

43
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

" PORFIRIAS Y PORFIRINEMIAS "

TRABAJO ESCRITO
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a
FRIAS GONZALEZ HERMILO REYES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1 9 9 1



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E .

- I. INTRODUCCION.

- II. GENERALIDADES DEL GRUPO HEMO
 - 2.1. ANTECEDENTES.
 - 2.2. ESTRUCTURA DEL HEMO
 - 2.3. BIOSINTESIS DEL GRUPO HEMO
 - 2.4. REGULACION DE SINTESIS DEL HEMO .

- III. MANIFESTACIONES CLINICAS.
 - 3.1. PORFIRIAS HEPATICAS
 - 3.2. PORFIRIAS A NIVEL DE MEDULA OSEA.

- IV. DIAGNOSTICO
 - 4.1. PORFIRIAS DE TIPO AGUDO
 - 4.2. PORFIRIAS CON LESIONES ESPECIFICAS EN LA PIEL.
 - 4.3. ESTUDIOS EN SANGRE PERIFERICA
 - 4.4. PORFIRIAS EN MEDULA OSEA
 - 4.5. ANEMIAS ASOCIADAS A LAS PORFIRIAS
 - 4.6. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE ANEMIA FERROPENICA

- V. METODOLOGIA

- RESUMEN

- BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Las porfirias son alteraciones clinicometabólicas o simplemente metabólicas (porfirias latentes); generalmente este tipo de trastornos son genéticos, en los que se produce un aumento en la síntesis de porfirinas por trastornos enzimáticos diversos.

La síntesis de porfirinas comienzan en las mitocondrias con la formación de ácido delta (δ) -aminolevulínico a partir de glicina y succinil CoA en presencia de fosfato de piridoxalasa como la enzima sintetasa del ácido delta (δ) -aminolevulínico, posteriormente se desplaza al citoplasma para la producción del porfobilinógeno, en donde se condensan 4 moléculas de porfobilinógeno en una estructura cíclica por medio de la enzima porfobilinógeno desaminasa, para formar sucesivamente el uroporfirinógeno en presencia de la uroporfirinógeno isomerasa y el coproporfirinógeno y pasos metabólicos intermedios. La fase final ocurre nuevamente en las mitocondrias y comprende la formación de protoporfirina por medio de la coproporfirinógeno oxidasa y la incorporación de hierro por la acción de la ferroquelatasa para formar el grupo hemo. Este componente viene a formar parte de la molécula de hemoglobina.

Por otra parte las porfirias se clasifican en 2 categorías principales, dependiendo de si la producción excesiva de porfirina se lleva a cabo en el hígado o en la médula ósea; --

Porfirias hepáticas: Porfiria Intermitente Aguda,
 Porfiria Variegata,
 Coproporfiria Hereditaria,
 Porfiria Cutánea Tardía.

**Porfirias Eritropoyéticas: Porfiria Eritropoyética Congénita,
Protoporfiria Eritropoyética.**

Estas difieren entre sí clínicamente y en el tipo de porfirina o el tipo de pirrol excretado, la vía de excreción, la fuente tisular endógena principal de porfirina o de pirrol y el patrón de herencia.

Esas patologías se encuentran asociadas con anemias -- como las ferropénicas, hemolíticas o sideroblásticas .

Se cuenta actualmente con una serie de procedimientos útiles para su identificación en el laboratorio, entre las más empleadas están: pruebas cualitativas de Watson Swartz, fluorescencia con luz ultravioleta, extracción con solventes, cromatografía de papel, método fluorométrico, mediciones en plasma y sangre, valoración morfológica, determinación sérica.

CAPITULO II

GENERALIDADES DEL GRUPO HEMO

2.1. Antecedentes.

La historia de las porfirinas se remonta a más de un siglo de años. El primer caso fue descrito en 1874 como la "pemphigus leprosus", el enfermo tuvo fotosensibilidad y mal hepático y fue encontrado en la excreta urinaria el compuesto conocido uroporfirina. En 1888 Nencki y Sichek identificaron hematoporfirina como derivado del hemo y esto condujo a que las porfirinas urinarias derivan de un desorden en la hemoglobina; y no fue hasta 1911 y 1925 cuando Günther describió 3 diferentes tipos de enfermedades cuya caracterización y excreción anormales de porfirina llamándolas hematoporfirinas. Posteriormente Fischer aclaró la estructura química de los pigmentos excretados en estas alteraciones.

Waldenström en 1934 sugirió que no existen fundamentalmente diferentes defectos y tipos de porfiria sino que las porfirinas son sintetizadas en tejidos diferentes a la médula ósea como es el hígado; asimismo, junto con Vahlquist identificaron el porfobilinógeno como precursor de la uroporfirina.

Watson y colaboradores en 1966 llegaron a una clasificación según la localización del proceso dominante, el primer grupo lo llamaron fotosensitivo o eritropoyético y el segundo porfiria hepática reconociendo en este último las siguientes subdivisiones: Intermitente aguda, porfiria cutánea tarda y tipo mixto.

B. Shemin más tarde siguiendo la biosíntesis del hemo, demostró que el porfobilinógeno, es formado del ácido delta (δ)-aminolevulínico (ALA) producido por glicina y ácido succínico.

2.2. Estructura del hemo.

La estructura básica del hemo está constituido por un átomo de hierro, el cual se coordina con 4 anillos pirrólicos - (tetrapirrol), a través de sus átomos de sustitución de hidrógeno no unidos entre sí y ensamblados por puentes meteno. Los 4 puentes meteno son numerados de manera semejante a las letras griegas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ); formando un sistema cíclico, conjugado con una secuencia de enlaces únicos y dobles alternantes, formando una resonancia y así proporcionándole un alto grado de estabilidad a la molécula. Estos dobles enlaces conjugados absorben fácilmente la luz visible dando el color rojo de la hemoglobina. Además de su coordinación con los anillos pirrólicos, el átomo de hierro del hemo se puede unir a otros 2 enlaces, uno por encima y otro por debajo del anillo porfirina.

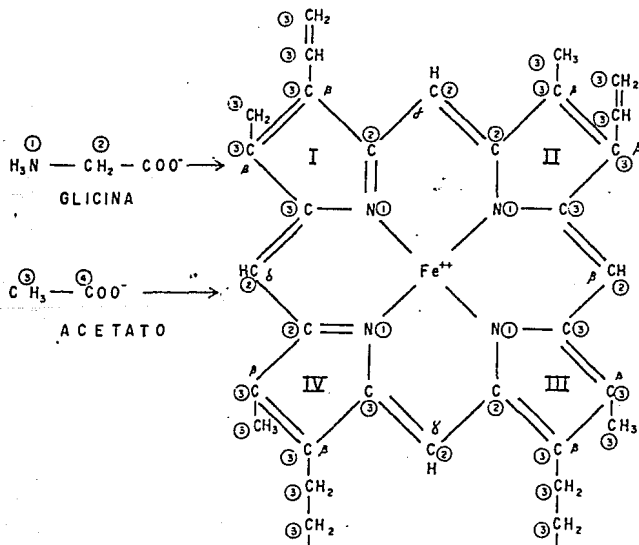
Los anillos se designan con los números romanos I, II, III y IV. Las posiciones Beta (β), de los anillos pirrólicos son sustituidos con un total de 8 restos:

- a) 4 grupos metilo,
- b) 2 propionato y
- c) 2 grupos vinilo.

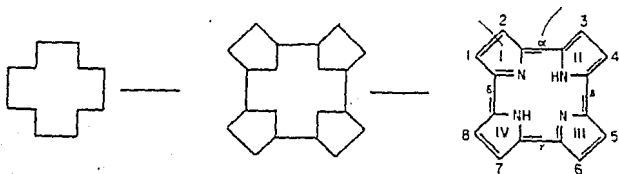
David Shemin y colaboradores, mediante experimentos de marcaje isotópico en 1945, demostraron que, después de alimentar a sujetos humanos con glicina conteniendo ^{15}N , aparecen marcados los átomos de nitrógeno del hemo. En cambio, si se administra glutamato con ^{15}N , aparece poco marcaje isotópico; utilizando posteriormente ^{14}C , descubriendo que 8 átomos de carbono del hemo derivan del carbono alfa (α), de la glicina y ninguno del carboxilo. Estudios posteriores demostraron que los restantes 26 átomos de carbono del hemo podían proceder del acetato. Además, el ^{14}C de acetato marcado en el metilo aparecían en 24 de estos 26 carbonos, mientras que el ^{14}C de acetato marcado en

el carboxilo solo aparecia en los otros 2. Siendo ilustrado de la siguiente forma:

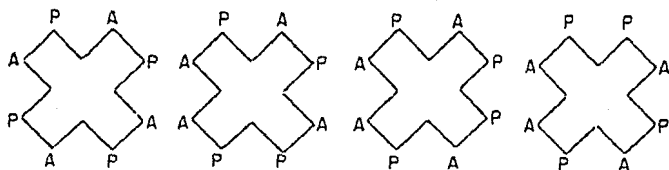
- 1.- Los 4 átomos de nitrógeno (marcados con el número en esquema), derivan del nitrógeno de glicina.
- 2.- Los 4 átomos de carbono en posición (2) en los anillos I, - II, III y IV, derivan de los átomos de carbono de glicina. - Siendo también cierto, respecto a los 4 átomos de carbono - metenos marcados con alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). El carbono carboxílico de glicina no se utiliza para la síntesis del hemo.
- 3.- Los 26 átomos restantes derivan de los grupos metilo o carboxilo de acetato, por medio de un compuesto intermedio de 4 carbonos procedente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, principalmente de la succinil CoA.



Fischer propuso una forma abreviada de la molécula de porfirina para facilitar su entendimiento, esta, omite los puentes metilénicos y cada anillo pirrólico se presenta como una -- abrazadera rectangular con los 8 lugares donde pueden ocurrir -- sustituciones numeradas reemplazando 8 átomos de H_2 , por



4 grupos metilo y 4 grupos etilo, produciéndose un tetrametil - tetraetil, con 4 etiporfirinas; isómeros de estos compuestos -- son teóricamente posibles en el arreglo de grupos metilo y etilo, los cuales han sido llamados tipo I, II, III y IV, pero -- únicamente el tipo I (grupo metil 1, 3, 5 y 7) y el tipo III -- (grupo metil en 1, 3, 5 y 8) ocurre en la naturaleza.



TIPO I

TIPO II

TIPO III

TIPO IV

El uso de: A denota los grupos de los ácidos acéticos,
P denota los grupos propiónicos.

Las porfirinas son consideradas derivadas del compuesto inicial llamado porfiria dando lugar a 15 isómeros las distintas posiciones variables de los 3 radicales de sustitución (metilo, vinilo y propionilo). La sustitución de grupos vinilos en posiciones 2 y 4, grupos de ácido propiónico en posiciones 6 y 7 producen protoporfirinas tipo III, isómero 9 de 15 isómeros posibles.

Las porfirinas más importantes en la naturaleza son: uroporfirina, coproporfirina y protoporfirina. Los compuestos en la serie URO son octacarboxílicos y la serie COPRO son tetra carboxílicos. Los números romanos, ejemplo: III y IX, significan el posible orden de sustituyentes alrededor de la periferie de los anillos porfirínicos asignados arbitrariamente, siendo relacionados con las enfermedades denominadas porfirias, así mismo son manifestaciones de vías biosintéticas anormales.

Las porfirinas tipo I y III se forman fisiológicamente siendo la última la más abundante y un metabolito endógeno. Además esta última conduce a la síntesis del hemo. Del compuesto I, normalmente se producen indicios de éste, formándose a lo largo de 2 líneas isoméricas conocidas como dualismo de porfirinas.

La diferencia estructural entre uroporfirina I y III, está en la posición de los enlaces laterales de los ácidos acético y propiónico en el anillo pirrol IV. El orden de sustituyentes A y P en el tipo III se encuentra invertido, siendo asimétrica, mientras que, en el tipo I la sustitución es simétrica.

La diferencia estructural entre coproporfirinas I y III, también se encuentra en la posición de las cadenas laterales situadas en el pirrol IV.

La diferencia entre uroporfirinas y coproporfirinas es

la presencia del grupo metil, en las coproporfirinas en la posición ocupada por el enlace lateral del ácido acético en las uroporfirinas, este ácido octacarboxilado es soluble en agua e insoluble en éter y la mayor parte de los solventes orgánicos.

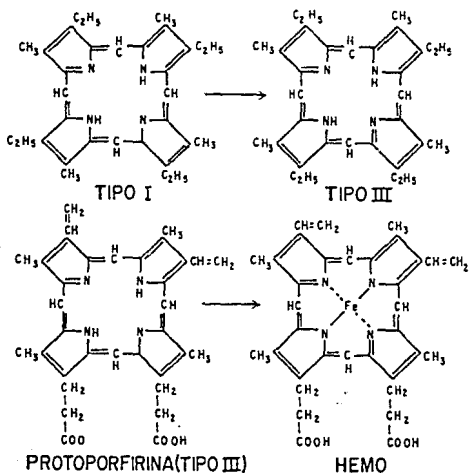
El uroporfirinógeno (UPG) es convertido en coproporfirinógeno (CPG) tipo III por descarboxilación de los 4 grupos de ácido acético con eliminación de CO_2 del grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$ formando el grupo metilo. La mayor porción de uroporfirinógeno se convierte en coproporfirina (CP) y una pequeña fracción se convierte en uroporfirina (UP) ordinaria en orina. En el uroporfirinógeno no grupos metileno enlazan los anillos presentes en las porfirinas. Así, el uroporfirinógeno es precursor de coproporfirinógeno que se convierte en coproporfirina y es eliminado en esa forma.

La fracción principal de coproporfirinógeno experimenta otra transformación en las posiciones 2 y 4, que son descarboxilados para formar grupos etilos, que secundamente son deshidrogenados (pérdida de 2H) para formar grupos vinilos. La sustitución de grupos vinilos en posiciones 2 y 4 y grupos de ácido propiónico en posiciones 6 y 7 producen protoporfirinas tipo III, isómero 9 de 15 isómeros posibles.

Todos los hemos pertenecen al tipo III y sólo contienen protoporfirinos tipo III (9), debido a que la enzima que transforma el coproporfirinógeno a protoporfirinógeno es específica de isómeros tipo III. Las cadenas laterales de ácido propiónico de esta pueden funcionar en la forma ionizada para orientar el hemo y contribuir a fijarlo a la globina.

La protoporfirina tipo III dentro del cual un átomo de Fe es incorporado por el complejo Fe-porfirina hemo. El hemo puede combinarse con los compuestos nitrógenados en forma de --

hemocromos. Donde se unen con la proteína globina, formándose la hemoglobina. En diferentes arreglos y combinaciones moleculares, el hemo es constituido por otro importante hemocromo tal es una mioglobina y otras enzimas citocromo peroxidasa y catalasa.



2.3. Biosíntesis del grupo hemo.

La vía biosintética del hemo comienza con precursores básicos, con succinil CoA del ciclo de ácidos tricarboxílicos y glicina.

2.3.1. Formación del ácido delta [δ] -aminolevulínico (ALA)

La biosíntesis comienza por una primer etapa, en la cual la ALA es el primer precursor del hemo por medio de la condensación del aminoácido de 2 carbonos la glicina y el ácido succínico activado. La enzima catalizadora es la sintetasa del ácido delta [δ] -aminolevulínico.

El primer factor y proceso básico de la reacción es -- que el succinato como activador de succinil CoA con un grupo carbonil electrofílico, reacciona ligándose el piridoxal fosfato como un carbanión estable en la enzima, el Mg^{++} es indicado como el catión; los cationes hacen al hemicetal más susceptible al ataque nucleofílico acelerando la formación de la base de -- Schiff, haciendo que el átomo carbono alfa (α) de la glicina -- (un nucleófilo por la estabilización del anión), es combinado -- con el carbón carbonilo del succinato, permitiendo la formación de un carbanión de glicina, produciéndose un ataque nucleofílico sobre el succinil CoA, esto es, que al formarse la base de -- Schiff con glicina activando la subsiguiente condensación al incrementar el carácter positivo del carbonil tiol éter de succinil CoA o por protección de la carga negativa del nucleófilo en trante.

Esto produce alfa (α) -amino-beta [β] -cetoadipídico como intermediario de la formación de ALA. El mono y el diésteres de este intermediario se incorporan con rapidez en el ALA, pero al ser inestable este sufre la descarboxilación hacia

ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA), la evolución del CO_2 - es paralela a la formación de ALA, este hallazgo indica o que no hay intermediario y si lo hay tiene una acción fugaz.

La última etapa de la reacción tiene lugar en la superficie de la enzima anterior a la liberación de ALA. Siendo esta reacción estereoespecífica. Durante la formación de un carbo - nión estable entre piridoxal fosfato y glicina, ha sido encontrado que el átomo de hidrógeno en el átomo de carbono metileno - con la configuración "R" esta específicamente perdido, evidencias del protón perdido, pero sin pérdida del grupo carboxilo. - La ALA producida en este reacción puede entonces por ligadura - a la superficie de la enzima, inhibir la actividad de la enzi - ma. La enzima es también sensible a la disponibilidad por activi - dad de compuestos sulfuro. Compuestos sulfhidrilo han sido en - contrados para inhibir la actividad de la enzima y esto puede - ser invertido por piridoxal fosfato, el cual forma una base de - Schiff con la enzima. También se ha observado que esta enzima, - que se encuentra en mamífero, es estimulada por EDTA e inhibida por metales bivalentes, siendo éstos capaces de estabilizar la - base de Schiff formada en la glicina y el fosfato de piridoxal - retardando la reacción con la succinil CoA.

Cualquier acumulación del hemo conduce a la disminu - ción en la velocidad de la síntesis de ALA, al contrario, si el hemo es removido por la unión con globina, se estimula la sínte - sis de ALA. En los mamíferos, ALA sintetasa es encontrada exclu - sivamente en mitocondrias.

2.3.2. Formación de porfobilinógeno (PBG).

Posteriormente en el citoplasma ocurre una segunda eta - pa, en la cual se produce la condensación de 2 moléculas de áci - do delta (δ) -aminolevulínico (ALA), esta reacción de deshidra

tación catalizada por la enzima ALA deshidrasa produce un derivado monopirrólico, el porfobilinógeno. Este acarrea cadenas laterales de ácido acético y ácido propiónico, en el anillo, la distribución de los residuos de glicina y del succinato. La enzima requiere grupos sulfhidrilos para su actividad y por lo tanto es inhibida por el plomo y estabilizada por el glutatión. La enzima se inhibe también con bajas concentraciones de grupos hemo (producto final), siendo una enzima reguladora de la síntesis del hemo.

La combinación de 2 moléculas de ALA para formar porfobilinógeno tiene lugar en una serie de eventos. En el primer paso, una molécula de ALA forma una base de Schiff por combinación directa de sus grupos ceto con un grupo amino de la enzima. Es seguido de un ataque nucleofílico por este anión intermediario sobre el carbono carbonílico de la segunda molécula de δ -aminolevulinato. El aldol resultante pierde los elementos del agua y el grupo amino libre de la segunda molécula del sustrato que desplaza el grupo amino de la enzima por la reacción trans-Schiff formando porfobilinógeno.

2.3.3. Transformación de 4 moles de porfobilinógeno a 1 mol de uroporfirina III, por medio de uroporfirinógeno I sintetasa y uroporfirinógeno III cosintetasa.

Todavía en el citoplasma, cuatro unidades de porfobilinógeno se condensan uniendo cabeza a cola para formar un tetrapirrol lineal que permanece unido a la enzima denominada uroporfirinógeno sintetasa, que por sí misma es inactiva. Este tetrapirrol lineal se cicla por pérdida de otro NH_4^+ . Esta enzima requiere una segunda enzima, llamada cosintetasa, para formar un polímero cíclico, uroporfirinógeno. Este y los 2 intermediarios siguientes en la vía no tienen el sistema de enlaces dobles con

jugados característicos de las porfirinas y se les conoce como porfobirinógenos.

Debido a que una de las unidades pirrólicas del uroporfirinógeno tiene 2 cadenas laterales diferentes (una de acetato y otra de propionato), hay 4 isómeros posibles de uroporfirinógeno, formándose sólo 2 isómeros: el isómero tipo I, en el que las unidades pirrólicas están condensadas cabeza con cola, y el isómero tipo III, que tiene una unidad de pirrol en la orientación opuesta. El hemo deriva del isómero tipo III.

Estas reacciones precisan de la acción de 2 enzimas:

a) La porfobilinógeno desaminasa denominada también uroporfirinógeno sintetasa.

Probablemente en presencia de uroporfirinógeno sintetasa, el porfobilinógeno (PBG) se convierte en un compuesto intermedio; por la ausencia de uroporfirinógeno cosintetasa, así-- ésta no es funcional, en este compuesto intermedio se produce una ciclación del tetrapirrol sin cambio de orden A y P (acetato y propionato), resultando uroporfirinógeno I, que es el isómero simétrico, este cromógeno menos coloreado puede sufrir una autooxidación para formar uno de los pigmentos urinarios, la uroporfirina I (es un compuesto que ocurre en condiciones patológicas, Porfiria) y sus compuestos relacionados produciendo grandes cantidades de porfirinas, o puede ser descarboxilado para originar coproporfirinógeno I, el -- cual a su vez puede ser oxidado a coproporfirina I. Pero si en el sistema hay suficiente cantidad de cosintetasa se formará uroporfirinógeno III.

b) La segunda enzima que interviene en la conversión de porfobilinógeno (PBG) a uroporfirinógeno III es la uroporfirinógeno isomerasa o uroporfirinógeno III cosintetasa, actuando --

con la porfobilinógeno (PBG) desaminasa.

El papel de la segunda enzima (es esencial en la isomerización de uno de los anillos pirroles), presenta más alta actividad que la primera, esto permite una inversión del anillo IV de la molécula porfirino para producir el uroporfirinógeno III asimétrico.

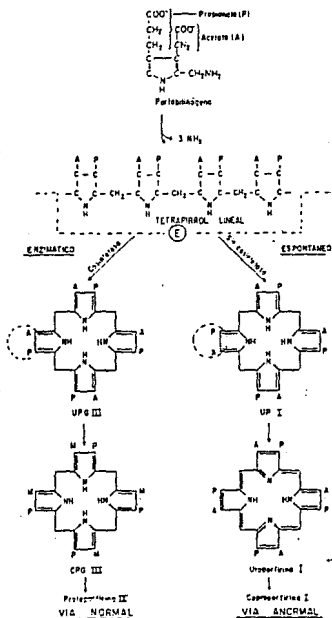
Si las cantidades variables de isomerasa a desaminasa no repercuten en el consumo de porfobilinógeno (PBG) a la acumulación total de uroporfirinógeno formado, la cantidad de isomerasa añadida determina el tipo de isómero III que sintetiza. Si en el sistema hay suficiente cantidad de cosintetasa, el tetrapirrol se condensará para formar pirrol y su comparación con el orden llamado en el uroporfirinógeno III indica que durante la reacción de ciclación la ordenación de los sustituyentes A y P (acetato y propionato) debe haber sido cambiada por lo menos en su localización.

Si la cosintetasa no es funcional, se produce una espontánea ciclación del tetrapirrol sin cambio en el orden A y P (acetato y propionato), del que resulta uroporfirinógeno I y sus compuestos relacionados.

Al no haber la primera enzima, la porfobilinógeno desaminasa, la uroporfirinógeno isomerasa no reacciona ni con el porfobilinógeno (PBG) ni con uroporfirinógeno I. Por cada puente metilénico formado se libera un ión amonio, el tetrapirrol lineal se cicla por pérdida de otro NH_4^+ . El producto ciclado es el uroporfirinógeno III que tiene disposición asimétrica de las cadenas laterales.

Según la especificidad de las enzimas que catalizan la última etapa, el cierre del anillo puede ocurrir mediante una

unión directa de los 2 extremos del tetrapirrol lineal o, acompañada por un desplazamiento de la unidad de tetrapirrol en el extremo no amínico a una posición diferente antes de cerrar el anillo. Esto último causa el ordenamiento de las cadenas laterales del pirrol, de una manera no alternante, es decir: A-P; -- A-P; A-P; P-A, en vez de A-P, A-P; A-P; A-P, se produce el isómero llamado uroporfirínógeno III. Este intermediario es la forma reducida (hexahidro) de la uroporfirina y difiere de la porfirina en que es incoloro, no fluorescente y no fotosensibilizante (se oxida fácilmente a porfirina en presencia de luz y O_2).



2.3.4. Uroporfirinógeno a coproporfirinógeno por la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa.

Una cuarta etapa en la cual la serie de cadenas laterales de acetilo correspondientes a los anillos I, II, III y IV se descarboxilan hasta grupos metílicos mediante la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa, Esta es activa con el uroporfirinógeno III y en los intermediarios subsiguientes que poseen de 5 a 7 grupos carboxilo, también convierte el isómero anormal -- uroporfirinógeno I, si está presente, a coproporfirinógeno I, pero a mucho más baja frecuencia que los isómeros tipo III.

En la etapa de formación de uroporfirinógeno, la estructura básica del porfirino ha sido producida y todos los desechos de hierro se insertan para formar los núcleos porfirinos. La primera de estas secuencias de descarboxilación es catalizada por la uroporfirinógeno descarboxilasa.

En esta secuencia 4 moles de carboxil se pierden de cada mole porfirino. Tomando el porfirino del octacarboxil uroporfirinógeno en sus cadenas laterales para formar grupos metilos, quedando un tetracarboxil en el coproporfirinógeno. Esta secuencia será seguida por la serie III y la serie I de isómeros de los porfirinos, pero a consecuencia del sustrato requerido -- la serie de isómero III, es descarboxilada más rápidamente que la serie del isómero I. Esta diferencia en grado de reacción de será ser trazada en la simetría del anillo IV, el cual podría efectivamente dar una reacción principal para el proceso catalizador de la uroporfirinógeno descarboxilasa; así la descarboxilación de la cadena del lado del primer ácido acético es más rápida. El proceso de descarboxilación de estas porfirinas comienza sobre el anillo IV y prosigue a través del anillo I, II y III para dar heptacarboxílico, hexacarboxílico y pentacarboxílico intermedio en la formación de coproporfirinógeno III. Como

parte de la secuencia de esta reacción es posible que en la etapa de pentacarboxil porfirino, uno de los lados de la cadena - propionato es descarboxilado y oxidado para un grupo de vinil - sobre el anillo I, probablemente por la enzima coproporfirinógeno no oxidasa. Este lado de la ramificación resulta en el isoproporfirinógeno en la serie de dehidroisoproporfirinógeno III de porfirinas, el primero es un deshidroisocoproporfirinógeno III, un problema asociado con esta secuencia es que mientras la uroporfirinógeno-descarboxilasa es una enzima soluble encontrada en el citoplasma, la próxima enzima patológica es mitocondrial. La única posible explicación es que a través de un daño de la enzima mitocondrial ha llegado a ser accesible hacia el porfirinógeno pentacarboxílico, tanto como el coproporfirinógeno III.

La configuración estereoquímica es mantenida durante el proceso de descarboxilación, la cual será consistente donde tomará lugar la reacción sobre la superficie de la enzima molecular. Esto fue mostrado por síntesis de un ejemplo de uroporfirinógeno III, en el cual la estereoquímica fue tal que la reacción de descarboxilación produjo residuos metilquiral.

2.3.5. Coproporfirinógeno III catalizada por coproporfirinógeno oxidasa.

En esta etapa de la secuencia de la reacción, una vez más se reencuentra a la mitocondria. La reacción es catalizada por una coproporfirinógeno oxidasa o coproporfirinógenasa, la cual requiere O_2 molecular para la actividad formando protoporfirinógeno, la enzima solamente actuará sobre el isómero III de Coproporfirinógeno y no sobre el isómero de la serie I (por lo cual, no ha sido identificado el protoporfirinógeno tipo I en materiales naturales).

Esta enzima lleva a cabo la descarboxilación oxidativa

de 2 cadenas propiónicas laterales o residuos propionílicos de los anillos I y II formando los grupos beta (β)-hidroxipropionato. La secuencia de la reacción es un paso en el cual se forma un intermediario que es monovinil porfirinógeno. Estudios han demostrado que esto es el 2-vinilporfirinógeno y el 4-vinilporfirinógeno (isoporfirinógeno). De estos 2 se ha demostrado que el isoporfirinógeno, es un sustrato mucho menos efectivo para la coproporfirinógeno oxidasa. El mecanismo entonces es -- que el coproporfirinógeno III es oxidantemente descarboxilado -- hacia el monovinilporfirinógeno (en el lugar de la enzima), en el cual el sitio de la configuración es tal que aceptará únicamente el grupo ácido 2-propiónico.

Esta molécula dará entonces una rotación en dirección-opuesta a las manecillas del reloj, así el segundo grupo propionato puede ser degradado en el mismo sitio de actividad de la superficie de la enzima. En esta etapa de la secuencia, algunos de los monovinilporfirinógenos pueden ser perdidos del sitio de la actividad y se acumularán, mientras que el alto índice de -- desechos de concentración de coproporfirinógenos por el sitio -- de actividad de la enzima. Estudios mecanísticos de la descarboxilación y de la secuencia de la oxidación han mostrado que únicamente una de las 2 uniones de hidrógeno beta (β) sobre la mitad del propionato, es pérdida.

2.3.6. Formación de protoporfirino III (IX) por protoporfirinógeno oxidasa.

La penúltima etapa de la secuencia biosintética es la oxidación o deshidrogenación del protoporfirinógeno a protoporfirino. Los grupos beta (β)-hidroxipropionato al ser descarboxilados y deshidratados, el residuo propionato en la segunda posición es oxidado a un grupo vinilo antes de alterarse la -- cuarta posición, así como la oxidación de los puentes metileno-

a puentes meteno en las posiciones alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ), formando el protoporfirinógeno el cual puede ocurrir espontáneamente, pero se cree que la oxidación del protoporfirinógeno en protoporfirina es catalizada por la protoporfirinógeno oxidasa, tras la sustracción de 6 átomos de hidrógeno. Esta oxidación genera el sistema de dobles ligaduras conjugadas característico de las porfirinas.

2.3.7. Formación del hemo por la ferroquelatasa.

El último paso biosintético de esta vía, catalizada por ferroquelatasa o hemosintetasa inserta un ión ferroso dentro del grupo del anillo tetrapirrólico porfirino para formar por quelación el grupo hemo o protohemo, la ferroquelatasa es una enzima mitocondrial, siendo atacada o asociándose a la membrana interna y es probable que la reducción del ión férrico a ión ferroso tenga lugar en este sitio.

No obstante que la reacción ocurre espontáneamente en una frecuencia baja en condiciones fisiológicas, es evidente -- que la reacción se cataliza IN VIVO por la ferroquelatasa. El ión férrico no se emplea por esta enzima y sólo el ácido dicarboxílico y porfirinas pueden servir como sustratos.

2.4. Regulación de síntesis de hemo.

Los pasos biosintéticos del hemo implican descarboxilaciones o aromatización, los cuales favorecen termodinámicamente, esta secuencia es unidireccional o irreversible, el mecanismo de control de estas vías unidireccionales son localizadas principalmente en el primer paso y en la relación con la síntesis del producto final.

Son varios factores los que intervienen: el ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) sintetasa y la coproporfirinóge-

no oxidasa aparecen en mitocondrias, mientras que las otras - aparecen en el citoplasma.

Los puntos de control son 2 enzimas que aparecen en -- las primeras etapas: el ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) sintetasa y el ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) deshidrasa mediante el mecanismo de retroalimentación.

El principal factor es la vía sintetasa que cataliza - la primera reacción, controla la velocidad de síntesis del hemo puesto que aparece en bajas concentraciones y ella misma es rápidamente metabolizada, utiliza la retroalimentación negativa, - o sea que el grupo hemo ejerce tanto control de retroalimentación, como de represión en el ácido delta (δ) -aminolevulínico sintetasa, sin embargo el ácido delta (δ) -aminolevulínico -- (ALA) deshidrasa es un segundo punto de control y se inhibe por el grupo hemo.

Hay diferencias en la regulación de la biosíntesis del hemo según los tejidos.

- a) En el hígado, el ácido delta (δ) -aminolevulínico sintetasa cataliza la reacción de formación del hemo, limitando el ritmo en condiciones fisiológicas. Las enzimas que siguen a el ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) sintetasa se encuentran en exceso. La regulación principal del ácido delta (δ) -aminolevulínico sintetasa es la represión por retroalimentación que ejerce el hemo como producto final. Las demandas - aumentadas de este último se cubren por medio de la síntesis del ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) sintetasa.
- b) En la médula ósea, el ácido delta (δ) -aminolevulínico sintetasa también es limitante del ritmo en las células que expresan por completo la síntesis del hemo, pero es poco lo -- que se sabe del papel de la enzima en la síntesis del hemo -

durante la división, la diferenciación y la maduración de las células eritroides. A medida que avanza dicha maduración, los núcleos y las mitocondrias se expulsan hacia el exterior, y desaparecen las enzimas mitocondriales de la síntesis del hemo, mientras persisten las enzimas del citosol que catalizan las reacciones en ácido delta (δ) -aminolevulínico y co proporfirinógeno. Por eso, los eritrocitos pueden utilizarse para el diagnóstico de las porfirias causadas por un defecto en una enzima del citosol.

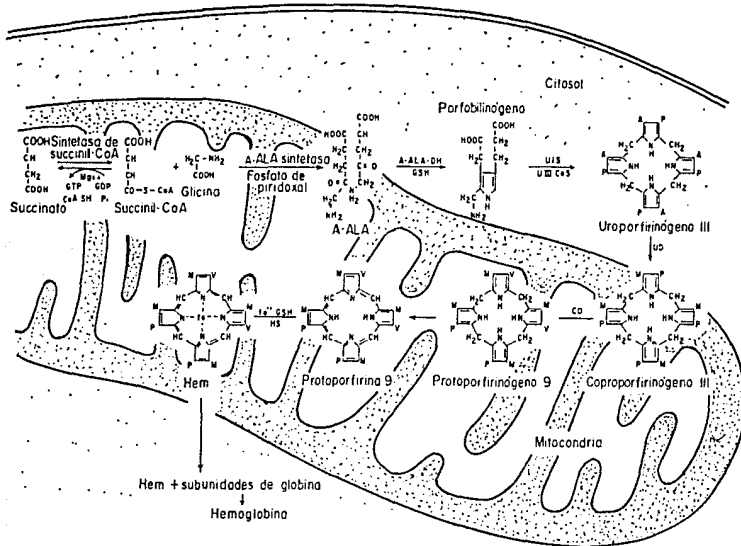
El control de la síntesis del hemo es distinta en la médula ósea y en el hígado. En este último órgano, el nivel de ácido delta (δ) -aminolevulínico (ALA) sintetasa es más importante de los determinantes en la formación del hemo, mientras que la síntesis de este último se desencadena en la médula ósea, por el proceso complejo de la diferenciación eritroide.

La PBG se emplea sólo para la formación de tetrapirroles teniendo un papel fisiológico.

En la última reacción el protohemo IX puede reaccionar con succinil CoA y glicina para formar ácido delta (δ) -aminolevulínico, por lo tanto, la protohemina es inhibidor por retro control de la secuencia completa de reacciones.

La protohemina se combina con la globina para formar hemoglobina producida en la médula ósea la cual es adecuada a las necesidades de los tejidos, el proceso puede ser detenido.

MEMBRANA CELULAR



BIOSINTESIS DEL HEM

CAPITULO III

MANIFESTACIONES CLINICAS.

Cuando se altera la síntesis del hemo, las consecuencias pueden ser graves por 2 razones:

- 1.- La producción insuficiente de hemo conduce a la anemia, y
- 2.- La acumulación de intermediarios de la vía es tóxica.

Las alteraciones de la producción del hemo, llamadas "porfirias", las cuales se caracterizan por la acumulación de intermediarios de la vía del hemo y los síntomas de cada tipo pueden comprenderse en términos de los compuestos que se acumulan.

La acumulación de delta (δ) -aminolevulinato y porfobilinógeno se asocia con el dolor abdominal, vómito, estreñimiento, anormalidades cardiovasculares y signos neuropsiquiátricos, aunque la base para estos síntomas no está definida.

Una acumulación de intermediarios de las porfirinas -- (uroporfirina I y III, coproporfirina I y III, de protoporfirina IX) lleva a un trastorno de fotosensibilidad que produce lesiones cutáneas. Debido a su sistema de enlaces dobles conjugados, las porfirinas absorben luz. Pueden perder la energía adicional conferida por la luz como fluorescencia o transferencia de energía al oxígeno molecular, produciendo por lo tanto una especie excitada que se denomina radical libre de oxígeno. Este es sumamente reactivo y lesiona por oxidación a los tejidos en los que es producido. El hemo también absorbe luz, pero debido a la presencia del átomo de hierro, pierde su energía adicional sin producir radicales libres de oxígeno.

Las porfirias se basan actualmente en el hecho de que-

ciertas formas clínicas parecen depender de la formación aumentada de porfirinas a nivel de hígado mientras que otras dependen de la médula ósea.

3.1. Porfirias hepáticas.

A las primeras se les conoce como hepáticas y se consideran 2 grupos:

a) El primero está constituido por cuadros que se expresan clínicamente por manifestaciones agudas y son:

- a) Porfiria Aguda Intermitente,
- b) Porfiria Variegata,
- c) Coproporfiria Hepática.

En éstas hay dolores con crisis abdominales y alteraciones neurológicas.

Los síntomas abdominales están presididos por el dolor, que puede ser continuo o cólico y extenderse por todo el abdomen o localizarse en zonas concretas, con el dolor suele haber vómitos, hay estreñimiento pertinaz. Con esto unido a posibles elevaciones de los leucocitos, con aparición de fiebre y taquicardia, en ocasiones se piensa en un abdomen quirúrgico. La crisis abdominal puede durar poco, días o semanas, llegando a alteraciones hidroelectrolíticas, conduce a insuficiencia renal con evolución fatal.

Las manifestaciones neurológicas son igualmente variables incluyendo alucinaciones, coma, disfunción hipotalámica, retención urinaria y parálisis del nervio craneal aunque menos visible algunas veces el comportamiento es maniaco depresivo -- esquizofrénico; estos trastornos son el resultado de las elevaciones intensas de los compuestos precursores de las porfirinas (ALA y PBG).

La enfermedad latente puede convertirse en padecimiento manifiesto por 4 factores exógenos: medicamentos, esteroides, inanición como el stress y la infección.

Las manifestaciones abdominales pueden presentarse aisladamente o más comúnmente después a los días sucesivos del cuadro neurológico; en otros las alteraciones de comienzo son las neurológicas, asociadas generalmente a trastornos psicóticos.

Durante los ataques graves algunos enfermos son incapaces de hablar, respirar o deglutir.

a) *Porfiria Intermitente Aguda*. - Su defecto consiste en la deficiencia de la enzima desaminasa de porfobilinógeno.*

Presenta las manifestaciones antes descritas, se caracteriza por ataques recurrentes de la disfunción neurológica y psiquiátrica. No presenta fotosensibilización.

b) *Porfiria Variegata*. - Además de causar los síntomas abdominales y neuropsiquiátricos muestran fotosensibilidad de la piel expuesta a la luz solar con poca resistencia a los traumatismos, sus lesiones suelen ser polimorfas con erosiones, vesículas, ampollas, formación de úlceras o de cicatrices interiores poco pigmentadas o despigmentadas; significando que estos enfermos deben tener porfirinas sensibles a la luz en la sangre circulante, además de ALA y PBG. La lesión enzimática en la biosíntesis del hemo es una deficiencia de oxidasa de proto-porfirinógeno.

c) *Coproporfiria Hereditaria*. - El síntoma más persistente es el dolor abdominal, vómitos, parálisis y síntomas psicológicos son menos frecuentes, los trastornos neurológicos son en forma de parálisis periférica. Se distingue de las demás --

porfirias debido a la deficiencia enzimática de coproporfirinógeno oxidasa. Algunos enfermos muestran erupción en la piel fotosensitiva, la cual es descrita con gran cantidad de coproporfirina circulante en exceso en orina y heces. Puede estar acompañado de ictericia.

b) En el segundo grupo se incluye la llamada:

Porfiria Hepática Cutánea Tarda. - Cuyo curso clínico - suele ser crónico no apareciendo la mayor parte con incidencia familiar, Esta no presenta síntomas abdominales o neuropsiquiátricos de las otras porfirias hepáticas, las manifestaciones mayores se encuentran en la piel, siendo la fotosensibilidad el dato clínico principal; pueden presentarse todos los grados desde el eritema benigno hasta una formación de ampollas, hiperpigmentación, escleroderma, escaras e hipertrichosis, producen inclusive calcificación local, estas lesiones no tienen carácter mutilante.

Presencia frecuente de hepatopatía y siderosis hepática es casi constante, aunque el grado de depósito de hierro es variable. En este tipo de porfiria hay mayor incidencia de diabetes.

El probable trastorno lo causa la deficiencia de des-carboxilasa de uroporfirinógeno a nivel de hígado.

3.2. Porfirias a nivel de Médula Ósea.

En las segundas o de tipo óseo se incluyen 2 enfermedades:

- a) *Porfiria Eritropoyética Congénita, y*
- b) *Protoporfiria Eritropoyética.*

Se caracterizan porque la producción aumentada de por-

firinas se realizan principalmente en la médula ósea, lo que explica las altas concentraciones que, por fluorescencia o método químicos, se pueden demostrar en médula y hematíes.

Las manifestaciones clínicas comunes en este grupo de porfirias corresponden a trastornos dérmicos por fotosensibilización, provocando un acúmulo de porfirinas, sobre todo uroporfirinas en las estructuras cutáneas. Tales manifestaciones también se encuentran en algunas formas de porfirias hepáticas con síntomas cutáneos dominantes como Porfiria Cutánea Tarda que es un trastorno adquirido.

El fenómeno de fotosensibilidad, se cree, que implica una síntesis alterada de uroporfirinógeno III cosintetasa implicando una producción excesiva de uroporfirinógeno I a partir del porfobilinógeno, por lo tanto el uroporfirinógeno I no puede formar protoporfirina y hemo, pero forma los pigmentos rojos uroporfirina I y coproporfirina I, estos compuestos cuando se exponen a la luz, desencadenan fenómenos locales de ionización, fluorescencia o transmisión de energía a otras moléculas, activando las reacciones químicas que dan lugar a la liberación de peróxidos libres, capaces de oxidar y lesionar estructuras celulares, determinando la liberación de enzimas lisosómicas o de sustancias vasoactivas como la histamina, por estos mecanismos generales se producen las lesiones de la piel (máculas, pápulas vesículas, bullas, etc.) debido a su variedad se denominan foto dermatitis polimorfa.

a) Porfiria Eritropoyética Congénita. Hay deficiencia de uroporfirinógeno cosintetasa. El síntoma principal es la fotosensibilidad.

Las áreas expuestas a la luz solar desarrollan con cierta agudeza, lesiones en forma de vesículas o bullas, que

con facilidad pueden ulcerarse y cicatrizándose posteriormente, - las cuales llegan a producir deformidades sobre todo en la cara, así como mutilaciones - a nivel de orejas, dedos, destrucción de los cartilagos nasales, así como hipertrichosis en cara y extremidades. Hay eritrodoncia, los dientes pierden su color tornándose con tinte rosado o marrón, debido al depósito local de uroporfirinas, que tienden a depositarse en los huesos, uniéndose al fosfato cálcico, explicando la fluorescencia de estas estructuras a la luz ultravioleta.

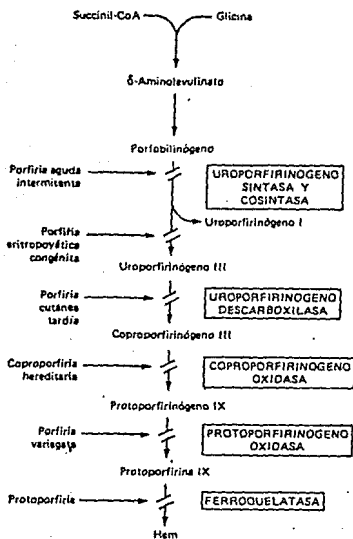
Hay anemia hemolítica, que a veces está compensada por la médula ósea, permitiendo los signos de hemólisis aumentada. - Secundariamente a estos trastornos los enfermos suelen tener -- esplenomegalia y en ocasión discreta ictericia. Puede influir en la anemia un fenómeno de eritropoyesis ineficaz asociado al hemolítico. La causa de ambos reside en el acúmulo de porfirinas -- en la población celular de la serie roja, no aclarándose aún el mecanismo.

b) Porfiria Eritropoyética. Se caracteriza por elevación de la protoporfirina en los hematíes, plasma y en heces, -- mientras que la excreción en la orina es normal.

Hay lesiones dérmicas por fotosensibilidad, en partes descubiertas aparece sensación de quemadura, seguida de prurito y dolor, observándose eritema y edema locales, asemejando a lesión urticaria. No son frecuentes las lesiones vesiculosas, ni la formación de úlcera o cicatrices. La reiteración de brotes de termina el desarrollo de edema y empastamiento crónico, que adquiere color grisáceo sobre el cual aparecen lesiones erosivo -- costrosas. El hirsutismo y la hiperpigmentación son también poco frecuentes y no produce la fluorescencia de los dientes.

En algunos enfermos se ha visto la asociación con colélitiasis, y en los cálculos biliares se ha comprobado altos nive

les de protoporfirina, excretándose sólo por la bilis, se puede depositar en hígado y determinar alteraciones, a veces graves, - con cuadro similar de una hepatitis o cirrosis, encontrándose - en estos, depósitos masivos de protoporfirina. No hay crisis -- neuropsiquiátrica. Es frecuente una ligera anemia.



Las porfirias hereditarias son causadas por deficiencias parciales de las enzimas requeridas para la biosíntesis del hem

CAPITULO IV

DIAGNOSTICO.

En el estudio de la diferenciación de porfirinas en condiciones con características similares clínicas, para determinar los tipos de porfiria y para detectar porfirias latentes en familias.

Los 3 tipos de muestras son de interés primordial en el diagnóstico de porfiria: eritrocitos, orina y heces.

4.1 . Porfirias de Tipo Agudo.

Los 3 desórdenes que se presentan Porfiria Aguda son:

- a) Porfiria Aguda Intermitente,
- b) Porfiria Variegata,
- c) Coproporfiria Hereditaria.

Estas necesitan ser diferenciadas con rapidez de condiciones más comunes con similares características clínicas.

Se sospecha el diagnóstico al notar que la orina fresca ácida (la observación de uroporfirina es ligera o nula) tiene un aspecto normal, pero su concentración aumenta con el tiempo obscureciéndose en reposo a medida que el porfobilinógeno incoloro se convierte en porfina roja y uroporfirina por polimerización. La cual presenta una coloración pardorrojiza a roja.

El diagnóstico se basa en las concentraciones urinarias elevadas de PBG en las pruebas de detección (cualitativas) de PBG, como la de Watson-Swartz o Hoesch. Una prueba negativa para el PBG excluye el diagnóstico de Porfiria Aguda en un paciente con dolor abdominal. Un resultado con cualquiera de es -

tas 2 pruebas ayuda pero no prueba un diagnóstico de Porfiria Aguda, pero ocasionalmente ocurren falsos positivos.

Aunque todas las pruebas de laboratorio positivas de -- ben ser confirmadas por métodos cuantitativos de PBG como el -- método cromatográfico, preferentemente de la misma muestra de -- orina. Si el ALA urinario es también medido la concentración se -- rá menor que el PBG.

Ya que sus valores aparecen elevados en las 3 porfi -- rias en ataques sistémicos agudos, este diagnóstico sólo sirve -- para saber que se trata de una porfiria con ataques agudos.

Si un enfermo que se cree con porfiria tiene un aumen -- to de excreción de PBG, la estimación de porfiria urinaria son -- de poco valor para determinar el tipo de porfiria.

La segunda prueba esencial en este grupo de enfermos -- es en heces y orina para saber el exceso de porfirina. Los pa -- cientes con porfiria aguda frecuentemente son estreñidos no ob -- teniendo mucha muestra, si ésta resulta positiva, la concentra -- ción de porfirina debe medirse, ya sea por técnicas de porcio -- nes de solvente o cromatográficas en capa delgada.

a) Porfiria Intermitente Aguda. En pacientes con un -- aumento de excreción urinaria de PBG positiva.

Una prueba negativa, normal o elevada de concentración -- de porfirina fecal establece el diagnóstico.

Los pacientes con enfermedad latente muchas veces no -- excretan bastante PBG y ALA; ambas pueden ser negativas, para -- poder reconocerse con técnicas habituales, en estos casos debe -- medirse cuantitativamente por cromatografía la eliminación uni -- naria de ALA y PBG.

Las porfirinas fecales pueden estar ligera o moderadamente aumentadas, pero no hasta el grado que se encuentra en -- asociación a la Porfiria Variegata y Coproporfirina Hereditaria.

Los resultados de la función hepática usualmente están dentro de los límites normales, excepto aquellos de la prueba de retención aumentada de bromosulfateína (BSF), las anomalías metabólicas incluyen hipercolesterolemia con aumento de los niveles de lipoproteínas de baja densidad, con frecuencia aumenta el yodo unido a proteínas y el yodo total de tiroxina. La -- globulina fijadora de tiroxina está elevada. La hemopexina, proteína plasmática que fija el hemo, aparece elevada y su concentración aumenta en brotes agudos.

b) Porfiria Variegata. La característica del diagnóstico es el exceso de excreción fecal de coproporfirina y mayormente de protoporfirinas. Además estos enfermos excretan cantidades excesivas de una porfirina dicarboxílica hidrofílica, conjugada con un péptido (porfirina X) que constituye un hallazgo característico en orina y heces de estos enfermos. En ésta los niveles urinarios de ALA y PBG vuelven a la normalidad unas pocas semanas después del ataque aunque siguen los síntomas neurológicos.

En síntomas cutáneos se demuestra una elevación de la uro y coproporfirinas urinarias, pero estos signos se pueden -- confundir con los de la PCT. La hiperexcreción fecal de protoporfirina que es propia de PV permite diferenciar estos 2 trastornos. Los niveles de protoporfirina superan a los de coproporfirina, situación exactamente inversa a la que sucede en la CH.

c) Coproporfirina Hereditaria. - Se distingue de las demás porfirias, debido a que al estar disminuido el contenido de la coproporfirinógeno oxidasa, aumenta la excreción fecal de --

coproporfirina III, y en menor grado en la orina. Esta aumentada la eliminación de ALA y PBG, pero suele normalizarse durante las remisiones.

En las CH se incrementa la coproporfirina fecal mientras que la concentración de protoporfirina es normal o cerca de normal.

4.2. Porfirias con lesiones específicas en la piel.

Un número de diferentes tipos de porfiria pueden presentarse en esta vía, en el cual la Protoporfirina Cutánea Tarda (PCT) y Protoporfirina (PP) son las más frecuentes. Inicialmente, hubo pruebas de eritrocitos y orina con exceso de porfirinas.

a) Porfiria Cutánea Tarda. Como en las otras porfirias al principio se observa orina roja o pardosa. Esta contiene -- gran cantidad de uroporfirinas I y III y coproporfirinas, pero más concentradas son las uroporfirinas.

El ALA puede aumentar ligeramente, pero la excreción de PBG es normal o, rara vez, aumentada (pruebas de Watson-Schwartz o de Hoesch, negativas).

Puede haber grados leves de ictericia y elevaciones entre leves y moderadas de los niveles séricos de transaminasas.

Cuando sobrevienen los síntomas cutáneos, estos trastornos pueden ir unidos a una hiperexcreción de la primer substancia supera a la segunda, mientras que en la PV sucede generalmente lo contrario. En cambio durante los accesos agudos de la última afección, la uroporfirina urinaria suele rebasar con mucho a la coproporfirina.

Las elevadas concentraciones fecales de protoporfirina

que son propias de la PCT permiten diferenciar estos 2 trastornos.

Este defecto en el hígado puede permanecer latente hasta que sea activado por una herida sobrepuesta del hígado o siderosis hepática por consumo excesivo de alcohol, cirrosis y algunas veces por estrógenos.

4.3. Estudios en Sangre Periférica.

a) Porfiria Intermitente Aguda.- Su demostración se basa en la disminución de la uroporfirinógeno I sintetasa en el eritrocito.

Generalmente, los resultados de las mediciones hematólogicas de rutina están dentro de los límites normales, aparte de la leucocitosis neutrófila moderada en ataques agudos, hallazgo que puede evaluar la impresión errónea de una infección. Hay anemia normocítica normocrómica con mayor frecuencia, la masa de glóbulos rojos está reducida, aunque el hematocrito es normal. Se sugiere que la masa de glóbulos rojos resulta de la disminución de la eritropoyesis efectiva.

En la sangre la urea es a menudo incrementada durante y por algunos meses del ataque agudo unión de la proteína ligada puede ser elevada y el hipertiroidismo puede ser precipitado.

La medición enzimática de biosíntesis de hemo en sangre periférica no es de ayuda en una situación aguda.

En la PIA latente, con eliminación normal de AIA y PBG se puede establecer el diagnóstico midiendo la actividad de la desaminasa de porfobilinógeno en los eritrocitos, linfocitos o fibroblastos obtenidos de cultivo de piel. Sin embargo, hay una superposición entre las actividades de la enzima en los eritro-

citos de pacientes normales y en pacientes de PIA, y no siempre es posible realizar un diagnóstico definitivo.

b) *Porfiria Variegata*. - Las porfirinas de los eritrocitos son normales, lo cual permite diferenciarla de la protoporfirina. Hay exceso de ALA y PBG en suero.

c) *Coproporfiria Hereditaria*. Uro, PBG y ALA porfirina de célula roja son normales. El defecto enzimático es una disminución en la oxidasa de coproporfirinógeno, puede demostrarse en eritrocitos. No hay complicación con las células eritroides.

d) *Porfiria Cutánea Tarda*. A menudo, la concentración de hierro sérico está aumentada (saturación de transferrina), - así como de siderosis del hígado y médula ósea. No hay complicación en células eritroides.

Un método de diagnóstico, todavía no generalizado, que contribuye a detectar la PCT se refiere a la disminución de la uroporfirinodescarboxilasa en el eritrocito.

4.4. Porfirias en Médula Ósea.

a) *Porfiria Eritropoyética Congénita*. - Los hallazgos clínicos son:

a) *Orina roja*. - Aparición de uroporfirina I en grandes cantidades en la orina, puede haber también un aumento de la -- excreción urinaria de uroporfirina III y coproporfirina I pero en menor grado. La excreción urinaria de ALA y PBG es normal.

En las heces, la coproporfirina I aumenta mucho, también la uroporfirina, pero en menor grado.

Tanto en la orina como en las heces, hay un predominio de isómeros tipo I. El exceso de uroporfirina I y coproporfirina I, se produce probablemente en la médula ósea y se deposita en órganos. Estas porfirinas acumuladas en las células sanguí-

neas rojas, son liberadas en la sangre y excretadas en la orina y materia fecal.

El tipo protoporfirínico no muestra aumento en las porfirinas urinarias, sino una elevación en la cantidad de protoporfirina en las heces y globulos rojos.

En general es posible demostrar la existencia en el suero de uroporfirinas y coproporfirinas de tipo I.

b) Fotosensibilidad.- El signo importante en esta enfermedad es la sensibilidad a la luz, las áreas del cuerpo que son expuestas a la luz se necrosan y se deforman por la cicatrices.

Esta fotosensibilidad se explica por la producción excesiva de uro y coproporfirinógeno I, seguida de hemólisis aumentando la fotosensibilidad (fotohemólisis), ya que la estimulación de la eritropoyesis que produce, también incrementa la producción de porfirina, la cual da como resultado una alta concentración de éstas en la sangre y su liberación en cantidades excesivas con acumulación bajo la piel.

En extensiones de médula ósea por microscopia de fluorescencia muestran normoblastos fluorescentes (con núcleo muy notable). En sangre periférica se observa fluorescencia en algunos de los hematíes circulantes.

Las porfirinas son agentes fotosensibilizantes debido a su capacidad de concentrar energía radiante por absorción, especialmente en la longitud de onda de la banda Soret (405 nm) así como las longitudes de onda de los rayos infrarrojos (2600 nm).

La presencia de porfirinas cerca de la superficie corporal, como sucede en la porfiria eritropoyética, permite que--

ocurra la sensibilización a la luz; esto es a diferencia de las circunstancias que prevalecen en porfiria hepática, donde la -- acumulación de porfirinas tiene lugar en las áreas del cuerpo -- que no están expuestas a la luz, ya que en el hígado lo está li geramente y sólo en forma secundaria.

Si la eritrodoncia no es evidente, se busca fluorescencia roja en los dientes mediante examen con luz ultravioleta -- (lámpara de Wood).

c).- Anemia.- Se presenta en la sangre en la mayoría -- de los casos, pero puede ser leve o severa, es de tipo hemolíti ca con reticulocitosis y la presencia de normoblastos en la san gre. Tanto los normoblastos como los reticulocitos y los eritro citos contienen grandes cantidades de uroporfirina I y concen traciones más bajas de coproporfirinógeno I. La protoporfirina es incrementada.

La anemia va acompañada de hiperplasia normoblastica.- Más del 90% de los pacientes sufren de anemia normocítica y nor mocrómica generalmente leve.

La destrucción de glóbulos rojos puede deberse a foto hemolisis, por su mayor contenido de uroporfirina y coproporfirina I.

En los frotis de sangre se pueden encontrar cuerpos -- de Howell-Jolly y siderocitos. Puede haber poiquilocitosis, anisocitosis y policromatofilia. Los normoblastos muestran fluorescencia roja intensa en el núcleo, en los reticulocitos, la fluo rescencia es menos pronunciada.

El resultado es que grandes cantidades de PBG se trans forman en isómeros tipo I. Cuando las células maduras de manera normal, la isomerasa es capaz de manejar el PBG sintetizado más

gradualmente, y se producen pocos isómeros de tipo I. Los normoblastos de esta línea celular relativamente normal no muestran fluorescencia nuclear, y los glóbulos rojos a que dan lugar no sufren hemólisis.

B) *Protoporfiria Eritropoyética*. - En esta enfermedad - pueden distinguirse 3 perfiles químicos.

- a) Elevación de protoporfirina fecal y la eritrocítica libre.
- b) Elevación de la segunda sin que aparezca aumentada la primera.
- c) Elevación de protoporfirina fecal sin que aumente la eritrocítica libre.

El tercer perfil es poco común observándose sólo en familiares asintomáticos. De los otros 2, el primero es menos frecuente que el segundo.

Son normales las excreciones urinarias de ALA, PBG, -- uroporfirinas, hallazgo único entre las porfirias, excepto cuando un proceso de hígado ocurre como un evento terminal. La coproporfirina fecal puede ser alta o normal.

La lesión enzimática provoca una intensa disminución de la ferroquelatasa en las células de la médula ósea, reticulocitos, hígado y fibroblastos. Causando una acumulación de protoporfirina IX en células eritroides.

Por lo tanto la PP se diagnostica al descubrir concentraciones altas de protoporfirina en los eritrocitos, con microscopio de fluorescencia se observa un gran número de eritrocitos con fluorescencia roja, en ocasiones se observa que se hemolizan si se expone a la luz ultravioleta una fina capa de sangre.

4.5. Anemias Asociadas a Las Porfirias.

Dentro de los defectos de la síntesis del hemo; se encuentran asociadas las porfirias, anemia ferropénica, anemia sideroblástica y algunas anemias sintomáticas, así como anemia hemolítica.

En las anemias debidas a la alteración de la fase de diferenciación, la cual lleva a término la síntesis de la hemoglobina, donde la anemia puede ser la consecuencia de un defecto en la formación del grupo hemo o de la globina. La más frecuente pertenece a la primera de estas 2 categorías, siendo el prototipo de las anemias hipocrómicas-microcíticas. La anemia que acompaña a las porfirias y el grupo de las anemias sideroblásticas se caracterizan por un inadecuado aprovechamiento del hierro, con el consiguiente defecto de la síntesis del hemo; puede ser sólo visible en un grupo o población de hemates, mientras que el resto es normocrómico.

a) Anemia Ferropénica.- Anemia ligada a las porfirias por deficiencia de hierro, se considera dentro de las hipocrómicas, inicialmente sin alteración en el tamaño de eritrocito; y si persiste la deficiencia, se convierte en microcítica hipocrómica. En la clasificación fisiopatológica, se encuentra el grupo de las anemias con alteración en la síntesis de hemoglobina.

Tienen cierto grado de anisocitosis, poiquilocitosis y presencia de dianocitos y eliptocitos, anisocitos, células en forma de lágrima, linfocitos (hay dimorfismo en las células en mixto o de 2 orígenes o bigeminada, glóbulos grandes o chicos). La cifra de reticulocitos suele ser baja. Las cifras de plaquetas y de leucocitos no está influida por el grado de ferropenia, pero si lo puede estar por la causa etiológica de la misma. Con frecuencia puede encontrarse una moderada leucotrombopenia.

La deficiencia de hierro generalmente no produce síntomas hasta que aparece anemia con descenso en la concentración de hemoglobina y en el hematócrito. La microcitosis y la hipocromía son alteraciones eritrocíticas clásicas de la deficiencia de hierro, que pueden detectarse con facilidad mediante los modernos contadores electrónicos de hematies. La disminución del tamaño eritrocitario [volumen corpuscular medio] menor de 80, es paralela al descenso en el contenido hemoglobínico de los hematies [hemoglobina corpuscular media], menor de 27. Se encuentran anomalías similares en la anemia de las enfermedades crónicas, en la talasemia y en la anemia sideroblástica.

En la extensión sanguínea pueden observarse hematies microcíticas, hipocrómicas y alargadas. Los cambios apreciados en la anemia de las enfermedades crónicas son similares, pero en general menos importantes. Un grado más notable de hipocromía, así como el punteado basófilo, son típicos de la betatalasemia. En la anemia sideroblástica se halla habitualmente un cuadro más amplio y es clásico el hallazgo de 2 poblaciones eritrocitarias, una hipocrómica y otra normocrómica.

Se confirma con determinación de Fe sérico y capacidad de captación de Fe . Como otras pruebas de hierro corporal, pruebas de quelación, concentración sérica de ferritina, protoporfirina eritrocitaria libre (PEL).

b) Anemia Sideroblástica.- Su diagnóstico depende de demostrar sideroblastos en anillo en la médula ósea. Se encuentran eritrocitos hipocrómicos y microcíticos, aunque los índices eritrocíticos sean normales. Los siderocitos aumentan también con anemia hemolítica severa.

Los sideroblastos anulares son normoblastos que contienen depósitos de hierro en las mitocondrias. Los anillos parcia-

les o complemento de gránulos que se tiñen con azul de Prusia - tienen una distribución perinuclear de estas mitocondrias cargadas de hierro. En estas anemias se han observado muchas anomalías metabólicas, como defectos en uno o más pasos enzimáticos que intervienen en la síntesis del hemo. Como los pasos iniciales y terminales de la síntesis de porfirinas y hemo se localizan dentro de las mitocondrias, es difícil determinar si estas anomalías son la causa o resultado de la carga de hierro existente en las mitocondrias.

Además de la presencia de sideroblastos anulares en la médula ósea, se presentan otras características: una población de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos en el frotis de sangre periférica debido a un defecto en la síntesis de hemo; hiperplasia eritroide en médula ósea como resultado de la eritropoyesis ineficaz; aumento en la concentración de porfirinas eritrocíticas; aumento considerable del hierro sérico y la saturación de transferrina que con frecuencia se acompaña de síntomas de sobrecarga generalizada de hierro.

c) Anemia Hemolítica. La evaluación inicial se hace a través de la cuenta de reticulocitos, que suele ser intensa. -- Los esferocitos constituyen la anomalía morfológica común. -- Para su estudio se hacen pruebas en frotis sanguíneo y se encuentra policromatofilia; cuenta de reticulocitos aumentada; hiperplasia eritroide en examen de médula ósea.

Varias pruebas séricas son útiles para establecer la presencia de hemólisis entre ellas, bilirrubina, haptoglobina, hemopexina, hemoglobina plasmática, deshidrogenasa láctica.

4.6. Diagnóstico diferencial de Anemia Ferropénica.

La existencia de anemia microcítica e hipocrómica no -

implica necesariamente una deficiencia férrica, ya que estos rasgos morfométricos pueden ser debido a "defectos de utilización" del hierro por procesos patológicos diversos.

El diagnóstico diferencial de las anemias ferropénicas debe hacerse con: hemoglobinopatías, fundamentalmente síndromes talasémicos heterocigotos; anemias sideroblásticas y anemias de las enfermedades crónicas, las anemias hemolíticas y aplásica.

El diagnóstico es fácil establecerlo frente a anemias macrocitarias, aplasia medular que se encuentra en la mayoría de las anemias hemolíticas.

a) En las enfermedades hepáticas, aunque puede haber imagen similar en la sangre periférica, tanto la determinación de hierro sérico como los depósitos en la médula ósea son normales.

b) En los procesos hemolíticos, la poiquilocitosis -- acentuada, la policromatofilia, así como la basofilia difusa -- son características de estas enfermedades, así como los demás caracteres morfológicos de la hemolisis no se encuentran habitualmente en la anemia ferropénica, pero en ocasiones la hemoglobina inestable puede dar una hipocromía importante, que obliga a diferenciar de una anemia ferropénica; será el dato de los reticulocitos aumentados, que suele ser manifiesta en trastornos hemolíticos, mientras que es nula o mínima en la anemia ferropénica, así como la determinación de hierro sérico normal, -- lo que ayuda para determinar un proceso hemolítico junto con -- los estudios de bilirrubinas séricas, deshidrogenasa láctica, hemoglobina libre en suero y elevación de metahemalbúmina y disminución de haptoglobinas.

c) Sin embargo, puede ser difícil el diagnóstico diferencial con la talasemia menor, que suele cursar con microcito-

sis o hipocromía, características morfológicas hemáticas similares a la ferropénica. En este caso la cifra de sideremia nos dará la clave, ya que está habitualmente alta en talasemia; al revés de lo que ocurre en la anemia ferropénica. En caso de duda será preciso acudir al estudio electroforético de la hemoglobina, ya que en la talasemia menor mostrará altas cifras de HbA_2 .

No obstante, enfermos con talasemia menor el recuento eritrocitario es superior a los 5,000,000/ML, a pesar de la baja concentración hemoglobínica. Por el contrario, solamente un 3% de los adultos con anemia por déficit de hierro tienen recuentos eritrocitarios de 5,000,000/ML o más.

El volumen corpuscular medio (VCM) está casi siempre reducido en la talasemia menor, valores aún más bajos se ven solamente en la anemia por déficit de hierro.

La reticulocitosis de grado ligero es más probable encontrarla en la talasemia menor que en la anemia por déficit de hierro, aunque puede faltar en estos trastornos. Lo mismo se aplica a la policromatofilia y al punteado basófilo. Por el contrario, la sideremia es usualmente normal o aumentada en estos síndromes de talasemia menor y es generalmente baja en la anemia ferropénica. Análogamente, el examen de las reservas de hierro de la médula ayudará a diferenciar estos trastornos.

En los síndromes talasanémicos existe un trastorno cuantitativo en la formación de las cadenas de la hemoglobina y aún cuando exista intensa microcitosis o hipocromía, el hierro sérico y de depósito es normal o elevado. En los resultados de la electroforesis de la hemoglobina, se observa elevación de hemoglobina A_2 y de hemoglobina fetal.

d) También hay que plantear el diagnóstico diferencial

de la anemia ferropénica con la anemia sideroblástica, que cursa también con microcitosis e hipocromía por mala utilización del hierro; pero en este caso hay hipersideremia y los depósitos de hierro están elevados, así como la tasa de saturación de transferrina.

Las anemias sideroblásticas pueden ser congénitas o adquiridas. Ambas se expresan morfológicamente por la existencia en sangre periférica de una doble población eritrocitaria, una microcítica e hipocrómica, y otra macrocítica y normocrómica. De la prevalencia de una u otra población resultarán parámetros eritrocitarios VCM, HCM y CHCM.

El rasgo morfológico fundamental que caracteriza a las anemias sideroblásticas, debido a un defecto intraeritrocitario de las síntesis del hemo, es el depósito patológico del hierro a nivel mitocondrial, puesto de manifiesto por la tinción de azul de Prusia en la típica imagen de sideroblastos en anillo y aún mejor por microscopía electrónica.

En la anemia sideroblástica (con acumulación de hierro) en los hallazgos en la sangre periférica los reticulocitos están disminuidos o ausentes, el hierro sérico es normal o aumentado en los depósitos de la médula ósea existe elevación de la hem siderina que, en ocasiones, muestra una distribución rodeando en forma de anillo, el núcleo de los eritroblastos.

El diagnóstico requiere efectuar la tinción de hierro-medular que pone de manifiesto un aumento de la cantidad de hem siderina en estos trastornos.

e) Los procesos infecciosos o inflamatorios crónicos, así como algunas enfermedades neoplásicas (por ejemplo: Hodgkin, etc.) pueden cursar con anemia hipocrómica y microcítica, gene-

ralmente de moderada intensidad, la cual se acompaña de una disminución de hierro sérico y de la saturación de la transferrina; sin embargo, la tinción medular del hierro pone de manifiesto una normal o moderada cantidad del hierro de depósito y un número bajo de sideroblastos, lo que parece indicar un defecto en la utilización del hierro desde el SRE a la eritropoyesis (sideroacresia).

Estos trastornos no se pueden distinguir de la anemia ferropénica sólo mediante examen de la sangre periférica, la siderosis suele estar disminuida y algunas veces esta hiposideremia es muy grave.

La medida de concentración de hierro sérico y la TIBC ayudan a establecer el diagnóstico diferencial.

f) La anemia de las enfermedades crónicas, aunque habitualmente es normocítica normocrómica, en una tercera parte se presenta como microcítica hipocrómica con frecuentes células en diana; de igual manera se puede alterar el hierro sérico y la saturación de transferrina, por lo que en ocasiones es necesario determinar los depósitos de hemosiderina en médula ósea, -- los cuales están conservados o aumentados, ya que este proceso debe sobre todo a una alteración de la eritropoyesis mediana probablemente por macrófagos activados.

g) La anemia de las porfirinas suele ser hipocrómica, pero cursa con hipersideremia y depósitos de hierro aumentados, lo mismo ocurre con la anemia del saturnismo.

CAPITULO V

METODOLOGIA

Durante los últimos años la investigación de las porfirias se ha venido transformando por la introducción de rápidas técnicas para su determinación y el empleo de métodos de medición de las enzimas de la biosíntesis del hemo, así como su asociación con diversas patologías; una variedad de métodos de laboratorio de uso corriente pueden ser usadas para confirmar su presumible diagnóstico clínico de la porfiria.

Aunque las porfirinas son razonablemente estables en una solución, al ser expuestas a la luz fuerte debe ser evitada y todos los solventes deben estar especialmente libres de peróxido.

Pruebas utilizadas para su identificación.

Prueba selectiva para uroporfirinas, LUZ DE WOOD -- (Luz Ultravioleta). El porfobilinógeno (PBG) es un inestable, incoloro, monopirrol, el cual polimeriza bajo condiciones ácidas y calor para formar uroporfirina fluorescente. No se ve siempre el pigmento rojo púrpura en la orina, ya que los porfirinógenos pueden estar presentes sin que se produzca cambio de color. A menudo se observa una fluorescencia rojo-naranja debido a la presencia de porfirinas, si la muestra se coloca bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga (entre 320 y 400 nm) en cuanto obscuro.

Selección rápida o prueba cualitativa de Watson-Swartz. Esta detecta el PBG urinario. Se lleva a cabo en un volumen del reactivo de Earlich, consistente en p-dimetilaminobenzaldehído gradualmente reactivado y coloreado, dando un producto (crista-

les) incoloro o un color ténue amarillo. La reacción de Earlich en medio ácido con el grupo pirrol presente en los derivados hemoglobínicos, produce un color rojo intenso acorde con la presencia del PBG, urobilinógeno, indol y otros componentes pirrólicos con posición libre dando el p-dimetilaminobenzaldehído de color rojo, en este caso se comporta como urobilinógeno. Adicionando solución saturada de acetato de sodio para disminuir la acidez e inhibir la formación de color rojo por estoles o indoles, el PBG quedará en la solución acuosa si lo hay. Si resultó positiva se agrega cloroformo (capa inferior) el color rosa, -- dando la presencia de PBG, se extrae con otra mezcla de butanol (capa superior) que extraerá, al igual que el cloroformo el color debido al urobilinógeno, pero no debido al PBG. Los derivados aldehídos de indoles sustituidos y otras sustancias reactivas que no son PBG son solubles en n-butanol. Por lo tanto, el color rosa o rojo que quedó en la capa acuosa después de la extracción con cloroformo y butanol indica una prueba positiva -- para el PBG que estriba en una característica de PIA.

Prueba de Hoesch.- El uso de cloroformo como único extractante es una fuente causa de pruebas positivas falsas. En esta prueba, 2 gotas de orina son mezcladas con un ml de reactivo de Earlich (2% de 6 M de HCL). Esta prueba es positiva si -- aparece un color rosado o rojo al cabo de 15 segundos. Cual -- quier reacción con urobilinógeno será eliminada por el corto -- tiempo y las condiciones fuertemente ácidas.

Precusores de porfirina: ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno.- Método tradicional de Manzerral y Granick.

Pruebas de ensaye basadas en intercambio aniónico que son más elaboradas pero más específicas y sensibles. Cuando las pruebas de ensaye son positivas la presencia del PBG puede ser confirmada probando para porfirina después de acidificar la --

orina y calentando para acelerar la polimerización.

ALA y PBG pueden ser determinados por un procedimiento de dos pasos; que consiste en una cromatografía de columna de intercambio aniónico, para separar el ALA y PBG, seguida por el aislamiento de ALA por adsorción de la columna, se calienta el eluato con acetyl-acetona o acetoacetatoetilico para formar un producto de condensación, para formar el correspondiente pirrol, que es químicamente análogo al PBG.

El porfobilinógeno es retenido en el intercambio de anión-resina en forma de acetato, mientras el ALA es retenida por el intercambio catión-resina en forma de hidrógeno. Estos precursores son entonces eluidos de las resinas con ácidos.

El porfobilinógeno se eluye con ácido acético diluido, se trata con un reactivo de Earlich modificado y se mide la absorbancia del color rosa a 553 nm.

El producto de condensación de ALA es también medido con el reactivo de Earlich, siendo este de color rosado a 553 nm.

La misma técnica puede ser aplicada en extracciones desproteinizadas procedentes de tejidos, plasma y líquido cefalorraquídeo.

Medición cuantitativa de las copro y uroporfirinas en orina.-Se extraen con acetato de etilo a pH 4.8. En estas condiciones, la extracción de coproporfirinas es casi máxima, pero en uroporfirinas es mínima. Después de lavar con acetato de sodio, para eliminar huellas de uroporfirinas, los coproporfirinos se transforman en coproporfirinas con solución diluida de yodo. Las coproporfirinas se pasan a HCl 1.5 N y se miden a través de su absorbancia en la longitud de onda óptima, vecina-

de 401 nm.

Para la Uroporfirina, la orina de la cual se extrajeron las coproporfirinas, y los lavados de solución de acetato de sodio que se le añadieron, se llevan a un pH de 3.0; en estas condiciones, la extracción de uroporfirinas por solventes orgánicos es máxima. Después de extraer con butanol, y mezclar con éter de petróleo, las uroporfirinas se transfieren a HCl 1.5 N y se mide en la misma forma que las coproporfirinas.

En solución clorhídrica, la iluminación con luz ultravioleta da una fluorescencia roja. Puede usarse un espectrofotómetro para demostrar las bandas de absorción.

Hay rápidas técnicas cromatográficas por la separación de porfirinas individuales.-en las cuales las porfirinas son también útilmente medidas por esterificación inicial y la separación por líquido de alta presión cromatográfica; así como en capa delgada cromatográfica.

También hay el empleo de los métodos de medición de las enzimas de la biosíntesis del hemo.

Porfirinas en Heces.

Se distribuyen las porfirinas entre vías urinarias y biliares en relación a sus propiedades de solubilidad, con uroporfirinas predominando en la orina, mientras que la mayoría de las porfirinas hidrofóbicas, protoporfirinas, son excretadas exclusivamente en bilis. Los isómeros de coproporfirinas, de protoporfirinas y muchas de las porfirinas dicarboxílicas en las heces son formadas en el intestino, particularmente por la acción de los microorganismos sobre el hemo a partir de la dieta y otras fuentes. Las protoporfirinas también son convertidas a porfirinas por bajas concentraciones de HCl dando mesoporfirina-

nas, por medio de bacteria intestinal la cual remueve grupos -vinil. En consecuencia, las heces contienen una mezcla de porfirinas dicarboxílicas, con protoporfirinas como principal componente. La fracción de porfirina insoluble en éter de las heces contiene un grupo de porfirinas hidrofílicas conocida como porfirina X, un péptido conjugado de una porfirina dicarboxílica, - junto con trazas de uroporfirina y porfirina heptacarboxílica.

El método para su determinación es por extracción de - solventes.-Medición de copro y protoporfirina fecales; Se extraen las porfirinas y porfirinógenos de las heces con éter adiccionado de ácido acético. Después de transformar los porfirinógenos en porfirinas con un reactivo diluido de yodo, se extraen las coproporfirinas con HCl 0.1 N y las protoporfirinas con HCl al 5%.

Las mediciones cuantitativas finales se efectúan con - absorbancias de interferencia de longitud de onda de Soret típicas de los pigmentos, con correcciones para las absorbancias de interferencia, como en el caso de la orina.

Espectrofotometría.-La cuantificación de la porfirina - separada es usualmente mejor llevada, ya sea por espectrofotometría con absorción de 400 nm, o alternativamente por espectrofotometría por las características de fluorescencia roja alrededor de 500 o 600 nm.

En orina, cuando esta contiene bastantes porfirinas, - la posición de las bandas depende de los complejos metálicos - (zinc). Generalmente se encuentran porfirinas libres en la porfiria "eritropoyética" (congénita), mientras que en las porfirias "hepáticas" predominan los complejos de zinc. La acidificación de la orina rompe la unión de porfirinas con zinc, y suministra también las mejores condiciones para la espectroscopia - de las distintas porfirinas.

En las porfirias manifiestas es sencillo encontrar una cantidad alta de porfirinas en orina, hay otras condiciones como asociación con lesiones hepáticas, anemias hemolíticas y -- ciertas dermatitis por fotosensibilización necesitándose técnicas más sensibles para la medición de porfirinas como métodos-- de extracción con solventes y otra como sería la fluorometría.

Las características de fluorescencia de las porfirinas permiten que bajas concentraciones sean detectadas en solución-- con una lámpara de amplia onda de luz ultravioleta. Las porfiri-- nas muestran un rojo o fluorescencia naranja cuando son irradi-- das, la intensidad de la fluorescencia es mayor en ácido que - en solución neutral alcalina.

Las porfirinas en los cromatogramas pueden ser visuali-- zados similarmente y después de la identificación por rocío con queroseno o iso-octano pueden ser detectados. Bilivolinas deri-- vadas de urobilinógeno también muestran fluorescencia roja en - cromatogramas pero no en solución, y pueden ser confundidas con porfirinas, ellas pueden ser distinguidas por su color púrpura-- característico y más rápidamente decolorando en la exposición - a la luz.

La fluorometría, a diferencia de la espectrofotometría requiere estandars de porfirina pura, la cual necesita una pre-- paración cuidadosa.

En años recientes, otras técnicas espectroscópicas no-- tables como las espectroscopía de masas y espectroscopía de -- resonancia magnética nuclear, son usadas más ampliamente en la-- determinación de la estructura de porfirina.

Porfirinas en Sangre.

Las porfirinas son altamente estables en sangre; por -

ejemplo, con anticoagulantes, como EDTA, mantenidas en la obscuridad no muestran pérdida de protoporfirina por más de 8 días a temperatura ambiente y por más de 8 semanas a 8°C o menos.

El exceso de porfirinas puede ser detectado por extracción de solventes o microscopía fluorescente en eritrocitos.

Extracción de solventes.- 0.1 ml de sangre se añade a 2.5 ml. de éter; ácido acético (5:1 v/v). El sobrenadante es transferido y agitado con 0.5 ml de HCl 3M, del cual se extrae porfirina dejando el hemo en la fase orgánica. Al examinarse en ultravioleta la presencia de rosa pálido a un rojo fuerte fluorescente en la fase ácida indica el exceso de porfirina. Si la prueba es positiva, debe ser repetida con células rojas lavadas y el plasma debe ser examinado por separado para detectar porfirinas.

Microscopio Fluorescente.- La dilución salina de mancha pura de sangre, para detectar los eritrocitos fluorescentes rojos por medio del microscopio. Es específico para eritrocitos de porfirina. La fluorescencia por la porfirina persiste por lo menos un minuto con un iodo tungsteno lámpara de cuarzo de 100-watts como recurso de luz, pero desaparece rápidamente, y puede perderse, con la más usual lámpara de mercurio de vapor.

Determinación Cuantitativa.

El problema principal de porfirina en la sangre es extraer el hemo. El cual interfiere con ambos la determinación -- por espectrofotometría y fluorometría.

El conjunto de porfirinas con algo de hemo son extraídos de varios ml de eritrocitos hemolizados con acetato de éter o ácido acético. Todas las porfirinas son extraídas en HCl al-15%, quedando el hemo en fase orgánica, transfiriendo cuantita-

tivamente el éter, y separando fracciones aún de coproporfirina y protoporfirina por extracciones con HCl al 0.1 M seguidas por HCl al 3M. La concentración de cada fracción es entonces medida ya sea por espectrofotometría o fluorometría.

La mayor parte de las protoporfirinas en sangre normal se encuentran como quelatos de zinc. Se han usado ácidos fuertes en las diversas técnicas de medición en sangre, ya que convierte el quelato a el dicatión, por lo tanto estos métodos determinan protoporfirinas en lugar de protoporfirinas-zinc.

En los últimos años se han desarrollado diversos micro métodos fluorométricos para la medición de porfirinas de 2 a 50 μ l de sangre. Todos estos métodos son rápidos y simplificados. Las porfirinas son extraídas en HCl por un acetato de etilo y ácido acético antes de las medidas fluorométricas. Desde que el ácido convierte la zinc-protoporfirina a protoporfirina, no distinguen entre protoporfirina y su complejo de zinc. La porfirina (libres de porfirina eritrocítica, FEP) medida es protoporfirina junto con otra porfirina que es extraída de acetato de etil ácido acético. El componente principal puede ser identificado por emisión espectroscópica fluorométrica y unos procesos de extracción adicionales.

Otro micrométodo para zinc protoporfirina, en el cual, la muestra de sangre es diluida con una solución hipotónica con teniendo detergente antes de la medición con un fluorómetro. La dilución no elimina completamente la interferencia de Hb y puede ser mejor utilizar una precipitación de proteína con etanol que extrae porfirina zinc pero no el hemo. Estos métodos de protoporfirina-zinc no detectan el exceso de protoporfirina, el cual está presente en la protoporfirina, a menos que la medición sea hecha a la máxima emisión para ambos componentes. La hematofluorometría, la cual mide protoporfirina-zinc en toda la-

sangre directamente es disponible y ha sido comparado con procedimientos de microextracción.

Hematofluorímetro. La mayor parte de las protoporfirinas en sangre normal está presente como quelato de zinc. Los ácidos fuertes, los cuales son usados en varias técnicas para la medición de porfirinas en sangre, convierten el quelato o el dicatión, y por lo tanto estos métodos determinan protoporfirinas en lugar de protoporfirinas-zinc.

La medición de protoporfirina eritrocítica y la forma de quelato de zinc de esta porfirina es hematofluorímetro. Este también puede emplearse para la medición de protoporfirina en plasma y heces.

Cromatografía en capa fina. Porphirinas individuales en eritrocitos o plasma pueden ser separadas por cromatografía en capa fina, después de esterificaciones metálicas y medido el éter por medio de escudriñar la fluorometría o después de la elución de los cromatogramas.

Prueba de Fotonemolisis para la protoporfirina eritropoyética. Se ha visto que la dermatitis provocada por la exposición a la luz solar, se acompaña de una cantidad excesiva de protoporfirina en glóbulos rojos. Por contenido anormal de protoporfirina en la protoporfirina anormal, los glóbulos rojos son hemolizados por exposición a una luz cuya longitud de onda se encuentra entre 360 y 380 nm, con glóbulos rojos normales, la hemolisis es inferior al 3%.

Otra prueba en la médula ósea obtenida por punción muestra fluorescencia bajo la luz ultravioleta. La microscopía de fluorescencia permite apreciar esta característica en los normoblastos.

Dentro de la asociación con estas enfermedades, el estudio de las anemias es de gran importancia para su diagnóstico se tienen pruebas como: El estudio de biometría hemática, morfología de eritrocitos al hacer frotis de sangre teñido con Wright, la determinación de hierro sérico (tinción de azul de Prusia), y la capacidad total de captación de hierro (o transferrina).

En otras investigaciones de utilidad tenemos: Hierro corporal, pruebas de quelación, concentración sérica de la ferritina en suero por métodos inmunoradiométricos, protoporfirina eritrocítica ha sido propuesta como un procedimiento explorador para el déficit de hierro, es un indicador sensible de las alteraciones de la síntesis del hemo, se usa poco con fines clínicos porque los métodos para determinarla son extremadamente tediosos y llevan mucho tiempo.

..CARACTERÍSTICAS DE LAS PORFIRIAS.

ANOMALIDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS DE LAS PORFIRIAS.

| | Porfiria Eritropoética | Porfiria Hereditaria | | | | Porfiria Eritrohepática |
|------------------------|--|---|---|---|--------------------------------|------------------------------|
| | Porfiria Eritropoética Coronaria (CEP) | Porfiria Intermitente Aguda (PIA) | Coproporfirina Hereditaria (CPH) | Porfiria Variegata (PV) | Porfiria Cutánea Tarda (PCT) | Protoporfirina (PP) |
| Deficiencia enzimática | Desaminasa de porfobilinógeno coactivada de uroporfirinógeno III (U) o - o ambas a la vez. | desaminasa de porfobilinógeno. | oxidasa de coproporfirinógeno. | Oxidasa de porfoporfirinógeno. | Desaminasa de uroporfirinógeno | Ferredoxinasa |
| Porfirinas Excretadas | Uroporfirina Uroporfirina III Coproporfirina I. | Porfobilinógeno. Ac. δ -amino Levulinico. | Coproporfirina Porfobilinógeno Ac. δ -aminolevulinico. | Coproporfirina Protoporfirina Porfobilinógeno Ac. δ -aminolevulinico. | Uroporfirina Coproporfirina | Protoporfirina |
| Herencia | Autosómica recesiva. | Autosómica dominante | Autosómica dominante | Autosómica dominante | Autosómica dominante | Autosómica dominante |
| Expresión metabólica | Células eritroides | Hígado | Hígado | Hígado | Hígado | Células eritroides e hígado. |

PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS PORFIRIAS.

| Signos y síntomas: | | | | | | |
|--|---------------------|--------------|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| Lesiones cutáneas por fotosensibilización. | Muy severas **** | Ninguna 0 | Raras 0 | Moderadamente severas ** S2 | Moderadamente severas ** 0 | Leves (*) |
| Ataques de dolor abdominal, náuseas, vómitos, neuropsiquiátricos | No 0 | Sí **** | Sí 0 | ** S2 | No 0 | No 0 |
| Aumentados por fármacos. | - | **** | - | **** | ** | - |

ANOMALIDADES DE LABORATORIO.

| | | | | | | |
|--------------------------------|-----|-------|-------|-------|-----|-----|
| ERITROCITOS: | | | | | | |
| Uroporfirina | +++ | N | N | N | N | N |
| Coproporfirina | ** | N | N | N | N | * |
| Protoporfirina | (*) | N | N | N | N | +++ |
| URINA: | | | | | | |
| Ac. δ -aminolevulinico. | N | (+++) | (+++) | (+++) | N | N |
| Porfobilinógeno | N | (+++) | (+++) | (+++) | N | N |
| Uroporfirina | +++ | ** | * | * | +++ | N |
| Coproporfirina | ** | N | ** | ** | * | (*) |
| HECES: | | | | | | |
| Coproporfirina | * | N | +++ | * | (*) | (*) |
| Protoporfirina | * | N | * | +++ | N | ** |

N, Normal; *, aumento en los niveles o en la eliminación; **, aumento moderado; ***, muy aumentado; (*), alto aumentado en algunos pacientes; (***), con frecuencia aumenta sólo durante los ataques.

VALORES NORMALES DE LAS PORFIRINAS Y SUS PRECURSORES.

| | Orina $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ | Heces $\mu\text{g}/\text{g peso seco}$ | Hematíes $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ | Plasma $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ |
|--------------------|-------------------------------------|---|--|--|
| ALA | 2.300 ± 400 | — | 31 ± 11 | 5.6 ± 0.02 |
| PBG | 1.500 ± 200 | — | — | — |
| Uroporfirina | < 60 | 2.2 ± 0.9 | Indicios | — |
| Coproporfirina | 120 ± 50 | 20 ± 10 | 2 ± 1.5 | — |
| Protoporfirina | Indicios | 30 ± 20 | 25 ± 10 | — |
| Porfirinas totales | — | < 150 | — | 0.35 ± 0.2 |

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA ANEMIA MICROCITICA HIPOCRONICA.

| | Anemia por deficiencia de hierro. | Carácter de talasemia β | Anemia de enfermedades crónicas | Anemia sideroblástica |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Hierro sérico | ↑ | N | ↓ | ↑ |
| TIBC | ↑ | N | ↓ | N |
| Ferritina sérica | ↓ | N | ↑ | ↑ |
| Protoporfirina eritrocítica | ↑ | N | ↑ | ↑ ó N |
| HbA ₂ | ↓ | ↑ | N | ↓ |

NOTA: ↑ = Aumentada, ↓ = Disminuida; N=Normal; TIBC= Capacidad total de captación de hierro.

R E S U M E N .

Cada tipo de porfiria humana es caracterizada por un tipo de patrón específico de acumulación intracelular del sustrato más próximo al defecto de la enzima; el reconocimiento de estos patrones por mediciones apropiadas de laboratorio es esencial para la diferenciación de porfirias debido a que sus diferentes tipos comparten el mismo comportamiento clínico.

Como pudo apreciarse a lo largo del desarrollo del tema, este grupo de entidades patológicas, se presentó en diversidad de formas, cada una de las cuales, caracterizadas por un defecto metabólico, las repercusiones clínicas y hematológicas -- son tan diversas que permiten su diagnóstico diferencial.

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

- 1.- William J. William, Bentler, Erslev, Rundles; Hematología; 2a. Edición, Tomo I. Ed. Salvat. 1983
- 2.- Wintrobe; Hematología; 1a. Edición. Ed. Intermedica; 168 683.
- 3.- Harold A. Harper; Química Fisiológica; 6a. Edición. Ed. Manual Moderno. 1978.
- 4.- H.J. Woodliff; Hematología Clínica; Ed. El Manual Moderno. 1978.
- 5.- R.C. Hillman; El Eritrocito; 2a. Edición. Ed. Manual Moderno. 1978.
- 6.- L. Stryer; Bioquímica; 2a. Edición. Ed. Reverte. 1982.
- 7.- Abraham White; Principios de Bioquímica; 6a. Edición. Ed. Interamericana. 1976.
- 8.- Lynch; Métodos del Laboratorio; 2a. Edición. Ed. Interamericana. 1979.
- 9.- Tietz; Química Clínica Moderna; 1a. Edición. Ed. Interamericana. 1979.
- 10.- P. Farreras Valenti; Medicina Interna; 2a. Edición. Ed. Marín. 1981; 563-569.
- 11.- Marcos A. Krupp; Diagnóstico Clínico y Tratamiento; 23a. Edición. Ed. Manual Moderno. 1988; 1063-1065.
- 12.- Jay H. Spein; TOMO II. Ed. Salvat Editores, S.A. 1983.
- 13.- Harrison; Principios de Medicina Interna; Tomo II. 7a. Edición. Ed. Mc. Graw Hill. 1989; 1823-1842; 2002-2008.
- 14.- Eales L; The Porphyrins and Porphyrinurias; Ann Rev. Med. 12: 251. 1961.

FOY
SALA
TRABAJOS
NO DEBE
59
BIBLIOTECA

- 15.- Dhar G.J.; Effects of hematin in hepatic porphyria; Ann. Int. Med. 1975. 83:20
- 16.- Granick S.; The introduction in vitro of the synthesis of aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria; J. Biol Chem. 1966. 241; 1359.
- 17.- Clinics in Hematology; Vol. 9, No. 2; Jun 1980; 272-294.
- 18.- Cartwright, George E.; Diagnostic Laboratory Hematology; 4a. Edición. Ed. Gruno Stratton. 1968; 326-352.
- 19.- Miale, John; Laboratory Medicine Hematology; 6a. Edición ed. The C.V. Mosby Company. 1982; 229-881
- 20.- Leavell-Troxup; Fundamental Clinical Hematology; 2a. Edición. Ed. W.B. Saunders Company. 1966; 47-55
- 21.- Clinical Chemistry; Vol. 24. 1978. 1515-1517, 1751-1754.
- 22.- Medicine; Abril 1982.
- 23.- Medicine; Julio 1985.
- 24.- Medicine; Octubre 1989.