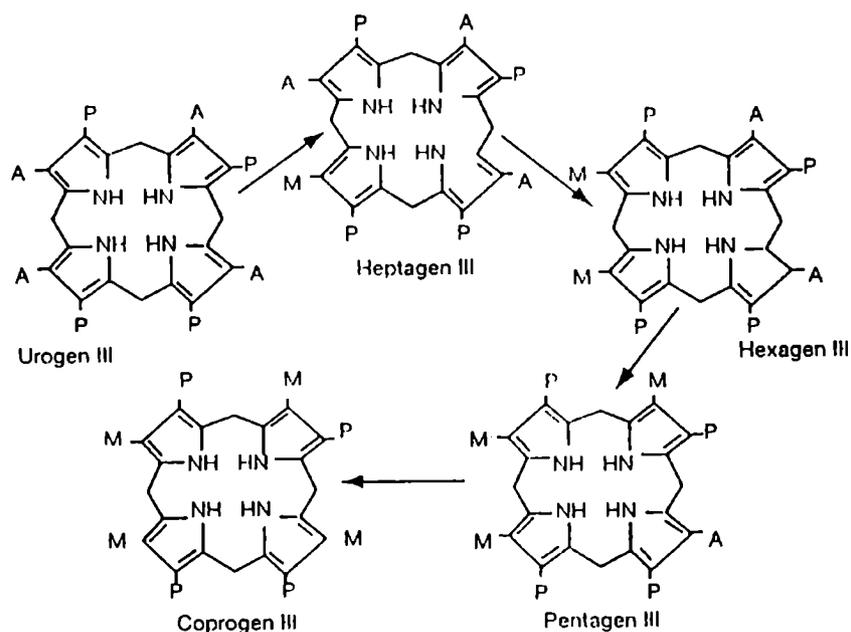


FIGURA III.1: Formación de UROgen III a COPROgen III.

P: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$; A: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; M: $-\text{CH}_3$.

III.2 LOCALIZACION CROMOSOMICA

Mediante un estudio de segregación de URO-D humana en células somáticas híbridas entre fibroblastos humanos y células de roedores, se observó que cosegrega con el cromosoma 1, asignándole la ubicación del gen (de Verneuil et al. 1984). Posteriormente, utilizando la misma estrategia pero incluyendo células híbridas con traslocaciones recíprocas entre los cromosomas humanos 1 y 2 se

estableció la localización en el brazo corto del cromosoma 1 (Mc Lellan et al. 1985). Finalmente, mediante hibridización *in situ* utilizando un cDNA de URO-D humana como sonda, se mapeó el *locus* del gen en la banda 1p34 (Dubart et al. 1986).

III.3 ESTRUCTURA DEL GEN Y mRNA

El gen de la URO-D o su cDNA fue clonado y secuenciado a partir de diversas especies: Se publicó la secuencia del cDNA de rata (Roméo et al. 1984; Romana et al. 1987), humano (Romeo et al. 1986) y de ratón (Wu et al. 1996); así como del gen humano (Romana et al. 1987; Morán Jimenez et al. 1996), *Sacharomyces cerevisiae* (Garey et al. 1992; Diflumeri et al. 1993), *Bacillus subtilis* (Hansson & Hederstedt, 1992), *Synechococcus sp. PCC7942* (Kiel et al. 1992), *Escherichia coli K-12* (Nishimura et al. 1993), y *Rhodobacter capsulatus* (Ineichen & Biel, 1994). Estos estudios permitieron conocer la secuencia primaria de la enzima. La secuencia primaria de la URO-D humana deducida de la secuencia de su cDNA indica un alto grado de homología con secuencias provenientes de otras especies (Romana et al. 1987, Wu et al. 1996).

El análisis de "southern blot" sobre el DNA genómico reveló que el gen de la URO-D humana está en una única copia (Roméo et al. 1986 a), además, mediante "northern" y secuenciación de clones provenientes de librerías humanas eritroides y no eritroides, no se observaron diferencias de tamaño ni de secuencia en el mRNA que pudieran suponer la posibilidad de splicing alternativo entre células eritroides y no eritroides (Roméo et al. 1986 a y b; de Verneuil, 1986; Romana et al. 1987). Durante la diferenciación eritropoyética, se incrementan los niveles de mRNA de la URO-D lo cual se debería a un aumento tejido específico de la actividad transcripcional del gen (Roméo et al., 1986 b).

El clonado y secuenciación del cDNA de la URO-D humana mostró que el RNAm tiene una longitud de 1.197 bases y codifica para un polipéptido de 367 aminoácidos y 40.830 Daltons (Roméo et al. 1986). Posee una región 3' no codificante de 75 bases, con una secuencia de poliadenilación (5'AATAAA3') a 19 bases "downstream" del extremo 3' y una región 5' no codificante de 18 bases.

La estructura del gen, detección de señales regulatorias en los extremos 5' y 3', así como las secuencias del promotor y de las uniones exón-intrón fueron determinadas por Romana et al. (1987) y la secuencia completa del mismo fue publicada por Morán-Jimenez et al. (1996); está compuesto por 10 exones dentro de una extensión de aproximadamente 3 kb; no obstante la secuencia publicada por Morán-Jimenez (1996) comprende alrededor de 4,5 kb ya que es más extensa en la región flanqueante 5', que la publicada por Romana (1987), la cual correspondía a las 310 pb "upstream" del sitio de inicio de transcripción. Los exones tienen entre 20 y 162 pb mientras que la longitud de los intrones varía entre 70 y 621 pb (Figura III.2 y Tabla III.1). Presenta dos sitios de inicio de transcripción: uno ubicado 18 bases upstream del codón ATG iniciador de la traducción del cual parten el 90% de las transcripciones y el otro, está 6 pb upstream de éste. Ambos sitios se utilizan en iguales proporciones en todos los tejidos estudiados (Romana et al. 1987). El cDNA descrito por Roméo et al. (1986) corresponde al mRNA iniciado en el segundo sitio de transcripción. La región promotora no es rica en GC comparada con la de otros genes "housekeeping", y presenta dos elementos consenso: una pseudo TATA box (5'TTAAATT3') que no es homóloga a la secuencia canónica para este elemento, localizada en la posición -26 del sitio principal de inicio de transcripción y una GC box (5'GGGGCGGAGC3'), en la posición -60, que a diferencia de lo que ocurre en numerosos promotores de genes housekeeping sólo hay una de estas secuencias; la misma es perfectamente homóloga a la secuencia consenso para el "binding" del factor de transcripción Sp1, además es interesante el hecho de que no posee CAAT box a menos que la secuencia ubicada a -80 (5'CCAAG3') pueda cumplir la misma función. En el

extremo 3' se encontró, 19 pb downstream de la señal de poliadenilación, una secuencia (5'TGTGTAGT3'), la cual es homóloga a la secuencia consenso 5'YGTGTTY3' (donde Y es una pirimidina) presente en numerosos genes eucariotas y estaría involucrada en procesos de terminación, clivaje y poliadenilación del mRNA (Mc Lauchland et al, 1985).

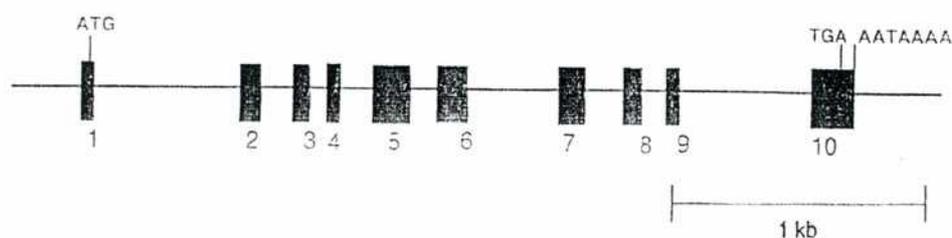


FIGURA III.2: Estructura del gen de la URO-D humana.

Tabla III.1: Tamaños publicados para los exones e intrones del gen de la URO-D

EXON	Longitud (pb)	INTRON	Longitud (pb)
1	20	1	621
2	113	2	115
3	80	3	76
4	63	4	239
5	198	5	117
6	162	6	368
7	138	7	159
8	101	8	103
9	67	9	332
10	162		

Hasta el presente se describieron cinco diferencias no patológicas con la secuencia del cDNA publicada por Roméo et al. (1986), en las posiciones 87, 325, 376-377-378, 931 y 1027: 87 (GCT→GCC), 325 (AGC→GGC), 376-377-378 (GCG→CGC), 931 (ITG→CTG) y 1027 (ITG→CTG) (de Verneuil et al. 1986 ; Garey et al. 1993; Mc Manus et al. 1994).

III.4 REFERENCIAS

Battle, A. M. del C. & Grinstein, M. (1964) Porphyrin biosynthesis II. Porphyrinogen III, a normal intermediate in the biosynthesis of protoporphyrin IX. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**: 13-20.

Cornford, P. (1964) Transformation of porphobilinogen into porphyrins by preparations from human erythrocytes. *Biochem. J.* **91**, 64-73.

De Verneuil, H; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1980) Some kinetic properties of human red cell Uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* **611**: 176-177.

De Verneuil, H.; Sassa, S. & Kappas, A. (1984) Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **258**(4): 2454-2460.

De Verneuil, H; Grandchamp, B; Foubert, C; Weil, D; N'Guyen, V.C; Gross, M.S.; Sassa, S. & Nordmann, Y. (1984) Assignment of the gene for uroporphyrinogen decarboxylase to human chromosome 1 by somatic cell hybridization and specific enzyme immunoassay. *Hum Genet.* **66**: 202-205

De Verneuil, H.; Grandchamp, B.; Beaumont, C.; Picat, C.; & Nordmann, Y. (1986) Uroporphyrinogen decarboxylase structural mutant (Gly281→Glu) in a case of porphyria. *Science* **234**(4777): 732-734.

Diflumeri, C; Larocque, R. & Keng, T. (1993) Molecular analysis of *Hem6 (Hem 12)* in *Sacharomyces cerevisiae*, the gene for uroporphyrinogen decarboxylase. *Yeast* **9**: 613-623.

Dubart, A.; Mattei, M.G.; Raich, N.; Beaupain, D.; Roméo, P. H.; Mattei, J.F. & Goossens, M. (1986) Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1. *Hum. Genet.* **73**(3): 277-279.

Elder, G.H; Tovey, J.A. & Sheppard, D.M. (1983) Purification of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **215**: 45-55.

Felix, F. & Brouillet, N. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**: 393-403.

García, R.C; San Martín de Viale, L.C; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1973) Porphyrin biosynthesis X. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes-Further properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **309**: 203-210.

Garey, J.R. Labbe-Bois, R; Chelstowska, A; Rytka, J; Harrison, L; Kushner, J. & Labbe, P. (1992) Uroporphyrinogen decarboxylase in *Sacharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **205**: 1011-1016.

Garey, J.R.; Franklin, K.F.; Brown, D.A.; Harrison, L.M.; Metcalf, K.M. & Kushner, J.P. (1993) Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* **105**: 165-169.

Hansson, M. & Hederstedt, L. (1992) Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes. *J. Bacteriol.* **174**: 8081-8093.

Hoare D. & Heath, H. (1959) The biosynthesis of porphyrins from Porphobilinogen by *Rhodopseudomonas spheroides* 2- The partial purification and some properties of Porphobilinogen deaminase and Uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* **73**: 679-690.

Ineichen, G. & Biel, A.J. (1994) Nucleotide sequence of the *Rhodobacter capsulatus* *hemE* gene. *Plant Physiol.* **108**: 423.

Jackson, A.H.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. & Smith, S.G. (1976) Hepta and hexa-carboxylic porphyrinogen intermediates in haem biosynthesis. *Ann. Clin. Res.* **8**, Suppl. 17: 64-69.

Jackson, A.H; Nagaraja Rao, R.K. & Supphayen, D.M. (1977) Intermediates between uroporphyrinogen I and coproporphyrinogen I. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 696-698.

Jones, R.M. & Jordan, P.M. (1993) Purification and properties of the uroporphyrinogen decarboxylase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. J.* **293**: 703-712.

Kardish, R.D. & Woods, J.S. (1980) Measurement of heme biosynthetic enzymes in mammalian tissues. *J. Appl. Biochem.* **3**: 159-167.

Kawanishi, S.; Seki, Y. & Sano, S. (1983) Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J. Biol. Chem.* **258**: 4285-4292.

Kiel, J.A; Ten-Berge, A.M. & Venema, G. (1992) Nucleotide sequence of the *Synechococcus* sp. *PCC7942* *hemE* gene encoding the homologue of mammalian uroporphyrinogen decarboxylase. *DNA seq.* **2**: 415-418.

Koopman, G.E; Juknat, de Geralnik, A.A. & Battle, A. M. del C. (1986) Porphyrin biosynthesis in *Rp. palustris* - V. Purification of uroporphyrinogen decarboxylase and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* **18**: 935-944.

Koopman, G.E. & Battle, A. M. del C. (1987) Biosynthesis of porphyrins in *Rp. palustris* - VI. The effect of metals, thiols and other reagents on the activity of uroporphyrinogen decarboxylase. *Int. J. Biochem.* **4**: 373-377.

Luo, J. & Lim, K. (1990) Decarboxylation of uroporphyrinogen III by erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* **268**: 513-515.

Mauzeral, D. & Granick, S. (1958) Porphyrin biosynthesis in erythrocytes III Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **232**: 1141-1162

Mc Manus, J.; Begley, G. & Ratnaik, S. (1994) Complex pattern of alternative splicing in the normal uroporphyrinogen decarboxylase gene: Implications for diagnosis of familial porphyria cutanea tarda. *Clin. Chem.* **40**(10): 1884-1889.

Mc Lauchlan, J; Gaffney, D; Whitton, J.L. & Clements, J.B. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**: 1347-1365.

McLellan, T; Pryor, M.A; Kushner, J.P; Eddy, R.L. & Shows, T.B. (1985) Assignment of uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the pter→p21 region of human chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* **39**: 224-227.

Moran-Jimenez, M.J.; Ged, C.; Romana, M.; Enriquez de Salamanca, R.; Taieb, A.; Topi, G.; D'Alessandro, L. & de Verneuil, H. (1996) Uroporphyrinogen decarboxylase: Complete human gene sequence and molecular study of three unrelated families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 712-721

Mukerji, S.K. & Pimstone, N.R. (1987) Evidence for two Uroporphyrinogen decarboxylase isoenzymes in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 1196-1203.

Mukerji, S.K. & Pimstone, N.R. (1992) Uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes: Purification, complete separation and partial characterization of two isoenzymes. *Int. J. Biochem.* **24**(1): 105-119.

Nishimura, K; Nakayashiki, T. & Hachiro, Y. (1993) Cloning and sequencing of the *hemE* gene encoding uroporphyrinogen III decarboxylase (UPD) from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **133**: 109-113.

Phillips, J.D; Whitby, F.G; Kushner, J.P. & Hill, C.P. (1997) Characterization and crystalization of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Protein Science* **6**: 1343-1346.

Romana, M.; Dubart, A. Beaupain, D.; Chabret, C.; Goossens, M. & Roméo, P.H. (1987) Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucl. Ac. Res.* **15**(18):. 7343-7356

Romana, M; Le Boulch, P. & Roméo, P.H. (1987) Rat uroporphyrinogen decarboxylase cDNA: Nucleotide sequence and comparison to human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucl. Acid. Res.* **15**: 7211

Roméo, P.H; Dubart, A; Grandchamp, B.(1984) Isolation and identification of a cDNA clone coding for rat uroporphyrinogen decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3346-3350.

Roméo, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Pryor, M.; Kushner, J.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J. Biol. Chem.* **261**(21): 9825-9831.

Roméo, P.H; Raich, N; Dubart, A. (1986) Molecular cloning and tissue-specific expression analysis of human PBG deaminase and uroporphyrinogen decarboxylase, in *Porphyrias and Porphyrias Nordmann, Y (ed). Paris, John Libbey, p 25.*

Smith, S.F.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. & Jackson, A.H. (1976) Pentacarboxylic intermediates in haem biosynthesis. *Ann. Clin. Res.* **8**, Suppl. 17: 89-91.

Smith, A.G. & Francis, J.E. (1979) Decarboxylation of porphyrinogens by rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem. J.* 455-458.

Straka, J.G. & Kushner, J.P. (1983) Purification and characterization of bovine hepatic Uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochemistry*, **22**: 4664-4672.

Tomio, J.M; García, R.C; San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1970) Porphyrin biosynthesis VII. Porphyrinogen carboxy-lyase from avian erythrocytes,. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **198**: 353-363.

Wu, C; Xu, W; Kozak, C.A. & Desnick, R.J. (1996) Mouse uroporphyrinogen decarboxylase: cDNA cloning, expression, and mapping. *Mammalian Genome*, **7**: 349-352.

CAPITULO IV

PORFIRIA CUTANEA HEPATICA

IV.1 DEFECTO ENZIMATICO

Tanto en la PCT como en la PHE, la actividad de la URO-D está disminuída (Kushner et al. 1976; Elder et al. 1981), en la primera alrededor de un 50% mientras que en la segunda, los valores son menores al 10% del valor normal. La PCT se transmite en forma autosómica dominante, mientras que la PHE es recesiva, y se ha propuesto que sería una forma homocigota de PCT (Elder et al. 1981; Lazaro et al. 1984).

La PCT puede ser hereditaria o familiar (PCT-F) en este caso la URO-D está disminuída en todos los tejidos, y adquirida (PCT-A) en la cual la deficiencia está limitada al hígado (Kushner et al. 1976; Blekenhorst et al. 1976; Elder et al. 1978; De Verneuil et al. 1978; Doss et al. 1980); ambos tipos de PCT se pueden diferenciar mediante la determinación de la actividad de URO-D eritrocitaria (Elder et al. 1980), que es normal en individuos con PCT-A, y en quienes la falla a nivel hepático muestra una actividad enzimática reducida, pero con cantidades de proteína inmunorreactiva normales (Elder et al. 1978, 1983, 1985), sugiriendo la presencia de un inhibidor en el hígado.

IV.2 PORFIRIA CUTANEA TARDIA

La PCT es la porfiria más común (Dean 1963), y la mayoría de los casos corresponden a la forma no hereditaria. En estudios dirigidos a conocer la

prevalencia de PCT-F y PCT-A, Held et al. (1989) midieron la URO-D eritrocitaria en 40 pacientes PCT encontrando la enzima disminuída en el 28% de los mismos; del estudio de otros 80 pacientes PCT no relacionados, el 22,5% resultó ser PCT-F (Koszo et al. 1992). Los pacientes con PCT-A se caracterizan por no presentar antecedentes familiares de PCT y haber estado expuestos a factores desencadenantes (Waldenstrom 1967; Piñol Aguadé, 1975; Topi, 1977; Elder, 1978, 1985); no obstante se conocen familias con URO-D eritrocitaria normal pero con casos de PCT en miembros de distintas generaciones, lo cual no se pudo atribuir a una exposición a agentes desencadenantes, sino a pensar en una predisposición genética en la PCT-A (Roberts et al. 1988; D'Alessandro et al. 1989).

Existen numerosos factores desencadenantes de PCT, tales como el alcohol, estrógenos, ciertos hidrocarburos aromáticos policlorados hepatotóxicos como el hexaclorobenceno (HCB), 2,3,7,8-tetracloro dibenzo-p-dioxina (TCDD) (Schmid 1960; Becker, 1965; Goldstein et al. 1973; Pimstone, 1975; Elder & Magnus 1975; Taylor & Roenigk, 1976; Elder et al. 1978; Strik et al. 1980; Kawanishi et al. 1983). La sobrecarga de hierro también es un factor importante; es común la siderosis hepática en la PCT aunque no siempre está presente, y se postuló que el hierro es un inhibidor de la URO-D (Joubert et al. 1973; Turnbull et al. 1973; Kushner et al. 1975; Felsher & Kushner, 1977; Koopmann et al. 1987). El hígado es el sitio de sobreproducción de porfirinas (Schmid et al. 1954), y la acumulación de uroporfirinas en el hígado de pacientes PCT podría contribuir a la disminución de la URO-D ya que las porfirinas en altas concentraciones inhiben esta enzima (Smith et al. 1981; Jones & Jordan, 1993). La disminución en la actividad de URO-D hepática, en pacientes PCT oscila entre un 25 y 50% del valor normal (Kushner et al. 1976; Elder et al. 1978; Felsher et al. 1982)

La PCT tiene penetrancia variable y aparentemente baja; esto explicaría la necesidad de factores desencadenantes para que se manifieste la

enfermedad (Kushner et al. 1976). Además la determinación de URO-D eritrocitaria en individuos PCT y normales mostró discrepancias entre hombres y mujeres, así Felsher et al. (1978) encontró valores semejantes en ambos sexos mientras que Kushner et al. (1976) encontró en mujeres valores en promedio correspondientes al 70% del observado en hombres; ésto se atribuyó al efecto de terapias con estrógenos.

IV.2.1 SIGNOS BIOQUIMICOS

La disminución de la URO-D hepática produce una alta concentración de porfirinas en el hígado, que se excretan por bilis y pasan a las heces. Además, las porfirinas altamente carboxiladas se desvían a la circulación sistémica para excretarse por orina, observándose un patrón de excreción característico de la PCT con elevadas cantidades de uro y heptaporfirina y en menor proporción porfirinas de 6 a 4 carboxilos; este patrón se observa aún a bajas concentraciones de porfirinas, como ocurre en familiares asintomáticos de PCT-F (Doss et al. 1971; Magnin et al. 1980); la orina de pacientes sintomáticos suele presentar un color rojo oscuro y fluorescencia a la luz de Wood por la presencia de alta concentración de porfirinas. Se observa una elevada concentración de uroporfirinas e isocoproporfirina en heces (Elder 1975) y altos niveles de porfirinas en plasma (Moore et al. 1973).

IV.2.2 SINTOMATOLOGIA

En general los pacientes no presentan manifestaciones clínicas de PCT cuando no han estado expuestos a la acción de hepatotoxinas desencadenantes de la enfermedad. La PCT es más común en hombres, es de aparición tardía, generalmente después de los 30 años y más frecuentemente entre 40 y 60 años, aunque se han descrito varios casos de PCT infantil (Welland & Carlsen 1969; Strock et al. 1972; Kansky A. 1974; Battle et al. 1989)

La PCT se caracteriza clínicamente por presentar manifestaciones dermatológicas y hepáticas sin sintomatología aguda y se la conoce también como porfiria cutánea hepática (Enríquez de Salamanca et al. 1982).

En los pacientes con PCT se observa fragilidad cutánea y ampollas dermolíticas en zonas expuestas a causa de la fotosensibilización cutánea. Las ampollas se abren, erosionan, ulceran y dan lugar a costras, cicatrices y pueden formarse quistes epidérmicos principalmente en el dorso de las manos. La piel se oscurece y tiende a la esclerosis; existen formas de PCT esclerodérmicas que pueden ser confundidas con esclerodermias (Magnin et al. 1982). El pelo adquiere color negro intenso ya que las porfirinas están involucradas en el metabolismo de la melanina y utilizan al folículo piloso como vía de excreción, hay hipertrichosis malar, de pabellón auricular y cejas. lesiones oculares tales como cicatrices palpebrales, pigmentación melánica de párpados, esclerosis de párpados, conjuntivitis, queratitis ampollar o erosiva. En algunos casos puede haber también hiperglucemia.

Frecuentemente la PCT está asociada con distintos grados de daño hepático. El síndrome hepático se inicia con manifestaciones inespecíficas: dispepsia, anorexia, astenia, hepatomegalia. La siderosis hepática es casi un rasgo constante en la PCT (Lamont et al. 1961; Elder et al. 1972; Pimstone, 1975, 1982; Meyer y Schmid, 1978). En el hígado porfírico se observan diversos tipos de lesiones histopatológicas: ampliación portal por infiltrado de células mononucleares y por fibrosis, necrosis focal perilobulillar, distorsión de la arquitectura lobulillar, esteatosis y depósitos de hierro, semejante a lo observado en hemocromatosis (Saver & Funk, 1969; Mascaró et al., 1973; Toppi & D'Alessandro Gandolfo, 1978).

La severidad de la hepatopatía subyacente parece estar en relación con la edad del paciente o con el tiempo de evolución de la enfermedad (Cortés et al.

1980). Ippen (1982) sostiene que la PCT no tratada progresa en el curso de 5-20 años desde una esteatosis focal con o sin siderosis a la que se agrega luego fibrosis y mayor siderosis que evoluciona hacia una cirrosis hepática. Zeilicoff et al. (1987) estudiaron 22 pacientes con PCT en los cuales predominó la hepatitis crónica, y el daño hepático estaba directamente relacionado con la deficiencia de URO-D hepática.

El alcohol, y otros agentes hepatotóxicos son factores desencadenantes tanto de la manifestación sintomatológica de la PCT como de la disfunción hepática. Además existe una importante asociación entre PCT y virus hepatotrópicos (Fargion et al. 1992; Mar de Castro et al. 1993).

IV.2.3 TRATAMIENTOS

De los tratamientos utilizados en pacientes con PCT, es muy común el empleo de cloroquina (Colomb, 1957), que en el hígado forma complejos solubles con uro y coproporfirinas, facilitando su eliminación renal (Scholnik et al. 1973; Chinarro et al. 1983). Si bien a altas dosis es hepatotóxico (Cripps & Curtis, 1962; Flesher & Redker, 1966), su uso prolongado, a muy bajas dosis, es tolerado y permite una completa remisión clínica y bioquímica de la porfiria entre 7 y 18 meses de tratamiento (Taljaard et al. 1972; Kordak et al. 1981; Ashion et al. 1984).

El uso de flebotomías (Ippen, 1961) también es utilizado en la terapia de PCT. Las sangrías repetidas permiten reducir el exceso de hierro de los depósitos corporales normalizando la sidermia y llegando a la remisión clínica y bioquímica de la PCT entre 9 y 18 meses de tratamiento (Lundvall, 1971; Ramsay et al. 1974; Ippen, 1977; Enríquez de Salamanca et al. 1980). Es más eficaz la combinación de flebotomías con cloroquina que permite eliminar simultáneamente el exceso de hierro y porfirinas hepáticas, acelerando el proceso de recuperación, pudiendo

llegar a una completa remisión entre 30 y 150 días de tratamiento.(Swanbeck & Wennersten, 1977; Batlle et al. 1988; Guzman et al. 1972).

El uso de S-Adenosil-metionina (SAM) es particularmente útil en pacientes en los cuales existe daño hepático severo, anemia hemolítica, disfunciones cardiovasculares, donde las flebotomías están contraindicadas, ya que el SAM también elimina el hierro hepático. El SAM es un precursor del GSH (Guilidori et al. 1984), en porfiria inducida en ratas por hexaclorobenceno (Rimington & Ziegler, 1963), se observó que inyecciones intraperitoneales de GSH facilitan la movilización de hierro libre aumentando su captación y transporte a la bilis ya que forma un conjugado con éste; además el GSH contribuiría a evitar la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas así como de los grupos sulfhidrilos del sitio activo de la URO-D. Por otro lado, el GSH juega un papel fundamental en la detoxificación (Gillette et al. 1984), El SAM aumenta los niveles de GSH hepático, su administración combinada con cloroquina es el tratamiento más conveniente, y se alcanza una completa remisión clínica y bioquímica de la PCT entre los 2 y 6 meses de tratamiento (Batlle et al. 1987, 1988).

IV.2.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA PCT

Fargion et al. (1992) sugirieron que la infección con el virus de la hepatitis C (HCV) está involucrada en la hepatopatía porfírica y que podría actuar como desencadenante de la expresión fenotípica de la PCT. Estudios realizados en países mediterráneos como Italia, España y Francia mostraron una elevada prevalencia del HCV en pacientes PCT (Fargion et al. 1992; Mar de Castro et al. 1993; Herrero et al. 1993; Cribier et al. 1995), sugiriendo también que el virus sería uno de los principales factores patogénicos. Estos hallazgos están sin embargo en contraste con los datos obtenidos en Alemania e Irlanda (8 y 10%) (Murphy et al. 1993; Stolzel et al. 1995) y los encontrados en Holanda y Australia del 18 y 20% respectivamente (Siersema et al. 1992; Gibson et al. 1995). Hasta la fecha hay

sólo 3 estudios con un número reducido de pacientes (5 a 8) en América (Wolff et al. 1994; Koester et al. 1994; Lim et al. 1995) y sólo uno acerca de dos pacientes japoneses (Tsukazaki et al. 1994). También se presentaron casos de PCT asociada a la presencia del virus de hepatitis B y de inmunodeficiencia humana (Navas et al. 1995; Wissel et al. 1987).

IV.3 PORFIRIA HEPATOERITROPOYETICA

La PHE se manifiesta desde el nacimiento o durante la infancia, generalmente a lo largo del primer año de vida, es clínicamente semejante a la PCT pero más severa y con una actividad de URO-D entre 5 y 10% del valor normal. (Piñol Aguadé et al. 1975; Elder et al. 1981; Lim y Poh-Fitzpatrick, 1984; Lazaro et al. 1984; de Verneuil et al. 1984). La gravedad de esta porfiria hace que pueda ser confundida con una PCE (Piñol Aguadé et al. 1969; Hofstad et al. 1973; Bernan, 1974; Cruces-Prado et al. 1980), aunque existen casos leves, los cuales pueden ser confundidos con PCT. Es una enfermedad recesiva, y se la consideró una forma homocigota de la PCT (Elder et al. 1981; Lazaro et al. 1984; Toback et al. 1987). Hasta el presente hay alrededor de 30 casos descriptos.

Esta porfiria se caracteriza por una excesiva producción de porfirinas tanto en hígado como en médula ósea (Piñol Aguadé et al. 1975) Desde el punto de vista bioquímico el patrón de excreción de porfirinas urinarias es similar al observado en la PCT, con excesivas cantidades de uro y heptaporfirinas; en heces se encuentran niveles elevados de uroporfirina e Isocoproporfirina (Eriksen & Eriksen, 1974; Day & Strauss, 1982); además hay una elevada concentración de protoporfirina en glóbulos rojos (Czarnecki, 1980). Clínicamente se presenta con severa fotosensibilidad, fragilidad cutánea, hipertricosis, hepatoesplenomegalia, y puede haber casos de cirrosis hepática.

IV.4 GENETICA MOLECULAR DE LA PCT Y PHE

Las proteínas mutantes de URO-D presentes en pacientes con PCT-F y PHE se pueden dividir en tres grupos basándose en su actividad y en la reactividad de las mismas frente a anticuerpos anti URO-D (Elder et al. 1983; de Verneuil et al. 1984), de esta manera se definen como "Cross-reactive immunologic material" (CRIM), y se pueden tener proteínas mutantes CRIM negativas cuando la actividad al igual que la inmunoreactividad están disminuídas, CRIM positivas cuando la actividad está reducida pero su inmunorreactividad es normal, y CRIM supernegativas cuando hay ausencia de proteína detectable con una actividad enzimática significativamente reducida; en PCT-F se han identificado casos de CRIM negativo mientras que en PHE se han descrito formas CRIM negativo y positivo (de Verneuil et al. 1984; Sassa et al. 1983; Kozo et al. 1990). Los CRIM positivos podrían resultar más probablemente de mutaciones puntuales de cambio de aminoácido (missense), mientras que entre las mutaciones que con mayor probabilidad den un CRIM negativo están las inserciones, deleciones, mutaciones que lleven a una transcripción anormal del gen, a un splicing aberrante del mRNA o a una proteína menos estable, y mutaciones que den un codón de stop de síntesis de proteínas (nonsense).

Las mutaciones encontradas tanto en PCT-F como en PHE están resumidas en la tabla IV.1. En 1986 se encontró la primera mutación en el locus de la URO-D asociada a un caso de porfiria (de Verneuil et al., 1986), tratándose de una mutación puntual (GGG→GAG) GLY281→GLU que producía una proteína menos estable frente a un lisado de linfocitos. En un estudio realizado acerca de la prevalencia de dicha mutación, en PHE y PCT-F (de Verneuil et al. 1988), se encontró que la misma estaba presente en 3 de 5 familias con PHE y en ninguna de las 13 familias con PCT-F estudiadas. En 1989, Garey et al. encontraron en un paciente con PCT-F, una mutación puntual en la misma posición pero el

aminoácido resultante era distinto (GGG→GTG) GLY281→VAL. Ambas mutaciones conducen a una proteína de menor estabilidad a la degradación que la normal pero la mutación asociada a PCT-F da como resultado una proteína con una vida media *in vivo* menor que la asociada a PHE.

En 1990 Garey et al. encontraron otra mutación asociada a PCT-F pero en este caso se trató de una mutación de splicing ya que es un cambio G→C en la primer base del intrón 6, la cual es crítica para la eliminación de dicho intrón y por lo tanto el exón 6 se elimina junto con el intrón en la maduración del mRNA; esta pérdida de 162 bases conduce a un mRNA cuya estabilidad no es menor a la normal pero la proteína resultante es menos estable frente a un lisado de linfoblastos y resultó totalmente inactiva, como se observó al expresar la mutante en un sistema procariótico.

En 1991, Romana et al. encontraron otra mutación puntual en un paciente con PHE (GAG→AAG) GLU167→LYS que producía una proteína menos estable y menos activa. Para determinar si había alguna relación entre las mutaciones responsables de la PCT y la PHE estos mismos autores estudiaron 6 pacientes con PCT-F no relacionados y no encontraron dicha mutación en ninguno de ellos lo cual indicaría una heterogeneidad en las mutaciones responsables de los fenotipos de PCT y PHE. En 1992, de Verneuil et al. encontraron otra mutación puntual (CGG→GGG) ARG292→GLY y una deleción causantes de PHE en dos hermanas de padres no consanguíneos de origen caucásico, ninguno de los cuales presentaba cuadro clínico de porfiria, aunque la URO-D sanguínea estaba reducida al 50% en ambos padres, siendo menor al 10% en las hijas. La madre era portadora de la mutación puntual y el padre era portador de una gran deleción a nivel del DNA (al menos 3 Kb correspondientes al gen de la URO-D) aunque la misma no fue caracterizada. Los autores no encontraron la mutación ARG292→GLY en 13 pacientes con PCT-F; esta mutación no lleva a una proteína menos estable frente a un lisado de linfoblastos, pero se trata de una posición

conservada en la URO-D de varias especies y podría ser esencial para actividad catalítica de la enzima.

De Verneuil et al. (1992) estudiaron la prevalencia de las mutaciones encontradas en el locus de la URO-D observando que las que están presentes en una de las porfirias no se hallan en la otra y que las mutaciones más frecuentes son para PHE GLY281→GLU, y para PCT-F la pérdida del exón 6. Con el propósito de determinar la existencia de una base genética en la PCT adquirida, Garey et al. (1993) realizaron un estudio sobre 10 pacientes con PCT-A sin encontrar mutaciones ni en el cDNA ni en el promotor de la URO-D.

En 1994, Meguro et al. estudiaron un caso de PHE el cual presentaba una forma moderada de la enfermedad causada por la presencia de mutaciones distintas en ambos alelos, una era VAL134→GLN debida a tres sustituciones puntuales secuenciales (T417G418T419→CCA) y la otra era la mutación puntual (CAT→CCT) HIS220→PRO. Ambos progenitores y tres hijos del paciente tenían una URO-D eritrocitaria reducida al 50% lo cual es esperado cuando la falla está en heterocigosis; en el paciente, doble heterocigota, la actividad en linfocitos fue 4% y en hígado 2% mientras que en eritrocitos fue del 16%. La expresión de ambas mutantes en células CHO reveló que la proteína con la mutación VAL134→GLN tenía el 80% de la actividad normal, mientras que en la proteína con HIS220→PRO era del 40% lo cual es consistente con el rol propuesto por Kawanishi et al. (1983) para la HIS220 en la actividad de la enzima y con el hecho de que la VAL134 está altamente conservada en la filogenia. Ambas proteínas tenían estabilidad normal.

Morán Jiménez et al.(1996), encontraron 2 mutaciones puntuales en estado homocigota responsables de PHE, (CCT→CTT) PRO62→LEU en una familia portuguesa y (TAT→TGT) TYR311→CYS en una familia italiana, ambas proteínas mutantes presentaron reducida actividad en un sistema de

expresión en *E. coli*, además la segunda mutación produce una proteína más termosensible.

Mc Manus et al. (1996; 1997) encontraron 7 mutaciones en pacientes australianos, una en PHE y 6 en PCT-F dos de las cuales estaban en el mismo alelo. Se encontraron en pacientes con PCT-F una mutación nonsense, (CGA→TGA) ARG143→STOP; en un mismo alelo se detectó la delección de una citosina en la posición 890 del cDNA con el consecuente corrimiento del marco de lectura y aparición de un codón stop, junto con la mutación missense (CTG→CAG) LEU253→GLU, la cual al expresarla en *E. coli* mostró una actividad del 3-6% del valor normal; una delección de 31 pares de bases (828-858 del cDNA) en el exón 8 que provoca un corrimiento del marco de lectura con aparición de un codón stop, originando una proteína truncada sin actividad como fue comprobado por su expresión en un sistema bacteriano; y otras dos mutaciones missense: (ATT→ACT) ILE334→TRE y (GGG→AGG) GLY318→ARG con actividades del 15% y normal respectivamente, al expresarlas en *E. coli*. Además, esta última proteína no fue más sensible a la degradación que la normal frente a un lisado de linfocitos. La mutación encontrada en homocigosis, un paciente con PHE, fue el cambio (GCT→GGT) ALA80→GLY, cuyo producto presentó una actividad reducida a un 15-39% del valor normal al expresarla en *E. coli*.

Hasta el presente solamente dos mutaciones descritas en PHE se detectaron en pacientes con PCT-F, Mc Manus et al. (1995) encontraron en un paciente la mutación VAL134→GLN, y Roberts et al. (1995), la mutación Gly(281)→Glu.

TABLA IV.1: Mutaciones en la URO-D humana

MUTACION	UBICACION	PORFIRIA	REFERENCIA
P62L	EXON 3	PHE	Morán Jimenez et al 1996
A80G	EXON 4	PHE	McManus et al 1996
R143X	EXON 5	PCT-F	McManus et al 1997
V134Q	EXON 5	PHE y PCT-F	Meguro et al 1994 y Roberts et al 1995
E167K	EXON 6	PHE	Romana et al 1991
IVS6+1	INTRON 6	PCT-F	Garey et al 1990
H220P	EXON 7	PHE	Meguro et al 1994
L253Q	EXON 7	PCT-F	McManus et al 1997
G281E	EXON 8	PHE y PCT-F	de Verneuil et al 1986 y McManus et al 1995
828del31	EXON 8	PCT-F	McManus et al 1996
G281V	EXON 8	PCT-F	Garey et al 1989
890delC	EXON 8	PCT-F	McManus et al 1996
Y311C	EXON 9	PHE	Morán Jimenez et al 1996
R292G	EXON 9	PHE	de Verneuil et al 1992
G318R	EXON 10	PCT-F	McManus et al 1996
I334T	EXON 10	PCT-F	McManus et al 1996
Delección de 3 kb	GEN COMPLETO	PHE	de Verneuil et al 1992

IV.5 REFERENCIAS

Ashion, R.E; Hawk, J.L.M. & Magnus, L. (1984) Low-dosaje oral chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda. Br. J. Dermatol. 111: 609-613.

Battle, A. M. del C; Stella, A.M; Melito, V; Guzman, H; C; Pietropaolo, N. & Cabrera, H. (1984) Estudio comparativo de los tratamientos de la porfiria cutánea tarda con S-Adenosil-L-metionina (SAM) y cloroquina. Flebotomías y cloroquina combinadas y la sola administración de SAM, cloroquina o flebotomías. *Rev. Arg. Dermatol.* **69**: 245-253.

Battle, A. M. del C; Stella, A.M; Melito, V; Guzman, H; C; Pietropaolo, N. & Cabrera, H. (1987) S-Adenosyl-L-methionine and porphyria cutanea tarda. *Boll. Ist. Derm. S. Gallicano.* **13**: 216-267.

Battle, A. M. del C; Stella, A.M; Melito, V. y Parera, V. (1989) Diez casos de porfiria cutánea tardía infantil en la Argentina. Datos bioquímicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **XXIII** (2): 315-320.

Becker, F.T. (1965) Porphyria cutanea tarda induced by estrogens. *Ar. Dermatol.* **92**: 252-260.

Blekkendorst, G.; Pimstone, N. & Eales, L. (1976) Porphyria Cutanea tarda in South Africa. Metabolic basis of disordered in biosynthesis. *Porphyria in Human Diseases.* (Ed. M. Doss), Karger Basel, pp. 299-311.

Brenan, J.A. (1974) Atypical erythropoietic protoporphyria. *Australas. J. Dermatol.* **15**: 36
Chinarro, S; Enríquez de Salamanca, R; Perpiñá, J. & Muñoz, J.J. (1983) Studies on *in vitro* formation of complexes between porphyrins and chloroquine. *Biochem. Interact.* **6**: 565-568.

Colomb, M. (1957) Trois cas des porphyrie cutanée tardie de l'adulte et deux cas de lucite ayant bien réagi á un traitement par la névaquine. *Bull. Soc. Franc. Dermatol. Syph.* **64**: 420-424.

Cortes, J.; Oliva, H.; Paradinas, F. & Fernández-Guio, C. (1980) The pathology of the liver in porphyria cutanea tarda. *Histopathology* **4**: 471-485.

Cribier, B.; Petiau, P.; Keller, F.; Schmitt, C.; Vetter, D.; Heid, E. & Grosshans, E. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C viral infection. A clinical and virologic study. *Arch. Dermatol.* **131**: 801-804.

Cripps, D.J. & Curtis, A.C. (1962) Toxic effect of chloroquine in hepatic porphyria. *Arch. Dermatol.* **86**: 575-578.

Cruces-Pardo, M.J; Enríquez de Salamanca, R; Hernando, M.V; Payero, M.L.P; Beltrán, T.C. & Aguilar, A.R. (1980) Two cases of infantile and familial porphyria cutanea tarda. *Dermatologica* **161**: 105-210.

Czamecki, D.B. (1980) Hepato-erythropoietic porphyria. *Arch. Dermatol.* **116**: 307-311.

D'Alessandro, G.L.; Griso, D.; Macri, A.; Biolcati, G. & Topi, G.C. (1989) Familial porphyria cutanea tarda with normal erythrocytic urodecarboxylase an exception to the rule?. *Dermatologica* **178**(4): 206-208.

Day, R. & Strauss, P. (1982) Several cutaneous porphyria in a 12 year old boy. Hepatoerythropoietic or symptomatic porphyria? *Arch. Dermatol.* **118**: 663-667.

De Verneuil, H.; Nordmann, Y.; Phung, N.; Grandchamp, B.; Aitken, G.; Grelier, N. & Noire, J. (1978) Familial and sporadic porphyria cutanea tarda. Two different diseases. *Int. J. Biochem.* **9**: 927-931.

De Verneuil, H.; Beaumont, C.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y.; Sfar, I. & Kastally, R. (1984) Enzymatic and immunological studies of uroporphyrinogen decarboxylase in familial porphyria cutanea tarda and hepato-erythropoietic porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **36**: 613-622.

De Verneuil, H.; Grandchamp, B.; Beaumont, C.; Picat, C.; & Nordmann, Y. (1986) Uroporphyrinogen decarboxylase structural mutant (Gly281→Glu) in a case of porphyria. *Science* **234** (4777): 732-734.

De Verneuil, H.; Hansen, J.; Picat, C.; Grandchamp, B.; Kushner, J.; Roberts, A.; Elder, G. & Nordmann, Y. (1988) Prevalence of the 281(gly→glu) mutation in hepatoerythropoietic porphyria and porphyria cutanea tarda. *Hum. Genet.* **78**: 101-102.

De Verneuil, H.; Bourgeois, F.; de Rooij, F.; Siersema, P.D.; Wilson, J.H.P.; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1992) Characterization of a new mutation (R292G) and a deletion at the human uroporphyrinogen decarboxylase locus in two patients with hepatoerythropoietic porphyria. *Hum. Genet.* **89**: 548-552.

Dean, G. (1963) The prevalence of the porphyrias. *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* **9**: 145-151.

Doss, M; Meinhof, W; Look, D; Henning, H; Nawrocki, P; Dölle, W. Strohmeyer, G. & Filippini, L. (1971) Porphyrins in liver and urine in acute intermittent and chronic hepatic porphyrias. *S. Afr. Med. J.* **45**: 50-54.

Doss, M.; Tiepermann, R; Look, D. Henning, H.; Nikolowski, J.; Ryckmanns, F. & Braun-Falco, O. (1980) Hereditäre und nicht-hereditäre form der chronischen hepatischen porphyrie: Unterschiedliches verhalten der uroporphyrinogen decarboxylase in leber und erythrozyten. *Klin. Wochenschr.* **58**: 1347-1356.

Elder, G.; Gray, C. & Nicholson, D. (1972) The porphyrias: a review. *J. Clin. Path.* **25**: 1013-1033.

Elder, G.H. (1975) Differentiation of porphyria cutanea tarda by measurement of isocoproporphyrin in feces. *J. Clin. Pathol.* **28**: 601-607

Elder, G.H. y Magnus, I.A. (1975) Oral contraceptives and the liver. *Brit Med.* **263**: 397-400.

Elder, G.; Lee, G. & Tovey, J. (1978) Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N. Engl. J. Med.* **299**: 274-278.

Elder, G.H; Sheppard, M.D; Enríquez De Salamanca, R. & Olmos, A. (1980) Identification of two types of porphyria cutanea tarda by measurement of erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase. *Clin. Sci.* **58**: 477-484.

Elder, G.H.; Smith, S.G.; Herrero, C.; Lecha, M.; Mascaró, J.M.; Muniesa, A.M.; Czarnecki, D.B.; Bernan, J. Poulos, V. & Enríquez de Salamanca, R. (1981) Hepato-erythropoietic porphyria: a new uroporphyrinogen decarboxylase defect or homozygous porphyria cutanea tarda? *Lancet I*, 916-919.

Elder, G.H; Sheppard, D.M; Tovey, J.A. & Urquhart, A.J. (1983) Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in porphyria cutanea tarda. *Lancet, I*: 1301-1303.

Elder, G; Urquhart, A.J; Enríquez De Salamanca, R; Muñoz, J.J. & Boukovsky, H.C. (1985) Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in the liver in porphyria cutanea tarda. *Lancet, I*: 229-232.

Enríquez de Salamanca, R; Rico, R; Peña, M.L; Romero, F; Olmos, A. & Jiménez, J. (1980) Patterns of porphyrin excretion in porphyria cutanea tarda under venesection treatment. *Int. J. Biochem.* **12**: 861-868.

Enríquez de Salamanca, R.; Chinarro, S.; Valls, V.; Muñoz, J.; Perpiñá, J.; Bergués, L.; Pascual, R. y Olmos, A. (1982) Porfiria cutánea tarda. *Endocr. Clin. Metab.* **4**: 46-67.

Eriksen, L. & Eriksen, N. (1974) Porphyrin distribution and porphyrin excretion in human congenital erythropoietic porphyria. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* **33**: 323-332.

Fargion, S.; Piperno, A.; Cappellini, M.; Sampietro, M.; Fracanzani, A.; Romano, R.; Caldarelli, R.; Marcelli, R.; Vecchi, L. & Fiorelli, G. (1992) Hepatitis virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* **16**: 1322-1326.

Flesher, B.F. & Redker, A.G. (1966) Effects of chloroquine on hepatic uroporphyrin metabolism in patients with porphyria cutanea tarda. *Medicine* **45**: 575-583.

Felsher, B.F. & Kushner, J.P. (1977) Hepatic siderosis and porphyria cutanea tarda: Relation of iron excess to the metabolic defect. *Semin. Hematol.* **14**: 243-251

Felsher, B.F; Norris, M.E. & Shih, J.C. (1978) Red-cell uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda and in other forms of porphyria. *N. Engl. J. Med.* **299**: 1095-1098.

Felsher, B.F; Carpo, N.M; Engleking, D.W. & Nunn, A.T. (1982) Decreased hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda. *N. Engl. J. Med.* **306**: 766-769.

Garey, J.R.; Hansen, J.L.; Harrison, L.M.; Kennedy, J.B. & Kushner, J.P. (1989) A point mutation in the coding region of uroporphyrinogen decarboxylase associated with familial porphyria cutanea tarda. *Blood* **73**(4): 892-895.

Garey, J.R.; Harrison, L.M.; Franklin, K.F.; Metcalf, K.M.; Radisky, E.S. & Kushner, J.P. (1990) Uroporphyrinogen decarboxylase: A splice site mutation causes the deletion of exon 6 in multiple families with porphyria cutanea tarda. *J. Clin. Invest.* **86**: 1416-1422.

Garey, J.R.; Franklin, K.F.; Brown, D.A.; Harrison, L.M.; Metcalf, K.M. & Kushner, J.P. (1993) Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* **105**: 165-169.

Gibson, P.R.; Ratnaike, S.; Blake, D. & Sinickas, V. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C (letter). *Med. J. Aust.* **162**: 54.

Gillette, J.R.; Mitchel, J.R. Bordie, B.B. (1984) Biochemical mechanism of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmac.* **14**: 271-289.

Goldstein, J.A; Hickman, P; Bergman, H. & Vos, J.G. (1973) Hepatic porphyria induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the mouse. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm.* **6**: 919-927

Guilidori, P; Galli-Kienle, M; Cotto, E, & Stramentinoli, G. (1984) Transmethylation, transulfuration and aminopropylation reactions of S-Adenosyl-L-Methionine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **259**: 4205-4212.

Guzman, H; Stella, A.M; Batlle, A. M. del C; Pietropaolo, N. & Cabrera, H. (1972) Evaluación terapéutica en porfiria cutánea tardía con flebotomía y cloroquina. Estudio de doce casos. *Arch. Argent. Dermatol.* **36**: 73-83.

Held, J.L.; Sassa, S.; Kapas & Harber, L.C. (1989) Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda: a study of 40 consecutive patients. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 332-334.

Herrero, C.; Vicente, A.; Bruguera, M.; Ercilia, M. G.; Barrera, J.M.; Vidal, J.; Terés, J.; Mascaró, J.M. & Rodés, J. (1993) Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda?. *The Lancet* **341**: 788-789.

Hofstad, F; Seip, M. & Eriksen, L. (1973) Congenital erythropoietic porphyria with a hitherto undescribed porphyrin pattern. *Acta Paediatr. Scand.* **62**: 380-384.

Ippen, H. (1961) Allgemeinsymptome der späten hautporphyrie (porphyria cutanea tarda) als hinweise fur deren behandlung. *Dtsch. Med. Wsch.* **86**: 127-133

Ippen, H. (1977) Treatment of porphyria cutanea tarda by phlebotomy. *Sem. Dermatol.* **14**: 253-259.

Ippen, H. (1982) Long term prognosis of cutaneous porphyrias. En Symposium of Porphyrias, 55 (Eds. J. Mascaró, T. Miura & P. Santoiani) Garsi S.A., Madrid, pp. 55-59.

Jones, R.M. & Jordan, P.M. (1993) Purification and properties of the uroporphyrinogen decarboxylase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem. J.* **293**: 703-712.

- Joubert, S.M; Taljard, J.J.F. & Shanley, B.C. (1973) Aetiological relationship between hepatic siderosis and symptomatic porphyria cutanea tarda. *Enzyme* **16**: 305-309
- Kansky, A. (1974) A porphyria cutanea tarda in a 2-year-old girl. *Br. J. Dermatol.* **90**: 213-216.
- Kawanishi, S.; Seki, Y. & Sano, S. (1983) Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J. Biol. Chem.* **258**: 4285-4292.
- Koester, G.; Feldman, J. & Bigler, C. (1994) Hepatitis C in patients with porphyria cutanea tarda. *J. Am. Acad. Dermatol.* **31**: 1054.
- Kordak, V; Martasek, P; Kalab, M; Semradova, M. & Papezova, R. (1981) Chloroquine in the treatment of porphyria cutanea tarda symptomatica. Twelve years of experience in 307 patients. *Cas. Lek. Ces.* **120**: 1225-1227.
- Koszo, F; Elder, G.H; Roberts, A. & Simon, N. (1990) Uroporphyrinogen decarboxylase deficiency in hepatoerythropoietic porphyria: further evidence for genetic heterogeneity. *Br. J. Dermatol.* **122**: 365-370.
- Koszo, F.; Morvay, M.; Dobozy, A. & Simon, N. (1992) Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in 80 unrelated patients with porphyria cutanea tarda. *Br. J. Dermatol.* **126**: 446-449.
- Kushner, J.P; Steinmuller, D.P; & Lee, G.R. (1975) The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. II. Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase. *J. Clin. Invest.* **56**: 661-667.
- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. & Lee, R.G. (1976) An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen-decarboxylase activity. *J. Clin Invest.* **58**: 1089-1097.
- Lamont, N.; Hathorn, M. & Joubert, S. (1961) Porphyria in the African. A study of 100 cases. *Q. J. Med.* **30**: 373-392.
- Lazaro, P; Enríquez de Salamanca, R; Elder, G.H; Villaseca, M.L; Chinarro, S. & Jaqueti, G. (1984) Is hepatoerythropoietic porphyria a homozygous form of porphyria cutanea tarda? Inheritance of uroporphyrinogen decarboxylase deficiency in a Spanish family. *Br. J. Dermatol.* **110**: 613-617.
- Lim, H.W. & Poh-Fitzpatrick, M.B. (1984) Hepato-erythropoietic porphyria: A variant of childhood-onset porphyria cutanea tarda. *J. Am. Acad. Dermatol.* **11**: 1103-1111.
- Lim, H.W.; Harris, H.R. & Follades, J. (1995) Hepatitis C virus infection in patients with porphyria cutanea tarda evaluated in New York (letter). *Arch. Dermatol.* **131**: 849.
- Lundvall, O. (1971) The effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. Its relation to the phlebotomy-induced reduction of iron stores. *Acta. Med. Scand.* **189**: 33-49.

- Magnin, P.H; Wider de Xifra, E.A; Lenczner, J.M; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1980) Studies on the excretion pattern of porphyrins and its use as a tool for diagnosing both symptomatic and asymptomatic cases of porphyria cutanea tarda. *Int. J. Biochem.* **12**: 873-879
- Magnin, P.H; Batlle, A. M. del C; Wider de Xifra, E.A; Lenczner, J.M. & Stella, A.M. (1982) Estudio clínico y bioquímico comparativo entre porfiria cutánea tardía no esclerodérmica y esclerodérmica. *Rev. Arg. Dermatol.* **63**: 177-182
- Mar de Castro, J.; Sánchez, J.; Herrera, J.F.; Chavés, A.; Durán, R.; García-Buey, L.; García-Monzón, C.; Sequí, J. & Moreno-Otero, R. (1993) Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepato.* **17**: 551-557.
- Mascaró, J.; Piñol Agudé, J.; Bruguera, M. & Galy-Mascaró, C. (1973) El hígado porfírico. Correlaciones entre la histopatología, la clínica y el laboratorio. *Actas Dermo-Sif.* **64**: 177-202.
- McManus, J.; Begley, C.; Ratnaik, I.; Hall, W. & Hall, E. (1995) A mutation previously described in hepato-erythropoietic porphyria observed in a patient diagnosed with familial porphyria cutanea tarda. *Scand. J. Clin. Inv.* **55**: Suppl. 223, Abstract 144.
- McManus, J.F.; Begley, C.G.; Sassa, S. & Ratnaik, S; (1996) Five new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene identified in families with cutaneous porphyria. *Blood*, **88**(9): 3589-3600.
- Meguro, K.; Fujita, H.; Ishida, N.; Akagi, R.; Kurihara, T.; Galbraith, R.; Kappas, A.; Zabriskie, J.; Toback, A.; Harber, L. & Sassa, S. (1994) Molecular defects of uroporphyrinogen decarboxylase in a patient with mild hepatoerythropoietic porphyria. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 681-685.
- Meyer, V. & Schmid, R. (1978) The porphyrias. En *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 4th ed. (Eds J. Standbury, J. Wyngaarden & D. Frederickson), Mc Graw Hill. New York, pp. 1166-1220.
- Moore, M.R; Thompsom, G.G; Allen, B.R; Hunter, J.A.A. & Parker, S. (1973) Plasma porphyrin concentrations in porphyria cutanea tarda. *Clin. Sci. Mol. Med.* **45**: 711-715
- Morán Jiménez, M.J.; Ged, C.; Romana, M.; Enríquez de Salamanca, R.; Taieb, A.; Topi, G.; D'Alessandro, L. & De Verneuil, H. (1996) Uroporphyrinogen deacetylase: Complete human gene sequence and molecular study of three unrelated families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 712-721
- Murphy, A.; Dooley, S.; Hillary, I.B. & Murphy, G.M. (1993) HCV infection in porphyria cutanea tarda. *Lancet* **341**: 1534-1535.
- Navas, S.; Bosch, O.; Castillo, I.; Marriott, E. & Carreno, V. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology* **21**: 279-284.

Pimstone, N. (1975) The hepatic aspects of the porphyrias. In *Modern Trends in Gastroenterology*, Ed. Read A. Butterworth London, pp. 373-417.

Pimstone, N. (1982) Porphyria cutanea tarda. *Semin. Liver Disease* **2**: 132-142.

Piñol Aguadé, J.; Castells Mas, A. & Rodés, J. (1969) A case of biochemically unclassifiable porphyria. *Br. J. Dermatol.* **81**: 270-275.

Piñol Aguadé, Herrero, C; Almeida, J; Castells, A; Ferrando, J; De Asper, J; Palou, A. & Gimenez, A. (1975) Porphyrie hépato-érythrocytaire: une nouvelle forme de porphyrie. *Ann Dermatol. Syph.* **102**: 129-136.

Piñol Aguadé, J.; Herrero, C.; Almeida, J.; Castells Mas, A.; Ferrando, J.; Aspres, J. de; Palou, A. & Giménez, A. (1975) Porphyric hépato-erythrocytaire. *Ann. Derm. Syp.* **1202**: 129-136.

Ramsay, C.A; Magnus, I.A; Turnbull, A. & Baker, H. (1974) The treatment of porphyria cutanea tarda by venesection. *Quart. J. Med.* **63**: 1-24.

Rimington, C. & Ziegler, G. (1963) Experimental porphyria in rats induced by chlorinated benzenes. *Biochem. Pharmac.* **12**: 1387-1397.

Roberts, A.; Elder, G.H.; Newcombe, R.; Enriquez de Salamanca, R. & Muñoz, J.J. (1988) Heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda. *J. Med. Genet.* **25**: 669-676.

Roberts, A.G; Elder, G.H; Enriquez de Salamanca, R; Herrero, C; Lecha, M. & Mascaró, J.M. (1995) A mutation (G281E) of the human uroporphyrinogen decarboxylase gene causes both hepatoerythropoietic porphyria and overt familial porphyria cutanea tarda: biochemical and genetic studies in Spanish patients. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 500-502.

Sassa, S; de Verneuil, H; Anderson, K.E. & Kappas, A. (1983) Purification and properties of human erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase: immunological demonstration of the enzyme defect in porphyria cutanea tarda. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* **96**: 65-75

Saver, G.F. & Funk, D.D. (1969) Iron overload in cutaneous porphyria. *Arch. Int. Med.* **124**: 190-194

Schmid, R; Schwartz, S. Watson, C.J. (1954) Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. *Arch. Intern. Med.* **93**: 167-190.

Schmid, R. (1960) Cutaneous porphyria in Turkey. *New Engl. J. Med.* **263**: 397-399

Scholnik, P.L; Epstein, J.H. & Maurer, H.S. (1973) The molecular basis of the action of chloroquine in porphyria cutanea tarda. *J. Invest. Dermatol.* **61**: 226-232.

- Siersema, P.D.; Ten Kale, F.J.; Mulder, P.G. & Wilson, J.H.P. (1992) Hepatocellular carcinoma in porphyria cutanea tarda: frequency and factors related to its occurrence. *Liver* **12**: 56-61.
- Smith, A.G. & Francis, J.E. (1981) Investigations of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase: comparisons of porphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins. *Biochem. J.* **195**: 241-230.
- Stolzel, U.; Kostler, E.; Koszka, C.; Stoffler Meilicke, M.; Schuppan, D.; Somasundaram, R.; Doss, M.O.; Habermehl, K.O. & Riecken, E.O. (1995) Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda in Germany. *Hepatology* **21**: 1500-1503.
- Storck, H; Schwartz, K. & Ott, F. (1972) Un cas de porphyrie cutanée tardive chez un garçon de 5 ans. *Bull. Soc. Fr. Dermatol Syph.* **79**: 240-242.
- Strik, J.J.T.W.A; Janssen, M.M.T. & Colombi, A.M. (1980) The incidence of chronic hepatic porphyria in an italian family. *Int. J. Biochem.* **12**: 879-883
- Swanbeck, G. & Wennersten, G. (1977) Treatment of porphyria cutanea tarda with chloroquine and phlebotomy. *Br. J. Dermatol.* **97**: 77-81.
- Taljaard, J.J.F; Shanley, B.C; Stewartwyne, E.G; Deppe, W.M. & Joubert, S.M. (1972) Studies on low-dose chloroquine therapy and the action of chloroquine in symptomatic porphyria. *Br. J. Dermatol.* **87**: 261-269.
- Taylor, J.S; & Roenigk, H.H.Jr. (1976) Estrogen-induced porphyria cutanea tarda symptomatica. *Porphyria in Human Diseases: First International Porphyria Meeting, Freiburg*. Edited by M. Doss. Basel, S. Karger. pp328-335.
- Toback, A.C; Sassa, S; Poh Fitzpatrick, M.B; Schechter, J; Zaider, E; Harber, L.C. & Kappas, A. (1987) Hepatoerythropoietic porphyria: clinical, biochemical, and enzymatic studies in a three-generation family lineage. *N. Engl. J. Med.* **316**: 645-650.
- Topi, G. & D'Alessandro Gandolfo, L. (1977) Inheritance of porphyria cutanea tarda: analysis of 14 cases in 5 families. *Br. J. Dermatol.* **97**: 617-628.
- Toppi, G. & D'Alessandro Gandolfo, L. (1978) Clinical observation, diagnostics and therapy for symptomatic and hereditary porphyria cutanea tarda. In *Diagnosis and Therapy of Porphyrias and Lead Intoxication* (Ed. M. Doss). Springer-Verlag, Berlin, pp. 107-110.
- Tsukazaki, N.; Tanaka, K.; Irifune, H.; Yoshida, H.; Watanabe, M.; Ohami, T. & Nonaka, S. (1994) Relationship between porphyria cutanea tarda (PCT) and viral hepatitis. *J. Dermatol.* **21**: 411-414.
- Waldenstrom, J. & Haeger Aronsen, B. (1967) The porphyrias: a genetic problem. *Progress in Medical Genetics.* **5**: 58-101.

Welland, F.H. & Carlsen, R.A. (1969) Porphyria cutanea tarda in an 8-year-old boy. *Arch. Dermatol.* **90**: 541-544

Wissel, P.S.; Sordillo, P.; Anderson, K.E.; Sassa, S.; Savillo, R. & Kappas, A. (1987) Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Hematol.* **25**: 107-113.

Wolff, C.; Arinas, R.; Puig, A.; Drause, P. y Parraguez, A. (1994) Infección por virus C de la hepatitis en pacientes con porfiria. *Rev. Mcd. Chil.* **122**: 294-298.

Zeilicoff, R.; Sarmiento, R.; Lucatelli, N.L.; Lenczner, J.M.; Ameigeiras, B.; Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Parera, V.E. & Magnin, P.H. (1987) El hígado en la porfiria cutánea tardía (PCT). *Rev. Arg. Derm.* **68**: 348-355.

MATERIALES Y METODOS

I. REACTIVOS Y ENZIMAS

La mayoría de los reactivos fueron de Merck, Sigma, Gibco, Promega, Bio Labs, QUIAGEN y Perkin Elmer. La Uroporfirina III y Coproporfirina III fueron de Porphyrin Products Inc. (USA). Para la obtención de linfocitos se utilizó Ficoll-Paque de Pharmacia. La proteinasa K (Gibco) se solubilizó en Tris-HCl 50 mM pH 8, acetato de calcio 4 mM a una concentración de 2,5 mg/ml. Para la extracción de RNA se empleó RNazolTMB (BIOTECHX). La transcriptasa reversa (M-MLV) y la Taq DNA polimerasa fueron de Gibco. La Vent DNA polimerasa y las enzimas de restricción fueron de BIO Labs. Para la Long Range PCR se utilizó la rTth DNA polimerasa XL de Perkin Elmer y el DNA templado fue obtenido mediante el kit Puregene (Gentra). Los productos de PCR se purificaron para su secuenciación empleando minicolumnas WizardTM (Promega) o el Kit de purificación QUIAquick de QUIAGEN. En la secuenciación de simple cadena por secuencia se utilizó el ³²P Sequencing Kit de Pharmacia y en la secuenciación de templados doble cadena por Taq DNA polimerasa se utilizaron el fmol Sequencing System de Promega o el Amplicycle Sequencing Kit de Perkin Elmer. El radioactivo utilizado fue [α^{35} S]dATP (1.348 Ci/mmol; 12,5 mCi/ml), [α^{33} P]dATP (1.000-3.000 mCi/mmol 10 mCi/ml) o [α^{32} P]dCTP (3.000 mCi/mmol 10 mCi/ml) de DUPONT. Para las autorradiografías se utilizaron películas Kodak X-OMAT AR o AGFA CURIX RP1. La cepa de E. coli JM 109 fue de GIBCO y el plásmido de expresión pKK 223-3, de Pharmacia.

Los primers utilizados fueron diseñados con asistencia del programa OLIGO y sintetizados por Cybersym (Lenni, RA, USA) o por el Dpto. de Genética Humana, The Mount Sinai School of Medicine, Nueva York, USA.

II. MATERIAL BIOLÓGICO

II.1 Obtención y procesamiento de la sangre para las determinaciones bioquímicas

La sangre fue extraída por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante (0,1 ml para 10 ml de sangre), los glóbulos rojos (GR) se separaron del plasma por centrifugación de 15 min a 2.000 rpm en una centrífuga clínica Rolco CM 36. Para la determinación de ALA-D, PBGasa y Deaminasa, 0,5 ml de GR se lisaron con 0,1 ml de Tritón X 100 5% y se diluyeron 15 veces con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Para la determinación de URO-D, los GR se lisaron por congelamiento-descongelamiento, agregado de Tritón X 100 5% (0,2 ml por ml de GR) y se diluyeron en buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7 como se indica en resultados.

II.2 Conservación de orina para la determinación de porfirinas

Los estudios se realizaron en orina de 24 horas, mantenida a 4 °C y oscuridad.

II.3 Obtención de linfocitos para la extracción de ARN y ADN

La sangre se extrajo por punción venosa utilizando EDTA 0,5M pH 8 como anticoagulante (1 ml cada 14 ml de sangre), se centrifugó 15 min. a 2.400 rpm en una centrífuga ROLCO CM 36, se separó la capa de leucocitos y se la homogeneizó en 5 ml de PBS. Los linfocitos se separaron en un gradiente de densidad formado por 3 ml de Ficoll-Paque, centrifugando 20 min. a 1.700 rpm. (Boyum 1968). La capa conteniendo los linfocitos se homogeneizó en 5 ml de PBS y se centrifugó 15 min a 1.000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se empleó como fuente de ARN y ADN.

La eficiencia de la extracción de linfocitos se evaluó por recuento en cámara de Neubauer de una suspensión de 0,02 ml de linfocitos en PBS y 0,02 ml de una solución de Trypan Blue. Se contaron las células viables de los cuadros laterales de la cámara (T). La cantidad de células se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = T \times 2 \times 10.000$$

III. ESTUDIOS BIOQUIMICOS EN PACIENTES

III.1 Determinación de porfirinas urinarias totales

Se realizó según el método de Seubert & Seubert (1983): 1 ml de orina (pH entre 5 y 7) se sembró en una resina aniónica DOWEX 2x-8 empaquetada en una columna cromatográfica de 0,8 cm x 3,0 cm. Luego se lavó con 10 ml de agua destilada. Seguidamente se eluyeron las porfirinas retenidas en la columna con 3 volúmenes de 2 ml de HCl 3 N, y se midieron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-21 OA.

La concentración de porfirinas se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{mg Porf/ml} = [2 \times A_{\text{max}} - (A^{380} + A^{430})] \times V \times F$$

donde:

A^{380} : absorbancia a 380 nm

A^{430} : absorbancia a 430 nm

A_{max} : máximo de absorbancia entre 400 y 410 nm

V: volumen total del eluido

F: 1.185

III.2 Extracción y determinación cuantitativa de porfirinas esterificadas

Las porfirinas urinarias fueron extraídas según la metodología de Batlle & Grinstein (1962) y se cuantificaron de acuerdo a With (1975).

Se tomaron 10 ml de orina y se llevaron a su punto isoelectrico (pH 3-3,2) con ácido acético glacial; las porfirinas se adsorbieron sobre talco y la suspensión formada se centrifugó 10 min a 2.000 rpm en una centrífuga clínica Rolco CM 36. Luego se lavó el talco con 10 ml de agua destilada, se centrifugó de igual forma, se descartó el sobrenadante y se esterificaron las porfirinas con 10 ml de una mezcla de metanol:H₂SO₄ (90:10 v/v), se agitó y se dejó el tubo cerrado en oscuridad 16-24 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó 10 minutos a 2.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a una ampolla de decantación y se extrajeron las porfirinas con cloroformo hasta fluorescencia negativa en el solvente orgánico. El extracto clorofórmico se llevó a neutralidad con un lavado de bicarbonato de sodio al 6%. La emulsión formada ocasionalmente, durante la extracción, se eliminó realizando un lavado con NaCl 7%. Finalmente, la solución clorofórmica se filtró a través de un papel de filtro embebido en el mismo solvente.

Las porfirinas esterificadas contenidas en la fracción clorofórmica se concentraron y se sembraron en una placa de sílica-gel (25 x 25 cm Kieselgel 60, Merck) junto con testigos de COPRO, PENTA, HEXA, FIRIA y URO; la placa se sometió a una primera cromatografía ascendente durante 20 min en una cuba saturada con benceno:metiletilcetona (20:1,5 v/v) y luego una segunda corrida de 90 min en una mezcla de benceno:metanol:acetato de etilo:éter de petróleo (25:1:0,5:3; v/v). Luego de cada corrida las placas se secaron en una corriente de aire tibio. La posición de las porfirinas se determinó por su fluorescencia bajo la luz UV y se las identificó por la posición de los testigos. Para realizar una determinación cuantitativa de la composición de porfirinas en la muestra se rasparon las manchas fluorescentes de la placa, se extrajeron las porfirinas con 2

ml de cloroformo y se cuantificaron en un espectrofotómetro SHIMADZU-UV 21 OA.

La concentración de porfirinas esterificadas se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{mg Porf} = [2 \times A_{\text{max}} - (A^{380} + A^{430})] \times V \times F$$

donde:

A^{380} : absorbancia a 380 nm

A^{430} : absorbancia a 430 nm

A_{max} : máximo de absorbancia entre 400 y 410 nm

V: volumen de la solución clorofórmica

F: 2,721

III.3 Porfirinas plasmáticas

Se determinaron mediante el índice de porfirinas plasmáticas (IPP), desarrollado por Schoua & Battle (1987), para el cual, la sangre extraída por punción venosa, heparinizada, se centrifugó según lo indicado en III.2.1; luego se tomaron 0,3 ml de plasma y se diluyó con buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,4 que contenía NaCl 0,9%. Se agitó y se graficó la emisión de fluorescencia entre 550 y 700 nm con una excitación fija en 400 nm, en un espectro-fluorómetro SHIMADZU RF-510; el IPP se calculó con la siguiente expresión:

$$\text{IPP} = I_m/I_o$$

donde:

I_m : Intensidad máxima de emisión entre 550 y 700 nm

I_o : Intensidad registrada sobre la línea de base a la altura del máximo de emisión (Figura 1)

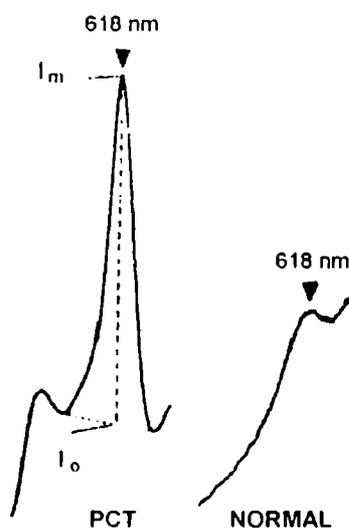


FIGURA 1: Espectros de emisión de fluorescencia de plasma diluido de de un paciente PCT y de un individuo normal.

III.4 Determinación de la actividad de ALA-D

La actividad de ALA-D se determinó según el método de Battle y col. (1988): El sistema standard de incubación contenía 0,25 ml de solución enzimática; 0,25 ml de buffer fosfato de sodio 0,2 M pH 6,8; 0,05 ml de ALA (50 mM) y 0,45 ml de H₂O. Se realizaron blancos de reactivo y de enzima. Se incubó 1 hora a 37 °C en aerobiosis, oscuridad, con agitación mecánica. La reacción se detuvo por el agregado de 0,1 ml de TCA 50%. Las proteínas precipitadas se separon por centrifugación a 2000 rpm 10 minutos en una centrifuga clínica Rolco CM 36, y en el sobrenadante se midió el PBG formado, por la técnica de Moore y Labbe (1964), para lo cual, se mezclaron volúmenes iguales de sobrenadante y reactivo de Ehrlich a temperatura ambiente, y a los 8 minutos se leyó absorbancia a 555 nm.

Los nmoles de PBG se calcularon según la siguiente fórmula:

$$\text{nmol PBG/ml} = [\text{Am} - \text{Ab}] \times \text{F}$$

Donde: Am: absorbancia de la muestra a 555 nm

Ab: absorbancia del blanco a 555 nm

F: 2,57

III.5 Determinación de la actividad de PBGasa y PBG-Deaminasa

Las actividades de PBGasa y Deaminasa se determinaron por el método de Battie y col.(1978): Para la determinación de Deaminasa, se incubaron 0.25 ml de solución enzimática; 0,05 ml de PBG (30 µg/0,1 ml); 0,2 ml de mezcla de incubación(*); y 0,25 ml de H₂O. Se realizaron blancos de reactivo y de enzima. La incubación se realizó durante 2 horas a 45°C, en aerobiosis, oscuridad y con agitación. Finalizada la incubación, se detuvo la reacción por agregado de 0,75 ml de TCA 10% y la mezcla se expuso a la luz blanca durante 20 minutos para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. Luego se centrifugó a 2000 rpm 10 minutos en una centrífuga clínica Rolco CM 36; y se midieron porfirinas del sobrenadante en un espectrofotómetro. Para la determinación de PBGasa, el sistema de incubación fue el mismo y se incubó a 37°C.

(*) MgCl₂/NaCl (1,7 M NaCl : 0,12 M MgCl₂ en proporción 7:3 v/v) y buffer Tris-HCl 0,5 M pH 8,2, en proporción 3:5 v/v.

Los nmoles de porfirinas formados se determinaron según la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles Porf./ml} = [2 \times \text{Amax} - (\text{A}^{380} + \text{A}^{430})] \times \text{F}$$

Donde: A_{max}: máximo de absorbancia entre 400 y 410 nm
A³⁸⁰: absorbancia a 380 nm
A⁴³⁰: absorbancia a 430 nm
F: 90,72

III.6 Determinación de la actividad de URO-D

La actividad de URO-D se determinó por el método de Afonso y col. (1985) con algunas modificaciones con la finalidad de optimizar la recuperación de porfirinas del sistema de incubación y facilitar la detección de las distintas porfirinas recuperadas. Las porfirinas formadas se midieron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El sistema standard de incubación contenía 1 ml de solución enzimática diluida en buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7 (3-200 mg/ml); 0,3 ml de GSH 20 mM; 0,3 ml de EDTA 1 mM; 0,3 ml de buffer fosfato de sodio 0,67 M pH 7; 0,2 ml de UROgen III (50 µg/ml), obtenido por reducción de Uroporfirina III con amalgama de sodio 3%, en medio básico (NaOH 25 mM) y el volumen se llevó a 3 ml con agua destilada. Se realizaron blancos de enzima y de reactivos. La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37°C en atmósfera de nitrógeno, oscuridad y con agitación mecánica. Finalizada la incubación se detuvo la reacción por el agregado de 0,33 ml de TCA 50% o 0,66 ml TCA 50%:DMSO (1:1). Luego se centrifugó 15 min a 3.000 rpm en una centrífuga clínica Rolco CM 36 y se filtró el contenido del tubo por papel de filtro embebido en la solución precipitante diluida 10 veces. El precipitado se lavó con 0,5 ml de la misma solución 1 a 3 veces. Las porfirinas se filtraron empleando filtros Whatman de 0,2 µm de poro y analizaron por HPLC utilizando un equipo modular SHIMADZU, según la técnica descrita por Lim et al. (1983). Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Columna: RP-18, longitud = 125 mm; diámetro interno = 4 mm; diámetro de partículas = 7 µm.

Solvente A: Buffer acetato de amonio 1 M pH 5,16.

Solvente B: acetonitrilo.

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de muestra: 20 μ l

Temperatura de corrida: 25 °C

Se empleó un gradiente lineal entre 10% y 30% con acetonitrilo en 15 min manteniendo el 30% por otros 10 min más. La detección de las porfirinas eluidas se realizó por espectrofotometría empleando una longitud de onda de 404 nm. o por fluorometría con una longitud de onda de excitación y emisión de 404 nm y 618 nm respectivamente.

Para la determinación de actividad, se realizó una curva de calibración Area del pico vs n moles Copro III realizada en el mismo equipo y en las mismas condiciones, con standard de Copro III disuelta en TCA 5%, en concentraciones seriadas y los nmoles de Coproporfirina III formados en la reacción se calcularon por interpolación en dicha curva.

La actividad enzimática se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{nmoles COPRO/ml} = \text{nmoles COPRO} \times 3 \times F$$

donde:

3: Dilución de la solución enzimática en el sistema de incubación

F: Factor de dilución para los glóbulos rojos

Se determinó espectrofotométricamente la cantidad de porfirinas recuperadas en cada caso y una vez ajustadas la concentración de proteínas y forma de detener la reacción se realizó una curva de tiempo (15 a 120 minutos) y una de sustrato (0,05 a 5 μ M) para ajustar el tiempo de incubación y concentración de UROgen III.

Una vez establecidas las condiciones para la medición de URO-D, se *determinó la misma* en pacientes. El diagnóstico de PCT-F se realizó considerando una disminución del 50% en la actividad enzimática respecto al valor promedio de 4 voluntarios normales en cada determinación.

Las unidades enzimáticas se definieron como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto en las condiciones standard de incubación. La actividad específica se definió como el número de unidades por mg de proteína.

III.7 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al. (1951), utilizando seroalbúmina bovina como standard.

IV **BUSQUEDA DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES PATOLOGICAS EN EL GEN DE LA URO-D**

Con el objetivo de detectar polimorfismos y mutaciones patológicas en el gen de la URO-D, se utilizó como fuente de análisis tanto el mRNA como el DNA genómico. Se realizó una RT-PCR para amplificar las 1,2 kb del cDNA, y se diseñaron estrategias para secuenciarlo ya sea mediante T7 secuenasa (con templados de simple cadena obtenidos por PCR asimétrica) como por Taq DNA polimerasa, indistintamente. El gen de la URO-D se amplificó ya sea en fragmentos de alrededor de 1 kb como en un único fragmento de 3 kb y se secuenció por Taq DNA polimerasa. Los polimorfismos y mutaciones encontradas se identificaron de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Beaudet & Tsui (1993).

IV.1 Extracción del RNA total

Se empleó el reactivo comercial RNazol TM^B cuyo fundamento es la metodología descrita en Chomczynski & Sacchi (1987).

Al pellet de linfocitos se le agregó 1 ml de RNazol TM^B y luego de una extracción vigorosa se transfirió a un tubo de 1,5 ml, se agregaron 100 μ l de cloroformo, se agitó 15 s, se mantuvo 5 min a 4°C y se centrifugó 15 min a 12.000 rpm en una centrifuga Sigma 3K 30 refrigerada. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se agregó 1 volumen de isopropanol, se mantuvo 1 h a -20°C y se centrifugó 15 min a 12.000 rpm y 4°C. El pellet de RNA obtenido se lavó con 800 μ l de etanol 75%, se centrifugó 8 min a 10.000 rpm y 4°C, se dejó evaporar 15 min a la misma temperatura, se resuspendió en 15 μ l de agua desionizada autoclavada y se mantuvo a 65°C por 10 min y luego 5 min a 0°C. El RNA así obtenido se almacenó a -70 °C. La calidad del RNA se ensayó por electroforesis de una alícuota de la preparación (3,5 μ l) a la que se le agregaron 10,5 μ l de formamida y 7 μ l de buffer de siembra (503 μ l formaldehído 37%, 60 μ l buffer fosfato de sodio 500 mM pH 7, 15 ml bromuro de etidio 10 mg/ml, 300 μ l glicerol y una punta de espátula de azul de bromofenol por ml de buffer) en un gel de agarosa 1% en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7 conteniendo 18% de formaldehído. Inmediatamente antes de sembrar se desnaturalizó la muestra por tratamiento a 65°C durante 10 min y 2 min a 0°C. La electroforesis se realizó en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7 durante 1 h. a 80 V.

La pureza del RNA se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 (Relación A^{260}/A^{280}) y su concentración se calculó según la expresión:

$$\text{mg/ml} = A^{260} \times \text{Dilución} \times 40$$

IV.2 Extracción del DNA genómico

El pellet de linfocitos se resuspendió en 300 µl de buffer TE (Tris-ClH 10 mM - EDTA 1 mM) y se agregaron 2,5 volúmenes de buffer de lisis (Acetato de sodio 25 mM pH 7, EDTA 25 mM, SDS 0,5%) y proteinasa K (concentración final: 250 mg/ml). Se incubó 4 h a 55 °C, se repartió el volumen en dos tubos de 1,5 ml y se extrajo el DNA agregando un volumen de fenol saturado en Tris-ClH 0,1 M pH 8, se agitó y se centrifugó 10 min a 5.000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C. Se trasvasó la fase acuosa a otro tubo y se repitió la extracción con fenol/Tris-ClH. La fase acuosa de la segunda extracción se transfirió a otro tubo y se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo, se agitó y centrifugó y la fase acuosa se transfirió a otro tubo al que se agregó 1 volumen de cloroformo frío, se repitió la agitación y centrifugación una vez más y la fase acuosa se transfirió a otro tubo al cual se le agregó 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío. Se mantuvo 1 h a -70°C, se centrifugó 3 min a 14.000 rpm y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70% frío; se repitió la agitación y centrifugación y el pellet se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 50 µl de agua desionizada y autoclavada y se almacenó a 4°C.

Para la amplificación de las 3 kb del gen de la URO-D el DNA se extrajo mediante el kit Puregene (GENTRA) siguiendo instrucciones del fabricante: A 3 ml de sangre entera se agregaron 9 ml de una solución de lisis de globulos rojos, se mezcló por inversión y luego de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 2.000 g 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100-200 µl de líquido residual por agitación en vortex. Se agregaron 3 ml de solución de lisis de globulos blancos y luego de mezclar se incubó a temperatura ambiente por 16 h. Seguidamente se agregaron 15 µl de RNasa (400 U/ml) y se incubó 1 h. a 37°C. Luego se agregó 1 ml de solución precipitante de proteínas y luego de agitar en vortex 20 segundos, se centrifugó a 2.000 g por 10 min. El sobrenadante se volcó en un tubo conteniendo 3 ml de

sopropanol 100% y se mezcló por inversión varias veces. Seguidamente se centrifugó a 2.000 g 3 min., se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 3 ml de etanol 70%, se centrifugó a 2.000 g 1 min. se descartó el sobrenadante y se secó el pellet al aire durante 15 min. Finalmente se agregaron 250 µl de solución hidratante de DNA y se incubó 16 h. a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C

La pureza del DNA obtenido se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm (Relación A^{260}/A^{280}). y la concentración se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ml DNA} = A_{260} \times \text{Dilución} \times 50$$

IV.3 Retrotranscripción y Amplificación (RT-PCR)

El RNA obtenido se retrotranscribió a cDNA empleando transcriptasa reversa M-MLV de GIBCO. La transcripción reversa se realizó a partir de 2,5 µg de RNA en 5 µl que luego de desnaturalizarlos por incubación de 10 minutos a 65°C se agregó la mezcla de reacción para alcanzar un volumen final de 20 µl que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; DTT 10 mM; 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (GIBCO) y 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (GIBCO). La reacción se realizó incubando 1 hora a 37°C seguida de 5 minutos a 95°C en un ciclador térmico MJ Research PTC 150. Finalizada la misma se realizó la PCR; optimizando las condiciones de amplificación (Saki et al, 1988; Williams, 1989), para lo cual se agregaron 80 µl de una mezcla que contenía 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (GIBCO); 50 pmoles de cada "primer"; 0,02 mmoles de cada dNTP en Tris HCl 16,2 mM pH 8,4 y KCl 40,6 mM y MgCl₂ para alcanzar una concentración final de 1 a 3 mM en los 100 µl de volumen final; la mezcla se cubrió con dos gotas de aceite mineral y procedió a la amplificación en un ciclador térmico. La amplificación comenzó con una

desnaturalización de 3 minutos a 95°C a la cual le siguieron 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C y 1,5 minutos a 72°C, con una extensión final de 5 minutos en el último ciclo. Los primers utilizados, "upper" y "lower", se unen a las regiones 5' y 3' no codificantes, respectivamente:

Primer Upper (U1): 5'-AGTTACAGACAGCTGACC-3'

Primer Lower (U2): 5'-GTGGTACTTGAGGGTAAAGGT-3'

Para ensayar el producto de la RT-PCR, 8 µl del cDNA amplificado se mezclaron con 2 µl del buffer de siembra (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1% y TBE 10 mM) y se corrió en gel de agarosa 1,4% teñido con bromuro de etidio, en buffer TBE 1X a 100 V durante 60 min, en una cuba HORIZON 58 (GIBCO BRL). El cDNA amplificado se almacenó a -20°C.

IV.4 Purificación del cDNA amplificado

El producto de la RT-PCR se purificó utilizando minicolumnas Wizard™ (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se partió de 300-400 µl de DNA y se mezclaron con 100 µl de buffer Wizard de purificación directa (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tritón X-100 0,1%), luego se agregó 1 ml de resina Wizard y se agitó suavemente 3 veces durante un período total de 1 min; luego se cargó todo el volumen en una minicolumna por medio de una jeringa. Seguidamente se lavó con 2 ml de isopropanol 80%, se ajustó la minicolumna a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 12.500 rpm durante 30 seg. Para eluir el DNA se ajustó la minicolumna a otro tubo eppendorf de 1,5 ml, se cargó con 50 µl de agua desionizada autoclavada y se mantuvo 3 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó 30 seg a 12.500 rpm.

IV.5 Amplificación asimétrica

Con el objeto de obtener templados de simple cadena para su secuenciación con T7 Secuensas, se realizaron amplificaciones del cDNA empleando los primers U₁ y U₂ en relación 100:1 ó 1:100 dependiendo de la cadena que se desea obtener (Gyllensten et al., 1988). Para obtener la cadena "sense", el producto de la RT-PCR, purificado por minicolumnas Wizard™ (1 µl), se amplificó en un volumen final de 100 µl que contenía 50 pmoles del primer U₁; 0,5 pmoles del primer U₂; 0,2 mM de cada dNTP; 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (GIBCO) en Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM y MgCl₂ 1-2 mM. Luego de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C se realizaron 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C y 1,5 minutos a 72°C con una extensión de 5 minutos en el último ciclo. Para obtener la cadena "antisense", la PCR se realizó en condiciones similares pero con 0,5 pmoles del primer U₁, 50 pmoles del primer U₂. Los productos amplificados se ensayaron de igual forma que en la RT-PCR.

IV.6 Amplificación del DNA genómico

Utilizando DNA genómico obtenido mediante digestión con proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo se amplificó un fragmento de 1.027 pb, utilizando los primers upper, 5'-GGGATGGGTTGAGTGAAGGTGGTCCTG-3' y lower, 5'-GGGACAATCTTTCACAAACAAAACACTACAC-3', cuyos sitios de unión son la última parte del intrón 7 y el extremo 3' del gen, respectivamente. Se eligió esta región para identificar la mutación responsable del skipping del exón 9 detectada al analizar el cDNA de una paciente con PCT. El sistema de amplificación, en 100 µl contenía 500 ng de DNA; dNTP 0,2 mM; 50 pmoles de cada primer; Tris-HCl 23,1 mM; KCl 47,7 mM; MgCl₂ 2 mM y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa; la amplificación se realizó con 3 min. a 95°C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 30 s. 60 °C 1 min. y 72 °C 1 min. con una extensión final de 5 min. a 72 °C. Los productos se ensayaron de igual forma que en la RT-PCR.

El gen completo fue amplificado mediante cinco PCR con productos solapados de manera tal de abarcar las 3 kb en fragmentos de alrededor de 1 kb. Los primers utilizados se ubicaron de manera tal de amplificar desde la región promotora completa (Romana et al. 1987) hasta el extremo 3' del gen; los primers internos se unen a secuencias exónicas. Las cinco amplificaciones se llevaron a cabo en un sistema que contenía 500 ng de DNA, dNTP 0,2 mM; 50 pmoles de cada primer; Tris-HCl 23,1 mM; KCl 47,7 mM; MgCl₂ 1-2 mM y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa. La amplificación se realizó con 3 min. a 95 °C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 1 min. 60 °C 1 min. y 72 °C 1,5 min. con una extensión final de 5 min. a 72 °C. Los productos se ensayaron de igual forma que en la RT-PCR. Los primers utilizados en cada PCR y su "target" se detallan a continuación:

PCR 1: Región promotora - Exón 2 (Fragmento: 1.040 pb)

U: 5'-TATGGACCTGGCTGGATAAGACTGTTGGT-3'

AS-6: 5'-CTCGCAGGAATGTGTCATTCTTCAGCCTC-3'

PCR 2: Región 5' - Exón 4 (Fragmento: 1.079 pb)

RT-U: 5'-AGTTACAGACAGCTGACC-3'

AS-5: 5'-CTCGCAGGAATGTGTCATTCTTCAGCCTC-3'

PCR 3: Exón 3 - Exón 6 (Fragmento: 903 pb)

S-8: 5'-CGGGCTGCCCAGGACTTTTTTCAGCACG-3'

AS-3: 5'-TTGTCCTACCAGATATGGGACCAGAGC-3'

PCR 4: Exón 5 - Exón 8 (Fragmento: 1.023 pb)

S-4: 5'-GGACGTGTGCCGCTGATTGGCTTTGCT-3'

AS-2: 5'-CCAGCTCCTCCAGGGCAAATGCCCATCCT-3'

PCR 5: Exón 7 - Región 3' (Fragmento: 1.057 pb)

S-9: 5'-TGGCCAAGCAAGTGAAGGCCAGGTTGCGGGA-3'

L2: 5'-CTGAGGATATGGGACAATCTTTTAC-3'

IV.7 Amplificación del gen de la URO-D en un solo fragmento (Long Range PCR)

El gen de la URO-D completo se amplificó en una única PCR, utilizando rTth DNA Polimerasa XL, optimizando las variables de las que depende la PCR (Saiki et al, 1988; Williams, 1989) y Long Range PCR (Cheng et al, 1994) y utilizando el sistema de Hot Start en la amplificación. Se utilizó el kit GeneAmp (Perkin Elmer). La PCR se llevó a cabo en tubos "Thin-Wall"; el medio de amplificación fue preparado en dos niveles (superior e inferior): El nivel superior contenía primers (U y L1); dNTPs; Mg(AcO)₂ en buffer XL II 0,3X (contiene Tricina, Acetato de Potasio, Glicerol y DMSO) en un volúmen final de 40 µl. Luego se cubrió con una Gema AmpliWax (Perkin Elmer) y se colocó en un ciclador térmico durante 5 minutos a 80 °C y 5 minutos a 25 °C. Seguidamente se agregó el nivel superior que contenía DNA (1 µg) y 4 unidades de r Tth DNA Polimerasa en Buffer XL II 0,3 X y un volumen final de 60 µl. Las concentraciones finales alcanzadas al mezclarse ambas fases durante la primer desnaturalización en el programa de amplificación fueron 0,3 µM de cada primer; 0,2 mM de cada dNTP; 0,7 a 1,5 mM de Mg(AcO)₂, en 100 µl. En la amplificación, después de una desnaturalización inicial de 1 min. a 94 °C se realizaron 16 ciclos de 15 seg. a 94 °C y 3 min. de annealing-extensión a 67 °C (1 min. por kb); seguidos de 12 ciclos con 15 seg. a 94 °C y 3 min. 15 seg. (con autoextensión de 15 seg. por ciclo) a 67 °C; como última etapa, una extensión de 10 min. a 72 °C. Finalizada la amplificación se ensayaron los productos de PCR por electroforesis a 200 voltios, en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

Primer Upper (U): 5'-TATGGACCTGGCTGGATAAGACTGTTGGT-3'

Primer Lower (L1): 5'-GGGACAATCTTTCACAAACAAAACACTACAC-3'

IV.8 Purificación del DNA amplificado para secuenciación

Para la purificación del DNA se utilizaron minicolumnas Wizard™ (Promega) según lo indicado en IV.4. Alternativamente, el DNA amplificado se purificó mediante el kit QUIAquick™ (QUIAGEN) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante en el cual cada producto de PCR se mezcló con 5 volúmenes de buffer PB que permite que la muestra mantenga un pH < 7,5, en el cual es eficiente la adsorción del DNA a la sílica de la minicolumna; una vez adsorbido a ésta se lavó con 0,75 ml de buffer PE (que contiene etanol); finalmente el DNA se eluyó en 50 µl de agua desionizada autoclavada. En el caso de una paciente cuya RT-PCR originó dos productos, los mismos fueron purificados separadamente para su secuenciación luego de cortarlos de un gel de agarosa 2% y eluirlos en buffer TE durante 48 h a 4°C. Asimismo, en el caso de un paciente cuya Long Range PCR originó dos productos, los mismos se cortaron de un gel de agarosa-NuSieve 1% y purificaron por minicolumnas QUIAquick (QUIAGEN) mediante el protocolo sugerido por el fabricante: a 100 mg de agarosa se agregaron 300 µl de buffer QX1 que permite solubilizar la agarosa y mantiene el pH < 7,5 para facilitar la adsorción del DNA a la sílica de la columna; seguidamente se incubó a 50 °C durante 10 min. para disolver la agarosa; luego se agregaron 100 µl de isopropanol, se mezcló y se cargó en la minicolumna; el DNA adsorbido en la misma se lavó primero con 0,5 ml de buffer QX1 y después con 0,75 ml de buffer PE (que contiene etanol); finalmente el DNA se eluyó con 50 µl de agua destilada autoclavada

IV.9 Secuenciación

Se realizó por el método de Sanger et al. (1977) tomando como base el protocolo de secuenciación directa mediante la enzima T7 DNA polimerasa o Secuenciación de Pharmacia (Tabor & Richardson, 1987) para templados de simple cadena (Purificados por minicolumnas Wizard) o mediante Taq DNA polimerasa

utilizando el kit fmol Sequencing System de Promega o el kit AmpliCycle de Perkin Elmer, para secuenciar templados doble cadena (Purificados por minicolumnas Wizard o por el kit QUIAquick), mediante un protocolo de incorporación directa de marca. Los primers utilizados se muestran en las Tablas 1 y 2.

a) T7 Secuencasa:

1) Annealing: Una mezcla que contenía 10 μ l de templado (2 μ g), 1 μ l de primer (1 pmol/ μ l), 2 μ l de buffer (Tris-HCl 1 M pH 7,6; MgCl₂ 100 mM; DTT 160 mM) y 1 μ l de DMSO, se incubó a 95°C 5 min y a 60 °C 10 min, luego se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

2) Marcación: A los 14 μ l del templado/primer se agregaron 3 μ l de la mezcla de marcación (1,375 mM de dCTP, dGTP y dTTP; 333,5 mM NaCl), 1 μ l de [α -³⁵S]dATP y 2 μ l de T7 secuencasa (1,6 U), se incubó 5 min. a temperatura ambiente y se procedió a la extensión.

3) Extensión: Se agregaron 4,5 μ l de la mezcla del paso anterior a cuatro tubos conteniendo cada uno 2,5 μ l de una de las cuatro mezclas de terminación, G, A, T, C (*), y se incubó 5 min a 37 °C. Finalmente, se agregaron 5 μ l de "Stop Solution" (97,5% formamida; 10 mM EDTA pH 7,5 y 0,3% de azul de bromofenol y de Xylene Cyanol).

(*) Tris-HCl 40 mM pH 7,6, NaCl 50 mM, dNTPs y el ddNTP correspondiente en las siguientes concentraciones:

G: 840 μ M de dATP, dCTP y dTTP, 93,5 μ M de dGTP y 14 μ M de ddGTP.

A: 840 μ M de dGTP, dCTP y dTTP, 93,5 μ M de dATP y 14 μ M de ddATP.

T: 840 μ M de dATP, dCTP y dTGP, 93,5 μ M de dTTP y 14 μ M de ddTTP.

C: 840 μ M de dATP, dGTP y dTTP, 93,5 μ M de dCTP y 17 μ M de ddCTP.

b) Taq DNA polimerasa:

fmol:

En un volumen final de 16 μ l se mezclaron: 1 μ l de DNA (500 fmoles), 1 μ l de primer (20 μ M), 1 μ l de [α -³⁵S]dATP y 5 μ l de buffer (Tris-HCl 250 mM pH 9; MgCl₂

10 mM). Luego se agregó 1 µl de "Sequencing Grade" Taq DNA Polimerasa (5 U). Después se agregaron 4 µl a cada uno de los cuatro tubos conteniendo 2 µl de d/ddNTP (G, A, T y C) compuesta por el ddNTP correspondiente (30 µM, 350 µM, 600 µM y 200 µM respectivamente), dATP, dTTP, dCTP y c⁷dGTP (20 µM); y se cubrió con una gota de aceite mineral. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico y se procedió al programa de amplificación: 95 °C, 2 min y luego 30 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s y 70 °C 1 min. Finalmente se agregaron 4,5 µl de "Stop Solution" (NaOH 10 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% y Xylene Cyanol 0,05%).

AmpliCycle:

En un volumen final de 30 µl se mezclaron 0,5 µl de DNA (1-100 fmoles), 1 µl de primer (20 µM), 1 µl de [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP o [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP y 5 µl de Cycling Mix (Ampli Taq DNA polimerasa 0,25 U/µl; Tris-HCl 500 mM pH 8,9; KCl 100 mM; MgCl₂ 25 mM y Tween 20 0,25%); llevando a volumen con agua destilada autoclavada. Luego se agregaron 6 µl a cada uno de los cuatro tubos conteniendo 2 µl de mezcla de terminación (G, A, T y C) compuesta por el ddNTP correspondiente (80 µM, 600 µM, 900 µM y 300 µM respectivamente), dATP, dTTP y dCTP (10 µM), c⁷dGTP 22,5 µM en Tris-HCl 10 mM EDTA 0,1 mM pH 7,5. Finalmente se cubrió con una gota de aceite mineral. Los tubos se colocaron en un ciclador térmico y se procedió al programa de amplificación: 95 °C 2 min. seguidos de 30 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s y 72 °C 1 min. Luego se agregaron 4,5 µl de Stop Solution (Formamida 95%, EDTA 20 mM, Azul de Bromofenol 0,05% y Xylene Cyanol 0,02%).

En todos los casos los productos de secuenciación se analizaron en geles (21 x 50 cm o 45 x 50 cm y 0.4 mm de espesor) de poliacrilamida 6% (Acrilamida:Bis acrilamida 19:1) y 7 M de urea utilizando una cuba Sequi-Gen (BIO RAD). El gel se precorrió a 40 W hasta alcanzar los 50 °C. Inmediatamente antes de sembrar, las muestras se calentaron a 94 °C 3 min, para su desnaturalización y

se mantuvieron en hielo mientras se procedió a su siembra (4 μ l) en el gel. La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X a 50 °C. durante 2 a 6 horas. Finalizada la corrida, los geles de secuenciación con [α^{35} S] se fijaron en metanol 10%:ácido acético 10% durante 20 min y se transfirió a una hoja de papel de filtro Whatman N° 1, se cubrió con una lámina autoadhesiva y se secó en un secador de geles BIO RAD 583 con vacío a 80 - 90 °C, luego se retiró la lámina y se expuso a una película radiográfica durante 48 h a -70 °C. Los geles de secuenciación con [α^{33} P] o [α^{32} P] no se fijaron y después de transferirlos al papel Whatman, cubrirlos con una lámina autoadhesiva y secarlos, se expusieron a una película radiografica durante 16 h a -70 °C.

TABLA 1:. Primers utilizados para secuenciar el cDNA

PRIMER	SENTIDO
RT-U: 5'-AGTTACAGACAGCTGACC -3'	Sense
S-1: 5'-TGGTGCATGCGCCAGGCAGGCCGTTAC-3'	Sense
S-2: 5'-ACTGCGTCGCTTCCCTCTGGATGCTGCCAT-3'	Sense
S-3: 5'-TGTTGTACCCAGGCACTGGGCATGGAGGT-3'	Sense
S-4: GGACGTGTGCCGCTGATTGGCTTTGCT-3'	Sense
S-5: GTAGGACAAGTGGTGGCTGGTGCCCAG-3'	Sense
S-6: ATCATCTTTGCTAAGGATGGGCATTTTGCC-3'	Sense
S-7: 5'-ATCGGGCAGTTGGTGAAGCAGATGCTG-3'	Sense
RT-L: 5'-GTGGTACTTGAGGGTAAAGGT -3'	Antisense
AS-1: 5'-TCTCCTCCTCAGATGCATACAAGGCACA-3'	Antisense
AS-2: 5'-CCAGCTCCTCCAGGGCAAATGCCCATCCT-3'	Antisense
AS-3: 5'-TTGTCTACCAGATATGGGACCAGAGC-3'	Antisense
AS-4: 5'-AAGGGTGATGGCTTGGAACACATAGCCT-3'	Antisense
AS:-5: 5'-AATGATGGCAGCATCCAGAGGGAA-3'	Antisense

TABLA 2.: Primers utilizados para secuenciar el gen

PRIMER	REGION SECUENCIADA
U: 5'-TATGGACCTGGCTGGATAAGACTGTTGGT-3'	Región 5'
E-1: 5'-TACAGAAAGGGGCGGAGCCTGGACTGG-3'	Exón1 - Intrón 1
U-1: 5'-GTTACAGACAGCTGACCATGGA-3'	Intrón 1
E-2: 5'-GGGAGCTGGCCTGGAGGAGGTAGATAG-3'	Exón 2 - Intrón 2
E-3: 5'-GAGGAGAAAAGTTTTCGAGGGGCA-3'	Exón 3 - Intrón 3
E-4: 5'-CAAAAGAGGGAAAGATTTATGCCTTCA-3'	Exón 4
S-2: 5'-ACTGCGTCGCTTCCCTCTGGATGCTGCCAT-3'	Intrón 4
E-5: 5'-CTGAACAGAACCTTTCCTCCTGGATTC-3'	Exón 5 - Intrón 5
E-6: 5'-GGGGTAGACAAAAGGAAGGGTCAGTC-3'	Exón 6 - Intrón 6
S-6: 5'-ATCATCTTTGCTAAGGATGGGCATTTTGCC-3'	Intrón 6
E-7: 5'-GTGGATTTTGTATGTGGGGGAAACTTC-3'	Exón 7 - Intrón 7
M: 5'-TGGCCAAGCAAGTGAAGGCCAGGTTGCGGGA-3'	Intrón 7
E-8: 5'-GGGATGGGTTGAGTGAAGGTGGTCCTG-3'	Exón 8 - Intrón 8
E-9: 5'-GGAGCTGCCATGTATGCAGTTACCA-3'	Exón 9 - Intrón 9
Int 9: 5'-CGGACTTTTTGTTGCTGTTGTGTTCAATTT-3'	Intrón 9
E-10: 5'-ATAGGGAGGACAAAGGCTTGCTGGT-3'	Exón 10 - Región 3'
P: 5'-CCGTAAAGTTTGCTGTAGCGA-3'	Región 5'
L1: 5'-GGGACAATCTTTCACAAACAAAACACTACAC-3'	Región 3' - Exón 10
92: 5'-CTCGCAGGAATGTGTCATTCTTCAGCTC-3'	Intrón 1
C: 5'-TGCATGGGACTCAAACAGCTGC3'	Intrón 6

IV.10 Polimorfismo de conformación de simple cadena (SSCP)

Para esta técnica se amplificó un fragmento de 118 pb empleando los primers "sense", 5'-AGTTACAGACAGCTGACC-3', con unión en la región 5' del gen, inmediatamente antes del codón iniciador de la traducción y "antisense", 5'-GAGTAGAGGGATAGAGTCCT-3', con unión en intrón 1. Se eligió esta región

pués en ella se encuentra la mutación 29insA, la que resultó ser la más frecuente en el grupo de pacientes estudiado. Las condiciones de amplificación se ajustaron sin el agregado de radioactivo y seguidamente se realizó la PCR radioactiva para SSCP utilizando [α - 32 P]dCTP (10 μ Ci), mediante el siguiente sistema: 200 ng de DNA, dNTP 0,1 mM; 20 pmoles de cada primer; Tris-HCl 23,1 mM; KCl 47,7 mM; MgCl₂ 1-2 mM y 1,5 unidades de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μ l. La amplificación se realizó con 3 min. a 95 °C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 1 min. 60 °C 30 seg. y 72 °C 20 seg. Los productos se ensayaron de igual forma que en la RT-PCR, en geles de agarosa 2%.

Para realizar el análisis de SSCP (Orita et al. 1989 a y b; Sheffield et al. 1993), 10 μ l del producto de PCR se diluyeron 5 veces en una solución 0,1% SDS y 10 mM EDTA; y luego se tomaron 5 μ l de ésta y se mezclaron con 5 μ l de solución desnaturizante (97,5% formamida; 10 mM EDTA pH 7,5 y 0,3% de azul de bromofenol y de Xylene Cyanol); las muestras se desnaturizaron por calentamiento a 100°C durante 5 min, se pusieron inmediatamente en hielo y se sembraron 4 μ l en un gel (21 x 50 cm y 0,4 mm de espesor) de poliacrilamida 6% (Acilamida-Bis acrilamida 19:1) no desnaturizante y sin glicerol, utilizando una cuba Sequi-Gen (BIO RAD). La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C (20 watts, 3 h) en TBE 0,5 X. Finalizada la electroforesis, el gel se transfirió a una hoja de papel Whatman N° 1, se cubrió con una lámina autoadhesiva y se secó en secador de geles BIO RAD 583 a 80°C con vacío, luego se retiró el plástico y se expuso a una película radiográfica 16 h a -70 °C.

V. EXPRESION PROCARIOTICA DE LAS MUTACIONES MISSENSE

V.1 Sistema de expresión

Para analizar el efecto de las mutaciones nuevas, que causan el cambio de

algún aminoácido, sobre la uroporfirinógeno decarboxilasa, se utilizó el sistema de expresión procariótica en *Escherichia coli* (cepa JM 109) y como vector el pKK-223-3; el cDNA normal de la URO-D desde el ATG iniciador hasta el codón de stop fue clonado en el vector, en fase con el promotor Tac, inducible con IPTG (pKK-UROD). La estrategia elegida para la construcción de los vectores mutantes fue la generación de un cassette portando la mutación mediante mutagénesis sitio dirigida por PCR, y su reemplazo en el pKK-UROD para luego transformar bacterias JM 109 competentes (Sambrook et al. 1989; Ausubel et al. 1991; Warner et al. 1992).

V.2 Preparación de células competentes

Se inocularon con un ansa 5 ml de medio LB (1% de Peptona; 1% de NaCl; 0,5% de extracto de levadura; pH 7,5) sin antibiótico, con un stock de células JM 109 y se crecieron O/N a 37 °C con agitación. Seguidamente 500 µl de cultivo se inocularon 100 ml del mismo medio y se creció a 37 °C hasta fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}} = 0,6$). Luego se centrifugó 5 min. a 700 g a 4 °C. y se resuspendió el pellet bacteriano en 20 ml de $MgCl_2$ 0,1 M estéril, se incubó 15 min. en hielo y se centrifugó igual que en el paso anterior. Seguidamente se resuspendió el pellet en 2 ml de $CaCl_2$ 0,1 M estéril y se incubó 1 h. en hielo. Luego se mezclaron 400 µl de células con 100 µl de glicerol 75% estéril y se almacenaron a -70 °C.

V.3 Determinación de URO-D en bacterias

Como etapa previa a la construcción de los vectores mutantes se determinaron las condiciones óptimas para la medición de actividad en este sistema, para lo cual se adaptó el método de determinación de URO-D en sangre y se determinó el tiempo de incubación y la concentración de sustrato a utilizar.

A partir de un stock de bacterias conteniendo ya sea el pKK o el pKK-UROD se inoculó mediante un ansa 5 ml de medio LB con ampicilina (50 µg/ml) y se creció 16 horas (O/N) a 37 °C con agitación. Seguidamente se tomaron 200 µl de cultivo O/N y se inocularon 10 ml de LB con ampicilina (50 µg/ml) y se crecieron a 37°C y agitación hasta $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$. Luego se tomaron 2 ml de cultivo y se crecieron por 3 horas más a 37 °C en presencia o ausencia de IPTG (5 mM). Finalizado este periodo se procedió a cosechar las bacterias para lo cual 1,5 ml de cultivo se centrifugó a 13.000 rpm 30 seg., se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de PBS, luego de repetir la centrifugación se descartó el sobrenadante y se lisaron las bacterias por agregado de 250 µl de buffer de lisis (Buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7 con 0,1% de Tritón X 100) y por sonicado en 3 pulsos de 15 segundos cada uno, a intensidad 6 en un sonicador Soniprep 150, manteniendo las muestras en hielo. Finalmente se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se usó para determinar URO-D por la metodología ya descrita pero en un sistema que contenía 50 µl de enzima; 50 µl de buffer fosfato de sodio 0,67 M pH 7; 50 µl de GSH 20 mM; 50 µl de EDTA 1 mM, y 50 µl de Uroporfirinogeno III (35 µg/ml) en un volumen final de 500 µl. La incubación se llevó a cabo durante una hora para comparar la actividad en los clones pKK y pKK-UROD con y sin IPTG. Finalizada la incubación se detuvo la reacción por agregado de 0,55 µl de TCA 50%, se expuso a la luz blanca durante 20 minutos, se centrifugó a 13.000 rpm 1 minuto y las porfirinas se analizaron por HPLC según la metodología de Lim et al.(1983). Para la determinación de actividad, los nmoles de Coproporfirina III formados en la reacción se calcularon por interpolación en una curva de calibración Area del pico vs n moles Copro III realizada en el mismo equipo y en las mismas condiciones, con standard de Copro III disuelta en TCA 5%,. Con el pKK-UROD + IPTG se realizó además un estudio de actividad en función del tiempo entre 15 y 120 min. y de actividad a distintas concentraciones de sustrato (0,05 a 5 µM). Las proteínas se determinaron por el metodo de Lowry et al. (1951). y la actividad se expresó como: nmol Copro III /mg proteína.

V.4 Construcción de los mutantes

Las mutaciones missense encontradas fueron introducidas en el pKK-UROD por intercambio de cassette. Los cassettes mutantes fueron obtenidos por mutagénesis sitio dirigida por PCR utilizando al constructo normal como templado. Para la elección de las enzimas de restricción a usar se determinaron los sitios de restricción en la secuencia normal de la URO-D con asistencia del programa MacVector 4.0 y la lista de enzimas cortadoras y no cortadoras del pKK-223-3 suministrada por Pharmacia.

Obtención del DNA plasmídico:

El DNA plasmídico del pKK-UROD se extrajo a partir de un cultivo O/N del cual se tomaron 1,5 ml de medio y luego de una centrifugación de 30 segundos a 13.000 rpm se procedió a la extracción, para lo cual se utilizó el kit QIAprep Spin Plasmid de QUIAGEN (Minipreps), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA plasmídico se eluyó en 50 µl de agua desionizada autoclavada. La concentración de plásmido se determinó mediante la expresión:

$$\text{mg/ml DNA} = A_{260} \times \text{Dilución} \times 50$$

Construcción de los cassettes:

Las mutagénesis se realizaron por PCR utilizando como templado al pKK-UROD diluído a una concentración de 0,3 µg/ml. Para N304K y R332H el cassette se construyó con una PCR utilizando Taq DNA polimerasa, en la cual uno de los primers tenía la base mutada y contenía el sitio para Nsi I y el otro flanqueaba el sitio para Bcl I (en N304K) o Hind III (en R332H), este último situado en el polilinker del vector. Para M165R y L195F se llevaron a cabo dos PCR secuenciales con

Vent DNA polimerasa; para cada mutante se realizaron dos PCR para obtener fragmentos superpuestos que incluyeran la mutación introducida por uno de los primers mientras que el otro flanqueaba el sitio para Kpn I o Hind III, ambos productos se purificaron y utilizaron juntos como templado en un segundo paso de PCR con los primers externos a ambos sitios de restricción. Ambos sistemas se esquematizan en la Figura 2.

En todas las PCR se utilizó el sistema Hot Start, agregando los primers al sistema de amplificación luego de 1 minuto a 94°C. Los sistemas de amplificación y primers utilizados para los cuatro cassettes se detallan a continuación (En los primers de mutagénesis se indica en minúscula la base introducida):

R332H y N304K:

La PCR se llevó a cabo en un sistema que contenía 2 µl (0,6 ng) de plásmido, dNTP 0,2 mM; 50 pmoles de cada primer; Tris-HCl 23,1 mM; KCl 47,7 mM; MgCl₂ 2 mM y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 100 µl. La amplificación se realizó con 5 min. a 94 °C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 1 min. 65 °C 1 min. y 72 °C 30 seg. Los primers utilizados en cada caso son los siguientes:

R332H: (258 pb)

Sense:(5')CTGTGCCTTGTATGCATCTGAGGAGGAGATCGGGCAGTTGGTG
AAGCAGATGCTGGATGACTTTGGACCACATCaCTAC(3')

Antisense:(5')ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCA(3')

N304K:(238 pb)

Sense:(5')TGGCCAAGCAAGTGAAGGCCAGGTTGCGGGA(3')

Antisense:(5')TGCCCGATCTCCTCCTCAGATGCATACAAGGCACAGGGGTC
CAGtTTGCC(3')

M165R y L195F:

En estos dos casos se realizaron dos PCR con productos superpuestos (PCR 1 A y B), en un sistema que contenía 2 μ l (0,6 ng) de plásmido, dNTP 0,2 mM; 50 pmoles de cada primer; Tris-HCl pH 8,8 20 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM; KCl 10 mM; Tritón X-100 0,1%; MgSO_4 4 mM y 2 unidades de Vent_R DNA polimerasa, en un volumen final de 100 μ l. La amplificación se realizó con 5 min. a 94 °C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 1 min. 65 °C 1 min. y 72 °C 30 seg. Ambos productos se purificaron por minicolumnas WizardTM o QIAquickTM y se utilizaron juntos (1 μ l de cada uno) como templado para una segunda PCR (PCR 2) realizada en las mismas condiciones pero con 1 min. de elongación en cada ciclo. Los primers utilizados en cada caso son los siguientes:

M165R

PCR 1 (A): (245 pb)

Sense:(5')TGTTGTACCCCAGGCACTGGGCATGGAGGT(3')

Antisense:(5') CACCACCCTCAACCCTGTATGTCATCAGG(3')

PCR 1 (B): (690 pb)

Sense:(5')CCTGATGACATACAGGGGTTGAGGGTGGTG(3')

Antisense:(5')ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCA(3')

PCR 2: (915 pb)

Sense:(5') TGTTGTACCCCAGGCACTGGGCATGGAGGT(3')

Antisense:(5') ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCA(3')

L195F:

PCR 1 (A): (334 pb)

Sense:(5')TGTTGTACCCCAGGCACTGGGCATGGAGGT(3')

Antisense:(5')CAGAGCATCAGTGAAGATGCGAAGCAGCT(3')

PCR 1 (B): (610 pb)

Sense:(5')AGCTGCTTCGCATCTCACTGATGCTCTG(3')

Antisense:(5')ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCA(3')

PCR 2: (915 pb)

Sense:(5') TGTTGTACCCCAGGCACTGGGCATGGAGGT(3')

Antisense:(5') ATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCA(3')

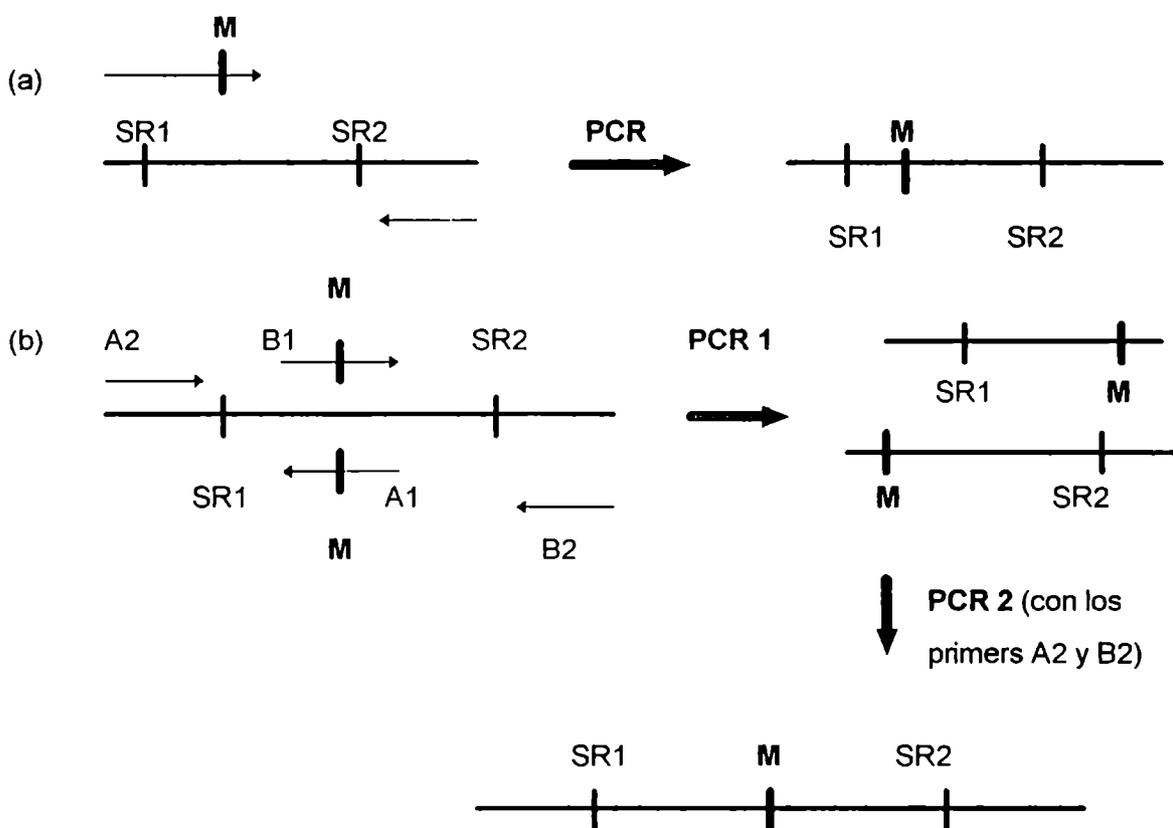


FIGURA 2: Estrategias de mutagénesis utilizadas en la expresión de mutaciones: (a) N304K y R332H. (b) M165R y L195F. SR1 y SR2: Sitios de restricción; A1, A2, y B1, B2: Primers utilizados en las PCR 1 A y B; M: Mutación introducida.

Digestiones:

Las digestiones se realizaron con alrededor de 1 µg de plásmido obtenido por Minipreps y 30 µl de un producto de PCR purificado en 50 µl por minicolumnas de purificación de productos de PCR, según se indica a continuación:

R332H:

Se realizó una primera digestión con Nsi I, en un volumen de 50 µl que contenía DNA; NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,4 y 100 unidades de Nsi I. Se incubó 16 horas a 37°C seguidos de 20 min. a 65°C para inactivar la enzima. Luego se realizó la segunda digestión para lo cual se agregó al sistema anterior 100 µl de una mezcla que contenía NaCl 75 mM; MgCl₂ 15 mM; DTT 1,5 mM; Tris-HCl 15 mM pH 7,9 y 100 unidades de Hind III. Se incubó 16 h. a 37°C seguidos de 20 min. a 65°C.

N304K:

Se realizó una primera digestión con Nsi I, en un volumen de 50 µl que contenía DNA; NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,4 y 100 unidades de Nsi I. Se incubó 16 horas a 37°C seguidos de 20 min. a 65°C. Luego se realizó la segunda digestión para lo cual se agregó al sistema anterior 100 µl de una mezcla que contenía NaCl 150 mM; MgCl₂ 15 mM; DTT 1,5 mM; Tris-HCl 75 mM pH 7,9 y 100 unidades de Bcl I, y se incubó 16 h. a 50°C.

M165R y L195F:

En este caso se realizó la digestión con ambas enzimas simultáneamente,

en 100 μ l que contenían DNA; $MgCl_2$ 10 mM; DTT 1 mM; Bis Tris Propano-HCl 10 mM pH 7; BSA 100 μ g/ml; 50 unidades de Kpn I y 100 unidades de Hind III. La digestión se realizó a 37°C durante 16 h.

Ligación:

La ligación de los productos de digestión purificados con el kit QUIAquick (QUIAGEN) o Wizard (Promega) se realizó en un sistema que en 20 μ l contenía 17 μ l de Vector/cassette (*), $MgCl_2$ 10 mM; DTT 10 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,8; ATP 1 mM; BSA 50 μ g/ml; 50 unidades y 400 unidades de T4 DNA Ligasa. La reacción se llevó a cabo durante 16 h a 16°C en un ciclador térmico.

(*): Relación cassette : Vector mayor o igual a 5:1

Transformación y selección:

A 100 μ l de células competentes se agregaron 20 μ l de ligado, se mantuvo en hielo durante 30 min. y se incubó a 42 °C durante 2 minutos, seguidamente se mantuvo en hielo por 5 min. tras lo cual se agregaron 450 μ l de LB y se incubó 1 h a 37°C a 225 rpm. Luego se realizó la selección, donde al volumen total (570 μ l) de Transformantes se agregaron 60 μ l Ampicilina (50 mg/ml), se plaqueó en LB-Agar y se creció 16 h a 37°C. Se picaron colonias aisladas y se hicieron crecer O/N a 37°C en 5 ml LB con 5 μ l de Ampicilina (50 mg/ml); De cada clon se realizó una PCR utilizando los primers flanqueantes al cassette, para la cual 100 μ l de cultivo se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se tomaron 2 μ l para amplificar el cassette, en un sistema que contenía dNTP 0,2 mM; 50 pmoles de cada primer; Tris-HCl 23,1 mM; KCl 47,7 mM; $MgCl_2$ 2 mM y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa, en un volumen final de 100 μ l. La amplificación se realizó con 5 min. a 94 °C seguidos de 30 ciclos de 95 °C 1 min. 65 °C 1 min. y 72 °C 30 seg. A los clones con PCR positiva se

extrajo el DNA plasmídico mediante minipreps, según el procedimiento ya indicado y se secuenció para chequear errores de PCR y verificar la presencia de la mutación introducida. De los clones positivos sin errores de PCR se tomaron 500 μ l de cultivo O/N, se diluyeron al medio con glicerol 30% estéril y se almacenaron a -70°C .

V.5 Determinación de la actividad residual en los clones mutantes:

Para la determinación de actividad residual en los constructos, se inoculó con un ansa (ó 2,5 μ l) 5 ml de medio LB con 5 μ l de Ampicilina (50 mg/ml) y se dejó crecer 16 h a 37°C con agitación. Seguidamente se realizó la inducción con IPTG y se obtuvo la fuente enzimática de la forma indicada en V.3. La URO-D se determinó tanto en los constructos mutados como en el normal y el pKK, que contenía el pKK-223-3 sin el cDNA de la URO-D; se realizó también la determinación en clones sin inducir. Se realizaron entre 5 y 8 inducciones independientes con cada clon. Se incubaron 50 μ l de solución enzimática (1-2 mg/ml) en Buffer Fosfato de Na 0,067 M pH 7 GSH 2 mM EDTA 0,1 mM con Urogen III 4 μ M en un volumen final de 0,5 ml.

Los tubos previamente burbujeados con N_2 se incubaron 30 min a 37°C en anaerobiosis, oscuridad y agitación. La reacción se detuvo por agregado de 55 μ l de TCA 50%. Los porfirinógenos se oxidaron a porfirinas por iluminación con luz blanca 20 min. Finalmente las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm 1 min, se filtraron por filtros Whatman de 0,2 μ m de poro y se analizaron por HPLC según la técnica de Lim et al. (1983) como se describió previamente.

La actividad específica se determinó de la siguiente manera:

$\text{nmoles de Copro III formados} \times 2 \times 10^3 / \text{mg proteínas} = \text{nmol C/h mg prot.}$

Donde: 2: Para expresar la actividad por hora
10: Por la dilución de la enzima en el sistema de incubación (1/10)

La actividad residual (AR) se calculó mediante la siguiente expresión:

$$AR = (AS - AS[pKK]) / (AS[pKK-UROD] - AS[pKK]) \times 100$$

Donde: AS: Actividad específica del constructo
AS[pKK]: Actividad específica del pKK
AS[pKK-UROD]: Actividad específica del pKK-UROD

V.6 Estabilidad a 37 °C:

Para los constructos pKK-UROD y pKK-UROD-R332H se estudió la estabilidad térmica. Se realizó durante 180 minutos con 0,2 mg/ml de enzima diluida en Buffer Fosfato de Na 0,067 M pH 7 y se tomaron alícuotas a intervalos de 40 minutos, se mantuvieron en hielo y luego se midió la URO-D como ya se ha descrito.

VI REFERENCIAS

- Afonso, S.G.; Chinarro Familiar, S.; Stella, A.M.; Battle, A.M. del C.; Lenczner, M.J. & Magnin, P.H. (1985) Uroporfirinógeno decarboxilasa eritrocitaria y hepática en porfiria cutánea tardía. *Rev. Arg. Dermatol.* **66**: 12-24.
- Ausubel, F.M; Brent, R; Kingston, R.E; Moore, D; Seidman, J.G; Smith, J.A. & Struhl, K. (1991) *Current protocols in molecular biology*. Vol. 1 Supl. 15 J. Wiley and Sons, New York.
- Battle, A. & Grinstein, M. (1962) Porphyrin biosynthesis. Studies on the nature of a biosynthetic porphyrin and its identification with the so-called "208 porphyrin". *Biochem. Biophys. Acta* **57**: 191-194.

- Battle, A. M. del C; Wider, E. A. & Stella, A. M. (1978) A simple method for measuring erythrocyte porphobilinogenase, and its use in the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Int. J. Biochem.* **9**: 871-876.
- Battle, A.M. del C. & Magnin, P. (1988) Porfirias humanas y experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. *Acta Bioquím. Clin. Latinoamer. Sup. Nro. 2*.
- Beaudet, A.L. & Tsui, L. (1993) A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum. Mutat.* **2**: 245-248.
- Boyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**: 77-89.
- Cheng, S.; Fockler, C.; Barnes, W.M. & Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Nat. Acad. Sciences, USA.* **91**: 5695-5699.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- De Verneuil, H.; Sassa, S. & Kappas, A. (1984) Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **258**: 2454-2460.
- Gyllensten, U.B. & Erlich, H.A. (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7652-7656.
- Hayashi, K. (1992) PCR-SSCP: A single and sensitive method for detection of mutations in the genome DNA. *PCR Methods Appl.* **1**: 34-38.
- Lim, C.K.; Rideout, J.M. & Wright, D.J. (1983) Separation of porphyrin isomers by high performance liquid chromatography. *Biochem. J.* **212**: 435-440.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Michaud, J.; Brody, L.C.; Steel, G.; Fontaine, G.; Martin, L.S.; Valle, D. & Mitchell, G. (1992) Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithin α -aminotransferase gene. *Genomics* **13**: 389-394.
- Moore, D. & Labbe, R. (1964) A quantitative assay for urinary porphobilinogen. *Clin. Chem.* **10**: 1105-1110.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2766-2770.

Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T. & Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.

Saiki, R.F.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sambrook, J; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Seubert, A. & Seubert, S. (1983) *Curso sobre porfirinas y porfirias. Etiopatogenia, clínica y tratamiento (Parte práctica)*. CIPYP - FCEyN (UBA) y CONICET.

Sheffield, V.C; Beck, J.S; Kwitek, A.E; Sandstrom, D.W. & Stone, E.M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, **16**: 325-332.

Schoua, E.M. y Battle, A.M. del C. (1987) Índice de porfirinas plasmáticas IPP. Un método rápido para la caracterización de las porfirias. *Rev. Arg. Dermatol.* **68**: 79-85.

Tabor, S. & Richardson, C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4767-4771.

Warner, C.A; Yoo, H.W; Roberts, A.G. & Desnick, R.J. (1992) Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of exonic mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. *J. Clin. Invest.* **89**: 693-700.

Williams, J.F. (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **7** (7): 762-768.

With, T.K. (1975) Clinical use of porphyrin ester chromatography of urine and faeces. *Dan. Med. Bull.* **22**: 80-86.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

OPTIMIZACION DE LAS TECNICAS

I.1 DETERMINACION DE URO-D EN SANGRE

Dado que las porfirinas se retienen en el precipitado proteico y con el objeto de establecer una concentración de proteínas y condiciones que permitan una mayor recuperación de porfirinas con una eficiente detección de los productos de la reacción, para lo cual se estudió el efecto de las proteínas en la retención de porfirinas, deteniendo la reacción con TCA solo o con el agregado de DMSO que favorece la solubilización de las porfirinas. Se determinó la actividad de URO-D en distintas concentraciones de proteínas (3 a 200 mg/ml) de la solución enzimática, y luego de incubar una hora con 4 μ M de sustrato, en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, se detuvo la reacción por el agregado de TCA 50% o TCA 50%/DMSO (1:1) hasta concentración final de 5% en ácido, y se procedió a lavar el precipitado 1 a 3 veces con la misma solución diluida 10 veces. Se determinó la recuperación total de porfirinas por espectrofotómetro y la concentración de COPRO luego de analizar las muestras por HPLC y en base a la curva de calibración Area del pico vs. nmol/ml de COPRO III, como se indicó en Materiales y Métodos. En las Figura I.1 se observa que la recuperación de porfirinas cuando la reacción se detuvo con TCA, aún luego de acumular 3 lavados no supera los valores obtenidos con el agregado de DMSO sin efectuar lavados y en 200 mg/ml se recupera con 3 lavados el 20% mientras que con el agregado de DMSO se recupera más del 50%; asimismo, el efecto de retención de porfirinas por el precipitado proteico es muy evidente a concentraciones superiores a 100 mg/ml, y se reduce considerablemente al disminuir la concentración de

proteínas, llegando a minimizar las diferencias entre las formas de detención de la reacción y la realización o no de lavados. En la Figura I.2 se observa que con el agregado de DMSO, la recuperación de porfirinas es entre el 80 y 90% por debajo de 12 mg/ml sin efectuar lavados y que la recuperación con los lavados es significativa en concentraciones superiores a 25 mg/ml aunque a partir de 50 mg/ml y luego de 3 lavados no alcanza el 80%. Cuando se determinó la concentración de porfirinas se observó que la recuperación de porfirinas compensa el efecto de dilución por los lavados, a altas concentraciones de proteínas mientras que a bajas concentraciones es mayor el efecto de la dilución sobre la recuperación (Figura I.3). La concentración del producto final de la reacción no mostró variación en su concentración con los lavados entre 3 y 100 mg/ml y presentó un aumento lineal hasta 100 mg/ml (Figura I.4). En base a estos resultados se adoptó la combinación TCA/DMSO para detener la reacción sin efectuar lavados. Además la concentración de proteínas a usar se fijó entre 50 y 100 mg/ml ya que en estas condiciones la COPRO III obtenida es fácilmente detectable por HPLC mediante el método para porfirinas sin esterificar de Lim et al (1983). Este rango de concentración se alcanza diluyendo 3 veces los eritrocitos en buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7 de la forma indicada en Materiales y Métodos.

Para determinar el tiempo de incubación y la concentración de sustrato se utilizaron GR diluidos 3 veces. Se determinó la actividad enzimática en presencia de 4 μM de UROgen III entre 15 y 120 minutos, observando un aumento lineal en la formación de COPRO III hasta 75 minutos con una cantidad de producto suficiente para su detección en 60 minutos, por lo cual se utilizó como tiempo de incubación en las siguientes determinaciones (Figura I.5). Para ajustar la concentración de sustrato se determinó la actividad durante 60 min. en presencia de 0,05 a 5 μM de UROgen III (Figura I.6), observando saturación por encima de 1 μM , y manteniéndose constante hasta 5 μM , por lo cual se utilizó 4 μM de UROgen III para las determinaciones posteriores.

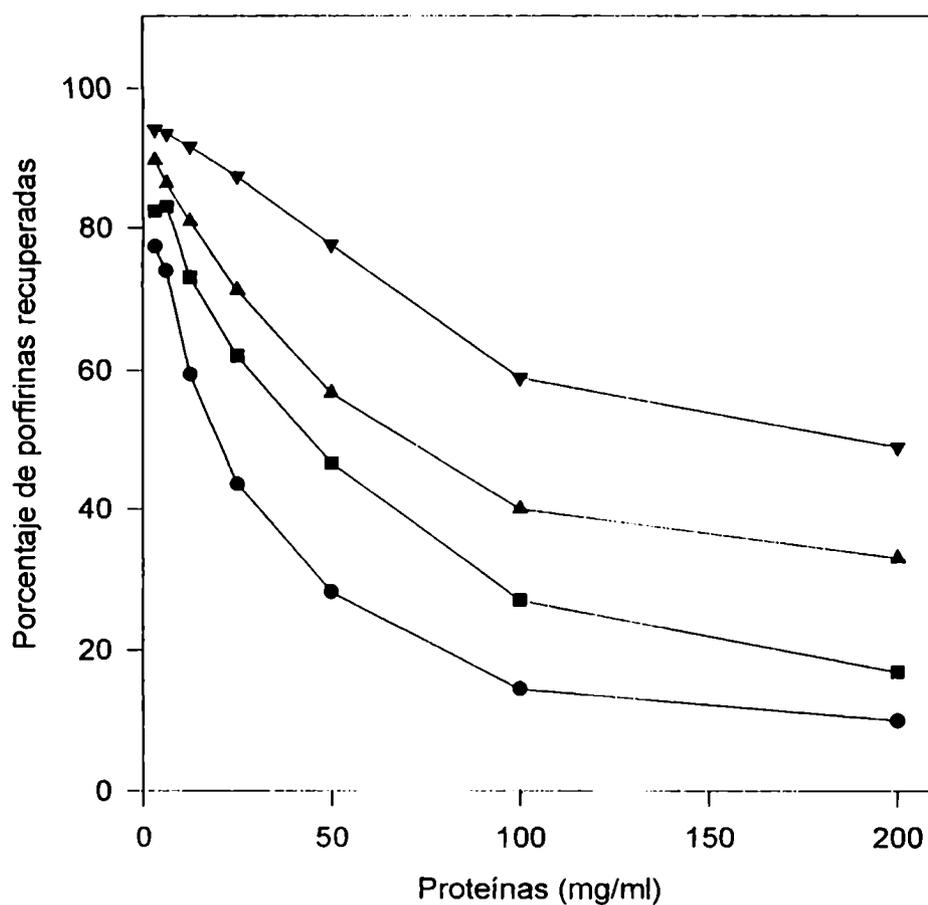


FIGURA I.1: Recuperación de porfirinas de proteínas precipitadas con TCA o con TCA/DMSO:(●) TCA (sin realizar lavados); (■) TCA (acumulando 3 lavados); (▲) TCA/DMSO (sin realizar lavados); (◄) TCA/DMSO (acumulando 3 lavados)

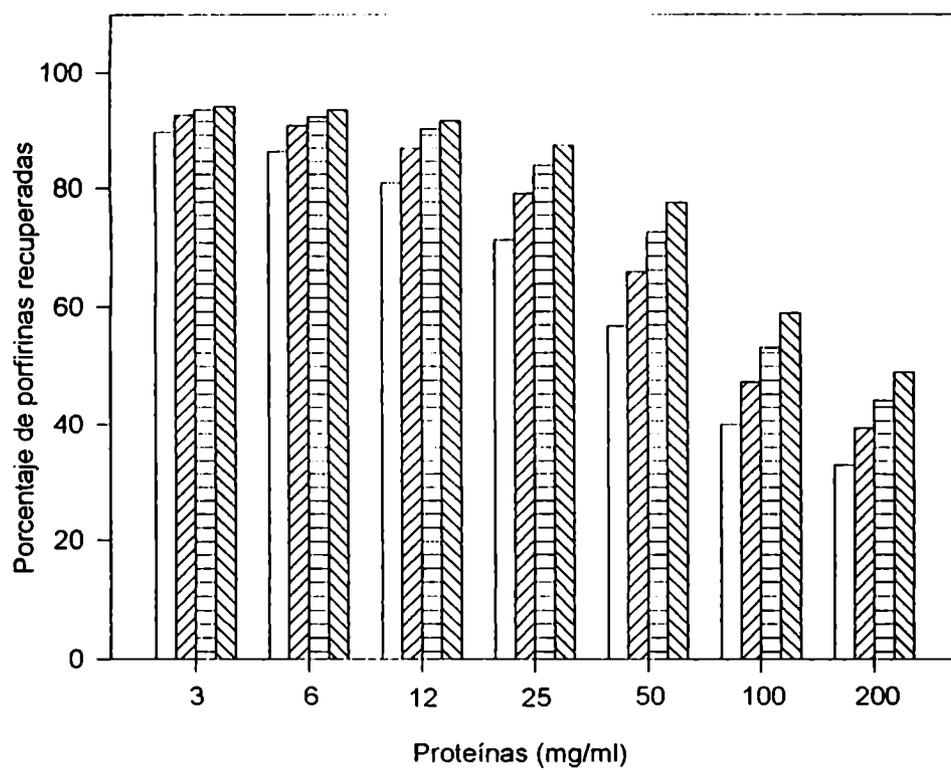


FIGURA 1.2: Recuperación de porfirinas de proteínas precipitadas con TCA/DMSO. Sin realizar lavados  y realizando 1 , 2  y 3 lavados .

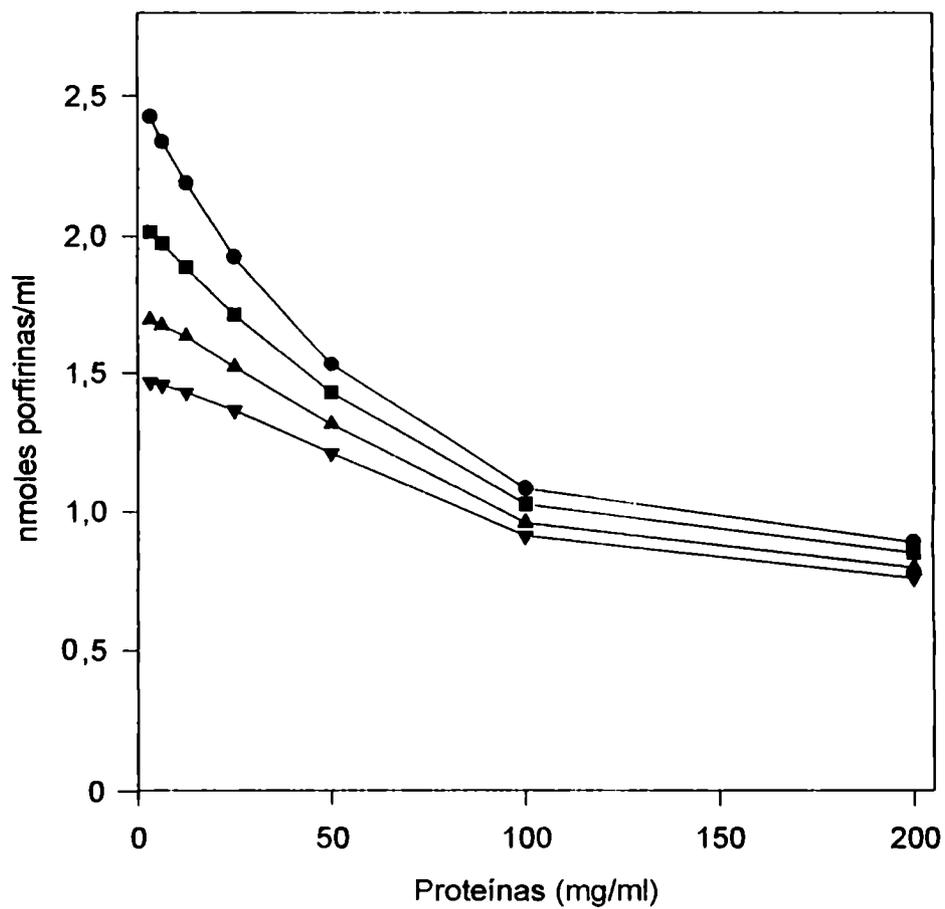


FIGURA I.3: Concentración de porfirinas recuperadas de proteínas precipitadas con TCA/DMSO: (●) sin realizar lavados; o acumulando (■) 1, (▲) 2, y (▼) 3 lavados

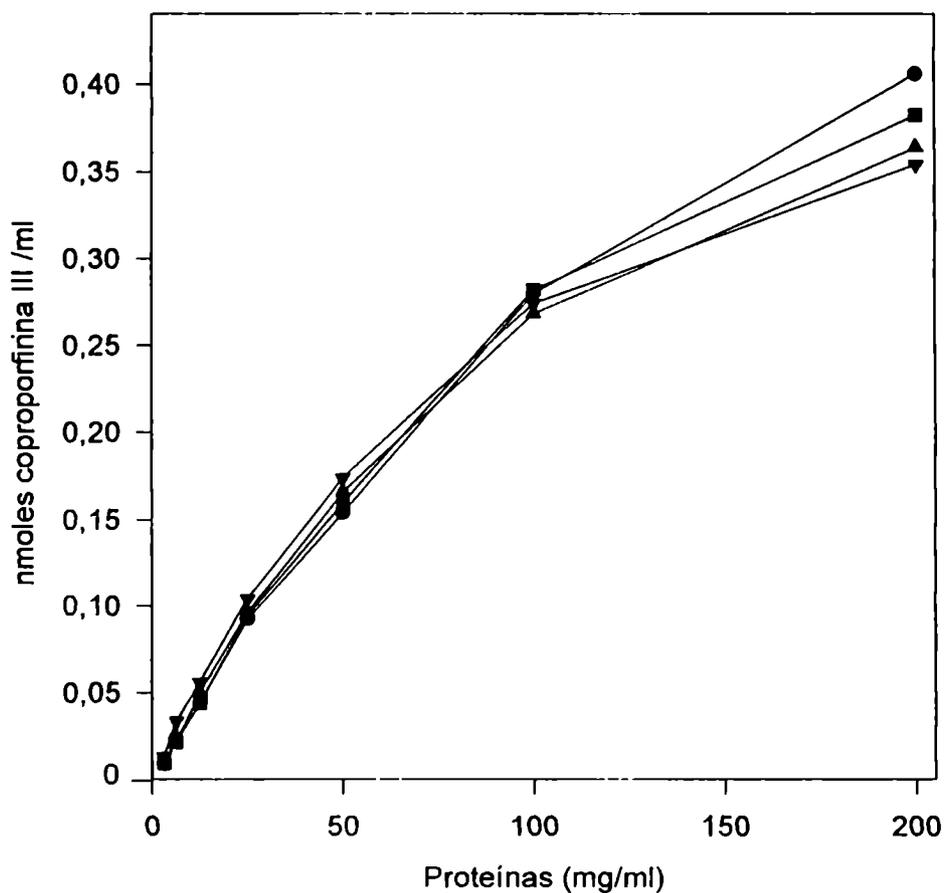


FIGURA I.4: Concentración de Coproporfirinas recuperadas de proteínas precipitadas con TCA/DMSO: (●) sin realizar lavados; o acumulando (■) 1, (▲) 2, y (▼) 3 lavados.

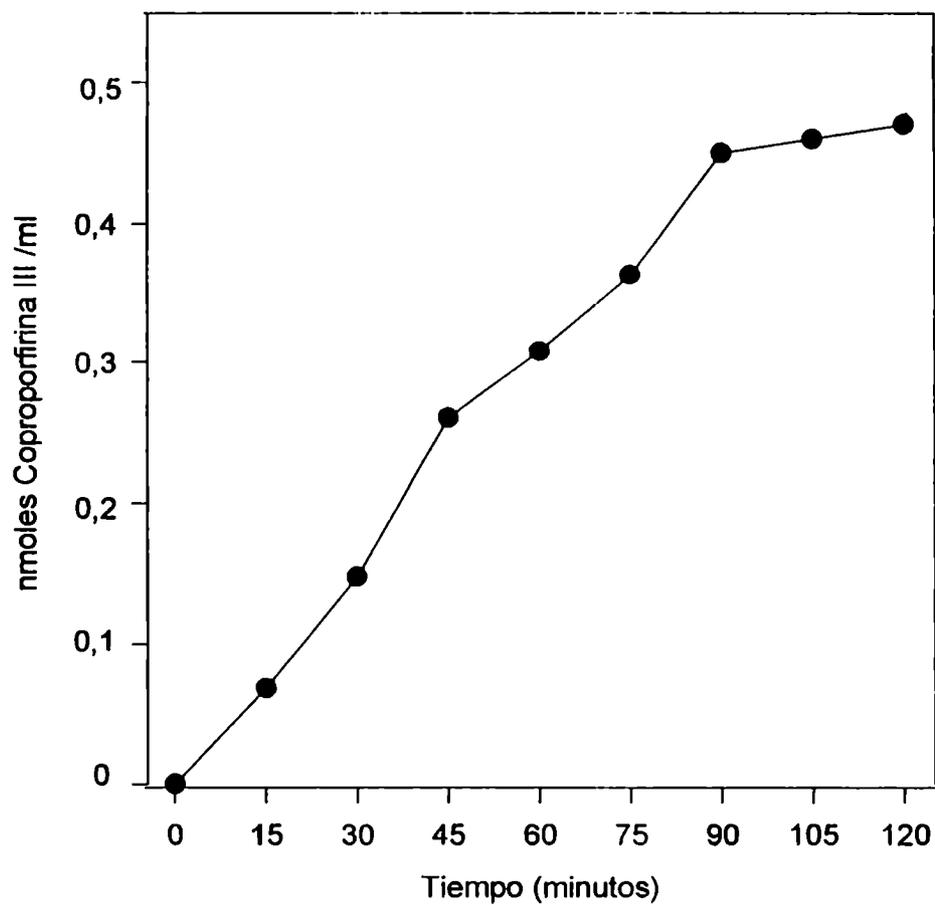


FIGURA 1.5: Actividad de URO-D eritrocitaria con 15 a 120 minutos de incubación.

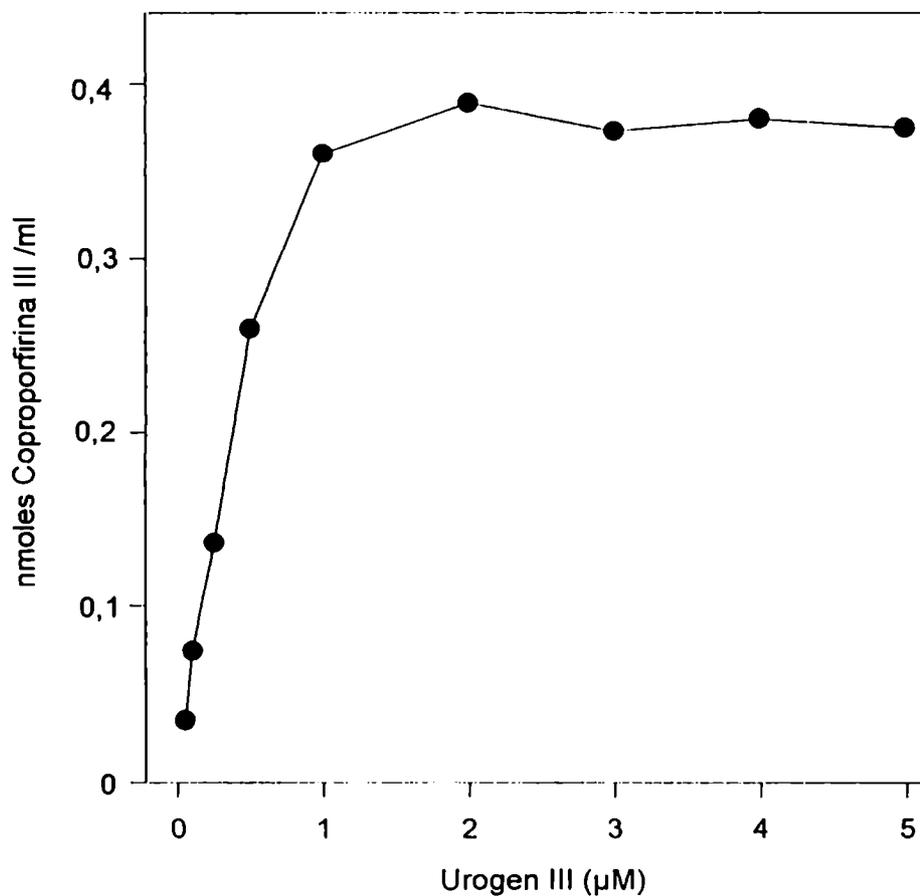


FIGURA I.6: Actividad de URO-D eritrocitaria con 0,05 a 5 μM de UROgen III.

Utilizando estas condiciones se realizó la medición de URO-D en los pacientes PCT para establecer los casos de PCT hereditaria. En la Figura I.7 se observa el perfil de HPLC de un individuo normal y de un paciente con PCT-F.

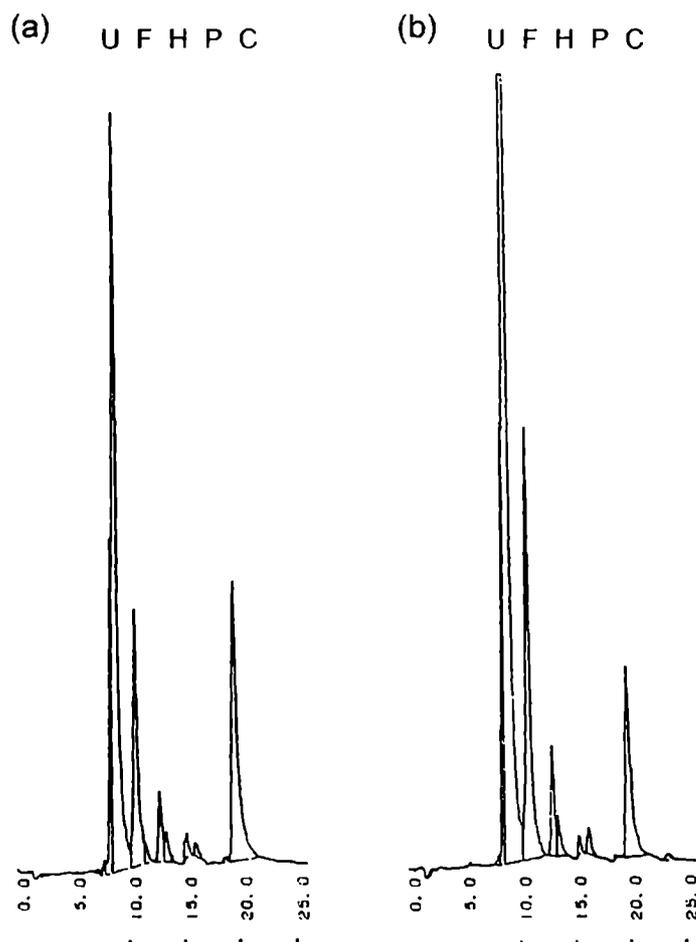


Figura 1.7: Perfil de HPLC del producto de actividad de URO-D a) Individuo normal; b) Paciente PCT-F. U: Uroporfirina; F: Firiaporfirina; H: Hexaporfirina; P: Pentaporfirina; C: Coproporfirina

I.2 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS

La obtención de linfocitos mediante ficoll y paque permitió un rápido procesamiento de las muestras con un rendimiento de entre 20 y 25 millones de células viables a partir de 15-20 ml de sangre entera. Este material fue utilizado para extraer tanto DNA como RNA, en este último caso, la extracción se realizó

inmediatamente después de obtener los linfocitos. Con el uso de RNA_{zol}TM B se obtuvo en promedio 20 µg de RNA con un grado de pureza entre 1,8 y 2 (R=260/280) y sin degradación como se observó al ensayarlo en un gel de agarosa 1% en presencia de formaldehído (Figura I.8). El DNA obtenido mediante digestión con proteinasa K y extracción con fenol cloroformo así como el obtenido mediante el kit Puregene (GENTRA) mostró una relación 260/280 de 1,7-1,9 y se obtuvieron alrededor de 0,2 mg de DNA a partir de 15-20 ml de sangre entera.

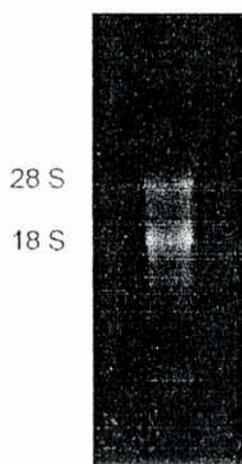


Figura I.8 Extracción de RNA total. Se indica la ubicación de los RNA ribosomales de 18 S y 28 S.

I.3 AMPLIFICACION DEL cDNA

El RNA se retrotranscribió utilizando oligo(dT)₁₂₋₁₈ como primer, obteniendo así el cDNA de los RNA poliadenilados. Finalizada la misma se realizó la amplificación del cDNA correspondiente al mRNA de la URO-D con primers diseñados para amplificar completamente la región codificante, uniéndose a sus extremos no codificantes, utilizando una temperatura de annealing adecuada para

estos primers y un tiempo de elongación basado en el fragmento a amplificar (casi 1,2 kb) y en que la enzima elonga 500 bases cada 30 seg. Se optimizó la concentración de Mg con el fin de lograr una buena amplificación sin obtener productos de amplificación inespecífica (Saiki et al, 1988; Williams, 1989), resultando óptimo 1,5 mM de MgCl₂ (Figura I.9). Este producto se purificó para su secuenciación; que se realizó utilizando primers sense y antisense para secuenciar todo el producto amplificado, en ambas direcciones. Cuando se empleó Taq DNA polimerasa, se empleó directamente ya que en la secuenciación se desnaturaliza cíclicamente el templado y cuando la enzima empleada fue Secuenasa, se llevó a cabo mediante un protocolo para templados de simple cadena, y se obtuvieron ambas simples cadenas mediante PCR asimétrica (Gyllensten & Erlich, 1988), ajustando la concentración de Mg, obteniendo resultados óptimos al utilizar 1 mM de MgCl₂ en ambas PCR (Figura I.10). Con estos procedimientos se obtuvo material para secuenciar el cDNA de la URO-D por cualquiera de estas dos enzimas. Aunque el RNA es una fuente más sensible a degradación que el DNA y requiere una retrotranscripción previa a la amplificación, su utilización como material para la búsqueda de mutaciones es muy conveniente ya que dadá su longitud, se puede secuenciar completamente la región codificante en el cDNA amplificado con sólo 6 reacciones con primers distribuidos cada 200 pb aproximadamente y con 2 horas de electroforesis. Además permite la rápida detección de mutaciones que causen defectos de splicing y la caracterización de su efécto en el mensajero.

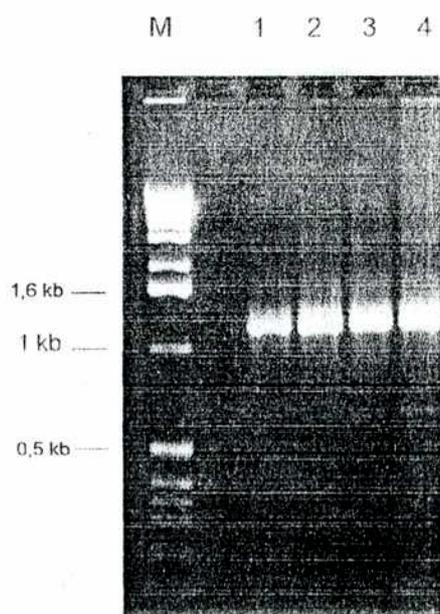


Figura I.9. RT-PCR de la URO-D, realizada con distintas concentraciones de $MgCl_2$ (1) 1 mM; (2) 1,5 mM; (3) 2 mM; (4) 3 mM. M: Marker 1 kb (GIBCO)

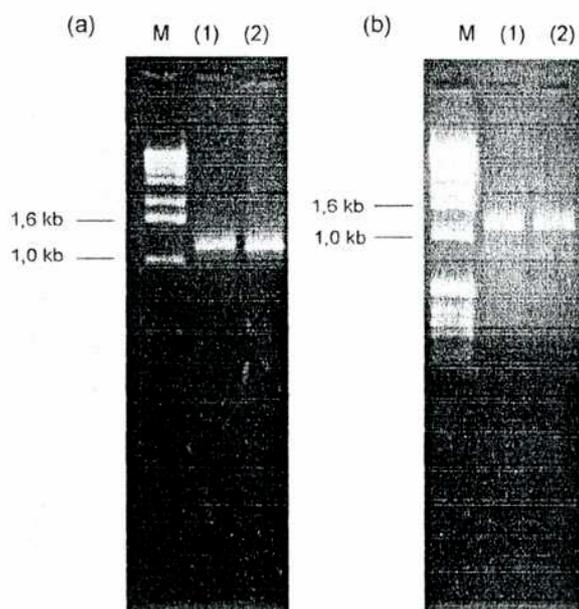


Figura I.10 PCR Asimétrica del cDNA de la URO-D, realizada con relación de primers U1:U2: (a) 100:1; (b) 1:100; y con distintas concentraciones de $MgCl_2$: 1 mM (Calles 1) y 2 mM (Calles 2). M: Marker 1 kb (GIBCO)

1.4 AMPLIFICACION DEL DNA GENOMICO

El gen de la URO-D comprende alrededor de 3 kb, para amplificarlo se desarrollaron dos estrategias alternativas, mediante cinco PCR cuyos productos superpuestos abarcan todo el gen, se diseñaron primers que se unan a exones y a los extremos 5' y 3' del gen, y se realizaron las amplificaciones optimizando la concentración de Mg, resultando óptimo 1 mM de $MgCl_2$ para las 5 PCR. (Figura I.11). Los primers se ubicaron en exones en lugar de intrones para minimizar la posibilidad de que su target esté ubicado en un polimorfismo, que en algunos pacientes podría conducir a la amplificación de un solo alelo. El gen completo se amplificó mediante una única PCR (Cheng et al, 1994) utilizando rTth DNA polimerasa, con primers diseñados en los extremos del gen, con un porcentaje de G+C del 50% y 27 bases, para poder utilizar una alta temperatura de annealing ($67^{\circ}C$), para impedir la amplificación inespecífica, se utilizó el sistema "Hot start" en la amplificación, separando la enzima de los primers hasta alcanzar la temperatura de desnaturalización, para evitar que la actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa de la enzima degrade el extremo 3' de los primers, y que ocurran amplificaciones inespecíficas. El tiempo de elongación en los primeros 16 ciclos se fijó en 3 minutos ya que la enzima elonga 1000 bases en 30-60 segundos; dicho tiempo se incrementó en los demás ciclos en 15 seg. por ciclo ya que el aumento en la cantidad de templado en los últimos ciclos hace que se necesite más tiempo para elongar todas las moléculas de templado. La concentración de $Mg(OAc)_2$ se ajustó entre 0,7 y 1,5 mM con diferencias de 0,2 mM, obteniendo producto sólo entre 1,1 y 1,5 mM, siendo óptima 1,5 mM (Figura I.12). Mediante estas estrategias se obtuvo material para secuenciar cada exón con las regiones intrónicas flanqueantes así como el promotor y las regiones no codificantes, lográndose de esta forma la secuenciación de todo el gen. con los primers indicados en la tabla IV de Materiales y Métodos. La estrategia de amplificar todo el gen en una única PCR es muy útil para detectar grandes deleciones en el gen, que pueden no ser detectadas cuando el mismo se amplifica por partes.

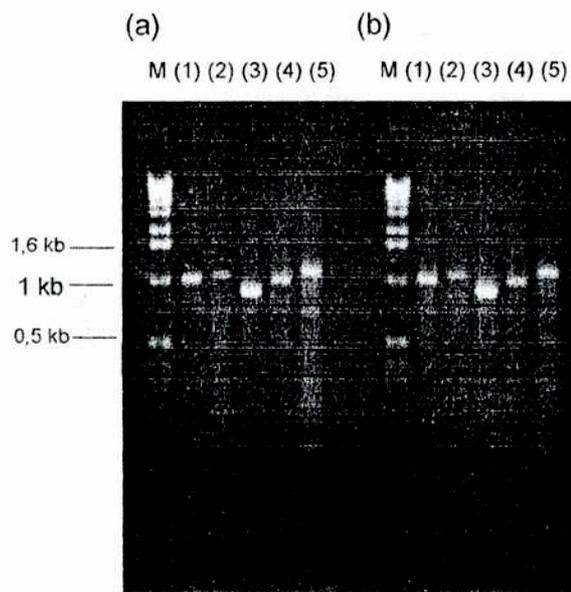


Figura I.11 Gen de la URO-D amplificado en 5 fragmentos superpuestos. Calles (a): 1 mM de $MgCl_2$; Calles (b): 2 mM $MgCl_2$; M: Marker 1 kb (GIBCO). (1): PCR 1; (2): PCR 2; (3): PCR 3; (4): PCR 4; (5): PCR 5.

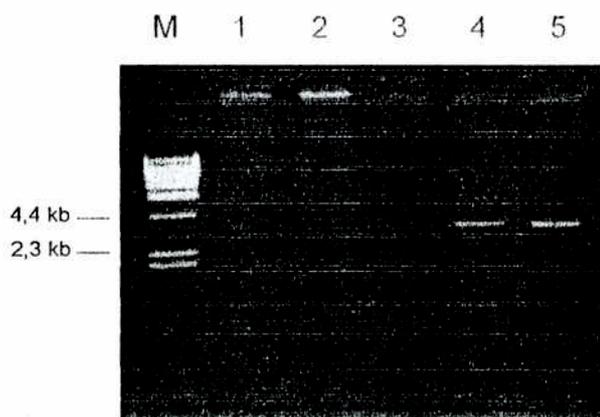


Figura I.12 Gen de la URO-D amplificado en una única PCR, con distintas concentraciones de $Mg(OAc)_2$. (1) 0,7 mM; (2) 0,9 mM; (3) 1,1 mM; (4) 1,3; (5) 1,5 mM M: Marker λ DNA *Hind III* Digest (Biolabs).

1.5 SSCP

Con la finalidad de realizar la detección rápida de la mutación 29insA, se realizó la amplificación de un fragmento comprendido entre la región 5' inmediatamente antes del codón ATG iniciador de la traducción y el comienzo del intrón 1. Este fragmento de casi 120 pb se amplificó con 20 segundos de elongación en 1 y 2 mM de $MgCl_2$, resultando óptima la primera concentración (Figura I.13). Se eligió un fragmento de tamaño reducido ya que el SSCP es más sensible en fragmentos de alrededor de 100 pb (Sheffield et al. 1993); De las cuatro condiciones clásicas de electroforesis para esta técnica: a temperatura ambiente o a 4°C, con y sin glicerol (Orita et al, 1989), se realizó a 4°C sin glicerol ya que es una de las condiciones de mayor sensibilidad en la detección, además se buscó detectar una inserción, y en general tanto las inserciones como las deleciones se detectan en las cuatro condiciones. Con un tiempo de electroforesis de 3 a 3,5 horas se detectó perfectamente en pacientes portadores, dos bandas por cada simple cadena, además, en estos mismos pacientes se pudo observar en las dobles cadenas, más de una banda, debido a la formación de heteroduplex entre cadenas normales y mutantes (White et al, 1992) (Figura I.14).

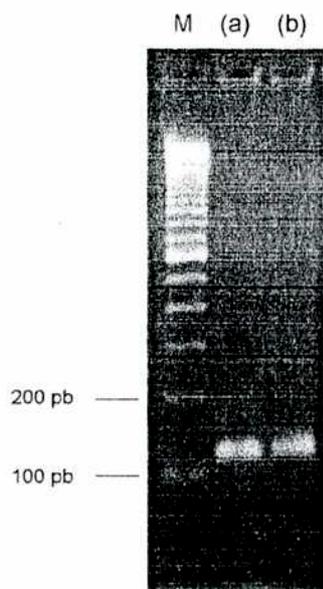


Figura I.13 Fragmento de 118 pb que incluye íntegramente al exón 1, amplificado con distintas concentraciones de $MgCl_2$ (a) 1 mM; (b) 2 mM M: Marker 100 pb (GIBCO).

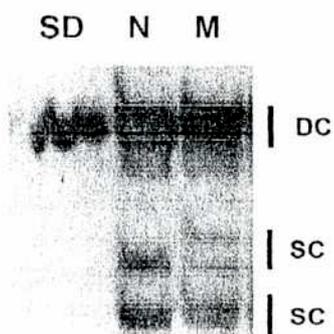


Figura I.14 Análisis por PCR-SSCP de un fragmento de 118 pb, la electroforesis se realizó a 4°C en geles de poliacrilamida no desnaturizantes y sin glicerol. SD: Fragmento sembrado sin desnaturalización; N: Individuo normal; M: Paciente portador de la mutación 29insA. DC: Doble cadena; SC: Simple cadena.

I.6 ESTUDIOS DE EXPRESION

DETERMINACION DE URO-D EN BACTERIAS

Para la determinación de URO-D en *E. coli* MJ 109 se adaptó el sistema de determinación en sangre (I.1). A partir de un stock de bacterias conteniendo ya sea el pKK o el pKK-UROD se hizo un crecimiento O/N, luego se dejó crecer un inóculo hasta fase logarítmica, se realizó un crecimiento de 3 horas con y sin IPTG, y se procedió a cosechar las bacterias como se indicó en Materiales y Métodos, obteniendo entre 1 y 2 mg de proteínas por mililitro, en 250 μ l. Se determinó la actividad incubando durante 60 min en presencia de 4 μ M de UROgen III y la reacción se detuvo por agregado de TCA hasta concentración final del 5% en ácido; sin DMSO ya que la cantidad de proteínas proveniente de lisados bacterianos es suficientemente baja como para producir un efecto apreciable de atrapamiento de porfirinas en el precipitado. Se compararon las actividades obtenidas en bacterias conteniendo el pKK o el pKK-UROD crecidas con y sin IPTG (Tabla I.1). La actividad en bacterias portadoras del pKK-UROD fue más de 40 veces mayor que en las portadoras del pKK, y la misma se incrementó 3 veces cuando habían crecido en presencia de IPTG.

Tabla I.1. Actividad de URO-D en bacterias

	pKK	pKK-UROD
sin IPTG	0,138 \pm 0,032	5,922 \pm 2,723
con IPTG	0,151 \pm 0,045	18,334 \pm 4,210

Actividades específicas (n = 3)

Para determinar la concentración de sustrato y tiempo de incubación se utilizaron bacterias portadoras del pKK-UROD y provenientes de crecimientos en presencia de IPTG. Se incubó con 4 μM de sustrato durante distintos tiempos (15 a 120 minutos) observándose linealidad hasta los 75 minutos, y una cantidad suficiente de producto para su detección en 30 minutos de incubación, por lo cual se adoptó este tiempo para las siguientes determinaciones (Figura I.15). Luego se ajustó la concentración de sustrato incubando durante 30 minutos en presencia de 0,05-5 μM , observando un aumento en la formación de Copro hasta 2 μM (Figura I.16), adoptándose 4 μM para las determinaciones siguientes.

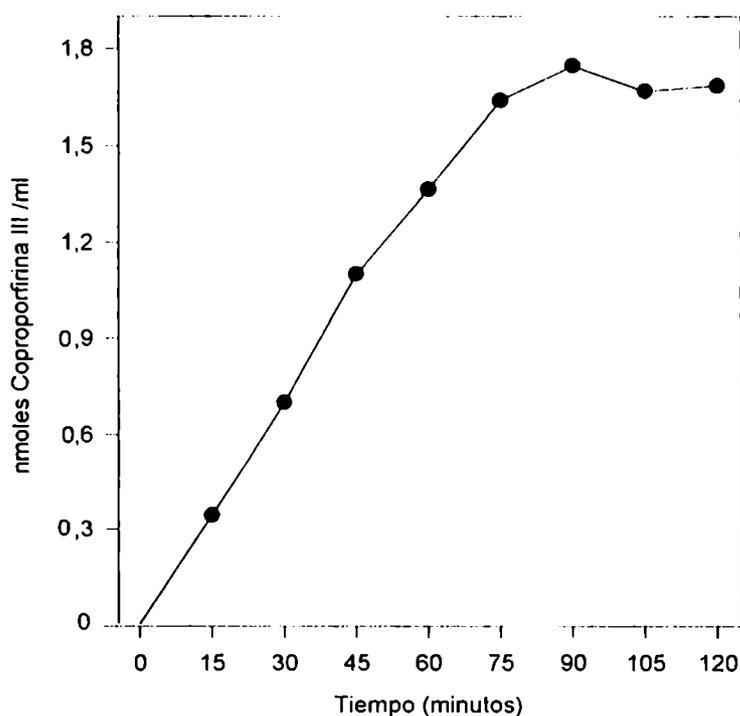


Figura I.15 Actividad de URO-D durante 15 a 120 minutos, en bacterias portadoras del plásmido pKK-UROD, crecidas en presencia de 5 mM de IPTG. Los datos representan el valor promedio de 2 inducciones independientes.

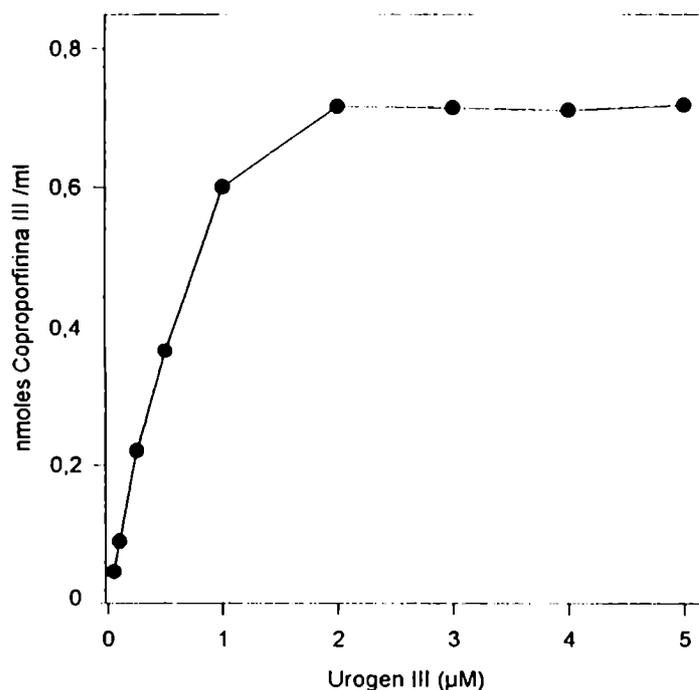


Figura 1.16 Actividad de URO-D con 0,05 a 5 μM de sustrato, en bacterias portadoras del plásmido pKK-UROD, crecidas en presencia de 5 mM de IPTG. Los datos representan el valor promedio de 2 inducciones independientes.

CONSTRUCCION DE LOS MUTANTES

Las mutaciones missense encontradas fueron introducidas en el pKK-UROD por intercambio de cassette. Los cassettes mutantes fueron obtenidos por mutagénesis sitio dirigida por PCR utilizando al constructo normal como templado. Las PCR se realizaron utilizando escasa cantidad de templado (0,3 ng) y condiciones restrictivas, con 65°C de annealing y empleando el sistema hot start, para evitar amplificaciones inespecíficas. Los primers se diseñaron de manera tal

que luego de las digestiones se liberen fragmentos menores a 50 pb para facilitar su eliminación purificando el producto de digestión por columnas de purificación de productos de PCR. El cassette generado debía contener la mutación a introducir y sitios de corte de enzimas de restricción para poder introducirlo en el vector, por lo tanto las mismas no podían cortar al plásmido pKK223-3 y debían cortar al ORF de la URO-D en no más de dos sitios; además para facilitar la construcción del cassette, uno de los sitios de restricción a usar tenía que estar relativamente cerca de la mutación para abarcar ambos puntos en un solo primer. Esto se pudo hacer sólo en las mutaciones N304K y R332H (Figura I.17), en esta última dado que se ubica cerca del final del ORF, en el exón 10 y no había ningún sitio de restricción utilizable en la secuencia de la URO-D downstream a la mutación, se diseñó un primer antisense en el vector, inmediatamente después del sitio para Hind III del polilinker, luego de secuenciar esa región con el primer S-7 (Tabla 1 de Materiales y Métodos) cuyo target es el exón 10 y tiene dirección sense. Para las mutaciones M165R y L195F no se pudo utilizar esta estrategia porque los sitios de restricción utilizables más cercanos a la mutación se encontraban a unas 200 pb; por lo tanto se realizaron dos pasos de PCR, en el primero se generaron dos fragmentos cada uno con la mutación introducida y un sitio de restricción, y en el segundo se logró un solo producto que contenía la mutación y los dos sitios de corte para las enzimas de restricción a usar (Figura I.18)

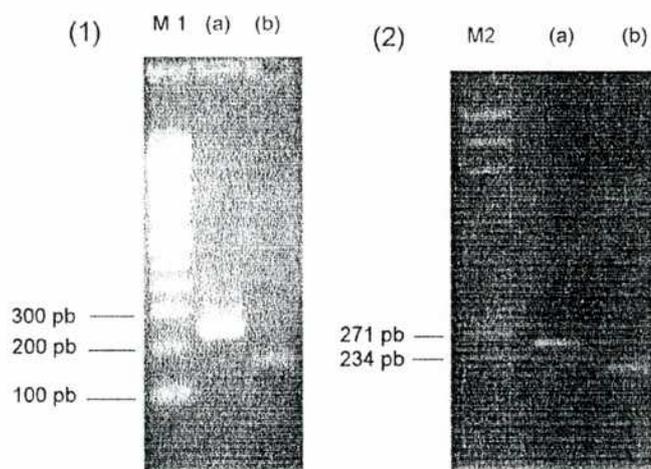


Figura I.17 (1) N304K: Producto de amplificación de un fragmento de 238 pb; (b) Dicho fragmento luego de digerirlo con *Bcl* I y *Nsi* I. (2) R332H: (a) Producto de amplificación de un fragmento de 258 pb; (b) El mismo fragmento luego de digerirlo con *Nsi* I y *Hind* III. M1: Marker 100 pb (GIBCO); M2: Marker ϕ X174 RF DNA *Hae* III Digest (Biolabs).

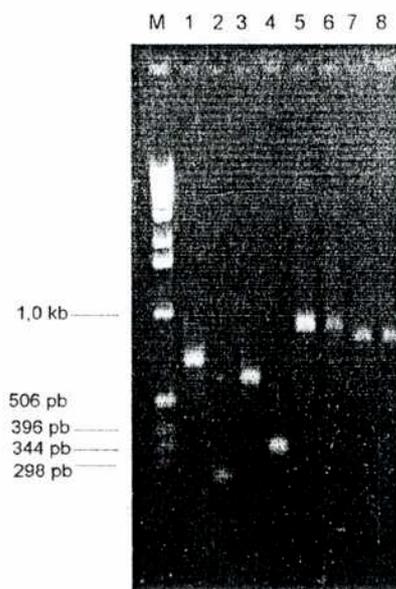


Figura I.17 M165R: Productos de amplificación de la PCR 1 (1) 690 pb y (2) 245 pb L195F: Productos de amplificación de la PCR 1 (3) 610 pb y (4) 334 pb. Productos de la PCR 2 (915 pb): (5) M165R y (6) L195F; (7 y 8) Ambos fragmentos luego de digerirlos con *Kpn* I y *Hind* III. M: Marker 1 Kb (GIBCO).

I.7 REFERENCIAS

Cheng, S.; Fockler, C.; Barnes, W.M. & Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **91**: 5695-5699.

Gyllensten, U.B. & Erlich, H.A. (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7652-7656.

Lim, C.K.; Rideout, J.M. & Wright, D.J. (1983) Separation of porphyrin isomers by high performance liquid chromatography. *Biochem. J.* **212**: 435-440.

Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T. & Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.

Saiki, R.F.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sheffield, V.C; Beck, J.S; Kwitek, A.E; Sandstrom, D.W. & Stone, E.M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*, **16**: 325-332.

White, M.B; Carvalho, M; Derse, D; O'Brien, S. & Dean, M. (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*, **12**: 301-306.

Williams, J.F. (1989) Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **7** (7): 762-768.

CAPITULO II

PORFIRIA CUTANEA TARDIA EN LA ARGENTINA. ESTUDIOS BIOQUIMICOS

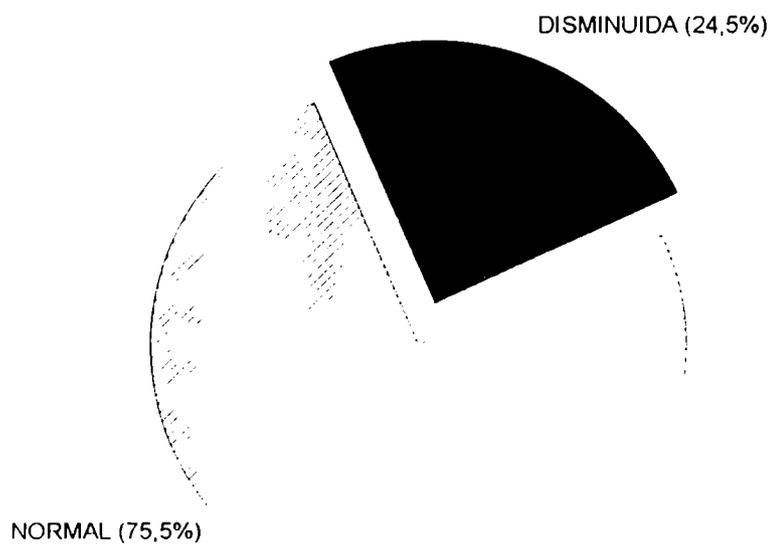
La PCT es la porfiria más común en la Argentina y en los últimos 20 años se han diagnosticado en el CIPYP 844 casos de PCT. Los pacientes fueron derivados principalmente de Hospitales Municipales, Nacionales y Provinciales de todo el país.

De esos 844 casos, 171 correspondieron al sexo femenino y 673 al masculino, de manera que la relación mujer a hombre es de 1 a 4. El 30% de los pacientes (255) concurren sólo una vez al Centro, mientras que el 70% (589) lo ha hecho periódicamente desde su primera concurrencia, durante y luego del tratamiento.

Teniendo en cuenta que debido a la avanzada edad del desencadenamiento de esta porfiria en la mayoría de los pacientes, un gran número de ellos ha fallecido y que gran parte de los pacientes viven en la provincia de Buenos Aires o en otras provincias de manera que las muestras de orina para realizar los controles bioquímicos llegan por correo, sólo fue posible citar un tercio de los 589 pacientes con PCT para realizar los estudios bioquímicos y poder establecer si eran portadores de porfiria hereditaria (PCT-F) o adquirida (PCT-A). El diagnóstico de PCT se realizó en base a la determinación del índice de porfirinas plasmáticas (IPP), porfirinas totales urinarias y su patrón de excreción.

II.1-MEDICION DE URO-D EN PACIENTES CON PCT

Se determinó la actividad de URO-D eritrocitaria en 106 pacientes diagnosticados como PCT familiarmente no relacionados, cuyas edades variaron entre 7 y 74 años, de los cuales 30 eran de sexo femenino y 76 de sexo masculino (Figura II.1).



.Figura II.1: Actividad de la URO-D en sangre de PCT

En la Tabla II.1 se muestran los rangos de los valores obtenidos en los 844 casos de PCT estudiados, característicos de este tipo de porfiria.

Tabla II.1: Determinaciones bioquímicas en pacientes con PCT

	IPP ($\lambda=618$ nm)	PORFIRINAS URINARIAS					
		$\mu\text{g}/24$ h	% U	% F	% H	% P	% C
PCT	1,35-9,00	1.401-13.950	45-55	30-40	5-10	5-10	7-15
VN	$\leq 1,30$	≤ 250	-	-	-	-	100

De los datos obtenidos se puede concluir que el 24,5% de la población porfírica estudiada son portadores de la PCT-F y el 75,5% restante son PCT-A.

Al realizar un estudio retrospectivo para identificar las familias en las cuales había más de un miembro diagnosticado como PCT, resultó que en 24 de ellas, 55 miembros presentaban la enfermedad manifiesta observándose la siguiente distribución:

Nro. de familias	Nro. de miembros con PCT
19	2
3	3
2	4

En el resto de las familias, según los datos disponibles, aparentemente sólo el propósito era portador de la PCT.

Cuando se midió la URO-D en algunos de estos pacientes, se encontró que en 2 de estas familias la enzima eritrocitaria era normal, lo que indicaría que no se trataría de una PCT-F. Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados por Roberts et al., 1988; D'Alessandro et al., 1989) y señalan la importancia de esta medición para identificar el tipo de PCT.

II.2-ASOCIACION PCT-VIRUS DE HEPATITIS

La PCT está asociada generalmente a distintos grados de daño hepático y se ha propuesto que el virus de la hepatitis C (HCV) juega un rol importante en la hepatopatía porfírica (Fargion et al., 1992).

La prevalencia del HCV en nuestra población porfírica es del 35% (n:108, 25 mujeres y 83 hombres, cuyas edades oscilaban entre 24 y 74 años). Este porcentaje se ubicó en un punto intermedio entre los valores hallados en Italia, España y Francia (71-91%) (Ferri et al., 1993; Lacour et al., 1993; Mar De Castro et al., 1993; Cribier et al., 1995; López Morante et al., 1995; Navas et al., 1995), y lo encontrado en Alemania, Irlanda, Holanda y Australia (8-20%) (Siersema et al., 1992; Murphy et al., 1993; Gibson et al., 1995; Stolzel et al., 1995).

II.2.1 Estudios del metabolismo del hemo en pacientes no porfíricos con hepatopatías

Para establecer si existe alguna alteración del camino metabólico del hemo en pacientes no porfíricos con otras alteraciones hepáticas, se determinaron algunos parámetros bioquímicos en 20 pacientes con distintos tipos de hepatopatías (10 mujeres y 10 varones; edad entre 29 y 62 años) (Tablas II.2 y II.3.).

Tabla II.2: Pacientes con distintos tipos de hepatopatías

PACIENTE	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO
LV	45	M	Hepatitis crónica por HCV
LOJ	31	M	Hepatitis crónica por HCV
VIM	58	F	Hepatitis crónica por HCV
LON	57	M	Hepatitis crónica por HCV
GA	60	F	Hepatitis crónica por HCV
JE	54	F	Hepatitis crónica por HCV
GJ	50	M	Hepatitis crónica por HCV
GAF	48	F	Hepatitis crónica por HCV
ROP	29	M	Hepatitis crónica por HCV
FD	56	F	Hepatitis crónica por HCV
OF	34	M	Hepatitis crónica por HCV
CS	35	F	Hepatitis crónica por HCV
DE	50	F	Hepatitis crónica por HCV
CM	32	M	Hepatitis crónica por HCV
SZ	39	F	Hepatitis autoinmune
CJ	40	M	Hepatitis alcohólica
DSC	59	M	Cirrosis por HCV
CB	53	F	Cirrosis por HCV
MO	62	M	Esteatosis hepática
MO	62	M	Esteatosis hepática

Uno de estos pacientes (LON, HIV (+)) resultó ser un típico caso de PCT-A sin diagnóstico previo de porfiria. Debido a la gravedad de su cuadro hepático (hepatocarcinoma), el paciente se encontraba en lista de espera para trasplante de hígado, el cual se realizó el 12/10/95.

Tabla II.3: Determinaciones bioquímicas en pacientes con hepatopatías:

PACIENTE	ALA-D (U/ml GR)	DEAMINASA (U/ml GR)	IPP ($\lambda=618$ nm)	PORF URIN ($\mu\text{g}/24$ h)	URO-D (%)
LV	0,578	90,97	1,22	159	95
LOJ	0,527	88,84	1,25	31	91
VIM	0,384	94,39	1,29	39	94
LON	1,451	109,70	4,83	6.505	98
GA	1,078	64,64	1,22	172	96
JE	1,226	69,76	1,24	57	89
GJ	1,402	76,04	1,10	92	92
GAF	1,529	92,70	1,20	118	95
ROP	1,990	76,56	1,43	58	97
FD	1,596	99,95	1,31	59	90
OF	1,865	68,68	1,22	98	98
CS	2,260	67,41	1,25	159	98
DE	1,124	68,40	1,30	174	90
CM	1,238	59,34	1,20	112	95
SZ	1,444	80,21	1,33	46	93
CJ	0,870	53,23	1,28	72	88
DSC	2,002	256,84	1,25	342	102
CB	1,627	95,16	1,20	176	96
MO	1,241	68,86	1,12	39	93
Valor normal	0,794 \pm 0,247 (F) 0,688 \pm 0,232 (M)	81,51 \pm 11,96 (F) 73,13 \pm 13,62 (M)	\leq 1,30	20-250	4,17 \pm 0,61

En las Figuras II.2 y II.3 se muestra el seguimiento de este paciente antes y después del trasplante. Inicialmente el paciente fue medicado con ácido Ursodeoxicólico (URSO) para mejorar la función hepática; en 30 días, como resultado de la administración de esta droga, se logró una reducción del 50% en la excreción de porfirinas urinarias (Figura II.2). A los 10 días del trasplante, las porfirinas urinarias estaban dentro de los valores normales en tanto que las porfirinas plasmáticas se normalizaron a los 3 meses de realizado el mismo (Figura II.3).

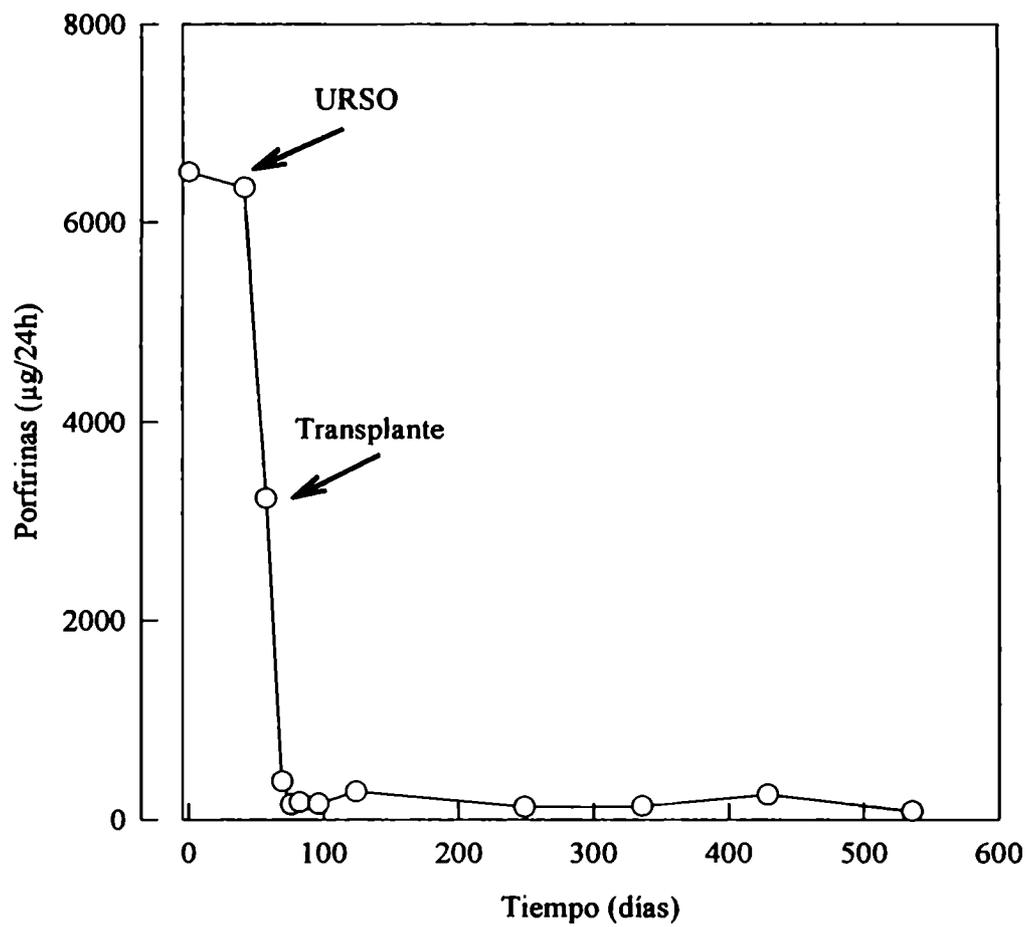


Figura II.3: Evolución de los niveles de porfirinas urinarias en un paciente PCT-HCV(+)

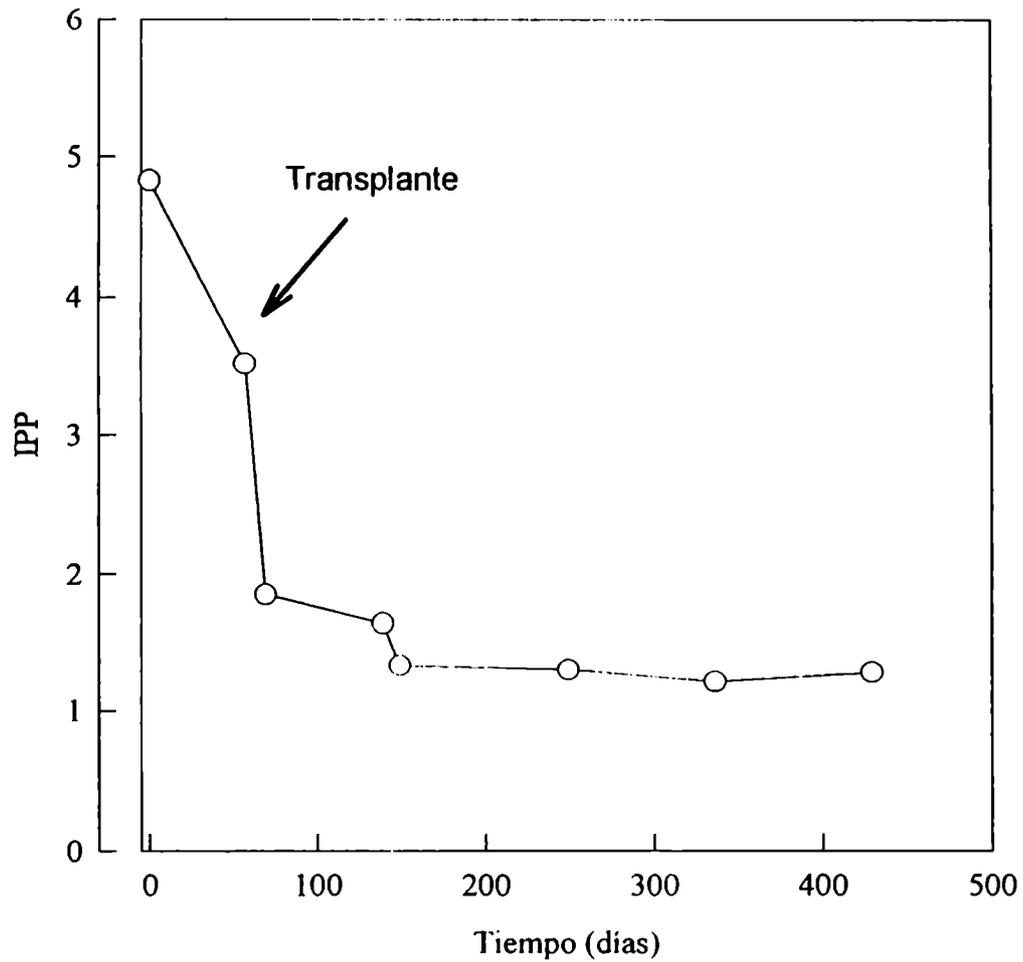


Figura II.4: Evolución de los niveles de porfirinas plasmáticas en un paciente PCT-HCV(+) luego del tratamiento

Como consecuencia del transplante, en este paciente, portador de una PCT adquirida, confirmada por medición de la URO-D eritrocitaria, se normalizó completamente el cuadro clínico y bioquímico, lográndose su remisión.

Dado que es común que los pacientes transplantados vuelvan a infectarse con el virus C, si el HCV o la hepatopatía asociada fueran los responsables del desencadenamiento de la PCT sería probable que un paciente re infectado con HCV desarrollara nuevamente la porfiria. En el caso del paciente LON, que acabamos de describir, a pesar de que se re infectó con el virus C, al realizar el primer control serológico al mes de realizado el trasplante, las porfirinas urinarias y plasmáticas estaban en los valores normales y aún se mantienen en ese rango hasta la fecha (Tabla II.5).

Tabla II.5: Determinaciones bioquímicas en el paciente LON PCT-HCV(+)

FECHA	IPP ($\lambda=618$ nm)	PORFIRINAS URINARIAS					
		$\mu\text{g}/24$ h	% U	% F	% H	% P	% C
14/08/95	4,83	6.505	47	32	9	7	5
05/11/97	1,30	67	-	-	-	-	100
VN	$\leq 1,30$	≤ 250	-	-	-	-	100

Otro de estos pacientes (OSC, HCV(+)) presentó un valor de Deaminasa 4 veces superior al normal, con porfirinas urinarias sólo ligeramente aumentadas (Tabla II.3). Un estudio bioquímico más amplio del mismo paciente mostró una PBGasa también aumentada y un perfil de porfirinas urinarias anormal (Tabla II.6). Se trata de un paciente portador de β -Talasemia menor; se ha publicado que en esta enfermedad el metabolismo del hemo se encuentra alterado (Bannerman, 1964), nuestros datos coinciden con otro estudio en el cual se ha descrito que la mayoría de los pacientes con β -Talasemia presentan una excreción de porfirinas urinarias levemente incrementada (Lyberatos et al., 1975).

Tabla II.6: Determinaciones bioquímicas en un paciente con β -Talasemia e infección por HCV(+)

	PBGasa (U/ml GR)	PTS (μ g/100 ml GR)	PORFIRINAS URINARIAS				
			% U	% F	% H	% P	% C
Paciente	179,29	110	9	4	-	2	85
VN	34,63 \pm 8,22	150 \pm 40	-	-	-	-	100

II.2.2 Determinación de URO-D en pacientes PCT con estudio hepático

En 108 pacientes portadores de una PCT, se realizaron estudios hepáticos en el Hospital Muñiz, en 60 de ellos se determinó la actividad enzimática de la URO-D eritrocitaria para clasificar la porfiria en hereditaria o adquirida y tratar de establecer una correlación entre el tipo de porfiria, el daño hepático o la infección por HCV. De estos 60 pacientes, 15 eran PCT-F y 45 PCT-A.

De la Tabla II.7 y de la Figura II.5 se puede inferir que si bien el HCV es el principal responsable de la hepatopatía en los pacientes PCT, con una incidencia mayor en la PCT-A que en la PCT-F, hay asimismo un índice relativamente alto de hepatitis criptogénica y también participación de HBV y HDV, además de otros tipos de daño hepático. Esto sugiere que el virus C tiene un papel importante pero no absoluto en la génesis de las hepatitis crónicas. Por lo tanto, en nuestra población PCT, más allá de la participación de un determinado agente etiológico, la hepatopatía *per se* sería la que en un huésped susceptible provoca el desarrollo de la porfiria.

Tabla II.7: Daño hepático según el tipo de PCT

	PCT-A (n)	PCT-F (n)
Hígado normal	16	7
Hepatitis por HCV	20	3
Hepatitis criptogénica	3	4
Esteatohepatitis	2	-
Fibrosis	1	-
Hepatitis por HBV y HDV	1	-

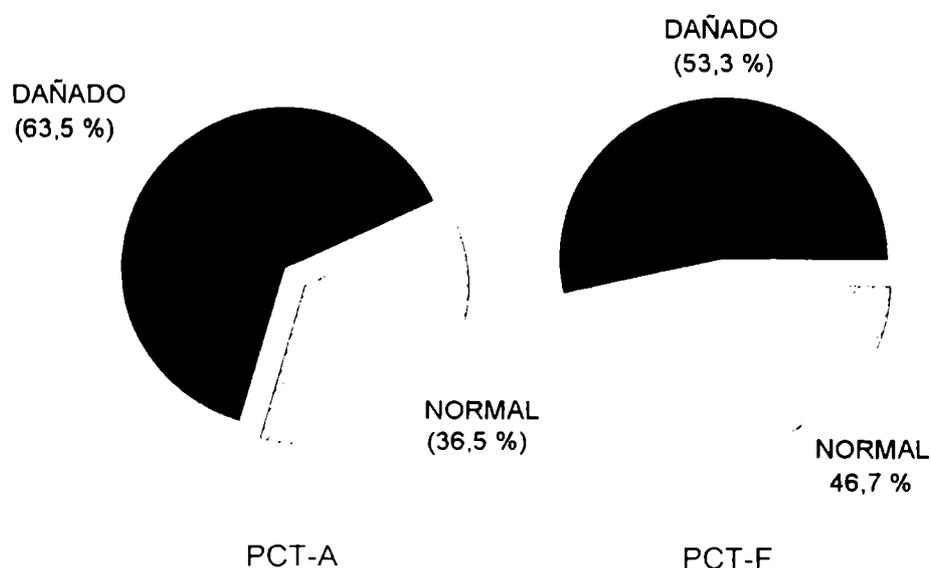


Figura II.5: Distribución del estado del hígado normal y dañado en pacientes con PCT-A y PCT-F

Además, la prevalencia de la infección por HCV en nuestra población es: PCT-A = 44,4%; PCT-F = 20,0 %. Estos resultados están de acuerdo con Quecedo et al. (1966) quienes encuentran una asociación PCT-

A:HCV(+) del 67,2% y PCT-F:HCV(+) del 47,3%, aunque estos autores no han determinado sistemáticamente la URO-D eritrocitaria.

Si bien son pocos los otros estudios realizados en los cuales se establece una diferencia entre la PCT-A y la PCT-F, el grupo de Herrero encontró un 79% de asociación HCV-PCT en una población de 75 pacientes con PCT-A y no detectaron el virus en 5 pacientes con PCT-F (Herrero et al., 1993). Cribier et al. (1995) hallaron una prevalencia de HCV del 58% en 12 pacientes con PCT-A mientras que un único paciente con PCT-F fue HCV(-). Otros autores hablan de 65% de HCV(+) en PCT esporádica (Navas et al., 1995) pero debe observarse y enfatizarse que en ninguno de estos trabajos se determinó la actividad de URO-D para clasificar la porfiria como hereditaria o adquirida y en uno de ellos, en donde estudian 100 PCT-A y 6 PCT-F, y encuentran un paciente con PCT:HCV(+), el diagnóstico de PCT-F se realizó exclusivamente en base a la historia familiar (Stolzel et al., 1995).

Nuestros resultados revelan que la población no porfírica con daño hepático no muestra alteraciones del metabolismo del hemo, salvo los 2 casos mencionados, de una PCT adquirida y una β -Talasemia aunque hay autores que dicen haber encontrado la coproporfirina urinaria ligeramente aumentada en pacientes HCV(+) no porfíricos (Frank et al., 1997); Krivosheyev y Krivosheyev, 1997).

Es bien conocido el papel patogénico del virus C en el desarrollo de hepatocarcinoma, una complicación muy frecuente en pacientes con PCT. Dada la elevada prevalencia de este virus en la PCT, en estos pacientes se debería realizar el estudio de la función hepática y en aquellos pacientes que son además HCV(+) con enfermedad hepática activa debería aplicarse el tratamiento adecuado para evitar su progresión hasta el hepatocarcinoma y un desenlace fatal.

II.3 ASOCIACION PCT-VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

A partir de 1987 se han publicado varios trabajos sobre casos de PCT infectados por virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Wissel et al., 1987; Hogan et al., 1989; Nip-Sakamoto et al., 1989; E. de Salamanca et al., 1990; Lafeuillade et al., 1990; Boisseau et al., 1991; Blauvelt et al., 1992; Conlan et al., 1992; Russel et al., 1992; Gafa et al., 1992; Soriano et al., 1993; Parera et al., 1996). En el CIPYP se han diagnosticado 32 pacientes PCT-HIV(+), 15 de ellos han sido motivo de estudio desde el punto de vista bioquímico en este trabajo. En la Tabla II.8 se muestran los datos obtenidos; se observa que todos los pacientes son de sexo masculino y las edades son relativamente menores a la edad más probable de manifestación de la PCT (40-60 años). Las porfirinas urinarias fueron muy elevadas en la mayoría de los casos salvo en unos pocos pacientes en quienes el desencadenamiento de la porfiria ha sido reciente.

En todos los pacientes con estudio hepático se encontró hepatitis crónica, en 8 de ellos por HCV, en 2 por HBV y en 1 por virus B y virus C de hepatitis. El paciente que fue HCV(-) y HB(-) presentaba una hepatitis granulomatosa. En cuanto al tipo de PCT, del estudio enzimático realizado en 11 pacientes, resultó que 3 de ellos eran PCT-F y el resto PCT-A.

Tabla II.8: Estudios bioquímicos y serológicos en pacientes PCT-HIV(+)

PACIENTE	SEXO	EDAD	PORF.URIN ($\mu\text{g}/24\text{ h.}$)	IPP ($\lambda=618\text{ nm}$)	HCV	HBV	TIPO DE PCT
BJ	M	38	13.980		(-)	(-)	A
BE	M	25	8.898	5,53	ND	ND	A
CJ	M	43	2.406	3,20	(+)	(-)	F
CP	M	20	11.110	4,38	(+)	(-)	F
FM	M	37	12.368	5,25	(+)	(-)	F
GA	M	32	12.502	4,85	(+)	(+)	A
GP	M	29	13.950	4,70	(-)	(+)	ND
GM	M	38	4.533	3,55	(+)	(-)	A
JR	M	30	6.240	4,50	ND	ND	ND
LM	M	44	3.368	5,18	(-)	(+)	ND
NJ	M	30	7.309	5,25	ND	ND	A
RD	M	28	5.900	6,00	(+)	(-)	A
RJ	M	35	7.926	5,70	(+)	(-)	A
SF	M	30	7.600	4,37	(+)	(-)	A
ZJ	M	42	5.294	5,60	(+)	(-)	ND

Estos datos están indicando que la PCT en pacientes HIV(+) también está asociada a la presencia de virus de la hepatitis y a la existencia de hepatitis crónica, lo cual sugiere que la hepatopatía producida por estos virus sería el factor desencadenante del cuadro dermatológico (Méndez et al., 1997).

Son escasos los estudios hepáticos y el tests serológicos en pacientes PCT-HIV(+) y según Castanet et al. (1994), la asociación PCT-HIV es secundaria a una infección concomitante por HCV. Gomi et al. (1997) opinan en cambio que el daño hepatocelular producido por el HIV es suficiente para producir la manifestación de la porfiria cuando existe un defecto latente en la URO-D. En cuanto al mecanismo de inactivación de la URO-D hepática por el HCV, se propuso que podría deberse al aumento de hierro libre, alteración del citocromo P-450, formación de radicales libres y aumento de la oxidación del

URO-D. En cuanto al mecanismo de inactivación de la URO-D hepática por el HCV, se propuso que podría deberse al aumento de hierro libre, alteración del citocromo P-450, formación de radicales libres y aumento de la oxidación del uroporfirinógeno (Fargion et al., 1992). Por otro lado, Cribier et al. (1996) observaron un marcado aumento de coproporfirinas urinarias en pacientes coinfectados HIV(+), HCV(+) no porfíricos, y sólo uno de 60 pacientes, mostró un perfil de porfirinas consistente con PCT. O'Connor et al (1996) observaron niveles anormales de porfirinas urinarias, plasmáticas y fecales en 13 de 33 pacientes HIV(+), 11 de los cuales eran también HCV(+) y sólo 4 presentaban un perfil de porfirinas urinarias consistente con una PCT. Nomura et al. (1996) también observaron niveles elevados de porfirinas plasmáticas en pacientes HIV(+) con o sin infección por HCV, pero se debe destacar que en ninguno de estos 3 últimos trabajos se estudiaron pacientes con PCT sintomática.

En nuestro país, la asociación PCT-HIV(+) es elevada dentro de la población porfírica (38%). En todos los casos la manifestación de la porfiria fue posterior a la infección por HIV. Por lo tanto es importante que en pacientes HIV(+) con síntomas cutáneos se descarte o confirme el diagnóstico de porfiria. Confirmada la PCT se debe aplicar el tratamiento adecuado (Parera et al., 1995) para lograr la remisión completa en el caso de la PCT-A o la normalización clínica y bioquímica en el caso de la PCT-F.

También es importante que en los pacientes PCT-HIV(+) se identifique la presencia del HCV, y así instaurar un tratamiento inmediato para el virus, evitando daños hepáticos mayores.

II.4 REFERENCIAS

Bannerman, R. (1964) Abnormalities of heme and pyrrole metabolism in thalassemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **119**, 503-512.

Blauvelt, A.; Ross Harris, H. & Hogan, D. (1994) Porphyria cutanea tarda and human immunodeficiency virus infection. *Int. J. Dermatol.* **31**, 474-479.

Boisseau, A.; Couzigou, P.; Forestier, J. Legroain, V.; Aubertin, J. Doutré, M.; Maleville, J.; Gemiaux, M. & Beylot, C. (1991). Porphyria cutanea tarda associated with human immunodeficiency virus infection. *Dermatologica* **182**, 155-159.

Castanet, J. Lacour, J.; Badokh, I.; Bekri, S. & Ortonne, J. (1994) Porphyria cutanea tarda in association with human immunodeficiency virus infection: is it related to hepatitis C virus infection. *Arch. Dermatol.* **130**, 664- 665.

Conlan, M. & Hoot, K. (1992) Porphyria cutanea tarda in association with human immunodeficiency virus infection in a hemophiliac. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 857-859.

Cribier, B; Petiau, P; Keller, F; Schmidt, C; Vetter, D; Heid, E. & Groshans, E. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C viral infection. *Arch. Dermatol.* **131**, 801-804.

Cribier, B.; Rey, D. & Uhl, G. (1996) Abnormal urinary coproporphyrin levels in patients infected by hepatitis C virus: a study of 177 patients. *Arch. Dermatol.* **132**, 1448-1452.

D'Alessandro, G.L.; Griso, D.; Macri, A.; Biolcati, G. & Topi, G.C. (1989) Familial porphyria cutanea tarda with normal erythrocytic urodecarboxylase an exception to the rule?. *Dermatologica* **178(4)**, 206-208.

Enriquez de Salamanca, R.; Sanchez-Perez, J.; Diaz-Mora, F. Garcia-Escandon, F.; Perez-Oteiza, C.; Moran, M.J.; Muñoz, F. & Fernandez-Herrera, J. (1990) Porphyria cutanea tarda associated with HIV infection: are those conditions pathogenetically related or merely coincidental ? *AIDS* **4**, 926-927.

Fargion, S.; Piperno, A.; Cappellini, M.; Sanpietro, M.; Fracanzani, A.; Romano, R.; Caldarelli, R.; Marcelli, R.; Vecchi, L. & Fiorelli, G. (1992) Hepatitis virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology* **16**, 1322-1326.

Feri, C.; Baicchi, U. Civita, L.; Greco, F.; Longombardo, G.; Mazzoni, A.; Careccia, G.; Bombardieri, S.; Pasero, G. & Zignego, A. (1993) Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur. J. Clin. Invest.* **23**, 851-855.

Frank, M; Gross, U; Stolzel, U; Kostler, E; Schuppan, D. & Doss, M. (1977) Hepatitis C as realisation factor of porphyria cutanea tarda (PCT) in Germany. *Acta Haematol.* **98** (Suppl1), 111.

Gafa, S.; Zannini, A & Gabrielli, C. (1992) Porphyria cutanea tarda and HIV infection: effect of zidovudine treatment on a patient. *Infection* **20**, 373-374.

Gibson, P; Ratnaike, S; Blake, D. & Sinickas, V. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C. *Med. J. Aust.* **162**, 54.

- Gomi, H.; Hatanaka, K.; Miura, T. & Matsuo, I. (1997) Type of impaired Porphyrin metabolism caused by hepatitis C virus is not porphyria cutanea tarda but chronic hepatic porphyria. *Arch. Dermatol.* **133**, 1170-1171.
- Herrero, C.; Vicente, A.; Bruguera, M.; Ercilia, M. G.; Barrera, J.M.; Vidal, J.; Terés, J.; Mascaró, J.M. & Rodés, J. (1993) Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda?. *The Lancet* **341**, 788-789.
- Hogan, D.; Card, R.; Ghadially, R.; McSheffrey, J. & Lane, P. (1989) Human immunodeficiency virus infection and porphyria cutanea tarda. *J. Am. Acad. Dermatol* **20**, 17-20
- Krivosheyev, B. & Krivosheyev, A. (1977) Chronic hepatitis C and porphyrin metabolism. *Acta Haematol.* **98** (Suppl1), 126.
- Lacour, J.; Bodok, I.; Castanet, J.; Bekri, S & Ortonne, J. (1993) Porphyria cutanea tarda and antibodies to hepatitis C virus. *Br. J. Dermatol.* **128**, 121-123.
- Lafeuillade, A.; Gamby, T.; Poizot-Martin, I.; Quilichini, R. & Gastaut, J. (1990) Porphyrie cutanée tardive associée a l'infection par le virus de l'immunodeficiency humaine. *Presse Médicale* **19**, 1195-1196.
- López Morante, A.; Saez Royuela, F.; Martín Lorente, J.; Yuguero del Moral, L. & Ojeda Giménez, C. (1995) Hepatitis C virus infection and porphyria cutanea tarda. *Gastroenter. Hepatol.* **18**, 7-10.
- Lyberatos, C; Papadopoulos, N; Papasteriadis, E; Mitsiou, A; Philippidou, A. & Gardikas, C. (1975) Urine porphyrins and their precursors in homozygous β -Thalassaemia. *Acta Haemat.* **54**, 95-97.
- Mar de Castro, J.; Sánchez, J.; Herrera, J.F.; Chavés, A.; Durán, R.; García-Buey, L.; García-Monzón, C.; Sequí, J. & Moreno-Otero, R. (1993) Hepatitis C virus antibodies and liver disease in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepato.* **17**, 551-557.
- Méndez, M.; Sawicki, M.; Muramatsu, H.; Schroder, T.; Alvarez, E.; Theiler, G.; Fainboim, H.; Battle, A. & Parera, V. (1996) Porfiria cutánea tardía (PCT). Asociación con infección por virus de hepatitis y de la inmunodeficiencia humana. *Medicina* **56**, 624-625.
- Murphy, a; Dooley, S; Hillary, B & Murphy G. (1993) HCV infection in porphyria cutanea tarda. *Lancet* **341**, 1534-1535.
- Navas, S.; Bosch, O.; Castillo, I.; Mariott, E. & Carregno, V. (1995) Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology* **21**, 279-284.
- Nip-Sakamoto, C.; Wong, R. & Izumi, A. (1989) Porphyria cutanea tarda and AIDS. *Cutis* **44**, 470-471.
- Nomura, M.; Zolla-Pazner, S. Simberkoff, M. Kim, M.; Sassa, S. & Lim, H. (1996) Abnormal serum porphyrin levels in patients with the acquired immunodeficiency syndrome with or without hepatitis C virus infection. *Arch. Dermatol.* **132**, 906-910.

O'Connor, W.; Murphy, G. & Darby, C. (1996) Porphyrin abnormalities in acquired immunodeficiency syndrome. (1996) *Arch. Dermatol.* **132**, 1443-1447.

Parera, V.; Méndez, M.; Melito, V.; Stella, A.; Jaled, M.; Bermejo, A.; Benetucci, J.; Ortega, G. & Battle, A. (1995) Acerca de diecisiete pacientes con virus de inmunodeficiencia humana que desarrollaron porfiria cutánea tardía. *Rev. Argent. Dermatol.* **76**, 230-235.

Quesedo, L.; Costa, J. & Enriquez de Salamanca, R. (1996) Papel del virus de la hepatitis C en la hepatopatía de la Porfiria Cutánea Tarda. *Medicina Clínica* **106**, 321-324

Roberts, A; Elder, G; Newcombe, R; de Salamanca, R y Muñoz J. (1988) Heterogeneity of familial porphyria cutanea tarda. *J. Med. Genet.* **25**, 669-676.

Russel, M.; Lustermans, F. Wuite, J. & van Pelt, J. (1992) Porphyria cutanea tarda in a patient with AIDS. *Neth. J. Med.* **41**, 68-70.

Siersema, P; Ten Kale, F; Mulder, P & Wilson, J. (1992) Hepatocellular carcinoma in porphyria cutanea tarda: frequency and factors related to its occurrence. *Liver* **12**, 56-61.

Soriano, E. Catala, M. Lacruz, J.; Campayo, A.; Lopez Aldeguer, J. & Perello, A. (1993) Porfiria cutánea tarda e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev. Clin. Esp.* **192**, 120-122.

Stolzel, U.; Kostler, E.; Koszka, C.; Stoffler Meilicke, M.; Schuppan, D.; Somasundaram, R.; Doss, M.O.; Habermehl, K.O. & Riecken, E.O. (1995) Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda in Germany. *Hepatology* **21**, 1500-1503.

Wissel, P.; Sordillo, P.; Anderson, K.; Sassa, S.; Savillo, R. & Kappas, A. (1987) Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Hematol.* **25**, 107-113.

CAPITULO III

SECUENCIA DEL GEN DE LA URO-D

III.1 SECUENCIA NORMAL

Se llevó a cabo la secuenciación del gen, entre los primers utilizados en la amplificación del mismo: 5'-TATGGACCTGGCTGGATAAGACTGTTGGT-3' y 5'-CTGAGGATATGGGACAATCTTTCAC-3'. La región comprendida incluye los exones, intrones así como todas las señales regulatorias conocidas (Romana et al. 1987). Esta región comprende 3.658 pb de acuerdo a la secuencia publicada por Morán-Jiménez et al (1996), desde las primeras 326 pb upstream del codón de iniciación de la traducción hasta 97 pb downstream del codón de stop. En 5 individuos con actividad de URO-D normal, se amplificó el gen mediante cinco PCR con productos solapados y se secuenciaron las 3.613 pb, utilizando los primers indicados en Materiales y Métodos. Además se amplificó el gen parcialmente o en un único producto, en 20 individuos entre normales y PCT, en los cuales se secuenciaron las regiones 5', 3', y todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes y completamente los intrones 2, 3, 5, y 8. En los individuos normales sus secuencias coincidieron entre si, además, tanto individuos normales como PCT presentaron 34 diferencias con la secuencia publicada, ubicadas en los extremos 5', 3' y en los intrones 1, 2, 6 y 9. Las diferencias son 14 sustituciones, 9 inserciones y 11 deleciones las cuales se distribuyen de la siguiente forma: siete en la región 5', diez en el intrón 1, una en el intrón 2, tres en el intrón 6, diez en el intrón 9 y tres en la región 3'. En la Tabla III.1 se indican las diferencias encontradas en las regiones no codificantes. Se consideró como posición +1 al sitio de inicio de la transcripción según la secuencia del cDNA de Roméo et al (1986) y los nucleótidos se numeraron según la nomenclatura de Beaudet & Tsui (1993).

TABLA III.1 Diferencias encontradas en regiones no codificantes

DIFERENCIA	UBICACION
ins C	-140 (Región 5')
ins G	-148 (Región 5')
ins C	-153 (Región 5')
T→G	-193 (Región 5')
ins C	-286 (Región 5')
del T	-302 (Región 5')
ins G	-305 (Región 5')
del A	38+101 (Intrón 1)
del G	38+128 (Intrón 1)
T→C	38+216 (Intrón 1)
C→T	38+217 (Intrón 1)
del T	38+298 (Intrón 1)
del G	38+303 (Intrón 1)
ins CACC	38+456 (Intrón 1)
del G	38+522 (Intrón 1)
G→C	38+572 (Intrón 1)
A→G	38+577 (Intrón 1)
ins G	151+41 (Intrón 2)
C→A	654+48 (Intrón 6)
G→C	654+50 (Intrón 6)
T→C	654+96 (Intrón 6)
del C	960+28 (Intrón 9)
del C	960+51 (Intrón 9)
C→A	960+109 (Intrón 9)
A→C	960+110 (Intrón 9)
C→A	960+119 (Intrón 9)
ins G	960+206 (Intrón 9)
del T	960+240 (Intrón 9)
del C	960+254 (Intrón 9)
C→G	960+265 (Intrón 9)
ins C	960+267 (Intrón 9)
C→G	1122+1 (Región 3')
C→T	1122+2 (Región 3')
del C	1122+79 (Región 3')

Además, se encontraron las cinco diferencias exónicas no patológicas descroptas previamente, en las posiciones 87, 325, 376-377-378, 931 y 1027 del cDNA (Roméo et al. 1986): 87 (GCT_I→GCC_C), 325 (AGC_I→GGC_C), 376-377-378 (GCG_I→CGC_C), 931 (ITG_I→CTG_C) y 1027 (ITG_I→CTG_C) de las cuales solamente la segunda y la tercera producen un cambio en el aminoácido: S103G y A122R respectivamente (De Verneuil et al. 1986 ; Garey et al. 1993; Mc Manus et al. 1994), todas presentes en la secuencia de Morán-Jiménez et al (1996), excepto la ubicada en la posición 1.027 del cDNA. Tanto estas 5 diferencias exónicas como las 34 diferencias en regiones no codificantes se encontraron en estado homocigota en todos los individuos analizados. De acuerdo con la secuencia obtenida, la región secuenciada comprende 3.659 pb.

La secuencia completa comprendida entre los primers más extremos utilizados en las amplificaciones se detalla a continuación:

REGION 5': (330 pb)

ATCATGAGTGGGACTTGCGCCAAGCCTCCGGATACCCAGACTGTCAGATGA
 GAACAAATTCCTCATGTCACCGTAAGATACATTTACAGCGGAGTTTTCTTTG
 GGCCTTTGTTGTTGCGTCGCTACAGCAAACCTTTACGGTGAAAAAAGGTAGGG
 GTCCTACGGGCAGCAGCCAGGGCAGCCCTGGAGCTGTCGCTGGAGTCCGA
 TCATGTGATCTTCAACATGGCGACGCTCTTGGTTCCCTACAGAAAGGGGCGG
 AGCCTGACTGGGGGGCAGGCTCAGATTCAGGTTAAATTGTGGATTGAGCTC
 GC
 AGTTACAGACAGCTGACC
 +1

EXON 1: (20 pb)

ATGGAAGCGAATGGGTTGGG

INTRON 1: (621 pb)

GTGAGTTCTCCAGAGCACGCGGTGTGGCTAGCCGGGCTTCTAATTTGAGTC
 TTCCAACTCAGGACTCTATCCCTCTACTCCCCTTTCCCCACCCTGGAGACCT
 CCCAACCTGAACTCCGTTAGCTGGGATCCTGAATCCTAAAACCATGGATTTTT
 GAGATGTTTCATCCCAGGGCCTTAATTCAAGGGATGCCTCAGGATTTCCAACC
 AGGATCTCTATTCTGGGACCATCAACTCTGATCCCTCTTTATCCCCCAGCCT
 GGGTATTTCTCAGCCCCTGAACCAGCCCAGTGACATTCCCGTTTCTGAGGCT
 CACTAGTTCGAAGACCCCCAACTATCCTTAGTGGGCCTTCATTCCCTCCCC

CCAGTCCCTCTGGTTGCTTCGAGCTTGAAGAGTAGAGACTAAGTGGAGGG
 AAGAGGCCCCAGGGCGGGCCCTTCTGGAGTTTGTGCACCACCTGATAGGCA
 GAGAGGAGGCGGAACGGGCGGAAAGCCAGGGTTTGGGAGCTGGCCTGGAG
 GAGGTAGATAGCGGTCCTGGACTGAATCGGCCTTATGAACCCGCGCTTTCC
 CCAGCCTCCAGCGTAGCATACTGACACCTACCCCCACCCCCACCTGATCGCC
 AG

EXON 2: (113 pb)

ACCTCAGGGTTTTCCGGAGCTGAAGAATGACACATTCCTGCGAGCAGCCTG
 GGGAGAGGAAACAGACTACACTCCCGTTTGGTGCATGCGCCAGGCAGGCCG
 TTACTIONACAG

INTRON 2: (116 pb)

GTAAGAGTCAGGGTCTGGAAATCTAGATAAAACTCCGGAGGGAGAAAAGTTT
 TCGAGGGGCAGGGGAGGGCTCTGGAGGGCCTCAAGGCTGAGCCCTGTCTT
 CCCTCTGTATGCAG

EXON 3: (80 pb)

AGTTTAGGGAAACCCGGGCTGCCCAGGACTTTTTTCAGCACGTGTCGCTCTCC
 TGAGGCCTGCTGTGAACTGACTCTGCAG

INTRON 3: (76 pb)

GTGAGGGGTCCACAAAAGAGGGAAAGATTTATGCCTTCAGTCTGCCACCTAG
 CAACCTGTCTCCTGTTTCCTACAG

EXON 4: (63 pb)

CCACTGCGTCGCTTCCCTCTGGATGCTGCCATCATTCTCCGACATCCTTG
 TTGTACCCAG

INTRON 4: (239 pb)

GTACCCACTCAAACCTGATCCTAGAATATAATCCAAGGACGCCTTGAAAATCC
 TTCTATCAGTCCAGTCAAGGTTTACAATAAGCACTTATCCTAACTGGATCGAG
 GGAAAACTAAGGTTGAAAGAAATGGAGTTTGGCAGAGTTTTATTCTCCTTTT
 CCTTCCTCCTGGAATGAGCTGAACAGAACCCTTTCCTCCTGGATTCCATTTTG
 GGAACCCAGATGTTTTCTCCCCCTCCAG

EXON 5: (198 pb)

GCACTGGGCATGGAGGTGACCATGGTACCTGGCAAAGGACCCAGCTTCCCA
 GAGCCATTAAGAGAAGAGCAGGACCTAGAACGCCTACGGGATCCAGAAGTG
 GTAGCCTCTGAGCTAGGCTATGTGTTCCAAGCCATCACCCCTACCCGACAAC
 GACTGGCTGGACGTGTGCCGCTGATTGGCTTTGCTGGTGCCCA

INTRON 5: (117 pb)

GTAATGTGGGACAGGGCAGGGACTCGGGGCGCGGGGAGATCACTCTGGAA
 GGTCTGGGGTAGACAAAAGGAAGGGTCAGTCTGGCTTCTGTGACACCATCT
 TTCTATCCTTCTCTAG

EXON 6: (162 pb)

TGGACCCTGATGACATACATGGTTGAGGGTGGTGGCTCAAGCACCATGGCT
 CAGGCCAAGCGCTGGCTCTATCAGAGACCTCAGGCTAGTCACCAGCTGCTT
 CGCATCCTCACTGATGCTCTGGTCCCATATCTGGTAGGACAAGTGGTGGCTG
 GTGCCAG

INTRON 6: (368 pb)

GTGAGTCCTGAGAGAGAGAGAAATAGGCTGGGATTTGGTCTGTAAGGACCA
 GAAGCAAGAGTGTCTAAACCTGAGAGGGCAGGGGTCTTAATGCCAGGGAT
 GAAAGAACCTTGGCCTCCAGTGATCTAGCTGAGCAGCCAAGCCCATCCTGAC
 ACTGACAGTGGGGCTTAATGCTCTAAGTATTCAGACACCAAAGTTAGTGCTG
 GGATCTGAGGAAAGTAAATTTTTTTTTTTAATTACTGGGTTTTTAGGGTCA
 GGCAGTATCAGGGATTGAAGTCATTTGGGGAAAATTGAGGTGGATTTTGTAT
 GTGGGGGAAACTTCTCTTTGTGTGTTACATATTTTCTTCACCATACCCTAA
 CTAG

EXON 7: (138 pb)

GCATTGCAGCTGTTTGAGTCCCATGCAGGGCATCTTGGCCCACAGCTCTTCA
 ACAAGTTTGCCTTACATCCGTGATGTGGCCAAGCAAGTGAAGGCCAG
 GTTGCGGGAGGCAGGCCTGGCACCAGTGCCCATG

INTRON 7: (159 pb)

GTGAGGATTGGGATGGGTTGAGTGAAGGTGGTCCTGTGGAGCTTTCAGGCT
 AAGTCCTGCATGGACTGGAGTGACCACTGGAGGGCAGCAGAAGTACAGTCA
 AGAAAGATTAGTGGTTGTAGCAAGGCCCTCTGTAGCCTGAGATCTGCTTTTT
 TCTAG

EXON 8: (101 pb)

ATCATCTTTGCTAAGGATGGGCATTTTGCCCTGGAGGAGCTGGCCCAAGCTG
 GCTATGAGGTGGTTGGGCTTGACTGGACAGTGGCCCCAAGAAAGCCCG

INTRON 8: (103 pb)

GTAAGCCATGGAAGGGTGAAGCCTTGAGGTTGAGGTGGGGGTGTTGGCTG
 GGGGAGCTGCCATGTATGCAGTTACCAGAACGTGGCGCTGGCTTTGCTTCC
 AG

EXON 9: (67 pb)

GGAGTGTGTGGGGAAGACGGTGACATTGCAGGGCAACCTGGACCCCTGTG
 CTTGTATGCATCTGAG

INTRON 9: (330 pb)

GTAACAGCCAGGGCCCCTCTGTGTGTCTGTTACTGTGCACTCCTGTGGCTGT
 GGTGTTGATTATTCTGTGTGCACTTGTTTTAATGTCTGTCTGTCCTTTTCTTCT
 ACTCTGTACAACATAAGCCCTAGAAAGACCGGACTTTTTGTTGCTGTTGTTCA
 TTTGTGTTTATGCTTCATGCCTGGGTCCATACTAGGGATCTGATAAATTTAT

TGAATGACTGAATAACACTGAGTAGAAGCATGCCTACATATGCGTTTGTCACT
 AGTATATATAGGGAGGACAAAGGCTTGCTGGTCCTCCTGTAGCCAGTGCCCT
 GTTGGTCCCCCAG

EXON 10: (162 pb)

GAGGAGATCGGGCAGTTGGTGAAGCAGATGCTGGATGACTTTGGACCACAT
 CGCTACATTGCCAACCTGGGCCATGGGCTTTATCCTGACATGGACCCAGAAC
 ATGTGGGCGCCTTTGTGGATGCTGTGCATAAACACTCACGTCTGCTTCGACA
 GAACTGA

REGION 3': (96 pb)

GTGTATACCTTTACCCTCAAGTACCACTAACACAGATGATTGATCGTTTCCAG
 GACAATAAAAGTTTCGGAGTTGAACTATTGTGTAGTTTTGTTT

III.2 POLIMORFISMOS DETECTADOS

Se detectaron dos polimorfismos intrónicos, los cuales fueron testeados en 25 individuos entre normales y PCT, para analizar las frecuencias alélicas. Uno fue detectado en la posición 654+30, en el intrón 6: 1853(g/t) (Figura III.1) y el otro en la posición 960+151, en el intrón 9: 2910(t/c) (Figura III.2), ambos se detectaron en heterocigosis y en sus dos formas homocigotas. Se encontró también, en dos pacientes PCT no relacionados, con actividad de URO-D normal, una mutación sinónimo en estado heterocigota, en el exón 6: CCA→CCG (P201P) (Figura III.3). Además, en la región 5' del gen se detectaron dos polimorfismos, en su forma heterocigota: -253(t→a) y -283(a→g). (Figura III.4 y III.5 respectivamente). Ninguno de estos polimorfismos había sido descrito previamente. Las frecuencias alélicas de los mismos se muestran en la Tabla III.2.

TABLA III.2 Polimorfismos detectados en el gen de la URO-D

POLIMORFISMO	FRECUENCIAS	FRECUENCIAS ALELICAS
-253(t/a)	t/t: 17/25; a/a: 0/25; t/a: 8/25	T: 0,84; A: 0,16
-283(a/g)	a/a: 19/25 g/g: 0/25; a/g: 6/25	A: 0,88; G: 0,12
1853(g→t)	g/g: 9/25; t/t: 5/25; g/t: 11/25	G: 0,58; T: 0,42
2910(t→c)	t/t: 8/25; c/c: 5/25; t/c: 12/25	T: 0,56; C: 0,44
P201P(A→G)	a/a: 23/25; g/g: 0/25; a/g: 2/25	A: 0,96; G: 0,04

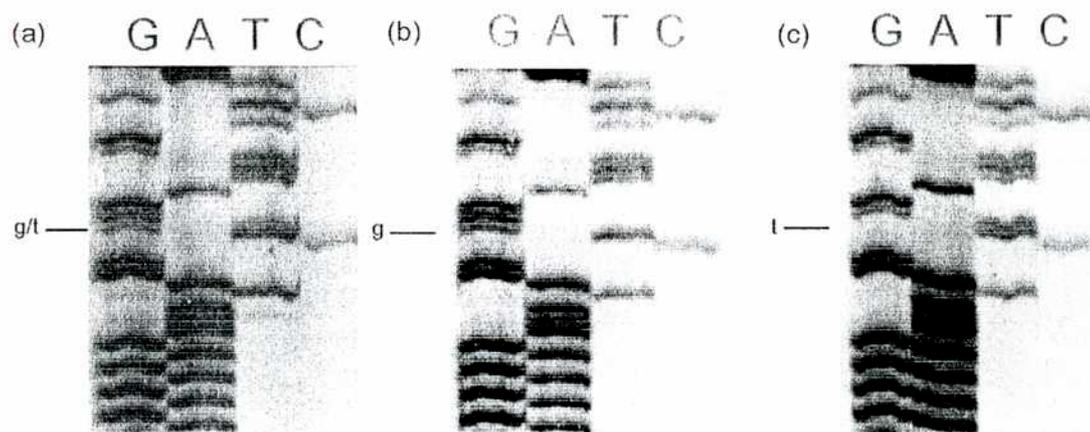


FIGURA III.1 Polimorfismo 1853(g/t) en estado heterocigota (a) y en sus dos formas homocigotas (b y c)

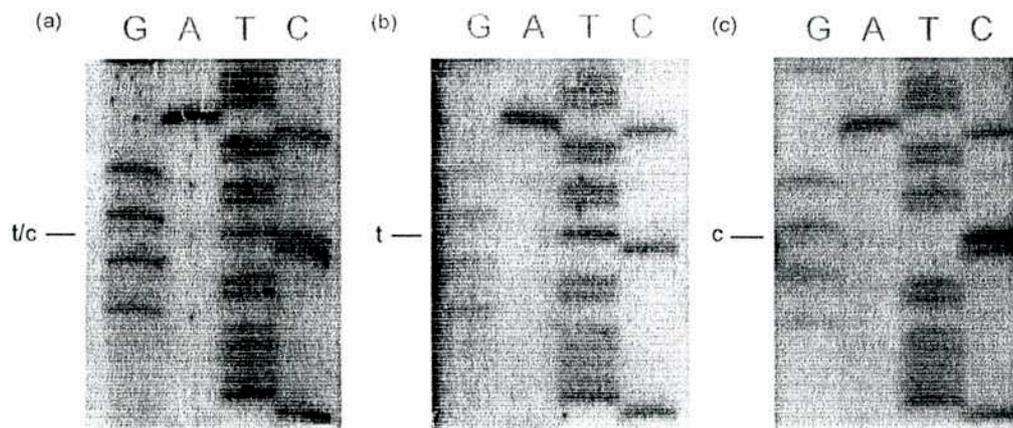


FIGURA III.2 Polimorfismo 2910(t/c) en estado heterocigota (a) y en sus dos formas homocigotas (b y c)

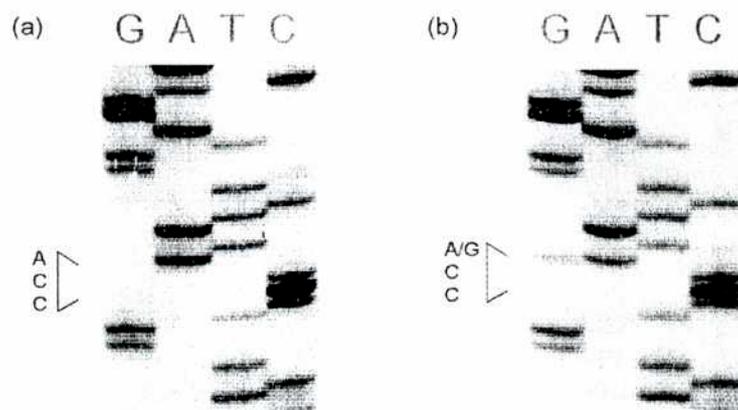


FIGURA III.3 Polimorfismo P201P(A→G): (a). Forma más común (b) Individuo heterocigota

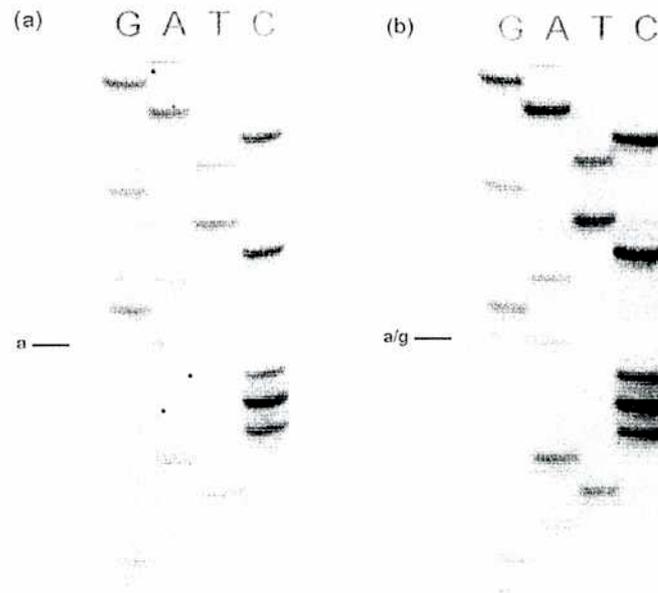


FIGURA III.4 Polimorfismo -253(t→a): (a). Forma más común (b) Individuo heterocigota

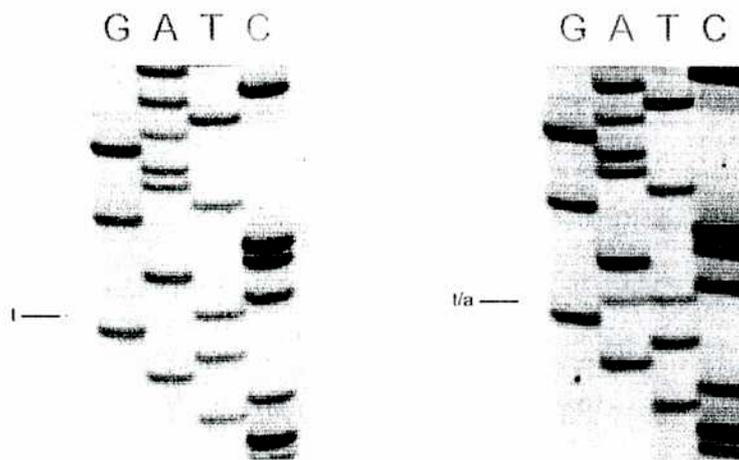


FIGURA III.5 Polimorfismo -283(a→g): (a). Forma más común (b) Individuo heterocigota

III.3 REFERENCIAS

- Beaudet, A.L. & Tsui, L. (1993) A suggested nomenclature for designating mutations. *Hum. Mutat.* **2**: 245-248.
- De Verneuil, H.; Grandchamp, B.; Beaumont, C.; Picat, C.; & Nordmann, Y. (1986) Uroporphyrinogen decarboxylase structural mutant (Gly281→Glu) in a case of porphyria. *Science* **234** (4777): 732-734.
- Garey, J.R.; Franklin, K.F.; Brown, D.A.; Harrison, L.M.; Metcalf, K.M. & Kushner, J.P. (1993) Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* **105**:165-169.
- Mc Manus, J.; Begley, G. & Ratnaik, S. (1994) Complex pattern of alternative splicing in the normal uroporphyrinogen decarboxylase gene: Implications for diagnosis of familial porphyria cutanea tarda. *Clin. Chem.* **40** (10): 1884-1889.
- Morán-Jiménez, M.J.; Ged, C.; Romana, M.; Enriquez de Salamanca, R.; Taieb, A.; Topi, G.; D'Alessandro, L. & de Verneuil, H. (1996) Uroporphyrinogen decarboxylase: Complete human gene sequence and molecular study of three unrelated families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 712-721
- Romana, M.; Dubart, A. Beaupain, D.; Chabret, C.; Goossens, M. & Roméo, P.H. (1987) Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase. *Nucl. Ac. Res.* **15** (18): 7343-7356
- Roméo, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Pryor, M.; Kushner, J.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA. *J. Biol. Chem.* **261** (21): 9825-9831.

CAPITULO IV

ESTUDIOS GENETICOS EN PACIENTES CON PCT-F

IV.1. PACIENTES ESTUDIADOS

De los 106 pacientes no relacionados, con diagnóstico de PCT, a los que se les determinó la URO-D eritrocitaria, 25 (23,6%) mostraron una reducción de alrededor del 50% en su actividad, con lo cual se diagnosticaron como PCT hereditaria y se procedió a realizar en los mismos el estudio genético. Dicho análisis se llevó a cabo solamente en 13 familias ya que no se pudo lograr la concurrencia de las demás familias a nuestro Centro para estos estudios. La búsqueda de mutaciones, ya sea a través del cDNA como del DNA genómico, se realizó en un paciente de cada familia y se extendió el estudio genético a los familiares, en aquellos casos donde fue posible hacerlo, totalizando 16 pacientes PCT-F. En la Tabla IV.1 se indican los datos bioquímicos de los pacientes estudiados.

IV.2. MUTACIONES ENCONTRADAS

En todos los pacientes estudiados se detectó la mutación responsable de la porfiria. Se identificaron 10 mutaciones, de las cuales una estaba presente en cuatro familias. De estas mutaciones 8 no habían sido descritas previamente, y las otras 2 son mutaciones missense que se describieron en casos de PHE pero no en PCT-F. En total se identificaron 6 mutaciones missense, 1 nonsense, 1 de splicing, 1 deleción grande y 1 inserción de una base, esta última es la que se detectó en cuatro familias. Las mutaciones missense nuevas se expresaron en *Escherichia coli*.

Tabla IV.1: Datos Bioquímicos en pacientes con PCT-F

CASO	SEXO	EDAD (años) (*)	ORINA					SANGRE		
			PORF. ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	CROMATOGRAFIA					IPP	URO-D % (**)
				U	F	H	P	C		
NMA	F	47	8.909	50	37	5	4	4	7,48	45
AF	M	24	11.622	50	30	5	10	5	6,00	39
AA	F	59	3.042	45	34	6	5	10	3,10	50
CD	F	64	5.008	50	40	3	5	2	6,75	44
LM	F	7	1.133	45	35	3	5	12	2,30	51
LOC	M	37	3.121	40	30	5	10	15	3,43	44
KC	F	7	3.174	45	35	2	3	15	5,80	44
JLC	M	11	1.257	45	35	2	3	15	4,20	43
JEP	M	58	2.033	44	36	4	6	10	2,10	42
SV	M	39	3.960	48	34	3	7	8	4,25	46
JA	M	64	4.490	40	30	10	10	10	4,70	38
CA	F	9	7.528	60	30	1	3	6	5,58	48
HO	F	23	6.945	45	36	5	7	7	6,00	44
CDA	M	12	2.277	42	42	4	4	8	4,26	48
AP	F	58	1.733	45	34	2	7	12	1,81	43
CA(h)	F	16	50	50	25	-	-	25	1,20	49

Los valores de porfirinas en orina y el IPP son los determinados al momento del diagnóstico.

U: % Uroporfirina; F: % Firiaporfirina; H: % Hexaporfirina P: % Pentaporfirina; C: % Coproporfirina

IPP: Índice de porfirinas plasmáticas

* Edad en el momento del diagnóstico.

** Porcentaje de actividad respecto al valor normal

PACIENTE NMA:

En este paciente se obtuvieron dos productos en la RT-PCR, de tamaño semejante como se evidenció en electroforesis en gel de agarosa (Figura IV.1). Los productos se purificaron y secuenciaron; además se obtuvieron ambos productos separadamente luego de cortarlos de un gel de agarosa 2% y eluirlos en buffer TE durante 48 h a 4°C. La secuenciación directa reveló que el producto de menor tamaño presentaba una delección de 67 bases (posiciones 894-960) que correspondía al exón 9 del gen de la URO-D (Figura IV.2). Este resultado indica que la mutación podría ser una delección genómica o un splicing aberrante. Para caracterizar la mutación se amplificó un fragmento del gen comprendido entre el intrón 7 y el extremo 3' del gen (Figura IV.3); la secuenciación del mismo mostró la presencia en estado heterocigota de la mutación puntual G→A (GAG→GAA) en la última base del exón 9 (Figura IV.4), no observándose otras mutaciones. Es interesante el hecho de que esta sustitución no cambia el aminoácido (E314E), por lo cual sería una mutación silenciosa, no obstante debido a su ubicación en la última base del exón 9, inactiva el sitio donador de splicing del intrón 9 con lo cual se produce la pérdida de dicho exón durante la maduración del mensajero. Asimismo no habría sitios críticos en la región ya que sólo se detectaron la especie normal y una aberrante con la delección del exón 9. Por otra parte, el empalme exón 8 - exón 10 conlleva a un cambio del marco de lectura y aparece un stop en el séptimo codón del exón 10 resultante en el mensajero defectuoso. En 1990 Garey et al describieron la primer mutación de splicing en el gen de la URO-D, que se debía a una transversión G→C en la primera base del intrón 6, en el sitio donador de splicing. Ya se han identificado mutaciones de splicing en la última base de exones en otros genes (Weil et al, 1989; Grandchamp et al, 1989). Estos resultados refuerzan la importancia de la secuencia de union exón-intrón en la especificidad para la selección de señales de splicing; ya que aunque hay

elementos intrónicos que son indispensables para la remoción de intrones, 5'-GT y AG-3' que están altamente conservados (Padgett et al 1986; Aebi et al, 1986; Jackson, 1991), hay secuencias en el entorno de éstas que presentan gran variabilidad (Mount, 1982) y son importantes para un correcto splicing. En el caso de esta paciente, el cambio en la secuencia donora $GAG/gtaaca \rightarrow GAA/gtaaca$ la cual varía de la secuencia consenso para el sitio donador de splicing $A/CAGgta/gagt$ y produce el splicing aberrante ya que pasa a utilizar como sitio donador la secuencia $CCG/gtaagc$ en la región exón 8-intrón 8. Solo el 22% de un gran número de secuencias donoras analizadas en mamíferos tienen una A en esta posición (Krawczak et al, 1992).

La mutación descrita conduciría a una proteína truncada con pérdida de casi el 20% de sus aminoácidos por lo cual su actividad y estabilidad podrían estar seriamente afectadas, por ello esta mutación no se podría encontrar en estado homocigota.

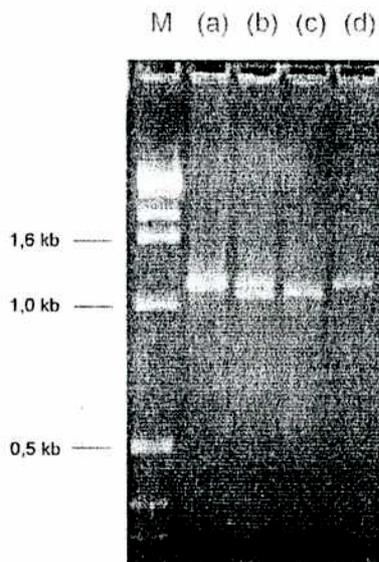


Figura IV.1. RT-PCR de la paciente NMA: (a) Individuo normal; (b) Paciente; (c y d) Ambos productos de la paciente luego de purificarlos de un gel de agarosa 2%. M: Marker 1 kb (GIBCO).

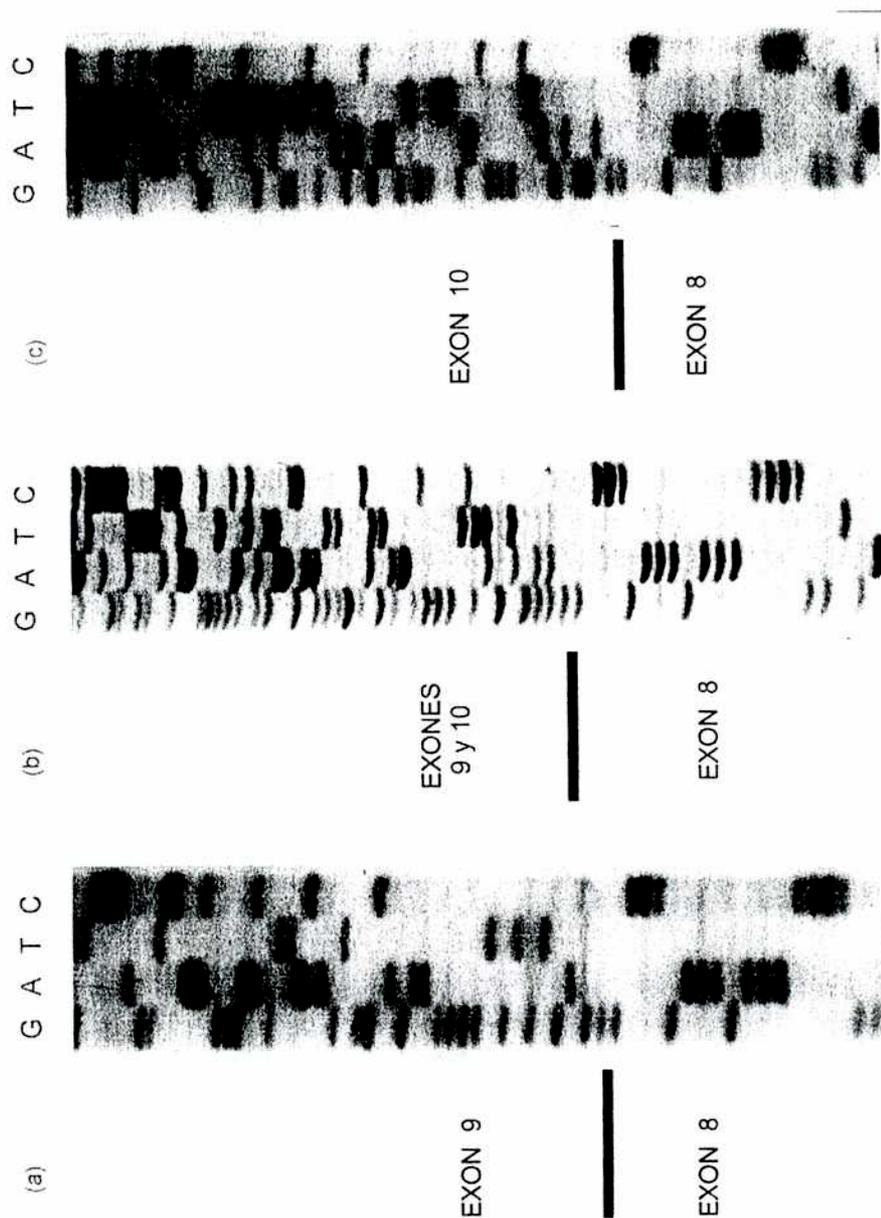


Figura IV.2. Secuenciación del cDNA de la paciente NMA: (a) Individuo normal; (b) Paciente; (c) cDNA del alelo mutado.

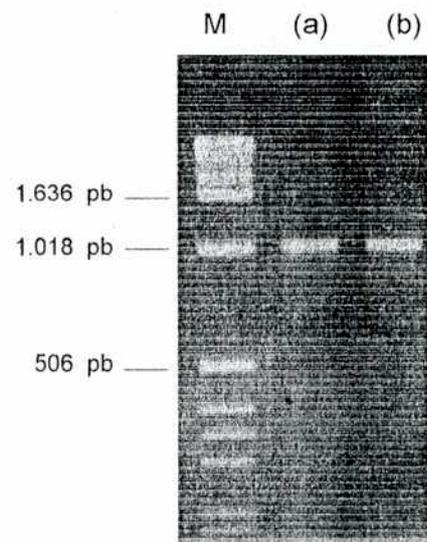


Figura IV.3. Amplificación entre la última parte del intrón 7 y el extremo 3' del gen, en un individuo normal (a) y en la paciente NMA (b). M: Marker 1 kb (GIBCO).

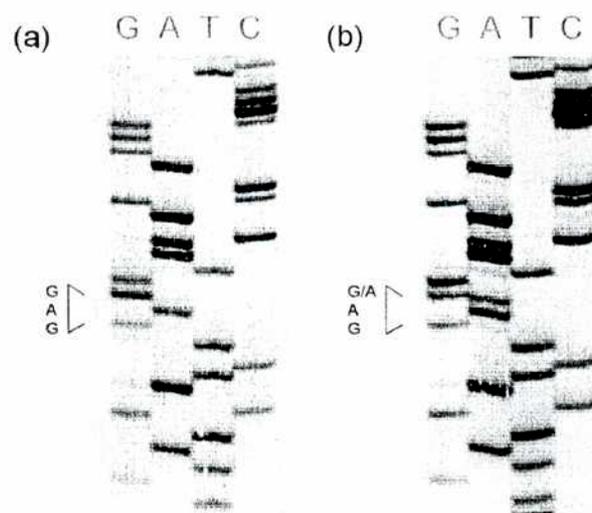


Figura IV.4. Secuenciación del exón 9 de un individuo normal (a) y de la paciente NMA (b).

PACIENTE JEP:

En este paciente se obtuvieron dos bandas en la Long Range PCR, una del tamaño esperado y otra de alrededor de 1 kb menor. Ambos productos se cortaron y purificaron a partir de un gel de agarosa-NuSieve 1% (Figura IV.5). La secuenciación de los productos de amplificación reveló una delección de 1052 pb (663del1052) que se extendía desde la quinta base del exón 2 hasta el nucleótido 1715, en el exón 6 y que presentaba una repetición directa de 10 bases (GATCGCCAGA) el extremo 5' del punto de ruptura (Figura VI .6 y 7). Esta mutación significa la pérdida de alrededor de un tercio del gen incluyendo la mayor parte del exón 2 y gran parte del exón 6, una región que codifica para 169 de los 367 aminoácidos de la enzima, por lo cual es muy probable que la misma no tenga un producto activo. La presencia de una repetición directa flanqueando el punto de ruptura sugiere como posibles mecanismos de esta delección el "slipped mispairing" o intercambios intracromosómicos involucrando repeticiones directas cortas (Kornreich et al, 1990).

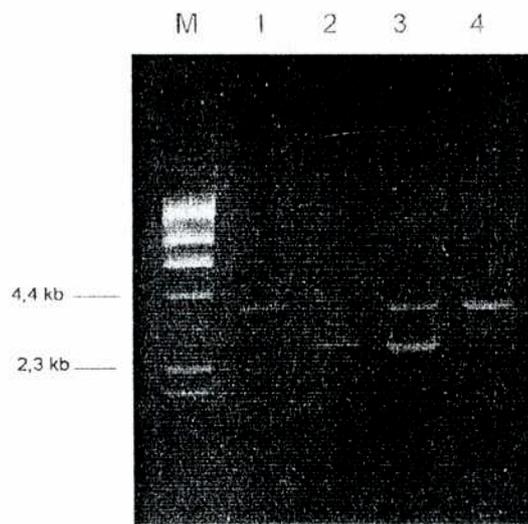


FIGURA IV.7: Long Range PCR del paciente JEP (calle 3); de un individuo normal (calle 4) . En las calles 1 y 2 estan sembrados los dos productos de la PCR de JEP luego de ser purificados de un gel de agarosa. M: Marcador λ *Hind III*

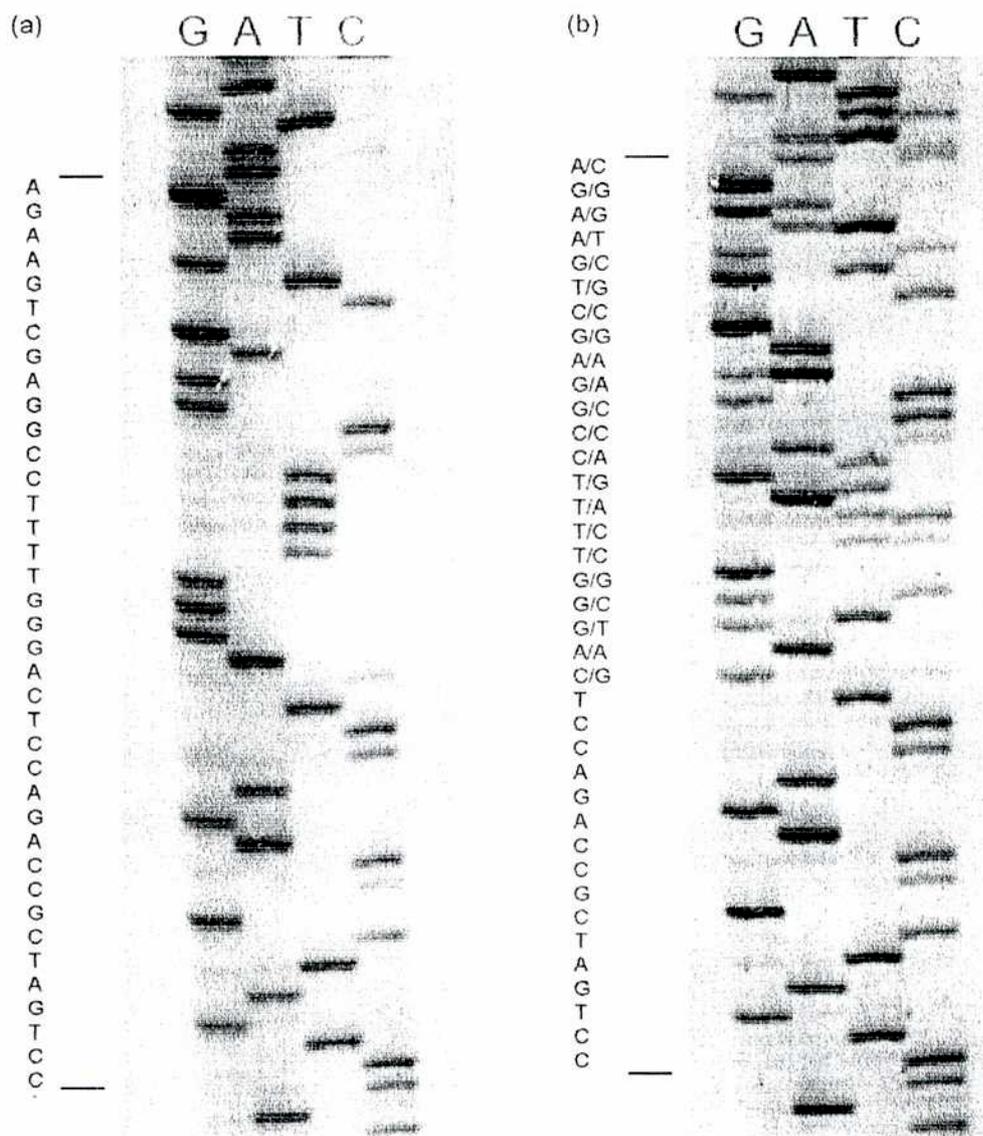


FIGURA IV.8: Secuenciación del exón 2 de un individuo normal (a) y del paciente JEP (b).

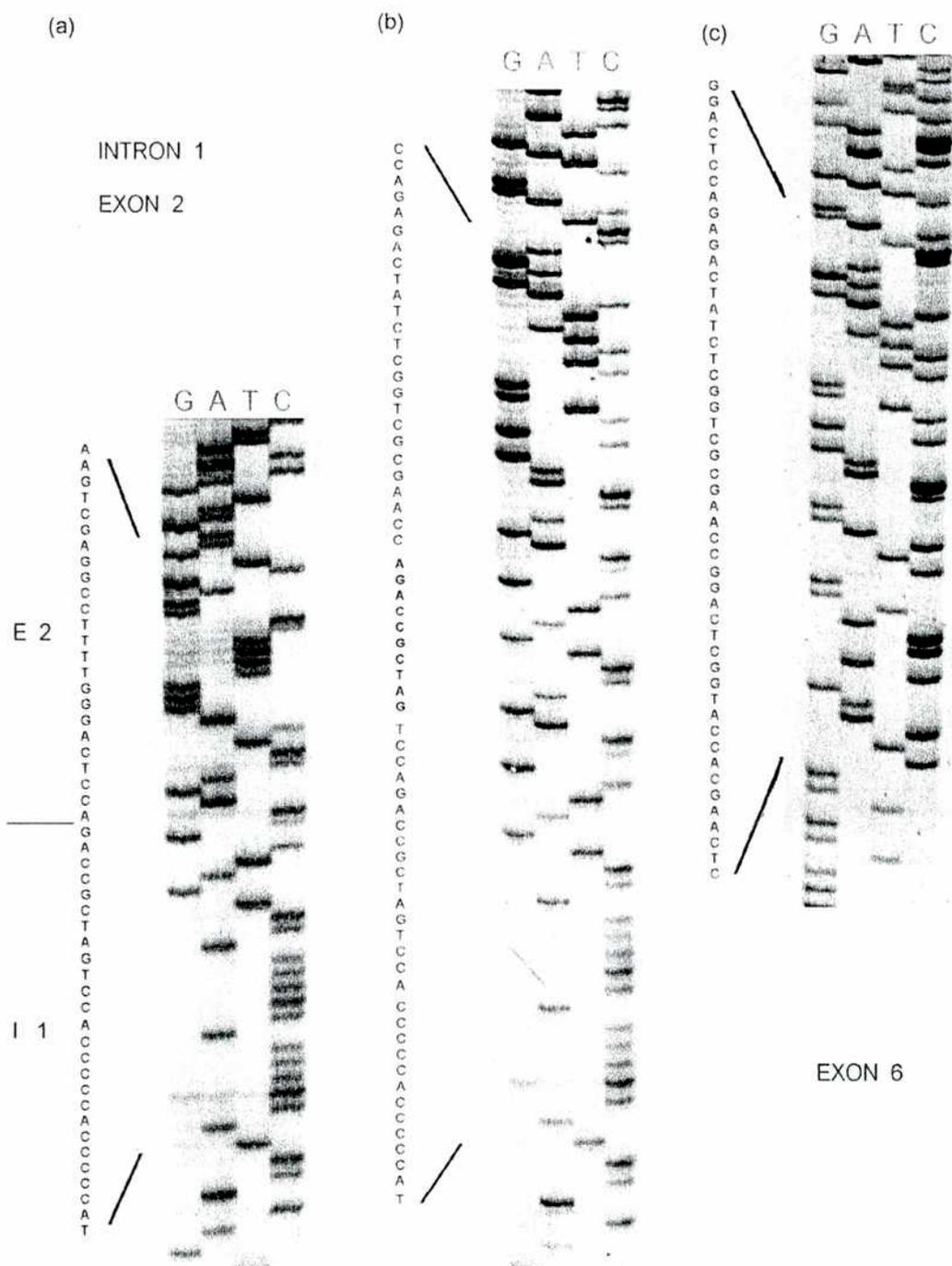


FIGURA IV.9: Secuenciación de los exones 2 y 6 de un individuo normal (a y c) y del exón 2 en el alelo mutado del paciente JEP (b).

PACIENTES CDA y AP:

En el paciente CDA se detectó en el exón 4 la mutación A80G (Figura IV.10), descrita por McManus et al, (1996) en un paciente con PHE; mientras que en la paciente AP se identificó en el exón 3 la mutación P62L (Figura IV.11), que también había sido descrita en una familia con PHE (Morán-Jiménez et al, 1996). Ambas mutaciones se expresaron en *E. coli* por los autores mostrando actividades residuales menores al 50% del valor normal. Hasta la fecha, otras dos mutaciones que habían sido detectadas en homocigosis en pacientes con PHE, se observaron en estado heterocigota en pacientes con diagnóstico de PCT: V134Q y G281E (Roberts et al, 1995; McManus et al, 1995). Tanto en el paciente CDA como en AP no se encontró ninguna otra mutación, por lo cual, el desencadenamiento de la porfiria es causado por la presencia de una simple dosis de mutaciones que en doble dosis causan PHE, lo cual indicaría que la PHE puede ser considerada como una forma homocigota de la PCT-F, o bien, que existen mutaciones que por su severidad fenotípica pueden presentarse en homocigosis o en casos de heterocigotas dobles sin ser letales pero dado que ambos productos génicos son deficientes, presentan un fenotipo mucho más severo que el mostrado en pacientes PCT-F.

PACIENTES AF, AA, CD y LM:

En estos cuatro pacientes se detectaron en estado heterocigota mutaciones missense no descritas previamente. En el paciente AF se observó la transición G→A, en el exón 10, que causa el cambio R332H (Figura IV.12). Esta mutación ocurre en un CpG, que es un "hot spot" para mutaciones. En la paciente LM se identificó la mutación N304K, causada por la transversión C→A en el exón 9 (Figura IV.13). En los otros dos pacientes se detectaron en el exón 6, las mutaciones M165R (en CD), causada por la transversión T→G (Figura IV.14); y L195F (en AA), por la transición C→T (Figura IV.15). Ninguna de estas tres últimas se produjo en un CpG. Dado que se trata de mutaciones de cambio de aminoácido, las mismas se expresaron en un sistema procariótico.

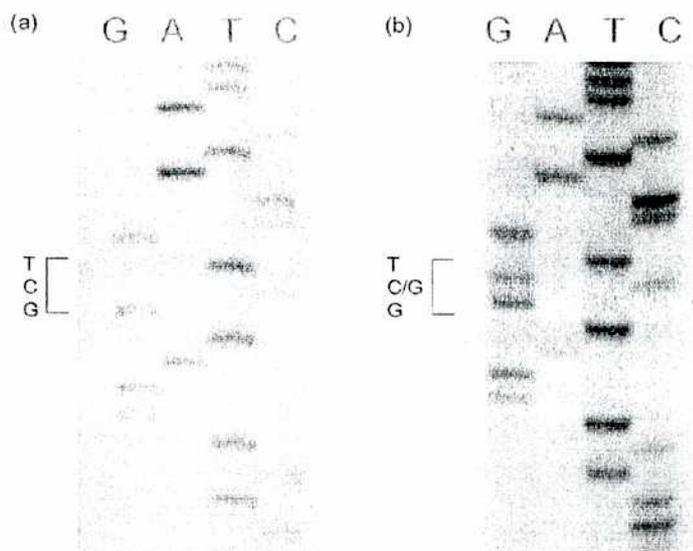


Figura IV.10. Secuenciación del exón 4 de un individuo normal (a) y del paciente CDA (b).

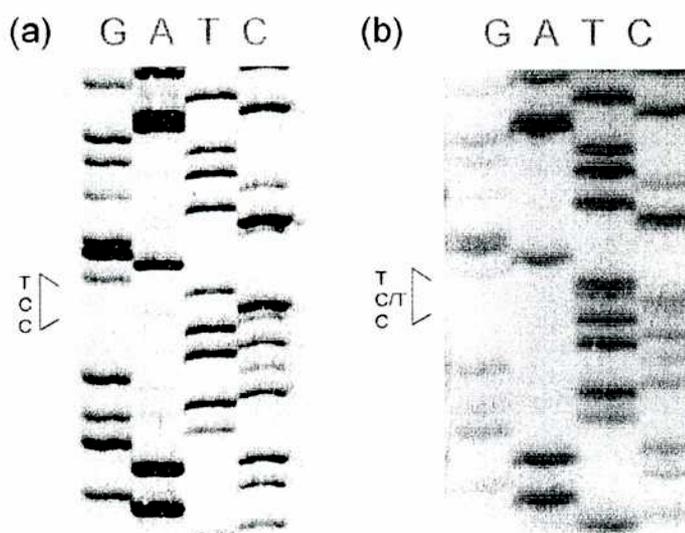


Figura IV.11. Secuenciación del exón 3 de un individuo normal (a) y de la paciente AP (b).

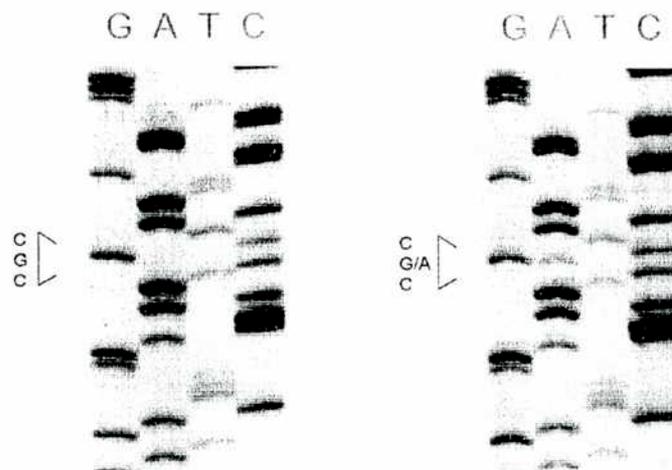


Figura IV.12. Secuenciación del exón 10 de un individuo normal (a) y del paciente AF (b).

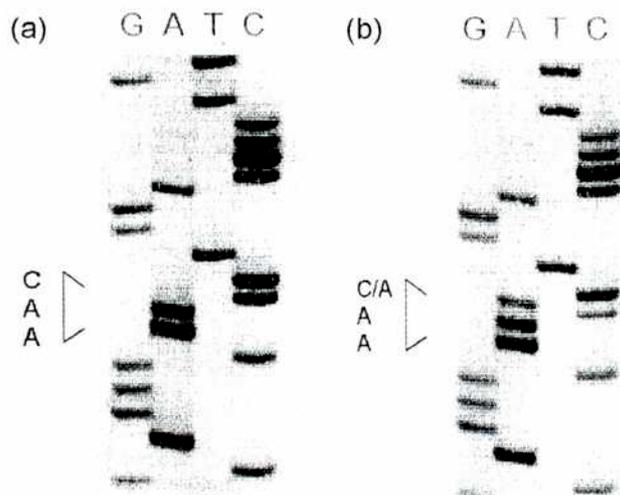


Figura IV.13. Secuenciación del exón 9 de un individuo normal (a) y de la paciente LM (b).

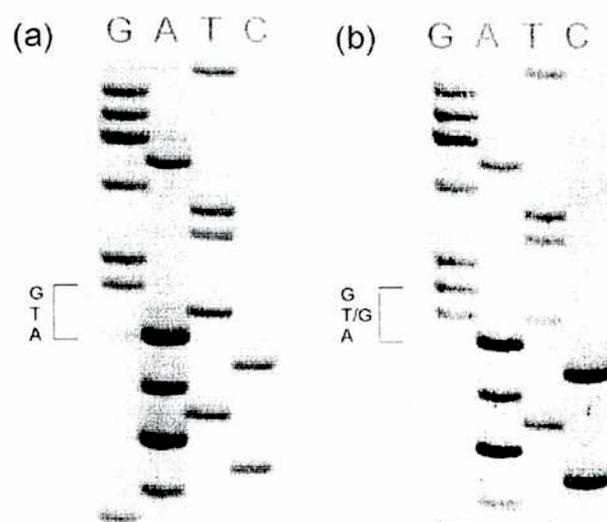


Figura IV.14. Secuenciación del exón 6 de un individuo normal (a) y de la paciente CD (b).

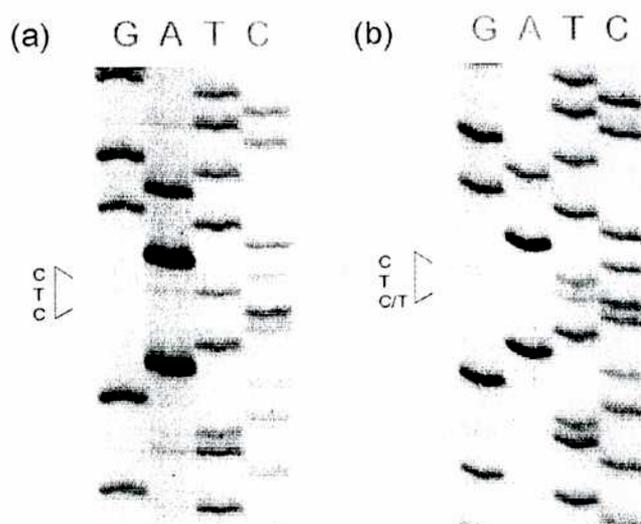


Figura IV.15. Secuenciación del exón 6 de un individuo normal (a) y de la paciente AA (b).

PACIENTE HO:

En este paciente se identificó en el primer codón del exón 6 una mutación puntual no descripta, que produce el cambio de un codón que codifica

para triptofano a un codón de stop (W159X), debido a la transición G→A en la tercera letra del mismo (Figura IV.16). La mutación predice un polipéptido sin 209 de sus 367 aminoácidos, por lo cual muy probablemente sea inactivo.

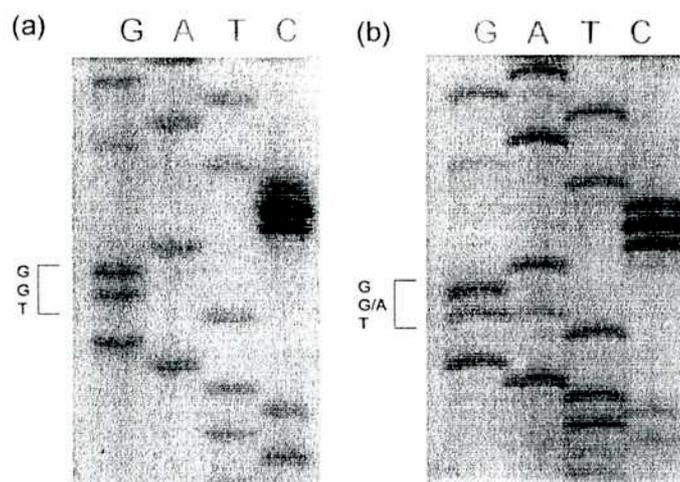


Figura IV.16. Secuenciación del exón 6 de un individuo normal (a) y del paciente HO (b).

PACIENTE KC:

En esta paciente se identificó una inserción de una A en el exón 1, codón 4 (Figura IV.17), que causa un corrimiento del marco de lectura, alterando los aminoácidos entre los codones 4 y 16 (excepto los codones 7, 10 y 13), con aparición de un stop prematuro (TGA) en la primera parte del exón 2, en el codón 17. Esta inserción ocurre antes, entre o después de dos adeninas en las posiciones 28 y 29. Probablemente la inserción se originó durante la replicación del DNA por "polymerase stutter". Es interesante el hecho de que esta mutación se observó también en otros tres pacientes no relacionados: JA, SV y CA (Figura IV.18) y en una hermana de la paciente CA (CA(h)). El hecho de haber encontrado esta mutación en 4 de 13 pacientes no relacionados, aunque se trata de una mutación no descrita previamente, sugiere que sería una de las mutaciones más

comunes en la PCT-F ya que solamente la mutación IVS6+1 descrita por Garey et al (1990) está presente en más familias, 5 de las 22 estudiadas. En PHE, la mutación G281E es la más frecuente, identificada en 17 de 28 pacientes con ancestro español o tunesino (Roberts et al 1995). Los cuatro pacientes portadores de la inserción tienen ancestros españoles (KC, JA y SV) o árabes (CA), por lo cual podría ser una mutación común en grupo étnico. Mediante SSCP se realizó el estudio a la familia de la paciente KC detectando la mutación en un hermano (JLC) y en el padre (LOC) (Figura IV.19).

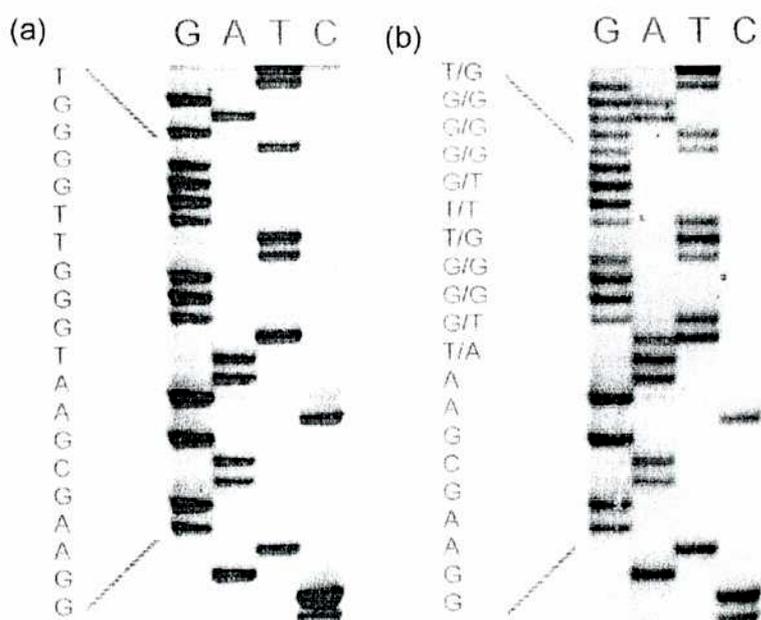


Figura IV.17. Secuenciación del exón 1 de un individuo normal (a) y de la paciente KC (b).

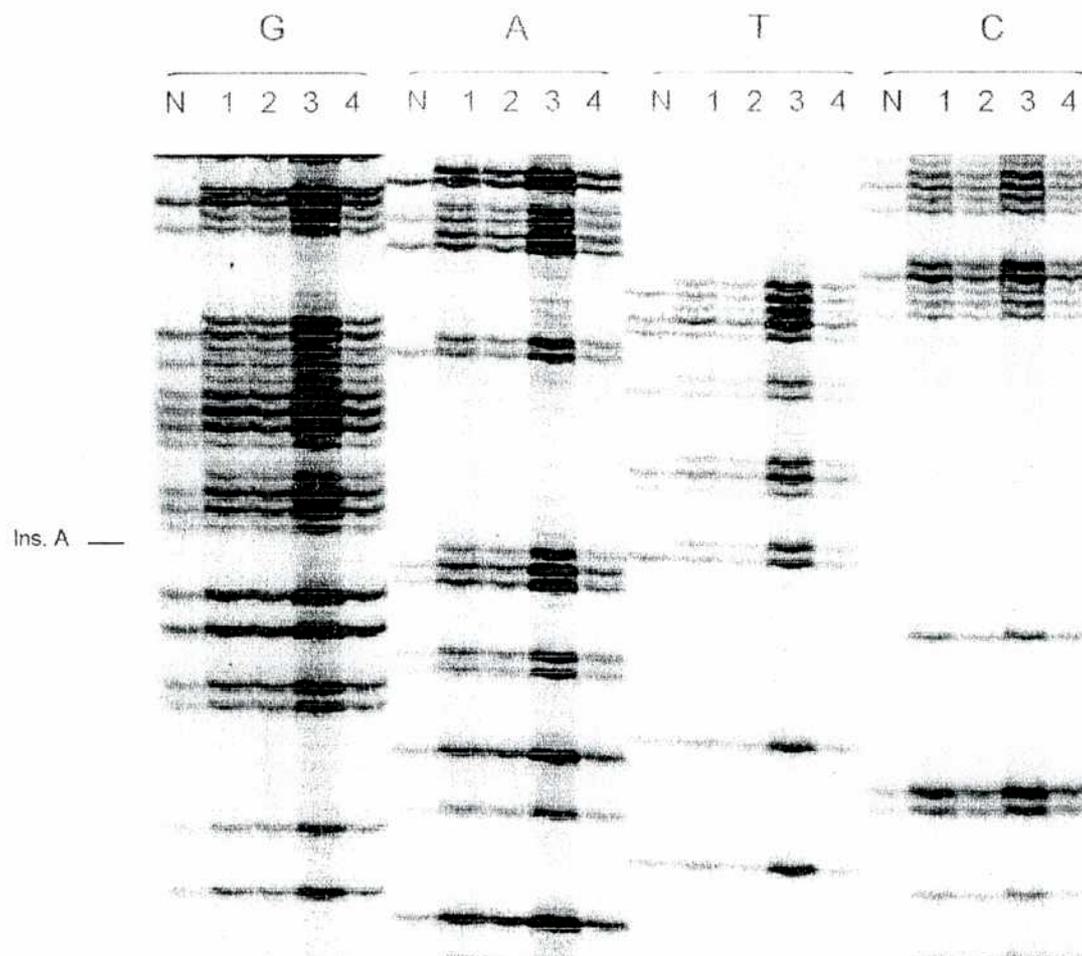


Figura IV.18. Secuenciación del exón 1 de un individuo normal (N) y de los pacientes KC, SV, JA y CA. (1, 2, 3 y 4)

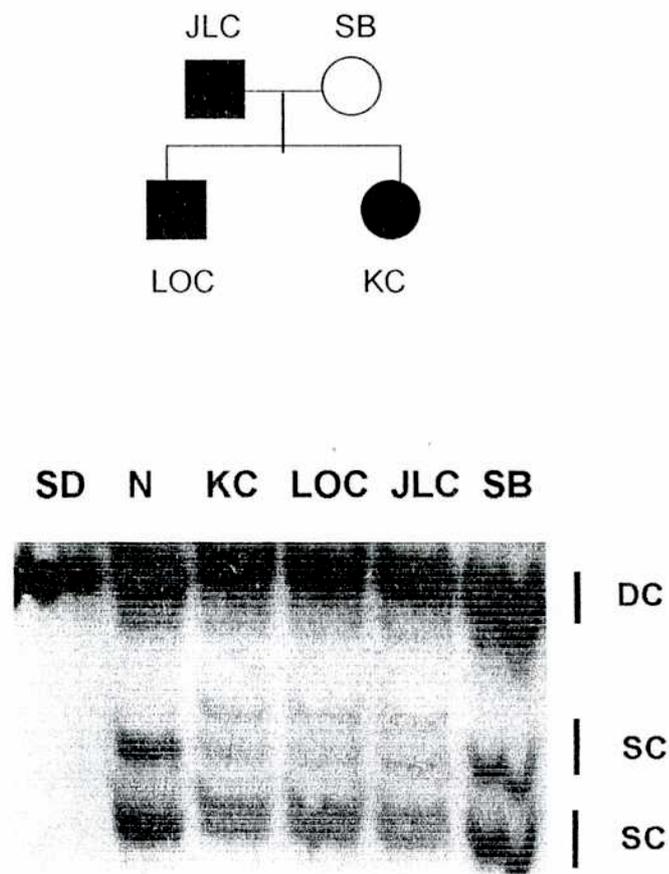


Figura IV.19. PCR-SSCP de un fragmento del gen de la URO-D que contiene el exón 1, en un individuo normal (a) y en KC, JLC, LOC y SB (b-e). ND: Fragmento sembrado sin desnaturalización. En el pedigree, los símbolos negros representan pacientes PCT.

IV.3. EXPRESION DE LAS MUTACIONES MISSENSE

Mediante la estrategia descrita en Materiales y Métodos se obtuvieron los clones portadores del pKK-UROD con la mutación introducida en cada caso, y libres de errores de PCR, los cuales se denominaron con el nombre de la

mutación: pKK-UROD-M165R; pKK-UROD-L195F; pKK-UROD-N304K y pKK-UROD-R332H. La secuenciación del vector, donde se observa la mutación introducida en cada caso se muestra en las Figuras IV.20, 21, 22 y 23

Se determinó la actividad específica de los cuatro clones mutantes así como del normal pKK-UROD y del clón que contiene el pKK sin el ORF de la UROD (pKK). La determinación enzimática se llevó a cabo en las bacterias inmediatamente después de un crecimiento de 3 horas en presencia o ausencia de IPTG 5 mM (Tabla IV.2). La mutación M165R en la cual una metionina altamente conservada se reemplaza por un aminoácido de muy diferentes propiedades ya que la Met es neutra e hidrofóbica mientras que la Arg es básica e hidrofílica, presentó una actividad residual menor al 0,5% del valor promedio expresado por el alelo normal, por lo cual la mutación produce una proteína inactiva o inestable o ambas cosas. Las mutaciones L195F, N304K y R332H expresaron proteínas mutantes con significativa actividad residual. La mutación L195F en la cual una Leu es reemplazada por un aminoácido aromático, la Phe, ambos hidrofóbicos y neutros, mostró una actividad residual superior al 30% del valor normal. En la mutación N304K, un aminoácido neutro, la Asp se reemplaza por una Lys, que es básico e hidrofílico, presentó una actividad residual menor al 20% del valor normal. Esta mutación se ubica dentro de un bloque de siete aminoácidos altamente conservados que podría ser importante para la función y/o estabilidad de la proteína. La mutación R332H en la cual un aminoácido hidrofílico básico es sustituido por un aminoácido básico y aromático, presentó mayor actividad que el normal, alcanzando en promedio casi un 30% más. De las mutaciones descritas previamente, la mutación G318R (McManus et al, 1996) al expresarse en *E. coli* también mostró actividad normal y no exhibió menor estabilidad a la degradación. La proteína mutante R332H tuvo una estabilidad térmica sensiblemente menor a la proteína normal cuando se incubaron a 37°C y pH 7, con una vida media de 40 minutos comparada con los 100 minutos de la proteína normal (Figura IV.24), lo cual explicaría su efecto en el desencadenamiento de la PCT.

Tabla IV.2: Determinación de URO-D en los clones normal y mutantes

	(-) IPTG	(+) IPTG	ACTIVIDAD RESIDUAL (+) IPTG
pKK	0,141 ± 0,016 (0,126-0,159) n = 3	0,134 ± 0,025 (0,107-0,162) n = 5	(0,134) 0%
pKK-UROD	6,305 ± 3,271 (3,809-10,870) n = 5	16,434 ± 5,691 (9,799-4,681) n = 8	(16,300) 100%
pKK-UROD-M165R	0,169 ± 0,013 (0,158-0,188) n = 4	0,208 ± 0,020 (0,182-0,230) n = 5	(0,074) 0,45%
pKK-UROD-L195F	2,435 ± 1,812 (1,132-5,025) n = 4	5,270 ± 2,942 (2,603-10,345) n = 6	(5,136) 31,51%
pKK-UROD-N304K	1,051 ± 0,440 (0,688-1,661) n = 4	3,211 ± 1,486 (1,609-5,074) n = 6	(3,077) 18,8%
pKK-UROD-R332H	8,252 ± 3,670 (4,120-13,164) n = 5	20,814 ± 4,899 (13,713-27,517) n = 8	(20,680) 126,87%

Actividad: nmol COPRO III/mg.h. (n: Número de experiencias)

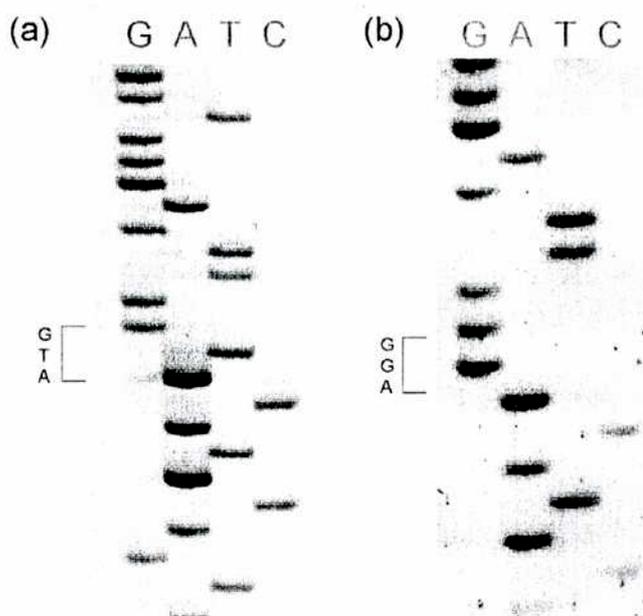


Figura IV.20. Mutación M165R: (a) pKK-UROD-M165R; (b) Secuencia normal.

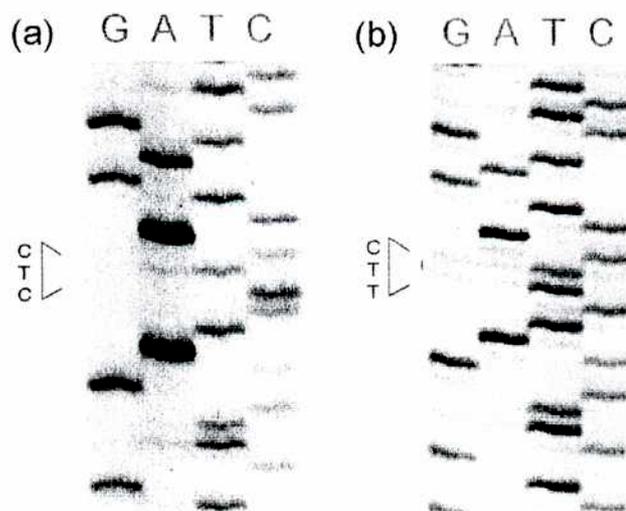


Figura IV.21. Mutación L195F: (a) pKK-UROD-L195F; (b) Secuencia normal.

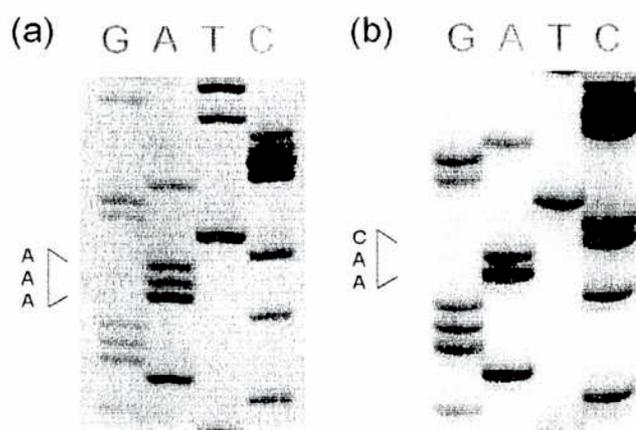


Figura IV.22. Mutación N304K: (a) pKK-URODN-304K; (b) Secuencia normal.

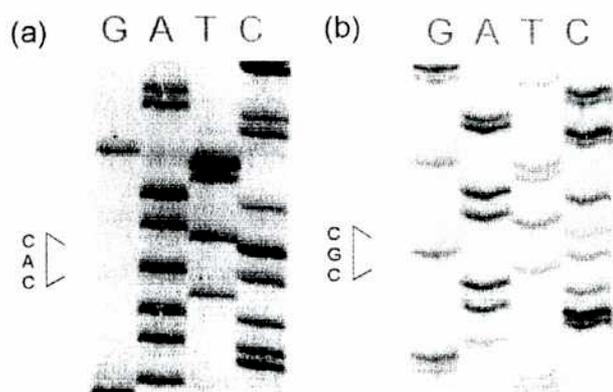


Figura IV.23. Mutación R332H: (a) pKK-UROD-R332H; (b) Secuencia normal.

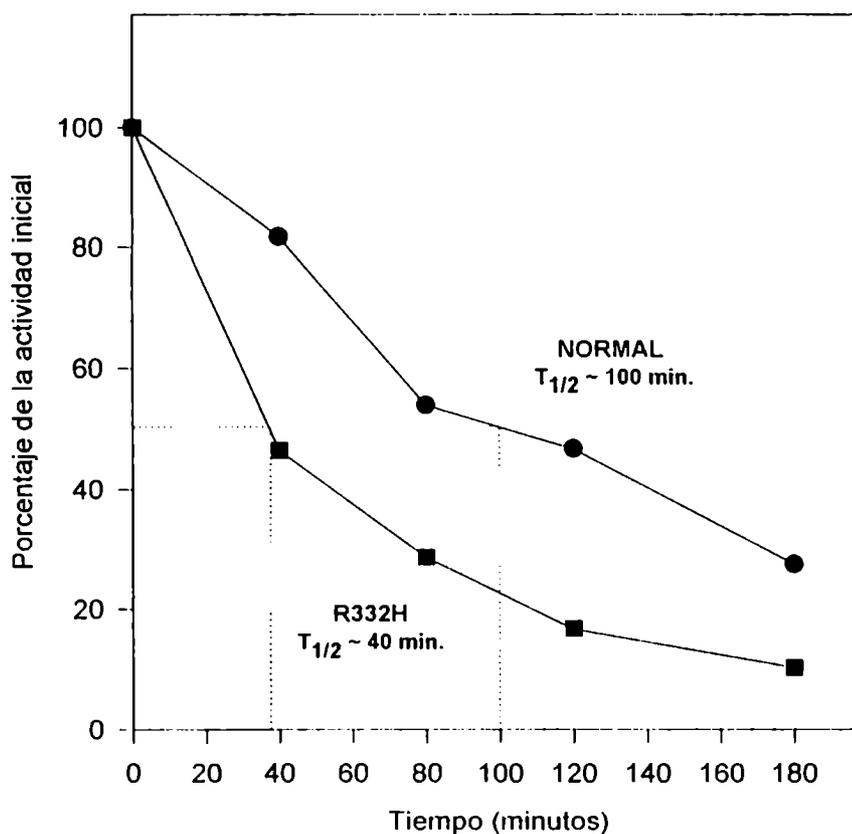


Figura IV.24. Termoestabilidad de las proteínas expresadas en *E. coli* por pKK-UROD y pKK-UROD-R332H. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad inicial basado en el promedio de dos inducciones independientes para la enzima normal y mutante.

La existencia de proteínas mutantes con significativa actividad residual sugieren la posibilidad de que los pacientes portadores presenten un fenotipo leve de la enfermedad o una predisposición menor a factores desencadenantes como el alcohol, compuestos policlorados y la sobrecarga de hierro, comparados con otros pacientes portadores de mutaciones más severas. Asimismo, las mutaciones en el

locus de la URO-D, según su severidad pueden presentarse en homocigosis o en forma de doble heterocigota, desencadenando un cuadro de PHE, mientras que en estado heterocigota y bajo ciertas circunstancias medioambientales podrían desencadenar un cuadro de PCT; por otro lado, las mutaciones altamente severas cuyos alelos no dan producto o el producto es inactivo, altamente inestable o ambos casos, no podrían encontrarse en estado homocigota ya que sería letal, y por lo tanto solamente podrían encontrarse en pacientes PCT o bien en heterocigotas compuestas, donde la mutación acompañante presente un fenotipo leve, de manera tal que el producto aunque mutante, pueda compensar la falta de actividad proveniente del otro alelo.

La identificación y caracterización de estas ocho mutaciones en el gen de la URO-D causantes de PCT-F duplican el número de mutaciones descritas en esta porfiria hasta el momento, elevando a 25 el número total de mutaciones identificadas en el gen de la URO-D, enfatizando la alta heterogeneidad molecular de esta porfiria, donde, en una población no estudiada anteriormente como es la nuestra, se encontraron 8 mutaciones nuevas en 13 familias no relacionadas. Estos resultados facilitarán el diagnóstico de individuos asintomáticos en las familias estudiadas y darán información para futuros estudios sobre la estructura y funcionalidad de la enzima humana.



IV.4. REFERENCIAS

Aebi, M.; Hornig, H.; Padgett, R.A.; Reiser, J. y Weissmann, C. (1986) Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. *Cell*. **47**: 555-565.

Garey, J.R.; Harrison, L.M.; Franklin, K.F.; Metcalf, K.M.; Radisky, E.S. & Kushner, J.P. (1990) Uroporphyrinogen decarboxylase: A splice site mutation causes the deletion of exon 6 in multiple families with porphyria cutanea tarda. *J. Clin. Invest.* **86**: 1416-1422.

Grandchamp, B.; Picat, C.; de Rooij, F. (1989) A point mutation G→A in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene results in exon skipping and is responsible for acute intermittent porphyria. *Nucleic Acid Res.* **17**: 6637-6649.

- Jackson, I.J. (1991) A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids. Res.* **19**: 3795-3798.
- Kornreich, R; Bishop, D. & Desnick, R.J. (1990) α -Galactosidase A gene rearrangements causing Fabry disease. *J. Biol. Chem.* **265**: 9319-9326.
- Krawczak, M; Rsis, J. & Cooper, D.N. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* **90**: 41-54.
- McManus, J.; Begley, C.; Ratnaik, I.; Hall, W. & Hall, E. (1995) A mutation previously described in hepato-erythropoietic porphyria observed in a patient diagnosed with familial porphyria cutanea tarda. *Scand. J. Clin. Inv.* **55**: Suppl. 223, Abstract 144.
- McManus, J.F.; Begley, C.G.; Sassa, S. & Ratnaik, S; (1996) Five new mutations in the uroporphyrinogen decarboxylase gene identified in families with cutaneous porphyria. *Blood*, **88** (9):, 3589-3600.
- Morán Jiménez, M.J.; Ged, C.; Romana, M.; Enríquez de Salamanca, R.; Taieb, A.; Topi, G.; D'Alessandro, L. & De Verneuil, H. (1996) Uroporphyrinogen decarboxylase: Complete human gene sequence and molecular study of three unrelated families with hepatoerythropoietic porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **58**: 712-721
- Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids. Res.* **10**: 459-472.
- Padgett, R.A.; Grabowski, P.J.; Konarska, M.M.; Seiler, S. & Sharp, P.A. (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 1119-1150.
- Roberts, A.G; Elder, G.H; Enríquez de Salamanca, R; Herrero, C; Lecha, M. & Mascaró, J.M. (1995) A mutation (G281E) of the human uroporphyrinogen decarboxylase gene causes both hepatoerythropoietic porphyria and overt familial porphyria cutanea tarda: biochemical and genetic studies in Spanish patients. *J. Invest. Dermatol.* **104**: 500-502.
- Weil, D.; D'Alessio, M.; Ramirez, F.; de Wet, W.; Cole, W.G.; Chan, D. & Bateman, J. (1989) A base substitution in the exon of a collagen gene causes alternative splicing and generates a structurally abnormal polypeptide in a patient with Ehlers-Danlos Syndrome Type VII. *EMBO J.* **8**. (6):1705-1710.