

Tesis de Posgrado

Genética molecular de la porfiria aguda intermitente : primer estudio en la población argentina

De Siervi, Adriana

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:

De Siervi, Adriana. (1998). Genética molecular de la porfiria aguda intermitente : primer estudio en la población argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3043_DeSiervi.pdf

Cita tipo Chicago:

De Siervi, Adriana. "Genética molecular de la porfiria aguda intermitente : primer estudio en la población argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3043_DeSiervi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**GENETICA MOLECULAR DE LA
PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.
PRIMER ESTUDIO EN LA POBLACIÓN ARGENTINA.**

Adriana De Siervi

15/2

TESIS DOCTORAL
Buenos Aires, 1998

TESIS DOCTORAL

**GENETICA MOLECULAR DE LA
PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.
PRIMER ESTUDIO EN LA POBLACIÓN ARGENTINA**

Adriana De Siervi

Directora: Prof. Dra. María Victoria Rossetti

Buenos Aires, 1998

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



A mis Padres y Esposo

INDICE

Agradecimientos	i
Abreviaturas	ii
Abreviaturas de los aminoácidos	iii
Código genético	iii

Parte 1. INTRODUCCIÓN	1
------------------------------	----------

Capítulo I. Camino metabólico del hemo	2
I.1. Porfirinas	2
I.1.1. Importancia biológica	2
I.1.2. Estructura y propiedades de precursores y porfirinas	2
I.2. Biosíntesis del hemo	4
I.3. Porfobilinógeno deaminasa: estructura y mecanismo de reacción	5
I.4. Regulación del camino biosintético del hemo	9
I.5. Referencias	12
Capítulo II. Desórdenes en la biosíntesis del hemo	16
II.1. Las porfirias y su clasificación	16
II.2. Generalidades de las Porfirias	18
II.3. Porfiria Aguda Intermitente	20
II.3.1. Sintomatología	20
II.3.2. Diagnóstico bioquímico	22
II.3.3. Tratamiento	23
II.4. Referencias	24

Capítulo III. Biología molecular de la PBG-D	28
III.1. Localización cromosómica	28
III.2. Isoformas de la PBG-D y cDNAs correspondientes	29
III.3. Organización del gen de la PBG-D humana	31
III.4. Elementos repetidos <i>Alu</i>	33
III.5. Polimorfismos en el gen de la PBG-D	33
III.6. Mutaciones en el gen de la PBG-D	35
III.7. Diagnóstico molecular de familias con PAI	40
III.8. Referencias	40

Parte 2. OBJETIVOS	46
---------------------------	-----------

Parte 3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
--------------------------------------	-----------

Capítulo I. Estudios bioquímicos	49
I.1. Pacientes	49
I.2. Determinación de ALA y PBG urinarios	49
I.3. Determinación de porfirinas totales urinarias	51
I.4. Determinación de la PBG-D en eritrocitos	51
I.5. Referencias	52

Capítulo II. Estudios genéticos	53
II.1. Metodología partiendo de RNA	53
II.1.1. Separación de linfocitos	54
II.1.2. Aislamiento de RNA total	54
II.1.3. Retrotranscripción y amplificación por PCR	56
II.1.4. Elución del cDNA amplificado	57
II.1.5. Amplificación asimétrica por PCR	57
II.1.6. Purificación del DNA simple cadena	57
II.1.7. Secuenciación directa del cDNA	58

II.1.8. Polimorfismo de conformación en simple cadena (SSCP)	59
II.2. Metodología partiendo de DNA	60
II.2.1. Extracción de DNA genómico	61
II.2.2. "Long range" PCR	61
II.2.3. Secuenciación	62
II.3. Detección rápida de mutación G111R por primer-ASO	64
II.4. Referencias	65
Capítulo III. Expresión procariótica	66
III.1. Metodología de expresión	66
III.2. Mutagénesis sitio dirigida	67
III.2.1. Mutación Q34P	67
III.2.2. Mutación G335S	67
III.3. Digestión del plásmido y del inserto	68
III.3.1. Mutación Q34P	68
III.3.2. Mutación G335S	68
III.4. Purificación y cuantificación del plásmido e inserto	69
III.5. Ligación del vector con el inserto	69
III.6. Preparación de células competentes	70
III.7. Transformación	70
III.8. Minipreparación del DNA plasmídico	71
III.9. Secuenciación de los clones	71
III.10. Medición de la actividad enzimática específica de la PBG-D	71
III.11. Referencias	72

Parte 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
--	-----------

Capítulo I. Análisis de la población argentina con PAI.

Estudios bioquímicos	75
I.1. Estudios bioquímicos	75
I.2. Análisis de la población argentina con PAI	77

I.3. Referencias	79
Capítulo II. Estudios genéticos. Desarrollo y optimización de las técnicas	80
II.1. Metodología partiendo de RNA	80
II.1.1. Separación de linfocitos	80
II.1.2. Aislamiento del RNA total	81
II.1.3. Retrotranscripción y amplificación por PCR	84
II.1.4. Amplificación asimétrica	87
II.1.5. Secuenciación directa	88
II.1.6. Condiciones finales elegidas para la metodología partiendo de RNA	89
II.2. Metodología partiendo de DNA	90
II.2.1. "Long range" PCR	90
II.2.2. Secuenciación directa	93
II.2.3. Detección rápida de mutación G111R por primer-ASO	94
II.3. Referencias	98
Capítulo III. Estudios genéticos. Diagnóstico de pacientes con PAI	99
III.1. Diagnóstico de la PAI	99
III.2. Mutación Q34P	99
III.3. Mutación G111R	103
III.4. Mutación Q204X	114
III.5. Mutación R173W	116
III.6. Mutación R201W	118
III.7. Mutación R173Q	119
III.8. Inserción A (666)	120
III.9. Deleción CT (728)	122
III.10. Mutación IVS12 ⁺¹	123
III.11. Deleción AGGA (815)	125
III.12. Deleción A (948)	127
III.13. Inserción C (913)	128
III.14. Mutación G335S	130
III.15. Deleción TTGGCTG (985)	132

III.16. Polimorfismos neutros	133
III.17. Conclusiones	135
III.17.1. Eficiencia y rapidez de la metodología empleada para el diagnóstico genético en pacientes con PAI	135
III.17.2. Mutaciones y polimorfismos neutros encontrados en la población argentina	136
III.17.3. Importancia del diagnóstico genético en pacientes con PAI	139
III.18. Referencias	139
Capítulo IV. Análisis de la mutación más frecuente en la población argentina con PAI	141
IV.1. Origen de las familias portadoras de la mutación G111R	141
IV.2. Detección rápida de la mutación G111R	142
IV.3. Relación de los datos clínicos y bioquímicos con el tipo de mutación encontrada	143
IV.4. Referencias	145
Capítulo V. Expresión procariótica de dos mutaciones puntuales nuevas. Análisis de la estructura de los mutantes	146
V.1. Expresión procariótica de las mutaciones: Q34P y G335S	146
V.2. Análisis de la estructura de los mutantes: Q34P y G335S	147
V.3. Otras mutaciones nuevas de la PBG-D: análisis de su estructura	148
V.4. Mutaciones de la PBG-D previamente publicadas: análisis de su estructura	149
V.5. Referencias	150
Parte 5. CONCLUSIONES	152

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- ◆ A mi esposo Eduardo, por haberme ayudado a tener confianza en mi misma en todos los momentos difíciles de este trabajo y por sus incontables y alentadoras charlas que me ayudaron a crecer profesionalmente. Porque sin su amor y comprensión jamás hubiera podido desarrollar esta Tesis.
- ◆ A mis padres, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera. Porque me enseñaron a superarme día a día y, fundamentalmente, por quererme tanto como yo los quiero a ellos.
- ◆ A mi hija Camila, que desde la "pancita" me ayudó a redactar esta Tesis y hoy me da alegría y amor todos los días.
- ◆ A mi hermano, Claudio y su familia: Andrea, Melisa y Micaela, por estar siempre presentes; y especialmente a Claudio por su inigualable ayuda con la computadora.
- ◆ A Alcira, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en el CIPYP y en el Departamento de Genética Humana del Hospital Mount Sinai, New York.
- ◆ A María Victoria, por dirigir esta Tesis confiando en mí desde el principio. Por valorar mi trabajo permanentemente, sobre todo en los momentos difíciles. Por compartir una gran amistad siempre y, principalmente en USA, donde más la necesité.
- ◆ A Vicky, por su importantísima contribución con los estudios bioquímicos y la atención de los pacientes.
- ◆ Al Dr. Robert J. Desnick por permitirme desarrollar una parte muy importante de esta Tesis en el Mount Sinai Hospital.
- ◆ A Cuqui, por su apoyo científico pero fundamentalmente, porque siempre pude contar con su maravillosa amistad.
- ◆ A Manuel, por su amistad, porque me ayudó a ingresar al CIPYP y por los tan agradables momentos compartidos.
- ◆ A Laura, por los momentos lindos compartidos, por su paciencia y por sus consejos referentes a la escritura de este trabajo.
- ◆ A Adriana, Carina, Alejandra y Marcelo por su invalorable amistad.
- ◆ A Alejandra, Leo, Marcela, Gustavo, Fernanda y Cuqui porque gracias a su amistad y sus cartas me permitieron sobrellevar la estadía en USA.
- ◆ A Héctor Muramatsu, Laura Dato y Beatriz Riccilo por su valiosa colaboración con la atención de los pacientes.
- ◆ A todo el personal del CIPYP por los gratos momentos compartidos durante esta Tesis.
- ◆ A la UBA y al CONICET por los subsidios y becas otorgados.

Abreviaturas

A	Adenina
ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico dehidrasa
ALA-S	Acido δ -aminolevúlico sintetasa
C	Citosina
cDNA	Acido desoxirribonucleico copia
COPROgen	Coproporfirinógeno
CPGasa	Coproporfirinogenasa
CPH	Coproporfiria Hereditaria
CRIM	Material inmunológico de Reacción Cruzada
Del	Delección
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAsc	Acido desoxirribonucleico simple cadena
dNTP	Desoxinucleótido tri-fosfato
G	Guanina
HMB	Hidroximetilbilano
HMB-S	Hidroximetilbilano sintetasa
Ins	Inserción
LR-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa Long range
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NPA	Nueva porfiria aguda
PAI	Porfiria aguda intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBG-D	Porfobilinógeno deaminasa
PCE	Porfiria congénita eritropoyética
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT	Porfiria cutánea tarda
PHE	Porfiria hepatocritropoyética
PPE	Protoporfiria eritropoyética
PPGox	Protoporfirinógeno oxidasa
PPL	Fosfato de piridoxal
primer-ASO	primer-Oligonucleótido alelo específico
PROTO	Protoporfirina
PROTOgen	Protoporfirinógeno
PV	Porfiria variegata
RFLP	Polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción
RNA	Acido ribonucleico
RNAsas	Ribonucleasas
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción- Reacción en cadena de la polimerasa
SSCP	Polimorfismos de conformación en simple cadena
T	Timina
URO-D	Uroporfirinógeno decarboxilasa
UROgen	Uroporfirinógeno

Abreviaturas de los aminoácidos

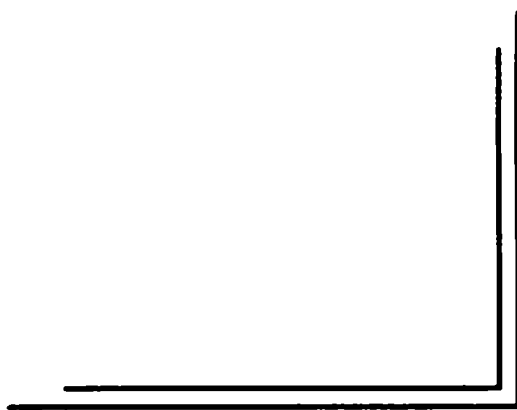
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Trconina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Código genético

Primera posición (extremo 5')	Segunda posición				Tercera posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G



INTRODUCCION



CAPÍTULO I. Camino metabólico del hemo.

I.1. Porphirinas

I.1.1. Importancia biológica

Las porfirinas poseen un papel central en los sistemas vivos. En la biosfera, estos compuestos intervienen en procesos de captura y utilización de energía (Adler *et al.*, 1975). La formación abiótica de las porfirinas y, en particular de los uroporfirinógenos, hizo posible y aumentó la eficiencia de los procesos de óxido-reducción que ocurrían en la atmósfera primitiva anaeróbica, transformándola en aeróbica. La participación de las porfirinas en estos cambios fundamentales de la evolución de nuestro planeta, destaca la significativa importancia de estos pigmentos.

Toda la energía consumida por los seres vivos procede de la energía solar capturada durante la fotosíntesis. El primer paso de este proceso es la absorción de la luz por una molécula fotorreceptora: la clorofila, una porfirina que contiene magnesio. En el proceso respiratorio de las células eucariotes, el hemo, una porfirina que contiene hierro, cumple una función similar. En consecuencia, el metabolismo de las porfirinas es uno de los atributos fundamentales de las células y, hasta el momento, se ha establecido que todas las formas de vida emplean el mismo camino para sintetizar los denominados pigmentos de la vida: hemoglobina y clorofila. Encontramos una estructura parecida en la vitamina B12, en cuyo caso la porfirina está formando un quelato con cobalto.

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

El ácido δ -aminolevúlico (ALA) y el porfobilinógeno (PBG) (Figura I.1) se identifican comúnmente como los precursores de las porfirinas, y son en realidad entidades únicas que llevan

específicamente a la síntesis de los tetrapirroles. ALA y PBG son moléculas relativamente simples que de acuerdo a su estructura química son altamente solubles en agua por lo cual se excretan sin dificultad por orina. Estos compuestos son fácilmente separables e identificables por medio de cromatografía de intercambio iónico y simples reacciones de coloración.

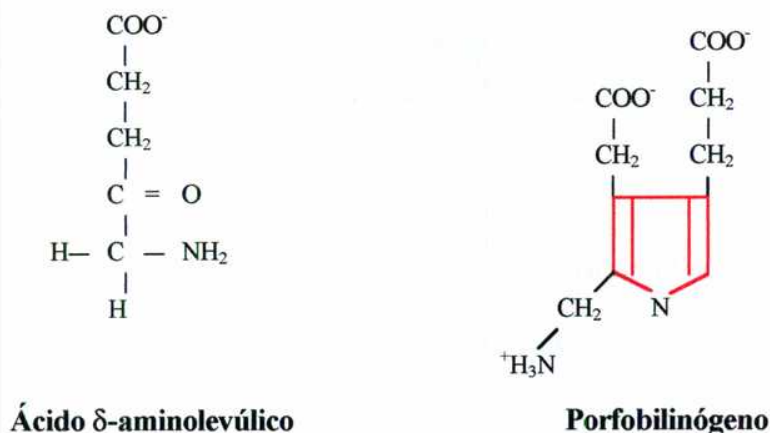


Figura I.1. Estructura de los precursores de las porfirinas: ALA y PBG.

Las porfirinas son, en cambio, tetrapirroles cíclicos que contienen cuatro anillos pirrólicos designados como A, B, C y D, unidos por puentes metilenos α, β, γ y δ (Figura I.2).

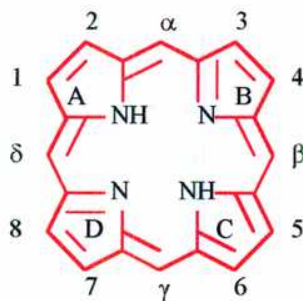


FIGURA I.2. Núcleo de la porfirina.

La existencia de dobles enlaces conjugados en la molécula la transforma en plana, resonante y altamente resistente a las modificaciones químicas. Esta rígida estructura planar contiene 8 cadenas laterales unidas en las posiciones β-carbono de cada anillo pirrólico, que según la nomenclatura de

Fischer, son numeradas del I al 8 desde el anillo A (Figura I.2). El tipo de cadena lateral determina las características físicas de la porfirina resultante.

Los intermediarios normales en la célula no son las porfirinas, sino los porfirinógenos, en los cuales los 4 puentes metilénicos están reducidos. Así, mientras las porfirinas exhiben una estructura altamente conjugada de dobles ligaduras alternadas y por ello presentan una notable coloración y emiten una intensa fluorescencia roja a la luz UV; los porfirinógenos son incoloros y no fluorescen. Estas propiedades son sumamente útiles para su detección, identificación y cuantificación en muestras biológicas.

I.2. Biosíntesis del hemo

Los primeros estudios sobre estos pigmentos provienen de la escuela de Hans Fischer, quien logró sintetizar químicamente hemina (Fischer *et al.*, 1937). Posteriormente varios grupos de investigadores contribuyeron a la elucidación de este camino biosintético.

El primer paso en la biosíntesis de porfirinas es la condensación de glicina y Succinil CoA para formar ácido δ -aminolevúlico (ALA) (Figura I.3). Esta reacción está catalizada por la enzima mitocondrial δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) que requiere fosfato de piridoxal (PPL) como cofactor. En la mayoría de los organismos estudiados esta etapa es la limitante, existiendo un control por retroinhibición y represión ejercido por el producto final hemo, sobre el ALA-S.

La biosíntesis procede a través del ALA hacia la formación del monopirrol no saturado heterocíclico, porfobilinógeno (PBG), en presencia de la enzima citoplasmática ALA Dehidrasa (ALA-D). Esta es una proteína octamérica y requiere cuatro átomos de zinc para expresar su actividad. Para que esta reacción se produzca, el ALA debe atravesar las membranas mitocondriales mediante un sistema de transporte activo (Bermúdez Moretti *et al.*, 1993; 1996), lo que constituiría otro paso regulatorio en este camino metabólico.

Una etapa crítica es la unión posterior de cuatro moléculas de PBG para formar el uroporfirinógeno (UROgen) de la serie III, por acción combinada de dos enzimas citoplasmáticas,

PBG Deaminasa (PBG-D), también llamada Hidroximetilbilano Sintetasa (HMB-S), y UROgen III cosintetasa o Isomerasa. La primera une 4 unidades de PBG en el sentido "cabeza-cola", produciendo un tetrapirrol lineal o HMB que en ausencia de la segunda enzima, se cicla espontáneamente a UROgen I, pero en su presencia, la Isomerasa rota el anillo pirrólico D y luego tiene lugar la ciclación, formando el UROgen III.

El esqueleto de la porfirina ya está formado. Las reacciones siguientes alteran las cadenas laterales y el grado de saturación del anillo de porfirina. La próxima etapa es la decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del UROgen III por acción de la UROgen decarboxilasa (URO-D) citosólica para formar el coproporfinógeno III (COPROgen III). La URO-D puede actuar sobre el UROgen I produciendo el COPROgen I. Sin embargo, aunque se pueden encontrar porfinógenos con 8 a 4 carboxilos de la serie I, solamente el COPROgen III se decarboxila oxidativamente a protoporfinógeno IX (PROTOgen IX) por medio de la coproporfinogenasa (CPGasa) mitocondrial. En consecuencia, cuando bajo ciertas condiciones se forman isómeros de la serie I, entre UROgen I y COPROgen I, éstos necesariamente se acumulan y excretan. La protoporfinógeno oxidasa (PPGox) elimina luego seis átomos de hidrógeno para formar la protoporfirina IX (PROTO IX). La última etapa de la secuencia implica la inserción del hierro en el anillo porfirínico, por acción de la Ferroquelatasa, formando el hemo, que es el grupo prostético de varias proteínas, entre ellas, la mioglobina, hemoglobina, catalasa, peroxidasa y citocromo c (Battlle & Magnin 1988).

I.3. Porfobilinógeno deaminasa: estructura y mecanismo de reacción

La PBG-D cataliza la deaminación y la polimerización de cuatro moléculas de PBG para formar el intermediario de cadena abierta HMB mediante una secuencia ordenada de reacciones en la cual la primer molécula de PBG forma el anillo A, las siguientes el B, el C y finalmente el D (Battersby *et al.*, 1979).

La importancia de esta enzima radica en ser la que genera la primer estructura tetrapirrólica. Por una deficiencia primaria de esta proteína se produce una disminución en la síntesis de hemo y

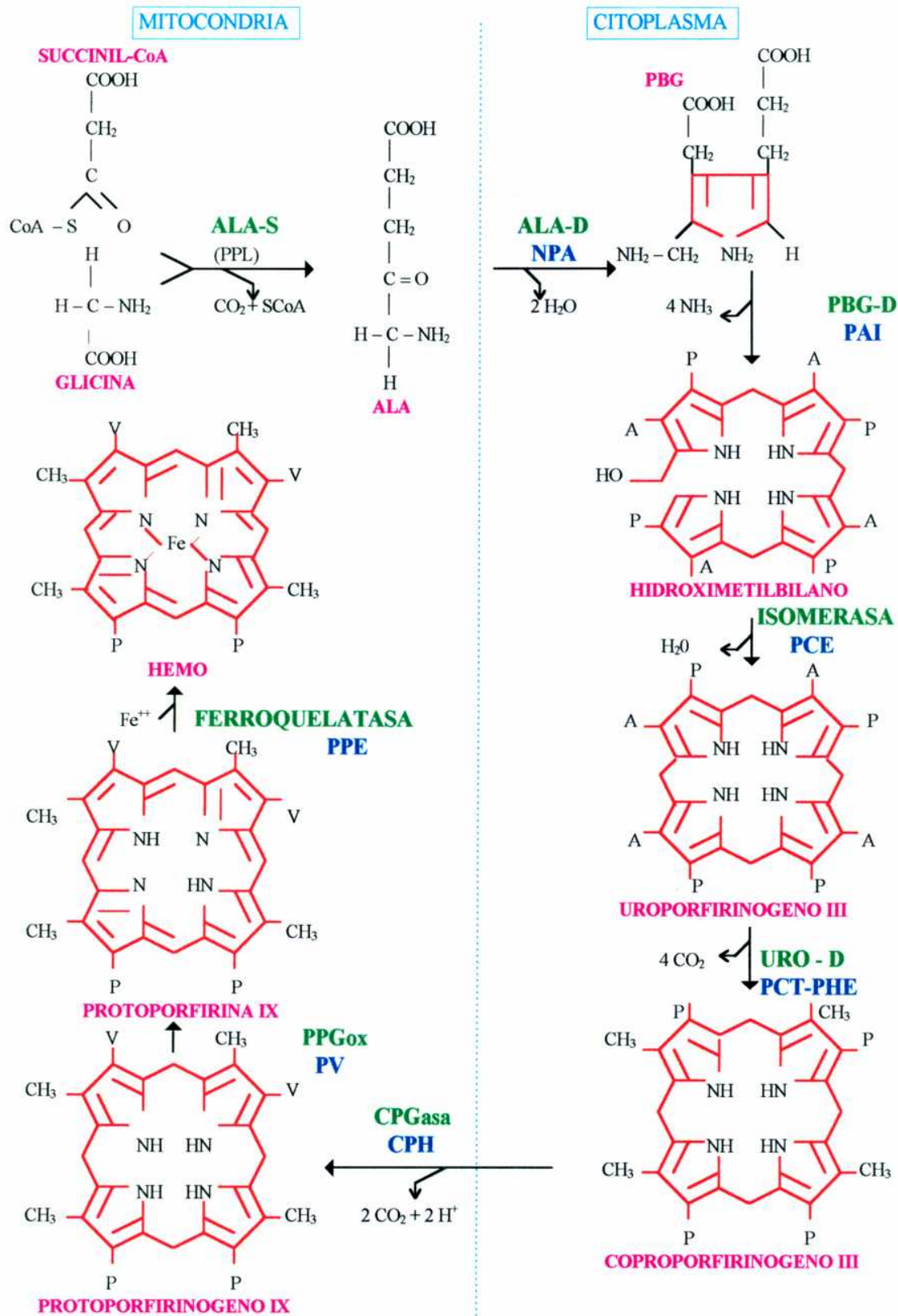


Figura I.3. Camino biosintético del hemo. En verde se indica la enzima involucrada en cada etapa: **ALA-S**= δ -aminolevulónico sintetasa; **ALA-D**= δ -aminolevulónico dehidrasa, **PBG-D**= Porfobilinógeno deaminasa, **URO-D**= Uroporfirinógeno decarboxilasa, **CPGasa**= Coproporfirinogenasa, **PPGox**= Protoporfirinogenasa. En azul se indica la porfiria asociada a cada falla enzimática: **NPA**= Nueva Porfiria Aguda; **PAI**= Porfiria Aguda Intermitente; **PCE**= Porfiria Congénita Eritropoyética; **PCT**= Porfiria Cutánea Tarda; **PHE**= Porfiria Hepatoeritropoyética; **CPH**= Coproporfiria Hereditaria; **PV**= Porfiria Variegata; **PPE**= Protoporfiria Eritropoyética. **A** = $-\text{CH}_2\text{COOH}$; **P** = $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; **V** = $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

una acumulación de precursores. Por otro lado, la PBG-D cumpliría un rol regulatorio secundario en la biosíntesis de porfirinas, ya que en ciertas condiciones la actividad de la misma se convierte en otro paso limitante de la velocidad de síntesis de hemo debido a su baja actividad en hígado (Moore *et al.*, 1980).

La PBG-D se purificó tanto de organismos procariotas como de eucariotas incluyendo eritrocitos de pollo (Llambías & Batlle, 1971a), eritrocitos humanos (Anderson & Desnick, 1980; Fumagalli *et al.*, 1985), hígado bovino (Sancovich *et al.*, 1969), callos de soja (Llambías & Batlle, 1971b), hígado de rata (Mazzetti & Tomio, 1988), glándula de Harder (Cardalda, 1996), *Euglena gracilis* (Rossetti *et al.*, 1980; Williams *et al.*, 1981), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Jordan & Shemin, 1973), *Rhodopseudomonas palustris* (Kotler *et al.*, 1987 a,b; 1990), *Scenedesmus obliquus* (Juknat *et al.*, 1994), *Arabidopsis thaliana* (Jones & Jordan, 1994), *Escherichia coli* (Thomas & Jordan, 1986; Hart *et al.*, 1986) y *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García *et al.*, 1991). También se aisló de plantas como espinaca (Higuchi & Bogorad, 1975) y arveja (Spano & Timko, 1991).

En todas las fuentes estudiadas esta enzima es monomérica, con un peso molecular entre 33 y 45 KDa (Llambías & Batlle, 1971 a, b; Rossetti *et al.*, 1980; Jordan & Shemin, 1973; Sancovich *et al.*, 1969), a excepción de *R. palustris* (Kotler *et al.*, 1987 a). Como la mayoría de las enzimas del camino biosintético del hemo la PBG-D es una proteína sulfhidrónica; los inhibidores de tioles afectan la formación de porfirinas ya que estos grupos estarían involucrados en la formación del HMB.

El estudio de la estructura de la PBG-D avanzó sustancialmente a través del clonado, secuenciación y cristalización de la enzima de *Escherichia coli* (Jordan *et al.*, 1988). La secuencia de aminoácidos se determinó en un amplio rango de organismos, y se comprobó que está muy conservada. Hay 58 residuos invariantes (18 %) y un 43 % de homología entre la estructura primaria de *E. coli* y humana. Los aminoácidos conservados se encuentran agrupados en un "core" hidrofóbico de la molécula, en otras localizaciones conformacionalmente importantes y en el sitio activo. Las enzimas ubicua y eritroide poseen una inserción de 29 residuos en el dominio 3 comparada con la de *E. coli*.

La estructura de rayos X de la enzima de *Escherichia coli* (Louie *et al.*, 1992) reveló su estructura tridimensional obteniéndose así un modelo molecular detallado. Este mostró que una cadena polipeptídica de 313 aminoácidos se pliega en tres dominios de aproximadamente el mismo tamaño. Cada uno de ellos contiene una estructura secundaria de hoja plegada β y α hélice, y un "core" hidrofóbico con contacto polar entre los dominios lo cual sugiere que se trata de una estructura flexible. La comparación de las secuencias alineadas con la enzima plegada permite determinar la organización estructural relativa de la PBG-D humana (Figura I.4). Todas las uniones exón/intrón se encuentran en los "loops" que conectan los elementos de estructura secundaria.

La secuencia exacta de los pasos que involucran el ensamble del HMB en la PBG-D fue motivo de varias investigaciones (Jordan & Warren, 1987; Warren & Jordan, 1988). Se identificó un grupo prostético de esta enzima, el cofactor dipirrometano (Jordan & Warren, 1987; Warren & Jordan, 1988; Hart *et al.*, 1987), formado por dos unidades de porfobilinógeno (Figura I.5).

El cofactor se encuentra en una hendidura entre los dominios 1 y 2 (Loiue *et al.*, 1992) unido covalentemente al átomo sulfuro de la cys 242 del dominio 3. Actúa como iniciador para la extensión del tetrapirrol lineal (HMB) y permanece unido a la enzima cuando se genera el producto. Esto ocurre a través de la condensación secuencial de cuatro moléculas de PBG con la enzima produciendo complejos intermediarios llamados ES, ES₂, ES₃ y ES₄ (Figura I.5), que han sido purificados por cromatografía de intercambio iónico (Warren & Jordan, 1988). Sin embargo, recientemente se ha descrito otro mecanismo (Jordan *et al.*, 1996), según el cual se indica que el preuroporfirinógeno, mas que el PBG, sería el precursor preferido por el cofactor dipirrometano.

El aspartato-84 se identificó a partir de la estructura de rayos X como un grupo catalítico clave (Woodcock & Jordan, 1994). Mutagénesis sitio-dirigida de este aminoácido a glutamato (D84E) generó una enzima con menos del 0,5 % de actividad catalítica, mientras que mutaciones a alanina (D84A) o asparragina (D84N) produjeron enzimas completamente inactivas (Woodcock & Jordan, 1994).

Los cuatro grupos carboxílicos del cofactor dipirrometano interactúan con residuos arginina altamente conservados en las posiciones 131, 132, 149 y 155 de la enzima de *E. coli*. Alteración de

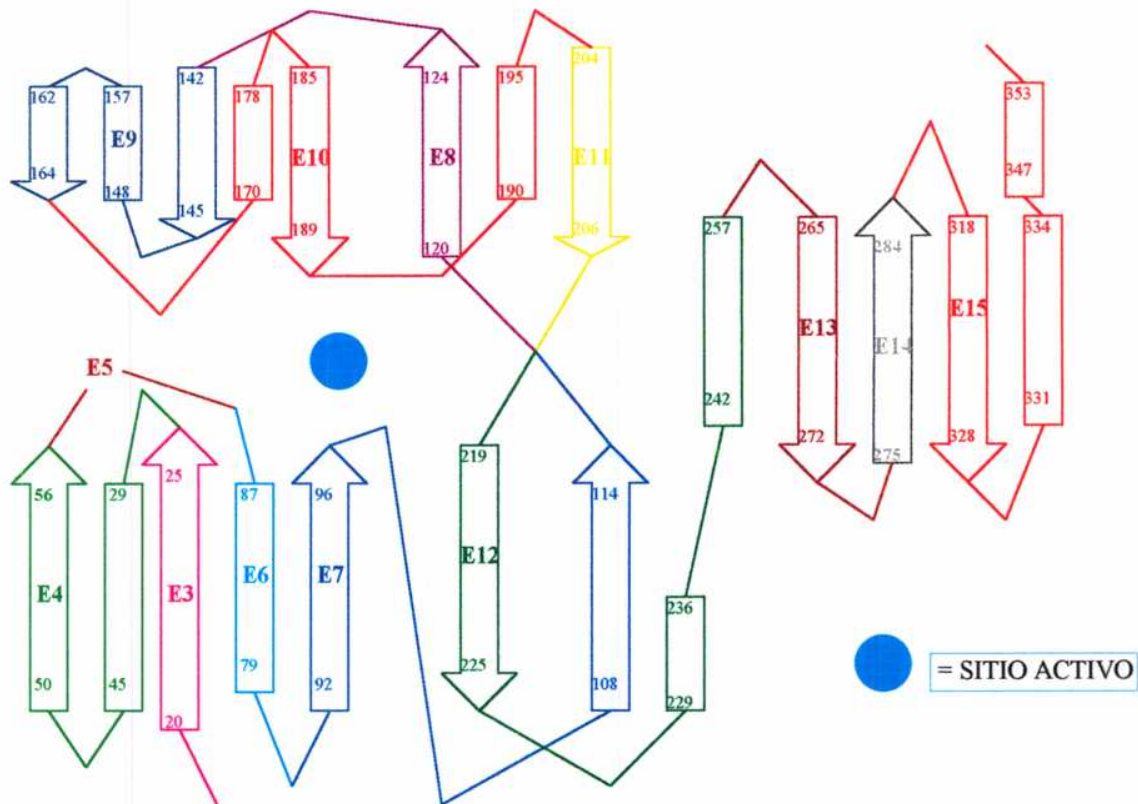


Figura I.4. Representación esquemática de la estructura secundaria de la PBG-D humana basada en la estructura cristalográfica de *E. coli*.

La estructura de α hélice se indica con rectángulos y la hoja plegada β con flechas. Los colores en la cadena polipeptídica indican los 15 exones en el gen humano. Se indican los residuos que limitan cada elemento estructural (Brownlie *et al.*, 1994).

las argininas 131 ó 132 por mutagénesis sitio-dirigida genera una proteína mutante incapaz de unirse al cofactor (Lander *et al.*, 1991; Jordan & Woodcock, 1991).

I.4. Regulación del camino biosintético del hemo

En la biosíntesis del hemo están involucradas ocho enzimas (Figura I.3); todas han sido intensamente investigadas. La primera y las tres últimas están localizadas en la mitocondria, mientras que las cuatro restantes están en el citosol.

Como se ha señalado la actividad de la primera enzima, ALA-S, es la etapa limitante y existe un control por retroinhibición y represión ejercido por el producto final hemo.

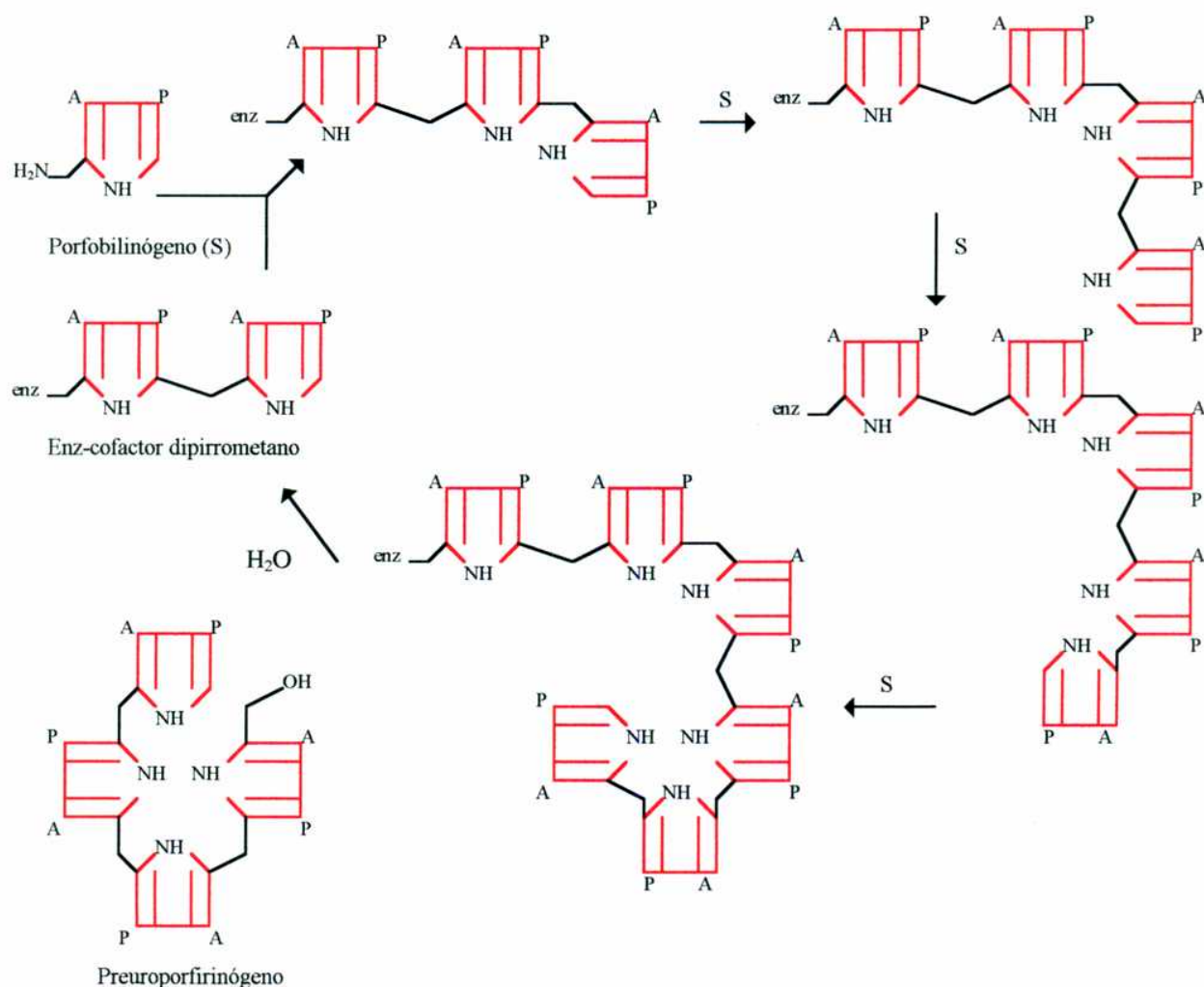


Figura I.5. Etapas del ensamblaje del preuroporfinógeno producido por la enzima porfobilinógeno deaminasa utilizando como iniciador el cofactor dipirrometano. A=CH₂CO₂H; P=CH₂CH₂CO₂H; enz=enzima PBG-D (Jordan *et al.*, 1996).

El ALA-S es una enzima muy inestable, con una vida media corta *in vivo*. Esta característica lleva a que su actividad se regule a través de un control sobre su mecanismo de síntesis, precisamente sobre la base de estos cambios en la actividad del ALA-S es que se considera a esta enzima como el principal punto de control de la biosíntesis del hemo.

Se acepta que los niveles de ALA-S en hígado están regulados por el producto final del camino y se han postulado varios mecanismos para explicar la acción del hemo sobre el ALA-S.

La segunda etapa en el camino del hemo está catalizada por la enzima ALA-D. Excepto en unas pocas fuentes en las cuales esta enzima actuaría como regulatoria (Ebbon & Tait, 1969; Muthykrishnan *et al.*, 1969; Viale 1978; Araujo *et al.*, 1989; Alvares *et al.*, 1972; Paveto *et al.*, 1989; Jayaraman *et al.*, 1991; De Bonis *et al.*, 1992), en la mayoría de los tejidos su actividad es muy superior a la del ALA-S y se considera que no desempeña ningún papel con respecto al control de la biosíntesis de porfirinas. Por el contrario, el ALA-D sería la enzima que se encuentra en exceso en cuanto a su cantidad y actividad en comparación con cualquiera de las demás enzimas del hemo.

Una de las etapas del camino del hemo que más especulación e interés ha estimulado es la que involucra la ciclotetramerización enzimática del PBG en uroporfirinógenos. Existe una abundante información acerca del sistema enzimático que cataliza esta reacción (Batlle & Rosetti, 1977). Se ha establecido que en esta conversión se requieren dos enzimas: la PBG-D y la isomerasa.

También se ha comentado que la actividad de PBG-D en hígado es generalmente baja y en algunos casos cercana al orden de la del ALA-S (Hutton & Gross, 1970). Por esta razón se ha propuesto que bajo ciertas circunstancias la PBG-D constituiría un segundo punto de control de la síntesis del hemo (Moore *et al.*, 1980).

Sobre el COPROgen III actúa la enzima coproporfirinogenasa (CPGasa) que cataliza la decarboxilación oxidativa de dos de las cadenas laterales de ácido propiónico en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B a dos grupos vinilos para formar el PROTOgen IX. Estudios realizados con la CPGasa de levadura (Zagorec & Labbe-Bois, 1986) han demostrado que la síntesis de esta enzima está sujeta a un control negativo por parte del hemo y del oxígeno a nivel pre-traducciona, constituyendo así un punto adicional de regulación del camino del hemo, por lo menos en este tipo de organismos.

La última etapa de la vía del hemo involucra la Ferroquelatasa, y se propuso que el funcionamiento de esta enzima está regulado por el aporte de sus sustratos (hierro y protoporfirina IX) y quizás de manera más importante, por la demanda de hemo por parte de las distintas apoproteínas sintetizadas a diferentes velocidades, dependiendo de las condiciones fisiológicas de las células (Labbe-Bois 1990).

I.5. Referencias

- Adler, A.D.; Varadi, V. & Wilson, N. (1975) Porphyrins power and pollution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **244**:685-694.
- Alvares, A.P.; Leigh, S.; Cohn, J. & Kappas, A. (1972) Lead and methyl mercury. Effects of acute exposure on cytochrome P450 and the mixed function oxidase system in the liver. *J. Exp. Med.* **135**:1406-1409.
- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980) Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **255**:1993-1999.
- Araujo, L.S., Lombardo, M.E., Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1989) Modelo experimental de porfiria en una mutante hemo-deficiente de *Saccharomyces cerevisiae*. *An. Asoc. Quím. Argent.* **77**:57-62.
- Batlle, A.M. del C. & Magnin, P.H. (1988) Porfirias humanas y experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. Actualizaciones Médico-Bioquímicas. *Acta Bioquím. Clin. Latinoamer. Sup.* **2**:3-52.
- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977) Enzymatic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Int. J. Biochem.* **8**:251-267.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & McDonald, E. (1979) Proof by synthesis that unrearranged hydroxymethylbilane is the product from deaminase and the substrate for cosynthetase in the biosynthesis of UROGEN III. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1155-1158.
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Ramos, E. & Batlle, A.M. del C. (1993) δ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **25**:1917-1924.
- Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.; Ramos, E. & Batlle, A.M. del C. (1996) δ -aminolevulinic acid uptake is mediated by the γ -aminobutyric acid-specific permease UGA 4. *Cell. Mol. Biol.* **42**:519-523.
- Cardalda, C. (1996) Porfobilinógeno deaminasa de glándula de Harder de rata. Purificación, propiedades y secuenciación. *Tesis doctoral, UBA*.
- Correa García, S.R.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1991) Different porphobilinogen deaminase forms in wild and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. A possible correlation with its segregant behaviour. *Int. J. Biochem* **23**:1019-1023.
- De Bonis, A.F.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1992) Delta-aminolevulinate dehydratase from free-living *Rhizobium*. *Int. J. Biochem.* **24**:1841-1847.
- Ebbon, J.G. & Tait, G.H. (1969) Studies on S-adenosylmethionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase in *Euglena gracilis* Strain Z. *Biochem. J.* **111**:573-582.
- Fischer, H. & Orth, H. Die chemie des pyrrols II (1937) Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig. Photostatic Editions. Ann. Arbor Univ. Press 1946 and Johnson Reprint Corp. New York, 1968.
- Fumagalli, S.A.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1985) Human red cell porphobilinogen deaminase. A simpler method of purification and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* **17**:485-494.
- Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1986) Purification, N- terminal amino acid sequence and properties of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**:273-276.

- Hart, G.J.; Miller, A.D.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1987) Biosynthesis of natural porphyrins: proof that hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) uses a novel binding group in its catalytic action. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1762-1765.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) The purification and properties of uroporphyrinogen I synthase and uroporphyrinogen III cosynthase. Interactions between the enzymes. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 244:401-408.
- Hutton, J.J. & Gross, S.R. (1970) Chemical induction of hepatic porphyrin in inbred strains of mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 141:284-292.
- Jayaraman, J.; Padmanaban, G.; Malathi, K. & Sarma, P.S. (1991) Haem synthesis during mitochondriogenesis in yeast. *Biochem. J.* 121:531-535.
- Jones, R.M. & Jordan, P.M. (1994) Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 299:895-902.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973) Purification and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Biol. Chem.* 248:1019-1024.
- Jordan, P.M.; Thomas, S.D. & Warren, M.J. (1988) Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* 254:427-435.
- Jordan, P.M. & Warren, M.J. (1987) Evidence for a dipyrromethane cofactor at the catalytic site of *E. coli* porphobilinogen deaminase. *FEBS. Lett.* 225:87-92.
- Jordan, P.M.; Warren, M.J. & Awan, S.J. (1996) Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of Porphobilinogen deaminase holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme. *Biochem. J.* 316:373-376.
- Jordan, P.M. & Woodcock, S.C.; (1991) Mutagenesis of Arginine residues in the catalytic cleft of *E. coli* porphobilinogen deaminase which affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation. *Biochem. J.* 280:445-449.
- Juknat, A.A.; Dörmemann, D. & Senger, H. (1994) Purification and kinetic studies on a porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Planta.* 193:123-130.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M.del C. (1987 a) Porphyrin biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. -VIII Purification and properties of deaminase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B:601-606.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M.del C. (1987 b) Porphyrin biosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. -IX PBG-deaminase. Kinetic studies. *Int. J. Biochem.* 19:981-985.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M.del C. (1990) Immobilized uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:252-257.
- Labbe-Bois, R. (1990) The Ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae* sequence, disruption and expression of its structural gene HEM 15. *J. Biol. Chem.* 265:7278-7280.
- Lander, M.; Pitt, A.R.; Alefounder, P.R.; Bardy, D.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1991) Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding. *Biochem. J.* 275:447-452.

- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a) Porphyrin biosynthesis VIII avian erythrocyte PBG deaminase-Urogen III cosynthetase, its purification, properties and separation of its components. *Biochim. Biophys. Acta.* 227:180-191.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b) Studies on Porphobilinogen deaminase- Uroporphyrinogen III Cosynthetase system of cultured soybean cells. *Biochem. J.* 121:327-340.
- Louie, G.V.; Brownlie, P.D.; Lambert, R.; Cooper, J.B.; Blundell, T.L.; Wood, S.P.; Warren, M.J.; Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature.* 359:33-39.
- Mazzetti, M. & Tomio, J.M. (1988) Characterization of porphobilinogen deaminase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 957:97-104.
- Moore, M.R.; McColl, K.E.L. & Goldberg, A. (1980) The activities of the enzymes of haem biosynthesis in the porphyrias and during treatment of acute intermittent porphyria. *Int.J.Biochem.* 12:941-946.
- Muthykrishnan, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) Regulation of heme biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol.Chem.*, 244:4241-4246.
- Paveto, C.; Passeron, S.; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1989) Regulatory role of δ -aminolevulinic acid dehydratase in the dimorphic fungus *Mucor Rouxii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94:635-639.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977) Polypyrrole intermediates in porphyrin biosynthesis: studies with *Euglena gracilis*. *Int. J. Biochem.* 8:277-283.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Occurrence of multiple molecular forms of porphobilinogenase in diverse organisms; The minimum quaternary structure of porphobilinogenase is a promotor of one Deaminase and one Isomerase domain. *Int. J. Biochem.* 12:761-767.
- Rossetti, M.V.; Parera, V.E. & Batlle, A.M. del C. (1976) Porphyrin biosynthesis. Immobilized enzymes and ligands. VII. Studies on bovine liver porphobilinogenase. *Acta Phys. Latinoam.* 26:371-378.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969) Porphyrin biosynthesis. VI. Separation and purification of PBG deaminase and Urogen III cosynthetase from cow liver. PBGase an allosteric enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 191:130-143.
- Spano, A.J. & Timko, M.P. (1991) Isolation, characterization and partial aminoacid sequence of a chloroplast-localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum sativum* L.) *Biochim. Biophys. Acta.* 1076:29-36.
- Thomas, S.D. & Jordan, P.M. (1986) Nucleotide sequence of hem C locus encoding porphobilinogen deaminase of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 14:6215-6226.
- Viale, A.A.; (1978) Biosíntesis de bacterioclorofila en *Rhodopseudomonas palustris*: sistemas enzimáticos reguladores. *Tesis doctoral, UBA*.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1988) Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase. *Biochemistry.* 27:9020-9030.
- Williams, D.C.; Morgan, G.S.; McDonald, E. & Battersby, A.R. (1981) Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics. *Biochem. J.* 193:301-310.

- Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1994) Evidence for participation of aspartate-84 as a catalytic group at the active site of porphobilinogen deaminase obtained by site-directed mutagenesis of the hemC gene from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **33**:2688-2695.
- Zagorec, M. & Labbe-Bois, R. (1986) Negative control of yeast coproporphyrinogenase synthesis by haem and oxygen. *J. Biol. Chem.* **261**:2506-2509.

CAPÍTULO II. Desórdenes en la biosíntesis del hemo.

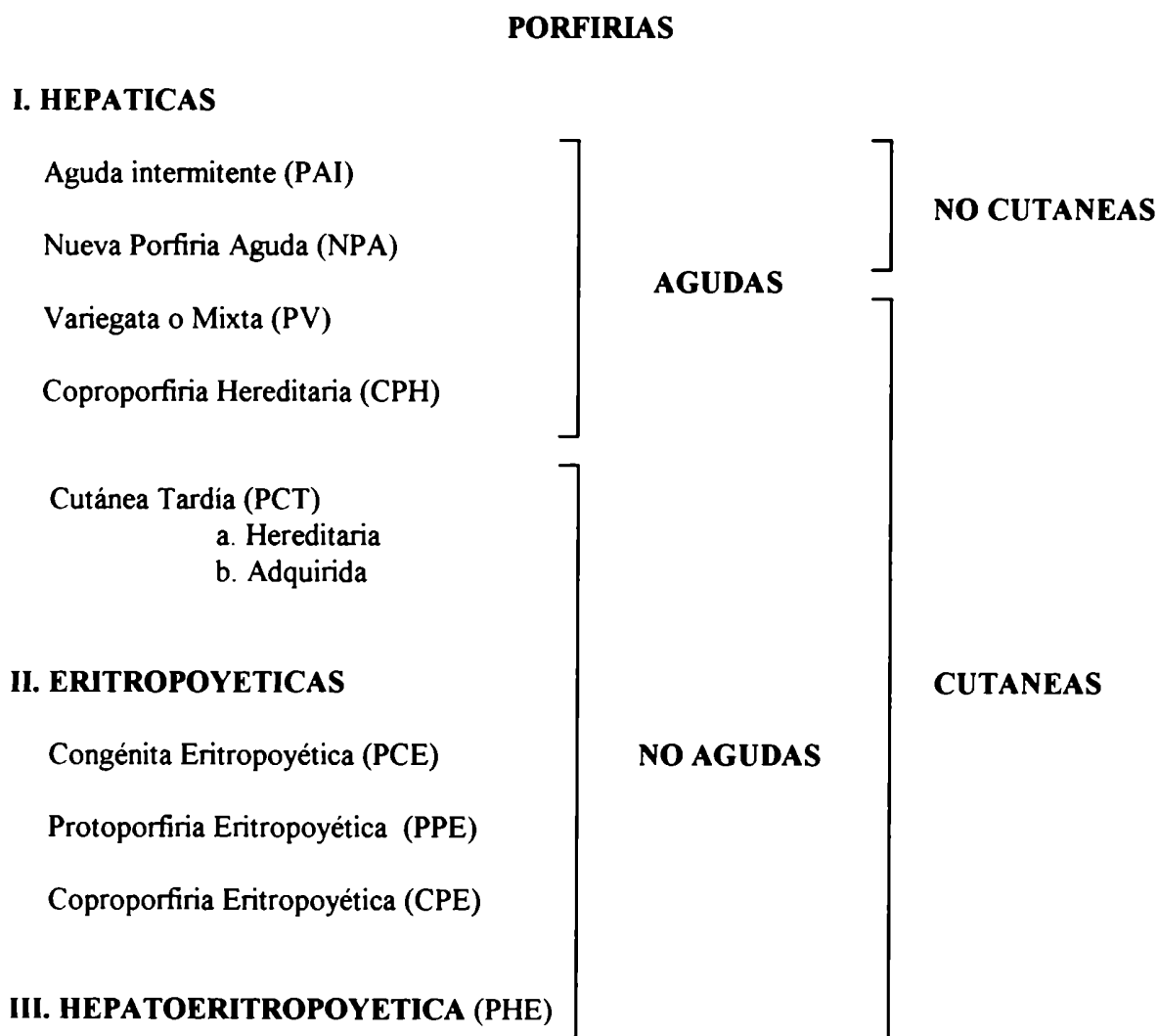
II.1. Las porfirias y su clasificación

Como ya se mencionó, el hemo es sintetizado en la célula por una secuencia de reacciones catalizadas por ocho enzimas. La ausencia de alguna de estas enzimas es incompatible con la vida porque el hemo es un componente esencial de las proteínas respiratorias así como de otras hemoproteínas importantes para el funcionamiento celular. Sin embargo, deficiencias parciales en una o más enzimas de este camino biosintético llevan al desencadenamiento de enfermedades metabólicas (Batlle & Magnin, 1988; Kappas *et al.*, 1989; Elder, 1993; Batlle, 1997). La actividad del ALA-S está disminuida en la anemia sideroblástica hereditaria (Elder, 1993), mientras que la deficiencia de cada una de las enzimas subsecuentes produce una familia de enfermedades conocidas como Porphirias caracterizadas por un patrón específico de acumulación y excreción de intermediarios de esta vía del hemo que refleja la acumulación del sustrato sobre el cual actúa la enzima defectuosa (Figura I.3). El defecto enzimático en cada porfiria es hereditario excepto en la PCT adquirida (Tabla II.1).

La evolución del conocimiento de las porfirias se refleja en la secuencia de las clasificaciones propuestas desde principio de siglo hasta el presente (Günther 1911; Waldeström 1937, 1957; Schmid *et al.*, 1954; Watson 1960; Goldberg & Rimington, 1962; Moore *et al.*, 1987; Batlle & Magnin, 1988). La tradicional clasificación de las porfirias en hepáticas o eritropoyéticas, según cual fuere 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 la propuesta (Batlle, 1997) de

sumar al primer criterio, la división en agudas y no agudas es una forma más satisfactoria para subdividir e identificar a este grupo de enfermedades.

Con la individualización progresiva de los distintos tipos de porfirias en base a su correlación clínico-patológica-bioquímica y los aportes más recientes, en cuanto a la identificación del defecto enzimático específico para cada una de ellas, se ha llegado hoy a la siguiente clasificación (Moore *et al.*, 1987) (Esquema II.1):



Esquema II.1. Clasificación de las porfirias.

II.2. Generalidades de las Porfirias

Las **Porfirias Agudas** se caracterizan por la presencia de ataques agudos que involucran disfunciones del sistema nervioso central, periférico y autónomo. Los síntomas se producen por una deficiencia de hemo y/o una acumulación de intermediarios potencialmente neurotóxicos, tales como el ALA y el PBG. Son ejemplos de enfermedades fármaco-genéticas, ya que estos pacientes corren el riesgo de desencadenar el ataque agudo por exposición a una gran cantidad de fármacos comunes. Cada una de ellas está asociada a una hipoactividad de una de las enzimas del camino del hemo (Figura I.3). Así en la PAI, la enzima deficiente es la PBG-D; en la NPA, el ALA-D; en la CPH, la CPGasa y en la PV, la PPGox (Tabla II.1). Este defecto, sumado a una des-regulación de la actividad del ALA-S, debido a una disminución del hemo en la célula, lleva a la acumulación y excreción aumentada en orina de los precursores, ALA y PBG, y en algunos casos también de porfirinas.

Tabla II.1. Herencia de los desórdenes causados por deficiencias parciales en las enzimas del camino metabólico del hemo.

Enfermedad	Deficiencia enzimática	Herencia	Mutaciones identificadas
Anemia sideroblástica	ALA-S eritroide	Ligada al cromosoma X	11
Nueva Porfiria Aguda (NPA)	ALA-D	Autosómica recesiva	2
Porfiria Aguda Intermitente (PAI)	PBG-D	Autosómica dominante	84
Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)	Isomerasa	Autosómica recesiva	8
Porfiria Cutánea Tardía (PCT)	URO-D	Autosómica dominante	9
Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE)	URO-D	Autosómica recesiva	7
Coproporfiria Hereditaria (CPH)	CPGasa	Autosómica dominante	4
Coproporfiria Eritropoyética (CPE)	CPGasa	Autosómica recesiva	-
Porfiria Variegata (PV)	PPGox	Autosómica dominante	8
Protoporfiria Eritropoyética (PPE)	Ferroquelatasa	Autosómica dominante	22

La PAI es la más común de las porfirias agudas y la segunda en frecuencia en la población argentina, a la cual nos referiremos en detalle más adelante.

Los pacientes con NPA, recesiva (Tabla II.1), son poco comunes y presentan una variación fenotípica sustancial. Algunos tienen buen pronóstico, y otros presentan severos ataques agudos luego de la pubertad con polineuropatía subaguda (Plewinska *et al.*, 1991).

La PV y la CPH además de la sintomatología aguda presentan manifestaciones cutáneas muy similares a la PCT. El cuadro dermatológico se manifiesta por fragilidad cutánea y ampollas en zonas expuestas, la piel se oscurece, puede ocurrir esclerodermia, el pelo adquiere un color negro intenso, se observa hipertriosis malar, de pabellón auricular y párpados, con pelos gruesos y renegridos.

Las **Porfirias cutáneas no-agudas**, presentan como principal signo clínico la fotosensibilización cutánea debida a la acumulación de porfirinas en piel, más intensa en las zonas expuestas a la luz solar.

La PCT, es la forma más común de las porfirias cutáneas y la más frecuente en la población argentina. Puede existir en dos formas: hereditaria o adquirida (De Verneuil *et al.*, 1978). La primera, presente en el 20 % de los casos, está asociada a una deficiencia parcial enzimática de la URO-D (50 % de actividad con respecto al valor normal) en todos los tejidos (Figura I.3), y se transmite como un carácter autosómico dominante (Tabla II.1). En el resto de los pacientes, la enzima está disminuida sólo en hígado. Esta porfiria se caracteriza por la presencia de fragilidad mecánica, hipertriosis y fundamentalmente fotosensibilización cutánea. Estas lesiones están asociadas a una excreción aumentada de porfirinas urinarias con un patrón típico consistente en intermediarios de 8 y 7 carboxilos y, en menor proporción de porfirinas menos carboxiladas. En esta enfermedad hay daño hepático debido a que el hígado es el principal sitio de sobreproducción de porfirinas.

La **Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE)** es una forma más severa de PCT, (actividad de URO-D menor al 10 % con respecto al normal) y se transmite como un carácter autosómico recesivo (Tabla II.1).

Las **Porfirias eritropoyéticas** en general no presentan daño hepático ni sintomatología de tipo agudo pero manifiestan problemas dermatológicos. La PPE se caracteriza por una severa fotosensibilidad, y en algunos pacientes la acumulación de protoporfirina en hepatocitos produce un daño hepático irreversible (Kappas *et al.*, 1990). La falla a nivel de la Ferroquelatasa se hereda en forma dominante (Tabla II.1).

La PCE, es una de las más raras, poco más de 100 casos descriptos en la literatura internacional, es la consecuencia de una deficiencia parcial enzimática de la Isomerasa y su herencia es recesiva (Tabla II.1). Se manifiesta a muy temprana edad, por lo general desde el nacimiento, con severas lesiones en la piel que progresan hacia mutilaciones, acompañadas de esplenomegalia y anemia hemolítica, el pronóstico es malo.

La CPE es producida por una deficiencia a nivel de la CPGasa y su herencia es recesiva (Tabla II.1). Hay sólo tres casos descriptos y se caracteriza por fotosensibilización cutánea con aumento de coproporfirina y protoporfirina en glóbulos rojos.

Se han aislado y caracterizado los genes o cDNAs de estas enzimas (Tabla II.2). Estos avances permitieron rápidamente la identificación de mutaciones en las porfirias (Tabla II.1) y la aplicación de técnicas de biología molecular al diagnóstico.

II.3. Porfiria Aguda Intermitente

II.3.1. Sintomatología

El defecto primario en la PAI es una deficiencia parcial de la enzima PBG-D (Strand *et al.*, 1970; Brodie *et al.*, 1977) (Figura I.3). Como resultado de este bloqueo en el camino del hemo hay una disminución del producto final, y un aumento de la actividad del ALA-S con sobreproducción y acumulación de los precursores, ALA y PBG. Esta enfermedad se hereda como un carácter autosómico dominante con penetrancia incompleta (Tabla II.1). La incidencia de este desorden es de 1:10.000 en la mayoría de las poblaciones pero varía entre países; una de las más altas (1:1.500) se

ha descrito en Suecia, en base a estudios sobre la determinación de la excreción urinaria de ALA y PBG (Wetterberg, 1967).

Tabla II.2. Genética molecular de las enzimas del camino biosintético del hemo.

Enzima	Gen	cDNA en pb	Expresión	Locus	Referencia
ALA-S ₁		1920 (168)	U	3p21	Cotter <i>et al.</i> , 1992
ALA-S ₂	22 Kb, 11 exones	1746 (147) 1635 (147)	E E	Xp11.2	Conboy <i>et al.</i> , 1992
ALA-D		990	U	9q34	Wetmur <i>et al.</i> , 1986 Potluri <i>et al.</i> , 1987
PBG-D	10 Kb, 15 exones	1032 1083	E U	11q24.1→q24.2	Raich <i>et al.</i> , 1986 Chretien <i>et al.</i> , 1988 Namba <i>et al.</i> , 1991 Grandchamp <i>et al.</i> , 1987 Chretien <i>et al.</i> , 1988 Namba <i>et al.</i> , 1991
Isomerasa	60 Kb	795	U	10q25.2→q26.3	Tsai <i>et al.</i> , 1988 Astrin <i>et al.</i> , 1991
URO-D	3 Kb; 10 exones	1101	U	1p34	Roméo <i>et al.</i> , 1986 Romana <i>et al.</i> , 1987
CPGasa	14 Kb; 7 exones	1062	U	3q12	Grandchamp <i>et al.</i> , 1983
PPGox	8 Kb; 13 exones	1814	U	1q23	
Ferroquelatasa	45 Kb, 11 exones	1269 (162)	U	18q21.3	Nakahashi <i>et al.</i> , 1990 Taketani <i>et al.</i> , 1992

U: ubicua y E: eritropoyética. Entre paréntesis se indica el número de pares de bases que codifican para el péptido señal para la importación a la mitocondria.

La expresión clínica ocurre después de la pubertad y más frecuentemente en mujeres que en hombres. La mayoría de los pacientes gozan de buena salud (PAI latentes) pero si se exponen a ciertos factores ambientales, estrés, drogas terapéuticas, hormonas sexuales, ayuno, ingestión

alcohólica o infecciones, pueden desarrollar ataques severos (PAI sintomáticos) y aún llegar a un desenlace fatal.

Los ataques agudos comienzan con fuertes dolores abdominales de tipo cólico que van aumentando en forma progresiva, pueden ser continuos o con exacerbaciones y períodos de calma que pueden simular una apendicitis o colecistitis aguda. En ocasiones los pacientes presentan desasosiego, náuseas, vómitos, constipación, taquicardia, hipertensión, convulsiones, estado confusional; pueden aparecer fenómenos motores con paresias o parálisis de miembros inferiores o superiores; asimismo, hay excitación, ansiedad, depresión, manía, alucinaciones visuales y auditivas; y el desarrollo de una neuropatía periférica puede llevar a la parálisis respiratoria y la muerte (Batlle & Magnin, 1988; Batlle, 1997).

Estos síntomas son consecuencia de la acción de los precursores de las porfirinas, principalmente ALA, sobre el sistema nervioso (Kappas *et al.*, 1989).

II.3.2. Diagnóstico bioquímico

El diagnóstico de la PAI se basa en la realización de estudios bioquímicos, la historia familiar y los síntomas clínicos. La identificación de sujetos con este error genético es importante para evitar la exposición a los factores precipitantes, establecer un diagnóstico temprano y un tratamiento apropiado si ocurre un ataque agudo.

La mayoría de los portadores de la enfermedad tienen una actividad de PBG-D disminuida en un 50 % pero hay un solapamiento de los valores de actividad enzimática normales bajos y los valores de los heterocigotas altos (Lamon *et al.*, 1979; McColl *et al.*, 1982; Bonaiti-Pellié *et al.*, 1984; Pierach *et al.*, 1987; Kappas *et al.*, 1989). Los individuos con PAI sintomáticos excretan niveles aumentados de ALA y PBG, y por lo tanto se pueden diagnosticar fácilmente.

Para la detección de casos latentes en familias afectadas hay varios métodos. El incremento de ALA y PBG en orina no sirve como diagnóstico debido a que los precursores se encuentran aumentados en sólo el 10 % de los casos latentes. La medición de la actividad de la PBG-D en eritrocitos periféricos es más sensible pero, como ya se mencionó, existe un amplio rango de valores

de actividad. El dato de actividad enzimática en asociación con el estudio de la familia entera permite el diagnóstico de un alto porcentaje de los casos de PAI pero no de todos (Astrup, 1978; Lamon *et al.*, 1979; Kreimer-Birnbaum *et al.*, 1980). Por lo tanto utilizando técnicas bioquímicas hay entre un 10 a un 20 % de los individuos que no se pueden diagnosticar, lo cual, sumado a la inespecificidad de la sintomatología hacen que el diagnóstico de la PAI resulte una tarea difícil.

Además, en base a los estudios bioquímicos se ha identificado una forma variante de la PAI, en la cual los pacientes manifiestan signos clínicos con niveles elevados de ALA y PBG, pero con actividad y concentración normal de PBG-D eritrocitaria (Desnick *et al.*, 1985; Kauppinen *et al.*, 1990). Esto se debe a la presencia de una mutación que afecta solamente la enzima ubicua. Por lo tanto, en estos pacientes no es posible identificar a los heterocigotas asintomáticos dado que la actividad de la PBG-D en eritrocitos es normal.

Sobre las bases del contenido eritrocitario de la PBG-D, los portadores de PAI pueden dividirse en dos grupos: CRIM-positivos y CRIM-negativos (CRIM = Material Inmunológico de Reacción Cruzada) (Hindmarsh, 1990; Lannfelt, 1990). El 85 % de los portadores del gen de la PAI es CRIM-negativo y se caracterizan por una disminución en la concentración y en la actividad de la enzima. El 15 % restante es CRIM-positivo y presentan una concentración de PBG-D normal pero la actividad enzimática está disminuida aproximadamente un 50 %. Esto se debe a que en estos casos la PBG-D es conformacionalmente estable pero inactiva.

Por lo tanto, debido a las dificultades que presenta el diagnóstico bioquímico, los estudios se han orientado hacia el empleo de las técnicas moleculares para identificar, fundamentalmente individuos latentes.

II.3.3. Tratamiento.

El mejor tratamiento de esta enfermedad es establecer un diagnóstico correcto y, en consecuencia, poder prevenir los ataques agudos. Por lo tanto es fundamental detectar los portadores del defecto genético para así evitar los factores precipitantes.

Las manifestaciones neurológicas pueden mejorar y aún desaparecer al eliminar la droga precipitante. Otras medidas terapéuticas consisten en la aplicación de dextrosa endovenosa, la administración de soluciones hipertónicas, clorpromazina, meperidina, propanolol en dosis pequeñas; y en los casos más severos, hematina endovenosa (Batlle 1997). El ácido fólico que actúa como un activador de la PBG-D, se ha empleado con éxito en el tratamiento de pacientes con PAI (Juknat de Gernalnik *et al.*, 1981).

Las hormonas sexuales pueden precipitar ataques agudos, aunque también se ha descrito que pueden prevenirlos en ciertas condiciones (Welland *et al.*, 1964; Zimmerman *et al.*, 1966). Así, la administración de anticonceptivos orales en bajas dosis pueden evitar la precipitación de los síntomas en mujeres durante el ciclo pre-menstrual (Perlroth *et al.*, 1965).

II.4. 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 10q25.2→q26.3. *Hum. Genet.* **87**:18-22.
- Astrup, E.G. (1978) Family studies on the activity of uroporphyrinogen I synthase in the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Clin. Sci. Mol. Med.* **54**:251-256.
- Batlle, A.M. del C. (1997) Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. Serie: Actualizaciones médico-bioquímicas. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamer. En prensa.*
- Batlle, A.M. del C. & Magnin, P.H. (1988) Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos y bioquímicos. Actualizaciones Médico-Bioquímicas. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamer. Sup. 2*: 3-52.
- Bonaiti-Pellié, S.; Phung, L. & Nordmann, Y. (1984) Recurrence risk estimation of acute intermittent porphyria based on analysis of porphobilinogen deaminase activity: a Bayesian approach. *Am. J. Med. Genet.* **19**:755-762.
- Brodie, 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. & Romeo, 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.
- Conboy, J.G.; Cox, T.C.; Bottomley, S.S.; Bawden, M.J. & May, B.K. (1992) Human erythroid 5-aminolevulinate synthase. *J. Biol. Chem.* **267**:18753-18758.

- Cotter, P.D.; Baumann, M. & Bishop, D.F. (1992) Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid δ -aminolevulinate synthase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4028-4032.
- Desnick, R.J.; Ostasiewicz, L.T.; Tishler, P.A. & Mustajoki, P. (1985) Acute intermittent porphyria: characterization of a novel mutation in the structural gene for uroporphobilinogen deaminase. *J. Clin. Invest.* 76:865-874.
- De Verneuil, H.; Aitken, G. & Nordmann, Y. (1978) Familial and sporadic porphyria cutanea. Two different diseases. *Hum. Genet.* 44: 145-150.
- Elder, G.H. (1993) Molecular genetics of disorders of haem biosynthesis. *J. Clin. Pathol.* 46:977-981.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962) Diseases of porphyrin metabolism. *Thomas Springfield II*.
- Grandchamp, B.; de Verneuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987) Tissue-specific expression of uroporphobilinogen deaminase. *Eur. J. Biochem.* 162:105-110.
- Grandchamp, B.; Weil, D. & Nordmann, Y. (1983) Assignment of the human coproporphyrinogen oxidase to chromosome 9. *Hum. Genet.* 64:180-183.
- Günther, H. (1911) Die Haematoporphyrin. *Deutsch Arch.Klin. Med.* 105:89-146.
- Hindmarsh, T.J. (1990) Enzyme heterogeneity in the porphyrias. *Clin. Biochem.* 23:371-374.
- Juknat de Gernalnik, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981) Porphyrin biosynthesis in *Euglena Gracilis* IV. An endogenous factor controlling the enzymic synthesis of porphyrinogens and its possible role in the treatment of some porphyrias. *Int. J. Biochem.* 13:343-353.
- Kappas, A.; Sassa, S.; Galbraith, R.A. & Nordmann, Y. (1989) The Porphyrias. In *The metabolic basis of inherited diseases*. (eds., Scriver, C.L.; Beaudet, A.; Sly, W.S. y Valle, V.) 6th ed., McGraw-Hill, New York. 1305-1365.
- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Palotie, A. & Mustajoki, P. (1990) RFLP analysis of three different types of acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 85:160-164.
- Kreimer-Bimba, M.; Bonkowsky, H.L. & Bottomley, S.S. (1980) Experience with the red cell uroporphyrinogen synthase assay in kindreds with acute intermittent porphyria. *Int. J. Biochem.* 12:807-810.
- Lamon, J.M.; Frykholm, B.C. & Tschudy, D.P. (1979) Family evaluations using red cell uroporphyrinogen I synthetase. *J. Med. Genet.* 16:134-139.
- Lannfelt, L. (1990) Immunological determination of uroporphobilinogen deaminase as a diagnostic measure in acute intermittent porphyria. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28:273-278.
- McColl, K.E.L.; Moore, M.R.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1982) Screening for latent acute intermittent porphyria: the value of measuring both leukocyte δ -aminolevulinate acid synthase and erythrocyte uroporphyrinogen-I-synthase activities. *J. Med. Genet.* 19:271-276.
- Moore, M.R.; McColl, K.E.L.; Rimington, C. & Sir Goldberg, A. (1987) Disorders of porphyrin metabolism. *Plenum Medical Book Co. NY & London*.
- Nakahashi, Y.; Taketani, S.; Okuda, M.; Inoue, K. & Tokunaga, R. (1990) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding human ferrochelatase gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173:748-755.

- Namba, H.; Narahara, K.; Tsuji, K.; Yokoyama, Y. & Seino, 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.
- Perlroth, M.G.; Marver, H.S. & Tschudy, D.P. (1965) Oral contraceptive agents and management of acute intermittent porphyria. *JAMA.* 194:1037-1042.
- Pierach, C.A.; Weimer, M.K.; Cardinal, R.A.; Bossenmaier, C. & Bloomer, R. (1987) Red blood cell porphobilinogen deaminase in the evaluation of acute intermittent porphyria. *JAMA* 257:60-61.
- Plewinska, M.; Thunell, S.; Holmberg, L.; Wetmur, J.G. & Desnick, R.J. (1991) δ -Aminolevulinate dehydratase deficient porphyria: identification of the molecular lesions in a severely affected homozygote. *Am. J. Genet.* 49:167-174.
- Potluri, V.R.; Astrin, K.H.; Wetmur, J.G.; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1987) Human δ -aminolevulinate dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* 76:236-239.
- Raich, B.N.; Roméo, P.H.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-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. *Nucleic Acids Res.* 15:7343-7355.
- 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.* 261:9825-9831.
- Schmid, R.; Schwartz, S. & Watson, C. (1954) Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. *Arch. Intern. Med.* 93:167-190.
- Strand, L.J.; 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 -aminolaevulinic acid synthetase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67:1315-1320.
- Taketani, S.; Inasawa, J.; Nakahashi, Y.; Abe, T. & Tokunaga, R. (1992) Structure of the human ferrochelatase gene. *Eur. J. Biochem.* 105:217-222.
- Tsai, S.F.; Bishop, D. & 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.
- Waldenström, J. (1937) Studien über porphyrie. *Acta Med. Scand.* 92(Suppl):1-254.
- Waldenström, J. (1957) The porphyrias as inborn errors of metabolism. *Am. J. Med.* 22:758-773.
- Watson, C. (1960) The problem of porphyria - some facts and questions. *N. Engl. J. Med.* 263:1205-1215.
- Welland, F.H.; Hellman, E.S.; Collins, A.; Hunter, G.W. & Tschudy, D.P. (1964) Factors affecting the excretion of porphyrin precursors by patients with acute intermittent porphyria. The effect of ethinil estradiol. *Metabolism.* 13:251-258.
- Wetmur, J.G.; Bishop, D.; Cantelmo, C. & Desnick, R.J. (1986) Human δ -aminolevulinate dehydratase: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7703-7707.

Wetterberg, L.A. (1967) In Neuropsychiatric and genetical investigation of Acute Intermittent Porphyria. *Stockholm University Books, Stockholm. Sweden.*

Zimmerman, T.S.; McMillin, J.M. & Watson, C.J. (1966) Onset of manifestations of hepatic porphyria in relation to the influence of female sex hormones. *Arch. Intern. Med.* **118**:229-240.

III. 1. Localización cromosómica

El cDNA del gen que codifica para la PBG-D eritrocitaria humana ha sido clonado y secuenciado (Raich *et al.*, 1986). Los análisis de Southern blot del DNA genómico indicaron que hay una sola copia del gen en el genoma humano (Raich *et al.*, 1986).

El locus del gen se localizó en el cromosoma 11 a través de estudios de células híbridas somáticas (humano/ratón) (Meisler *et al.*, 1980). Subsecuentemente, con el objetivo de ubicar la región cromosómica correspondiente, se construyeron células híbridas que contenían el genoma completo del Hamster chino y una sola copia del cromosoma 11 humano. Se caracterizaron cariotípicamente subclones portadores de deleciones terminales de este cromosoma y se ensayaron para varias isoenzimas humanas y marcadores inmunológicos. Este mapeo permitió localizar el locus en la región 11q13→qter (Meisler *et al.*, 1981).

Por estudios de dosaje de genes en pacientes con síndrome de trisomía parcial 11q, se asignó la localización a la región 11q23.2→qter (de Verneuil *et al.*, 1982).

Finalmente, por técnicas de hibridización *in situ*, se logró la sublocalización utilizando una sonda marcada específica al locus del gen, la cual hibridizaba con la banda 11q24. Además estudiando individuos con monosomía 11q24.2→qter, la actividad de la PBG-D era normal pero estaba incrementada 1,5 veces en pacientes con trisomía 11q22.2→qter. Ambos resultados sugieren que la región más pequeña para la PBG-D humana podría estar comprendida en 11q24.1→11q24.2 (Namba *et al.*, 1991).

III.2. Isoformas de la PBG-D y cDNAs correspondientes.

Se pueden distinguir dos isoformas de esta enzima, una se encontró en todas las células y la otra sólo en células eritroides (Desnick *et al.*, 1985). Se demostró que las dos se traducen a partir de dos mRNAs que difieren solamente en su extremo 5' terminal (Grandchamp *et al.*, 1987) pero ambos están codificados por un sólo gen (Raich *et al.*, 1986). La transcripción es a través de splicing diferencial de dos transcritos primarios generados a partir de dos promotores separados entre sí por 3 Kb de DNA. (Figura III.1).

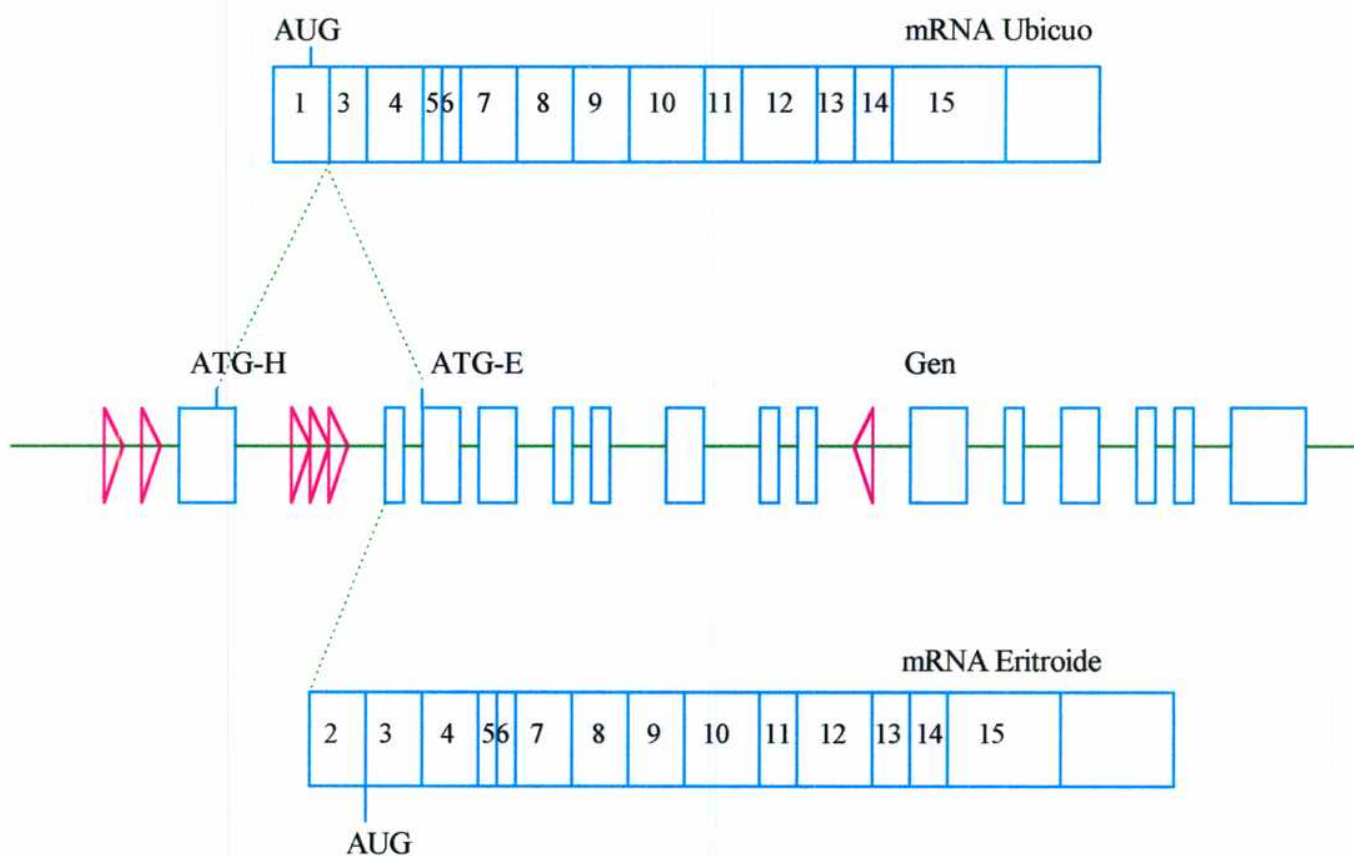


Figura III.1. Estructura del gen de la PBG-D.

Se indica en la figura el splicing diferencial de los transcritos eritroide y no-eritroide. Los exones están representados como rectángulos y la posición y orientación de las secuencias repetidas *Alu* están indicados como triángulos.

La secuencia del promotor ubicuo del gen es rica en G+C (70%) y no contiene las clásicas secuencias TATA y CAC boxes. Está ubicado en la región upstream al exón 1 y la reciente determinación de su secuencia (945 pb) (Yoo *et al.*, 1993), permitió la identificación de posibles elementos regulatorios en ese promotor: dos sitios de unión al AP1 (en los nucleótidos -491 a -487 y -126 a -119), un sitio de unión al AP 4 (en los nucleótidos -461 a -456), un sitio de unión al elemento de respuesta tiroide (TRE) (nucleótidos -45 a -38) y dos sitios de unión a enhancers (ENH) (nucleótidos -828 a -821 y -16 a -9); además de los dos sitios de unión para factores de transcripción Sp1 descritos con anterioridad (-201 a -191 y -90 a -181) (Chretien *et al.*, 1988) y las 13 pb repetidas y adyacentes (-243 a -217), (Figura III.2).

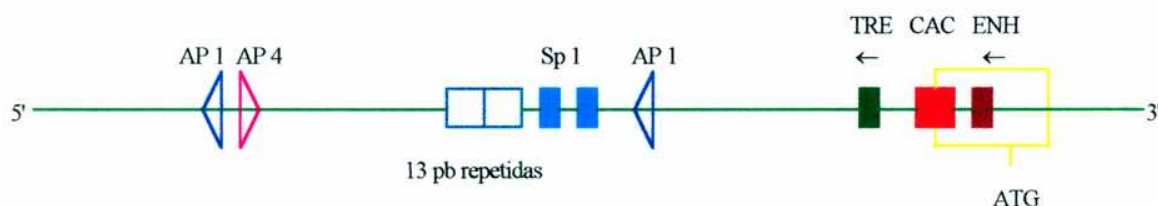


Figura III.2. Esquema de la región promotora de la PBG-D ubicua.

Se indican los sitios de unión a los factores de transcripción: Sp 1 = secuencia Sp1 (GC box); AP 1 = secuencia de unión Jun y Fos; AP 4 = secuencia de unión AP 4; TRE = elemento de respuesta a hormona tiroide; CAC = CAC box; ENH = enhancer; ATG = sitio de iniciación de la traducción.

El promotor eritroide del gen humano codificante para la PBG-D se usó como modelo para el estudio de transcripción eritroide-específica. Este posee los siguientes elementos regulatorios: un sitio de unión AP 1 (en los nucleótidos 2781 a 2788), una secuencia CAC (2839 a 2847), un CAAT box (2855 a 2863), un TATA box (2913 a 2918) (Chretien *et al.*, 1988), dos sitios de unión NF-E1 (2760 a 2765 y 2782 a 2790), un sitio de unión NF-E2 (2782 a 2790) (Mignotte *et al.*, 1989),

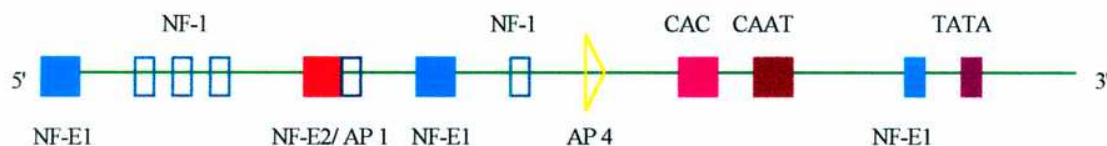


Figura III.3. Esquema de la región promotora de la PBG-D eritroide.

Se indican los factores de transcripción eritroide específicos: NF-E1 y NF-E2. La secuencia CAC box se encuentra también en el promotor β -globina.

cuatro sitios de unión NF-1 (2675 a 2679; 2713 a 2717; 2724 a 2728 y 2827 a 2831), dos sitios de unión para Topoisomerasas (TOPO: 2332 a 2346 y 2329 a 2343), un sitio de unión AP 4 (2830 a 2835) y otro sitio de unión NF-E1 (2573 a 2580) (Yoo *et al.*, 1993) (Figura III.3).

El promotor upstream, activo en todos los tejidos, codifica para los exones 1 y 3 al 15. El otro, solamente activo en células eritroides codifica para los exones 2 al 15. Este último cuando se introdujo en células no-eritroides fue completamente inactivo, demostrando su especificidad, y tiene una homología estructural con el promotor del gen de la β -globina, como por ejemplo los sitios de unión NF-E2/AP 1 y las secuencias TATA, CAAT y CAC boxes (Mignotte *et al.*, 1989). Estos hallazgos sugieren que esos factores comunes podrían co-regular la transcripción de estos genes durante el desarrollo eritroide (Chretien *et al.*, 1988; Mignotte *et al.*, 1989; Frampton *et al.*, 1990).

Un elemento localizado alrededor del sitio de iniciación es esencial para asegurar la selección de los sitios de iniciación durante la diferenciación (Beaupain *et al.*, 1990).

El cDNA eritroide tiene un marco de lectura abierto de 1039 pb y codifica para 344 aminoácidos. El cDNA ubicuo posee 1320 pb, por lo tanto genera una proteína con 17 aminoácidos adicionales en el extremo NH₂-terminal (361 aminoácidos totales). Por lo tanto la isoforma ubicua tiene un peso molecular mayor (44 KDa) a la eritroide específica (42 KDa) (Grandchamp *et al.*, 1987). Los codones de iniciación de la traducción para ambas enzimas (designados como ATG-H y ATG-E, respectivamente) se localizaron en los nucleótidos 1 a 3 del exón 1 y 3233 a 3235 en el exón 3 (Figura III.1).

III.3. Organización del gen de la PBG-D humana

Recientemente, se publicó la secuencia genómica completa de la PBG-D humana (Yoo *et al.*, 1993). Los 10024 nucleótidos se dividen en 15 exones, con una extensión entre 39 y 438 pb, y 14 intrones entre 87 y 2913 pb. Como se muestra en la Tabla III.1, todas las secuencias intrónicas coinciden con las secuencias consenso 5' y 3' para el splicing de los genes transcriptos (Mount 1982). Las posibles secuencias de lazo se identificaron entre los nucleótidos -39 y -20 de la

Tabla III.1. Secuencias de unión intrón/exón del gen de la PBG-D humano.

Exón	Longitud (pb)	Posición genómica	Sitio donador de splicing (5')	Intrón	Longitud (pb)	Sitio aceptor de splicing (3')
						5'tagcggaacca CACACAGC
1	62	-29-33	CAACGGCG gtagt	1	2913	lccacactgacaactgcocttggccaaggggcttcagggc TCAGTGTGTC
2	94	2945-3638	GGCAGAAAG gtactg	2	178	agaaacagaaggggagactgtgacctggggacttttttcag GAAGAAAA
3	54	3215-3268	AGAGCCAG gtaggt	3	328	ggctgggaagggcgaggactaagtcacaaatctacccag GAAGAAAA
4	73	3595-3667	TGAAATCA gtagt	4	376	gatacaataalgagcacctgattgattgactctctccag TTGCTATG
5	50	4042-4091	TCTCTAAG gtaaca	5	87	ttccctgaaaggagatcaccaaggctctttctglocggcag ATTGGAGA
6	56	4177-4232	AAGAAATGA gtaagt	6	412	lcatacccttctcttggcccccctctccacatctatag AGTGGACC
7	78	4643-4720	ATCTGCAA gtaaga	7	231	aaactcttccctagatctgtgcocttccctcccccag GCGGGAAA
8	78	4950-5027	GAGAAAGAG gtaagt	8	124	gcctagtgtaaagaatctcattgaaactctctctgaggcag TGTGGTGG
9	76	5150-5225	GGAGTATT gtaacc	9	1148	caggattgcccgaacactgtgtgctcttagcaactctccacag CCGGGGAAA
10	114	6372-6485	TGGGGCAG gtaggg	10	599	cccgtgtccaccccttttgactccctgttccgctccacag ATCCTGCA
11	39	7083-7121	TGGGCCAG gtacac	11	242	gaaagatcaggccctgagtgcttagagatgtttttccalcag GGGGCCTT
12	120	7362-7481	GGCACCTG gtaggg	12	236	gttaaggagcocttgcagctcacagaagaactctgtttacag GAAGGAGG
13	54	7716-7769	ATGGGCAA gtaagt	13	125	ccctctcaggactgtgtgctgaggcaactgttttctccocag CTGTACCT
14	87	7893-7979	CTGCCCAG gtaaca	14	90	ctctgtgtctgccaalccacccctctccctccatccalcag CATGAAGA
15	438	8068-8505	CTGAAGGT gttgig			

Las secuencias consenso son: Sitio donador = $\text{C}^{\text{A}}\text{AG} \text{gt}^{\text{a}} \text{g}$; Sitio aceptor = $\text{ctt}^{\text{a}} \text{a} \text{ct}^{\text{g}} \text{g}$; Secuencia del lazo = $\text{ctt}^{\text{a}} \text{ctt}^{\text{a}} \text{ct}^{\text{g}} \text{g}$; $\text{cccc} \text{c} \text{cc} \text{cc}$; tttttttt ; ncag

unión 3' para los 14 intrones por homología con la secuencia consenso C/TNC/TTA/GAC/T (Reed & Maniatis, 1988).

Las regiones no codificantes del cDNA eritropoyético comprenden 81 bases en el extremo 5' terminal antes del codón metionina de iniciación y 267 bases en el extremo 3' terminal seguido por 14 bases de la señal de poli A.

III.4. Elementos repetidos *Alu*

El gen de la PBG-D es rico en secuencias *Alu*, ya que se identificaron seis a lo largo de las 10 Kb y normalmente estos elementos se encuentran distribuidos en promedio en el genoma cada 4 Kb (Hwu 1986, Jelinek & Schmid, 1986). Dos de ellas se encuentran en la región 5' no codificante, tres en el intrón 1 y una en el intrón 9 (Figura III.1). Todos, excepto el del intrón 9, se encuentran en orientación sense.

Cuando cada uno de estos elementos se compara con la secuencia *Alu* consenso (Jurka & Smith, 1988), el porcentaje de identidad está entre 76,2 y 90,6 %. De los 24 dinucleótidos CpG en las secuencias consenso, 10 a 16 se presume que sufrieron deaminación espontánea de 5-metilcitosina a timidina (Deybach & Puy, 1995).

III.5. Polimorfismos en el gen de la PBG-D

El análisis de polimorfismos en la PBG-D es de suma utilidad en familias de PAI heterocigotas en las cuales no se pudo identificar la mutación específica. Hasta la fecha se detectaron 10 polimorfismos intragénicos cuya localización, sitios de restricción y alteraciones se indican en la tabla III.2. Los primeros cuatro polimorfismos identificados fueron *Msp* I, *Pst* I, *Bst* NI y *Apa*LI en el intrón 1. Aunque su localización precisa inicialmente no se conocía (Lee & Anvret, 1987; Llewellyn *et al.*, 1987b; Lee 1991a), la posterior secuenciación del gen entero de la PBG-D (Yoo *et al.*, 1993) determinó la localización de los mismos (1345G/A; 1500T/C; 2377C/A y 2479A/G). En todas las poblaciones estudiadas se encontró un fuerte desequilibrio de ligamiento

Tabla III.2. Polimorfismos en el gen de la PBG-D.

Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Posición del nucleótido	Enzima de restricción	Población estudiada	Frecuencia	No. alelos estudiados	Referencia
-	T→C	-64	<i>Apa</i> I	Europea caucásica Canadiense	T = 0,37, C = 0,63 T = 0,48, C = 0,52	35 100	Picat <i>et al.</i> , 1991 Schreiber <i>et al.</i> , 1992
11	G→A	1345	<i>Msp</i> I	Europea caucásica	G = 0,53, A = 0,47	16	Llewellyn <i>et al.</i> , 1987 a,b
				Finlandesa	G = 0,41, A = 0,59	66	Kaappinen <i>et al.</i> , 1990
				Sueca	G = 0,60, A = 0,40	98	Lee <i>et al.</i> , 1988, 1990, 1991a
				Europea	G = 0,54, A = 0,46	96	Scobie <i>et al.</i> , 1990
				Norteamericana caucásica	G = 0,58, A = 0,42	104	Yoo <i>et al.</i> , 1993
	T→C	1500	<i>Pst</i> I	Europea	T = 0,58, C = 0,42	37	Lee & Anvret 1987
				Sueca	T = 0,60, C = 0,40	98	Lee <i>et al.</i> , 1988, 1990, 1991a
				Europea	T = 0,55, C = 0,45	137	Scobie <i>et al.</i> , 1990
				Norteamericana caucásica	T = 0,62, C = 0,38	106	Yoo <i>et al.</i> , 1993
				Sueca	C = 0,60, A = 0,40	98	Lee <i>et al.</i> , 1991a
	C→A	2377	<i>Apa</i> L I	Norteamericana caucásica	C = 0,54, A = 0,46	100	Yoo <i>et al.</i> , 1993
				Sueca	A = 0,55, G = 0,45	34	Lee <i>et al.</i> , 1988, 1990, 1991a
				Europea	A = 0,53, G = 0,47	100	Scobie <i>et al.</i> , 1990
				Finlandesa	A = 0,25, G = 0,75	66	Kaappinen <i>et al.</i> , 1990
				Norteamericana caucásica	A = 0,62, G = 0,38	106	Yoo <i>et al.</i> , 1993
I2	G→T	3119	-	Japonesa	G = 0,95, T = 0,05	31	Daimon <i>et al.</i> , 1993a
I3	A→G	3581	<i>Bsm</i> A1	Norteamericana caucásica	A = 0,59, G = 0,41	100	Yoo <i>et al.</i> , 1993
				Japonesa	A = 0,21, G = 0,79	31	Daimon <i>et al.</i> , 1993a
E10	G→T	6479	-	Europea caucásica	G = 0,65, T = 0,35	43	Gu <i>et al.</i> , 1991
I10	C→A	7064	<i>Hinf</i> I	Norteamericana caucásica	G = 0,69, T = 0,31	106	Yoo <i>et al.</i> , 1993
				Norteamericana caucásica	C = 0,75, A = 0,25	92	Yoo <i>et al.</i> , 1993
I14	G→A	7998	<i>Mnl</i> I	Norteamericana caucásica	G = 0,97, A = 0,03	96	Yoo <i>et al.</i> , 1993

entre los RFLP's del intrón 1 (Llewellyn *et al.*, 1987a,b; Lee *et al.*, 1988; Kauppinen *et al.*, 1990; Yoo *et al.*, 1993).

Utilizando la técnica de polimorfismos de conformación en simple cadena (SSCP), se identificaron 3 polimorfismos ubicados en los intrones 3 (3581A/G), 10 (7064C/A) y 14 (7998G/A) (Yoo *et al.*, 1993). Además, se detectó un polimorfismo en el exón 10 (6479G/T) (Gu *et al.*, 1991). El RFLP del intrón 3 también está fuertemente ligado con los del intrón 1, pero no lo está con el del exón 10 (Yoo *et al.*, 1993).

III.6. Mutaciones en el gen de la PBG-D.

La existencia de una forma variante de PAI, así como los dos grupos CRIM determinados según el contenido eritrocitario de la enzima PBG-D (ver capítulo II, sección II.3.2), sugieren la presencia de una significativa heterogeneidad molecular en las mutaciones que causan esta enfermedad (Anderson *et al.*, 1981; Desnick *et al.*, 1985; Mustajoki & Desnick, 1985).

Hasta la fecha se identificaron 84 mutaciones diferentes en el gen PBG-D humano (Tabla III.3). Estas causan defectos de splicing, sustituciones de aminoácidos, proteínas truncadas por creación de un codón de terminación o cambio del marco de lectura por delección o inserción.

Se detectaron 3 mutaciones que producen PAI variante (PBG-D eritrocitaria normal); 2 de las cuales están en el sitio donador de splicing del exón 1 (Grandchamp *et al.*, 1989a,b) y la tercera es una sustitución (G→A) en el codón de iniciación que impide la traducción del mRNA ubicuo pero no la del eritroide (Chen *et al.*, 1994). De las 81 mutaciones restantes que causan PAI clásica, el 78 % (63/81) son puntuales. De todas las mutaciones puntuales, en el 56 % de los casos está involucrada una G (35/63), en el 33 % una C (21/63), una T en el 8 % (5/63) y una A sólo en el 3 % (2/63). Este desequilibrio se explica en parte por la presencia de mutaciones que modifican el dinucleótido CpG, ya que 18 se deben a la deaminación de la metilcitosina a timidina (Tabla III.3). La repartición de cada nucleótido es homogénea a lo largo de la secuencia codificante (20 a 29 %), por lo tanto otro factor que explica la alta frecuencia de G mutadas es la presencia de mutaciones en los sitios consenso de splicing (13/14).

Tabla III.3. Mutaciones descritas hasta la fecha.

Exón/Intrón		Cambio en la secuencia nucleotídica	Cambio en la secuencia de la proteína	Referencia
Exón 1	3	ATG→ATA	M1I	Chen <i>et al.</i> , 1994
	33	GCG→GCT	SDS	Grandchamp <i>et al.</i> , 1989a
Intrón 1	33+1	gtg→atg	SDS	Grandchamp <i>et al.</i> , 1989b
Exón 3	-22	CGC→CCC	SDS	Llewellyn <i>et al.</i> , 1996
	76	CGC→TGC	R26C	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	77	CGC→CAC	R26H	Llewellyn <i>et al.</i> , 1993
Intrón 3	87+1	gtg→atg	SDS	Lundin <i>et al.</i> , 1995
Exón 4	91	CGCT→CACT	A31T	Gu <i>et al.</i> , 1994
	97	Del A	CML: cod 125-Stop	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	100	CAG→TAG	Q34X	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	100	CAG→AAG	Q34K	Mgone <i>et al.</i> , 1992
	125	TTG→TAG	L42X	Puy <i>et al.</i> , 1996
Exón 5	163	GCT→TCT	A55S	Gu <i>et al.</i> , 1994
	168	Del GT	CML: cod 192-Stop	Schreiber <i>et al.</i> , 1995
	174	Del C	CML: cod 293-Stop	Gu <i>et al.</i> , 1994
	182	Ins G	CML: cod 197-Stop	Gu <i>et al.</i> , 1994
Intrón 5	210+1	gta→ata	SDS	Gu <i>et al.</i> , 1994
Exón 6	218	Del AG	CML: cod 243-Stop	Gu <i>et al.</i> , 1994
Exón 7	277	GTT→TTT	V93F	Chen <i>et al.</i> , 1994
	287	TCC→TTC	S96F	De Rooij <i>et al.</i> , 1995
	293	AAG→AGG	K98R	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	295	GAC→CAC	D99H	De Rooij <i>et al.</i> , 1995
	331	CGGA→CAGA	G111R	Gu <i>et al.</i> , 1993a
	314	Ins C	CML: cod 362-Stop	Schreiber <i>et al.</i> , 1995
Intrón 7	345-1	cag→caa	SAS	Schreiber <i>et al.</i> , 1994
Exón 8	346	CGG→TGG	R116W	Gu <i>et al.</i> , 1993b; Chen <i>et al.</i> , 1994; Kauppinen <i>et al.</i> , 1995; Morita <i>et al.</i> , 1995
	347	CGG→CAG	R116Q	Mgone <i>et al.</i> , 1993
	356	CTC→TTC	P119L	Lundin <i>et al.</i> , 1995
Intrón 8	423+1	gta→tta	SDS	Lundin <i>et al.</i> , 1995
Exón 9	445	CGA→TGA	R149X	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	446	CGA→CAA	R149Q	Delfau <i>et al.</i> , 1991
	446	CGA→CTA	R149L	Gu <i>et al.</i> , 1994
	463	CAG→TAG	Q155X	Scobie <i>et al.</i> , 1990

Exón/Intrón		Cambio en la secuencia nucleotídica	Cambio en la secuencia de la proteína	Referencia
Exón 9	470	Ins A	CML: cod 623-Stop	Schreiber <i>et al.</i> , 1994
Intrón 9	499-1	tag→taa	SDS	Lundin <i>et al.</i> , 1994
Exón 10	499	<u>CGG</u> →TGG	R167W	Gu <i>et al.</i> , 1992; Llewellyn <i>et al.</i> , 1992; Kauppinen <i>et al.</i> , 1995 Delfau <i>et al.</i> , 1990; Picat <i>et al.</i> , 1990; Mgone <i>et al.</i> , 1992; Llewellyn <i>et al.</i> , 1992. Lee, 1991a. Delfau <i>et al.</i> , 1990; Kauppinen <i>et al.</i> , 1992 Mgone <i>et al.</i> , 1992 Kauppinen <i>et al.</i> , 1995 Lee & Anvret, 1991b Lundin <i>et al.</i> , 1994; Chen <i>et al.</i> , 1994 Schreiber <i>et al.</i> , 1994 Mgone <i>et al.</i> , 1994 Delfau <i>et al.</i> , 1991
	500	<u>CGG</u> →CAG	R167Q	
	517	<u>CGG</u> →TGG	R173W	
	518	<u>CGG</u> →CAG	R173Q	
	530	CTG→CGG	L177R	
	583	<u>CGC</u> →TGC	R195C	
	593	TGG→TAG	W198X	
	601	<u>CGG</u> →TGG	R201W	
	604	Del G	CML: cod 759-Stop	
	610	CAG→TAG	Q204X	
	612	CAG→CAT	SDS (Del 9 pb)	
Exón 11	625	GAG→AAG	E209K	Gu <i>et al.</i> , 1993
	629	Del A	CML: cod 761-Stop	Lee <i>et al.</i> , 1995
Intrón 11	652-3	cag→gag	SDS	Llewellyn <i>et al.</i> , 1996
Exón 12	667	GAA→AAA	E223K	Gu <i>et al.</i> , 1994 Kauppinen <i>et al.</i> , 1995 Kauppinen <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1995 De Rooij <i>et al.</i> , 1995 Kauppinen <i>et al.</i> , 1995 Puy <i>et al.</i> , 1996 De Rooij <i>et al.</i> , 1995 Mgone <i>et al.</i> , 1993; Gu <i>et al.</i> , 1994 Delfau <i>et al.</i> , 1991 Mgone <i>et al.</i> , 1993 Chen <i>et al.</i> , 1994; Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	673	CGA→GGA	R225G	
	673	<u>CGA</u> →TGA	R225X	
	710	Del T	CML: cod 761-Stop	
	713	CTG→CGG	L238R	
	715	Del CA	CML: cod 747-Stop	
	716	CAC→CGC	H239R	
	730	Del CT	CML: cod 746-Stop	
	734	CTT→CGT	L245R	
	739	TGC→CGC	C247R	
	740	TGC→TTC	C247F	

Exón/Intrón		Cambio en la secuencia nucleotídica	Cambio en la secuencia de la proteína	Referencia
Exón 12	742	Ins 8 pb	CML: cod 772-Stop	Gu <i>et al.</i> , 1994
	748	GAA→CAA	Q250A	Lundin <i>et al.</i> , 1995
	748	GAA→AAA	E250K	Gu <i>et al.</i> , 1994
	754	GCC→ACC	A252T	Mgone <i>et al.</i> , 1993
	755	GCC→GTC	A252V	Mgone <i>et al.</i> , 1993
	766	CAC→AAC	H256N	Mgone <i>et al.</i> , 1992
	771	CTG→CTA	SDS	Grandchamp <i>et al.</i> , 1989c
	771	CTG→CTC	SDS	Daimon <i>et al.</i> , 1993b
	771	Ins T	CML: cod 784-Stop	Ong <i>et al.</i> , 1996
Intrón 12	771+1	gag →aag	SDS	Puy <i>et al.</i> , 1996
Exón 13	806	ACA→ATA	T269I	Mgone <i>et al.</i> , 1994
	820	GGA→AGA	G274R	Mgone <i>et al.</i> , 1994
Intrón 13	826-1	gac →aac	SAS	Llewellyn <i>et al.</i> , 1993
	825+1	gta →ata	SDS	Llewellyn <i>et al.</i> , 1996
Exón 14	838	GGA→AGA	G280R	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	848	TGG→TAG	W283X	Mgone <i>et al.</i> , 1994; Schreiber <i>et al.</i> , 1995
	849	TGG→TGA	W283X	Chen <i>et al.</i> , 1994
	886	CAG→TAG	Q296X	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995
	900	Del T	CML: cod 944-Stop	Delfau <i>et al.</i> , 1991; Schreiber <i>et al.</i> , 1995
Intrón 14	912+1	gtg →atg	SDS	Gu <i>et al.</i> , 1993
Exón 15	913	Ins C	CML: cod 916-Stop	Puy <i>et al.</i> , 1996
	973	CGA →TGA	R325X	Petersen <i>et al.</i> , 1996
	1062	Ins C	CML: cod 1074-Stop	Daimon <i>et al.</i> , 1994
	1073	Del A	CML: cod 1084-Stop	Kauppinen <i>et al.</i> , 1995

Abreviaturas utilizadas en la Tabla:

SDS= mutación en el Sitio Donor de Splicing

SAS= mutación en el Sitio aceptor de Splicing

Del= Delección

Ins= Inserción

CML= cod X-Stop= Cambio del marco de lectura que genera un codón de terminación de la traducción (Stop) en el codón X (downstream).

Las bases mutadas se resaltaron en **negrita**; y las mutaciones que se producen en el dinucleótido CpG se subrayaron.

Los tipos de mutaciones puntuales son: sin sentido en el 18 % de los casos (11/63), sustituciones de aminoácidos en el 60 % (38/63) y mutaciones de splicing en el 22 % (14/63). Hay

18 cambios de marco de lectura (22 %) que se producen por 11 deleciones (61 %) y 7 inserciones (39 %).

El exón 12 es el que posee la mayor frecuencia de mutaciones, con 20 mutaciones reportadas (24 %). Luego siguen: el exón 10, con 11 mutaciones; el 7 con 6; el 4, 9 y 14 con 5; el 5 y el 15 con 4; el 3 y el 8 con 3; el 1, 11 y 13 con 2; el 6 con 1 y no se reportaron mutaciones en el exón 2. Con respecto a los intrones se reportaron mutaciones de splicing que producen pérdida de un exón en los intrones 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14 y dos en el intrón 13.

Se reportaron 3 casos de PAI heterocigotas compuestos con deficiencia severa de la PBG-D desde una temprana edad (Beukeveld *et al.*, 1990; Llewellyn *et al.*, 1992). Dos de éstos presentan las mutaciones R167W y R167Q (Llewellyn *et al.*, 1992).

Históricamente los individuos con PAI, y luego las mutaciones en el gen de la PBG-D, se clasificaron dentro de 2 grupos de acuerdo al estado CRIM. En el subtipo con fenotipo CRIM-positivo, la heterogeneidad de las mutaciones es limitada. Por ejemplo, sobre 18 pacientes estudiados CRIM-positivos no relacionados (Delfau *et al.*, 1990; Gu *et al.*, 1992; Kauppinen *et al.*, 1992; Llewellyn *et al.*, 1992) 9 poseen la misma mutación R167Q y 4 la R173Q. Además, sobre 43 pacientes no relacionados CRIM-positivos de origen francés y alemán, 5 tienen la misma mutación en el exón 4 A31T (Gu *et al.*, 1994).

Por el contrario dentro del grupo con fenotipo CRIM-negativo, el cual representa el 80% de los pacientes con PAI, hay un alto grado de heterogeneidad alélica en las mutaciones de la PBG-D, excepto en las poblaciones sueca y holandesa donde se reportó una alta prevalencia de la misma mutación. Así, la mutación W198X se encontró en 12 de 15 familias suecas, pero hay entre ellas un origen en común lo cual sugiere un efecto fundador (Lee & Anvret, 1991b). Y la mutación R116W se encontró en 15 de 49 pacientes holandeses no relacionados en un análisis de hasta cuatro generaciones (Gu *et al.*, 1993).

III.7. Diagnóstico molecular de familias con PAI

El diagnóstico de la PAI a través de análisis bioquímicos tiene limitaciones (capítulo II, sección 3.2). Además, la heterogeneidad molecular de las mutaciones observada complica el desarrollo de procedimientos standard. La detección de portadores del gen en una familia con una mutación conocida se puede realizar utilizando técnicas moleculares apropiadas (Grompe, 1993). El procedimiento de análisis se elige dependiendo del tipo y localización de la mutación. Los métodos de búsqueda de mutaciones nuevas en familias con PAI tales como electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) o polimorfismos de conformación en simple cadena (SSCP) parecerían ser útiles (Kauppinen, 1992; Bourgeois *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1994). Sin embargo, éstas técnicas no eliminan la secuenciación de la muestra de DNA para encontrar la mutación responsable de la variación de migración.

Finalmente, hay casos raros en los cuales la actividad de la PBG-D y las investigaciones moleculares fallan en la detección del defecto genético. En éstos casos se puede utilizar el análisis de ligamiento en familias afectadas (Deybach & Puy, 1995). Pero éste tipo de análisis sólo sirve en los casos de familias que tienen un genotipo informativo y al menos dos individuos vivos sintomáticos para establecer el ligamiento.

III.8. Referencias

- Anderson, P.M.; Reddy, R.M.; Anderson, K.E. & Desnick, R.J. (1981) Characterization of the porphobilinogen deaminase deficiency in acute intermittent porphyria: immunologic evidence for heterogeneity of the genetic defect. *J. Clin. Invest.* **68**:1-12.
- Beaupain, D.; Eléouët, J.F. & Roméo, P.H. (1990) Initiation of transcription of the erythroid promoter of the porphobilinogen deaminase gene is regulated by a *cys*- acting sequence around the cap site. *Nucleic Acids Res.* **18**:6509-6515.
- Beukeveld, G.J.J.; Wolthers, B.G.; Nordmann, Y.; Deybach, J.C.; Grandchamp, B. & Wadman, S.K. (1990) A retrospective study of a patient with homozygous form of acute intermittent porphyria. *J. Inherit. Metab. Dis.* **13**:673-683.
- Bourgeois, F.; Gu, X.F.; Deybach, J.C.; Te Velde, M.P.; De Rooij, F.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1992) Denaturing gel electrophoresis for rapid detection of latent carriers of a subtype of acute intermittent porphyria with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase activity. *Clin. Chem.* **38**:93-95.

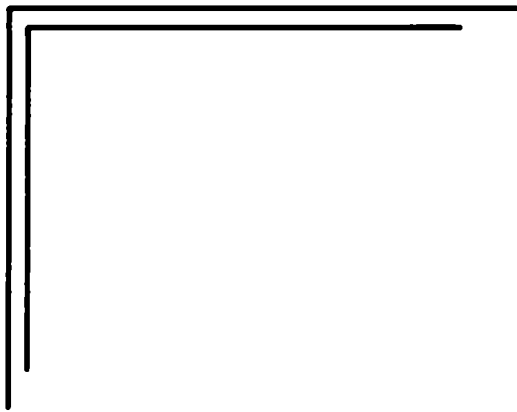
- Chen, C-H.; Kenneth, H.A.; Lee, G.; Anderson, K.E. & Desnick, R.J. (1994) Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the Hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "Variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. *J. Clin. Invest.* **94**:1927-1937.
- 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.
- Daimon, M.; Morita, Y.; Yamatani, K.; Igarashi, M.; Fukase, N.; Ohnuma, H.; Sugiyama, K.; Ogawa, A.; Hideo, M.; Manaka, H. & Sasaki, H. (1993a) Two new polymorphisms in introns 2 and 3 of the human porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Genet.* **92**:115-116.
- Daimon, M.; Yamatani, K.; Igarashi, M.; Fukase, N.; Ogawa, A.; Tominaga, M. & Sasaki, H. (1993b) Acute intermittent porphyria caused by G to C mutation in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene that results in exon skipping. *Hum. Genet.* **92**:549-553.
- Daimon, M.; Yamatani, K.; Igarashi, M.; Fukase, N.; Morita, Y.; Ogawa, A.; Tominaga, M. & Sasaki, H. (1994) Acute intermittent porphyria caused by a single base insertion of C in exon 15 of the porphobilinogen deaminase gene that results in a frameshift and premature stopping of translation. *Hum. Genet.* **93**:533-537.
- Delfau, M.H.; Picat, C.; de Rooij, F.W.M.; Hamer, K.; Bogard, M.; Wilson, J.H.P.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1990) Two different point G to A in exon 10 of the Porphobilinogen Deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria. *J. Clin. Invest.* **86**:1511-1516.
- Delfau, M.H.; Picat, C.; de Rooij, F.; Voortman, G.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1991) Molecular heterogeneity of acute intermittent porphyria: identification of four additional mutations resulting in the CRIM-negative subtype of the disease. *Am. J. Hum. Genet.* **49**:421-428.
- De Rooij, F.W.M.; Voortman, G.; De Baar, E.; Grandchamp, B.; Te Velde, K. & Wilson, J.H.P. (1995) Frequency and distribution of mutations in the gene of porphobilinogen deaminase in dutch acute intermittent porphyria patients. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* **55**:Suppl. 223, Abstract 24.
- Desnick, R.J.; Ostasiewicz, L.T.; Tishler, P.A. & Mustajoki, P. (1985) Acute intermittent porphyria: characterization of a novel mutation in the structural gene for porphobilinogen deaminase. *J. Clin. Invest.* **76**:865-874.
- De Vermeuil, H.; Phung, N.; Nordmann, Y.; Allard, D.; Leprince, F.; Jérôme, H.; Aurias, A. & Rethoré, M.O. (1982) Assignment of Human Uroporphyrinogen 1 Synthase locus to region 11qter by gene dosage effect. *Hum. Genet.* **60**:212-213.
- Deybach, J.C. & Puy, H. (1995) Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. *J. Bioener. Biomem.* **27**:197-205.
- Frampton, J.; Walker, M.; Plumb, M. & Harrison, P.R. (1990) Synergy between the NF-E1 erythroid-specific transcription factor and the CACCC factor in the erythroid-specific promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Mol. Cel. Biol.* **10**:3838-3842.
- Grandchamp, B.; de Vermeuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987) Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. *Eur. J. Biochem.* **162**:105-110.

- Grandchamp, B.; Picat, C.; Kauppinen, R.; Mignotte, V.; Peltonen, L.; Mustajoki, P.; Roméo, P.H.; Goossens, M. & Nordmann, Y. (1989a) Molecular analysis of acute intermittent porphyria in a Finnish family with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Eur. J. Clin. Invest.* 19:415-418.
- Grandchamp, B.; Picat, C.; Mignotte, V.; Wilson, J.H.P.; Te Velde, K.; Sandkuyl, L.; Roméo, P.H.; Goossens, M. & Nordmann, Y. (1989b) Tissue-specific splicing mutation in acute intermittent porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:661-664.
- Grandchamp, B.; Picat, C.; de Rooij, F.W.M.; Beaumont, C.; Deybach, J.C. & Nordmann, Y. (1989c) A point mutation G/A in exon 12 of the PBG deaminase gene results in exon skipping and is responsible for acute intermittent porphyria. *Nucleic Acids Res.* 17:6637-6649.
- Grompe, M. (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet.* 5:111-116.
- Gu, X-F.; Lee, J-S.; Delfau, M.H. & Grandchamp, B. (1991) PCR detection of a G/T polymorphism at exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 19:1966.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; Voortman, G.; Te Velde, K.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1992) High frequency of mutations in exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene in patients with a CRIM-positive subtype of acute intermittent porphyria. *Am. J. Hum. Genet.* 51:660-665.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; de Baar, E.; Bruylant, M.; Lissens, W.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993a) Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Hum. Mol. Genet.* 2:1735-1736.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; Lee, J-S.; Te Velde, K.; Deybach, J.S.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993b) High prevalence of the point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 91:128-130.
- Gu, X.F.; de Rooij, F.; Voortman, G.; Te Velde, K.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1994) Detection of eleven mutations causing acute intermittent porphyria using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Genet.* 93:47-52.
- Hwu, H.R.; Roberts, J.W.; Davidson, E.H. & Britten, R.J. (1986) Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3875-3879.
- Jelinek, W.R. & Schmid, C.W. (1986) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu. Rev. Biochem.* 51:813-844.
- Jurka, J. & Smith, T. (1988) A fundamental division in the *Alu* family of repeated sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:4775-4778.
- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Palotie, A. & Mustajoki, P. (1990) RFLP analysis of three different types of acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 85:160-164.
- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Pihlaja, H.; & Mustajoki, P. (1992) CRIM-positive mutations of acute intermittent porphyria in Finland. *Hum. Mutat.* 1:392-396.
- Kauppinen, R.; Mustajoki, S.; Pihlaja, M.; Peltonen, L. & Mustajoki, P. (1995) Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* 4:215-222.
- Lee, J.S. & Anvret, M. (1987) A Pst I polymorphism for the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 15:6307.

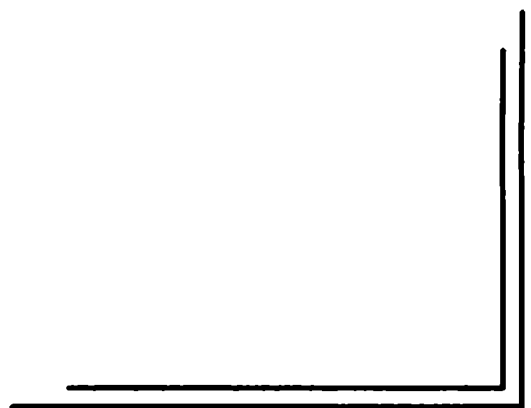
- Lee, J.S.; Anvret, M.; Lindstein, J.; Lannfelt, L.; Gellerfors, P.; Wetterberg, L.; Floderus, Y. & Thunell, S. (1988) DNA polymorphisms within the human porphobilinogen deaminase gene in two Swedish families with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 79:379-381.
- Lee, J.S.; Grandchamp, B. & Anvret, M. (1990) A point mutation of the human porphobilinogen deaminase gene in a Swedish family with acute intermittent porphyria. *Am. J. Hum. Gen.* 47:1162.
- Lee, J.S. (1991a) Molecular genetic investigation of the human porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Doctoral thesis, Stockholm.*
- Lee, J.S. & Anvret, M. (1991b) Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10912-10916.
- Lee, G.; Astrin, K. & Desnick, R.J. (1995) Acute intermittent porphyria: a single base deletion and a nonsense mutation in the human Hydroxymethylbilane synthase gene predicting truncations of the enzyme polypeptide. *Am. J. Med. Genet.* 58:155-158.
- Llewellyn, D.H.; Elder, G.H.; Kalsheker, N.A.; Marsh, O.W.M.; Harrison, P.R.; Grandchamp, B.; Picat, C.; Nordman, Y.; Roméo, P.H. & Goossens, M. (1987a) DNA polymorphism of the human porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Lancet.* 2:706-708.
- Llewellyn, D.H.; Kalsheker, N.A.; Elder, G.H.; Harrison, P.R.; Chretien, S. & Goossens, M. (1987b) A Msp I polymorphism for the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 15:1349.
- Llewellyn, D.H.; Smyth, S.J.; Elder, G.H.; Hutchesson, A.C.; Rattenbury, J.M. & Smith, M.F. (1992) Homozygous acute intermittent porphyria: Compound heterozygosity for adjacent base transitions in the same codon of the porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Genet.* 89:97-98.
- Llewellyn, D.H.; Whatley, S. & Elder, G.H. (1993) Acute intermittent porphyria caused by an arginine to histidine substitution (R26H) in the cofactor-binding cleft of porphobilinogen deaminase. *Hum. Mol. Genet.* 2:1315-1316.
- Llewellyn, D.M.; Scobie, G.A.; Urquhart, A.J.; Whatley, S.D.; Roberts, A.G.; Harrison, P.H. & Elder, G.H. (1996) Acute intermittent porphyria caused by defective splicing of porphobilinogen deaminase RNA: a synonymous codon mutation at -22 bp from the 5' splice site causes skipping of exon 3. *J. Med. Genet.* 33:437-438.
- Lundin, G.; Wedell, A.; Thunell, S. & Anvret, M. (1994) Two new mutations in the porphobilinogen deaminase gene and a screening method using PCR amplification of specific alleles. *Hum. Genet.* 93:59-62.
- Lundin, G.; Hashemi, J.; Floderus, Y.; Thunell, S.; Sagen, E.; Laegreid, A.; Wassif, W.; Peters, T. & Anvret, M. (1995) Four mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria. *J. Med. Genet.* 32:979-981.
- Meisler, M.; Wanner, L.; Eddy, R.E. & Shows, T.B. (1980) The UPS locus encoding uroporphyrinogen I synthase is located on chromosome 11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:170-176.
- Meisler, M.; Wanner, L.; Kao, F.T. & Jones, C. (1981) Localization of the uroporphyrinogen I synthase locus to human chromosome region 11q13→qter and interconversion of enzyme isomers. *Cytogenet. Cell Genet.* 31:124-128.

- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R. & Connor, J.M. (1992) Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of in vitro amplified cDNA. *Hum. Genet.* 90:12-16.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R.; Louie, G.V. & Connor, J.M. (1993) Detection of a high mutation frequency in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 92:619-622.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R.; Louie, G.V. & Connor, J.M. (1994). Identification of five novel mutations in the Porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* 5:809-811.
- Mignotte, V.; Elquet, J.F.; Raich, N. & Roméo, P.H. (1989) Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6548-6552.
- Morita, Y.; Daimon, M.; Hashiwaba, K.; Igarashi, M.; Fukase, H.; Ohmuma, H.; Ikezawa, Y.; Sugiyama, K. & Manaka, H. (1995) A point mutation C to T in exon 8 of the porphobilinogen deaminase gene in a Japanese family with acute intermittent porphyria. *Jpn. J. Hum. Genet.* 40(2):207-2013.
- Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice site junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10:459-472.
- Mustajoki, P. & Desnick, R.J. (1985) Genetic heterogeneity in acute intermittent porphyria: characterization and frequency of porphobilinogen deaminase mutations in Finland. *Brit. Med. J.* 291:505-509.
- Namba, H.; Narahara, K.; Tsuji, K.; Yokoyama, Y. & Seino, 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.
- Ong, P.M.; Lanyon, W.G.; Hift, R.J.; Helkett, J.; Moore, M.R.; Mgone, C.S. & Connor, J.M. (1996) Detection of four mutations in six unrelated South African patients with acute intermittent porphyria. *Mol. Cel. Probes.* 10:57-61.
- Petersen, N.E.; Nissen, H.; Hansen, T.S.; Rasmussen, K.; Brock, A. & Horder, M. (1996) R325X mutation in exon 15 of the hydroxymethylbilane synthase gene identified in two Danish families with acute intermittent porphyria. *Clin. Chem.* 42:106-107.
- Picat, C.; Delfau, M.H.; De Rooij, F.W.M.; Beukeveld, G.J.J.; Wolthers, B.G.; Wadman, S.K.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1990) Identification of the mutations in the parents of a patient with a putative compound heterozygosity for acute intermittent porphyria. *J. Inher. Metab. Dis.* 13:684-686.
- Picat, C.; Bourgeois, F. & Grandchamp, B. (1991) PCR detection of a C/T polymorphism in exon 1 of the porphobilinogen deaminase gene (PBG-D). *Nucleic Acids Res.* 19:5099.
- Puy, H.; Deybach, J.C.; Robreau, A.M.; Lamoril, J. & Nordmann, Y. (1996) Detection of four novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene in French Caucasian patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Her.* 46:177-180.
- Raich, B.N.; Roméo, P.H.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic Acids Res.* 14:5955-5968.

- Reed, R. & Maniatis, T. (1988) The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 2:1268-1276.
- Schreiber, W.E.; Jamani, A. & Ritchie, B. (1992) Detection of a T/C polymorphism in the porphobilinogen deaminase gene by polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Clin. Chem.* 38:2153-2155.
- Schreiber, W.E.; Fong, F. & Jamani, A. (1994) Molecular diagnosis of acute intermittent porphyria by analysis of DNA extracted from hair roots. *Clin. Chem.* 40:1744-1748.
- Schreiber, W.E.; Fong, F.; Nanar, B.A. & Jamani, A. (1995) Heteroduplex analysis detects frameshift and point mutations in patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 96:161-166.
- Scobie, G.A.; Urquhart, A.J.; Elder, G.H.; Kalsheker, N.A.; Llewellyn, D.H.; Smyth, J. & Harrison, P.R. (1990) Linkage disequilibrium between DNA polymorphisms within the porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Genet.* 85:157-159.
- Scobie, G.A.; Llewellyn, D.H.; Urquhart, A.J.; Smyth, S.J.; Kalsheker, N.A.; Harrison, P.R. & Elder, G.H. (1990) Acute intermittent porphyria caused by a CT mutation that produces a stop codon in the Porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Genet.* 85:631-634.
- Yoo, H.-W.; Warner, C.A.; Chen, C.-H. & Desnick, R.J. (1993) Hydroxymethylbilane synthase: complete genomic sequence amplifiable polymorphisms in the human gene. *Genomics.* 15:21-29.

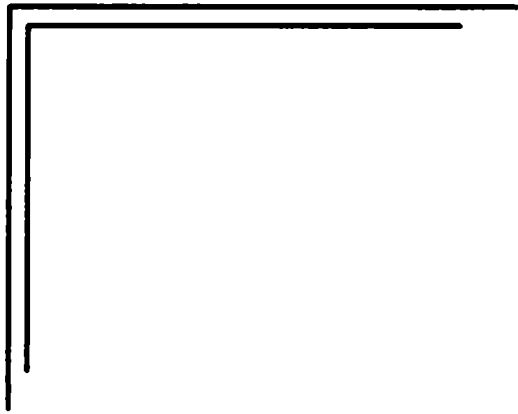


OBJETIVOS

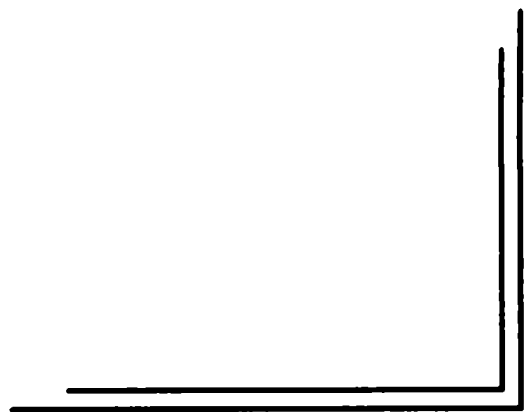


Los objetivos de esta tesis son:

- ♦ **Realizar el primer estudio genético en la población argentina con PAI.**
- ♦ **Detectar la o las mutaciones en el gen de la PBG-D en individuos con PAI sintomáticos que causan la enfermedad.** Se espera encontrar nuevas mutaciones ya que se considera que los factores étnicos, ambientales y aleatorios, entre otros, están relacionados con el tipo de mutación responsable de la PAI.
- ♦ **Determinar con certeza los individuos latentes y normales dentro de una misma familia afectada.** Esto será de gran importancia en aquellos pacientes en los cuales el análisis bioquímico no nos ofrezca un diagnóstico seguro y confiable, como en el caso de los pacientes en los cuales la enzima presenta un valor de actividad que cae dentro del rango normal, y así poder prevenir el desencadenamiento de los ataques agudos.
- ♦ **Realizar estudios de expresión en bacterias de las mutaciones puntuales nuevas identificadas,** si las hubiese, para asegurar que la misma es la causa de la enfermedad en esa familia y para ampliar nuestros conocimientos acerca de la estructura molecular de la PBG-D.
- ♦ **Desarrollar una metodología adecuada, rápida y eficiente para el diagnóstico genético de individuos con PAI en el laboratorio,** la cual deberá permitir obtener resultados confiables, seguros y reproducibles.
- ♦ **Desarrollar métodos para la detección rápida y la búsqueda de nuevas mutaciones responsables de la enfermedad.**
- ♦ **Ofrecer una mayor caracterización de la heterogeneidad de la PAI a nivel del DNA,** la cual es de suma importancia para un mejor conocimiento de la fisiopatología de este desorden metabólico, así como para el desarrollo de métodos para el diagnóstico clínico, prevención y posible tratamiento de la enfermedad.



MATERIALES Y METODOS



I.1. Pacientes.

Se realizaron estudios bioquímicos y genéticos en 65 pacientes correspondientes a 27 familias diferentes. En primer lugar se estudió a un paciente con PAI sintomático de cada familia y luego se analizaron los familiares del mismo.

I.2. Determinación de ALA y PBG urinarios

Se realizó según el método de Mauzerall & Granick (1956). La cromatografía de los precursores se basa en el uso de resinas de intercambio iónico, compactadas en columnas (0,8 x 3,0 cm). Para la separación del PBG, se utilizó la resina aniónica Dowex 2X-8 en la forma acetato y, para el ALA, la catiónica Dowex 50X-8 en la forma ácida.

Se sembró 1 ml de orina (pH entre 5 y 7) en la columna aniónica y se lavó dos veces con 2 ml de agua destilada. El eluido se recogió en un tubo (T_A) y el PBG se eluyó de la columna con 7 ml de ácido acético 1 M. El T_A , que contiene ALA y urea, se sembró en la columna catiónica. Se lavó con 16 ml de agua destilada para eliminar la urea y luego se eluyó el ALA con 7 ml de acetato de sodio 0,5 N.

La determinación del ALA urinario se basa en la capacidad que tienen todas las aminoacetonas de condensarse con acetilacetona a pH 4,6 dando lugar a la formación de un pirrol con una posición alfa libre. Para la formación del pirrol a partir de ALA se procedió de la siguiente forma: 1 ml de solución que contiene ALA se mezcló con 1 ml de buffer acetato 1M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona y se calentó durante 10 min a 100°C para producir la condensación. Luego de

enfriar, se mezclaron volúmenes iguales de la solución conteniendo el pirrol y el reactivo de Ehrlich. A los 8 min de agregado el reactivo se leyó la absorbancia a 555 nm. En estas condiciones, la cantidad de ALA presente se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{mg ALA/24 h} = A_{555} * V_t * 0,00385 * V_{24}$$

donde:

V_t = volumen del tubo (ml)

V_{24} = diuresis total de 24 hs (ml)

0,00385 = factor aplicable correspondiente a la absorción de una solución de ALA de 1 mg/ml.

La determinación de PBG se basa en su reacción con el p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB), en medio ácido, para dar un compuesto de color rojizo. La técnica empleada (Moore & Labbe, 1974), consistió en mezclar volúmenes iguales de muestra y reactivo de Ehrlich a temperatura ambiente. Luego de la adición del reactivo, el máximo desarrollo de color se alcanza a los 8 min, manteniéndose constante hasta los 15 min, momento en que el color comienza a decaer. El cálculo del PBG se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{mg PBG/24 h} = \frac{A_{555} * V_t * V_{24}}{113,6}$$

donde:

V_t = volumen del tubo (ml)

V_{24} = diuresis total de 24 hs

113,6 = absorción de una solución de PBG en ácido acético cuya concentración es de 1 mg/ml.

1.3. Determinación de porfirinas totales urinarias.

La determinación de porfirinas libres totales en orina se realizó según la metodología de Seubert & Seubert (1983). La técnica consiste en intercambiar las porfirinas urinarias (1 ml de orina) sobre la resina aniónica (Dowex 2X-8) empaquetada en una columna cromatográfica (0,8 cm x 3,0 cm). Se lava la columna con agua destilada, y las porfirinas se eluyen con HCl 3N y se miden espectrofotométricamente.

$$\text{mg/24 h} = [2 A_{\text{máx}} - (A_{380} + A_{430})] * f * V_{\text{HCl}} * V_{24}$$

donde:

V_{24} = diuresis de 24 hs (ml)

$f = 1,185$

1.4. Determinación de la PBG-D en eritrocitos.

La actividad de la PBG-D en glóbulos rojos se determinó según la técnica de Batlle *et al.*, (1978). Los glóbulos rojos (500 μ l) se lisaron con 100 μ l de Tritón 5 % y 6,9 ml de buffer Tris HCl 0,05 M, pH 7,4. La mezcla de incubación contenía 250 μ l de glóbulos rojos lisados; 50 μ l de PBG (30 μ g/0,1 ml); 75 μ l de buffer Tris HCl 0,5 M, pH 8,2 y 125 μ l de solución NaCl-MgCl₂ (NaCl 1,7 M-MgCl₂.6 H₂O 0,12 M; 7:3 v/v) en un volumen final de 750 μ l. La presencia de la solución NaCl-MgCl₂ inhibe la actividad de la URO-D de modo que todo el producto de la reacción es Uro. La incubación se realizó aeróbicamente, en oscuridad y con agitación mecánica durante 120 min a 45°C. La reacción se detuvo con el agregado de 750 μ l de TCA 10 % y la mezcla se expuso a la luz blanca durante 20 min para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. Luego se centrifugó 10 min a 2000 rpm y se midieron en el sobrenadante las absorbancias de las porfirinas formadas. Se hicieron blancos de actividad que contenían sólo PBG y buffer. De esta manera todos los datos de actividad se corrigieron considerando las porfirinas formadas no enzimáticamente.

La cantidad de porfirinas formadas se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{nmoles porfirinas} = [2 A_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} - (A_{380} + A_{430})] * v * 1,008$$

donde:

v = volumen de la solución (ml)

1,008 = factor correspondiente para Uro en HCl 5 %

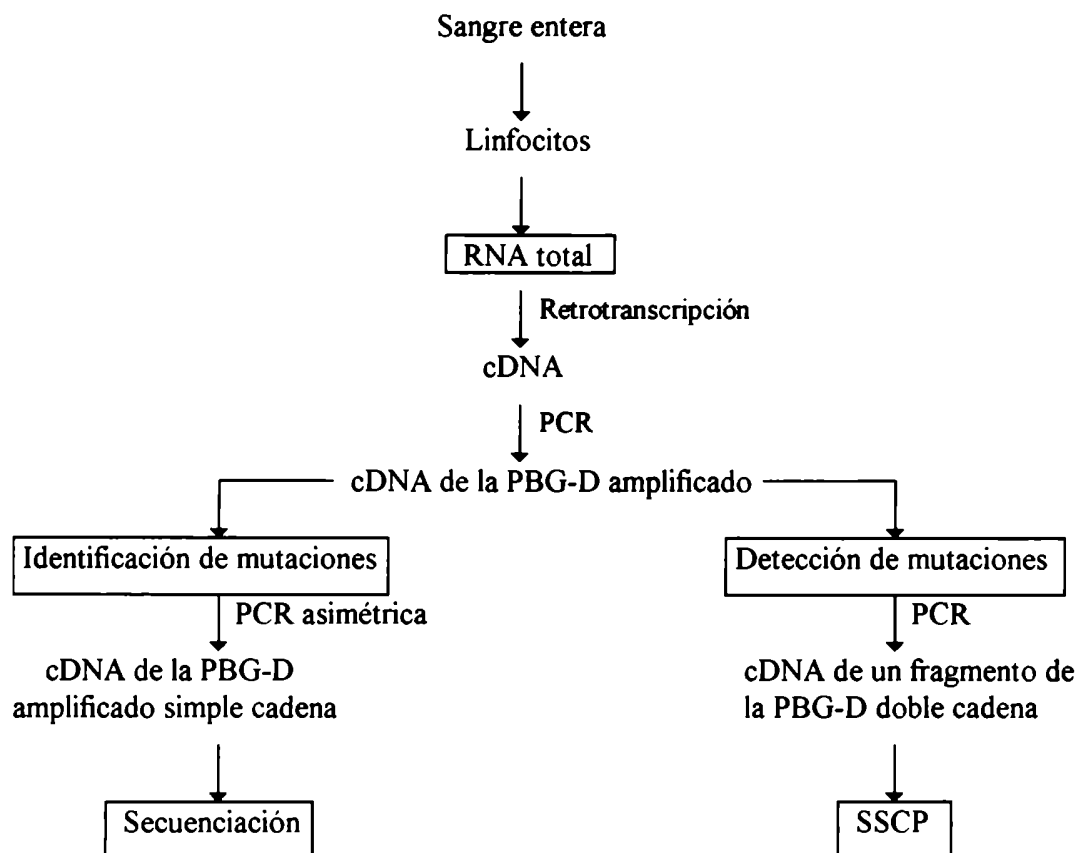
Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar un nmol de porfirinas en 1 hora, bajo las condiciones experimentales antes descriptas. La actividad específica se expresa, entonces, como nmol de porfirinas formadas en 1 hora por mg de proteína.

1.5. Referencias

- Battle, A.M. del C.; Wider de Xifra, 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.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) The occurrence and determination of δ -aminolaevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219:435-446.
- Moore, D. & Labbe, R. (1974) A quantitative assay for urinary porphobilinogen. *Clin. Chem.* 10:1105-1110.
- Seubert, A. & Seubert, S. (1983) Curso sobre porfirinas y porfirias. Etiopatogenia, clínica y tratamiento (Parte práctica). CIPYP. FCEyN (UBA) y CONICET.

II.1. Metodología partiendo de RNA

Esta metodología se desarrolló de la siguiente manera:



II.1.1. Separación de linfocitos

Los linfocitos se obtuvieron a partir de 15 ml de sangre entera extraída sobre 1 ml de EDTA (0,5 M, pH 8) como anticoagulante. El método de separación de linfocitos que se utilizó fue gradiente de densidad con Ficoll-paque de Pharmacia Biotech (Boyum 1968), siguiendo las instrucciones que incluye el producto con algunas modificaciones. La técnica se optimizó utilizando sangre de individuos normales.

Se realizó una primera centrifugación de 15 min a 2400 rpm y, al cabo de la misma, los glóbulos blancos (mononucleares y polimorfonucleares) formaron una capa blanca que separaba el plasma de los glóbulos rojos. Con una pipeta Pasteur, se extrajo la misma y se colocó en un tubo previamente cargado con 5 ml de PBS (KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,1 mM; MgCl_2 0,5 mM; NaCl 138 mM y Na_2HPO_4 8,1 mM). Se homogeneizó y se trasvasó a otro tubo que contenía 4 ml de Ficoll-paque. Luego de centrifugar 20 min a 1700 rpm, se observó una capa de plasma y, por debajo, la capa de mononucleares separada de los eritrocitos por el Ficoll-paque. Luego, se lavaron con 5 ml de PBS y por centrifugación (15 min a 1500 rpm) se obtuvo el pellet de linfocitos.

Alternativamente, se utilizó la técnica de lisis de glóbulos rojos, en la cual se utilizó un buffer de lisis de glóbulos rojos y luego de centrifugar (10 min a 3000 rpm) se realizaron dos lavados con 5 ml de PBS.

II.1.2. Aislamiento de RNA total.

El RNA total se aisló utilizando la técnica de **RNAzolTM B (Biotecx)**. El RNA total aislado de la línea celular eritropoyética K562 se utilizó como control en la optimización de la técnica.

Esta metodología se basa en el protocolo original de Chomczynski & Sacchi, (1987) y consta de cuatro etapas que se modificaron como se detalla a continuación:

i) Homogeneización: se resuspendió el pellet de linfocitos en 1 ml de **RNAzolTM B** (Isotiocianato de guanidina, β -Mercaptoetanol y Fenol) y luego se rompieron mecánicamente utilizando vortex.

ii) Extracción: se realizó agregando 0,15 vol de cloroformo y, luego de agitar 15 seg, se incubó 5 min a 4°C obteniendo la fase acuosa por centrifugación (15 min a 12500 rpm a 4°C).

iii) Precipitación: la fase acuosa se incubó con 1 vol de isopropanol 1 h a -20°C. Luego se centrifugó 15 min a 12500 rpm a 4°C.

iv) Lavado: el pellet se lavó con 1 vol de etanol 75 % y se recogió por centrifugación (8 min a 10.000 rpm a 4°C), se secó al aire durante 15 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en agua desionizada y autoclavada incubando 10 min a 65°C y se guardó inmediatamente a -70°C.

Alternativamente, se ensayaron otras dos metodologías para extraer el RNA total: a) Tiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987), y b) gradiente de Cloruro de Cesio (Ullrich *et al.*, 1977).

a) Extracción con Tiocianato de guanidina: Esta técnica se realizó en cuatro etapas:

i) Homogeneización: El pellet de linfocitos se resuspendió en 2 ml de solución desnaturante (Tiocianato de Guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM, pH 7; β -Mercaptoetanol 0,1 M y Sarkosil 0,5 % v/v) y las células se rompieron luego mecánicamente con ayuda de un homogeneizador (Teorer).

ii) Extracción de RNA: El lisado se transfirió a tubos de microcentrífuga y se le agregó 10 % v/v de acetato de potasio 2 M, pH 4. La extracción se realizó con 1 volumen de Fenol caliente (60°C) saturado en agua y 100 μ l de una solución de Cloroformo:Isoamílico (49:1). Luego de agitar, se incubó 15 min a 4°C y se centrifugó 15 min a 12500 rpm en frío.

iii) Precipitación: El RNA contenido en la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de Isopropanol durante 1 h a -20°C y se recogió por centrifugación a 4°C (15 min a 12500 rpm).

iv) Lavado: El pellet de RNA se resuspendió en 800 μ l de etanol 75 % y se centrifugó 10 min a 12500 rpm a 4°C. El pellet se secó al vacío y luego de resuspenderlo en agua desionizada y autoclavada se incubó 15 min a 60°C. El RNA se guardó inmediatamente a -70°C.

b) Gradiente en Cloruro de Cesio:

i) Homogeneización: El pellet de linfocitos se resuspendió en 3 ml de solución desnaturante (Tiocianato de guanidina 6 M; Citrato de sodio 5 mM; β -Mercaptoetanol 0,1 M; Sarkosyl 5 %; Perclorato de amonio 25 %) y luego las células se rompieron mecánicamente con una jeringa y aguja.

ii) Extracción: El lisado se transfirió a un tubo que contenía 1,5 ml de CsCl 5,7 M y se ultracentrifugó durante 20 hs, a 40000 rpm y a 15°C. A esta velocidad el RNA queda en el fondo. El pellet se resuspendió en buffer TE pH 7,5 (Tris.HCl 10 mM y EDTA 1 mM) incubando 10 min a 65°C.

iii) Precipitación: El RNA se precipitó con 0,1 vol de acetato de potasio y 2,5 vol de etanol 70 % durante 2 h a -20°C y se colectó por centrifugación (30 min a 10000 rpm a 4°C). Finalmente, el pellet se secó y se resuspendió en agua desionizada y autoclavada incubando 10 min a 65°C.

II.1.3. Retrotranscripción y amplificación por PCR

La obtención del cDNA y su amplificación se llevaron a cabo por PCR (Saiki *et al.*, 1988) según la técnica original de Mgone *et al.*, 1992; con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

El RNA (3 μ g) se retrotranscribió durante 1 h a 37°C en una mezcla de reacción de 20 μ l que contenía KCl 75 mM; TrisHCl 50 mM (pH 8,3); 50 μ M de cada dNTP; 0,5 μ g de oligo (dT)₁₂₋₁₈; DTT 10 mM y 200 U de Transcriptasa reversa M-MLV, de GIBCO. Para finalizar la reacción, la mezcla se calentó a 95°C durante 5 min e, inmediatamente se colocó en hielo. El cDNA así sintetizado, se amplificó directamente en la misma mezcla de reacción, por el agregado de 10 μ l de buffer TrisClH pH 8,3 10X; 1,1 mM de MgCl₂; 25 pmol de cada uno de los primers (F1 y R1, Tabla II.1) y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (de GIBCO) hasta un volumen final de 100 μ l. La amplificación se realizó por PCR, usando un Minicycler M. J. Research, con una etapa inicial de desnaturación de 3 min a 95°C y luego 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 1,5 min a 72°C. Finalmente, se hizo una extensión de 5 min a 72°C. Los productos de la PCR se testearon en un gel

de agarosa 1,4 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV, Fotodyne.

II.1.4. Elución del cDNA amplificado

El producto amplificado se sembró en una sola calle de un gel de agarosa 1,4 % teñido con bromuro de etidio y luego de una corrida electroforética de 1 h a 80 V en la cuba Horizon 58, la banda se cortó sobre el transiluminador y se eluyó toda la noche en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM pH 7,5).

II.1.5. Amplificación asimétrica por PCR

La obtención del DNA simple cadena se realizó por PCR asimétrica como se detalla a continuación, según la técnica de Mgone *et al.*, 1992, con ligeras modificaciones.

Se usaron 15 µl del cDNA eluido en una mezcla de reacción conteniendo KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 1,5 mM; 12,5 µM de cada dNTP; 3 U de Taq DNA polimerasa y una relación 100:1 (50 pmol:0.5 pmol) de los primers F2 y R2 (Tabla II.1). La PCR se llevó a cabo durante 40 ciclos a las temperaturas y tiempos utilizados para la RT-PCR. Los productos de esta PCR se testearon en un gel de agarosa 1,4 % teñido con bromuro de etidio.

II.1.6. Purificación del DNA simple cadena

El DNA simple cadena (DNAsc) se purificó utilizando Wizard PCR (PROMEGA) que permite obtener un templado libre de sales y de primers.

Tabla II.1. Primers utilizados en la amplificación por PCR y reacciones de secuenciación para la metodología a partir de RNA.

Nombre	Ubicación	Dirección	Secuencia
F1 = 019	Promotor	sense	5' ACT TTC CAA GCG GAG CCA TG 3'
F2 = 507	Exón 1	sense	5' CAT GTC TGG TAA CGG CAA TGC GG 3'
F3 = Phe 6	Exón 6	sense	5' ATG CCC TGG AGA AGA ATG A 3'
F4 = F413	Exón 8/9	sense	5' CCA GAG AAG AGT GTG GTG GGA A 3'
F5 = Phe 10	Exón 10	sense	5' GGA AGC TGG ACG AGC AGC AGG A 3'
F6 = Phe 11b	Exón 10/11	sense	5' CAG ATC CTG CAC CCT GAG GAA 3'
R1 = 020	3' no codificante	antisense	5' TAG GCA CTG GAC AGC AGC AA 3'
R2 = 508	3' no codificante	antisense	5' CTG TGC CCC ACA AAC CAG TTA AT 3'
R3 = Phe 14	Exón 14	antisense	5' CAT GGA TGG TAG CCT GCA TGG TCT C 3'
R4 = Phe 13	Exón 13	antisense	5' CTA CTG GCA CAC CTG CAG CCT C 3'
R5 = Phe 11	Exón 11	antisense	5' AGC ATA CAT GCA TTC CTC A 3'
R6 = Phe 4	Exón 4	antisense	5' CGA GGC TTT CAA TGT TGC CAC 3'

II.1.7. Secuenciación directa del cDNA

El cDNA simple cadena se secuenció por el método de los inhibidores de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) según el protocolo de Mgone *et al.*, 1992. La reacción de secuenciación se desarrolló según las siguientes etapas:

i) Pegado del primer al templado: el DNAsc (3 µg) se incubó con 1 pmol del primer; 3 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 2 µl de buffer (Tris-HCl 1 M, pH 7,6; MgCl₂ 100 mM y DTT 160 mM) durante 10 min a 60°C y, posteriormente, se dejó descender lentamente la temperatura hasta 20°C. Las secuencias de los primers utilizados para secuenciar el cDNA se encuentran en la Tabla II.1.

ii) Marcación: Para incorporar la marca al DNA, se le agregó 3 µl de mezcla de marcado (1,375 mM de dCTP, dGTP y dTTP; NaCl 333,5 mM); 0,5 µCi de [α^{35} S] dATP (DuPont) y 3 U de T7 DNA Polimerasa (Pharmacia) y se incubó 5 min a temperatura ambiente.

iii) Reacción de elongación y terminación: se prepararon cuatro tubos conteniendo 4,5 µl de la solución de DNA marcado, y a cada uno se le agregó 2,5 µl de una de las cuatro mezclas de

terminación: A (840 mM de dCTP, dGTP y dTTP; dATP 93,5 mM; ddATP 14 mM; Tris.HCl 40 mM, pH 7,6 y ClNa 50 mM), G, C ó T y se incubaron 5 min a 37°C.

iv) Finalización: la reacción se detuvo con 5 µl de solución Stop (0,3 % de azul de bromofenol; 0,3 % de Xylene cyanol; 10 mM de EDTA pH 7,5; 97,5 % de formamida desionizada).

Los productos secuenciados se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C e, inmediatamente se sembraron en un gel de poliacrilamida (6 %) que contenía 7 M de urea. Los geles se corrieron entre 2 y 6 hs, dependiendo de los resultados requeridos, a 50°C, y se fijaron con una solución 10 % metanol/ 10 % ácido acético. Luego, se secaron a 80°C, durante 3 hs a 25 mmHg de vacío y se expusieron a una película Kodak X-OMAT AR, por un período de 3 a 4 días.

II.1.8. Polimorfismo de conformación en simple cadena (SSCP)

En los últimos años, se han descripto varias técnicas para la búsqueda de mutaciones puntuales, entre ellas, el análisis por SSCP (Orita *et al.*, 1989), la cual permite detectar variaciones de movilidad que indican la presencia de mutaciones, sin embargo para identificar la mutación responsable de esta variación es necesario secuenciar.

i) PCR: Para realizar el análisis por SSCP, previamente se amplificó 5 µl del cDNA eluido (ver sección II.1.4., de Materiales y métodos) en una mezcla de reacción (Vf = 20 µl) conteniendo KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 1 mM; 12,5 µM de cada dNTP; 1 U de Taq DNA polimerasa; 0,5 µCi de [α^{35} S] dATP y 10 pmol de cada primer. Se analizaron 2 fragmentos: el 1 (152 pb) que contenía los exones 1, 3 y 4 utilizando los primers F1 y R6 y el fragmento 2 (273 pb) que contenía los exones 10 a 14 utilizando los primers F5 y R3 (Tabla II.1). La PCR se llevó a cabo durante 40 ciclos a las temperaturas y tiempos utilizados para la RT-PCR. Los productos de esta PCR se testearon en un gel de agarosa 1,4 % teñido con bromuro de etidio.

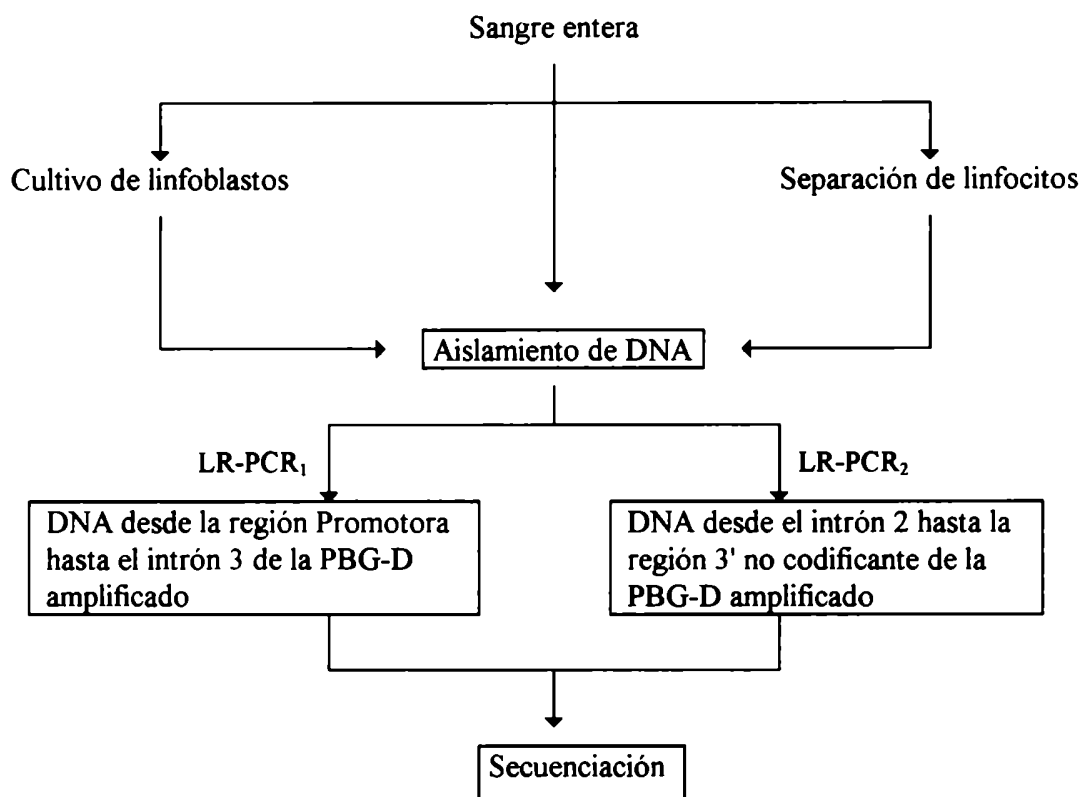
ii) Desnaturalización de la muestra: El fragmento de DNA amplificado y marcado radioactivamente (6 µl) se desnaturalizó con 4 µl de solución Stop (0,3 % de azul de bromofenol; 0,3 % de Xylene cyanol; 10 mM de EDTA pH 7,5; 97,5 % de formamida desionizada) y una

incubación de 5 min a 98°C e, inmediatamente se sembraron en un gel de poliacrilamida (5 %) no-desnaturalizante.

iii) Condiciones de la corrida: Se ensayaron varias condiciones electroforéticas para aumentar la sensibilidad del análisis. Los geles se corrieron con o sin glicerol (10 %) y a temperatura ambiente o a 4°C entre 10 y 20 hs, dependiendo de la longitud del fragmento a analizar. Luego, se secaron a 80°C, durante 3 hs a 25 mmHg de vacío y se expusieron a una película Kodak X-OMAT AR por un período de 4 días.

II.2. Metodología partiendo de DNA

Esta metodología se desarrolló de la siguiente manera:



II.2.1. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se aisló por dos metodologías: i) Fenol/cloroformo, y ii) Puregene (Gentra System. Inc.).

i) Fenol/Cloroformo: En los casos en que se utilizó esta técnica, primero se separaron los linfocitos por la metodología descrita en la sección II.1.1 de Materiales y Métodos. Luego, al pellet de glóbulos blancos se le agregó 350 µl de buffer TE, 700 µl de buffer de lisis y 300 µl de proteinasa K (2,5 mg/ml) y se incubó 4 horas a 55°C. A continuación, se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol saturado en Tris ClH (0,1 M, pH 8) y una extracción con un volumen de Cloroformo frío, al final de cada una se centrifugó 10 min a 5.000 rpm. A la fase acuosa recogida se le agregó 1/10 volúmenes de Acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó 1 hora a -70°C. Luego se centrifugó 3 min a 14.000 rpm y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70 % frío. El DNA así obtenido se secó al aire 10 min y se resuspendió en 40 µl de agua desionizada estéril.

ii) Puregene: En este caso se aisló el DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante, directamente de la sangre entera o, en las muestras que fue posible, se estableció previamente un cultivo de linfoblastos (Anderson & Gusella, 1984).

II.2.2. "Long range" PCR

El gen de la PBG-D (10 Kb) se amplificó en dos fragmentos (PR y LR) utilizando la enzima *rTth* DNA polimerasa XL (Gene Amp, XL PCR Kit, Perkin Elmer) especialmente diseñada para amplificar secuencias largas de DNA (5 a 40 Kb) (Cheng *et al.*, 1994). El fragmento PR de 4,5 Kb se amplificó con los primers PR 3 y PR 4 (Tabla II.2) que abarcan desde la región promotora hasta el intrón 3, y el fragmento LR de 5,5 Kb se amplificó con los primers LR 3 y LR 4 (Tabla II.2) que abarcan desde el intrón 2 hasta la región 3' no codificante.

En ambos casos se preparó una mezcla inferior de la siguiente manera: 12 µl de buffer XL (Tricine, acetato de potasio, glicerol y DMSO); 4 µl de Mg(AcO)₂ (25 mM); 8 µl de

dNTP's (10 mM); 1,6 µl de mezcla de primers (25 µM cada uno) PR 3 + PR 4 ó LR 3 + LR 4 y 14,4 µl de agua desionizada. A esta mezcla se le agregó una gema de cera (AmpliWax™, Perkin Elmer) para aumentar la especificidad de la PCR y se incubó 5 min a 80°C y 5 min a 25°C. Una vez realizado este proceso conocido como "hot start", se agregó la mezcla superior que contenía 18 µl de buffer XL; 2 µl de DNA (2 µg); 2 µl de enzima *rTth* DNA polimerasa XL (2 U/µl) y 38 µl de agua destilada. Luego de incubar 1 min a 94°C, la amplificación se llevó a cabo en dos etapas: la primera (16 ciclos) se realizó con una desnaturalización de 30 seg a 94°C y el pegado de los primers y la elongación de la enzima se realizó a 67°C durante 5 min. La segunda etapa (12 ciclos) se realizó con una desnaturalización de 30 seg a 94°C y el pegado de primers y la elongación de la enzima se realizó a 67°C comenzando en 5 min 15 seg, e incrementando 15 seg por ciclo. La etapa de extensión final se realizó a 72°C durante 10 min.

Los productos amplificados se testearon en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio. Luego se purificaron utilizando QIAquick PCR purification kit, de QUIAGEN, para eliminar los primers, dNTP's y sales.

II.2.3. Secuenciación

Se secuenciaron cada uno de los 15 exones y 30 bases de cada intrón usando Amplicycle™ sequencing kit (Perkin Elmer), el cual posee una enzima (AmpliTaQ DNA polimerasa) recombinante que permite la secuenciación del DNA doble cadena. Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: a un grupo de 4 tubos que contenían 2 µl de cada mezcla de terminación (por ejemplo, la mezcla de terminación G contiene: 22,5 µM de c^7 dGTP; 10 µM de cada uno de los dATP, dCTP y dTTP; y 80 µM de ddGTP en 10 mM Tris HCl y 0,1 mM de EDTA, pH 7,5), se le agregó 6 µl de la siguiente mezcla: 5 µl de cycling mix (1,25 U de Amplitaq DNA polimerasa en 500 mM de TRIS-HCl, pH 8,9; 100 mM de KCl; 25 mM de MgCl₂ y 0,25 % Tween 20), 1 µl de primer (20 µM); 1 µl de DNA (100 ng); 22 µl de H₂O y 1 µl de [α ³³P] dATP (1 µCi, Dupont). Luego de agregarle

Tabla II.2. Primers utilizados en la amplificación por LR-PCR y reacciones de secuenciación para la metodología a partir de DNA.

Nombre	Región que secuencia	Ubicación	Dirección	Secuencia
PR 3		Promotor	sense	5' TGC TCC CAC TTC AGT TAC TTG TCT TTA 3'
PR 4		Intrón 3	antisense	5' GAC GCC CAT CTC TAA ACC TAA TCA GGA C 3'
LR 3		Intrón 2	sense	5' AAG GGA CCA GCC TTG GAG TAT TTC CCC ACT C 3'
LR 4		3' no codificante	antisense	5' CAA GGA TAG AAG GGC GGT TGA GGT GTG C 3'
EP 58	Exón 1	Promotor	sense	5' GAG ACC AGG AGT CAG ACT GT 3'
EP 116	Exón 2/3	Intrón 1	sense	5' CCC ACT GAC AAC TGC CTT GGT CAA G 3'
EP 71	Exón 4	Intrón 3	sense	5' CCT AAC CTG TGA CAG TCT 3'
EP 48	Exón 5/6	Intrón 6	antisense	5' AGA CCT AGC ATA CTA GGG 3'
EP 77	Exón 7	Intrón 7	antisense	5' AGG GTC AGG CCC CAA AGG GAA AGG 3'
EP 128	Exón 8	Intrón 7	sense	5' CGA GAG AAT AGA GGT GAT 3'
EP 12	Exón 9	Intrón 9	antisense	5' TTG TCT TTT TCC TTG GCT GC 3'
EP 9310	Exón 10	Intrón 9	sense	5' GGG AAA GAC AGA CTC AGG CAG AG 3'
EP 25	Exón 11	Intrón 11	antisense	5' CGG TAG CAT CCC AAG GTC T 3'
EP 15.1.12	Exón 12	Intrón 12	antisense	5' TAA GAA ATC TTC CCT GC 3'
EP 1613	Exón 13	Intrón 12	sense	5' CAG TGA TGT CCT CAG GTC TG 3'
EP 20	Exón 14	Intrón 13	sense	5' ATC CCA GGT TTC TAG GTA G 3'
EP 15.1	Exón 15	Exón 14	sense	5' AGA CCA TGC AGG CTA CCA TC 3'
EP 15.2	Exón 15	3' no codificante	antisense	5' CGT GAC CTG TCG TCG TTG 3'

a cada tubo una gota de aceite mineral, los tubos se introdujeron en el ciclador térmico M. J. Research precalentado a 95°C durante 3 min. Los ciclos de la reacción de secuenciación (30 ciclos) se realizaron con una etapa de desnaturalización de 30 seg a 95°C, el pegado del primer se realizó por 30 seg a 60°C y la elongación de la enzima durante 60 seg a 72°C. La reacción se paró con el agregado de 4,5 µl de solución stop (95 % de formamida; 20 mM de EDTA; 0,05 % de azul de bromofenol y 0,02 % de xylene cyanole).

Luego de una etapa de desnaturalización de 3 min a 94°C las muestras se sembraron en un gel de poliacrilamida (4 %) conteniendo 7 M de urea precalentado a 50°C. Las muestras se corrieron a 80 W por diferentes períodos de tiempo (entre 2 y 6 hs) dependiendo del primer utilizado y la región a analizar. En la Tabla II.2 se indican los primers utilizados para la secuenciación de cada exón. Al finalizar la corrida electroforética, el gel se transfirió a un papel de filtro (Whatman N° 3) y se secó por 2 hs a 90°C. Luego se expuso a una película autorradiográfica (Kodak X-OMAT) durante 12 a 24 hs.

II.3. Detección rápida de mutación G111R por primer-ASO

La técnica de primer-ASO se usa para detectar mutaciones conocidas en un gen, empleando dos juegos de primers que contienen la secuencia mutada o la normal. Estos juegos de primers amplifican por PCR sólo si tienen el alelo correspondiente. Esta técnica se empleó para la detección de la mutación G111R, la cual se produce por un cambio GGA→AGA en el nucleótido 331.

Se desarrollaron 2 PCRs que amplifican un fragmento de 170 pb empleando dos grupos de primers. Un juego de primers amplifican el alelo mutante: AD 76 (sense) 5' CCC TAG GCT CCA CCA CTG AAG 3' y AD 7M (antisense): 5' GCA AGA CTC TTA CTT GCA GAT GGC TCT 3', el cual lleva la base mutada en el extremo 3'. El otro juego de primers amplifican el alelo normal: AD 76 (sense) y AD 7N (antisense): 5' GCA AGA CTC TTA CTT GCA GAT GGC TCC 3'. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl que contenía buffer10X Tris-ClH pH 8,3 (10 µl); 0,5 mM de Cl₂Mg; 12,5 µM de cada dNTP; 100 ng de DNA genómico; 25 pmol de cada primer y 2,5 U de Taq polimerasa (GIBCO). El programa de amplificación

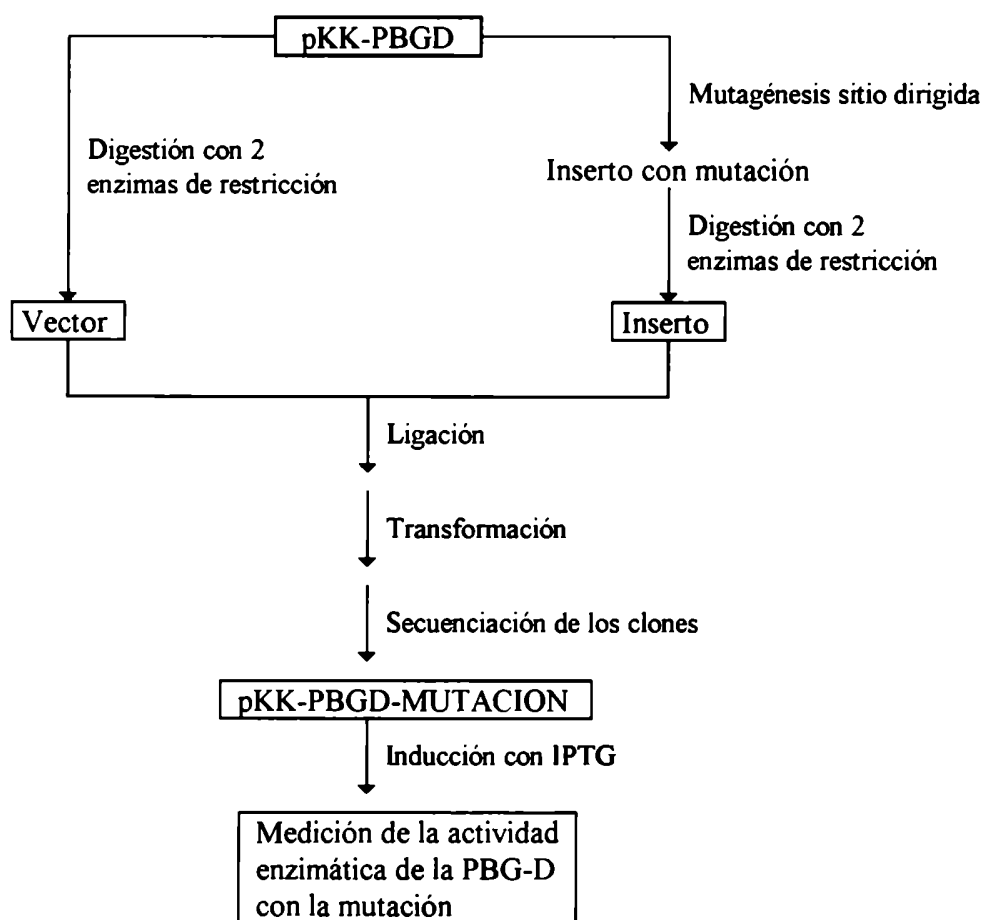
(Minicycler M. J. Research) fue el siguiente: 3 min a 95°C (desnaturalización) y luego 30 ciclos de: 30 seg a 95°C; 30 seg a 65°C y 20 seg a 72°C, finalmente se realizó una etapa de elongación de 5 min a 72°C. Los productos se sembraron en un gel de agarosa (2 %) teñido con bromuro de etidio.

II.4. Referencias

- Anderson, M.A. & Gusella, J.F. (1984) Use of cyclosporin A in establishing Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines. *In vitro (Rockville)*. **20**:856-858.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5695-5699.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. *Annal. Biochem.* **162**:156-159.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R. & Connor, J.M. (1992) Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of *in vitro* amplified cDNA. *Hum. Genet.* **90**:12-16.
- Orita, M.; Iwahara, 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.
- Saiki, R.K.; Gelgard, D.H.; Stoffer, S.J.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.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**:5463-5467.
- Ullrich, A.; Shine, J.; Chirgwin, J.; Pickett, R.; Tischler, E.; Rutter, W.J. & Goodman, H.M. (1977) Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*. **196**:1313-1317.

III.1. Metodología de expresión

Con el objetivo de realizar la expresión procariótica de las mutaciones **Q34P** y **G335S**, se desarrolló la siguiente metodología:



III.2. Mutagénesis sitio dirigida

Para expresar los alelos de la PBG-D normal y mutante se utilizó el constructo de expresión pKK-PBGD, el cual contiene la región codificante de la PBG-D ubicada detrás del codón de iniciación ATG del vector pKK233-2 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.); que permite la expresión inducible por IPTG de la PBG-D en *E. coli* cepa JM109 transformadas y además posee una resistencia a ampicilina para su selección.

III.2.1. Mutación Q34P

La introducción de la mutación Q34P se realizó por mutagénesis sitio dirigida (Warner *et al.*, 1992) utilizando dos primers que amplifican un fragmento de 596 pb: MV 101 (5' AAG ATG AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC CGC AAG AGC CAG CTT GCT CGC ATA CCG ACG GAC 3') "sense", que contiene la mutación (en rojo) y un sitio de corte para la enzima de restricción *Kpn* I (subrayado); y el primer MV 672 (5' CAC AGC ATA CAT GCA TTC CTC AGG GTG CAG 3') "antisense", que contiene un sitio de corte para la enzima de restricción *Nsi* I (subrayado). Con estos primers se realizó una PCR en una mezcla de reacción de 100 µl que contenía KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); MgCl₂ 1 mM; 200 µM de cada dNTP; 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Gibco) y 50 ng de DNA del constructo pKK-PBGD; se colocaron los tubos en el ciclador y una vez que llegó a 94°C se agregó 25 pmol de cada primer. La PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a 65°C y 20 seg a 72°C; finalmente se incubó 5 min a 72°C para la elongación final. Los productos se testearon en un gel de agarosa 1,4 % teñido con bromuro de etidio.

III.2.2. Mutación G335S

La introducción de la mutación G335S se realizó por la misma metodología que la Q34P pero utilizando dos primers que amplifican un fragmento de 611 pb: MV 1030 (5' ATC CAG CAT GTT TTT GGC TCC TTT GCT CAG CAA CAA GTT GGC CAG GCT GAT GCT CAA GTT CTG GGC AGC CAA 3') "antisense", que contiene la mutación (en rojo) y un

sitio de corte para la enzima de restricción *Blp* I (subrayado); y el primer MV 472 (5' CGA AGA GCA GCC CAG CTG CAG AGA AAG TTC 3') "sense". Con estos primers se realizó una PCR en las mismas condiciones que en III.2.1.

III.3. Digestión del plásmido y del inserto

Cada uno de los insertos obtenidos y el plásmido pKK-PBGD se digirieron con dos enzimas de restricción para luego poder ligarlos y obtener el constructo que posee la mutación deseada.

III.3.1. Mutación Q34P

Se digirió 20 µl de inserto (2 µg) (del producto de amplificación de III.2.1) con 50 U de la enzima *Nsi* I (Biolabs) y 5 µl de buffer para *Nsi* I (100 mM de NaCl; 10 mM de Tris-HCl; 10 mM de Mg Cl₂; 1 mM de DTT; pH 8,4) en un volumen final de 50 µl. Se incubó 6 h a 37°C y luego de inactivar la enzima por calor (20 min a 65°C) se digirió con *Kpn* I (Biolabs). Con esta enzima la digestión se realizó en un volumen final de 100 µl con 50 U de la misma; 5 µl de buffer NE1 (10 mM de Bis Tris Propano-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, pH 7) y 0,2 µg de Seroalbúmina bovina. Se incubó toda la noche a 37°C.

Por otro lado se digirió el vector pKK-PBGD (2 µg) con las mismas enzimas y en las mismas condiciones de reacción.

III.3.2. Mutación G335S

Se digirió 20 µl de inserto (2 µg) (del producto de amplificación de III.2.2) con 50 U de la enzima *Bst*XI (Biolabs) y 5 µl de buffer NE4 (50 mM de acetato de potasio; 20 mM de Tris-acetato; 10 mM de acetato de magnesio; 1 mM de DTT; pH 7,9) en un volumen final de 50 µl. Se incubó 16 horas a 55°C y luego de inactivar la enzima por calor (20 min a 65°C) se digirió

con *Bln* I. En este caso la digestión se realizó en un volumen final de 100 µl con 50 U de enzima (Biolabs) y 5 µl de buffer NE4. Se incubó 16 horas a 37°C.

Asimismo se digirió el vector pKK-PBGD (2 µg) con las mismas enzimas y en las mismas condiciones de reacción.

Luego de realizar las digestiones se procedió a remover el fosfato 5' del vector para evitar la autoligación de fragmentos mal digeridos, si los hubiese. Para ello se agregó a los 100 µl de digerido 10 U de Fosfatasa alcalina (Biolabs), y se incubó 1 h a 37°C; luego se agregó 5 mM de EDTA y se calentó 1 h a 65°C.

III.4. Purificación y cuantificación del plásmido e inserto

Una vez realizadas las digestiones con ambas enzimas de restricción, se sembró en un gel de agarosa 2 % 10 µl de inserto y en uno 0,9 % 15 µl de vector. Se comparó con las muestras sin digerir y si las enzimas de restricción cortaron correctamente se procedió a la purificación utilizando Wizard PCR (PROMEGA) que eliminan dNTP's y fragmentos de hasta 50 pb. En el caso del inserto de la mutación G335S, luego de digerir con *Nsi* I se generaban dos fragmentos, uno de 114 pb y el otro de 593 pb. Para eliminar el fragmento de 114 pb fue necesario realizar una corrida en un gel de agarosa 2 % y luego cortar la banda de 393 pb la cual, posteriormente, se purificó con Wizard PCR.

Para cuantificar el vector y el inserto, se sembró en un gel de agarosa 0,5 y 1 µg del marcador de 1 Kb (Gibco) y 1 µl de muestras con cantidad desconocida. Luego de una corrida a 80 V durante 1 h se comparó la intensidad de las bandas de la muestra incógnita con la del marcador, obteniendo así una cantidad aproximada de DNA plasmídico y del inserto.

III.5. Ligación del vector con el inserto

Se procedió a la ligación del vector con el inserto que contiene la mutación correspondiente, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción. Para ello se realizaron 3 relaciones molares

diferentes (vector:inserto): 1:3 (L_1), 1:6 (L_2) y 1:12 (L_3). Además se realizó un blanco sin inserto (B), y un blanco de transformación utilizando el plásmido normal pKK-PBGD (C). El volumen final de ligación fue 20 μ l y contenía: 50 ng de vector; 18 ng, 36 ng ó 54 ng de inserto; 400 U de T4 DNA Ligasa (Biolabs) y 2 μ l de buffer de reacción (50 mM de Tris-ClH, pH 7,8; 10 mM de $MgCl_2$; 10 mM de DTT; 1 mM de ATP; 50 μ g/ml de Seroalbúmina bovina). En estas condiciones se incubó 16 h a 16°C.

III.6. Preparación de células competentes

Se repicó una colonia de *Escherichia coli* JM109 crecida en medio M9 (6 g/l de Na_2HPO_4 ; 3 g/l de KH_2PO_4 ; 0,5 g/l de NaCl; 1 g/l de NH_4Cl ; 15 g/l de agar, pH 7,4; 2 mM de $MgSO_4$; 0,1 mM de $CaCl_2$; 0,2 % de glucosa y 1 mM de Tiamina-HCl) y se creció toda la noche en 3 ml de medio líquido LB (1 % de peptona; 1 % de NaCl 0,5 % de extracto de levadura; pH 7,5) a 37°C. Luego se diluyó 0,5 ml del medio de cultivo crecido con 100 ml de medio fresco y se dejó crecer hasta fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}} = 0,6$). Se cosecharon las células por centrifugación (5 min a 7000 g a 4°C). El pellet se resuspendió en 20 ml de $MgCl_2$ 0,1 M y luego de incubar 15 min en hielo se centrifugó nuevamente (5 min a 7000 g a 4°C). Posteriormente el pellet se resuspendió en 2 ml de CaCl 0,1 M y se incubó 1 h en hielo. Las células competentes se guardaron a -70°C con 20 % de glicerol.

III.7. Transformación

Se pusieron en contacto 100 μ l de células competentes con 20 μ l de DNA plasmídico producto de la ligación (sección III.5) durante 30 min en hielo. Luego se incubó 2 min a 42°C y 5 min en hielo. Se agregó 450 μ l de medio LB fresco y se incubó 1 h a 37°C. Finalmente se sembró en medio LB sólido con ampicilina y se dejó crecer a 37°C durante 16 h.

III.8. Minipreparación del DNA plasmídico

Una vez obtenidos los clones, se repicaron 20 de una región elegida al azar, en 4 ml de medio LB con ampicilina y se dejó crecer toda la noche a 37°C para extraer el DNA plasmídico. Para ello, se cosecharon las células de 3 ml de medio por centrifugación y el pellet se resuspendió en 300 µl de solución hipotónica P1 (50 mM de Tris ClH; 10 mM de EDTA y 50 µg/ml de RNAsa A; pH 8) y 300 µl de solución de lisis P2 (200 mM de NaOH; 1 % de SDS). Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente 5 min. Se agregó 300 µl de solución de neutralización P3 (3 M AcOK, pH 4,8) y se mezcló nuevamente por inversión. Luego de centrifugar 10 min a 13000 rpm, al sobrenadante se le agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se incubó 5 min en hielo y se volvió a centrifugar (10 min a 13000 rpm). El pellet que contenía el DNA plasmídico se lavó con 1 volumen de etanol 70 %, se dejó secar al aire y se resuspendió en 30 µl de agua desionizada. El DNA así preparado se guardó a -20°C. Además 400 µl de medio crecido con cada clon se guardó con 100 µl de glicerol a -70°C (glicerolato).

III.9. Secuenciación de los clones

Cada uno de los clones se secuenció para asegurar la presencia de la mutación correspondiente y verificar que el resto del inserto no tenga mutaciones que se pudieron producir por error a lo largo de todo el procedimiento. El método de secuenciación utilizado fue el mismo que se describió en la sección II.2.3 de Materiales y Métodos, utilizando Amplicycle™ sequencing kit (Perkin Elmer).

III.10. Medición de actividad enzimática específica de la PBG-D

Una vez obtenido el clon que posee la mutación correspondiente sin errores a lo largo de toda la secuencia codificante de la PBG-D, se procedió a medir la actividad enzimática para

determinar en que medida afecta la mutación a la actividad de la enzima, según la técnica de Anderson & Desnick (1982) y Tsai *et al.* (1988).

El clon correspondiente se repicó del glicerolato guardado a -70°C y se dejó crecer en 5 ml de medio LB con ampicilina a 37°C con agitación constante durante 16 h. Luego, 200 µl de ese medio crecido se diluyó en 10 ml de medio fresco LB sin ampicilina y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,6$). Una vez alcanzada esta fase se realizó la inducción con 5 mM de IPTG durante 3 hs y agitación constante.

Luego de la inducción se cosecharon las células de 1,5 ml de medio por centrifugación (13000 rpm durante 1 min) y el pellet se lavó con una solución de NaCl 0,9 %. Las células se lisaron con 250 µl de buffer de lisis (1 mM de buffer $NaPO_4$, pH7,6; 1 mM de DTT; 1 mM de $MgCl_2$; 0,05 % de Tritón-X-100) y 3 pulsos de sonicación de 15 seg a 4°C. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima para la medición de actividad. El sistema de incubación se preparó en un volumen final de 800 µl que contenía: 100 µl de sobrenadante; 500 µl de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1; 135 µl de PBG 2,21 mM. Se incubó 45 min a 37°C y la reacción se paró con 800 µl de TCA 10 %. Luego de centrifugar 15 min a 10000 rpm, se iluminó durante 20 min y se midió a 380, 406 y 430 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard. Se realizó un blanco de sustrato.

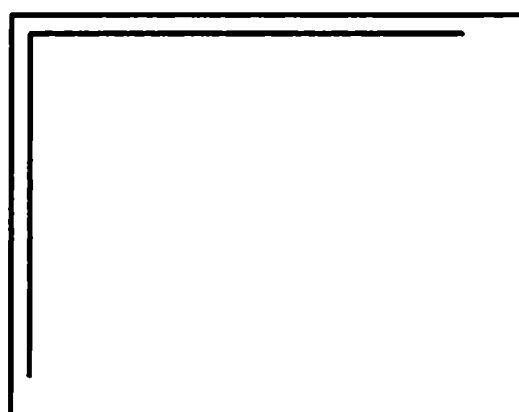
Paralelamente, se midió actividad del clon pKK-PBGD (normal) el cual se lo consideró como un 100 % de actividad, y de la bacteria *E. coli* JM109, el cual se consideró un 0 % de actividad.

Para calcular la actividad específica se determinaron las proteínas por el método de Bradford (1976).

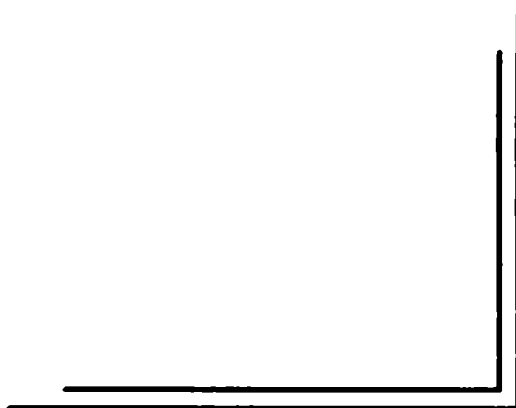
III.11. Referencias

Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1982) Porphobilinogen deaminase: Methods and principles of the enzymatic assay. *Enzyme*. 28:146-157.

- 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.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 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.
- 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.



RESULTADOS Y DISCUSION



CAPÍTULO I. Análisis de la población argentina con PAI. Estudios bioquímicos.

I.1. Estudios bioquímicos

En la Tabla I.1 se muestran los resultados de los estudios bioquímicos realizados a 65 pacientes correspondientes a 27 familias no relacionadas. En primer lugar se estudió a un paciente con PAI sintomático de cada familia y luego se analizaron los familiares del mismo. Se analizaron todos los integrantes disponibles de la familia para poder diagnosticar la mayor cantidad de individuos normales y latentes de la misma.

Tabla I.1. Estudios bioquímicos.

Familia	Paciente	Sexo	Edad(*)	Orina			PBG-D	Pedigree
				ALA	PBG	Porfirinas Totales		
1	(P)-FTB	F	48 (1988)	6,2	11,0	563	32,60	-
2	(P)-GLV	F	34 (1982)	9,8	80,7	678	42,96	-
	(L)-ALV	F	60	1,1	2,0	50	31,84	Madre
	(N)-RAV	M	60	1,0	1,1	18	72,40	Padre
3	(P)-ELH	F	41 (1994)	4,6	19,9	624	48,66	-
	(P)-BEH	F	46 (1995)	2,7	8,7	437	37,70	Hermana
	(P)-ROH	F	49 (1993)	9,4	40,8	724	42,11	Hermana
	(N)-MIH	M	34	2,5	1,9	81	67,69	Hermano
	(L)-FLM	F	16	0,7	0,5	124	31,13	Hija de ELH
4	(L)-HSS	F	54	1,3	1,8	127	29,12	-
	(N)-GUS	M	30	1,6	1,0	124	63,65	Hijo
	(N)-NAL	F	21	1,9	2,0	30	57,91	Nieta
5	(P)-AAD	F	27 (1995)	4,1	9,1	770	41,20	-
	(L)-MED	F	41	1,9	1,7	125	35,45	Hermana
	(N)-IVR	F	15	2,1	2,0	52	68,74	Sobrina
6	(P)-COS	F	53 (1968)	5,6	44,9	3107	36,67	-

Familia	Paciente	Sexo	Edad(*)	Orina			PBG-D	Pedigree
				ALA	PBG	Porfirinas Totales		
7	(P)-CEG	F	40 (1987)	8,2	66,6	500	31,96	-
	(L)-MLJ	F	72	1,6	2,3	197	27,53	Madre
	(N)-ELG	M	81	1,3	1,8	130	72,43	Padre
8	(P)-SEO	F	40 (1989)	3,9	13,4	551	42,93	-
	(P)-VON	F	40 (1989)	1,3	7,7	170	41,27	Hermana
9	(P)-LIM	F	36 (1995)	39,0	183,0	1525	37,77	-
	(N)-GUM	M	25	2,0	1,2	118	51,98	Hermano
	(N)-ADM	F	34	1,3	0,8	47	68,41	Hermana
	(L)-STM	F	42	2,3	1,8	0	43,08	Hermana
	(N)-GRM	F	39	2,2	3,0	41	66,44	Hermana
10	(P)-AFA	F	47 (1986)	20,1	65,6	849	67,27	-
11	(P)-MRF	F	38 (1993)	21,6	74,1	1195	62,69	-
12	(P)-EFF	F	38 (1995)	2,9	8,6	881	41,34	-
	(L)-YOF	F	63	1,6	5,0	125	36,39	Madre
	(N)-PAF	M	68	1,4	1,8	224	63,21	Padre
13	(P)-LUM	F	23 (1994)	17,7	93,3	1286	39,62	-
14	(P)-MIV	F	43 (1996)	12,8	99,8	875	64,43	-
15	(P)-GSV	F	28 (1989)	8,8	34,5	2176	54,78	-
	(L)-GGV	M	31	2,2	1,5	100	40,85	Hermano
	(L)-MAV	M	59	1,5	1,5	184	47,51	Padre
16	(P)-MOA	F	39 (1981)	12,3	102,0	1538	31,40	-
	(P)-SUA	F	41 (1982)	5,5	30,2	1001	21,18	Hermana
	(N)-RAA	M	38	0,7	2,5	36	43,71	Hermano
	(N)-FEV	F	18	0,5	2,3	59	64,39	Hija
17	(P)-ALS	F	50 (1989)	6,5	46,1	617	41,94	-
18	(P)-MAC	F	34 (1996)	18,2	56,7	3913	56,97	-
19	(P)-MCE	F	37 (1989)	4,9	34,5	813	51,81	-
20	(P)-NCH	F	60 (1974)	5,7	41,4	339	35,89	-
	(L)-CAL	M	32	1,1	1,0	23	36,97	Hijo
	(L)-MAL	F	14	1,1	1,0	52	45,20	Nieta
21	(P)-SAM	F	25 (1994)	36,7	182,5	6831	29,15	-
	(L)-ABM	F	50	1,9	3,4	218	36,15	Madre
	(N)-OSM	M	58	1,3	1,8	169	79,00	Padre
	(L)-ALM	M	24	2,3	4,1	180	39,53	Hermano
22	(P)-SUM	F	45 (1987)	6,3	43,1	828	31,48	-
	(L)-JUM	M	71	0,9	1,7	130	25,93	Padre
	(N)-ARE	F	65	0,8	1,0	120	41,90	Madre
	(N)-BEM	F	42	0,7	0,9	110	42,99	Hermana

Familia	Paciente	Sexo	Edad(*)	Orina			PBG-D	Pedigree
				ALA	PBG	Porfirinas Totales		
23	(P)-SIP	F	49 (1995)	4,5	15,8	1502	47,96	-
	(L)-LAB	F	27	0,6	1,4	60	33,70	Hija
	(L)-FAB	F	25	1,9	0,7	35	37,60	Hija
24	(P)-TEP	F	37 (1987)	7,8	37,1	687	24,44	-
25	(P)-ARM	F	58 (1987)	9,8	68,9	465	71,12	-
	(L)-CLM	F	33	1,0	2,5	41	46,60	Hija
	(L)-MAM	M	20	1,3	1,8	166	50,07	Hijo
26	(P)-LIN	F	47 (1990)	6,4	30,8	690	38,74	-
	(L)-EZP	M	16	3,1	1,7	123	44,64	Sobrino
	(L)-DIP	M	21	1,7	1,2	65	39,19	Sobrino
27	(P)-MCP	F	42 (1995)	33,6	224	4067	49,53	-

P = Propósito; L = individuo con PAI latente; N = individuo normal.

(*): Edad actual. () Fecha del primer ataque agudo

Valores normales:

ALA = 2-4 mg/24 h; PBG = 1-2 mg/24 h; Porfirinas totales = 20-250 µg/24 h; PBG-D = 81,51 ± 11,96 U/ml GR (Mujeres) y 73,13 ± 13,62 U/ml GR (Hombres).

En base a los estudios bioquímicos, determinamos que, de los 65 individuos estudiados, el 46 % resultó ser PAI sintomático, el 31 % PAI latente y el resto (23 %) fueron normales. Los individuos PAI latentes y normales se diagnosticaron en base a la actividad PBG-D eritrocitaria disminuida, debido a que el ALA, PBG y Porfirinas totales urinarias se encuentran dentro del rango normal. Asimismo, el 82 % del total de individuos afectados, correspondió al sexo femenino. No se analizó ningún individuo PAI sintomático correspondiente al sexo masculino.

I.2. Análisis de la población argentina con PAI

El CIPYP (Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias) es el único centro de referencia de estudio de todas las porfirias en la Argentina. Funciona desde el año 1978 y desde

esa fecha se diagnosticaron numerosos casos de PAI en base a los estudios bioquímicos antes mencionados.

En este trabajo se analizaron cuidadosamente los estudios bioquímicos realizados a todas las familias que concurrieron al CIPYP desde su inicio para poder tener datos precisos de la enfermedad en la población argentina.

Los resultados y conclusiones obtenidos fueron los siguientes:

- Hasta el día de la fecha se diagnosticaron en el CIPYP 240 casos de PAI que aún se encuentran vivos.
- Si consideramos que esos 240 casos corresponden a la totalidad de la población argentina con PAI, podemos determinar la frecuencia de la enfermedad en esta población, obteniendo un valor de 1:125.000.
- La frecuencia de la PAI en la población argentina es baja comparada con los pocos datos descriptos para otras poblaciones. Así, por ejemplo, también en base a estudios bioquímicos se estimó una prevalencia de la enfermedad de 2-7:100.000 en Finlandia (Mustajoki *et al.*, 1992) y 7,7:100.000 en Suecia (Wetterberg 1967). Además se ha identificado una comunidad en el norte de Suecia con una prevalencia extremadamente alta (1:49) ya que todas las familias de esta comunidad descienden de un ancestro común (Andersson *et al.*, 1995).
- Los 240 casos estudiados correspondían a 80 familias diferentes.
- De los 240 casos analizados el 58,2 % fue PAI latente y el 41,8 % PAI sintomáticos.
- Cuando diferenciamos a los casos por sexos notamos que la enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres: el 72,4 % eran mujeres y el resto (27,6 %) eran hombres, lo cual representa una relación de sexo F:M, 7:3 respectivamente (Figura I.1). Si bien en la población sueca se encontró también un mayor número de casos en mujeres que en hombres, la relación de F:M no fue tan diferente (3:2) (Waldenström 1956).

- Cuando consideramos solamente los individuos con PAI latente no se observó una gran diferencia entre sexos: el 58,7 % correspondió a mujeres y el 41,3 % a hombres. En el caso de los PAI sintomáticos, sin embargo, se observó una notable diferencia entre ambos sexos: 91 % para el sexo femenino y 9 % para el sexo masculino (Figura I.1). Esto nos indica que no sólo la enfermedad es menos frecuente en hombres sino que además es poco común que estos últimos desarrollen los síntomas, debido a que las mujeres están más expuestas a los factores desencadenantes de los ataques agudos que caracterizan la PAI.

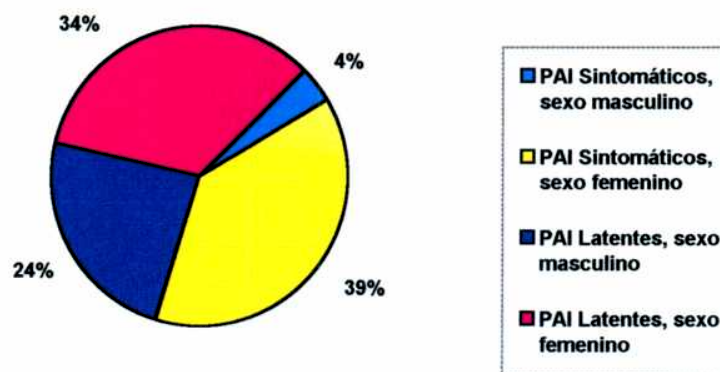


Figura I.1. Gráfico que representa la población argentina con PAI

I.3. Referencias

- Andersson, C.; Thunell, S.; Floderus, Y.; Forsell, C.; Lundin, G.; Anvret, M.; Lannfelt, L.; Wetterberg, L. & Lithner, F. (1995) Diagnosis of acute intermittent porphyria in northern Sweden: an evaluation of mutation analysis and biochemical methods. *J. Int. Med.* **237**:301-308.
- Mustajoki, P.; Kauppinen, R.; Lannfelt, L.; Lilius, L. & Koistinen, J. (1992) Frequency of low erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in Finland. *J. Inter. Med.* **231**:389-395.
- Waldenström, J. (1956) Studies on the incidence and heredity of acute porphyria in Sweden. *Acta Genet.* **6**:122-131.
- Wetterberg, L.A. (1967) In Neuropsychiatric and genetical investigation of Acute Intermittent Porphyria. *Stockholm University Books, Stockholm. Sweden.*

CAPÍTULO II.

Estudios genéticos.

Desarrollo y optimización de las técnicas.

II.1. Metodología partiendo de RNA

II.1.1. Separación de linfocitos

Debido a que el grado de pureza de los linfocitos depende de la eficiencia en la separación de células rojas, la sangre entera con el anticoagulante se procesó por dos técnicas: lisis de glóbulos rojos o gradiente de densidad (Ficoll-paque) donde se evaluó además su rendimiento como se indica en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Separación de linfocitos por distintas metodologías.

N	Método	X = # Cels. (10^7)/ml
10	Lisis de GR	$1,30 \pm 0,4$
10	Ficoll-paque	$2,43 \pm 0,2$

A partir de estos resultados decidimos emplear el protocolo de Ficoll-paque ya que, no sólo nos permitió obtener mayor cantidad de células, sino que además el pellet no estaba contaminado con hemoglobina.

Para mejorar la eficiencia de separación con Ficoll-paque se ensayaron diferentes tiempos y velocidades de centrifugación en las distintas etapas, adoptando finalmente los descriptos en materiales y métodos.

El pellet de linfocitos puede utilizarse directamente para el aislamiento del RNA total o guardarse a -70°C , aunque, con el proceso de congelamiento/descongelamiento, se observó una pérdida aproximada del 30 % de células totales.

II.1.2. Aislamiento del RNA total

La eficiencia de la extracción de RNA depende de la cantidad total obtenida, del grado de pureza (A_{260}/A_{280}) y, fundamentalmente, de la no-degradación observada en un gel de agarosa 1 % y formaldehído. Con el objetivo de optimizar estos parámetros, se probaron distintas técnicas: Tiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987), ultracentrifugación en Cloruro de cesio (Ullrich *et al.*, 1977) y RNAzol™ B, de Biotecx. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla II.2 y en la Figura II.1.

Utilizando la técnica de Cloruro de Cesio (Ullrich *et al.*, 1977), la pureza del RNA fue la óptima pero, la baja cantidad de RNA extraída la hace poco conveniente para nuestros fines. Por otro lado, si comparamos los resultados obtenidos con las otras dos metodologías (Tabla II.2), se observa que no hay diferencias significativas entre ambas, sin embargo, decidimos adoptar la estrategia del RNAzol™ B dado que involucra menos etapas y por lo tanto el RNA está más protegido de la degradación por RNAsas. Así, como se muestra en la Figura I.1, con la técnica del Tiocianato de Guanidina el RNA obtenido se encontraba casi siempre parcialmente degradado, lo cual generalmente no ocurría cuando se empleaba RNAzol™ B. Esta degradación parcial puede deberse a la fuente de tejido de partida, ya que partiendo de la línea celular K562 (Figura II.1) o de levaduras (dato no mostrado) no se observaba esa degradación.

La preparación de un RNA no degradado está obstaculizada por la presencia de RNAsas celulares activas, ya que en el momento de la ruptura celular, inevitablemente hay una mezcla rápida de RNA y RNAsas. Una manera de evitar la degradación nucleotídica es desnaturalizar todas las proteínas celulares, incluyendo estas enzimas. Esto sólo es posible si la tasa de desnaturalización es mayor que la tasa de degradación (Chirgwin *et al.*, 1979). La tasa de desnaturalización se maximiza por el uso combinado de un fuerte desnaturalizante, el Tiocianato de Guanidina, que es un potente

agente caotrópico, y un reductor, el β -Mercaptoetanol, que rompe puentes disulfúricos, que son esenciales para la actividad de la RNAsa (Sela *et al.*, 1956).

Tabla II.2. Aislamiento del RNA total por distintas metodologías.

Método	Muestra	Cantidad de RNA (μg)	Pureza (A_{260}/A_{280})
RNAzol™ B	1	32	1,8
	2	19	1,7
	3	25	1,7
	4	28	1,8
	K562	200	1,8
Tiocianato de Guanidina	1	19	1,7
	2	18	1,7
	3	24	1,6
	4	28	1,6
	K562	180	1,8
Cloruro de Cesio	1	10	1,9
	2	4	2,1
	3	2	2,2
	4	5	2,0
	K562	100	2,0

Los linfocitos se obtuvieron a partir de sangre entera de individuos normales y se utilizó como control la línea celular eritropoyética K562, que se replicó en medio líquido RPMI con 20 % de suero fetal bovino.

En base a estas consideraciones, pudimos optimizar aún mas la técnica de RNAzol™ B focalizando nuestra atención en la etapa de homogeneización. Para ello ensayamos diferentes métodos de ruptura celular, como el homogeneizador Polytron (Teorer), el Vortex o simple mezcla por pipeteo, resultando ser el mejor sistema de ruptura celular para la obtención de una buena preparación de RNA el empleo del Vortex.

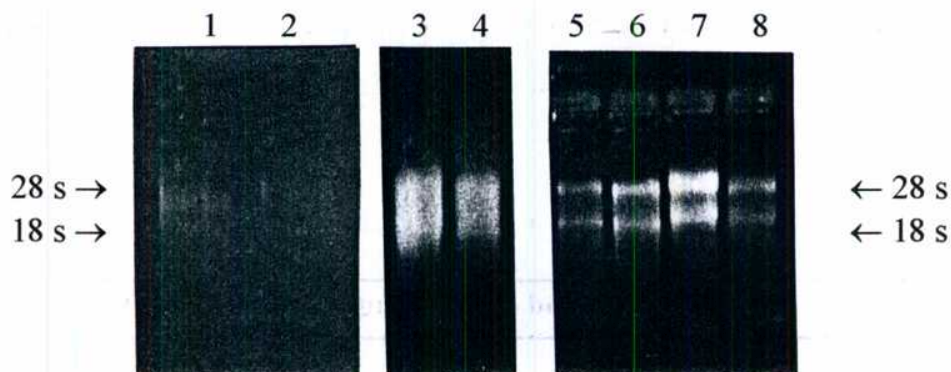


Figura II.1. Aislamiento del RNA por distintas metodologías.

Calles 1 a 6: RNA extraído de linfocitos de sangre entera por: 1 y 2 = gradiente en CICs; 3 y 4 = Tiocianato de Guanidina; 5 y 6 = RNAzol™ B. Calles 7 y 8: RNA extraído de linfocitos de la línea celular K562 por: 7 = Tiocianato de Guanidina; 8 = RNAzol™ B. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1 % y formaldehído.

Además, combinamos estas formas de ruptura celular con distintas soluciones desnaturizantes: I = RNAzol™ B; II = RNAzol™ B + 4 M de Tiocianato de Guanidina; III = RNAzol™ B + 0,7 % de β -Mercaptoetanol y IV = RNAzol™ B + 4 M de Tiocianato de Guanidina + 0,7 % de β -Mercaptoetanol. El agregado de Tiocianato de Guanidina no dió resultado, ya que el RNA obtenido formaba un precipitado gelatinoso no aprovechable para nuestros fines. La mejor opción fue adicionar β -Mercaptoetanol al RNAzol™ B (solución III).

Además, para evitar la presencia de RNAsas exógenas, el material y las soluciones se trataron de diferentes maneras, siendo las óptimas las que se enuncian a continuación. El material plástico siempre fue nuevo, y se autoclavó durante 20 min a 1 atm de presión, secándose en estufa a 90°C durante 5 hs. El material de vidrio, sin embargo, se sometió a calentamiento 230°C durante 5 hs antes de su utilización; y, las soluciones que lo permitían, se trataron con 0,1 % de DEPC (Dietilpirocarbonato) toda la noche y luego se autoclavaron (20 min a 1 atm) para eliminar trazas de este compuesto (Fedorcsak & Ehrenberg, 1966). La resuspensión final del RNA se realizó con agua desionizada y autoclavada pero sin DEPC, ya que éste inhibe a las enzimas empleadas en la RT-PCR (Kumar & Lindberg, 1972).

II.1.3. Retrotranscripción y amplificación por PCR

Con el objetivo de optimizar la RT-PCR en las condiciones de nuestro laboratorio, nos basamos en la técnica original de Mgone *et al.*, 1992 y sobre ella realizamos las siguientes modificaciones:

i) Calidad de RNA: Para estudiar la influencia de la pureza, cantidad y degradación del RNA sobre la RT-PCR, partimos de RNAs de diferentes calidades. Con una pureza menor a 1,7 no se observaba amplificación; sin embargo, si esta era 1,7 ó mayor, se obtenía una banda de amplificación, aunque el RNA estuviese parcialmente degradado, (Figura II.2).

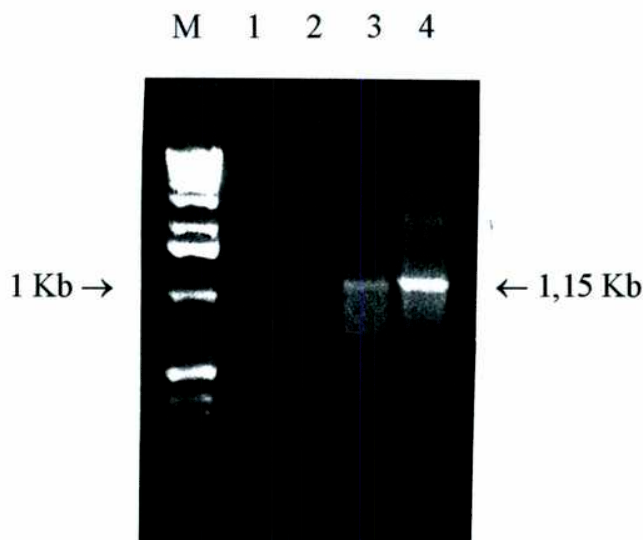


Figura II.2. RT-PCR: Pureza del RNA.

Se utilizaron en la RT-PCR, RNAs de diferentes purezas (A_{260}/A_{280}): Calles: 1 = 1,5; 2 = 1,6; 3 = 1,7 y 4 = 1,8. M = marcador de 1 Kb. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio.

ii) Cantidad de RNA: Otro factor de importancia es la cantidad de RNA, ya que partiendo de 1 μ g el producto de amplificación fue mínimo o nulo, observándose mejores resultados cuando se partió de 2 a 3 μ g de RNA (Figura II.3).

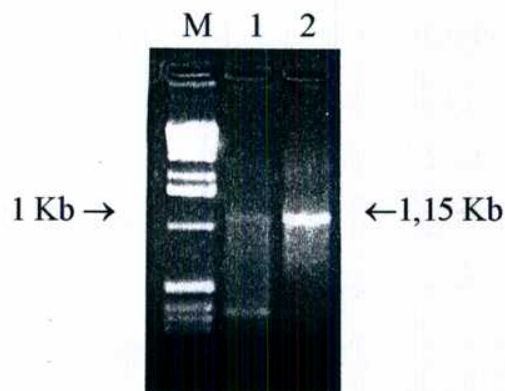


Figura II.3. RT-PCR: Cantidad de RNA.

Diferentes cantidades de RNA se utilizaron para la RT-PCR. Calles: 1 = 1 µg y 2 = 3 µg. M = marcador de 1 Kb. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio.

iii) Primers utilizados en la Retrotranscripción: El oligo (dT)₁₂₋₁₈ se pega a la cola de poli(A) de los RNA mensajeros, permitiendo la retrotranscripción de los mismos. Sin embargo, para aumentar la especificidad de la RT, utilizamos alternativamente el primer del extremo 3' terminal (R1, en la Tabla II.1 de "Materiales y Métodos"). Debido a la presencia de bandas inespecíficas y a la baja amplificación del cDNA buscado se continuó empleando el sistema original con oligo d(T)₁₂₋₁₈ (Figura II.4).

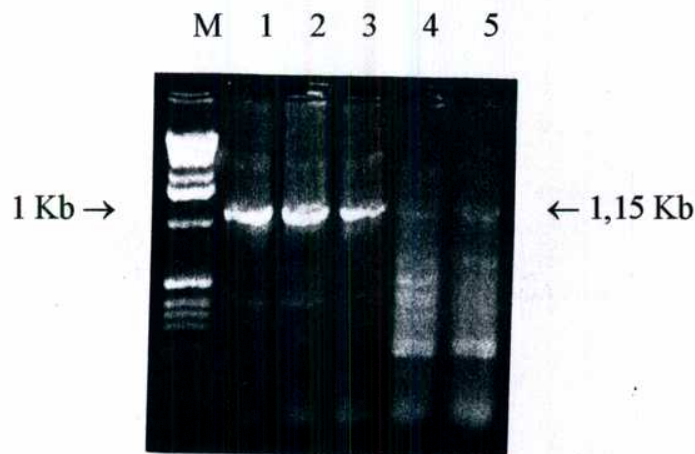


Figura II.4. RT-PCR: Primers utilizados en la RT.

Calles 1, 2, 4 y 5 = RNA aislado a partir de células de la línea K562 y calle 3 = RNA extraído a partir de linfocitos de sangre entera. Diferentes oligos se utilizaron para la RT: calles: 1-3 = oligo d(T)₁₂₋₁₈, y 4-5 = primer R1. M = marcador de 1 Kb. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio.

iv) Concentración de magnesio: La enzima Taq DNA polimerasa utiliza al magnesio como cofactor y cada sistema de primers posee una concentración óptima del mismo, donde produce un máximo de amplificación del fragmento buscado y un mínimo de bandas inespecíficas. En base a esto, desarrollamos PCRs con diferentes concentraciones de magnesio (0,6 mM; 1,1 mM; 1,6 mM; 2,1 mM; 2,5 mM y 3 mM) y los mejores resultados se obtuvieron con una concentración 1,1 mM (Figura II.5).

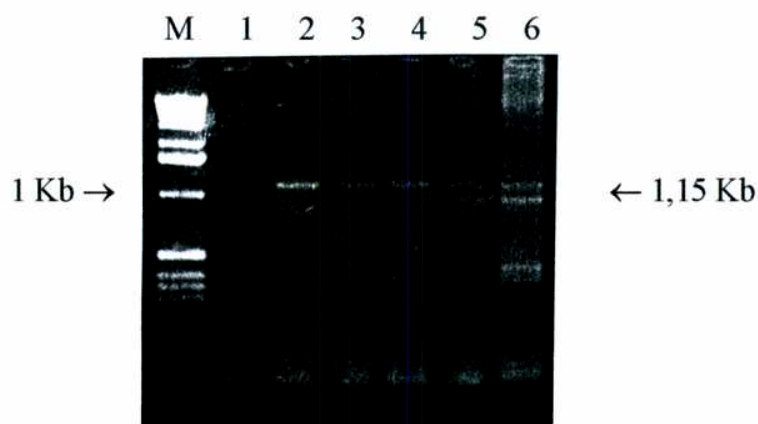


Figura II.5. RT-PCR: Concentración de magnesio.

Distintas concentraciones de magnesio ensayadas en la RT-PCR, calles: 1 = 0,6 mM; 2 = 1,1 mM; 3 = 1,6 mM; 4 = 2,1 mM; 5 = 2,5 mM y 6 = 3 mM. M = marcador de 1 Kb. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio.

v) Concentración de dNTP's: Para mejorar la amplificación, se ensayaron distintas concentraciones de cada uno de los dNTPs (12,5 μ M, 25 μ M y 50 μ M). Como se observa en la Figura II.6, los mejores resultados se obtuvieron con 50 μ M de cada desoxinucleótido.

vi) Temperatura de pegado de primers: Se probaron dos temperaturas de pegado de primers, 55°C y 60°C, observándose mejores resultados con ésta última (dato no mostrado).

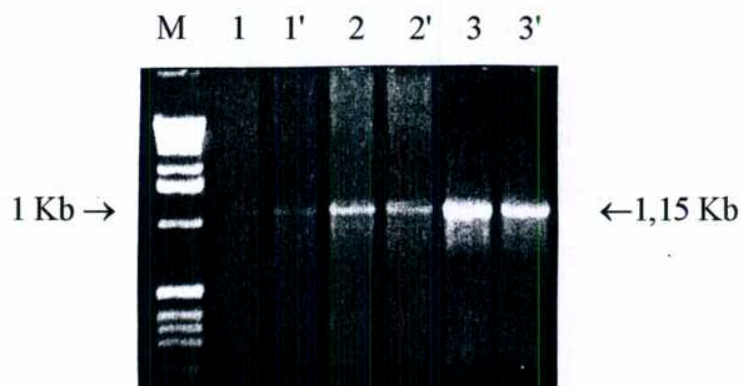


Figura II.6. RT-PCR: Concentraciones de dNTP's.

Distintas concentraciones de cada uno de los dNTP's ensayadas en la RT-PCR. Calles: 1 y 1' = 12,5 μ M, 2 y 2' = 25 μ M, y 3 y 3' = 50 μ M. M = marcador de 1 Kb. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio.

II.1.4. Amplificación asimétrica

Luego de la purificación en un gel de agarosa (Figura II.7) y posterior elución, el producto de la RT-PCR, queda muy diluído, por lo tanto, para aumentar la eficiencia de la PCR asimétrica, se aumentó la cantidad de cDNA de partida a 15 μ l obteniéndose resultados satisfactorios (Figura II.8).

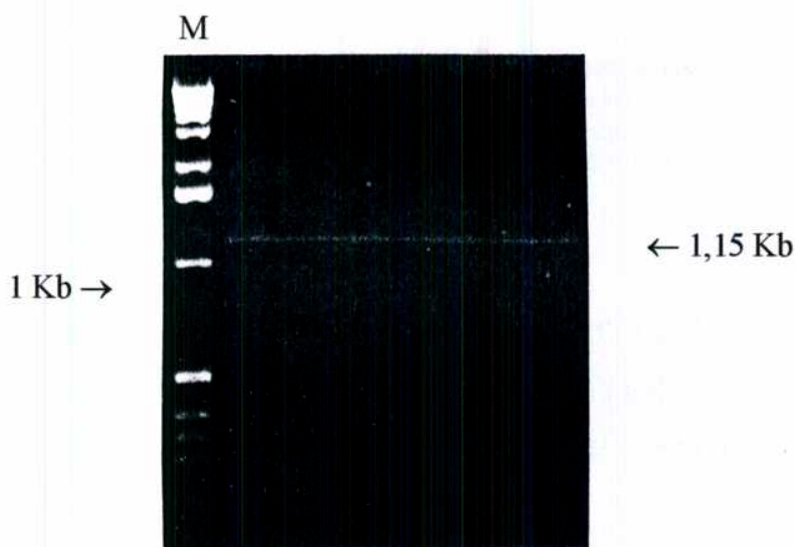


Figura II.7. Purificación del producto de la RT-PCR.

La muestra se corrió en un gel de agarosa 1,4% teñido con bromuro de etidio para su posterior elución. M = marcador de 1 Kb.

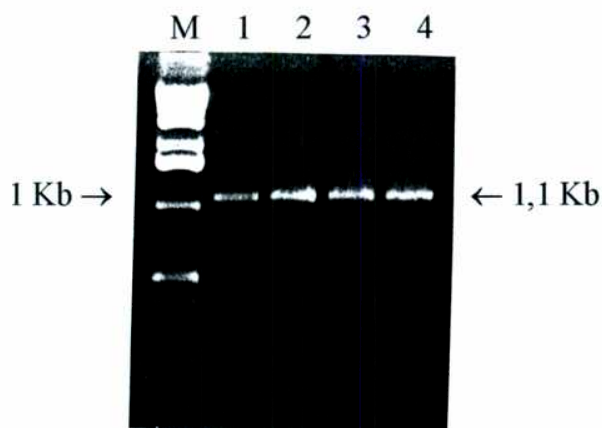


Figura II.8. PCR asimétrica: Condiciones óptimas.

Calles 1 y 2 = RNA extraído a partir de la línea celular K562. Calles 3-4 = RNA extraído de linfocitos de sangre entera. Para la obtención del cDNA simple cadena se utilizaron distintas concentraciones de primers: calles 1 y 3 = F2, 50 pmoles y R2, 0.5 pmoles; calles 2 y 4 = F2, 0.5 pmoles y R2, 50 pmoles. M = marcador de DNA de 1 Kb. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio. La banda de amplificación de 1,1 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D.

II.1.5. Secuenciación directa

Por la técnica descrita en la sección II.1.7 de "Materiales y métodos", se secuenció el cDNA de la PBG-D de 2 individuos normales con el objetivo de poner a punto la técnica. La secuencia obtenida coincidió con la publicada previamente (Raich *et al.*, 1986), lo cual verifica la eficiencia de la metodología.

La estrategia utilizada consistió en el uso de diferentes primers para la secuenciación por "tramos" del cDNA completo. El producto de una reacción de secuenciación con el primer elegido, se corrió en un gel de poliacrilamida a distintos tiempos (2, 3 y 6 hs), lo cual permitió leer aproximadamente 250 pb. Por lo tanto, se utilizaron 10 primers (Tabla II.1 de "Materiales y Métodos") para obtener secuencias solapadas y asegurar así la lectura precisa.

II.1.6. Condiciones finales elegidas para la metodología partiendo de RNA

La estrategia elegida, secuenciación directa del cDNA simple cadena de la PBG-D, partiendo del RNA extraído a partir de los linfocitos de cada paciente, evita el empleo de líneas celulares de linfoblastos, método que si bien provee de una mayor cantidad de RNA, es muy costoso, largo y riesgoso ya que debe utilizarse el virus Epstein-barr. En cambio nuestro laboratorio ha desarrollado una metodología que nos permite obtener un diagnóstico rápido en una semana.

Partiendo de apenas 20 ml de sangre se prepara una cantidad de RNA suficiente para realizar todos los estudios necesarios para el diagnóstico del paciente. Para ello separamos los linfocitos por la técnica de gradiente de densidad (Ficoll-paque) y luego aislamos el RNA utilizando el reactivo comercial RNazol™ B con el agregado de β -Mercaptoetanol.

Para obtener el cDNA de la PBG-D amplificado realizamos una RT-PCR a través de la técnica de Mgone *et al.*, (1992) con algunas modificaciones: concentración de $MgCl_2$ (1,1 mM), concentración de cada dNTPs (50 μM) y cantidad de RNA inicial (3 μg), (Figura II.9).

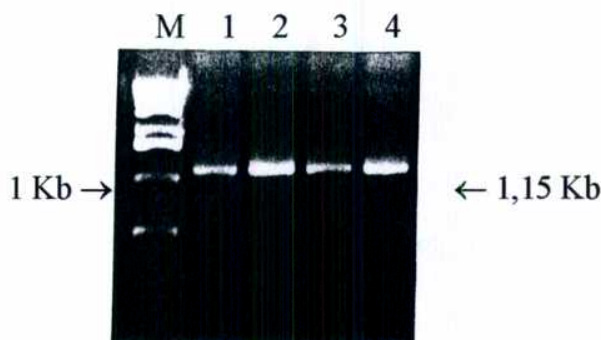


Figura II.9. RT-PCR: Condiciones óptimas.

Calles 1 y 2 = RNA extraído de linfocitos de sangre entera de dos pacientes con PAI; calles 3 y 4 = RNA extraído a partir de la línea celular K562. M = marcador de DNA de 1 Kb. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 1,4 % teñido con Bromuro de etidio. La banda de amplificación de 1,15 Kb coincide con el tamaño del cDNA de la PBG-D amplificado.

Luego de purificar el cDNA amplificado, se obtuvo el cDNA simple cadena amplificado a través de dos PCRs asimétricas independientes. Finalmente se procedió a la secuenciación directa.

Debemos enfatizar, que los resultados son altamente reproducibles y nos permiten obtener la secuencia completa del cDNA del individuo afectado.

II.2. Metodología partiendo de DNA

II.2.1. Long range PCR

El gen de la PBG-D (10 Kb) se amplificó en dos fragmentos (PR y LR) utilizando la enzima *rTth* DNA polimerasa XL (Gene Amp, XL PCR Kit, Perkin Elmer) como se detalló en "Materiales y Métodos", siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Para optimizar la reacción de LR-PCR se realizó utilizando la técnica de "Hot start" y se probaron diferentes concentraciones de acetato de magnesio y condiciones de los ciclos.

i) Técnica de "Hot start": Durante la reacción de PCR la actividad exonucleasa 3'→5' de la polimerasa podría digerir o modificar el extremo 3' de los primers cuando la enzima, primers y el acetato de magnesio se colocan juntos. Para eliminar este problema en la LR-PCR se utiliza la técnica de "Hot start"; la cual puede realizarse manualmente, o utilizando una gema de cera (AmpliWax™, Perkin Elmer) para "hot start" automatizada con la que observamos una alta reproducibilidad.

ii) Concentración de acetato de magnesio: La cantidad óptima de $Mg(AcO)_2$ depende de la calidad y composición de los dNTPs, del buffer de reacción (principalmente por la presencia de quelantes), del par de primers y de la secuencia a amplificar. Una alta concentración de $Mg(AcO)_2$, produce una acumulación de producto no específico (múltiples bandas en un gel de agarosa) y una muy baja concentración resulta en una cantidad muy baja de producto (bandas débiles o ninguna banda en un gel de agarosa). En base a esto, se testaron varias concentraciones de magnesio (0,7; 0,8; 0,9; 1,00; 1,125 y 1,25 mM) para optimizar la

cantidad de producto amplificado. Los resultados se observan en la Figura II.10. La concentración óptima fue 0,8 mM, sin embargo debido a que la banda de amplificación fue muy débil se eligió la concentración 1 mM donde si bien hay un poco de inespecífico, el producto se obtuvo en mayor cantidad.

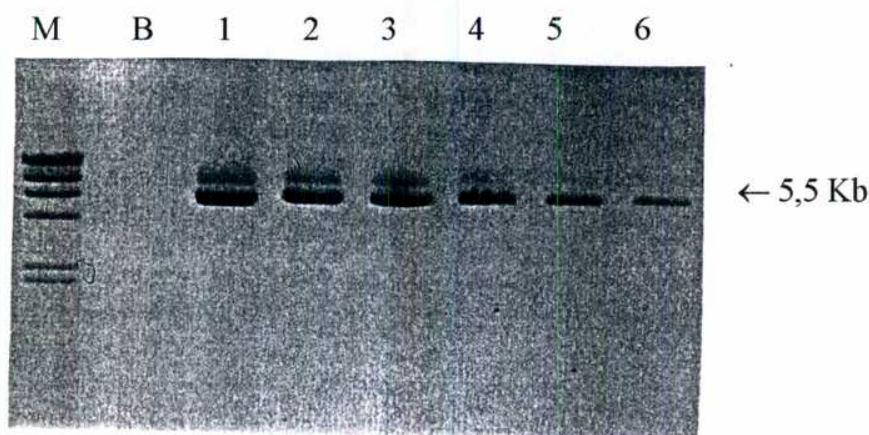


Figura II.10. LR-PCR: Concentración de $Mg(AcO)_2$.

Calles: 1 a 6 = Distintas concentraciones de $Mg(AcO)_2$ en la LR-PCR de un DNA aislado de linfoblastos: 1 = 1,25; 2 = 1,125; 3 = 1,00; 4 = 0,9; 5 = 0,8 y 6 = 0,7 mM. M = marcador de DNA λ Hind III. B = Control de contaminación (sin DNA). Las muestras se testearon en un gel de agarosa 1 % teñido con Bromuro de etidio. La banda de 5,5 Kb coincide con el tamaño del fragmento LR de la PBG-D que se amplificó con los primers LR 3 y LR 4 (Tabla II.2 de Materiales y Métodos) que abarcan desde el intrón 2 hasta la región 3' no codificante.

iii) Condiciones de los ciclos: La LR-PCR se desarrolla en dos etapas: la primera, con tiempo de extensión fijo y, la segunda, con tiempo de extensión incremental. Se considera que la enzima *rTth* DNA polimerasa XL amplifica 1 Kb de DNA en 30 a 60 segundos, por lo tanto la longitud del fragmento a amplificar afecta el tiempo de extensión inicial. En este caso el fragmento es de 5,5 Kb, por lo tanto, se probaron dos tiempos en la extensión de la primera etapa (fija): 5 y 6 min. A medida que transcurren los ciclos, la cantidad de DNA aumenta, por lo tanto el número de moléculas de enzimas se vuelve limitante en ese tiempo de extensión. Para mantener la eficiencia de amplificación hay que aumentar el tiempo de extensión en los

ciclos posteriores, por eso se desarrolla una segunda etapa en la cual se incrementa 15 seg por ciclo.

El número de ciclos en ambas etapas, varía con el número de copias inicial, nosotros probamos 16 ciclos en la etapa fija y 12 ciclos en la etapa de tiempo de extensión incremental.

Para obtener óptimas reacciones de especificidad, los primers deben tener una longitud de 30 bases y las temperaturas de pegado de primer/extensión deberían estar entre 60 y 70°C utilizando, generalmente la mas alta temperatura de pegado de primers posible. Si se utiliza 65°C o más se puede obtener la máxima eficiencia en solo dos etapas en cada ciclo de amplificación: desnaturalización (94°C) y pegado de primer/extensión (65°C). Por lo tanto, teniendo en cuenta esto se probaron dos temperaturas de pegado de primer/extensión: 65 y 67°C.

En la Figura II.11 se indican los resultados de las 3 condiciones descriptas para el tiempo y temperatura de pegado de primer/extensión: 6 min a 65°C, 5 min a 65°C y 5 min a 67°C, obteniendo la menor cantidad de inespecífico pero con gran cantidad de producto de amplificación trabajando a 67°C, 5 min.

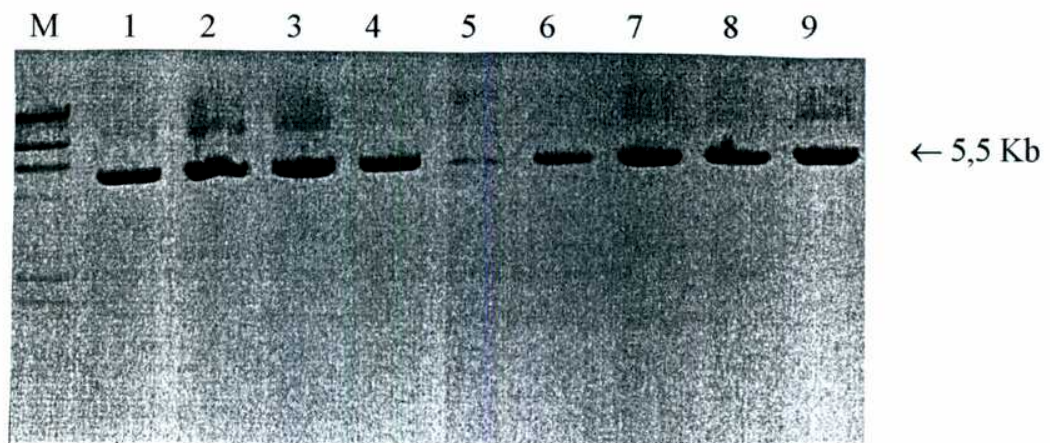


Figura II.11. LR-PCR: Condiciones de pegado de primers/extensión.

Calles: 1 a 9 = Distintas condiciones de pegado de primers/extensión en la LR-PCR de un DNA aislado de linfoblastos: 1 a 3 = 6 min a 65°C; 4 a 6 = 5 min a 65°C y 7 a 9 = 5 min a 67°C. M = marcador de DNA λ Hind III. Las muestras se testaron en un gel de agarosa 1 % teñido con Bromuro de etidio. La banda de 5,5 Kb coincide con el tamaño del fragmento LR de la PBG-D que se amplificó con los primers LR 3 y LR 4 (Tabla II.2 de Materiales y Métodos) que abarcan desde el intrón 2 hasta la región 3' no codificante.

En la Figura II.12 se muestran los fragmentos PR de 4,5 Kb y LR de 5,5 Kb amplificados por LR-PCR para obtener todo el gen amplificado en dos fragmentos, uno que abarca la región promotora hasta el intrón 3 y el otro que abarca desde el intrón 2 hasta la región 3' no codificante.

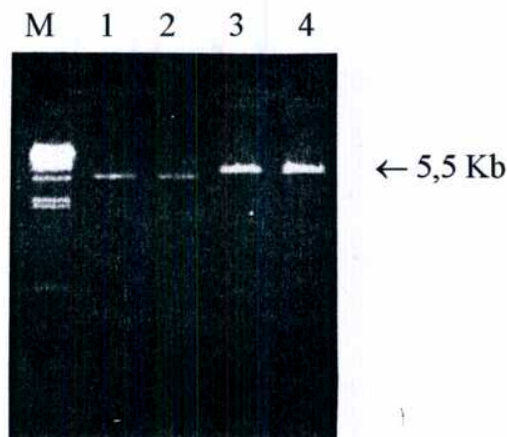


Figura II.12. LR-PCR: Condiciones óptimas.

LR-PCR de un DNA aislado de linfoblastos: Calles: 1 y 2 = Fragmento PR de 4,5 Kb que abarca desde la región promotora hasta el intrón 3 y, 3 y 4 = Fragmento LR de 5,5 Kb que abarca desde el intrón 2 hasta la región 3' no codificante. M = marcador de DNA λ Hind III. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 1 % teñido con Bromuro de etidio.

II.2.2. Secuenciación directa

Como ya se describió en Materiales y Métodos se secuenciaron cada uno de los 15 exones y 30 bases de cada intrón usando Amplicycle™ sequencing kit (Perkin Elmer), el cual posee una enzima (AmpliTaQ DNA polimerasa) recombinante que permite la secuenciación del DNA doble cadena. Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: i) la cantidad de templado y ii) la cantidad de enzima.

i) Cantidad de DNA templado: Se realizaron reacciones de secuenciación utilizando 1 ó 0,5 μ l del DNA amplificado por LR-PCR y purificado. Como se observa en la Figura II.13,

los mejores resultados se obtuvieron con poco DNA, debido a que la lectura de la secuencia es más clara.

ii) **Cantidad de enzima:** Se probaron dos cantidades de enzima: 4 y 5 μ l de cycling mix que contiene 1 ó 1,25 U de Amplitaq DNA polimerasa respectivamente. Como se observa en la Figura II.14, los mejores resultados se obtuvieron con 1,25 U de enzima.

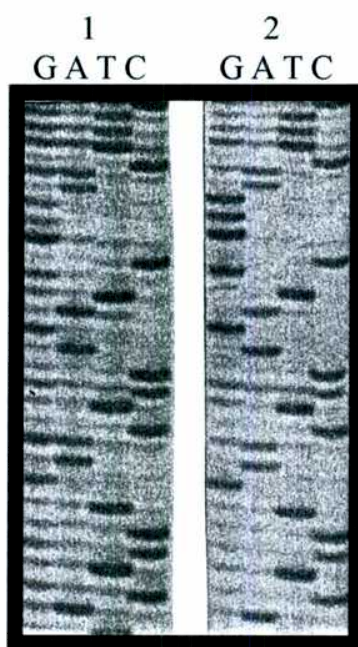


Figura II.13. Secuenciación directa: Diferentes cantidades de templado.

Secuenciación directa de un fragmento del DNA de un individuo normal realizada utilizando dos concentraciones diferentes del producto de la LR-PCR: calles 1 = 1 μ l y 2 = 0,5 μ l.

II.2.3. Detección rápida de mutación G111R por primer-ASO.

La técnica de primer-ASO, descrita en "Materiales y Métodos", se empleó para la detección de la mutación G111R, la cual se produce por un cambio GGA→AGA en el nucleótido 331. Para ello se desarrollaron 2 PCRs que amplifican un fragmento de 170 pb empleando dos pares

de primers especialmente diseñados que amplifican el alelo mutante (AD 76 y AD 7M) o el alelo normal (AD 76 y AD 7N).

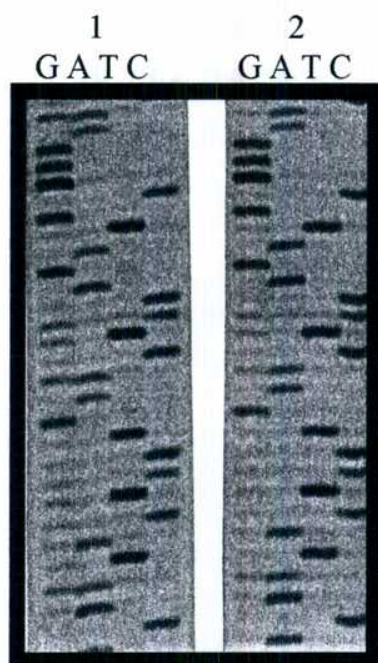


Figura II.14. Secuenciación directa: Diferentes cantidades de enzima.

Secuenciación directa de un fragmento del DNA de un individuo normal realizada utilizando dos cantidades diferentes de enzima: calles 1 = 1 U y 2 = 1,25 U.

Para optimizar la PCR se testearon diferentes temperatura de pegado de primers y diferentes concentraciones de magnesio.

i) Concentración de Magnesio: Se probaron varias concentraciones de magnesio: 1; 0,75; 0,625; 0,5 y 0,375 mM. Con una concentración 1 mM (Figura II.15) y 0,75 mM (Figura II.16) se observó amplificación cuando se utilizaba DNA de un individuo normal y el primer AD 7M, que contiene la mutación. Utilizando una concentración 0,625 mM (Figura II.17) se observaron mejores resultados, pero los óptimos se obtuvieron cuando se utilizó 0,5 mM de magnesio (Figura II.18). Cuando se probó una concentración 0,375 mM no se observó fragmento de amplificación con ningún primer (dato no mostrado).

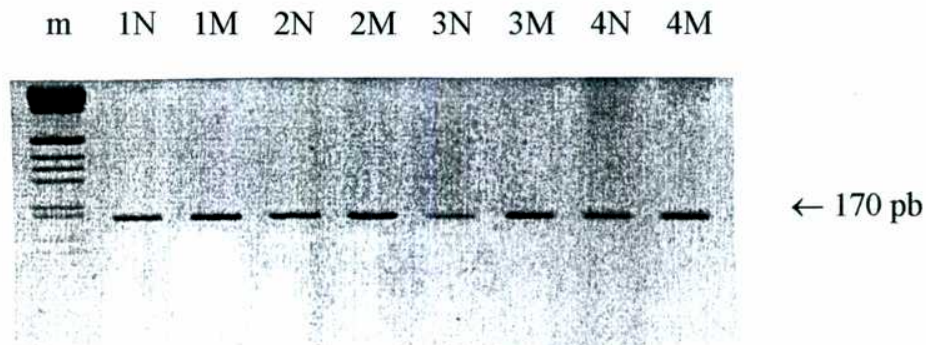


Figura II.15. Pimer-ASO: Concentración de magnesio 1 mM.

DNA amplificado por la técnica de primer-ASO utilizando una concentración de magnesio 1 mM: Calles: 1 y 2 = Individuos que no portan la mutación y, 3 y 4 = Individuos portadores de la mutación G111R. Las PCRs se realizaron utilizando los dos juegos de primers: N = AD 76 y AD 7N (no porta la mutación) y, M = AD 76 y AD 7M (porta la mutación). m = marcador de DNA ϕ X174. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio.

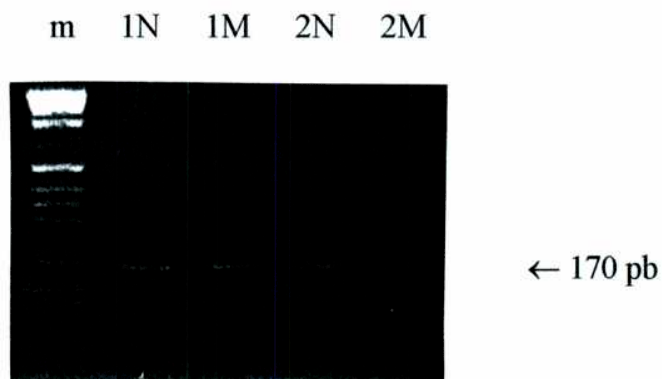


Figura II.16. Pimer-ASO: Concentración de magnesio 0,75 mM.

DNA amplificado por la técnica de primer-ASO utilizando una concentración de magnesio 0,75 mM: Calles: 1 = Individuo que porta la mutación G111R y, 2 = Individuo que no portan la mutación. Las PCRs se realizaron utilizando los dos juegos de primers: N = AD 76 y AD 7N (no porta la mutación) y, M = AD 76 y AD 7M (porta la mutación). m = marcador de DNA ϕ X174. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio.

m 1N 1M 2N 2M 3N 3M

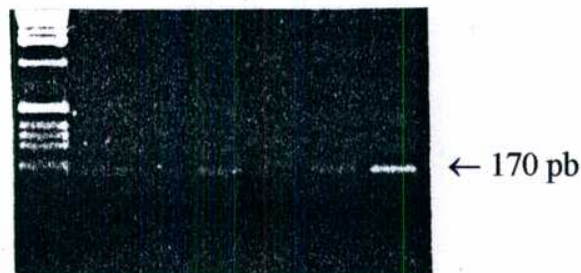


Figura II.17. Pimer-ASO: Concentración de magnesio 0,625 mM.

DNA amplificado por la técnica de primer-ASO utilizando una concentración de magnesio 0,625 mM: Calles: 1 y 2 = Individuos que no portan la mutación G111R y, 3 = Individuo que porta la mutación. Las PCRs se realizaron utilizando los dos juegos de primers: N = AD 76 y AD 7N (no porta la mutación) y, M = AD 76 y AD 7M (porta la mutación). m = marcador de DNA 1 Kb. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio.

ii) Temperatura de pegado de primers: Para mejorar las condiciones se testearon 3 temperaturas de pegado de primers: 60°C, 65°C y 72°C; observándose resultados óptimos con 65°C (Figura II.18); ya que a 72°C no se observaba amplificación y a 60°C había amplificación con ambos primers en una muestra de un individuo normal.

m 1N 1M 2N 2M 3N 3M m



Figura II.18. Pimer-ASO: Concentración de magnesio 0,5 mM.

DNA amplificado por la técnica de primer-ASO utilizando una concentración de magnesio 0,5 mM: Calles: 1 = Individuo que no porta la mutación G111R y, 2 y 3 = Individuos que portan la mutación. Las PCRs se realizaron utilizando los dos juegos de primers: N = AD 76 y AD 7N (no porta la mutación) y, M = AD 76 y AD 7M (porta la mutación). m = marcador de DNA 1 Kb. Las muestras se testearon en un gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio.

II.3. Referencias

- Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. **18**:5294-5299.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
- Fedorcsak, I. & Ehrenberg, L. (1966) Effects of diethylpyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem. Scand.* **20**:107-109.
- Kumar, A. & Lindberg, U. (1972) Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**:681-683.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R. & Connor, J.M. (1992) Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of *in vitro* amplified cDNA. *Hum. Genet.* **90**:12-16.
- Raich, B.N.; Roméo, P.H.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase. *Nucleic Acids Res.* **14**:5955-5968.
- Sela, M.; Anfinsen, C.B. & Harrington, W.F. (1956) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim. Biophys. Acta*. **26**:506-509.
- Ullrich, A.; Shine, J.; Chirgwin, J.; Pickett, R.; Tischer, E.; Rutter, W.J. & Goodman, H.M. (1977) Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*. **196**:1313-1317.

CAPÍTULO III. Estudios genéticos.

Diagnóstico de pacientes con PAI.

III.1. Diagnóstico de la PAI.

Se realizaron estudios genéticos a 65 pacientes de 27 familias no relacionadas; cuyos estudios bioquímicos se encuentran en la Tabla I.1. de "Resultados". Para éstos se utilizaron las metodologías a partir de RNA o de DNA, descritas en el capítulo II de "Materiales y Métodos", y optimizadas según se detalló en el capítulo II de "Resultados". En primer lugar se estudió a un paciente con PAI sintomático de cada familia y luego se analizaron los familiares del mismo. Se analizaron todos los integrantes disponibles de la familia para poder diagnosticar la mayor cantidad de individuos normales y latentes de la misma.

En cada familia se detectó la presencia de una mutación encontrándose 14 mutaciones diferentes que se detallan en este capítulo.

III.2. Mutación Q34P

En las familias 1 y 2 se detectó una mutación puntual en el exón 4: la adenina de la posición 101 cambia a una citosina ($A_{101} \rightarrow C$), lo cual produce el cambio de la glutamina de la posición 34 a una prolina ($CAG \rightarrow CCG$) (Q34P). Esta mutación no ha sido publicada previamente y se encuentra en un exón donde se han descrito solamente el 6 % de las mutaciones conocidas (5/84). Además, esta sustitución se produce en el nucleótido adenina donde hay una muy baja frecuencia de mutación ya que sólo se describieron 2 mutaciones (el 3 % de las mutaciones puntuales conocidas).

De la **familia 1**, se analizó solamente el paciente propósito (FTB) debido a que el resto de los integrantes no pudieron concurrir a nuestro Centro. Este paciente, de 48 años y sexo femenino, presentó los primeros síntomas de la enfermedad en el año 1988 y a partir de esa fecha desarrolló sucesivos ataques agudos, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática.

Los estudios genéticos se iniciaron realizando un análisis de búsqueda de mutaciones por SSCP en diferentes condiciones (Ver sección II.1.8 de "Materiales y Métodos"). Cuando se analizó el fragmento 1, que contenía los exones 1, 3 y 4, en un gel de poliacrilamida 5 % corrido a temperatura ambiente durante 10 horas se observó una movilidad diferente a la del cDNA normal (Figura III.1) lo cual indicó la presencia de una mutación en esa región.

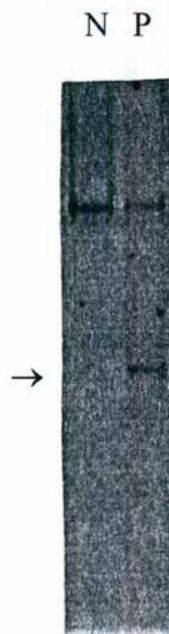


Figura III.1. Análisis por SSCP del paciente FTB de la familia 1.

cDNA amplificado (fragmento 1) analizado en un gel de poliacrilamida (5 %) corrido a temperatura ambiente, correspondiente a un individuo normal (N) o al paciente FTB (P) de la familia 1. La flecha indica la variación de movilidad con respecto al control.

Luego se utilizó la metodología a partir de RNA. Cuando se realizó la RT-PCR, los productos obtenidos fueron del tamaño esperado (1,15 Kb), excluyendo así grandes deleciones,

inserciones y mutaciones de splicing. Luego por secuenciación directa de este cDNA se detectó la mutación, como se muestra en la Figura III.2.

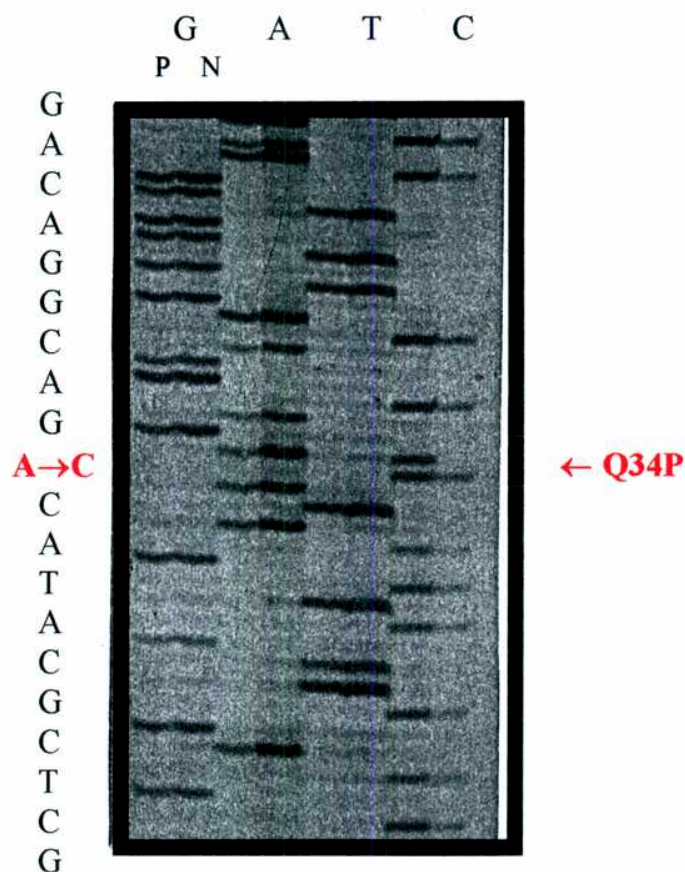


Figura III.2. Identificación por secuenciación directa de la mutación Q34P en la familia 1.

Secuencia parcial del cDNA del paciente FTB de la familia 1 (P) y un individuo normal para esa mutación (N). Se observa una sustitución de una A a una C del nucleótido 101 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 34 de glutamina a prolina (Q34P). Se utilizó en la secuenciación directa el primer R6.

Con respecto a la **familia 2**, se analizaron el paciente GLV (propósito), de 34 años y sexo femenino, y sus padres: ALV, 60 años y sexo femenino, y RAV, 60 años y sexo masculino. El propósito presentó los primeros síntomas de la enfermedad a los 19 años y a partir de esa fecha desarrolló varios ataques agudos, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. Los padres nunca desarrollaron sintomatología pero en

base a la actividad de la PBG-D eritrocitaria la madre (ALV) se diagnosticó como PAI latente y el padre (RAV) como normal.

En esta familia, los estudios genéticos se realizaron utilizando la metodología a partir de DNA. Se establecieron las líneas celulares de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación (Figura III.3). Cuando se analizaron los padres del propósito se vió que la madre no era portadora de la mutación tal como se esperaba en base a los estudios bioquímicos, mientras que el portador era el padre. Como ya se mencionó, la medición de la actividad de la PBG-D en eritrocitos periféricos es la técnica bioquímica más sensible para el diagnóstico de los casos latentes, pero existe un amplio rango de valores de actividad lo cual en este caso generó un error de diagnóstico que sólo pudo ser subsanado por la utilización de estudios genéticos.

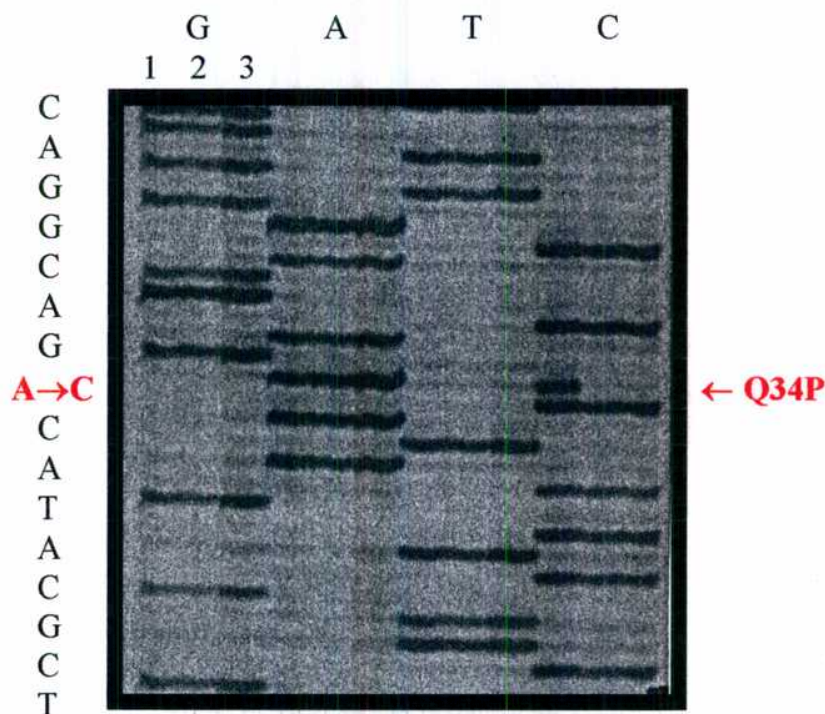
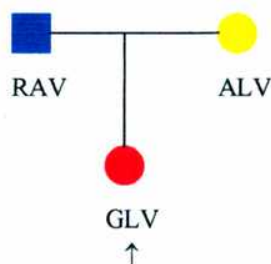


Figura III.3. Identificación por secuenciación directa de la mutación Q34P en la familia 2.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente GLV (Propósito, PAI); 2 = paciente ALV (madre del propósito, normal); y 3 = un individuo normal para esa mutación. Se observa una sustitución de una A a una C del nucleótido 101 que predice una sustitución en el residuo 34 de glutamina a prolina (Q34P). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 71.

En base a los estudios genéticos realizados, el pedigree de la familia 2 es el que se indica en el Esquema III.1.



Esquema III.1. Pedigree de la familia 2 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino con PAI latente.
- = Individuo de sexo femenino normal.
- ↑ = Individuo propósito.

III.3. Mutación G111R

En 12 familias no relacionadas (3 a 14 en la Tabla I.1 de "Resultados") se detectó una mutación puntual en el exón 7: la guanina de la posición 331 cambia a una adenina ($G_{331} \rightarrow A$), la cual produce el cambio de la glicina de la posición 111 a una arginina ($GGA \rightarrow AGA$) (G111R). Esta mutación ha sido descrita hasta el momento en sólo un paciente de origen belga (Gu *et al.*, 1993a), y se encuentra en un exón donde se describieron solamente el 7 % de las mutaciones conocidas (6/84).

Para la detección de esta mutación, se utilizó en la familia 3 la metodología a partir de RNA y en el resto de las familias la metodología a partir de DNA (Capítulo II de "Materiales y Métodos").

Con respecto a la **familia 3** se analizaron 5 integrantes, comenzando por los pacientes ELH (sexo femenino, 41 años) y BEH (sexo femenino, 46 años), hermanas entre sí. Ambas pacientes son sintomáticas y desarrollaron su primer ataque agudo a los 38 y 44 años, respectivamente.

Los estudios genéticos se iniciaron con la RT-PCR, y los productos obtenidos fueron del tamaño esperado (1,15 Kb), excluyendo así grandes deleciones, inserciones y mutaciones de

splicing. La secuenciación directa de este cDNA reveló la presencia de la mutación G111R (Figura III.4).

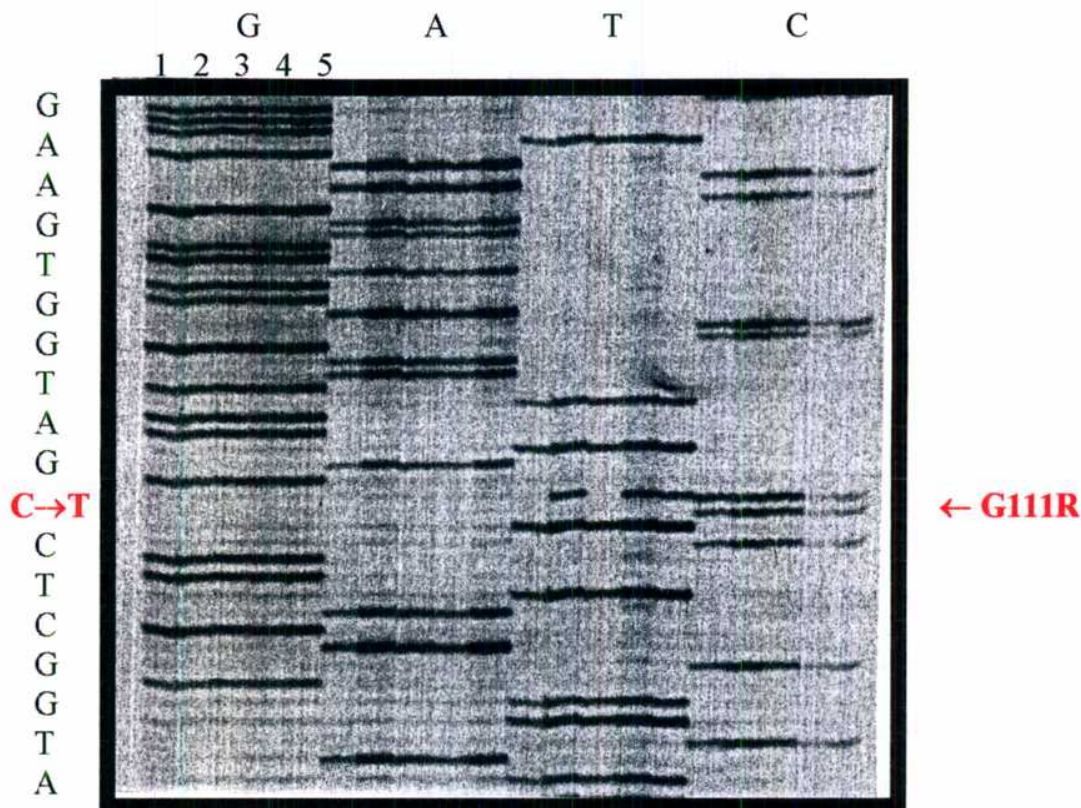
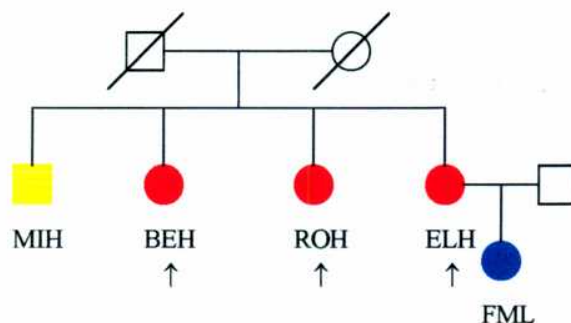


Figura III.4. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en la familia 3.

Secuencia parcial del cDNA de la PBG-D. Calles: 1 = individuo normal; 2 = paciente ELH (Propósito, PAI); 3 = paciente MIH (hermano del propósito, normal); 4 = paciente ROH (hermana del propósito, PAI) y 5 = paciente FML (hija del propósito, PAI). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer F3.

Una vez detectada la mutación, se utilizó la técnica de Primer-ASO (sección II.3. de "Materiales y Métodos") para la detección rápida de portadores dentro de la misma familia. Así se analizaron 3 integrantes más: ROH, sintomática, de 49 años y sexo femenino, FLM, de 16 años y sexo femenino y MIH, de 34 años y sexo masculino. La paciente ROH desarrolló su primer ataque agudo a los 45 años y se detectó la presencia de la mutación. La paciente FLM es portadora de la mutación pero nunca desarrolló sintomatología (PAI latente) y MIH no es portador de la mutación.

Estos resultados fueron confirmados por secuenciación como se muestra en la Figura III.4. Por lo tanto, en base a los estudios genéticos el pedigree de la familia 3 es el siguiente (Esquema III.2.):



Esquema III.2. Pedigree de la familia 3 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino, no analizado, fallecido.
- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo propósito.

En la **familia 4** se analizaron tres integrantes comenzando por un individuo con PAI latente (HSS) madre de una paciente de sexo femenino sintomática que falleció por un ataque agudo de PAI. Una vez detectada la mutación en este individuo, se utilizó la técnica de Primer-ASO para el diagnóstico rápido en los otros dos individuos: GUS y NAL, hijo y nieta de HSS, respectivamente. Ambos individuos no son portadores de la mutación G111R, resultados que fueron confirmados por secuenciación como se muestra en la Figura III.5. En esta familia el diagnóstico bioquímico coincide con el genético y por lo tanto, el pedigree queda como se muestra en el esquema III.3.

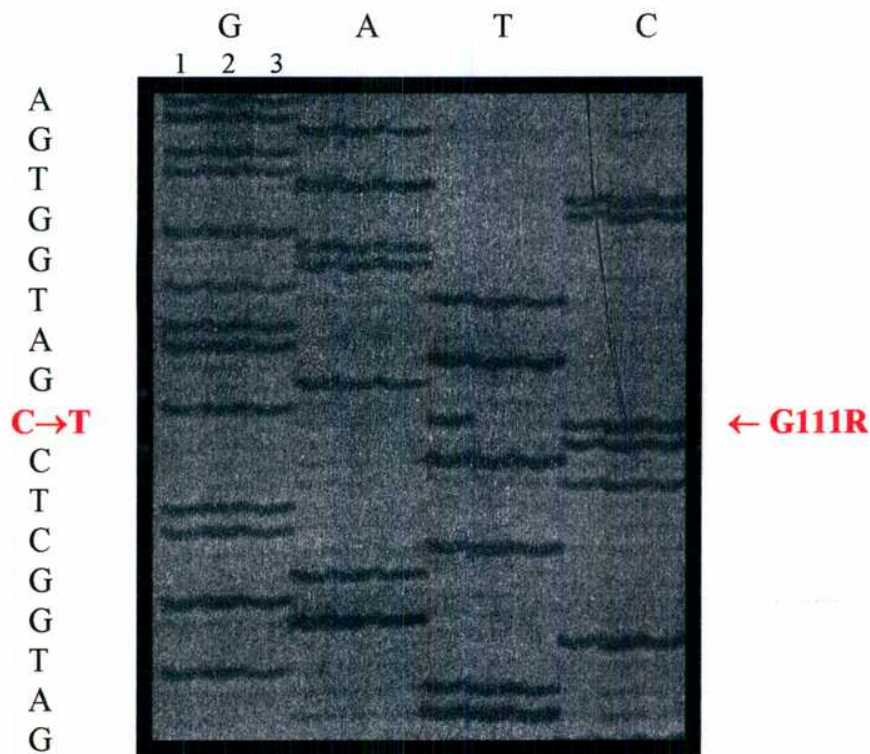
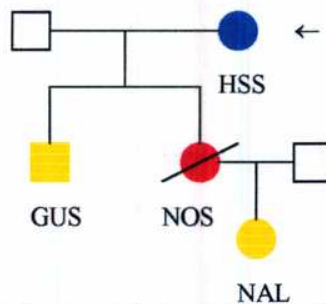


Figura III.5. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en la familia 4.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente HSS (propósito, PAI); 2 = paciente GUS (hijo del propósito, normal) y 3 = paciente NAL (nieta del propósito, normal). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 77.



Esquema III.3. Pedigree de la familia 4 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- / = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo de sexo femenino normal.
- ← = Individuo propósito.

En la **familia 5** se analizaron tres integrantes comenzando por un individuo con PAI sintomático (AAD) de 27 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo a los 25 años. Luego utilizando la técnica de primer-ASO se diagnosticó a su hermana (MED), de 41 años, que resultó ser portadora de la mutación y por no presentar sintomatología es PAI latente; y a la sobrina (IVR), de 15 años, normal. Como se muestra en la Figura III.6 estos resultados fueron confirmados por secuenciación directa y el pedigree quedó determinado como se muestra en el Esquema III.4.

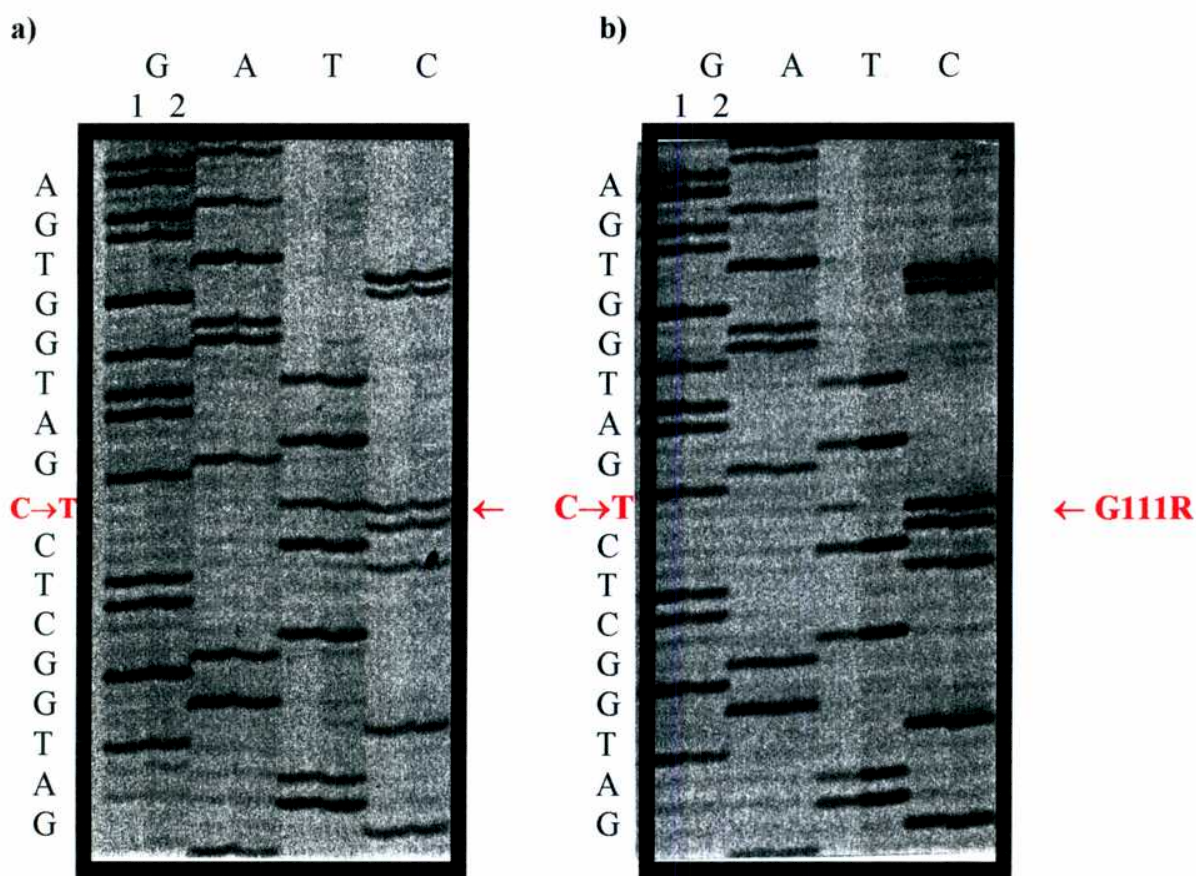
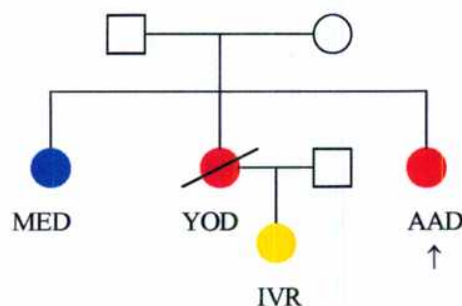


Figura III.6. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en la familia 5.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. a) Calles: 1 = paciente AAD (propósito, PAI) y 2 = paciente MED (hermana del propósito, PAI); b) Calles: 1 = paciente AAD (propósito, PAI) y 2 = paciente IVR (sobrina del propósito, normal). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 77.



Esquema III.4. Pedigree de la familia 5 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino, no analizado.
- ~~●~~ = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- = Individuo de sexo femenino normal.
- ↑ = Individuo propósito.

En la **familia 6** se analizó solamente el individuo propósito (COS), de 53 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1968 (a los 24 años). Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa se comprobó que era portadora de la mutación G111R (dato no mostrado).

En la **familia 7** se analizó el individuo propósito (CEG), de 40 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1987 (a los 30 años). Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa se comprobó que era portadora de la mutación G111R. Se utilizó la técnica de primer-ASO, para el diagnóstico rápido de la madre (MLJ), la cual era la portadora de la enfermedad si bien nunca desarrolló sintomatología (PAI latente); y el padre, que fue normal. Estos resultados se confirmaron por secuenciación directa como se muestra en la Figura III.7. En esta familia el diagnóstico bioquímico coincide con el genético y por lo tanto, el pedigree queda como se muestra en el Esquema III.5.

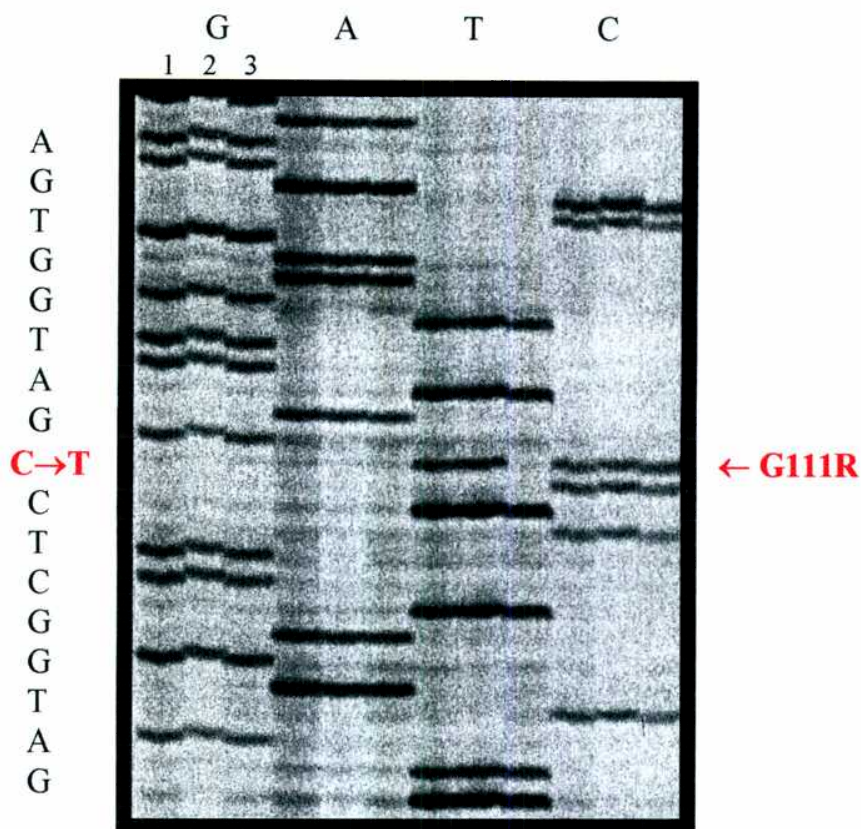
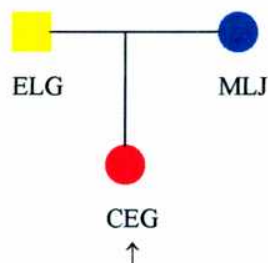


Figura III.7. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en la familia 7.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente CEG (propósito, PAI); 2 = paciente MLJ (madre del propósito, PAI) y 3 = paciente ELG (padre del propósito, normal). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 77.



Esquema III.5. Pedigree de la familia 7 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- ↑ = Individuo propósito.

En la **familia 8** se analizaron dos hermanas mellizas de 40 años (SEO y VON), que desarrollaron su primer ataque agudo en el año 1989 (a los 32 años). Luego de establecer las líneas celulares de linfoblastos y realizar el análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa, se comprobó que ambas eran portadoras de la mutación G111R (Figura III.8). Utilizando la técnica de primer-ASO se comprobó la presencia de la mutación por otra metodología.

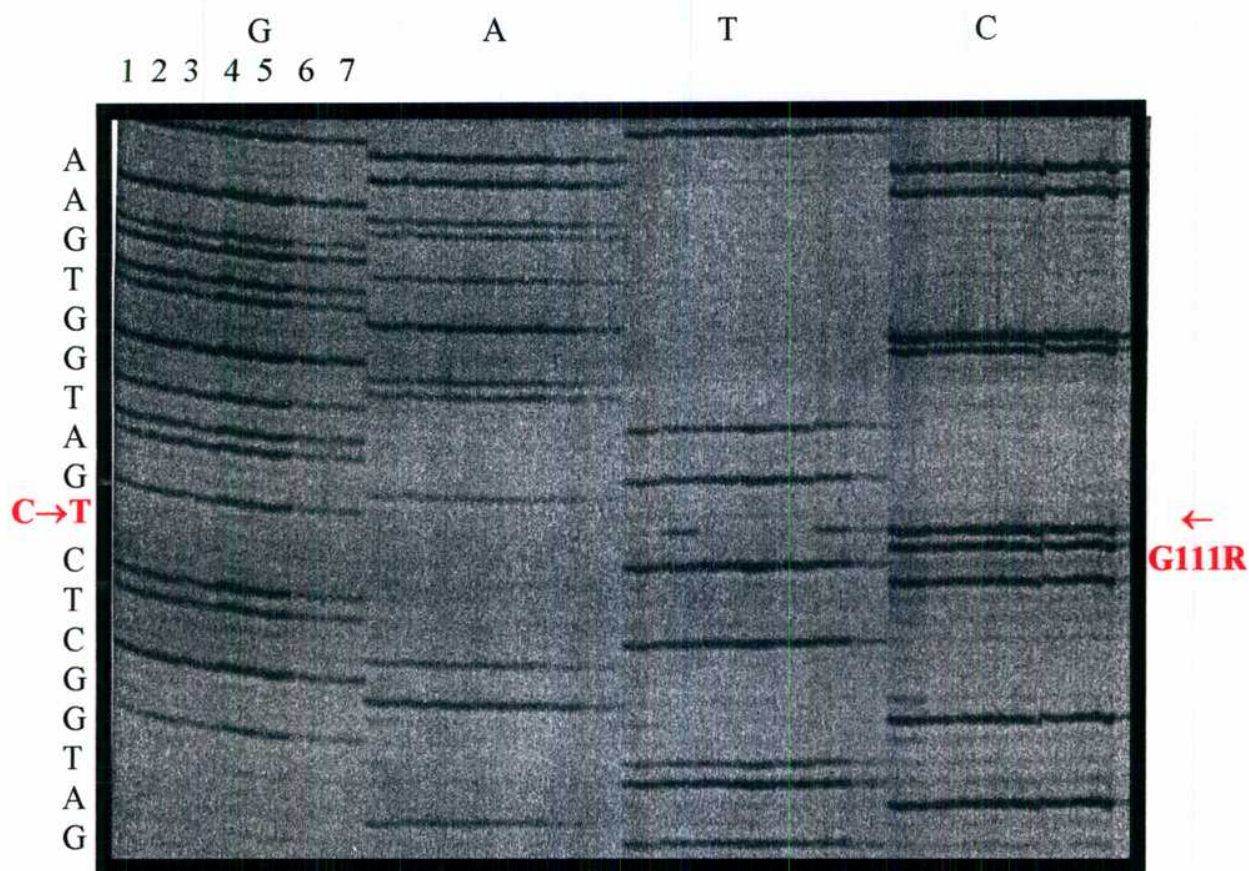
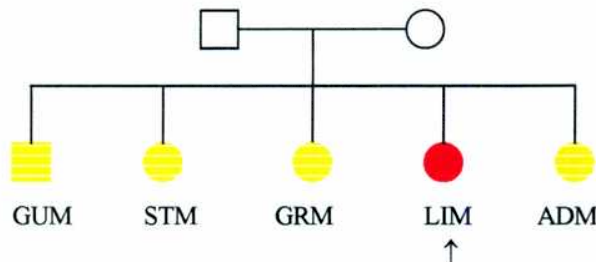


Figura III.8. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en las familias 8 y 9.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles 1 a 5: familia 9, y 6 a 7: familia 8. Calles: 1 = paciente GUM (hermano del propósito, normal); 2 = paciente LIM (propósito, PAI); 3 = paciente STM (hermana del propósito, normal); 4 = paciente GRM (hermana del propósito, normal); 5 = paciente ADM (hermana del propósito, normal); 6 = paciente SEO (propósito, PAI); y 7 = paciente VON (propósito, PAI). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 77.

En la **familia 9** se analizaron cinco integrantes. El individuo propósito (LIM), de 36 años y sexo femenino, desarrolló su primer ataque agudo a los 34 años. Analizando la secuencia del gen de la PBG-D por secuenciación directa se detectó la presencia de la mutación G111R en ese individuo. Luego de aplicar la técnica de detección rápida de la mutación (primer-ASO) en los hermanos (GUM, STM, GRM y ADM) se comprobó que todos eran normales, a pesar de que una de las hermanas (STM) había sido diagnosticada en base a la actividad de la PBG-D eritrocitaria como PAI latente. Estos resultados se confirmaron por secuenciación como se muestra en la Figura III.8. El pedigree queda como se indica en el Esquema III.6.



Esquema III.6. Pedigree de la familia 9 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo de sexo femenino normal.
- ↑ = Individuo propósito.

En la **familia 10** se analizó solamente el individuo propósito (AFA), de 47 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1986 (a los 36 años). Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa, se comprobó que la paciente era portadora de la mutación G111R (dato no mostrado).

En la **familia 11** también se analizó solamente el individuo propósito (MRF), de 38 años y sexo femenino que presentó los primeros síntomas de la enfermedad en el año 1993 (a los 34 años) y a partir de esa fecha desarrolló sucesivos ataques agudos, por lo tanto fue claramente

diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa se comprobó que era portadora de la mutación G111R (dato no mostrado).

En la **familia 12** se analizó el individuo propósito (EFF), de 38 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1995 (a los 36 años). Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa, se comprobó que era portadora de la mutación G111R (Figura III.9). Utilizando la técnica de primer-ASO se observó que la madre (YOF) era la portadora de la mutación si bien nunca desarrolló sintomatología (PAI latente) (Figura III.10) y el padre (PAF) era normal (dato no mostrado). En esta familia el diagnóstico bioquímico coincide con el genético y por lo tanto, el pedigree queda como se muestra en el Esquema III.7.

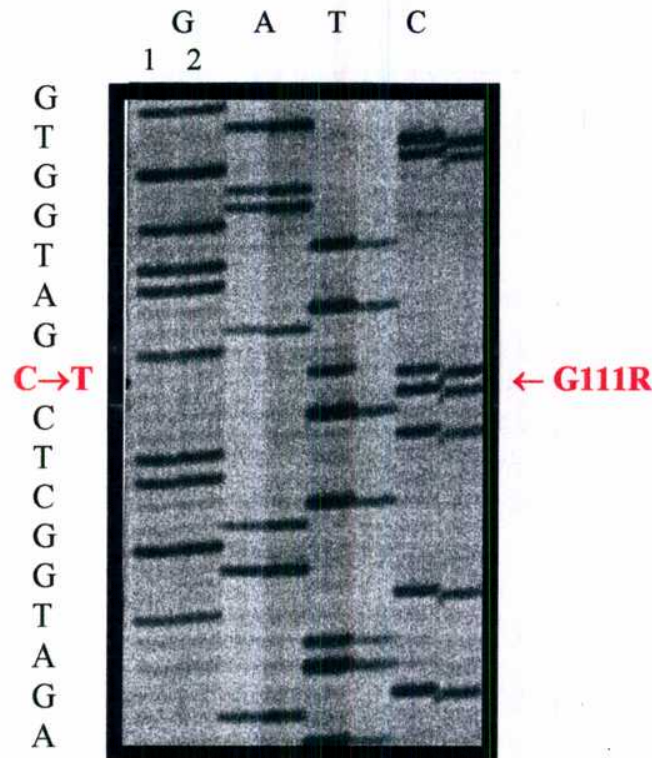


Figura III.9. Identificación por secuenciación directa de la mutación G111R en la familia 12.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente EFF (propósito, PAI) y 2 = individuo normal. Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 331 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 111 de glicina a arginina (G111R). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 77.

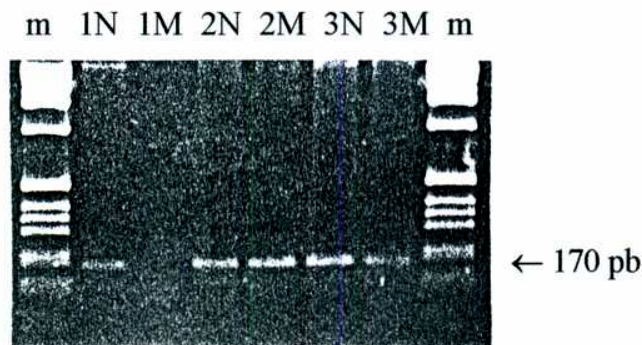
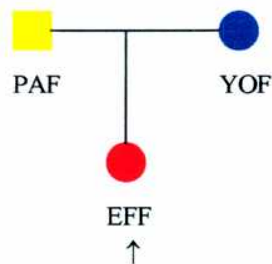


Figura III.10. Diagnóstico rápido en la familia 12 utilizando la técnica de Pimer-ASO.

DNA amplificado por la técnica de primer-ASO: Calles: 1 = Individuos que no portan la mutación G111R y, 2 y 3 = Individuos que portan la mutación: 2 = paciente EFF (propósito) y 3 = paciente YOF (madre del propósito). Las PCRs se realizaron utilizando los dos juegos de primers: N = AD 76 y AD 7N (no porta la mutación) y, M = AD 76 y AD 7M (porta la mutación). m = marcador de DNA 1 Kb. Las muestras se testaron en un gel de agarosa 2 % teñido con Bromuro de etidio.



Esquema III.7. Pedigree de la familia 12 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- ↑ = Individuo propósito.

En la **familia 13** se analizó solamente el individuo propósito (LUM), de 23 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1994 (a los 20 años). Luego del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa, se comprobó que era portadora de la mutación G111R (dato no mostrado).

En la **familia 14** también se analizó solamente el individuo propósito (MIV), de 43 años y sexo femenino que desarrolló su primer ataque agudo en el año 1996 (a los 42 años). Luego

del análisis del gen de la PBG-D por secuenciación directa, se comprobó que era portadora de la mutación G111R (dato no mostrado).

III.4. Mutación Q204X

En la **familia 15** se detectó una mutación puntual en el exón 10: la citosina de la posición 610 cambia a una timina ($C_{610} \rightarrow T$), la cual cambia la glutamina de la posición 204 por un codón de terminación de la transcripción generando una proteína más corta ($CAG \rightarrow TAG$) (Q204X). Esta mutación ha sido publicada previamente (Mgone *et al.*, 1994) y se encuentra en el segundo exón con mayor cantidad de mutaciones reportadas luego del 12 (11/84).

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (GSV), de 28 años y sexo femenino, que presentó los primeros síntomas de la enfermedad a los 20 años y a partir de esa fecha desarrolló sucesivos ataques agudos, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación (Figura III.11). Cuando se analizaron el padre del propósito (MAV) y el hermano (GGV) utilizando la misma metodología se vió que el padre no era portador de la mutación tal como se esperaba en base a los estudios bioquímicos, mientras que el hermano sí lo era (Figura III.11). Por lo tanto, en base a los estudios genéticos el pedigree de la familia 3 queda como se indica en el Esquema III.8.

En la Figura III.11 también se indica la presencia de un polimorfismo neutro en el exón 10 (G/T) previamente publicado (Gu *et al.*, 1991; Yoo *et al.*, 1993), en la poblaciones europea y norteamericana caucásica al cual nos referiremos más adelante. Sin embargo, cabe aclarar, que los pacientes GSV y GGV, portadores de la mutación Q204X poseen los alelos G/G, mientras que el paciente MAV, no portador de la mutación, presenta el polimorfismo en heterocigosis (G/T). Esto indica que la mutación está ligada a la ausencia del polimorfismo en esta familia (G/G).

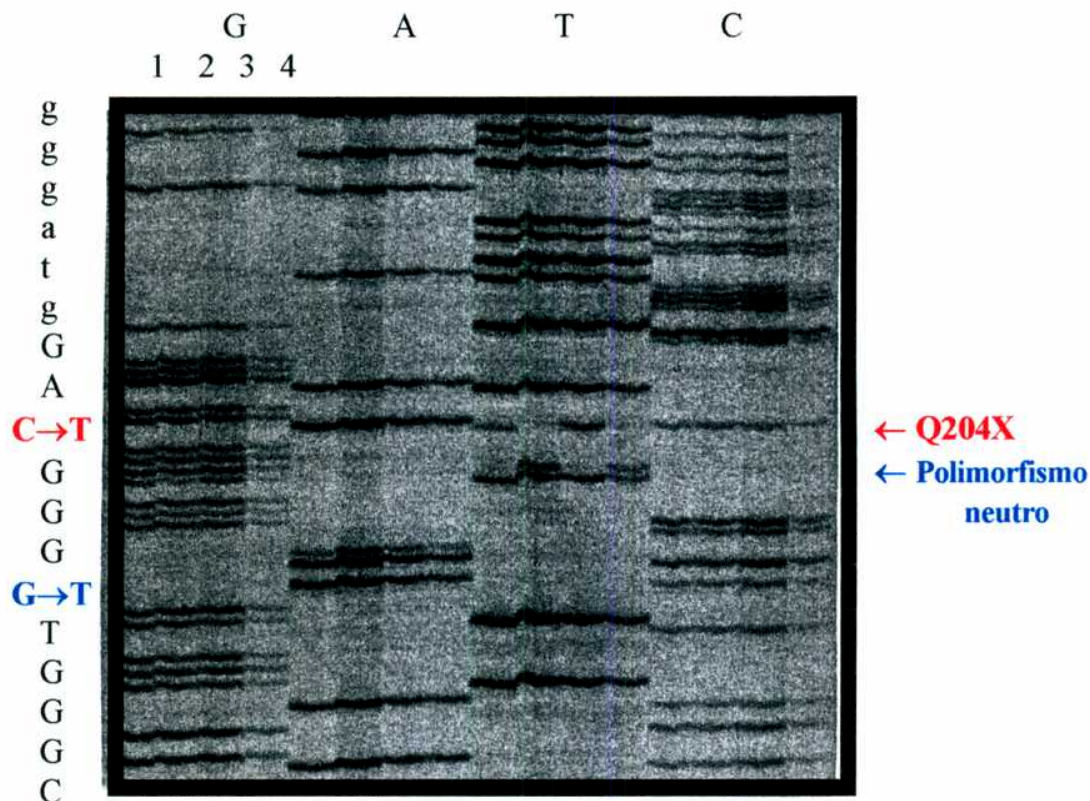
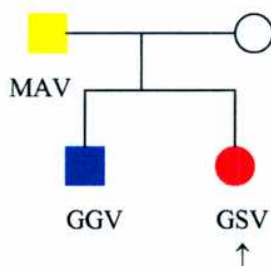


Figura III.11. Identificación por secuenciación directa de la mutación Q204X en la familia 15.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D, en minúscula se indica parte de la secuencia intrónica y en mayúscula parte de la secuencia exónica. Calles: 1 = paciente GSV (propósito, PAI); 2 = paciente MAV (padre del propósito, normal); 3 = paciente GGV (hermano del propósito, PAI) y 4 = individuo normal. Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 610 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 204 de glutamina a un codón de terminación de la transcripción (Q204X). Además, se indica (en azul) la presencia de un polimorfismo G/T que no produce cambio de aminoácido (ver texto). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 9310.



Esquema III.8. Pedigree de la familia 15 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo femenino, no analizado.
- = Individuo de sexo masculino, normal.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino con PAI latente.
- ↑ = Individuo propósito.

III.5. Mutación R173W

En las **familias 16 y 17**, no relacionadas, se detectó la misma mutación puntual en el exón 10: la citosina de la posición 517 cambia a una timina ($C_{517} \rightarrow T$), la cual cambia la arginina de la posición 173 por triptofano ($CGG \rightarrow TGG$) (R173W). Esta mutación ha sido publicada previamente (Lee *et al.*, 1991) y se encuentra en el segundo exón con mayor cantidad de mutaciones reportadas luego del 12 (11/84).

En la **familia 16** los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (MOA), de 39 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 23 años (1981) y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.12). Cuando se analizaron la hija del propósito (FEV) y sus dos hermanos (SUA y RAA) utilizando la misma metodología se vio que la única portadora de la mutación era la hermana (SUA) que además presentó sintomatología en el año 1982 (a los 26 años). El hermano (RAA) y la hija (FEV) fueron normales tal como se esperaba en base a los estudios bioquímicos (Figura III.12). Por lo tanto, el pedigree de la familia 16 queda como se indica en el Esquema III.9.

En la **familia 17** sólo se pudo analizar el individuo propósito (ALS), de 50 años y sexo femenino que presentó su primer ataque agudo a los 42 años. Por lo tanto, había sido diagnosticado previamente en base a los estudios bioquímicos y su historia clínica como PAI sintomático. Se utilizó la metodología a partir de DNA estableciendo previamente la línea celular de linfoblastos y, por secuenciación directa se vio que portaba la mutación R173W (Figura III.13).

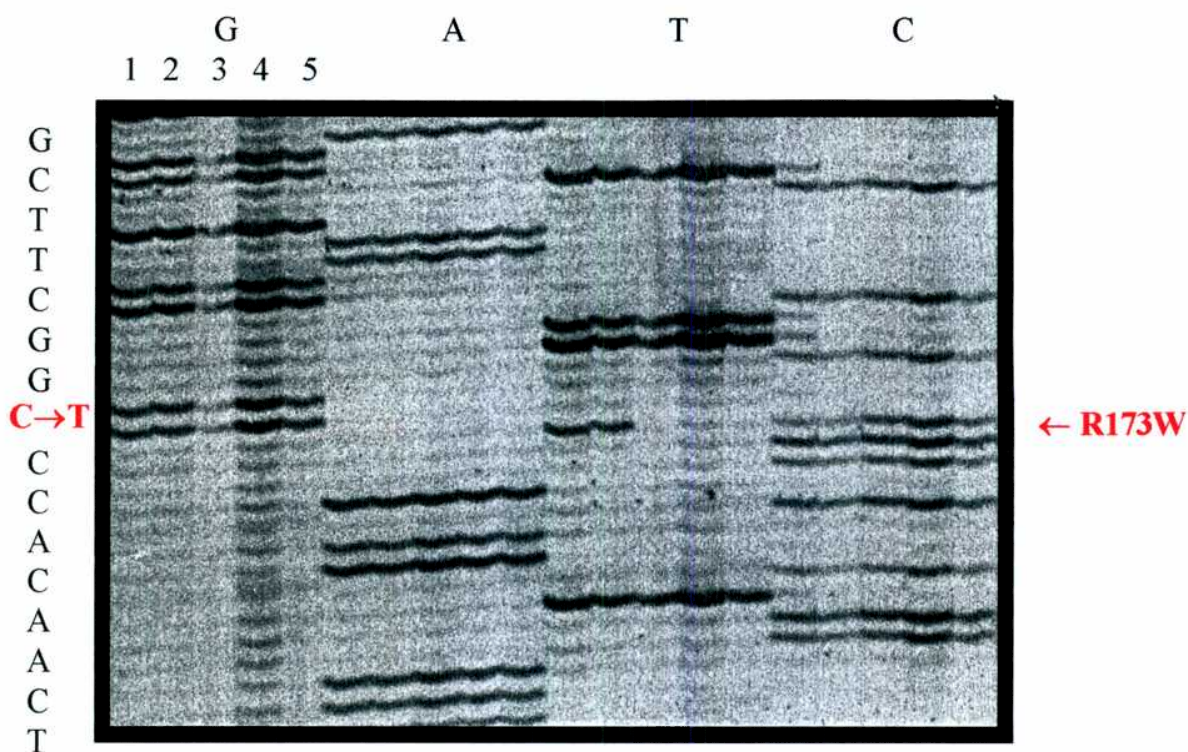
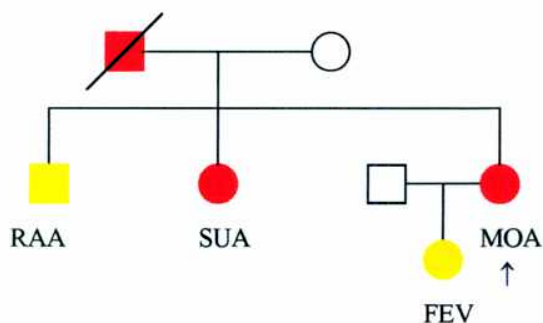


Figura III.12. Identificación por secuenciación directa de la mutación R173W en la familia 16.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente MOA (propósito, PAI); 2 = paciente SUA (hermana del propósito, PAI); 3 = paciente RAA (hermano del propósito, normal); 4 = paciente FEV (hija del propósito, normal) y 5= individuo normal. Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 517 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 173 de arginina a triptofano (R173W). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 9310.



Esquema III.9. Pedigree de la familia 16 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, con PAI sintomático, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino, no analizado.
- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino normal.
- = Individuo de sexo femenino normal.
- ↑ = Individuo propósito.

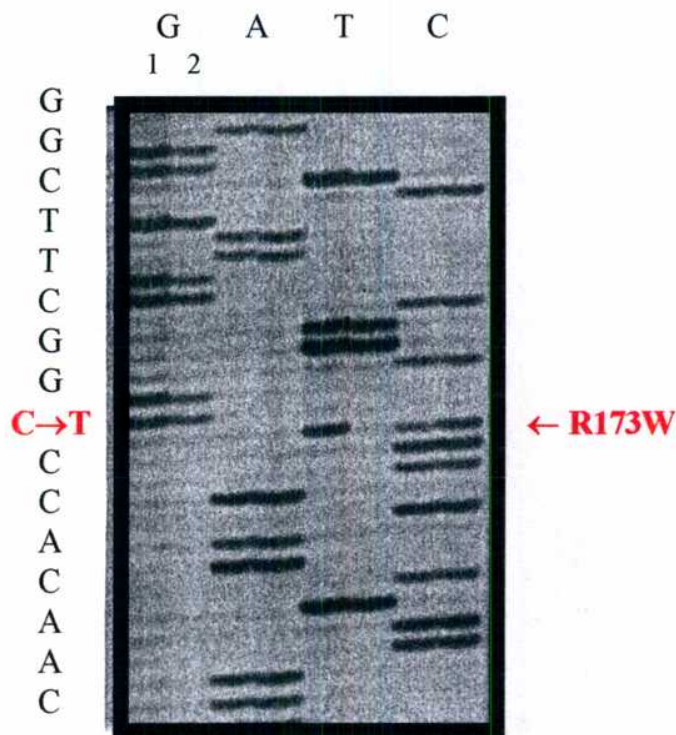


Figura IIL13. Identificación por secuenciación directa de la mutación R173W en la familia 17.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente ALS (propósito, PAI) y 2 = individuo normal. Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 517 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 173 de arginina a triptofano (R173W). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 9310.

III.6. Mutación R201W

En la **familia 18**, se encontró una mutación puntual en el exón 10: la citosina de la posición 601 cambia a una timina ($C_{601} \rightarrow T$), la cual predice un cambio de la arginina de la posición 201 por triptofano ($CGG \rightarrow TGG$) (R201W). Esta mutación ha sido publicada previamente (Lundin *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994) y se encuentra en el segundo exón con mayor cantidad de mutaciones reportadas luego del 12 (11/84).

En esta familia sólo se pudo analizar el individuo propósito (MAC), de 34 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 33 años. Por lo tanto, ya había sido diagnosticado previamente en base a los estudios bioquímicos y su historia clínica como PAI sintomático.

Para los estudios genéticos, se utilizó la metodología a partir de DNA estableciendo previamente la línea celular de linfoblastos y por secuenciación directa se detectó la presencia de la mutación como se muestra en la Figura III.14. Además, se indica la presencia del polimorfismo mencionado en la sección III.4 de éste capítulo, el cual el propósito lo porta en heterocigosis (G/T).

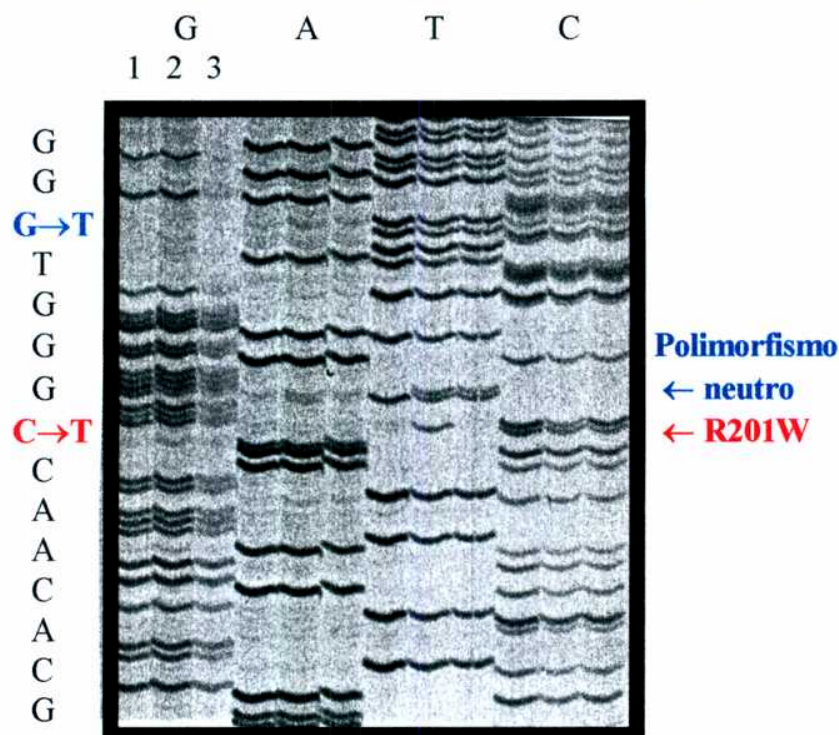


Figura III.14. Identificación por secuenciación directa de la mutación R201W en la familia 18.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 y 3 = individuos normales; y 2 = paciente MAC (propósito, PAI). Se observa una sustitución de una C a una T del nucleótido 601 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 201 de arginina a triptofano (R201W). Además, se indica (en azul) la presencia de un polimorfismo G/T que no produce cambio de aminoácido (ver texto). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 9310.

III.7. Mutación R173Q

En la **familia 19** se detectó una mutación puntual en el exón 10: la guanina de la posición 518 cambia a una adenina ($G_{518} \rightarrow A$), la cual cambia la arginina de la posición 173 por glutamina ($CGG \rightarrow CAG$) (R173Q). Esta mutación ha sido publicada previamente (Delfau *et al.*, 1990; Kauppinen *et al.*, 1992).

En esta familia sólo se pudo analizar el individuo propósito (MCE), de 37 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 29 años. Por lo tanto, ya había sido diagnosticado previamente en base a los estudios bioquímicos y su historia clínica como PAI sintomático.

Para los estudios genéticos, se utilizó la metodología a partir de DNA pero sin establecer previamente la línea celular de linfoblastos, por secuenciación directa se detectó la presencia de la mutación como se muestra en la Figura III.15.

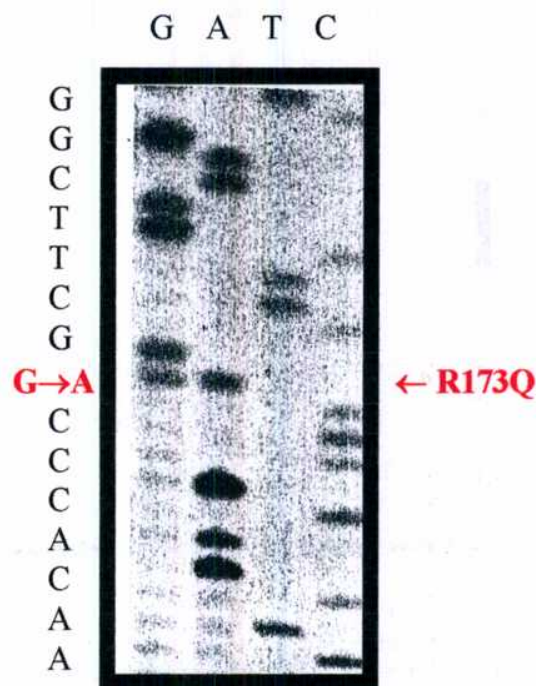


Figura III.15. Identificación por secuenciación directa de la mutación R173Q en la familia 19.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D: paciente MCE (propósito, PAI). Se observa una sustitución de una G a una A del nucleótido 518 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 173 de arginina a glutamina (R173Q). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 9310.

III.8. Inserción A (666)

En la **familia 20** se detectó una inserción en el exón 12 de una adenina en la posición 666, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 747, formando una proteína más corta. Esta mutación no ha sido

publicada previamente y se encuentra en el exón con mayor cantidad de mutaciones reportadas hasta la fecha (20/84).

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (NCH), de 60 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 37 años (1974) y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.16). Cuando se analizaron el hijo del propósito (CAL) y su nieta (MAL) utilizando la misma metodología se vió que ambos portaban la mutación a pesar de nunca haber desarrollado la sintomatología (Figura III.16). Por lo tanto, el pedigree de la familia 20 queda como se indica en el Esquema III.10.

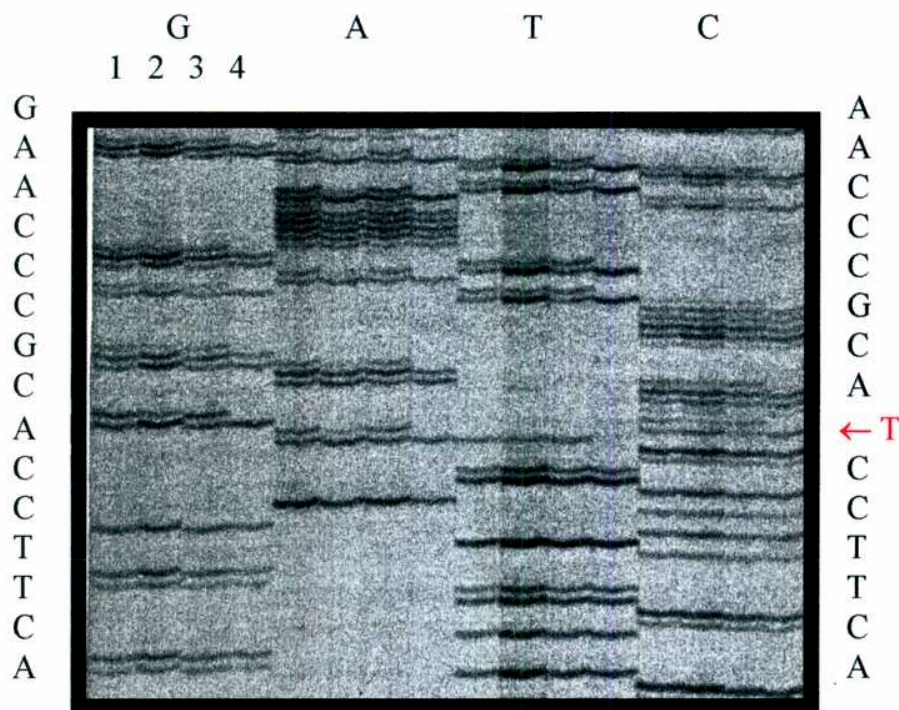
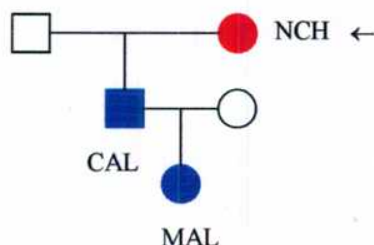


Figura III.16. Identificación por secuenciación directa de la mutación Ins A 666 en la familia 20.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente NCH (propósito, PAI); 2 = paciente CAL (hijo del propósito, PAI); 3 = paciente MAL (nieta del propósito, PAI); y 4 = individuo normal. Se observa una inserción de una T en la posición 666 (en rojo) que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la transcripción en la posición 747. Debido a que se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 15.1.2 (antisense) la lectura obtenida es de la cadena complementaria. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia con la inserción.



Esquema III.10. Pedigree de la familia 20 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino con PAI latente.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- ← = Individuo propósito.

III.9. Delección CT (728)

En la **familia 21** se detectó una delección en el exón 12 de una citosina y una timina en las posiciones 728 y 729, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 747, formando una proteína más corta. Esta mutación no ha sido publicada previamente y se encuentra en el exón con mayor cantidad de mutaciones reportadas hasta la fecha (20/84).

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (SAM), de 25 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 22 años y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.17). Cuando se analizaron los padres del propósito (ABM y OSM) y el hermano (ALM) utilizando la misma metodología se vió que la madre (ABM) y el hermano portaban la mutación a pesar de nunca haber desarrollado la sintomatología (Figura III.17), mientras que el padre era normal (dato no mostrado). Por lo tanto, el pedigree de la familia 21 queda como se indica en el Esquema III.11.

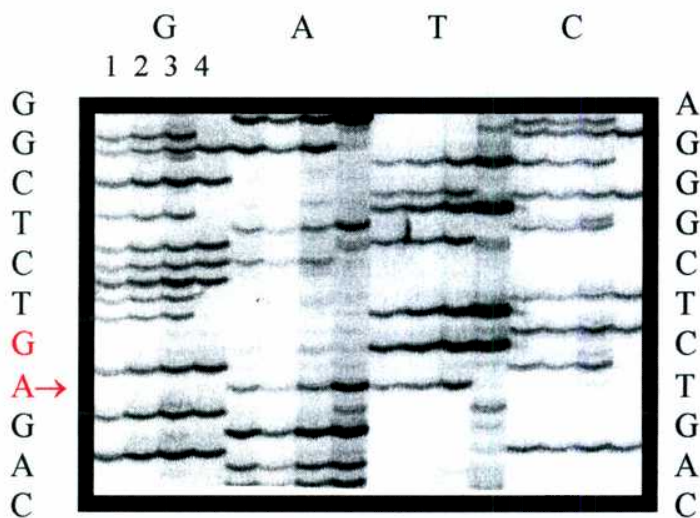
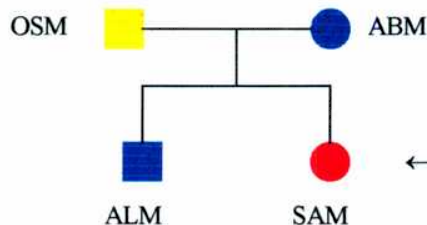


Figura III.17. Identificación por secuenciación directa de la mutación Del CT 728 en la familia 21.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente SAM (propósito, PAI); 2 = paciente ABM (madre del propósito, PAI); 3 = paciente ALM (hermano del propósito, PAI); y 4 = individuo normal. Se observa una deleción de una GA en la posición 728 (en rojo) que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la transcripción en la posición 747. Debido a que se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 15.1.2 (antisense) la lectura obtenida es de la cadena complementaria. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia mutada.



Esquema III.11. Pedigree de la familia 21 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, normal.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- = Individuo de sexo masculino con PAI latente.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- ← = Individuo propósito.

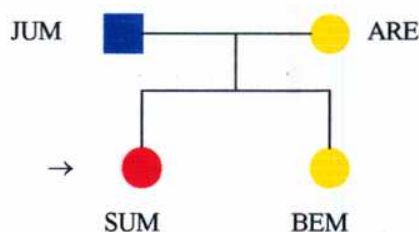
III.10. Mutación IVS12⁺¹

En la **familia 22** se detectó una mutación puntual en la primera base del intrón 12, en la posición 771+1, la cual cambia una guanina por una adenina (**g→c**) y produce la pérdida del

exón 12 por encontrarse mutado el sitio donador de splicing. Esta mutación no ha sido publicada previamente, sin embargo, en el mismo nucleótido se reportó una mutación que cambia g→a (Puy *et al.*, 1996) y también produce pérdida del exón 12.

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (SUM), de 45 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 35 años y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.18). Cuando se analizaron los padres del propósito (JUM y ARE) y la hermana (BEM) utilizando la misma metodología se vio que la madre (ARE) y la hermana no portaban la mutación, mientras que el padre si la portaba a pesar de nunca haber desarrollado la sintomatología (Figura III.18). Por lo tanto, el pedigree de la familia 22 queda como se indica en el Esquema III.12.

Además, para verificar la pérdida del exón 12 por un defecto en el splicing, se aisló el RNA de los linfoblastos en cultivo y luego de realizar la RT-PCR se observaron dos bandas en un gel de agarosa. Una correspondía al mRNA con splicing normal (1150 pb) y la otra al mRNA con splicing defectuoso (1030 pb) (dato no mostrado).



Esquema III.12. Pedigree de la familia 22 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, PAI latente.
- = Individuo de sexo femenino, normal.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo propósito.

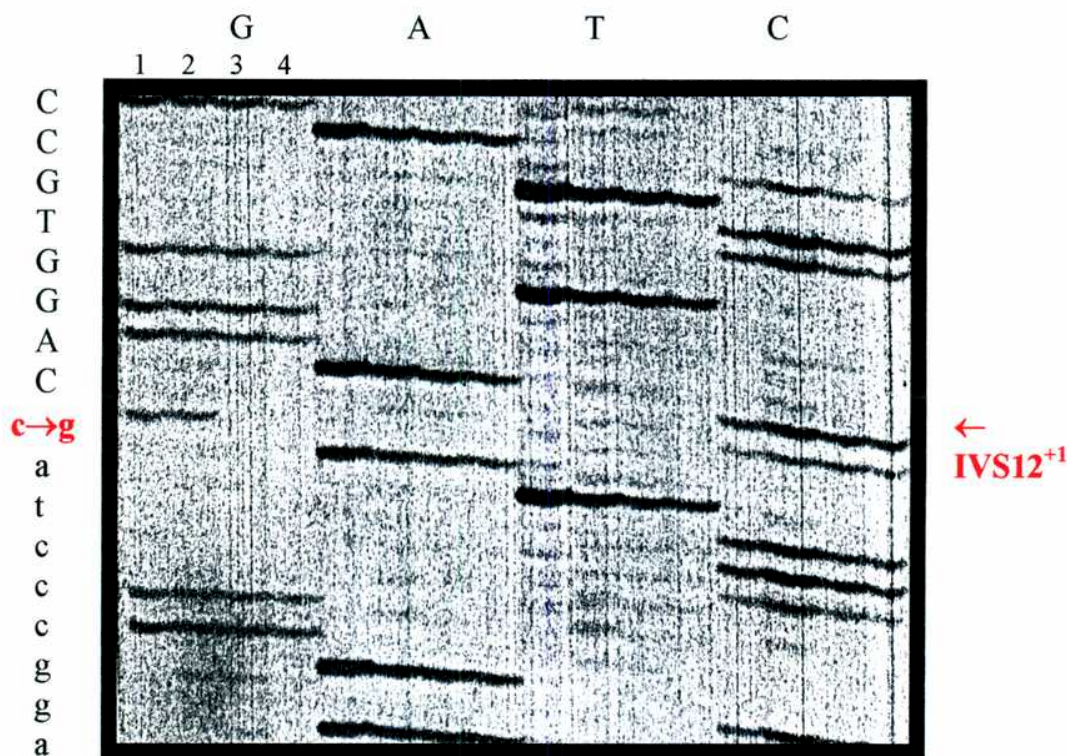


Figura III.18. Identificación por secuenciación directa de la mutación IVS12⁺ en la familia 22.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D: paciente SUM (propósito, PAI); 2 = paciente JUM (Padre del propósito, PAI); 3 = paciente ARE (madre del propósito, normal); y 4 = paciente BEM (hermana del propósito, normal). Se observa una sustitución de una c a una g del primer nucleótido del intrón 12 (771+1) (en rojo) que produce pérdida del exón 12 por defecto en el splicing. Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 15.1.2 (antisense), por lo tanto, la lectura obtenida es de la cadena complementaria. En minúscula se indica la secuencia intrónica y en mayúscula la exónica.

III.11. Deleción AGGA (815)

En la **familia 23** se detectó una deleción en el exón 13 de cuatro bases: **AGGA** en las posiciones 815 a 818, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 833, formando una proteína más corta. Esta mutación no ha sido publicada previamente y se encuentra en un exón con muy baja cantidad de mutaciones publicadas hasta la fecha (2/84).

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (SIP), de 49 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 47 años y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a

partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.19). Cuando se analizaron las hijas del propósito (LAB y FAB) utilizando la misma metodología pero sin establecer linfoblastos en cultivo se vió que ambas portaban la mutación a pesar de nunca haber desarrollado la sintomatología (dato no mostrado). Por lo tanto, el pedigree de la familia 23 queda como se indica en el Esquema III.13.

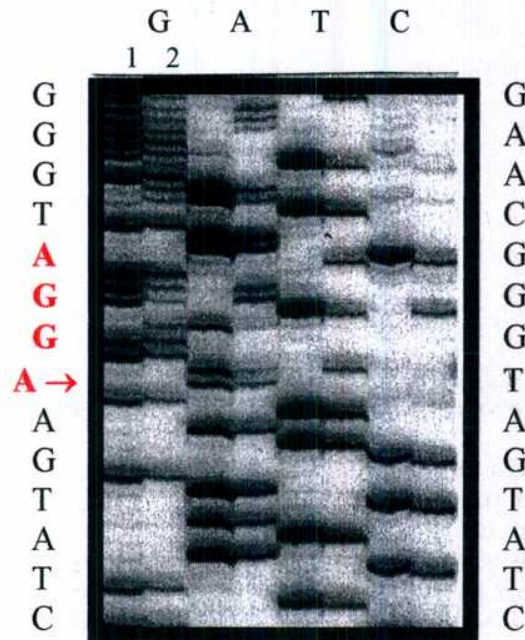
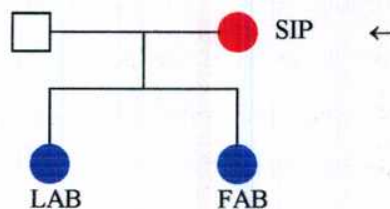


Figura III.19. Identificación por secuenciación directa de la mutación Del AGGA 815 en la familia 23. Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = individuo normal; y 2 = paciente SIP (propósito, PAI). Se observa una delección de cuatro bases AGGA en la posición 815 (en rojo) que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la transcripción en la posición 833. En la secuenciación directa se utilizó el primer EP 1613. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia con la delección.



Esquema III.13. Pedigree de la familia 23 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo femenino con PAI latente.
- ← = Individuo propósito.

III.12. Deleción A (948)

En la **familia 24** se detectó una deleción en el exón 15 de una adenina en la posición 948, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 1028, dando lugar a la síntesis de una proteína más corta. Esta mutación no ha sido publicada previamente y se encuentra en un exón con muy baja cantidad de mutaciones publicadas hasta la fecha (4/84).

En esta familia sólo se pudo analizar el individuo propósito (TEP), de 37 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 27 años. Por lo tanto, ya había sido diagnosticado previamente en base a los estudios bioquímicos y su historia clínica como PAI sintomático. La metodología utilizada para los estudios genéticos fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.20).

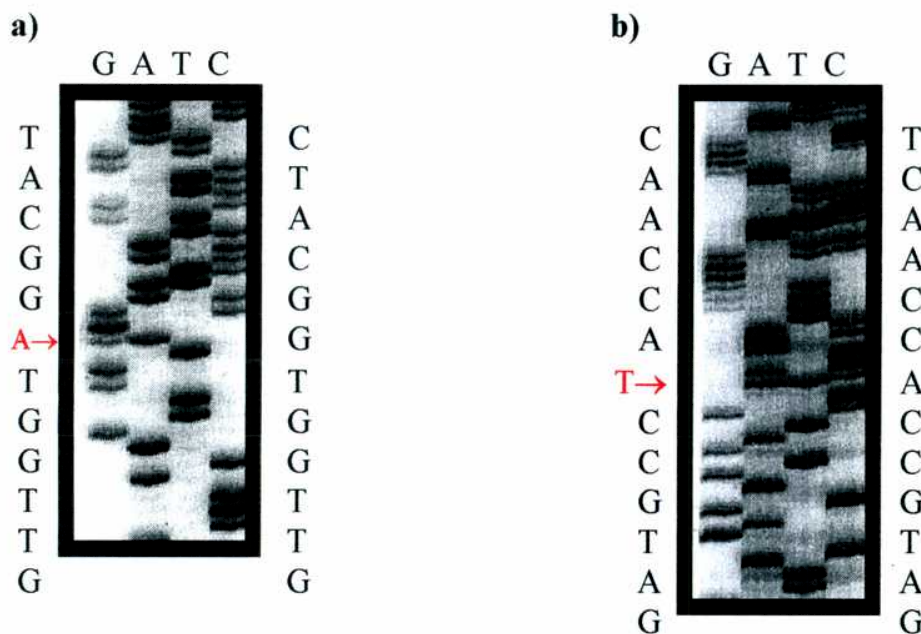


Figura III.20. Identificación por secuenciación directa de la Del A 948 en la familia 24.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D: paciente TEP (propósito, PAI). Se observa una deleción de una adenina en la posición 948 (en rojo) que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la transcripción en la posición 1028. En la secuenciación directa se utilizó el primer: a) EP 15.1; y b) EP 15.2. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia delecionada.

III.13. Inserción C (913)

En la **familia 25** se detectó una inserción en el exón 15 de una citosina en la posición 913, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 916, formando una proteína más corta. Esta mutación ha sido publicada previamente (Puy *et al.*, 1996) y se encuentra en un exón con muy baja cantidad de mutaciones publicadas hasta la fecha (4/84).

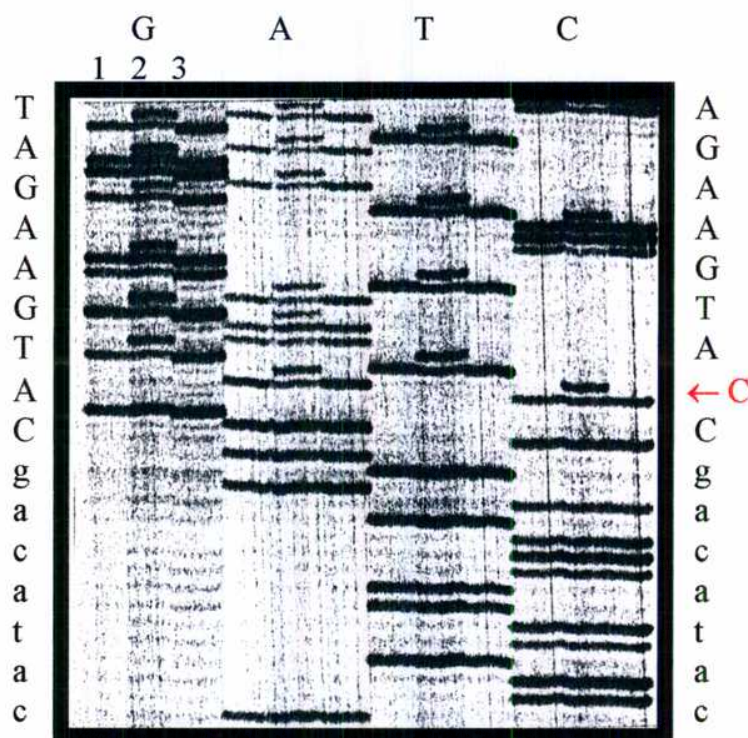


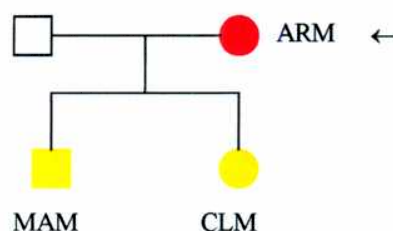
Figura III.21. Identificación por secuenciación directa de la Ins C 913 en la familia 25.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente CLM (hija del propósito, normal); 2 = paciente ARM (propósito, PAI); y 3 = paciente MAM (hijo del propósito, normal). Se observa una inserción de una C en la posición 913 (en rojo) que produce un corrimiento del marco de lectura generando un codón de terminación de la transcripción en la posición 916. En la secuenciación directa se utilizó el primer EP 15.1. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia con la inserción. En minúscula se indica la secuencia intrónica y en mayúscula la exónica.

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (ARM), de 58 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 48 años y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. La metodología utilizada fue a

partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.21). Cuando se analizaron los hijos del propósito (MAM y CLM) utilizando la misma metodología se vió que ambos no portaban la mutación a pesar de tener la actividad de la PBG-D eritrocitaria disminuída (Figura III.21). Por lo tanto, el pedigree de la familia 25 queda como se indica en el Esquema III.14.

Cabe aclarar que cuando se analizó la secuencia del propósito por secuenciación directa, se encontró, además de la inserción, una delección de 8 bases en el intrón 6: **gaaggggt**, la cual tambien estaba presente en los dos hijos del propósito (CLM y MAM) (Figura III.22). Sin embargo, esta delección se cree que no produce ningún cambio en la región codificante ya que se encuentra a 16 bases "upstream" de la adenina de la secuencia consenso del lazo (Tabla III.1 de "Introducción"). Además, está ubicada a 357 bases del exón 6 y a 54 bases del exón 7.



Esquema III.14. Pedigree de la familia 25 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino, normal.
- = Individuo de sexo femenino, normal.
- ← = Individuo propósito.

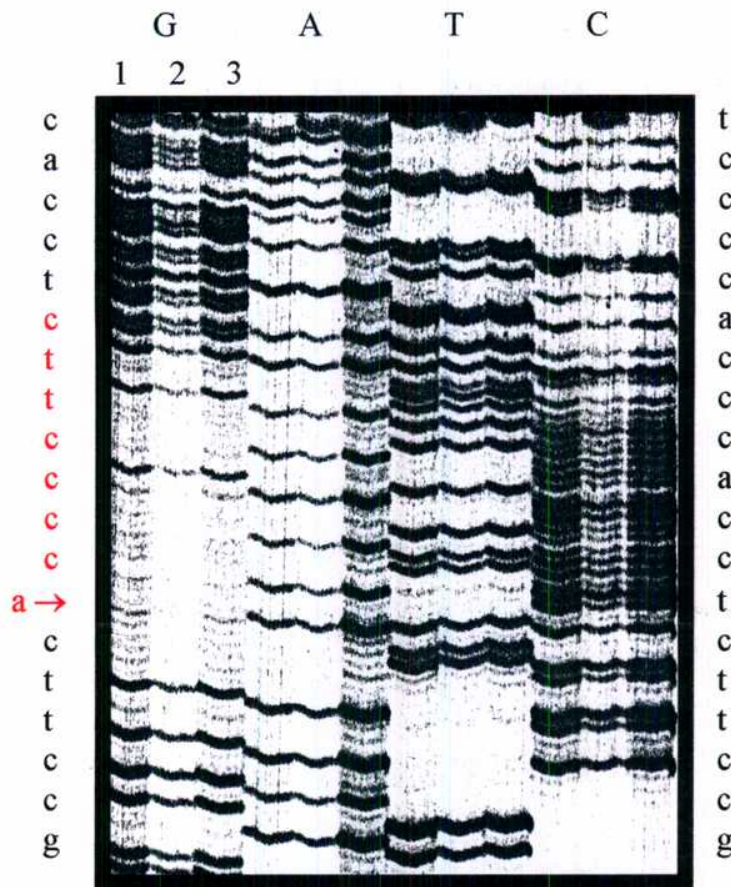


Figura III.22. Identificación por secuenciación directa de la mutación Del gaagggt en el intrón 6 en la familia 25. Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente ARM (propósito, PAI); 2 = paciente CLM; y 3 = paciente MAM. Tanto CLM como MAM fueron normales para la Inserción C 913, pero portadores de una delección en el intrón 6: gaagggt (en rojo). En la secuenciación directa se utilizó el primer EP 77. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia delecionada.

III.14. Mutación G335S

En la **familia 26** se detectó una mutación puntual en el exón 15: la guanina de la posición 1003 cambia a una adenina ($G_{1003} \rightarrow A$), la cual cambia la glicina de la posición 335 por serina ($GGC \rightarrow AGC$) (G335S). Esta mutación no ha sido publicada previamente.

Los estudios genéticos se iniciaron en el individuo propósito (LIN), de 47 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 40 años y, por lo tanto fue claramente diagnosticada clínica y bioquímicamente como PAI sintomática. Además, la hermana del propósito

falleció por el desencadenamiento de un ataque agudo de PAI. La metodología utilizada fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.23). Cuando se analizaron los sobrinos del propósito (DIP y EZP) utilizando la misma metodología se vió que ambos portaban la mutación tal como se esperaba en base a los estudios bioquímicos (Figura III.23). Por lo tanto, el pedigree de la familia 26 queda como se indica en el Esquema III.15.

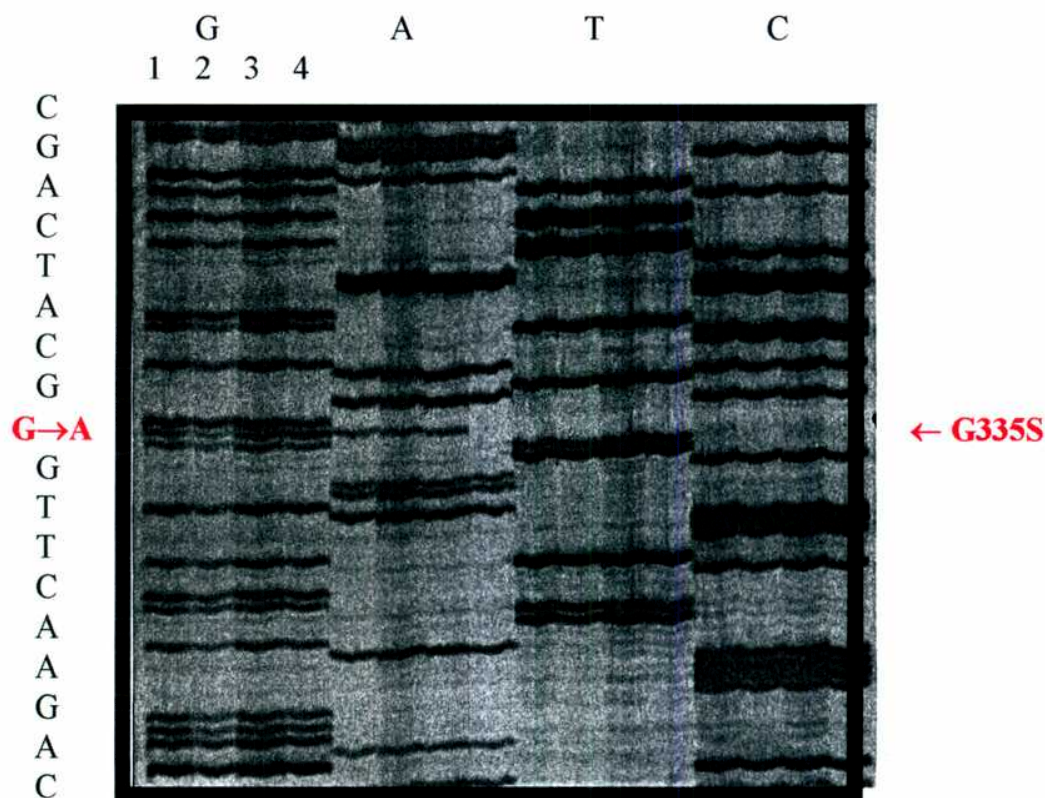
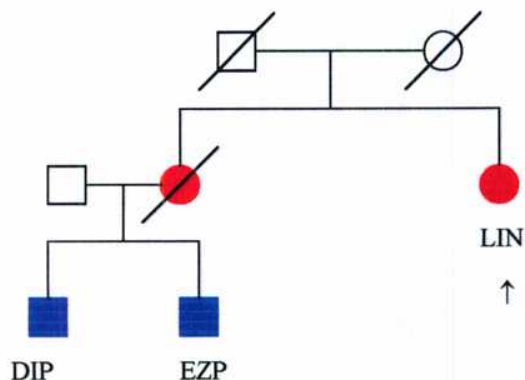


Figura III.23. Identificación por secuenciación directa de la mutación G335S en la familia 26.

Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente LIN (propósito, PAI); 2 = paciente DIP (sobrino del propósito, PAI); 3 = paciente EZP (sobrino del propósito, PAI); y 4 = individuo normal. Se observa una sustitución de una G a una A del nucleótido 1003 (en rojo) que predice una sustitución en el residuo 335 de glicina a serina (G335S). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 15.1.



Esquema III.15. Pedigree de la familia 26 en base al diagnóstico genético.

- = Individuo de sexo masculino, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino, fallecido.
- = Individuo de sexo masculino, no analizado.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático, fallecido.
- = Individuo de sexo femenino con PAI sintomático.
- = Individuo de sexo masculino con PAI latente.
- = Individuo propósito.

III.15. Deleción TTGGCTG (985)

En la **familia 27** se detectó una deleción de siete bases en el exón 15: **TTGGCTG** en las posiciones 985 a 991, la cual produce un corrimiento del marco de lectura que genera un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 1028, dando lugar a la síntesis de una proteína más corta. Esta mutación no ha sido publicada previamente.

En esta familia sólo se pudo analizar el individuo propósito (MCP), de 42 años y sexo femenino, que desarrolló su primer ataque agudo a los 40 años. Por lo tanto, ya había sido diagnosticado previamente en base a los estudios bioquímicos y su historia clínica como PAI sintomático. La metodología utilizada para los estudios genéticos fue a partir de DNA estableciendo la línea celular de linfoblastos y luego de realizar la LR-PCR se procedió a la secuenciación directa, la cual reveló la presencia de la mutación en este individuo (Figura III.24). Cabe aclarar que la deleción fue deducida de la secuenciación directa con los primers EP 15.1 (sense) (Figura III.24) y EP 15.2 (antisense) (dato no mostrado), ya que debido a que

hay una secuencia repetida (CCCAG) utilizando un sólo primer la delección parecería ser más larga.

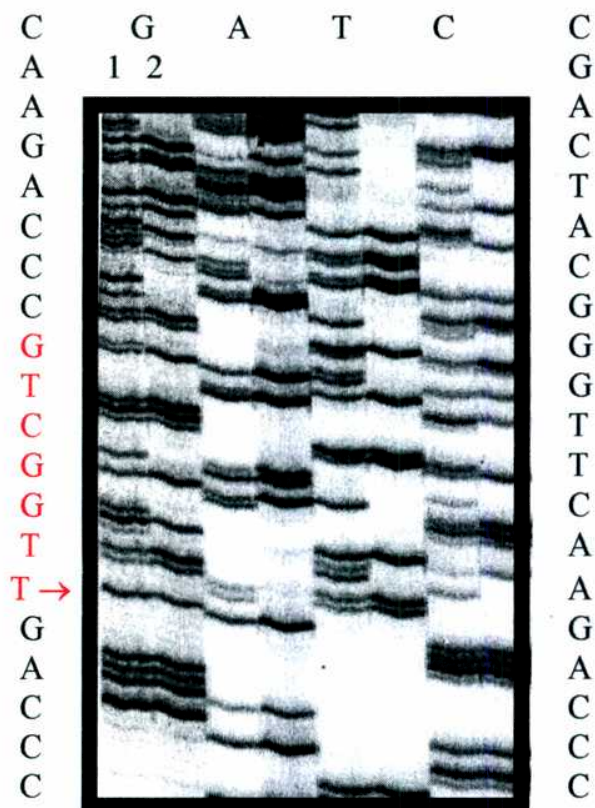


Figura III.24. Identificación por secuenciación directa de la mutación Del TTGGCTG (985-991) en la familia 27. Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 = paciente MCP (propósito, PAI); y 2 = individuo normal. Se observa la presencia de una delección TTGGCTG en las posiciones 985 a 991 del exón 15 (en rojo). En la secuenciación directa se utilizó el primer EP 15.1. A la izquierda se indica la secuencia normal y a la derecha la secuencia delecionada.

III.16. Polimorfismos neutros

Con el objetivo de tener más conocimiento acerca de la genética molecular de la PBG-D en la población argentina, se analizaron dos polimorfismos neutros previamente publicados (ver Tabla III.2 de "Introducción"): en el intrón 3, a→g (3581) (Yoo *et al.*, 1993; Daimon *et al.*, 1993) y en el exón 10, G→T (6479) (Gu *et al.*, 1991; Yoo *et al.*, 1993).

La frecuencia del alelo A para el polimorfismo del intrón 3 fue 0,56 sobre 64 alelos analizados. Esta frecuencia es muy parecida a la publicada para la población norteamericana caucásica (0,59) (Yoo *et al.*, 1993) pero muy diferente a la de la población japonesa (0,21) (Daimon *et al.*, 1993) (Figura III.25).

En el caso del polimorfismo del exón 10, sobre 74 alelos analizados, se observó que la frecuencia del alelo G fue muy diferente a la publicada para otras poblaciones. En la población argentina la frecuencia de este alelo fue 0,81, mientras que para la población caucásica europea fue 0,65 (Gu *et al.*, 1991) 0,69 para la norteamericana caucásica (Yoo *et al.*, 1993) (Figuras III.11 y III.14 de este capítulo).

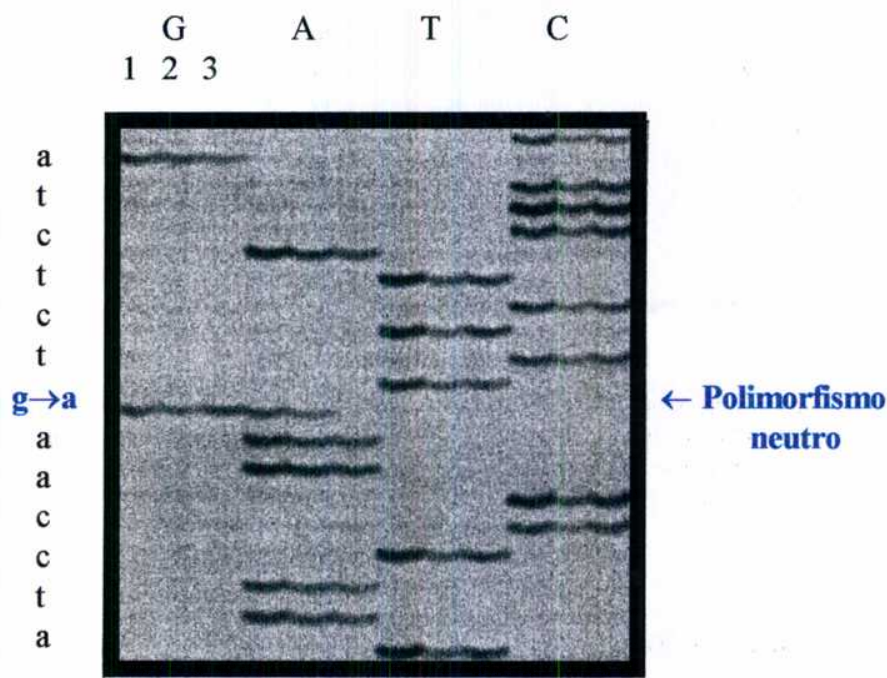


Figura III.25. Identificación por secuenciación directa del polimorfismo neutro g/a del intrón 3. Secuencia parcial del DNA de la PBG-D. Calles: 1 a 3 = individuos que presentan el polimorfismo neutro g→a (3581) del intrón 3 (en azul). Se utilizó en la secuenciación directa el primer EP 71.

III.17. Conclusiones

III.17.1. Eficiencia y rapidez de la metodología empleada para el diagnóstico genético en pacientes con PAI

Para los estudios genéticos se desarrollaron dos tipos de metodología, una partiendo de RNA y otra partiendo de DNA.

La estrategia elegida partiendo del RNA aislado a partir de los linfocitos de cada paciente, evita el empleo de líneas celulares de linfoblastos, método que si bien provee de una mayor cantidad de RNA, es muy costoso, largo y riesgoso ya que debe utilizarse el virus Epstein-barr. Por lo tanto, nuestra metodología nos permite obtener un diagnóstico relativamente rápido del paciente. Además, luego de la RT-PCR se puede descartar o no, la presencia de mutaciones de splicing, grandes deleciones e inserciones. No obstante, para la identificación de las mutaciones intrónicas que producen defectos en el splicing la única solución es el análisis del DNA.

La estrategia elegida partiendo del DNA es, sin embargo, mucho más rápida, ya que luego del aislamiento del DNA se realiza una PCR (LR-PCR) y finalmente por Secuenciación, utilizando Taq DNA polimerasa, se identifican directamente la o las mutaciones presentes en cada paciente.

Además, en esta tesis se utilizó un método de búsqueda de mutaciones: Polimorfismos de conformación en simple cadena (SSCP). Teniendo en cuenta que la región codificante es de 1150 pb, esta técnica no resulta práctica debido a que para obtener buenos resultados habría que analizar 5 fragmentos amplificados por PCR (200 pb cada uno) en, al menos 4 condiciones distintas de corrida (temperatura ambiente ó 4°C, y gel de poliacrilamida 5 % con o sin glicerol), lo cual representa realizar 4 geles y luego proceder a la secuenciación directa para la identificación de la mutación. Además, hay que considerar que siempre no se dispone de una gran cantidad de pacientes para aplicar métodos de búsqueda de mutaciones. Si se utiliza, en cambio, la metodología a partir de DNA descripta, directamente se procede a la secuenciación

para lo cual se realizan 15 reacciones de secuenciación (una para cada exón) que se analizan en dos geles de poliacrilamida

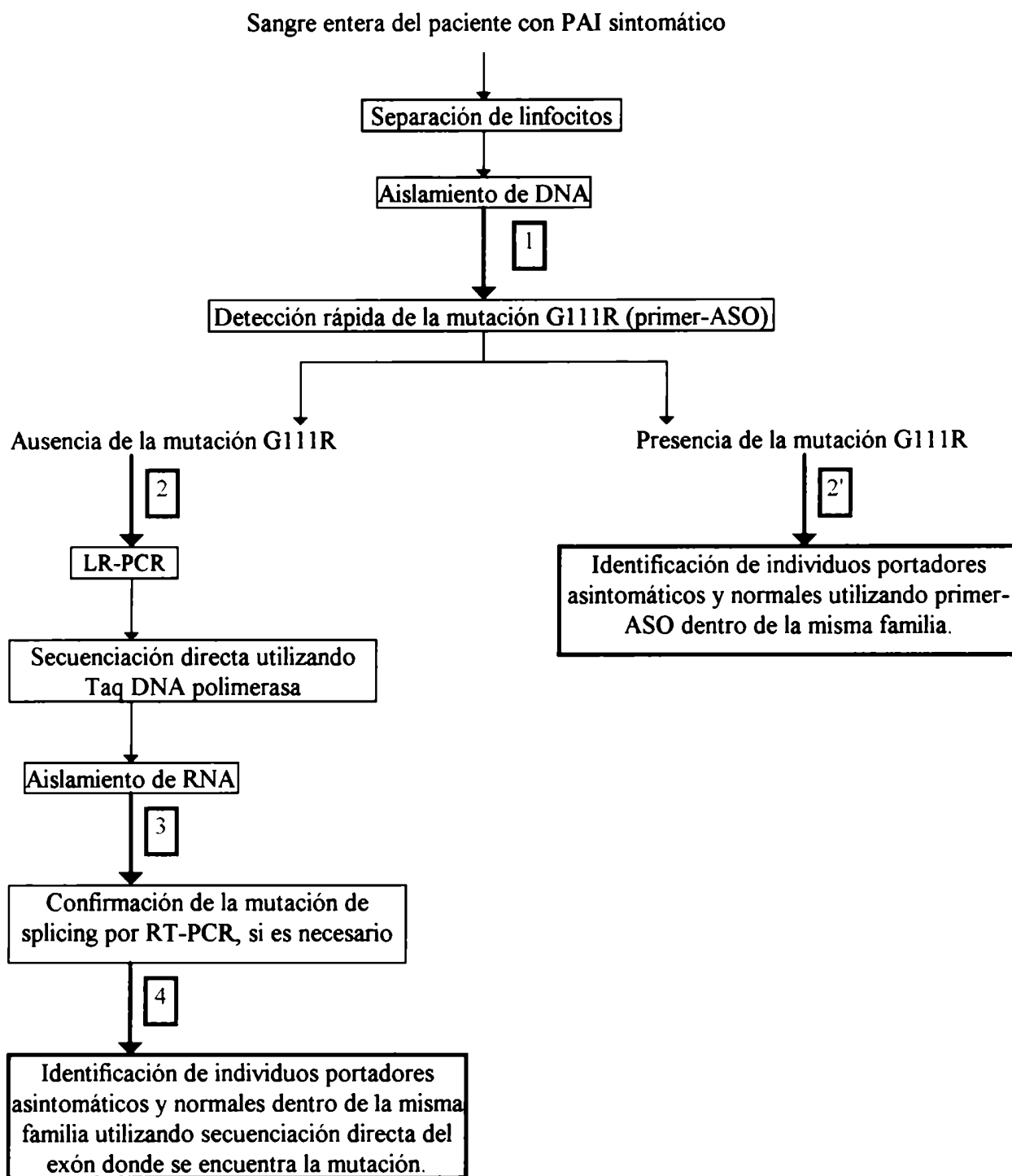
En el caso de la población argentina, en base a los resultados obtenidos, la rapidez del diagnóstico genético se ve favorecido por la presencia de una mutación en alta frecuencia (G111R), es decir, cuando una familia se acerca a nuestro Centro, primero se realiza en el paciente con PAI sintomático la detección rápida de ésta mutación (primer-ASO) y luego, si no posee esa mutación, se procede a la secuenciación directa.

Por lo tanto, evaluando las ventajas y desventajas de cada estrategia, y considerando las características especiales de la población argentina, proponemos un esquema a seguir para el diagnóstico genético de la PAI en el laboratorio (Esquema III.1).

III.17.2. Mutaciones y polimorfismos neutros encontrados en la población argentina

En éste primer análisis de la población argentina a nivel genético, sobre 27 familias afectadas no-cosanguíneas estudiadas, se encontraron 14 mutaciones distintas, de las cuales 8 no habían sido previamente publicadas: 2 puntuales que producen cambio de aminoácido: **Q34P** (en el exón 4) y **G335S** (en el exón 15); 1 mutación puntual de splicing que produce la pérdida del exón 12: **IVS12⁺¹**; 4 deleciones y 1 inserción que producen corrimiento del marco de lectura y generan un codón de terminación de la transcripción: **Delección CT 728** (en el exón 12), **Delección AGGA 815** (en el exón 13), **Delección A 948** (en el exón 15), **Delección TTGGCTG 985** (en el exón 15) e **Inserción A 666** (en el exón 12).

Del total de mutaciones detectadas en la población argentina, el 57 % (8/14) fueron mutaciones puntuales: 4 en una G, 3 en una C y 1 en una A. Hasta el momento sólo se habían reportado mutaciones puntuales en el nucleótido A en el 3 % de los casos (2/63). Seis de estas mutaciones producen cambio de aminoácido (Q34P; G111R; R173W; R201W; R173Q; G335S), 1 genera un codón de terminación de la transcripción (Q204X) y 1 es de splicing (IVS12⁺¹, que produce la pérdida del exón 12). El 43 % restante (6/14) produce un corrimiento del marco de lectura, de las cuales 4 fueron deleciones (CT 728, en el exón 12; AGGA 815, en el exón 13; A



Esquema III.1. Diagnóstico genético de pacientes con PAI.

Los números recuadrados en color indican los pasos a seguir. El paso 3 es optativo para la caracterización de la mutación.

948, en el exón 15 y TTGGCTG 985, en el exón 15) y 2 inserciones (A 666, en el exón 12 y C 913, en el exón 15).

Hasta la fecha se habían reportado 84 mutaciones en la población mundial, y la mayoría se encontraban en el exón 12 (24 %), exón 10 (13 %) y el exón 7 (7 %). Luego del análisis de la población argentina estos valores se han modificado sensiblemente: de las 92 mutaciones encontradas, la mayoría siguen encontrándose en los exones 12 y 10 (25 y 12 %, respectivamente) pero el exón 15 pasó a tercer lugar con 7 mutaciones (8 %).

Asimismo, en el mundo se habían publicado 66 mutaciones puntuales (78 %) y 18 mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura (22 %): 11 deleciones y 7 inserciones (13 y 8 %, respectivamente). Estos hallazgos se modificaron por la gran cantidad de deleciones encontradas en la población argentina. Por lo tanto actualmente hay 69 mutaciones puntuales (75 %) y 23 mutaciones que producen cambio de marco de lectura (25 %): 15 deleciones y 8 inserciones (16 y 9 %, respectivamente).

Es importante destacar que el 44 % (12/27) de las familias analizadas poseen la misma mutación (G111R), que había sido encontrada con anterioridad en una familia de origen belga (Gu *et al.*, 1993a). Como ya se mencionó, la PAI es una enfermedad que se caracteriza por la enorme heterogeneidad genética descripta, es decir, la mayoría de las mutaciones son "privadas", se encuentran en una sola familia. Solamente se describieron 2 excepciones, la mutación W198X (que se encontró en el 50 % de la población sueca con PAI; Lee & Anvret, 1991) y la R116W (que se encontró en la tercera parte de la población holandesa; Gu *et al.*, 1993b). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran entonces otra mutación que se presenta en alta frecuencia dentro de la misma población. Por lo tanto, se desarrolló un método de diagnóstico rápido para la detección de la misma utilizando la técnica de primer-ASO. El análisis en detalle con respecto a ésta mutación se desarrollará en el capítulo IV.

Además se analizó la frecuencia de 2 polimorfismos previamente publicados. El primero está ubicado en el intrón 3 (A/G) y presenta una frecuencia similar a la población caucásica de América del Norte: A = 0,56 y G = 0,44, sobre 64 alelos analizados. El otro se encuentra en el exón 10 (T/G)

y la población argentina resultó ser altamente homocigota: G = 0,81 y T = 0,19, sobre 74 alelos analizados.

III.17.3. Importancia del diagnóstico genético en pacientes con PAI

En éste capítulo, se describió el análisis de 65 individuos correspondientes a 27 familias diferentes de la población argentina con PAI. En base a los estudios genéticos, determinamos que, del total de individuos estudiados, el 46 % fue PAI sintomático, el 28 % PAI latente y el resto (26 %) fueron normales.

Los individuos con PAI sintomáticos previamente habían sido diagnosticados, en forma clara en base a estudios clínicos y bioquímicos, por lo tanto el estudio genético sirvió para determinar en la familia la mutación causante de la enfermedad.

En el caso de los individuos con PAI latentes y normales se realizó, previamente, un diagnóstico bioquímico en base a la actividad PBG-D eritrocitaria disminuida, pero estos resultados no fueron concluyentes porque hay un solapamiento de valores normales bajos y PAI altos. Asimismo, luego de realizar los estudios genéticos, se determinó que un 5 % de individuos (3/65) diagnosticados bioquímicamente como PAI latentes fueron normales, lo cual resalta la importancia del estudio genético en portadores asintomáticos.

III.18. Referencias

- Chen, C-H.; Kenneth, H.A.; Lee, G.; Anderson, K.E. & Desnick, R.J. (1994) Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the Hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "Variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. *J. Clin. Invest.* **94**:1927-1937.
- Daimon, M.; Yamatani, K.; Igarashi, M.; Fukase, N.; Ogawa, A.; Tominaga, M. & Sasaki, H. (1993) Acute intermittent porphyria caused by G to C mutation in exon 12 of the porphobilinogen deaminase gene that results in exon skipping. *Hum. Genet.* **92**:549-553.
- Delfau, M.H.; Picat, C.; de Rooij, F.W.M.; Hamer, K.; Bogard, M.; Wilson, J.H.P.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1990) Two different point G to A in exon 10 of the Porphobilinogen Deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria. *J. Clin. Invest.* **86**:1511-1516.

- Gu, X-F.; Lee, J-S.; Delfau, M.H. & Grandchamp, B. (1991) PCR detection of a G/T polymorphism at exon 10 of the porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 19:1966.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; de Baar, E.; Bruylant, M.; Lissens, W.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993a) Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Hum. Mol. Genet.* 2:1735-1736.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; Lee, J-S.; Te Velde, K.; Deybach, J.S.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993b) High prevalence of the point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 91:128-130.
- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Pihlaja, H.; & Mustajoki, P. (1992) CRIM-positive mutations of acute intermittent porphyria in Finland. *Hum. Mutat.* 1:392-396.
- Lee, J.S. (1991) Molecular genetic investigation of the human porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Doctoral thesis, Stockholm.*
- Lundin, G.; Wedell, A.; Thunell, S. & Anvret, M. (1994) Two new mutations in the porphobilinogen deaminase gene and a screening method using PCR amplification of specific alleles. *Hum. Genet.* 93(1):59-62.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G; Moore, M.R.; Louie, G.V. & Connor, J.M. (1994). Identification of five novel mutations in the Porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* 5:809-811.
- Puy, H.; Deybach, J.C.; Robreau, A.M.; Lamoril, J. & Nordmann, Y. (1996) Detection of four novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene in French Caucasian patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Her.* 46:177-180.
- Yoo, H.-W.; Warner, C.A.; Chen, C.-H. & Desnick, R.J. (1993) Hydroxymethylbilane synthase: complete genomic sequence amplifiable polymorphisms in the human gene. *Genomics.* 15:21-29.

CAPÍTULO IV. Análisis de la mutación más frecuente en la población argentina con PAI.

IV.1. Origen de las familias portadoras de la mutación G111R

Como ya se detalló en el capítulo 3 de "Resultados", en esta tesis se analizaron 27 familias no-cosanguíneas con PAI, y un resultado muy notable fue que el 44 % (12/27) de las mismas portan la misma mutación puntual en el exón 7: la guanina de la posición 331 cambia a una adenina ($G_{331} \rightarrow A$), la cual produce el cambio de la glicina de la posición 111 a una arginina ($GGA \rightarrow AGA$) (G111R).

Esta mutación había sido descrita hasta el momento sólo en un paciente de origen belga (Gu *et al.*, 1993a). Para demostrar que este cambio de base fue la mutación causante de la enfermedad y no un polimorfismo neutro Gu *et al.* (1993a) introdujeron la misma en un cDNA clonado en un vector de expresión por mutagénesis sitio-dirigida. Luego de verificar que la secuencia de uno de los clones mutados contenía solamente la mutación G111R y el resto de la secuencia era normal, demostraron que ese cDNA era incapaz de dirigir la síntesis de una proteína activa en el sistema de expresión.

La PAI es una enfermedad que se caracteriza por la enorme heterogeneidad genética descrita, es decir, la mayoría de las mutaciones son "privadas", se encuentran en una única familia. Solamente se describieron 2 excepciones a nivel mundial, la mutación W198X (Lee & Anvret, 1991) y la R116W (Gu *et al.*, 1993b). Sin embargo, es interesante aclarar que los portadores de la mutación W198X, que se encontró en el 50 % de la población sueca con PAI, tienen un origen en común lo cual sugiere un efecto fundador porque todas provienen de una misma comunidad (Arjeplog). En cambio, entre los portadores de la mutación R116W, que se detectó en la tercera

parte de la población holandesa, no se encontró ninguna relación de cosanguinidad en un análisis de hasta cuatro generaciones.

Los resultados obtenidos en ésta tesis muestran otra mutación que se presenta en alta frecuencia dentro de la misma población. Se investigó el origen de las 12 familias portadoras de G111R, con el objetivo de trazar un origen ancestral común. Sin embargo, no se logró obtener suficientes datos por varias razones, en algunos casos los padres no están vivos y se desconoce nacionalidades de los antecesores más allá de dos generaciones. En otros casos están vivos pero también se desconoce el origen. Tres familias tienen origen italiano, y otras refieren origen francés, árabe e irlandés. Además, cabe aclarar que la población argentina ha recibido a lo largo de la historia sucesivas inmigraciones, principalmente de países europeos, lo cual dificulta el establecimiento de un nexo entre todas las familias. Los datos más lejanos son ambiguos y en muchos casos no podemos construir un análisis del pedigree detallado por, al menos, cuatro generaciones. Consecuentemente, podemos decir que no hay cosanguinidad entre las familias hasta los datos investigados y no se puede establecer un origen común o ancestral para la mutación.

IV.2. Detección rápida de la mutación G111R

En el presente estudio se utilizó la técnica de primer-ASO para la detección rápida de la mutación G111R debido a que la misma se encontró en casi el 50 % de la población argentina con PAI. El método descripto es simple, rápido y económico porque se necesitan solamente 3 primers y dos reacciones de PCR para detectar la presencia o ausencia de la sustitución. La reacción se lleva a cabo en un ciclador térmico y se pueden testear varios pacientes simultáneamente. Además, se requiere muy poca cantidad de DNA y no se necesita utilizar material radioactivo. Cabe aclarar que es muy importante utilizar controles positivos y negativos para la mutación, para asegurar la eficiencia del método debido a que algunas veces se observaron falsos positivos.

Sin embargo, la probabilidad de que el método produzca un diagnóstico errado es casi inexistente, en nuestra experiencia encontramos una concordancia perfecta entre los resultados

del primer-ASO y la secuenciación directa. Por este motivo, aseguramos que los resultados obtenidos por éste método son concluyentes y pueden utilizarse para el diagnóstico sin la necesidad de corroborarlo con secuenciación directa.

IV.3. Relación de los datos clínicos y bioquímicos con el tipo de mutación encontrada.

En los estudios publicados hasta la fecha a nivel mundial, se estableció que no existe una clara relación entre el tipo de mutación que causa la PAI y la severidad de los síntomas clínicos. Incluso, dentro de una misma familia, la expresión clínica de la enfermedad es muy variable (Grandchamp *et al.*, 1996). En los dos casos en los cuales se encontró alta prevalencia de una mutación dentro de la misma población (Lee & Anvret, 1991; Gu *et al.*, 1993b), no se hizo referencia a esta relación.

Debido a que encontramos la misma mutación en varias familias y en un esfuerzo por establecer algún tipo de relación genotipo/fenotipo, investigamos en profundidad la sintomatología clínica y los resultados bioquímicos de los pacientes con PAI que desarrollaron alguna vez un ataque agudo. Para realizar este análisis se consideró un individuo propósito de cada familia afectada y se dividieron las mismas en dos grupos: el Grupo I, que incluye las familias portadoras de la mutación G111R, y el Grupo II, que incluye las familias con otra mutación. Los resultados de este análisis se detallan en la Tabla IV.1.

Cuando comparamos la edad del desarrollo del primer ataque agudo, el sexo y los resultados bioquímicos, no se observan grandes diferencias entre ambos grupos, salvo para el caso de las porfirinas totales urinarias donde se encontró una diferencia del 100 % entre ambos grupos. Para obtener alguna conclusión acerca de la diferencia entre ambos grupos con respecto a la sintomatología clínica, se comparó la presencia o ausencia de varios síntomas muy comunes en éste tipo de pacientes según la literatura (ver sección II.3.1. de "Introducción"). Como se muestra en la Tabla IV.1, los pacientes del Grupo I presentaron un mayor número de síntomas con respecto a los del Grupo II. Esta diferencia se observa en los porcentajes de cada uno de los síntomas, ya que en

Tabla IV.1. Análisis de los datos clínicos y bioquímicos según el tipo de mutación encontrada.

	Grupo I	Grupo II
Características generales:		
Número de pacientes analizados	12	15
Edad (años)	39 (23 a 53)	42 (25 a 60)
Edad del primer ataque agudo (años)	32 (20 a 42)	33 (19 a 48)
Sexo	F 100 %	F 100 %
Resultados bioquímicos:		
ALA en orina (mg/24 h)	11,8 (1,3 a 39)	11,8 (4,5 a 36,7)
PBG en orina (mg/24 h)	57,2 (7,7 a 183)	67,2 (11 a 224)
Porfirinas totales en orina (µg/24 h)	822,0 (170 a 1525)	1713,0 (339 a 6831)
PBG-D eritrocitaria (U/ml)	46,31 (31,96 a 67,27)	42,71 (24,44 a 71,12)
Sintomatología (%):		
Trastornos neurológicos	75	53
Trastornos psiquiátricos	33	7
Convulsiones	42	20
Dolores musculares	67	33
Parálisis	83	40
Cefaleas	67	27
Mareos	67	33
Dolores abdominales	100	100
Vómitos	25	0
Anorexia	42	33
Constipación	58	20
Periodos menstruales anormales	42	7
Taquicardia	42	20
Más de un ataque agudo	83	80

En la tabla se muestran los datos investigados para un paciente sintomático de cada familia del Grupo I = portadores de la mutación G111R, o del Grupo II = portadores de una mutación distinta a G111R.

Los datos presentados para las características generales y los estudios bioquímicos son un promedio y entre paréntesis se indica el rango de variación.

Los valores normales para los estudios bioquímicos son: **ALA** = 2-4 mg/24 h; **PBG** = 1-2 mg/24 h; **Porfirinas totales** = 20-250 µg/24 h; **PBG-D** = 81,51 ± 11,96 U/ml GR (Mujeres).

Los valores para cada síntoma representan el porcentaje de individuos de ese Grupo que presentó el síntoma.

casi todos hay un 50 % menos de pacientes del Grupo II con la presencia del síntoma, excepto en el caso de los dolores abdominales, que se presentó en el 100 % de los individuos de ambos grupos y la expresión de más de un ataque agudo que se presentó en aproximadamente el 80 % de los casos.

Por lo tanto, en base a este análisis se puede concluir que si bien no hay un patrón determinado para la expresión clínica y bioquímica de la mutación G111R, sí se encontró mayor cantidad de síntomas en los pacientes que la portan con respecto a los que portan otra mutación. Sin embargo, estos resultados no nos permiten establecer una clara relación genotipo/fenotipo para sospechar de los datos clínicos y bioquímicos que el paciente porta o no la mutación G111R.

IV.4. Referencias

- Grandchamp, B.; Puy, H.; Lamoril, J.; Deybach, J.C. & Nordmann, Y. (1996) Review: Molecular pathogenesis of hepatic acute porphyrias. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:1046-1052.
- Gu, X-F; de Rooij, F.; de Baar, E.; Bruylant, M.; Lissens, W.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993a) Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Hum. Mol. Genet.* 2:1735-1736.
- Gu, X-F.; de Rooij, F.; Lee, J-S.; Te Velde, K.; Deybach, J.S.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993b) High prevalence of the point mutation in the porphobilinogen deaminase gene in Dutch patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Genet.* 91:128-130.
- Lee, J.S. & Anvret, M. (1991) Identification of the most common mutation within the porphobilinogen deaminase gene in Swedish patients with acute intermittent porphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10912-10915.

CAPÍTULO V.

Expresión procariótica de dos mutaciones puntuales nuevas. Análisis de la estructura de los mutantes.

V.1. Expresión procariótica de las mutaciones: Q34P y G335S

Con el objetivo de obtener una mayor caracterización de las mutaciones puntuales nuevas encontradas de la PBG-D, y para demostrar que estas sustituciones fueron la causa de la enfermedad y no son polimorfismos neutros, se realizaron estudios de expresión en bacterias. Para ello se construyeron vectores de expresión pKK-PBGD para cada uno de los alelos mutantes utilizando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida y, luego de verificar que la secuencia de uno de los clones contenía la mutación y el resto de la secuencia era normal, se expresó en *E. coli*, y se determinó su actividad enzimática.

Las mutaciones que se expresaron de esta manera fueron Q34P y G335S. La metodología para cada caso se detalla en el capítulo III de "Materiales y Métodos".

Los resultados obtenidos para seis experimentos independientes de inducción y medición de la actividad enzimática se muestran en la Tabla V.1. Como se puede observar, el porcentaje de actividad enzimática de la PBG-D mutada fue menor al 3 % del nivel medio expresado para el alelo normal (pKK-PBGD) en ambos casos: 1,3 % para pKK-PBGD-Q34P y 2,5 % para pKK-PBGD-G335S. Esto indica que ambas mutaciones, no son polimorfismos neutros, sino que por el contrario, son sustituciones de aminoácidos que producen enzimas prácticamente inactivas dejando demostrado que las mismas son la causa de la PAI en los pacientes que las portan.

Tabla V.1. Expresión de las mutaciones Q34P y G335S de la PBG-D en *E. coli*.

Constructo	Actividad de la PBG-D		Porcentaje de la actividad enzimática
	Media (U/mg*h)	Rango	
JM109	0,20	0,08-0,41	0
pKK-PBGD	139,91	131,64-151,62	100
pKK-PBGD-Q34P	1,78	0,71-3,24	1,3
pKK-PBGD-G335S	3,47	0,72-5,21	2,5

Los valores de actividad enzimática Media y Rango representan los resultados de seis experimentos independientes.

JM109 = cepa de *E. coli* sin plásmido (control de la actividad de la PBG-D basal bacteriano).

pKK-PBGD = plásmido pKK 233-2 que contiene el cDNA de la PBG-D normal.

pKK-PBGD-Q34P = plásmido pKK 233-2 que contiene el cDNA de la PBG-D con la mutación Q34P.

pKK-PBGD-G335S = plásmido pKK 233-2 que contiene el cDNA de la PBG-D con la mutación G335S.

V.2. Análisis de la estructura de los mutantes: Q34P y G335S

Como ya se explicó en el capítulo I de "Introducción", la secuencia de aminoácidos de la PBG-D se determinó en un amplio rango de organismos, y se comprobó que hay una alta conservación de los aminoácidos estructural y funcionalmente importantes. Así, por ejemplo, hay un 43 % de homología entre la estructura primaria de *E. coli* y la humana (Jordan *et al.*, 1988). Posteriormente, se determinó la estructura de rayos X de la enzima de *Escherichia coli* (Louie *et al.*, 1992) la cual reveló su estructura tridimensional obteniéndose así un modelo molecular detallado. Entonces, debido a que la PBG-D humana no ha sido cristalizada y a la alta conservación evolutiva observada, se puede realizar un análisis de las mutaciones encontradas sobre la estructura cristalográfica de *E. coli* para determinar los efectos sobre la estructura y propiedades catalíticas de la enzima humana.

Se ha descrito, para la sustitución Q34K, publicada por Mgone *et al.* (1992); que el cambio de esa glutamina 34 a lisina, ubicada en un aminoácido evolutivamente conservado del sitio activo de la enzima, produce una notoria alteración en la estructura secundaria de la proteína, por ruptura de los puentes de Hidrógeno con los aminoácidos S96 y R195 (Brownlie *et al.*, 1994). La transversión A→C del nucleótido 101 que cambia esta misma glutamina por prolina podría tener consecuencias similares o más severas considerando que la prolina es en

realidad un iminoácido estructuralmente muy diferente a la glutamina. Los estudios de expresión indicaron que la mutación Q34P disminuye la actividad de la PBG-D a solamente un 1,3 % con respecto al valor normal, demostrando la inactividad casi total de la enzima.

Además, es interesante aclarar, que esta mutación se presentó en dos familias no relacionadas y los pacientes portadores presentaron una sintomatología muy severa durante los repetidos ataques agudos, como por ejemplo, trastornos neurológicos, parálisis, dolores musculares y abdominales, taquicardia, anorexia, cefaleas y mareos. Todos estos datos implican que la mutación sería bastante severa.

En el caso de la mutación G335S, no se habían publicado hasta la fecha mutaciones en ese residuo. Sin embargo si realizamos el mismo análisis vemos que la glicina de la posición 335, también es un residuo muy conservado evolutivamente (Brownlie *et al.*, 1994). Además, en cuanto a la estructura de los aminoácidos; la sustitución es de glicina, el aminoácido más simple, a serina, que contiene un grupo hidroxilo. Teniendo en cuenta estas consideraciones y los resultados de los estudios de expresión en bacterias, deducimos que la mutación G335S también produciría una notable alteración en la estructura de la proteína, lo cual genera una enzima casi inactiva (2,5 % con respecto a la actividad normal).

Esta mutación se encontró en la familia 26, en la cual la hermana del propósito y, posiblemente la madre, fallecieron durante un ataque agudo de PAI. La sintomatología presentada por el paciente propósito fue trastornos neurológicos, parálisis, dolores abdominales, taquicardia, anorexia y constipación. Esto implica que la mutación G335S es muy severa porque produce una proteína altamente inactiva.

V.3. Otras mutaciones nuevas de la PBG-D: análisis de su estructura

Con respecto al resto de las mutaciones nuevas encontradas, todas producen grandes cambios estructurales de la proteína lo cual afectarían notablemente su actividad y/o estabilidad.

Así, por ejemplo, la mutación de splicing **1VS12⁺¹** produce la delección del exón 12, es decir de 39 residuos aminoácidos (218 a 257), generando la pérdida en su estructura terciaria de una

hoja plegada β (5₁) y dos estructuras α (4₁ y 1₃), lo cual da como resultado un producto proteico inactivo (Brownlie *et al.*, 1994).

El resto de las mutaciones nuevas encontradas producen un corrimiento del marco de lectura por la presencia de una delección (CT 728, en el exón 12; AGGA 815, en el exón 13; A 948, en el exón 15 y TTGGCTG 985, en el exón 15) o una inserción (A 666, en el exón 12), las cuales generan un codón de terminación de la transcripción prematuro dando lugar a la síntesis de una proteína más corta. Por lo tanto, el cambio estructural es tan notable que las proteínas generadas serían altamente inactivas y/o inestables.

V.4. Mutaciones de la PBG-D previamente publicadas: análisis de su estructura

Con respecto a las mutaciones encontradas previamente publicadas, analizaremos la estructura en detalle de cada una de ellas.

Así por ejemplo, la glicina 111 que cambia a una arginina, (G111R) se ubica en la superficie de la proteína y según la comparación de la estructura de la PBG-D de *E. coli* con la humana su efecto es desconocido (Brownlie *et al.*, 1994). Sin embargo, como ya se mencionó en el capítulo IV de "Resultados", Gu *et al.* (1993) realizaron los estudios de expresión en bacterias y demostraron que la proteína era inactiva en el sistema de expresión.

Por otro lado, los cuatro grupos carboxílicos del cofactor dipirrometano interactúan con residuos arginina altamente conservados de la PBG-D. La alteración de esas argininas por mutagénesis sitio-dirigida generaron una proteína mutante incapaz de unirse al cofactor y/o al sustrato (Lander *et al.*, 1991; Jordan & Woodcock, 1991). Las mutaciones R173W (Lee 1991) y R173Q (Delfau *et al.*, 1990; Kauppinen *et al.*, 1992) afectan a una de esas argininas (homóloga a la de la posición 155 de *E. coli*). Por lo tanto, estas sustituciones a triptofano o glutamina, que se encontraron en tres familias argentinas no relacionadas, anulan la capacidad del aminoácido 173 para formar puentes salinos con el cofactor y el sustrato, generando una proteína inactiva.

Además, la arginina de la posición 201 forma un puente salino con el residuo D178, por lo tanto una mutación en ese residuo produce una pérdida de la estabilidad proteica considerable. Así

lo demostraron Chen *et al.* (1994) cuando identificaron la mutación R201W. Al realizar los estudios de expresión en bacterias vieron que si bien la actividad enzimática de la proteína mutada era muy alta (40 % del normal), la misma era altamente inestable, ya que perdía más del 90 % de la actividad luego de ser sometida a una temperatura de 65°C durante 180 min.

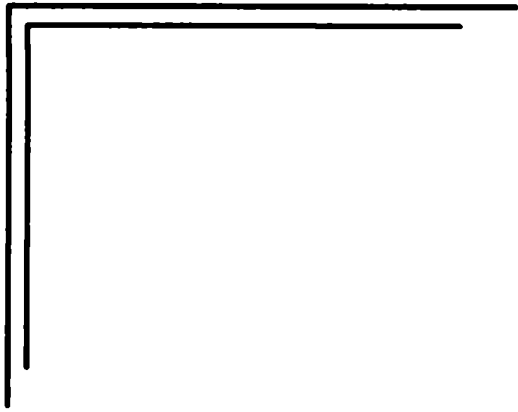
Otra mutación encontrada en la población argentina pero previamente publicada fue la Q204X (Mgone *et al.*, 1994) que genera una proteína truncada a la cual le faltan los exones 12 a 15, por lo tanto se estima que su actividad catalítica sería muy baja.

Por último la inserción C 913 (Puy *et al.*, 1996) en el exón 15, produce un corrimiento del marco de lectura con la aparición de un codón de terminación de la transcripción en el nucleótido 916 generando una proteína truncada.

V.5. Referencias

- Brownlie, P.D; Lambert, R.; Louie, G.; Jordan, P.M.; Blundell, T.L.; Warren, M.J.; Cooper, J.B. & Wood, S.P. (1994) The three-dimensional structures of mutants of porphobilinogen deaminase: Toward an understanding of the structural basis of acute intermittent porphyria. *Prot. Sci.* 3:1644-1650.
- Chen, C-H.; Kenneth, H.A.; Lee, G.; Anderson, K.E. & Desnick, R.J. (1994) Acute intermittent porphyria: identification and expression of exonic mutations in the Hydroxymethylbilane synthase gene. An initiation codon missense mutation in the housekeeping transcript causes "Variant acute intermittent porphyria" with normal expression of the erythroid-specific enzyme. *J. Clin. Invest.* 94:1927-1937.
- Delfau, M.H.; Picat, C.; de Rooij, F.W.M.; Hamer, K.; Bogard, M.; Wilson, J.H.P.; Deybach, J.C.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1990) Two different point G to A in exon 10 of the Porphobilinogen Deaminase gene are responsible for acute intermittent porphyria. *J. Clin. Invest.* 86:1511-1516.
- Gu, X-F; de Rooij, F.; de Baar, E.; Bruylant, M.; Lissens, W.; Nordmann, Y. & Grandchamp, B. (1993) Two novel mutations of the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Hum. Mol. Genet.* 2:1735-1736.
- Jordan, P.M.; Thomas, S.D. & Warren, M.J. (1988) Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* 254:427-435.
- Jordan, P.M. & Woodcock, S.C.; (1991) Mutagenesis of Arginine residues in the catalytic cleft of *E. coli* porphobilinogen deaminase which affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation. *Biochem. J.* 280:445-449.
- Kauppinen, R.; Peltonen, L.; Pihlaja, H.; & Mustajoki, P. (1992) CRIM-positive mutations of acute intermittent porphyria in Finland. *Hum. Mutat.* 1:392-396.

- Lander, M.; Pitt, A.R.; Alefounder, P.R.; Bardy, D.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1991) Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding. *Biochem. J.* **275**:447-452.
- Lee, J.S. (1991) Molecular genetic investigation of the human porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria. *Doctoral thesis, Stockholm.*
- Louie, G.V.; Brownlie, P.D.; Lambert, R.; Cooper, J.B.; Blundell, T.L.; Wood, S.P.; Warren, M.J.; Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* **359**:33-39.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R. & Connor, J.M. (1992) Detection of seven point mutations in the porphobilinogen deaminase gene in patients with acute intermittent porphyria, by direct sequencing of *in vitro* amplified cDNA. *Hum. Genet.* **90**:12-16.
- Mgone, C.S.; Lanyon, W.G.; Moore, M.R.; Louie, G.V. & Connor, J.M. (1994). Identification of five novel mutations in the Porphobilinogen deaminase gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**:809-811.
- Puy, H.; Deybach, J.C.; Robreau, A.M.; Lamoril, J. & Nordmann, Y. (1996) Detection of four novel mutations in the porphobilinogen deaminase gene in French Caucasian patients with acute intermittent porphyria. *Hum. Her.* **46**:177-180.



CONCLUSIONES



Las conclusiones obtenidas en esta tesis son las siguientes:

- ♦ Este es el primer estudio a nivel genético realizado en la población argentina con PAI.
- ♦ Se estimó la frecuencia de aparición de la enfermedad en la población argentina en 1:125.000.
- ♦ Se determinó que la PAI es más frecuente en mujeres que en hombres, presentando una relación de sexos de 7:3, respectivamente, para la población argentina. Además, no sólo la enfermedad es menos frecuente en hombres sino que además es poco común que estos últimos desarrollen los síntomas, debido a que las mujeres están más expuestas a los factores desencadenantes de los ataques agudos que caracterizan la PAI.
- ♦ En esta tesis, se analizó el 34 % de las familias afectadas de la población argentina. Para ello se realizaron estudios bioquímicos y genéticos a 65 pacientes de 27 familias no relacionadas.
- ♦ En este primer análisis de la población argentina a nivel genético, sobre 27 familias afectadas no-cosanguíneas estudiadas, se encontraron 14 mutaciones distintas.
- ♦ De las 14 mutaciones encontradas, 8 no habían sido previamente publicadas: 2 puntuales que producen cambio de aminoácido: **Q34P** (en el exón 4) y **G335S** (en el exón 15); 1 mutación puntual de splicing que produce la pérdida del exón 12: **IVS12⁺**; 4 deleciones y 1 inserción que producen corrimiento del marco de lectura y generan un codón de terminación de la transcripción: **Delección CT 728** (en el exón 12), **Delección AGGA 815** (en el exón 13), **Delección A 948** (en el exón 15), **Delección TTGGCTG 985** (en el exón 15) e **Inserción A 666** (en el exón 12).
- ♦ De las 14 mutaciones encontradas, 6 habían sido previamente publicadas: **G111R** (en el exón 7); **R173W**, **R201W**, **R173Q** y **Q204X** (en el exón 10) y una **inserción C 913** (en el exón 15).
- ♦ Con las mutaciones nuevas encontradas en la población argentina, se aumentó la frecuencia de mutaciones en el exón 15 y el porcentaje de deleciones varió de un 13 a un 16 % en la población mundial.

- ◆ Se analizó la frecuencia de 2 polimorfismos previamente publicados. El primero está ubicado en el intrón 3 (A/G) y presenta una frecuencia similar a la población caucásica de América del Norte: A = 0,56 y G = 0,44, sobre 64 alelos analizados. El otro se encuentra en el exón 10 (T/G) y la población argentina resultó ser altamente homocigota: G = 0,81 y T = 0,19, sobre 74 alelos analizados.
- ◆ El 44 % (12/27) de las familias argentinas analizadas poseen la misma mutación (**G111R**), que había sido encontrada con anterioridad solamente en una familia de origen belga. Estos resultados muestran la tercer mutación que se presenta en alta frecuencia dentro de una misma población a nivel mundial.
- ◆ Se desarrolló un método de diagnóstico rápido para la detección de la mutación **G111R** utilizando la técnica de primer-ASO. Este método es simple, rápido, económico y altamente reproducible, y puede utilizarse para el diagnóstico sin la necesidad de corroborarlo con secuenciación directa.
- ◆ Evaluando las ventajas y desventajas de las estrategias metodológicas empleadas en esta tesis, y considerando las características especiales de la población argentina, se propuso un esquema para el diagnóstico genético de la PAI.
- ◆ En base a los estudios genéticos, se determinó que un 5 % de individuos (3/65) diagnosticados bioquímicamente como PAI latentes fueron normales, lo cual habla de la importancia del estudio genético en portadores asintomáticos.
- ◆ Debido a que encontramos la misma mutación en varias familias y en un esfuerzo por establecer algún tipo de relación genotipo/fenotipo, investigamos en profundidad la sintomatología clínica y los resultados bioquímicos de los pacientes con PAI que desarrollaron alguna vez un ataque agudo y se puede concluir que si bien no hay un patrón determinado para la expresión clínica y bioquímica de la mutación **G111R**, sí se encontró mayor cantidad de síntomas clínicos característicos en los pacientes que la portan con respecto a los que portan otra mutación. Sin embargo, estos resultados no nos permiten establecer una clara relación

genotipo/fenotipo para sospechar, a partir de los datos clínicos y bioquímicos que el paciente porta o no la mutación G111R.

- ♦ Se realizaron estudios de expresión en bacterias para las mutaciones puntuales Q34P y G335S. El porcentaje de actividad enzimática de la PBG-D mutada obtenido fue menor al 3 % con respecto al normal en ambos casos: 1,3 % para pKK-PBGD-Q34P y 2,5 % para pKK-PBGD-G335S. Esto indica que ambas mutaciones, no son polimorfismos neutros, sino que por el contrario, son sustituciones de aminoácidos que producen enzimas prácticamente inactivas, demostrando que las mismas son la causa de la PAI en los pacientes que las portan.

