

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA DESAMINASA DEL  
PORFOBILINOGENO EN LA IDENTIFICACION DE PORTADORES DE  
PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA.

Trabajo de Tesis Profesional presentado por

JOSE VAZQUEZ PRADO

como requisito para obtener el título de

BIOLOGO

Agosto, 1988.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

A mis padres

Miguel Vázquez Flores y  
Josefina Prado de Vázquez  
con el mayor cariño y agradecimiento.

A mis hermanos

Miguel, Luis Armando y Alma  
los mejores compañeros de toda la vida.

A mis amigos

por la suerte de haberlos encontrado.

Puebla, Pue. octubre 1988

### Agradecimientos:

Al personal de los Laboratorios Clínicos de Puebla, lugar donde fué realizado el presente estudio, por todas las facilidades prestadas para la realización del mismo. En especial:

Al Dr. Francisco Javier Sánchez Anzaldo  
Director de este trabajo que a mi juicio además de guía se convirtió en un gran amigo.

Al Dr. Guillermo Ruíz Reyes  
Director de los Laboratorios Clínicos de Puebla de quien recibí un gran ejemplo.

Al Dr. Alejandro Ruíz Arguelles  
Por sus acertadas críticas.

A Alejandra, Carlos, Eloísa, Esther, Gustavo y Rocío  
Porque con ellos compartí esta etapa en los Laboratorios Clínicos de Puebla y su apoyo fué fundamental para mantener las ganas de seguir adelante.

Indice:

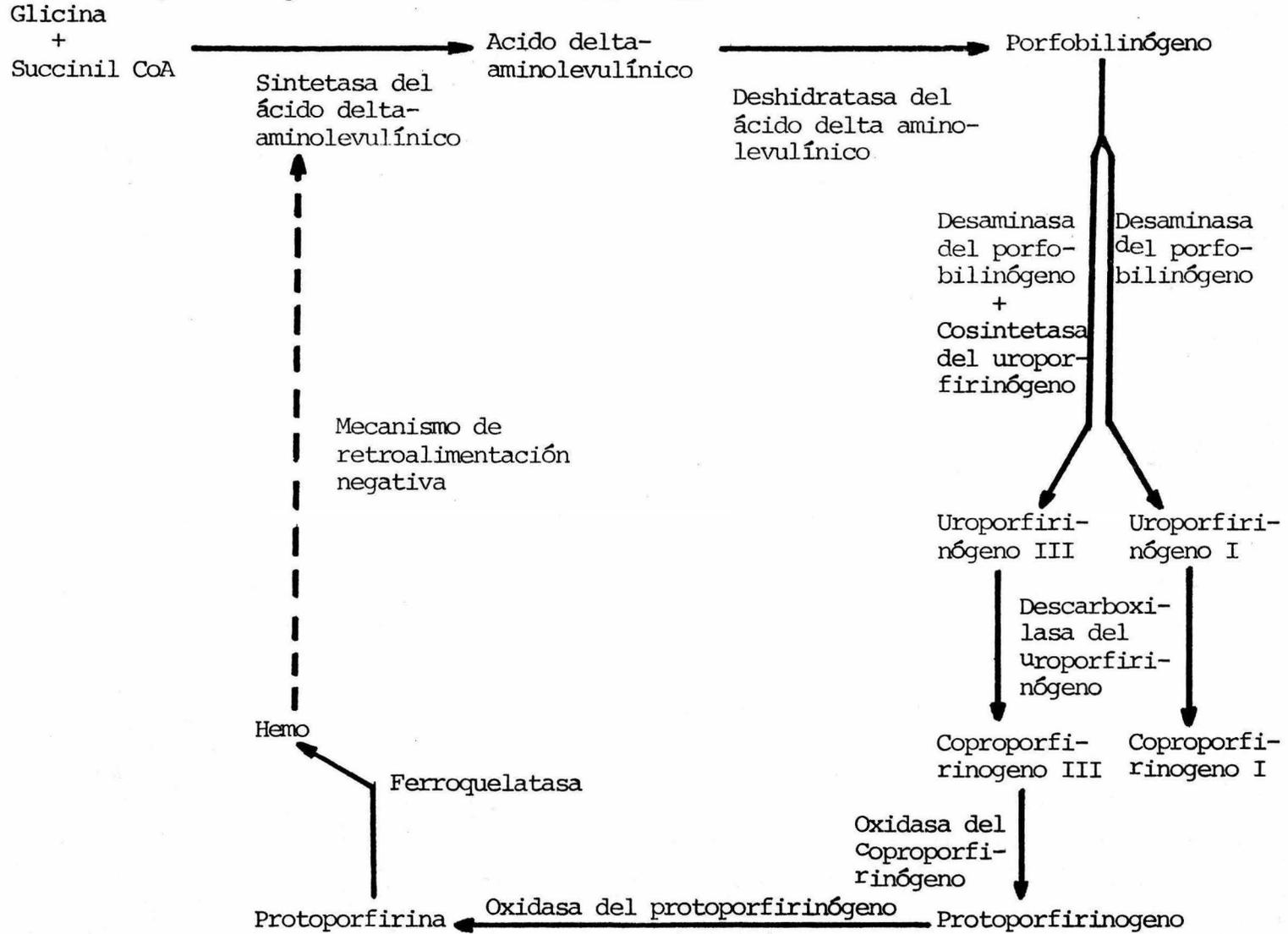
Introducción.....	1
Material y métodos.....	7
Variables analíticas.....	9
Resultados.....	13
Discusión.....	36
Referencias.....	40

## Introducción:

Las porfirias son errores innatos y adquiridos del metabolismo caracterizados por alteraciones que disminuyen las actividades de las enzimas específicas de la vía biosintética del hemo (1-3). El punto de partida de esta vía metabólica está constituido por la formación del ácido delta-aminolevulínico (ADAL) a partir de los precursores glicina y succinil-CoA, posteriormente dos moléculas de ADAL forman el anillo monopirrol porfobilinógeno (PBG) y cuatro moléculas de PBG se unen para formar los uroporfirinógenos que luego se transforman en coproporfirinógenos. El protoporfirinógeno resulta de la transformación de los coproporfirinógenos de tipo III y a su vez este es modificado para formar la protoporfirina que es el precursor directo del hemo, Fig. A (3-4).

Una clasificación simple de las porfirias es aquella que las divide en hepáticas y eritropoyéticas dependiendo del tejido que principalmente presente una producción excesiva de metabolitos de la vía del hemo. Otra clasificación, desde el punto de vista clínico, se fundamenta en la ocurrencia de periodos agudos de síntomas neurovisceral, manifestaciones dermatológicas o ambos e incluye dos grupos: porfirias agudas que comprende dos categorías: porfirias que producen manifestaciones neurológicas y cutáneas (porfiria variegata y coproporfiria hereditaria) y las que se expresan exclusivamente por

Fig. A. VIA BIOSINTETICA DEL HEMO



medio de síntomas neurológicos (porfiria intermitente aguda y deficiencia de la enzima deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico). Las porfirias no agudas producen lesiones cutáneas y son: porfiria eritropoyética congénita, porfiria cutánea tardía, porfiria tóxica, porfiria hepatoeritropoyética y protoporfirina.

Las consecuencias clínicas de las deficiencias enzimáticas en las distintas porfirias hepáticas son variables, probablemente menos de una cuarta parte de las personas que tienen predisposición hereditaria llegan a sufrir de una crisis porfírica aguda (5). Los factores ambientales, incluidos factores metabólicos no determinados genéticamente, juegan un papel vital en la expresión clínica de estos padecimientos (2). Hasta hace algunos años, los pacientes que presentaban la fase aguda con frecuencia morían, más aún si no se llegaba a hacer el diagnóstico y se usaban drogas como los barbitúricos o se sometía al paciente a intervenciones quirúrgicas innecesarias.

La porfiria aguda intermitente es la más frecuente de este grupo de enfermedades, constituye alrededor del 80 % de las porfirias agudas encontradas en Norteamérica y Europa (5). Estudios llevados a cabo en nuestro medio también así lo indican (6-8). Fué descrita por primera vez por Stokvius en 1889. Waldestrom estableció su naturaleza hereditaria en 1937 y poco después Gates la reconoció como un carácter dominante de penetrancia variable. Esta porfiria se distingue por la predominancia de síntomas gastrointestinales y neuropsiquiátricos y la ausencia de fotosensibilidad dérmica (9). Los principales

signos de esta enfermedad son dolor abdominal, estreñimiento, parestesias y parestias de los miembros superiores e inferiores y alteraciones de la conducta que pueden llegar a la franca psicosis (4, 6, 8 y 10).

La porfiria intermitente aguda es más frecuente en mujeres que en hombres (2,4), por lo general no se expresa antes de la pubertad, y en etapas posteriores a ella, las manifestaciones clínicas observadas son muy variables, no obstante que la deficiencia enzimática es la misma en sujetos latentes que en sujetos sintomáticos (2, 4). McColl y colaboradores (11) demostraron que la biosíntesis del hemo se ve afectada por el ciclo menstrual femenino, encontrando además que las crisis agudas en mujeres con porfiria aguda intermitente son más comunes en el periodo premenstrual. Es probable que esto explique su preponderancia en el sexo femenino.

Además de ser un error innato del metabolismo, la porfiria intermitente aguda es considerada una alteración farmacogenética en la cual muchos agentes químicos pueden provocar crisis agudas de esta enfermedad, entre los que se citan particularmente: barbitúricos, sulfonamidas, productos hormonales, contraceptivos, dietas reductoras de peso y alcohol (2-3, 5, 9, 12-13). La carbamazepina es un compuesto químico que induce porfiria aguda en personas que no tienen predisposición genética para esta enfermedad (14). Probablemente los químicos citados incrementan la actividad de la enzima sintetasa del ácido delta-aminolevulínico hepática y de esta manera predisponen la expresión aguda de la enfermedad (2,13).

El defecto bioquímico que ocurre en la porfiria intermitente aguda es debido a una disminución de la actividad de la enzima desaminasa del porfobilinógeno (D-PBG), también llamada sintetasa del uroporfirinógeno (S-URO) y sintetasa del hidroximetilbilano (S-HMB) E.C. 4.3.1.8. (2, 5). La actividad de esta enzima se encuentra reducida en un 50 % con relación al promedio normal en todos los tejidos examinados en los pacientes con este tipo de porfiria (2), entre los que se incluyen sangre total (15), fibroblastos y células amnióticas en cultivo (16) y linfocitos en cultivo (17).

Estudios recientes han demostrado la heterogeneidad genética en las mutaciones asociadas con la porfiria intermitente aguda (18-21) habiéndose encontrado, hasta 1985, cuatro diferentes clases de mutantes relacionadas con la expresión enzimática de la desaminasa del porfobilinógeno (21).

La desaminasa del porfobilinógeno ha sido purificada de eritrocitos humanos y se han determinado varias de sus propiedades fisicoquímicas. Se estima que se trata de un monómero termoestable con un peso molecular comprendido entre 36 000 y 42 000 daltones (22-24). Se conoce además que el gene que codifica para esta enzima se localiza en el cromosoma 11 (25) en la región q23-qter (26-28).

El diagnóstico diferencial de porfirias se realiza en base a los patrones de excreción de metabolitos de la vía del hemo (29-37); no obstante, la cuantificación de

la desaminasa del porfobilinógeno es la prueba crítica para diagnosticar porfiria intermitente aguda, especialmente en sujetos asintomáticos cuyos patrones de excreción son normales (9). El fundamento de la prueba de laboratorio diseñada para cuantificar la actividad de esta enzima consiste en medir la cantidad de uroporfirinas formadas en función del tiempo y de la cantidad de tejido usado como fuente de la enzima a partir de un determinado sustrato (38-42). Se han usado tanto ácido delta-aminolevulínico (43-46) como porfobilinógeno (47-54), la cuantificación del producto final se hace midiendo la fluorescencia emitida por las porfirinas cuando son estimuladas con luz ultravioleta de longitud de onda larga (43-45, 47-50, 53, 54), aunque también se han cuantificado por espectrofotometría de luz visible (46, 51, 52).

En vista de la amplia variedad de métodos hasta ahora descritos que analizan la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno (43-54) se consideró oportuno el establecimiento de un sistema que condensara toda esta experiencia y la introducción del uso de mercaptoetanol que incrementa significativamente la producción final de uroporfirinas, según pudo ser demostrado.

Se decidió utilizar ácido delta-aminolevulínico como sustrato debido a su mayor rentabilidad y facilidad de manejo (43-46), lo que involucra la intervención en el sistema de la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico. Para favorecer la actividad de esta enzima se eliminaron procesos de preincubación, se introdujo el uso de mercaptoetanol y se utilizó amortiguador fosfato-

citrato concentrado (55) y sulfato de zinc (44) a concentraciones modificadas. No obstante la amplia utilización del espectrofluorómetro en la cuantificación final de porfirinas formadas se consideró de mayor conveniencia el uso de espectrofotometría de luz visible. Por tal motivo se buscó conseguir un pico de absorción a 405 nm, gracias a la obtención máxima de uroporfirinas, inhibiendo a la descarboxilasa del uroporfirinógeno mediante incubación a 45°C (51) y la utilización de una mezcla de cloruro de sodio y cloruro de magnesio (52) a concentraciones modificadas; evitando, además, la interferencia de proteínas al momento de la lectura con el empleo de ácido tricloroacético como agente precipitante (50). De esta manera, ha sido diseñado un método económico que por su accesibilidad pretende ser de empleo generalizado en el diagnóstico de porfiria intermitente aguda.

#### Material y métodos:

##### Reactivos:

- Solución Tritón X-100: Preparar una solución acuosa al 0.2 %.

- Amortiguador fosfato-citrato: Diluir 13.4 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 90 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.5 con ácido cítrico 0.5 M preparado con 9.68 gr de ácido cítrico monohidratado en 100 ml de agua destilada, aferrar a 100 ml. Se obtiene una concentración 0.5 M.

- Sustrato ADAL: Preparar una solución 6 mM con 100.56 mg de ácido delta-aminolevulínico hidrociorado (sigma Chemical Co., St Louis Mo) en 100 ml de amortiguador fosfato-citrato. Dividir en alícuotas de 1.0 ml y conservar a - 25°C. Estable durante 6 semanas bajo estas

condiciones de almacenamiento.

- Solución mezcla de sales: Preparar una solución 0.45 M de cloruro de sodio (2.6298 gr de NaCl en 100 ml de agua destilada) y una solución 0.09 M de cloruro de magnesio (1.8298 gr de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  en 100 ml de agua destilada) hacer una mezcla 7:3 (vol/vol) de estas soluciones, añadir sulfato de zinc a una concentración de 1.5 mM (0.0431 gr de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 ml de la mezcla de cloruro de sodio con cloruro de potasio).

- Mercaptoetanol: Previo a cada análisis preparar una dilución acuosa 1:5. Preparar 125 ul cada ocasión.

- Acido tricloroacético: Preparar una solución acuosa al 10 %.

- Muestra sanguínea: Centrifugar alícuotas de sangre total heparinizada y resuspender en solución salina isotónica (0.9 gr de NaCl en 100 ml de agua destilada) hasta alcanzar el hematocrito original.

- Coproporfirina I estándar: En un vial de coproporfirina I estándar (Sigma Chemical Co., St Louis Mo.) adicionar 2.0 ml de ácido clorhídrico 1.5 N. Introducir la solución en un baño de agua hirviendo durante 5 min., dejar enfriar a temperatura ambiente y hacer una serie de diluciones para la elaboración de una curva estándar. Leer densidad óptica a 400 nm en un espectrofotómetro de luz visible.

Procedimiento:

El método que a continuación se describe es el resultado del estudio de cada una de las variables que luego se detallan:

En un tubo con tapón de rosca colocar 0.445 ml de agua destilada, añadir 0.2 ml de amortiguador fosfato-citrato, 0.25 ml de solución mezcla de sales, 1.0 ml de solución Tritón X-100 y 5 ul de solución de mercaptoetanol, mezclar y añadir 100 ul de muestra sanguínea; en agitador mecánico mezclar hasta lograr hemólisis completa y añadir 1.0 ml de sustrato ADAL, mezclar nuevamente e incubar a 45°C en la oscuridad a baño María durante 2 horas. Detener la reacción con 3.0 ml de solución de ácido tricloroacético, incubar a 4°C durante 15 minutos y centrifugar a 2 500 rpm durante 10 minutos, exponer el sobrenadante a la luz ambiental durante un periodo mínimo de 15 minutos y leer uroporfirinas a 405 nm en un espectrofotómetro de luz visible (Zeiss PM2DL). Procesar simultáneamente un tubo que servirá como blanco de lectura, en este debe agregarse 1.0 ml de amortiguador fosfato-citrato en lugar de sustrato ADAL. Determinar el hematocrito de las muestras procesadas. Expresar los resultados como nmol de porfirinas/ml de eritrocitos/2 hrs, utilizar la curva estándar de coproporfirinas para la conversión de densidad óptica a concentración de porfirinas.

Variabes analíticas:

Espectro de absorción:

Se investigó el espectro de absorción en la banda de Soret del producto del análisis, debido a que en este intervalo se ubica el pico de absorción de las porfirinas, para tal efecto se registró su densidad óptica en el in-

tervalo comprendido entre 400 y 410 nm. En este experimento la incubación de la mezcla de análisis se hizo durante una hora.

#### Mercaptoetanol:

Para conocer el efecto del mercaptoetanol en el sistema de análisis se estudio un grupo de 10 personas sanas (7 mujeres y 3 hombres, con edades comprendidas entre 20 y 29 años), se procesaron por duplicado muestras sanguíneas de estos sujetos bajo el esquema básico ya mencionado, salvo que en una de las muestras de cada sujeto no se administró mercaptoetanol. Los resultados se analizaron por "t pareada". Posteriormente se investigó la concentración óptima de mercaptoetanol, para ello se estudiaron 10 personas sanas (6 hombres y 4 mujeres, con edades comprendidas entre 19 y 43 años), cada muestra fué objeto de 4 tratamientos, siguiendo el procedimiento anterior se probaron concentraciones finales de mercaptoetanol de 1.19 mM (dilución 1:20), 2.38 mM (dilución 1:10), 4.76 mM (dilución 1:5) y 23.78 mM (sin diluir), los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza.

#### Concentración de sustrato:

Para conocer la concentración óptima de sustrato se estudiaron 15 personas sanas (9 mujeres y 6 hombres, con edades comprendidas entre 17 y 43 años). Se formaron 5 grupos, cada uno de ellos correspondiendo a una concen-

tracción de sustrato ADAL, las concentraciones probadas fueron: 0.6 mM, 1.5 mM, 3.0 mM, 6.0 mM y 15.0 mM. Los resultados fueron evaluados por análisis de varianza y prueba de Duncan.

Concentración de sustrato vs tiempo de incubación:

De manera factorial se analizó la relación entre variaciones simultáneas en el tiempo de incubación y la concentración de sustrato. Se estudiaron 6 personas (4 mujeres y 2 hombres, con edades comprendidas entre 21 y 43 años). Se probaron simultáneamente 3 concentraciones de sustrato: 0.6 mM, 3.0 mM y 6.0 mM y 6 tiempos de incubación: 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 12 hr y 24 hr. Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (sistema factorial) y prueba de Duncan.

pH vs temperatura:

Se investigó de manera factorial el efecto de variaciones simultáneas en el pH y la temperatura. Se estudiaron 12 personas normales (5 mujeres y 7 hombres, con edades comprendidas entre 21 y 43 años). Se investigó el efecto de 2 temperaturas de incubación: 37°C y 45°C y 5 valores de pH: 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5. Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (sistema factorial) y prueba de Duncan.

Almacenamiento previo de las muestras sanguíneas:

Se estudió el efecto del tiempo transcurrido entre

la toma de las muestras y el procesado de las mismas. Se estudiaron 5 personas normales (3 mujeres y 2 hombres, con edades comprendidas entre 22 y 28 años). Se establecieron 4 grupos, cada uno de ellos correspondió a tiempos de 0 hrs, 2 hrs, 6 hrs y 24 hrs transcurridos entre la toma de las muestras y el procesado de estas. Asimismo se establecieron 2 grupos que correspondieron a 2 diferentes condiciones de almacenamiento de las muestras: temperatura ambiente y 4°C. Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza.

Coefficientes de variación:

El coeficiente de variación intraanálisis fué establecido con una muestra sanguínea de un sujeto normal que fué procesada 10 veces de manera simultánea.

El coeficiente de variación interanálisis fué establecido procesando, independientemente en 4 ocasiones diferentes, un grupo de 5 muestras sanguíneas cada vez, entre cada análisis las muestras se conservaron congeladas a -25°C, en alícuotas de 100 ul.

Valores de referencia:

Para determinar los valores de referencia se cuantificó la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno en 23 individuos normales (10 mujeres y 13 hombres, con edades comprendidas entre 20 y 29 años) sin historia familiar de dolor abdominal ni exposición laboral al plomo.

#### Estudios familiares:

Con el objetivo de identificar portadores asintomáticos de porfiria intermitente aguda, se realizaron estudios familiares de pacientes afectados con este padecimiento. A todos los individuos que formaron parte de los estudios familiares (n=18) se les cuantificó la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno, en la mayor parte de los casos (n=16) se investigó el contenido urinario de ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno (53) y en algunos de ellos (n=11) la presencia de porfirinas en heces (54).

#### Otras porfirias:

Se evaluó la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno en pacientes con otros tipos de porfiria: porfiria variegata (n=5), protoporfiria eritropoyética (n=1) y coproporfiria hereditaria (n=1).

#### Resultados:

##### Espectro de absorción:

El espectro de absorción del producto mostró un pico en la banda de Soret a los 405 nm, este es característico de las uroporfirinas (29), (Fig. No. 1).

##### Mercaptoetanol:

La presencia de mercaptoetanol a una concentración

final de 4.76 mM en el sistema de análisis de la desaminasa del porfobilinógeno incrementó significativamente la obtención final de uroporfirinas (Fig. No. 2). La actividad en ausencia de mercaptoetanol fué de  $123.13 \pm 16.04$  nmol porfirinas/ml eritrocitos/2 hrs, contra  $135.49 \pm 15.77$  nmol porfirinas/ml eritrocitos/2 hrs en presencia del mismo (p menor a 0.005, n=10, Tabla No. 1). Concentraciones finales de mercaptoetanol en el sistema de análisis comprendidas entre 1.19 mM y 23.78 mM no mostraron diferencias significativas en su influencia sobre la cantidad final de uroporfirinas formadas en este análisis enzimático (p mayor de 0.05, n=10, Tabla No. 2, Fig. No. 3).

#### Concentración de sustrato:

No se encontró una variación significativa en la producción de porfirinas formadas a partir de concentraciones de sustrato comprendidas entre 0.6 mM y 15 mM (p mayor de 0.05, n=15; Tabla No. 3, Fig. No. 4).

#### Concentración de sustrato vs tiempo de incubación:

El efecto conjunto del tiempo de incubación y la concentración de sustrato resultó significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno (p menor de 0.005, n=6; Tabla No. 4, Fig. No. 5). Se encontró un incremento lineal en la producción de uroporfirinas por periodos de incubación de hasta 24 hrs y para cada una de las concentraciones de sustrato analizadas.

#### pH vs temperatura:

La acción conjunta de variaciones en el pH y la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno (p mayor de 0.05, n=12; Tabla No. 5, Fig No. 6). No obstante, variaciones independientes en cada uno de estos factores sí tienen efecto significativo (p menor de 0.005, n=12: Tabla No. 5, Fig. No. 6). El sistema de pH, analizado por la prueba de Duncan, mostró una actividad óptima de la enzima a un pH de 7.5 y 8.0, la temperatura de incubación que ofreció mejores resultados fué la de 45°C.

#### Almacenamiento previo de las muestras sanguíneas:

El almacenamiento de las muestras a 4°C y a temperatura ambiente no redundó significativamente sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno (p mayor de 0.05, n=5; Tabla No. 6, Fig. No. 7) en un periodo de almacenamiento máximo de 24 hrs.

#### Coefficientes de variación:

El coeficiente de variación intraanálisis fué de 3.89 y el coeficiente de variación interanálisis fué de 5.6.

#### Valores de referencia:

La curva de referencia se hizo comprendiendo un intervalo de concentración de coproporfirinas entre 3.7 y 1520 nmol. La lectura de la absorción espectrofotométrica

ca se hizo a 400 nm, se encontró un comportamiento lineal en el intervalo referido. La ecuación que describe este comportamiento es:

$$y = 2981.6 X - 27.1 \quad (r=0.998)$$

donde:

y = nmol de porfirinas

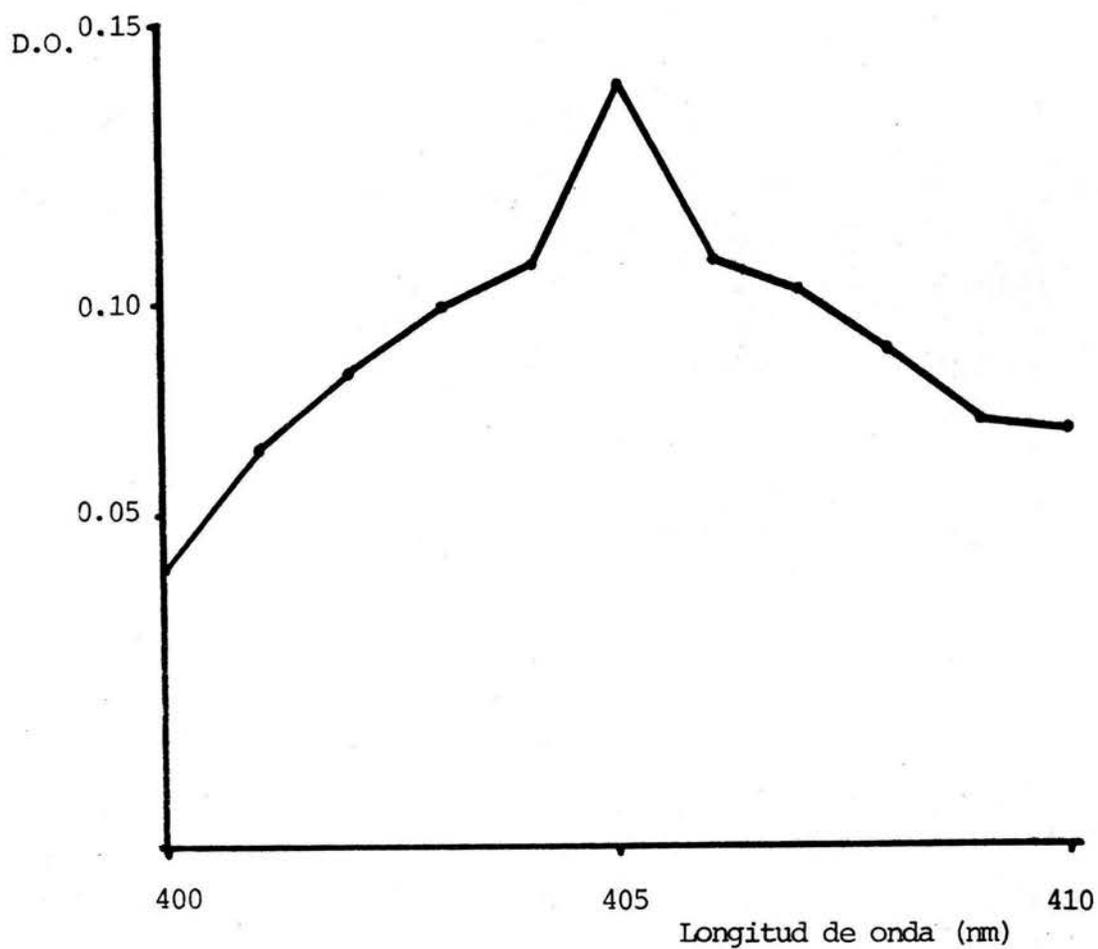
X = densidad óptica

Al introducir como factores el volumen final de la muestra de análisis (6.0 ml), el recíproco del hematocrito multiplicado por 100 y el recíproco del volumen de muestra adicionada a la mezcla de análisis (100 ul) se obtiene la ecuación que permite conocer la concentración de porfirinas formadas por mililitro de eritrocitos durante un periodo de incubación de 2 horas. Así:

$$\text{nmol porfirinas/ml eritrocitos/2 h} = (2981.6 \text{DO} - 27.1) (6/\text{Hto})$$

La actividad promedio de la desaminasa del porfobilinógeno resultante del análisis de 23 sujetos normales seleccionados como se indicó previamente (material y métodos) fué de 114.95 nmol/ml eritrocitos/2 hrs  $\pm$  16.28, intervalo de referencia resultante (media  $\pm$  2 desviaciones estándar) comprende de 83 a 148 nmol/ml eritrocitos/2 hrs (Fig. No. 8).

Figura No. 1 ESPECTRO DE ABSORCION



Espectro de absorción en la banda de Soret del producto obtenido en el análisis funcional de la desaminasa del porfobilinógeno. El pico a 405 nm corresponde a la absorción máxima de uroporfirinas.

TABLA No. 1 MERCAPTOETANOL

POBLACION SEXO	SANA EDAD	MERCAPTOETANOL (mM)	
		0.0 D-PBG (nmol/ml eritrocitos/2 hrs)	4.76
F	25 A	131.7	141.2
F	24 A	152.6	165.9
M	26 A	130.51	149.58
M	26 A	121.31	129.64
M	29 A	88.39	104.65
F	27 A	121.84	137.52
F	27 A	118.03	132.79
F	21 A	129.43	130.20
F	20 A	119.96	127.92
F	24 A	117.53	135.54
		$\bar{X} =$	
		123.1	135.49
		$s =$	
		16.04	15.77

ANALISIS ESTADISTICO:

Prueba "t" para observaciones pareadas

t calculada: 6.91

t tablas: 3.25

p menor de 0.005

Conclusión: La diferencia entre las medias resulta significativa.

Efecto de la presencia de mercaptoetanol en el sistema de análisis funcional de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 2 MERCAPTOETANOL

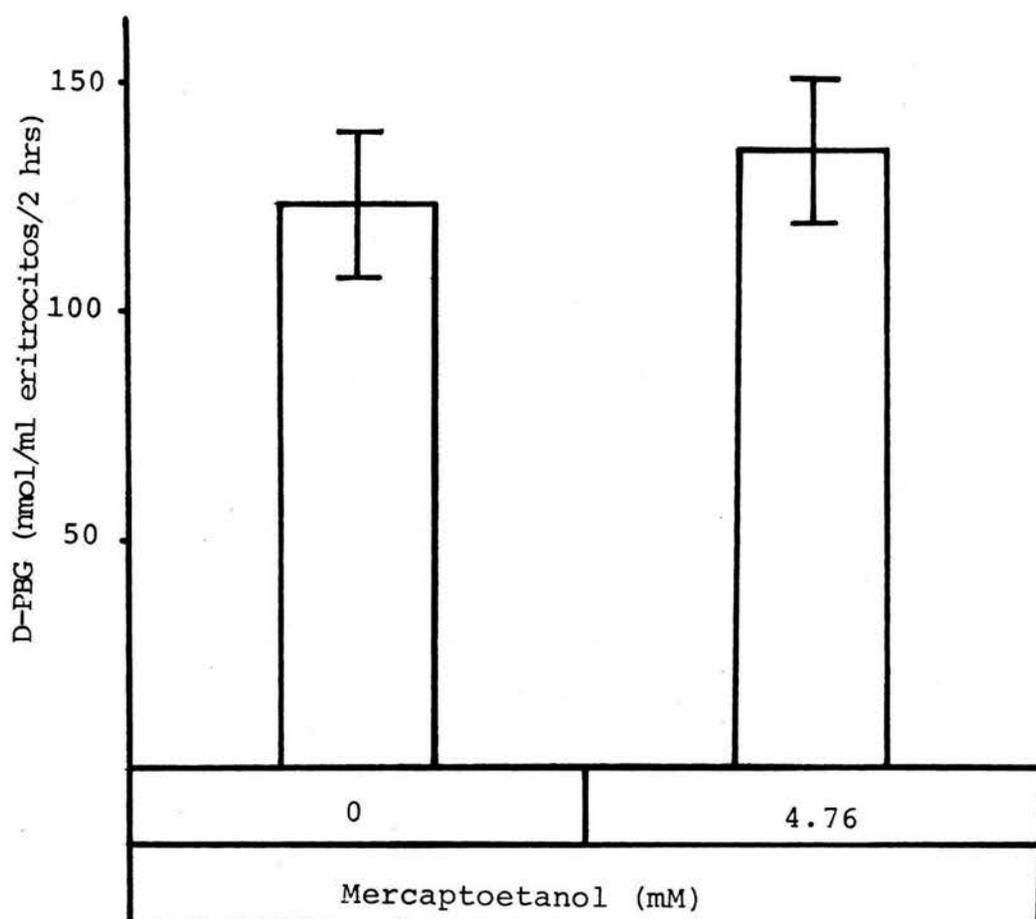


Diagrama que muestra el efecto del mercaptoetanol sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. Las medias de los dos tratamientos difirieron significativamente al ser comparadas por la prueba "t" para observaciones pareadas (p menor de 0.005, n = 10).

TABLA No. 2 MERCAPTOETANOL

POBLACION SANA SEXO	EDAD	D-PBG (Densidad óptica 405 nm)			
M	22 A	0.130	0.233	0.222	0.198
F	23 A	0.219	0.261	0.276	0.297
F	19 A	0.260	0.275	0.276	0.274
M	43 A	0.212	0.205	0.274	0.154
M	22 A	0.356	0.368	0.343	0.320
M	22 A	0.109	0.239	0.244	0.219
F	23 A	0.225	0.260	0.273	0.294
F	19 A	0.270	0.260	0.263	0.288
M	43 A	0.198	0.230	0.233	0.209
M	22A	0.368	0.360	0.325	0.353
	$\bar{X} =$	0.2347	0.2691	0.2736	0.2626
	$s =$	0.0839	0.0539	0.0367	0.0620

ANALISIS ESTADISTICO  
ANALISIS DE VARIANZA

Varianza calculada: 0.7964

F tablas 2.84

p mayor de 0.05

Conclusión: No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias correspondientes a cada tratamiento.

Efecto de diferentes concentraciones de mercaptoetanol en el sistema de análisis funcional de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 3 MERCAPTOETANOL

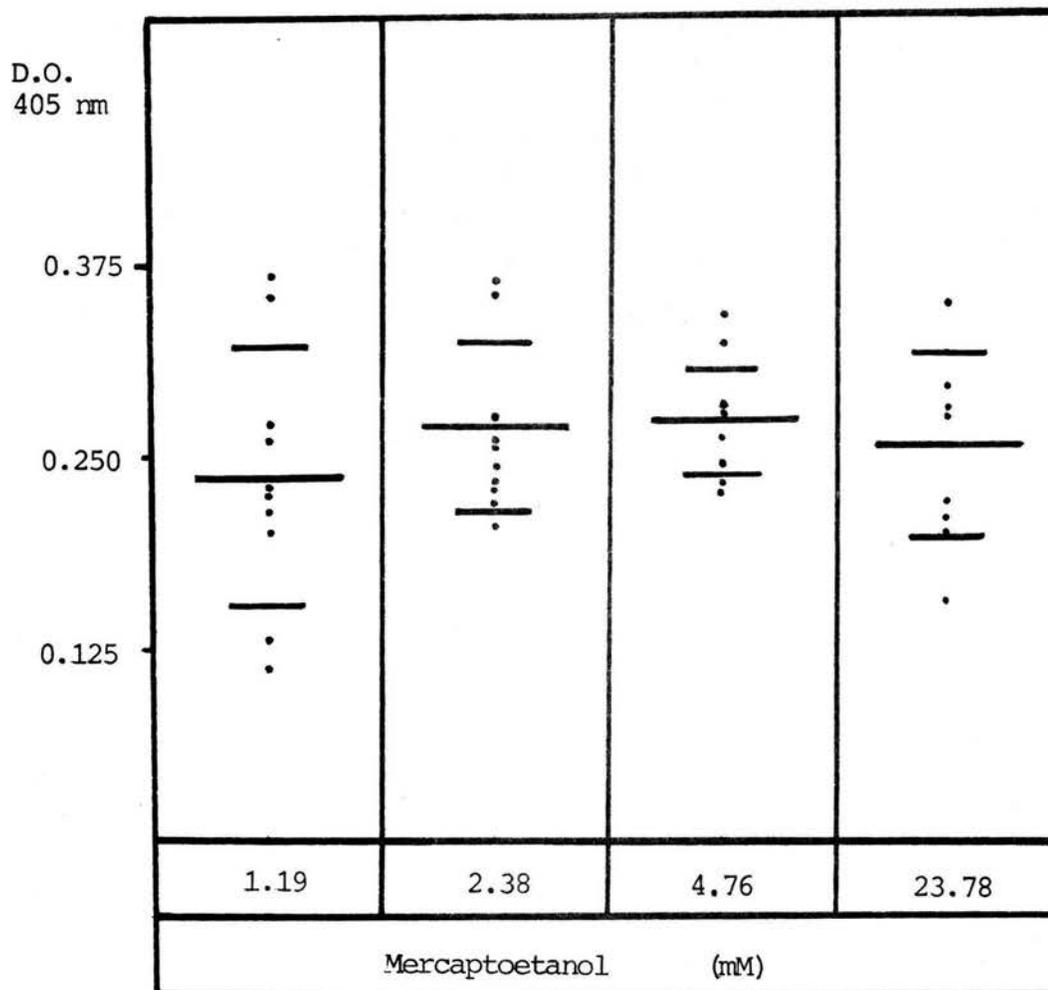


Diagrama de dispersión que muestra el efecto de distintas concentraciones de mercaptoetanol sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. El efecto de distintas concentraciones de mercaptoetanol no difirió significativamente al comparar las medias de los distintos grupos por análisis de varianza ( $p$  mayor de 0.05,  $n = 10$ ).

TABLA No. 3 SUSTRATO ADAL

POBLACION SANA	SEXO	EDAD	SUSTRATO ADAL mM				
			0,6	1,5	3,0	6,0	15,0
			D-PBG (Densidad óptica 405 nm)				
F		17 A	0.302	0.287	0.309	0.306	0.336
M		36 A	0.223	0.229	0.243	0.225	0.271
F		28 A	0.265	0.256	0.271	0.306	0.243
M		22 A	0.291	0.334	0.351	0.343	0.318
M		26 A	0.279	0.258	0.338	0.240	0.245
F		17 A	0.226	0.246	0.296	0.276	0.279
M		20 A	0.243	0.249	0.277	0.272	0.255
M		28 A	0.364	0.354	0.383	0.389	0.363
F		26 A	0.289	0.346	0.343	0.360	0.384
F		41 A	0.323	0.346	0.339	0.359	0.362
F		23 A	0.306	0.285	0.338	0.335	0.372
M		43 A	0.292	0.285	0.275	0.291	0.305
F		17 A	0.232	0.242	0.231	0.243	0.253
M		25 A	0.217	0.290	0.239	0.244	0.302
F		38 A	0.294	0.325	0.348	0.321	0.336
$\bar{X} =$			0.2764	0.2888	0.3054	0.3007	0.3083
s =			0.0418	0.0426	0.0474	0.0504	0.0491

ANALISIS ESTADISTICO:

ANALISIS DE VARIANZA

Varianza calculada 1.22

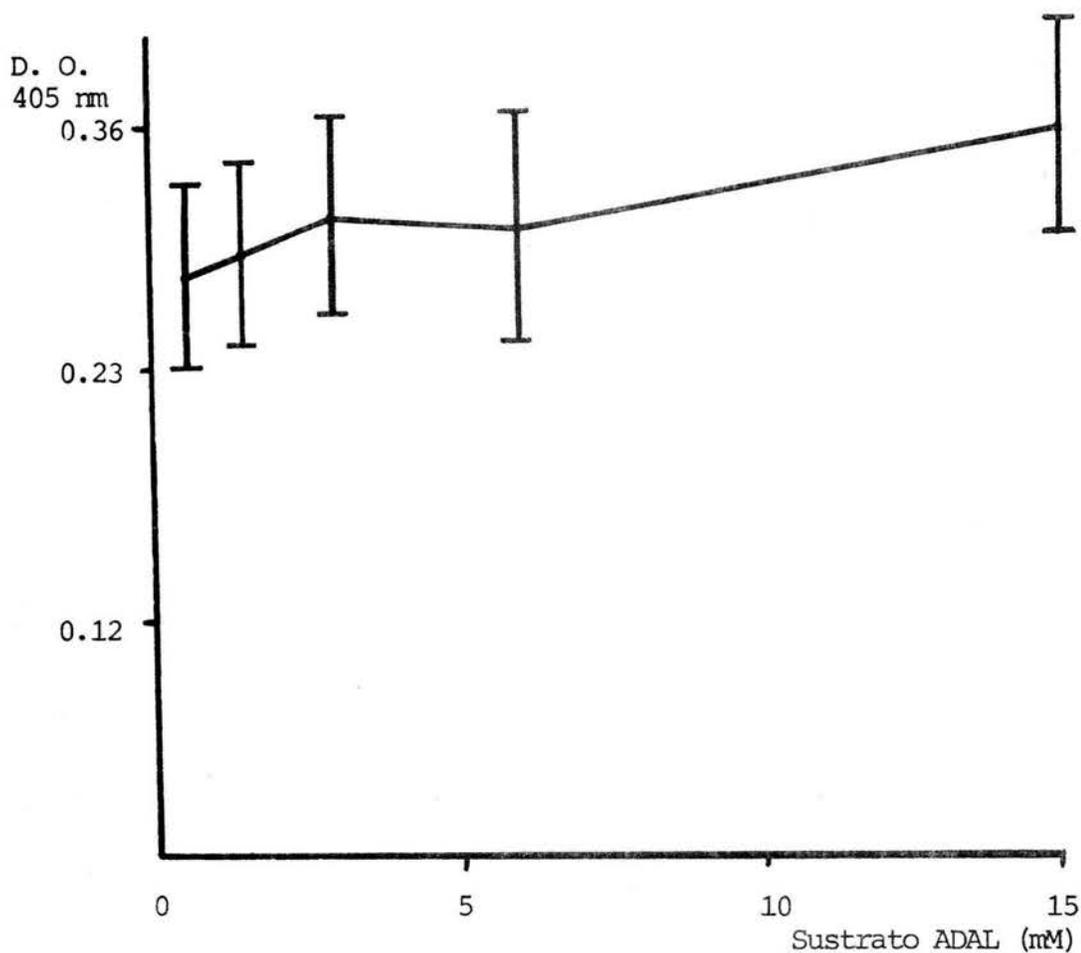
F tablas 2.53

p mayor de 0.05

Conclusión: No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias correspondientes a cada uno de los distintos tratamientos.

Efecto de distintas concentraciones de ácido delta-aminolevulínico en el sistema de análisis funcional de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 4 SUSTRATO ADAL



Efecto producido por el incremento en la concentración de sustrato ácido delta-aminolevulínico sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. Las diferencias entre las medias no resultaron significativas al ser comparadas por análisis de varianza ( $p$  mayor de 0.05,  $n = 15$ ). Las barras representan la  $\bar{X} \pm s$  de 15 experimentos para cada uno de 5 tratamientos.

TABLA No. 4 SUSTRATO ADAL vs TIEMPO DE INCUBACION

Incubación (hrs)	POBLACION SANA				SEXO / EDAD				ADAL (mM)
	M 22 A	F 23 A	F 24 A	F 23 A	F 21 A	M 43 A			
	D-PBG (Densidad óptica 405 nm)								
1	0.128	0.144	0.226	0.079	0.124	0.127		0.6	
2	0.291	0.378	0.292	0.427	0.307	0.308			
4	0.585	0.607	0.394	0.410	0.501	0.521			
8	0.839	1.222	0.883	0.733	0.880	0.793			
12	1.240	1.170	0.505	1.222	1.300	1.145			
24	1.336	1.585	1.065	1.655	1.830	1.415			
1	0.110	0.186	0.183	0.124	0.134	0.157		1.5	
2	0.360	0.426	0.299	0.291	0.317	0.267			
4	0.621	0.616	0.366	0.411	0.555	0.584			
8	0.885	1.103	0.972	0.785	0.850	0.910			
12	1.332	1.365	0.485	1.025	1.490	1.550			
24	1.984	2.170	1.560	2.055	2.120	2.665			
1	0.128	0.191	0.226	0.094	0.156	0.149		6.0	
2	0.381	0.398	0.377	0.263	0.305	0.315			
4	0.656	0.619	0.460	0.395	0.583	0.649			
8	1.088	1.197	1.165	0.969	1.107	1.220			
12	2.008	1.765	0.695	1.880	1.985	1.985			
24	4.264	4.380	2.555	3.820	4.195	4.010			

ANALISIS ESTADISTICO:

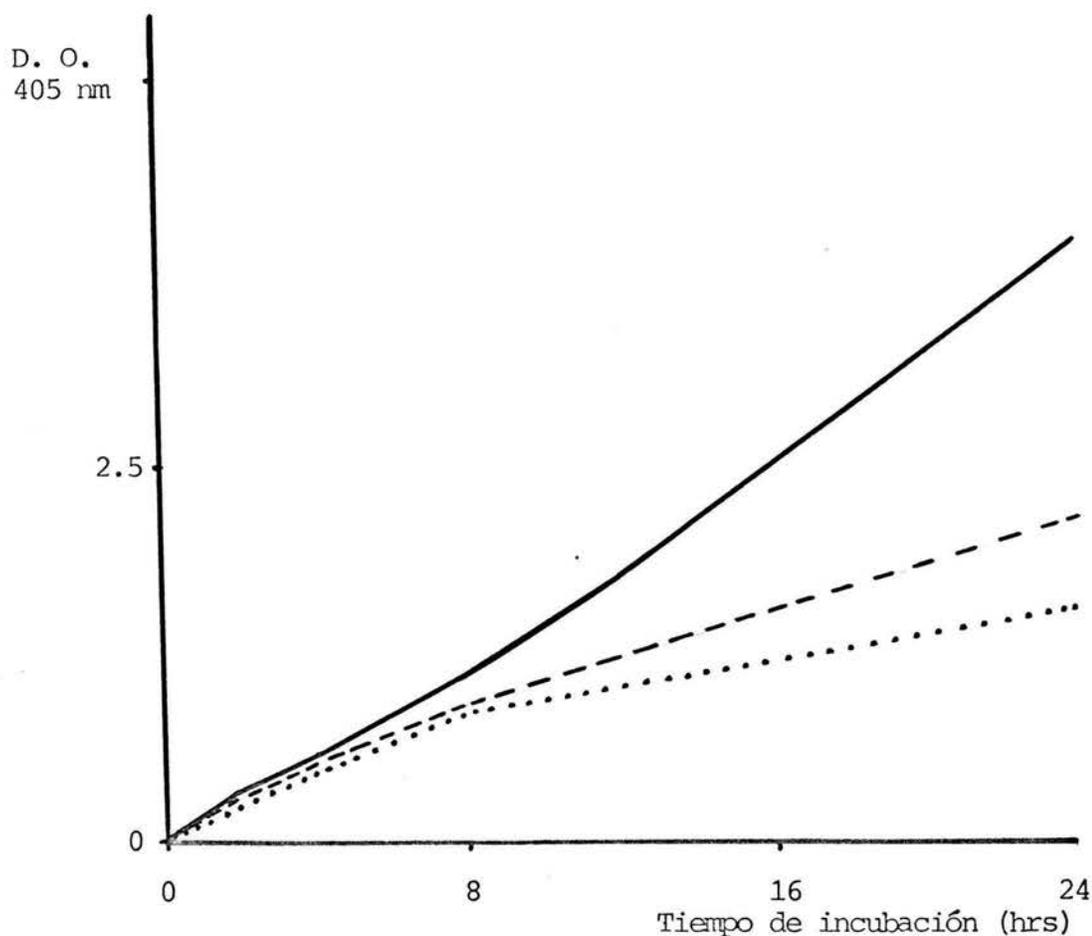
ANALISIS DE VARIANZA (SISTEMA FACTORIAL)

Varianza calculada:		F 0.995 (Tablas)
Sustrato vs tiempo:	20.026	2.9
Sustrato ADAL	43.5	5.79
Tiempo de incubación	190.91	3.76

p menor de 0.005

Conclusión: El efecto conjunto de tiempo y temperatura de incubación resulta significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 5 SUSTRATO ADAL vs TIEMPO DE INCUBACION



Efecto del incremento simultáneo en el tiempo de incubación y la concentración de sustrato ácido delta-aminolevulínico sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. Se utilizaron concentraciones de ácido delta-aminolevulínico de 0.6 mM (...), 1.5 mM (- - -) y 6.0 mM (----). Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (sistema factorial) encontrándose que el aumento conjunto en el tiempo de incubación y la concentración de sustrato tiene un efecto significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno ( $p$  menor de 0.005,  $n = 6$ ). El incremento en la producción de uroporfirinas ocurrió de manera lineal hasta un tiempo máximo de incubación de 24 hrs. La densidad óptica graficada para incubaciones de 12 y 24 hrs es el resultado de multiplicar por el factor de dilución requerido para la lectura.

TABLA No. 5 pH vs TEMPERATURA

POBLACION SANA		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	pH
SEXO	EDAD	D-PBG	(Densidad óptica			405 nm)	T°
M	43 A	0.095	0.342	0.676	0.634	0.525	
F	25 A	0.095	0.365	0.714	0.742	0.619	
F	24 A	0.097	0.375	0.659	0.670	0.580	
M	22 A	0.055	0.385	0.819	0.847	0.695	
F	37 A	0.178	0.405	0.643	0.701	0.619	
M	24 A	0.135	0.431	0.779	0.806	0.733	
M	21 A	0.121	0.333	0.567	0.588	0.557	<u>37°C</u>
M	30 A	0.214	0.374	0.592	0.592	0.538	
M	37 A	0.039	0.292	0.590	0.657	0.504	
F	23 A	0.043	0.312	0.694	0.709	0.537	
F	24 A	0.024	0.214	0.502	0.502	0.390	
M	28 A	0.079	0.285	0.549	0.560	0.384	
M	43 A	0.272	0.741	0.847	0.908	1.199	
F	25 A	0.385	0.804	1.141	1.086	0.820	
F	24 A	0.423	0.851	1.062	1.002	0.729	
M	22 A	0.548	1.093	1.409	1.295	0.935	
F	37 A	0.442	0.744	1.060	1.061	0.778	
M	24 A	0.378	0.879	1.186	1.067	0.967	
M	21 A	0.422	0.681	0.943	0.975	0.742	<u>45°C</u>
M	30 A	0.421	0.656	0.907	0.914	0.796	
M	37 A	0.351	0.708	1.053	0.956	0.710	
F	23 A	0.290	0.761	1.161	1.038	0.681	
F	24 A	0.286	0.591	0.856	0.790	0.550	
M	28 A	0.117	0.434	0.589	0.706	0.349	

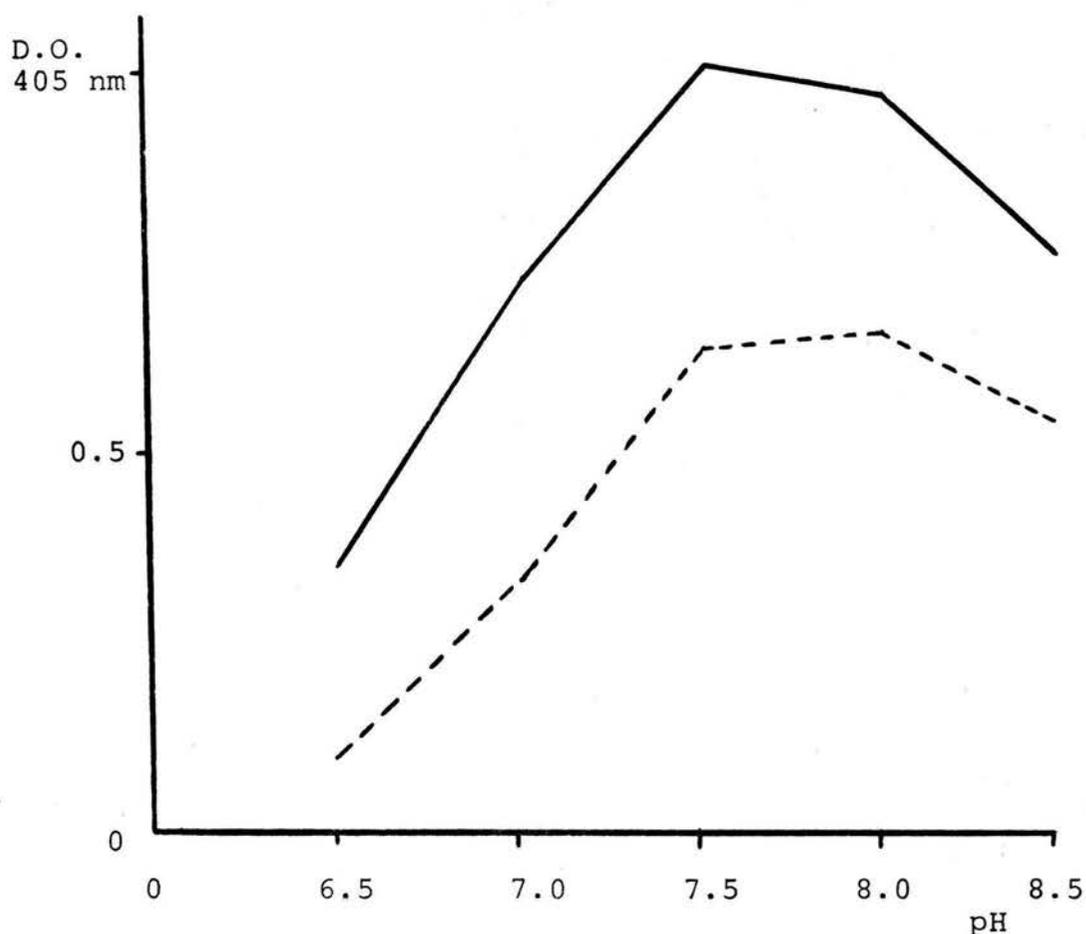
ANALISIS ESTADISTICO:

ANALISIS DE VARIANZA (SISTEMA FACTORIAL)

Varianza calculada:	F 0.095	F 0,995	
T° vs pH	1.87	2.5	p mayor de 0.05
T°	158.1		8,49 p menor de 0.005
pH	79.9		4.14 p menor de 0.005

Conclusión: El efecto de pH y T° no resultó significativo, no obstante, el efecto independiente de cada uno de estos factores sí resultó significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 6 pH vs TEMPERATURA



Efecto del incremento simultáneo en el pH y la temperatura sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. Se estudiaron valores de temperatura de 37°C (- - -) y 45°C (—). Los resultados fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (sistema factorial) encontrándose que el efecto conjunto del pH y la temperatura no fué significativo sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno ( $p$  mayor de 0.05,  $n = 12$ ). El efecto independiente de ambos factores sí fué significativo ( $p$  menor de 0.005). El efecto del pH fué evaluado por la prueba de Duncan para comparaciones múltiples y no se encontraron diferencias significativas entre el efecto causado por un pH de 7.5 y de 8.0. Los restantes si difirieron significativamente en su efecto ( $p$  menor de 0.05,  $n = 12$ ).

TABLA No. 6 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS vs T°

POBLACION NORMAL		T° 4°C	T° AMBIENTE	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (hrs)
SEXO	EDAD	D-PBG (nmol/ml eritrocitos/2 hrs)		
F	23 A	155.55	155.55	
M	28 A	135.27	135.27	
M	22 A	161.93	161.93	<u>0.0</u>
F	23 A	133.32	133.32	
F	25 A	115.66	115.66	
F	23 A	175.56	170.38	
M	28 A	143.49	120.05	
M	22 A	172.32	147.70	<u>2.0</u>
F	23 A	144.93	123.09	
F	25 A	115.66	100.33	
F	23 A	191.56	152.02	
M	28 A	133.62	97.43	
M	22 A	151.55	135.00	<u>6.0</u>
F	23 A	146.12	106.37	
F	25 A	92.43	93.82	
F	23 A	156.26	160.02	
M	28 A	105.24	108.53	
M	22 A	151.55	148.47	<u>24.0</u>
F	23 A	139.82	124.49	
F	25 A	102.65	98.93	

ANALISIS ESTADISTICO:

ANALISIS DE VARIANZA

Varianza calculada: F 0.95

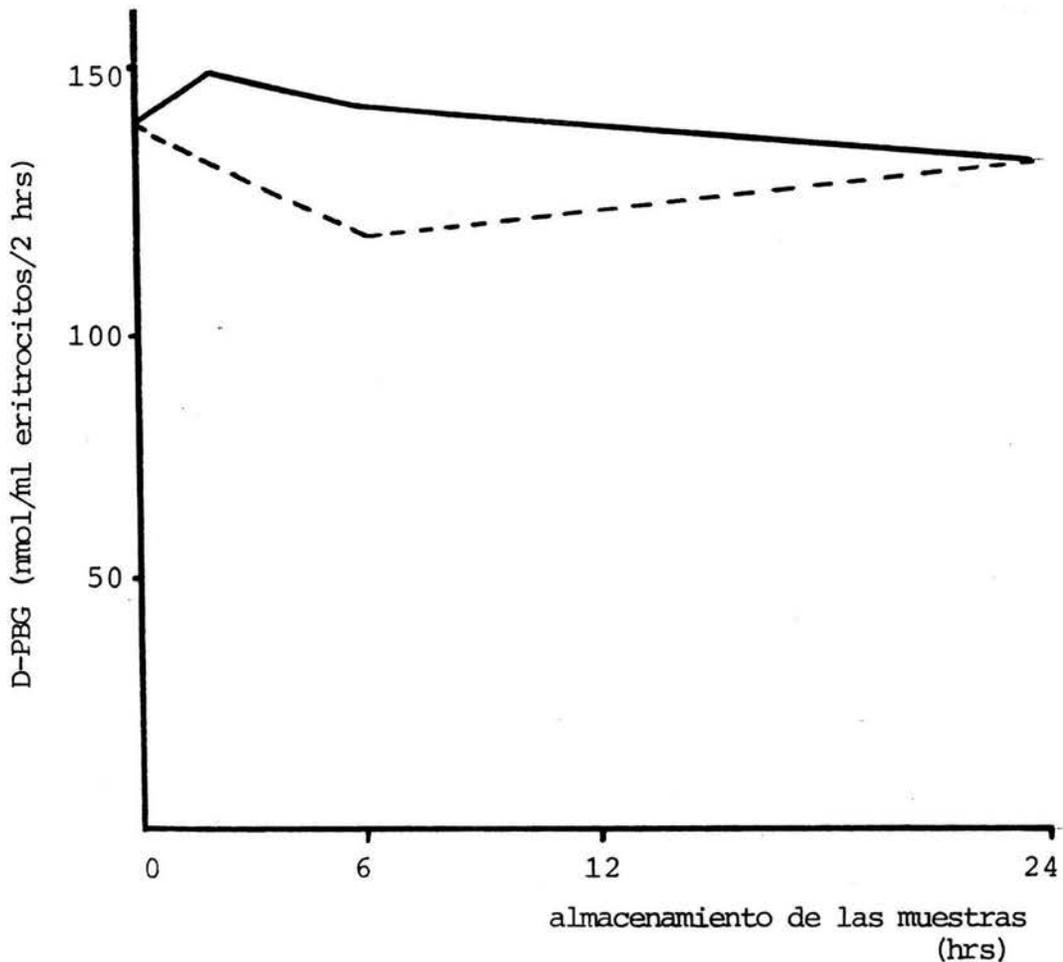
T° 4°C 0.794 3.24 p mayor de 0.05

T° ambiente 0.440 3.24 p mayor de 0.05

Conclusión: No existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Efecto del almacenamiento de las muestras sanguíneas a 4°C y a T° ambiente por periodos de hasta 24 horas sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno.

Figura No. 7 ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS vs TEMPERATURA



Efecto del tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y el procesado de las mismas sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno. Las muestras fueron conservadas a 4°C (—) o a temperatura ambiente (- - -). Cada uno de los tratamientos fué evaluado estadísticamente por análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas entre las medias correspondientes a cada uno de los tratamientos (  $p$  mayor de 0.05,  $n = 5$  ).

## Estudios familiares:

Se hicieron tres estudios familiares de pacientes con porfiria intermitente aguda. El número total de individuos incluidos en esta población fué de 18 personas, de las cuales, 11 tuvieron niveles de la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno por abajo de los valores de referencia previamente definidos (Fig. No. 8).

En la primera familia, la propósa (II-2, Fig. No.9) mostró niveles de actividad de la desaminasa del porfobilinógeno en los límites normales inferiores establecidos para la evaluación funcional de esta enzima y presentó una elevación discreta en el porfobilinógeno urinario. Uno de sus hermanos (II-3, Fig. No. 9) tuvo una actividad disminuída de la desaminasa del porfobilinógeno, aún cuando clínicamente nunca había presentado síntomas de porfiria intermitente aguda y la excreción de sus metabolitos (ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno) resultó normal.

En la segunda familia, la propósa (II-7, Fig. No. 10) mostró actividad disminuída de la desaminasa del porfobilinógeno y excreción normal del ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno y ausencia de porfirinas en heces. Tres de sus hermanas (II-2, II-6 y II-8; Fig. No. 10) también tuvieron actividad enzimática disminuída y solamente una de ellas (II-8; Fig. No. 10) mostró una elevación discreta de porfobilinógeno urinario.

En la tercera familia, la propósa (II-3; Fig. No. 11) fué estudiada durante una crisis de porfiria intermitente aguda, en este periodo alcanzó elevaciones impor-

tantes en los valores urinarios de ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno, en esta paciente la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno estuvo disminuída. La paciente se encontró hospitalizada debido a paro respiratorio y paraplejia. En el estudio familiar se detectaron como portadores de porfiria intermitente aguda a una hermana, dos hijos y al padre de la propósa (Fig. No. 11); todos ellos presentaron excreciones anormalmente elevadas de ácido delta-aminolevulínico y/ó porfobilinógeno y refirieron síntomas clínicos de dolor abdominal.

#### Otras porfirias:

Los pacientes con otros tipos de porfiria tuvieron actividad normal o aumentada de la desaminasa del porfobilinógeno (Fig. No. 8).

Figura No. 8 POBLACION ESTUDIADA

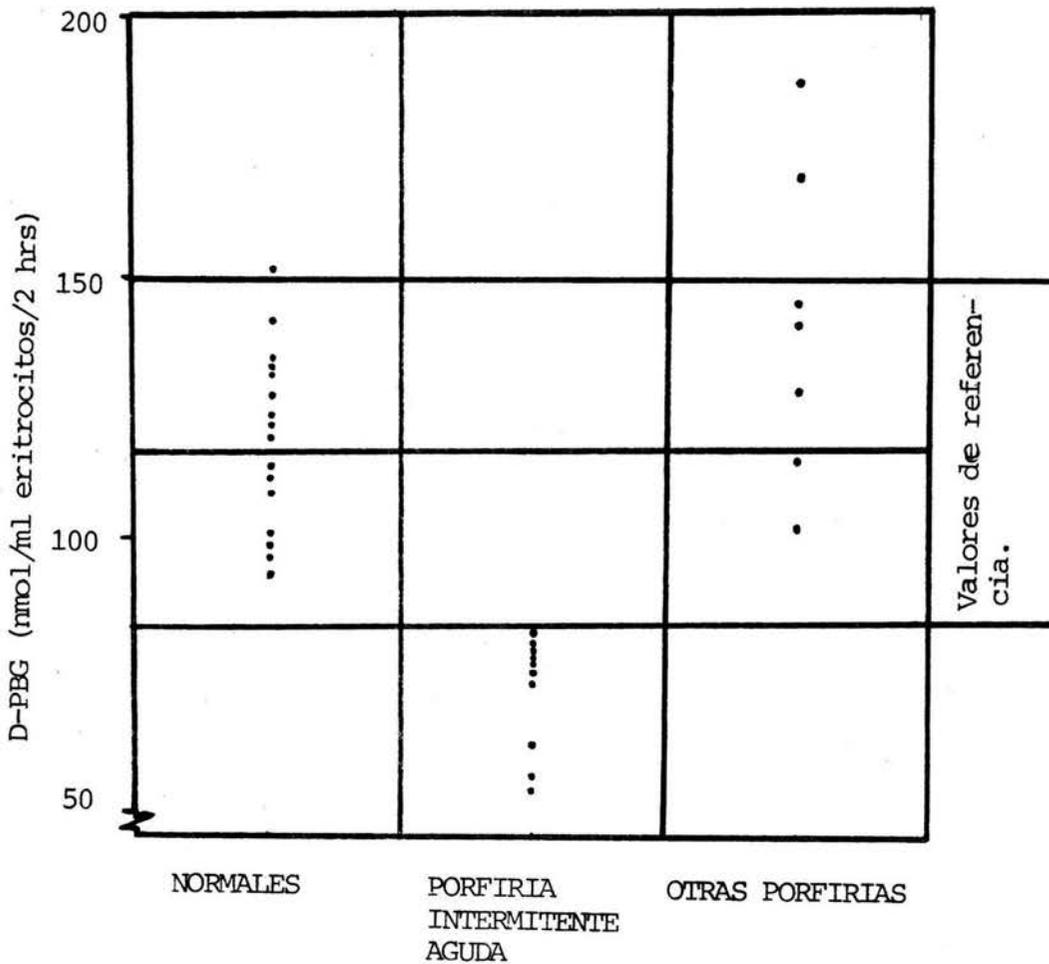
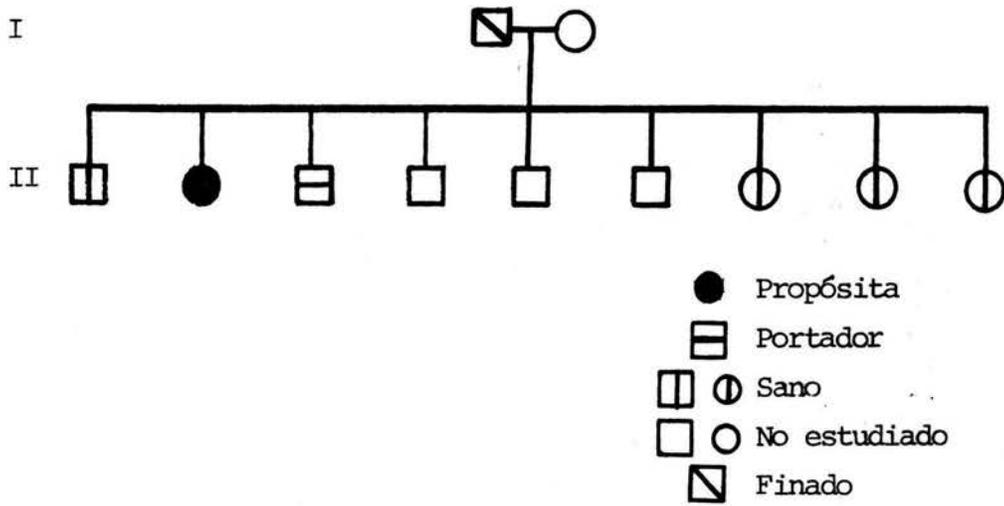


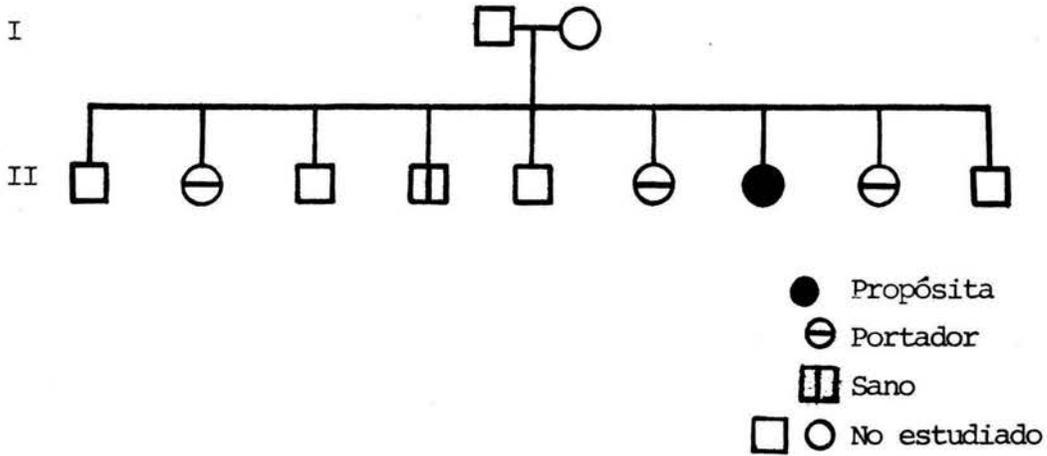
Diagrama de dispersión que muestra la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno en personas normales (n = 23), portadores de porfiria intermitente aguda (n = 11) y pacientes con otros tipos de porfirias: protoporfiria eritropoyética (n = 1), coproporfiria hereditaria (n = 1) y porfiria variegata (n = 5). Se estableció el diagnóstico de porfiria intermitente aguda en aquellos individuos que mostraron una actividad de la desaminasa del porfobilinógeno por debajo del límite inferior de referencia. Los valores de referencia corresponden al intervalo comprendido entre la  $\bar{X}$  normal  $\pm 2$  s.

Figura No. 9 ESTUDIOS FAMILIARES Familia No. 1



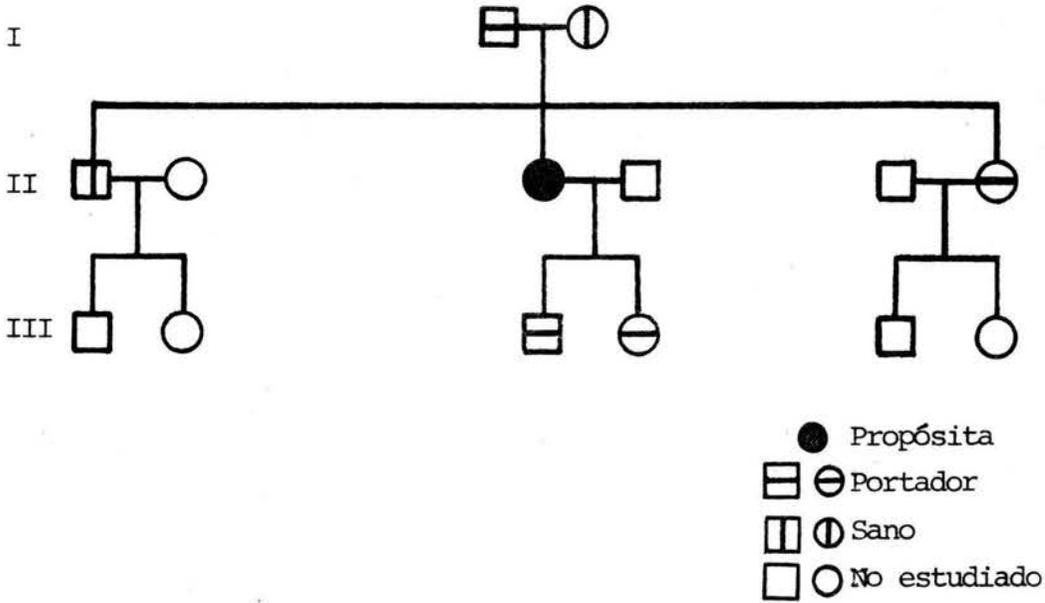
	D-PBG (nmol/ml eritr/2 h)	ADAL (mg/lt)	PBG (mg/24 h)	PORFIRINAS FECALES
II-1	102.53	-	-	-
II-2	84.6	2.8	2.4	-
II-3	75.76	0.5	0.56	-
II-7	95.67	1.75	1.87	-
II-8	92.46	4.8	2.4	-
II-9	117.3	2.5	2.2	-
Valores de referencia	83-148	0-5	0-2	negativo

Figura No. 10 ESTUDIOS FAMILIARES Familia No. 2



	D-PBG (nmol/ml eritr/2 h)	ADAL (mg/l)	PBG (mg/24 h)	PORFIRINAS FECALES
II-2	82.03	0.5	0.75	negativo
II-4	86.09	0.5	0.37	-
II-6	63.5	1.18	0.94	negativo
II-7	80.9	0.5	0.36	negativo
II-8	75.64	1.12	2.44	negativo
Valores de referencia	83-148	0-5	0-2	negativo

Figura No. 11 ESTUDIOS FAMILIARES Familia No. 3



	D-PBG (nmol/ml erit/2 h)	ADAL (mg/lt)	PEG (mg/24 h)	PORFIRINAS FECALES
I-1	55.18	4.13	34.31	negativo
I-2	133.66	-	--	negativo
II-1	103.99	2.82	2.0	negativo
II-3	79.2	31.0	306.85	negativo
II-5	77.21	14.9	46.87	+ +
III-3	57.39	3.05	6.9	negativo
III-4	79.71	2.77	7.12	negativo
Valores de referencia	83-148	0-5	0-2	negativo

## Discusión:

El diagnóstico de las porfirias de basa en aspectos clínicos y de laboratorio. Un diagnóstico clínico es factible cuando el padecimiento cursa en una fase aguda o bien existen manifestaciones gastrointestinales o neuropsiquiátricas leves debidas a una acumulación crónica de los metabolitos del hemo (14). No obstante por ser un cuadro clínico atípico puede ser confundido con otros padecimientos abdominales para el caso de las porfirias agudas (5) y con una amplia variedad de fotodermatitis para los casos de porfirias en que ocurre sensibilidad dérmica a la radiación solar (2).

Las porfirias agudas, entre las que la porfiria intermitente aguda destaca por su frecuencia y gravedad (11-13), se caracterizan por periodos críticos que abundan en manifestaciones neuropsiquiátricas y gastrointestinales seguidos de periodos asintomáticos. Individuos genéticamente portadores de porfiria intermitente aguda pueden permanecer asintomáticos durante toda su vida (15), especialmente si no se ven expuestos a los agentes químicos que se sabe favorecen la expresión clínica de este padecimiento.

Las anormalidades de la excreción de los metabolitos del hemo características de la porfiria intermitente aguda se presentan únicamente cuando los pacientes tienen sintomatología clínica (14). Se requiere un conjunto de pruebas en la búsqueda de metabolitos urinarios y fecales (23-31), las que resultan ineficaces en la detec-

ción de portadores asintomáticos de este padecimiento cuya excreción es normal.

Debido al carácter farmacogenético de la porfiria intermitente aguda, es de capital importancia la detección de portadores asintomáticos para evitar la exposición a los agentes porfirogénicos conocidos (15). De esta manera, y debido a la elevada mortalidad registrada en sujetos que caen en crisis de porfiria intermitente aguda (14), no es exagerado afirmar que la detección de portadores asintomáticos puede prevenir un desenlace fatal.

La prueba crítica para la detección de portadores de porfiria intermitente aguda consiste en medir la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno, enzima cuya deficiencia es responsable de este padecimiento (43). El análisis espectrofluorométrico de las uroporfirinas formadas por esta enzima a partir de la utilización de porfobilinógeno como sustrato, es la técnica más empleada para este propósito (32-41), sin embargo, ofrece dificultades técnicas tales como la inestabilidad del sustrato que requiere ser preparado inmediatamente antes del análisis, que impiden su uso generalizado.

La utilización de ácido delta-aminolevulínico como sustrato, y espectrofotometría de luz visible como medida de cuantificación de la actividad enzimática, permite que la técnica sea asequible, económica y técnicamente sencilla. Teniendo en cuenta la sensibilidad menor del espectrofotómetro de luz visible en la detección de uro-

porfirinas, resultó evidente la necesidad de investigar aquellos factores que favorecen la cinética de las enzimas involucradas en el análisis. Así, la introducción de mercaptoetanol en la mezcla de análisis, contribuyó a la producción de cantidades significativamente mayores de uroporfirinas debido, probablemente, a que mantiene reducidos los grupos sulfhidrilo de la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico (52). El pico de absorción a 405 nm comprueba la efectividad del bloqueo enzimático sobre la descarboxilasa del uroporfirinógeno (48-49) y la formación de un tipo único de porfirinas asegura una sensibilidad mayor con la cuantificación espectrofotométrica. Se recurrió a un sistema de análisis factorial para elegir el tiempo de incubación y la concentración óptima de sustrato debido a que existe una interrelación de estos factores, ya que el efecto conjunto fué significativo.

Puesto que el almacenamiento de las muestras de sangre a temperatura ambiente no redundó significativamente sobre la actividad de la desaminasa del porfobilinógeno resulta posible que las muestras sean referidas al lugar de análisis sin decremento en la significación de los resultados; de cualquier manera, aún cuando las diferencias no fueron significativas, se recomienda conservar las muestras a 4°C si no se realiza el análisis antes de 24 horas.

Los coeficientes de variación intraanálisis e interanálisis se sujetan a los límites aceptados convencionalmente y reflejan la reproducibilidad de este sistema em-

pleado en la cuantificación funcional de la desaminasa del porfobilinógeno.

En los estudios familiares, además de reafirmarse el diagnóstico de los propósitos, se detectaron ocho portadores de porfiria intermitente aguda, tres de los cuales resultaron con excreciones normales de ácido delta-aminolevulínico y porfobilinógeno. Estos hallazgos corroboran la eficacia del método aquí descrito para la detección de portadores asintomáticos de porfiria intermitente aguda e ilustran la necesidad de los estudios familiares en sujetos que sufren este padecimiento.

## Referencias:

- 1.- Sassa, S. y Kappas, A. 1981. Genetic, metabolic and biochemical aspects of the porphyrias. *ADV HUM GENET* 11: 121-231.
- 2.- Kappas, A, Sassa, S. y Anderson K. E. 1983. The porphyrias. En Stanbury, J. B. et al (eds). *The metabolic basis of inherited diseases*. McGraw Hill. E.U. p. 1301-1384.
- 3.- Molina Ballesteros, G. et al. 1977. Porfirias. *GACETA MEDICA DE MEXICO* 113(4):191-195.
- 4.- Hindmarsh, J. T. 1986. The porphyrias: Recent advances. *CLIN CHEM* 32(7):1255-1263.
- 5.- Edit. Lancet. 1985. Latent acute hepatic porphyria. *LANCET* 1(8422):197-198.
- 6.- Flores, J. et al. 1960. Porfiria. Estudio de cinco casos. *REV GASTROENTEROLOGIA DE MEXICO* 25:37-53.
- 7.- Moreno, J. 1982. Porfiria aguda intermitente e insuficiencia renal. *ARCH MED Y CIRUGIA (PUEBLA)* 3(2):67-69.
- 8.- Sánchez-Anzaldo, F.J. et al. 1985. Porfirias en una población con presión de selección. *MEMORIAS DEL X CONGRESO NACIONAL DE GENETICA HUMANA*. Oaxaca, Oax. México.

- 9.- Goldberg, A. 1985. Molecular genetics of the acute intermittent porphyria. BRITISH MED J 291:499-500.
- 10.- Benhamou, C. L. 1981. Les porphyries. NOUV PRESS MED 10(43):3537-3538.
- 11.- McColl, K. et al. 1982. Alterations in haem biosynthesis during the human menstrual cycle: studies in normal subjects and patients with latent and active intermittent porphyria. CLIN SCI 62(2):183-191.
- 12.- Moore, M. R. 1980. International review of drugs in acute porphyria-1980. INT J BIOCHEM 12:1089-1097.
- 13.- Magnus, I. A. 1984. Drugs and porphyria. BRITISH MED J. 288:1474-1475.
- 14.- Yeung, A. et al. 1983. Carbamazepine-induced non hereditary acute porphyria. LANCET. 1(8328):790-792.
- 15.- Kreimer-Birnbaum, M. 1975. Uroporphyrinogen synthase in human blood: developmental studies. LIFE SCI 17: 1473-1478.
- 16.- Sassa, S. et al. 1975. Studies in porphyria IV. Expression of the gene defect of acute intermittent porphyria in cultured human skin fibroblasts and amniotic cells: prenatal diagnosis of the porphyric trait. J. EXP MED 142:722-731.

17.- Sassa, S. et al. 1978. Studies in porphyria VII. Induction of uroporphyrinogen I synthase and expression of the gene defect of acute intermittent porphyria in mitogen stimulated human lymphocytes. J CLIN INVEST 61: 499-508.

18.- Anderson, P. M. et al. 1981. Characterization of the porphobilinogen deaminase deficiency in acute intermittent porphyria. Immunologic evidence for heterogeneity of genetic defect. J CLIN INVEST 68:1-12.

19.- Desnick, R. et al. 1985. Acute intermittent porphyria: Characterization of a novel mutation in the structural gene for porphobilinogen deaminase. Demonstration of noncatalytic enzyme intermediates stabilized by bound substrate. J CLIN INVEST 76(2):865-874.

20.- Mustajoki, P. 1981. Normal erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in kindred with acute intermittent porphyria. ANN INTERN MED 95:162-166.

21.- Mustajoki, P. y Desnick, R. 1985. Genetic heterogeneity in acute intermittent porphyria: Characterization and frequency of porphobilinogen deaminase mutations in Finland. BRITISH MED J 291:505-509.

22.- Miyagi, K. et al. 1979. Uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes: Separation, purification and properties of isoenzymes. PROC NATL ACAD SCI USA 76(12): 6172-6176.

- 23.- Anderson, P. M. y Desnick, R. J. 1980. Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. Identification of stable enzyme-substrate intermediates. J BIOL CHEM 255(5):1993-1999.
- 24.- Fumagalli, S. A. et al. 1985. Human red cell porphobilinogen deaminase. A simpler method of purification and some unusual properties. INT J BIOCHEM 17(4):485-494.
- 25.- Meisler, M. et al. 1980. The UPS locus encoding uroporphyrinogen I synthase is located on chromosome 11. BIOCHIM BIOPHYS RES COMM 95(1):170-176.
- 26.- Wang, A. L. 1981. Regional gene assignment of human porphobilinogen deaminase and esterase A<sub>4</sub> to chromosome 11q23-11qter. PROC NATL ACAD SCI USA 78(9):5734-5738.
- 27.- De Verneuil, H. et al. 1982. Assignment of human uroporphyrinogen I synthase locus to region 11qter by dosage effect. HUM GENET 60:212-213.
- 28.- Mc Kusick, V. et al. 1986. The morbid anatomy of human genome: A review of mapping in clinical medicine. MEDICINE 65(1):1-33.
- 29.- Schwartz, S. et al. 1960. Determination of porphyrins in biological materials. METHODS BIOCHEM ANAL VIII: 221-293.
- 30.- Day, R. S., De Salamanca, R. E. y Eales, L. 1978. Quantitation of red cell porphyrins by fluorescence scanning after thin layer chromatography. CLIN CHIM ACTA 89: 25-33.

- 31.- Straka, J. et al. 1981. High performance liquid chromatography of porphyrin esters. ANAL BIOCHEM 111: 269-275.
- 32.- Ford, R. et al. 1981. Liquid chromatographic analysis for urinary porphyrins. CLIN CHEM 27(3):397-401.
- 33.- Jakson, A. et al. 1982. Analysis and separation of natural and synthetic mixtures of uroporphyrins by high performance liquid chromatography. BIOCHEM J 203:515-517.
- 34.- Wright, D. y Lim, Ch. K. 1983. Simultaneous determination of hidroximethylbilane synthase and uroporphyrinogen III synthase in erythrocytes by high performance liquid chromatography. BIOCHEM J. 213:85-88.
- 35.- Carlson, R. et al. 1984. An internal standard for porphyrin analysis. ANAL BIOCHEM 140:360-365.
- 36.- Jakson, A. et al. 1985. H. P. L. C. analysis of di- and tricarboxylic porphyrins in porphyric patients. BIOCHEM J. 227:327-331.
- 37.- Galbraith, R. A., Sassa, S. y Kappas, A. 1987. A comparison of the utility of Dowex resin and polybenzimidazole Aurorez resin in the determination of urinary porphobilinogen concentrations. CLIN CHIM ACTA. 164:235-239.
- 38.- Grandchamp. B, Grelier, M. y Normann, Y. 1975. Porphyrie aigue intermittente. Detection des porteurs asymptomatiques de la tare. NOUV PRESS MED 4(24):1801-1802.

39.- Grelier, M. et al. 1977. Detection de la porphyrie aigue intermittente par la dosage de l'urosynthetase. NOUV PRESS MED 6(14):1045-1047.

40.- Kreimer-Birnbaum, M., Bonkowsky, H. L. y Bottomley, S. S. 1980. Experience with the red cell uroporphyrinogen I synthase (URO-S) assay in kindreds with acute intermittent porphyria (AIP). INT J BIOCHEM 12:807-810.

41.- Bottomley, S. S., Bonkowsky, H. L. y Kreimer-Birnbaum, M. 1981. The diagnosis of acute intermittent porphyria. Usefulness and limitations of the erythrocyte uroporphyrinogen synthase assay. AM J CLIN PATHOL 76:133-139.

42.- Pierach, C. et al. 1987. Red blood cell porphobilinogen deaminase in the evaluation of acute intermittent porphyria. JAMA 257(1):60-61.

43.- Peterson, L. et al. 1976. Erythrocyte uroporphyrinogen I synthase activity in diagnosis of acute intermittent porphyria. CLIN CHEM 22(11):1835-1840.

44.- Piepkorn, M. et al. 1978. Modified erythrocyte uroporphyrinogen I synthase assay, and its clinical interpretation. CLIN CHEM 24(10):1751-1754.

45.- Chamberlain, B. y BATTERY, J. 1980. Reappraisal of the uroporphyrinogen I synthase assay, and a proposed modified method. CLIN CHEM 26(9):1346-1347.

- 46.- Brocklehurst, D. et al. 1980. The measurement of erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in the diagnosis of latent and acute intermittent porphyria. INT J BIO-CHEM 12:791-793.
- 47.- Meyer, U. et al. 1971. Intermittent acute porphyria - Demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism. NEW ENGL J MED 286(24):1277-1282.
- 48.- Granick, S. et al. 1972. Assays for porphyrins, delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphyrinogen synthase in microliter samples of whole blood: Applications to metabolic defects involving the heme pathway. PROC NATL ACAD SCI USA 69(9):2381-2385.
- 49.- Sassa, S. et al. 1974. A microassay for URO-I-S, one of the three abnormal enzyme activities in acute intermittent porphyria, and its application to the study of the genetics of this disease. PROC NATL ACAD SCI USA 71(3):731-736.
- 50.- Magnussen, C. R. et al. 1974. A red cell enzyme method for the diagnosis of acute intermittent porphyria. BLOOD 44(6):857-868.
- 51.- Grandchamp, B. et al. 1976. The spectrophotometric determination of uroporphyrinogen I synthetase activity. CLIN CHIM ACTA 70:113-118.
- 52.- Battle, A. M. del C. et al. 1978. A simple method for measuring erythrocyte porphobilinogenase, and its use in the diagnosis of acute intermittent porphyria.

INT J BIOCHEM 9:871-875.

53.- Ford, R. et al. 1980. Assay for erythrocyte uroporphyrinogen I synthase activity, with porphobilinogen as substrate. CLIN CHEM 26(8):1182-1185.

54.- Johansson, L. et al. 1984. A filter paper dry blood spot procedure for acute intermittent porphyria population screening by use of whole blood uroporphyrinogen I synthase assay. CLIN CHIM ACTA 137:317-331.

55.- Wigfield, D. y Farant, J. P. 1979. Factors influencing the pH activity relationship of delta-aminolevulinic acid dehydratase from human blood, and their relevance to blood lead assay. J ANAL TOXICOL. 3:161-168.

56.- Davis, J. y Andelman, S. 1967. Urinary delta-aminolevulinic acid levels in lead poisoning. A modified method for the rapid determination of urinary delta-aminolevulinic acid using disposable ion exchange chromatography columns. ARCH ENVIRON HEALTH 15:53-59.

57.- Holti, G. et al. 1958. An investigation of porphyria cutanea tarda Q J MED 27:1-17.