

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



ESTUDIO DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PORFIRINAS POR DIFERENTES
TÉCNICAS ANALÍTICAS: ASPECTOS CUANTI- Y CUALITATIVOS.

EL Autor



Paloma Sepúlveda Vizcaíno

VOBO

El director de la tesis



R. Enriquez de Salamanca Lorente

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Rafael Enriquez de Salamanca Lorente, Catedrático de Medicina Interna del Departamento de Medicina de esta Universidad Complutense: Certifico que el trabajo titulado "Estudio de la excreción urinaria de porfirinas por diferentes técnicas analíticas: aspectos cuantitativos y cualitativos", ha sido realizado por Dña. Paloma Sepúlveda Vizcaino bajo mi directa supervisión y dirección en la Unidad de Investigación sobre Porfirias que regento. Considero que el referido trabajo reúne la calidad y originalidad suficiente para optar al grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: FELICISIMA MILLA
(fecha y firma) 31-1-97
D.N.I.: 50138355

Fdo.: R. Enriquez de Salamanca
(fecha y firma) 27-1-1997
D.N.I.: 1.464.335

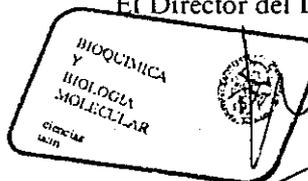
INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Se expone favorablemente.

Fecha reunión
Consejo Departamento

6 febrero - 1997

El Director del Departamento



Fdo.: _____
(fecha y firma)

A MIS PADRES, A MIGUEL

Y A TI MI AMOR.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Rafael Enriquez de Salamanca, por toda la orientación que me ha prestado y por haber puesto a mi alcance todos los medios necesarios para la realización de la presente Tesis Doctoral, sin su consejo y dirección no hubiera salido adelante.

También quisiera agradecer su colaboración y amistad a todos mis compañeros de la Unidad de Porfirias, ahora repartidos por todo el mundo, llevados por su gran labor investigadora, a todos ellos desde aquí les deseo muchos éxitos en sus respectivos trabajos.

Especial agradecimiento, merecen, como no mis padres. A ellos les debo todo, y por supuesto también la realización de esta tesis. Siempre confiaron en mi y nunca pusieron ningún tipo de trabas en mi carrera.

Desde aquí también una mención especial a Miguel, muchas gracias por ser como eres, espero que no cambies nunca y sigas manteniendo siempre tu alegría.

Finalmente quisiera agradecer la paciencia infinita que Juanjo, ha tenido conmigo en todo lo referente a la elaboración y presentación de esta Tesis, y también como no en todos los demás aspectos de nuestra vida en común.

INDICE:

CAPITULO I: INTRODUCCION

I.1. CONCEPTOS GENERALES

I.1.1. PORFIRINAS: Nomenclatura y propiedades

I.1.2. Biosíntesis del hemo

CAPITULO II: FISIOPATOLOGIA DE LA EXCRECION DE PORFIRINAS

CAPITULO III: PORFIRIAS Y PORFIRINOPATIAS

CAPITULO IV: OBJETIVOS

CAPITULO V: MATERIAL Y METODOS

V.1. MATERIAL

V.1.1. MATERIAL INSTRUMENTAL

V.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

V.1.3. REACTIVOS

V.1.4. PRODUCTOS

V.2. METODOS DE LABORATORIO

V.2.1. METODOS CUANTITATIVOS

1.1. Método de partición y extracción solvente de
Gajdos y Gajdos-Torok.

1.2. Métodos espectrofluorimétricos.

1.2.1. Método de Piomelli

1.2.2. Método de Westerlund et al.

V.2.2. METODOS CUALITATIVOS

- 2.1. Individualización de carboxilporfirinas
- 2.2. Determinación de las de fracciones COPRO y URO a partir de los máximos de excitación.
- 2.3. Valoración de la excreción urinaria de porfirinas.

V.3. METODOS ESTADISTICOS

- 3.1. Análisis de la varianza (ANOVA). Test a posteriori de Scheffé.
- 3.2. T-Student (Determinar si la pendiente difiere de 1).
- 3.3. Regresión lineal.
- 3.4. Test Welch (Comparación de pendientes).
- 3.5. Test no paramétrico de Mann-Whitney (muestras independientes).
- 3.6. Test no paramétrico Wilcoxon (muestras apareadas).
- 3.7. Test de Friedman.
- 3.8. Transformación logarítmica.

CAPITULO VI: RESULTADOS Y COMENTARIOS

- VI.1. Comparación de los datos obtenidos tras la determinación urinaria de porfirinas por diferentes métodos analíticos.
- VI.2. Recuperación y variabilidad del método de Westerlund.
- VI.3. Elaboración de rectas patrón para estimar fracciones COPRO y URO a partir de porfirinas totales.
- VI.4. Estudio de la excreción urinaria de porfirinógenos en individuos normales y en pacientes con PCT y PIA.

VI.5. Estudio del ritmo nictameral de la excreción urinaria de porfirinas en individuos normales.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES.

CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA

CAPITULO I: INTRODUCCION.

I.1. CONCEPTOS GENERALES

I.1.1. PORFIRINAS: Nomenclatura y propiedades

Las porfirinas son tetrapirroles cíclicos carentes de metal, que participan en procesos fundamentales de los seres vivos como grupos prostéticos de una gran variedad de hemoproteínas. Estas hemoproteínas tienen diferentes funciones entre las que podemos destacar:

- Unión reversible con el oxígeno: hemoglobina, mioglobina.
- Reacciones con el oxígeno molecular: Citocromo P-450 (monoxigenasa), Triptofano oxigenasa (dioxigenasa), Citocromo oxidasa (oxidasa).
- Reacciones con peróxidos : Peroxidasas, Catalasa.
- Reacciones de transferencia de electrones: Citocromos.

En los organismos fotosintéticos, el camino de las porfirinas se deriva hacia la rama de las clorofilas y bacterioclorofilas y en algunas bacterias hacia la síntesis de corrinas. Las clorofilas son derivados de las porfirinas en las que la estructura básica es el anillo de clorina en el que el puente metilénico gamma es sustituido por el anillo de ciclopentanona. También existe otra modificación que es la esterificación del carbono en posición 7 por un alcohol graso de cadena larga que es el fitol que le sirve a la clorofila para poder anclarse en la membrana tilacoidal, dado que las clorofilas están inmersas en un ambiente hidrofóbico y el tetrapirrol es una molécula polar. (1)

El anillo de corrina es característico de la vitamina B12, en el que el puente metilénico δ se pierde y presenta grupos amida en lugar de carboxilos; se forma a partir del uroporfirinogeno III.

El núcleo básico de todas las porfirinas viene representado por la porfina, tetrapirrol cíclico de síntesis, sin cadenas laterales. Está formada por cuatro anillos pirrólicos denominados A, B, C y D en el sentido de las agujas del reloj, unidos entre sí por enlaces metilénicos (α , β , γ , δ).⁽²⁾

La nomenclatura de las porfirinas fue desarrollada inicialmente por Fischer (3); posteriormente "The International Union of Pure and Applied Chemists" (IUPAC) IUPAC-IUB.⁽⁴⁾ intentó instaurar una nueva nomenclatura, pero la de Fischer sigue siendo la más utilizada en la mayoría de los trabajos (Fig.1).

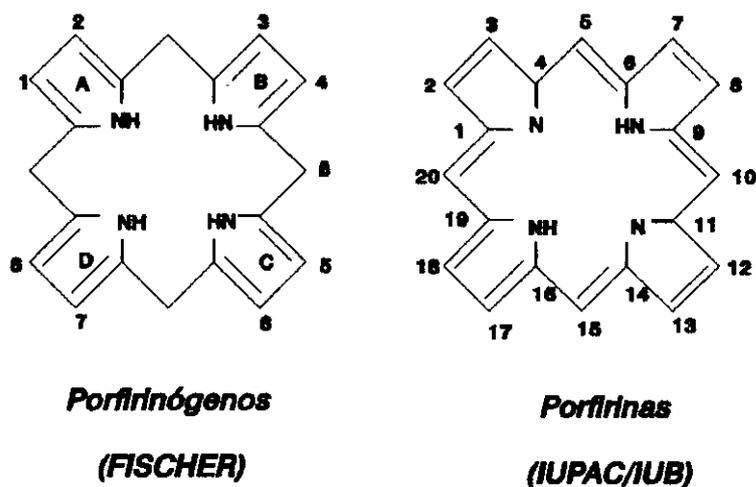


Fig.1. Estructura básica de los porfirinógenos y porfirinas con indicación de los sistemas de numeración.

Las porfirinas son compuestos conjugados cuyos átomos de carbono son trigonales, por lo tanto estas moléculas constituyen una estructura resonante, rígida y muy estable.

Las formas reducidas de las porfirinas son los porfirinógenos. La diferencia estructural entre ambas formas radica en la presencia de dobles enlaces conjugados en la forma oxidada, enlaces que confieren a la molécula las propiedades de estabilidad y fluorescencia roja bajo la luz ultravioleta.

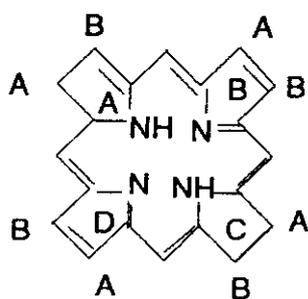
Los porfirinógenos son compuestos sin color, intermediarios naturales en la síntesis del hemo, clorofila y corrina. Pueden obtenerse por reducción de las porfirinas con amalgama de sodio-mercurio; son inestables y rápidamente se oxidan a porfirinas por exposición al oxígeno atmosférico, especialmente bajo condiciones de acidez (5). La estructura de las diferentes porfirinas depende de la sustitución de los hidrógenos situados en los carbonos periféricos de los anillos pirrólicos de la porfina, por diferentes grupos funcionales. Existen ocho posiciones que pueden ser sustituidas, dando lugar a diferentes porfirinas (Tabla 1).

Tabla 1. Nomenclatura de los isómeros de las porfirinas existentes en la naturaleza. Numeración de sus cadenas laterales.

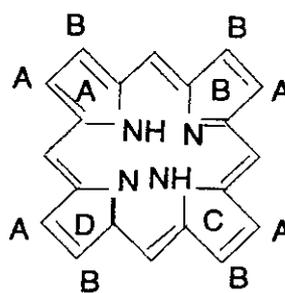
Porfirinas IUPAC	SUSTITUYENTES							
	(2)	(3)	(7)	(8)	(12)	(13)	(17)	(18)
Porfirinas FISCHER	1	2	3	4	5	6	7	8
Uro III (I)	A(A)	P(P)	A(A)	P(P)	A(A)	P(P)	A(P)	P(A)
Penta III (I)	M	P	M	P	A	P	P	M
Copro III (I)	M(M)	P(P)	M(M)	P(P)	M(M)	P(P)	M(P)	P(M)
IsoCopro III	M	E	A	P	M	P	P	M
DeshidroisoCopro III	M	V	M	P	A	P	P	M
DesetilisoCopro III	M	H	A	P	M	P	P	M
Hidroisocopro III	M	HE	A	P	M	P	P	M
Hardero IX	M	V	M	P	M	P	P	M
Proto IX	M	V	M	V	M	P	P	M

Abreviaturas: M: $-\text{CH}_3$ A: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ H: $-\text{H}$
 E: $-\text{C}_2\text{H}_5$ P: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
 V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$ HE: $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$

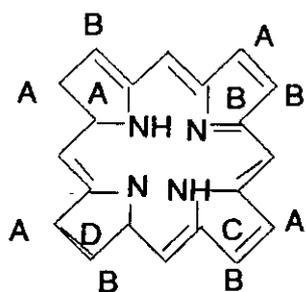
Las porfirinas con dos tipos distintos de cadenas laterales pueden formar cuatro isómeros de posición (I, II, III, IV) mientras que aquellas con tres tipos distintos, pueden presentar quince isómeros posibles. En el organismo sólo se encuentran los isómeros de las series I y III, y el protoporfirinógeno IX que es en realidad la variante 9 de la serie isomérica III (Fig.2)



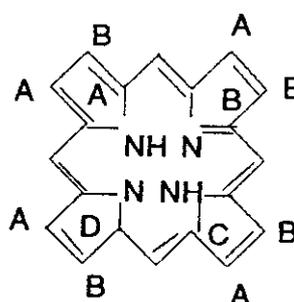
Tipo I



Tipo II



Tipo III



Tipo IV

Fig.2. Representación esquemática de los isómeros I, II, III y IV.

El número de grupos carboxílicos de las cadenas laterales es variable en las distintas porfirinas: 8 en las uroporfirinas, 4 en las coproporfirinas y 2 en la protoporfirina. Este hecho tiene una gran importancia desde el punto de vista bioquímico ya que condiciona la hidrosolubilidad de las distintas porfirinas y por tanto su ruta preferente de excreción. Por otro lado, el número de carboxilos también influye en la movilidad de las porfirinas en procesos de electroforesis y cromatografía, lo cual permite su separación e identificación cuando las diferentes formas se presenten en medios biológicos (6).

La estructura relativamente grande de las porfirinas les confiere un carácter hidrofóbico. La solubilidad de cada una de ellas aumenta con el número de grupos carboxílicos presentes en las cadenas laterales. Son solubles en ácidos y bases fuertes así como en disolventes orgánicos acidificados (7)

El punto isoeléctrico de las porfirinas se encuentra en el intervalo de pH entre 3 y 4.5. A este pH las porfirinas pueden ser extraídas del acetato de etilo y éter por ácidos minerales; la concentración del CIH (en g/dl) necesaria para extraer 2/3 partes de las porfirinas de un volumen igual de éter es conocida como número CIH o número Willstätter (8). En general el número CIH es inversamente proporcional al número de grupos carboxílicos ácidos, aunque la solubilidad en éter está también aumentada por la presencia de sustituyentes no saturados, por ejemplo grupos vinilo.

El reparto o partición de las porfirinas entre solventes orgánicos, tales como el acetato de etilo y éter y ácidos minerales diluidos, proporciona por tanto un método adecuado tanto para su separación de otros pigmentos relacionados como para su fracclonamiento en subgrupos de similar número CIH.

Las porfirinas como cromóforos presentan un máximo de absorción en la zona comprendida entre los 400-410 nm (banda de Soret) y cuatro bandas (α , β , γ , δ) de menor intensidad a longitudes de onda más largas, entre 500 y 630

nm cuyas intensidades se incrementan desde la región del rojo hacia el azul de la zona visible del espectro. Este patrón de bandas característico de las porfirinas en disolventes orgánicos o disoluciones alcalinas débiles se reemplaza por un patrón de dos bandas, más agudas e intensas además de la banda de Soret en disoluciones ácidas (9). Las bandas de absorción son características para cada porfirina y varían según el disolvente y el pH (10). Las porfirinas libres y esterificadas, al ser excitadas por radiaciones de luz, alrededor de los 400 nm, emiten la luz absorbida en forma de fluorescencia roja de menor energía. La fluorescencia es característica de moléculas que como las porfirinas tienen una estructura de anillos aromáticos rígidos. Además de las porfirinas, los quelatos de porfirinas con metales diamagnéticos (Mg, Zn, Sn) que tienen sus electrones apareados, emiten fluorescencia mientras que los quelatos de porfirinas con metales paramagnéticos (Fe, Cu, Cr, Mn) no fluorescen. Las porfirinas sólidas no son fluorescentes pero al quedar adsorbidas en talco, celulosa etc pueden fluorecer. Esta fluorescencia se observa mucho mejor en soluciones clorhídricas.

I.1.2. BIOSÍNTESIS DEL HEMO

Las moléculas relativamente complejas de las porfirinas son sintetizadas en las células a partir de precursores muy simples, teniendo como intermediarios en la secuencia de reacciones enzimáticas a los porfirinógenos.

En animales y bacterias los precursores son el succinilCoA procedente del ciclo de Krebs y la glicocola, que procede del "pool" de aminoácidos.

La secuencia de reacciones catalizadas por ocho enzimas fué establecida por los grupos de Shemin, Rimington, Neuberger y Granick (11) (12).

La compartimentación de las enzimas en la célula es esencial para el control de la biosíntesis del hemo. En la mitocondria se localizan la primera y las tres últimas enzimas de la ruta, mientras que las enzimas intermedias se localizan en el citoplasma (Fig.3).

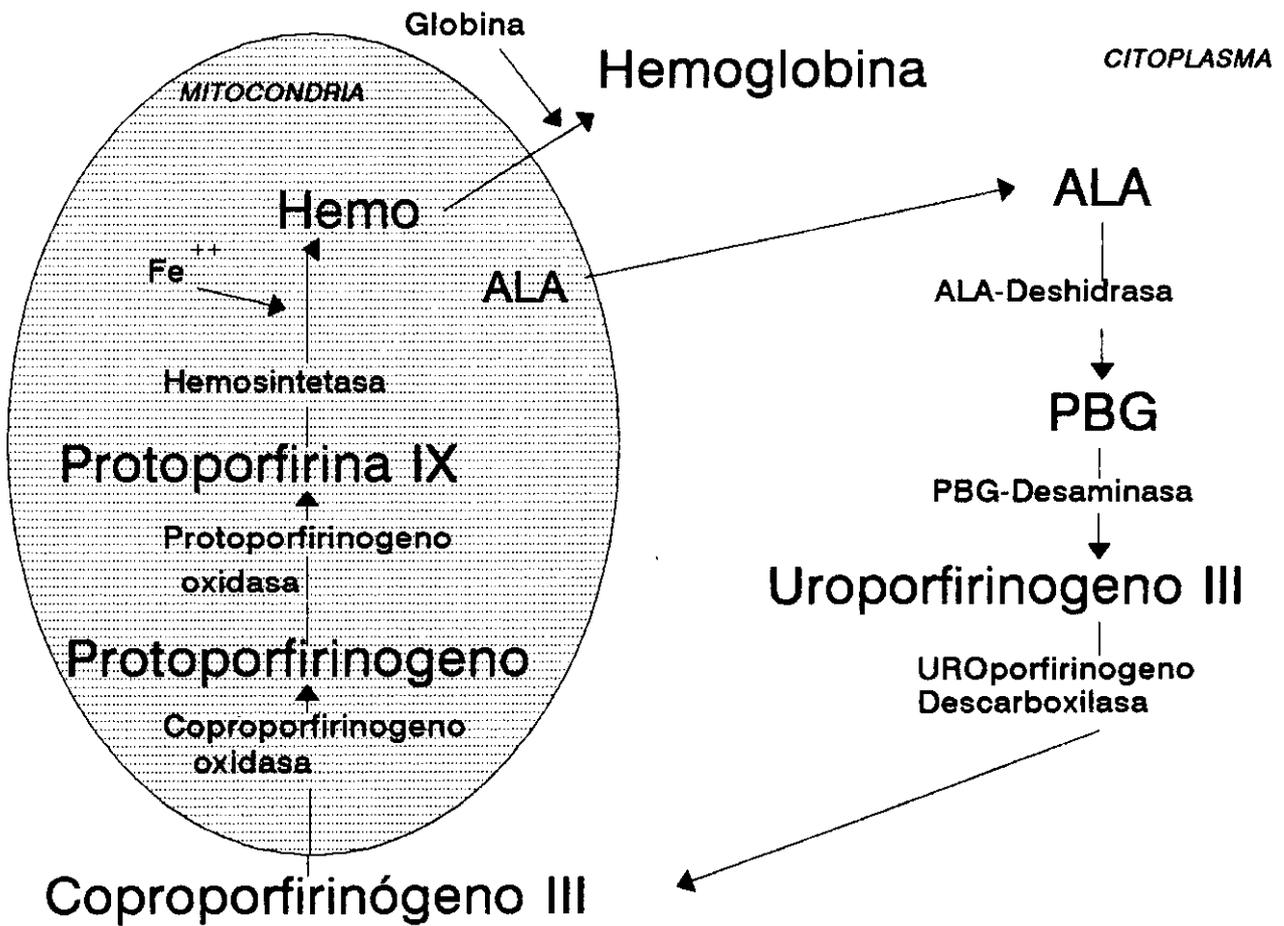


Fig.3. Compartimentación de los enzimas implicados en la ruta biosintética del hemo.

FORMACION DEL ACIDO δ-AMINOLEVULINICO (ALA).

Se inicia la biosíntesis en la mitocondria (13 - 18) con la condensación del succinilCoA y la glicina para formar el ácido δ-aminolevulínico (ALA). Esto se demostró en 1945 por medio de técnicas isotópicas. Shemin y Rittenberg (19) comprobaron usando glicocola marcada con ^{15}N y luego ^{14}C , que este aminoácido proporcionaba los cuatro nitrógenos, además de los cuatro carbonos de los puentes metilénicos y otros cuatro carbonos α en los anillos pirrólicos (Fig.4).

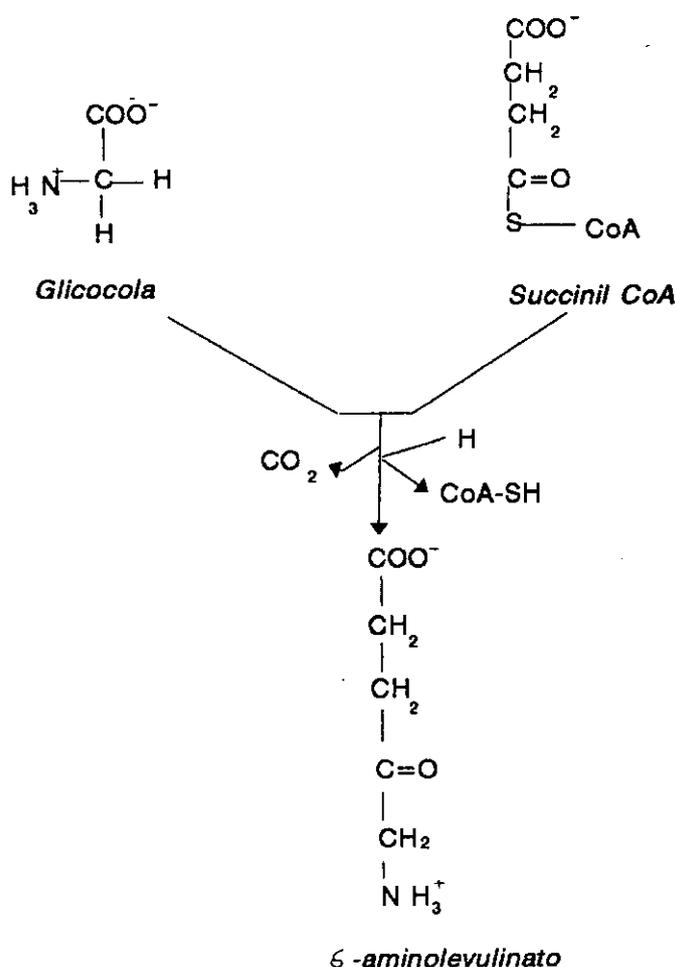


Fig.4. Biosíntesis del δ-aminolevulinato a partir de glicocola en bacterias y animales.

Dichos autores dedujeron que el grupo carboxílico (COOH) y los carbonos α , β , γ del ácido δ -aminolevulínico (ALA) proceden del succinilCoA y el carbono δ , de la glicocola; así la glicocola es el donante del grupo amino no entrando el grupo carboxílico de la glicocola en la formación del ALA.

Esta etapa de formación del ALA está catalizada por la ALA sintetasa (ALA-S)(E.C.2.3.1.37). Esta enzima se localiza en la matriz y membrana interna mitocondrial, pero posee un precursor citoplasmático de mayor peso molecular formado por un dímero de subunidades idénticas y otras dos unidades catalíticamente inactivas.

Esta enzima requiere de fosfato de piridoxal como cofactor. Se manejan distintas hipótesis sobre el mecanismo de acción de la ALA-S. Se piensa que hay un grupo sulfidrilo en el centro activo de la enzima que es esencial para que comience la reacción, y al cual se une en primer lugar el fosfato de piridoxal.

La glicocola forma una base de Schiff con el cofactor y a continuación se condensa la molécula de succinilCoA obteniéndose así un intermediario inestable que recibe el nombre de ácido α amino β cetoadípico, que se descarboxila eliminándose así el grupo carboxílico de la glicocola como CO. Finalmente el ALA se libera de la enzima. (Fig.5)

Beale, Gough y Granick propusieron que en plantas superiores operaba un camino diferente para la síntesis del ALA, según el cuál a partir de glutamato, vía α cetoglutamato y γ - δ -dioxovalorato (DOVA) se forma el ALA por acción de transaminasas del glutamato y DOVA (20) .

También se ha demostrado que el ALA puede originarse en animales y bacterias a partir de DOVA por medio de DOVA-Transaminasa y en algunos tejidos como mitocondria de hígado bovino, se ha demostrado que la actividad de la DOVA-T es varias veces superior a la del ALA-S de igual origen.

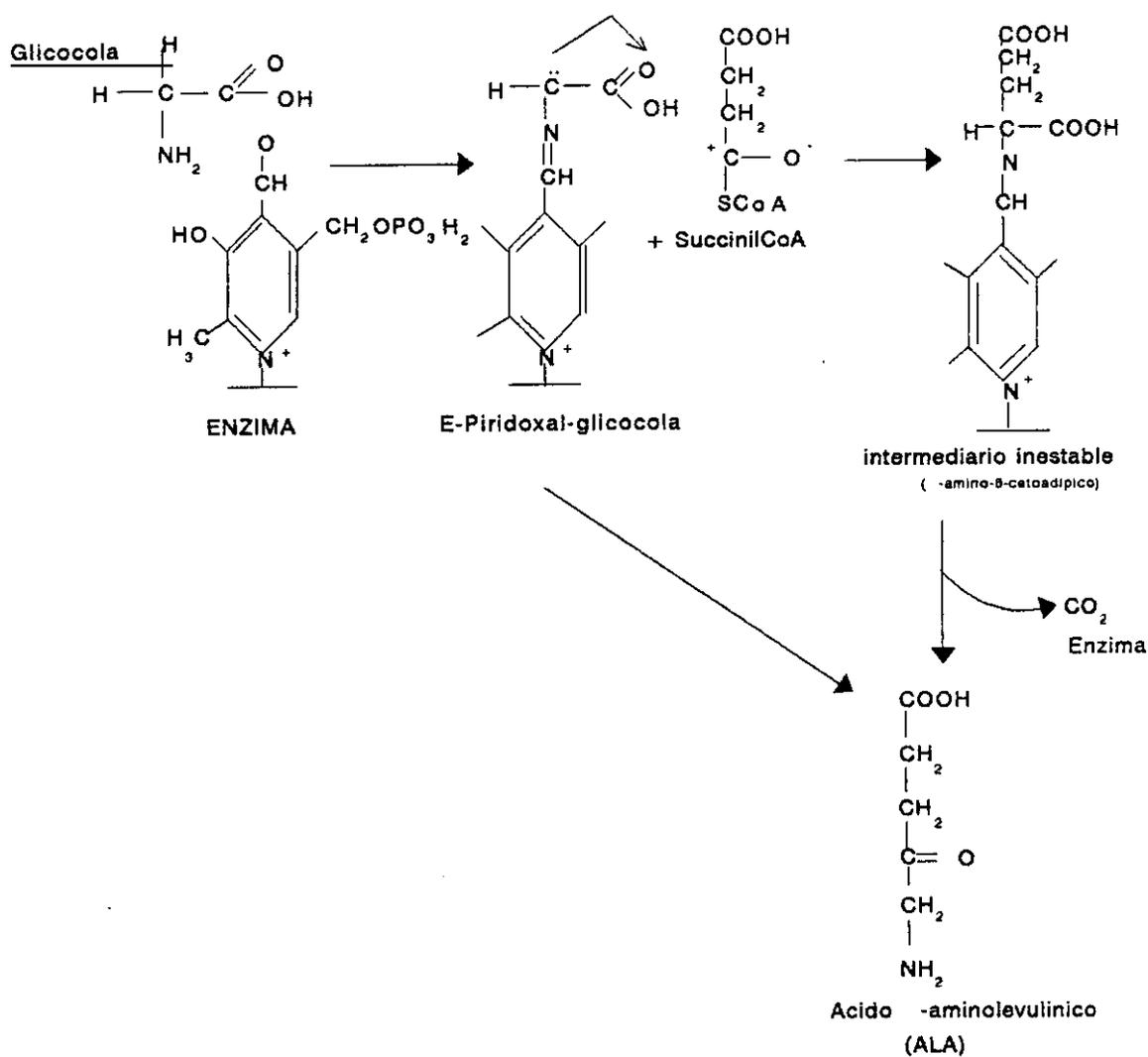


Fig.5. Mecanismo propuesto para la formación enzimática del ALA.

La ALA-S tiene un pH óptimo de 7.6 y un punto Isoeléctrico de 8.2. Es una enzima muy inestable con una tasa de recambio de las más rápidas de las proteínas mitocondriales.

La ALA-S es considerada como la enzima limitante de la ruta, por su vida media corta y por ser su actividad regulada por el producto final, el hemo, a través de un mecanismo de retroinhibición.

La síntesis de ALA es la única etapa endergónica de la ruta ya que para la activación del ácido succínico se precisa un aporte de ATP.

FORMACION DEL PORFOBILINOGENO.

El ALA pasa al citoplasma donde actúa la enzima aminolevulínico deshidratasa (ALA-D) (E.C. 4.2.1.24) dando lugar a un monopirrol cíclico que es el porfobilinógeno (PBG) por condensación de dos moléculas de ALA.

Esta ALA-D es un octámero de subunidades idénticas. La estructura básica funcional es un dímero de 70000 de peso molecular. Es una enzima termoestable y sulfídrica. Suele requerir la presencia de un compuesto reductor tiólico, por ejemplo cisteína o glutatión, para que su actuación se realice con la máxima actividad. Esta enzima se inhibe ante bajas concentraciones de sustancias que bloquean grupos -SH, como los metales pesados Pb, Hg, Cd. Su pH óptimo es de 6.8 y su punto isoelectrico de 4.9.

Existen evidencias de que en el centro activo de la enzima se encuentran, además de grupo -SH, un átomo de Zn por subunidad, 1 ó 2 residuos de lisina, 1 residuo de histidina y restos de aminoácidos hidrofóbicos que en conjunto contribuyen a definir la estructura activa de la enzima.

El mecanismo de acción ha sido estudiado por Nandl y Shemin y por Batlle y col (21)(22).

Una molécula de ALA se une covalentemente a la enzima a través de la formación de una base de Schiff entre el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina del centro activo y el grupo ceto del ALA. Seguidamente se produce una condensación aldólica con la segunda molécula de ALA. Esta se une, no covalentemente, a la otra subunidad enzimática, a través de residuos cargados. Posteriormente se dan una serie de reorganizaciones intramoleculares que darán lugar al PBG que se libera del centro activo de la enzima, regenerándose así la enzima libre que puede así entrar en otro ciclo de reacciones. (Fig.6)

FORMACION DE UROPORFIRINOGENOS I Y III.

Tras la formación del PBG se produce la síntesis del primer compuesto cíclico intermediario. La condensación química de cuatro moléculas de PBG puede dar lugar a la formación de cuatro isómeros posibles de uroporfirinógeno, pero la reacción catalizada produce sólo los isómeros I y III.(Fig.7)

Una antigua hipótesis sugería que la formación del uroporfirinógeno III estaba catalizada por un sistema enzimático "porfobilinogenasa" (PBG-asa) formado por dos enzimas diferentes: Uroporfirinógeno I sintetasa y Uroporfirinógeno III cosintetasa o isomerasa. Hoy en día se admite que ambas enzimas actúan de forma independiente (23).

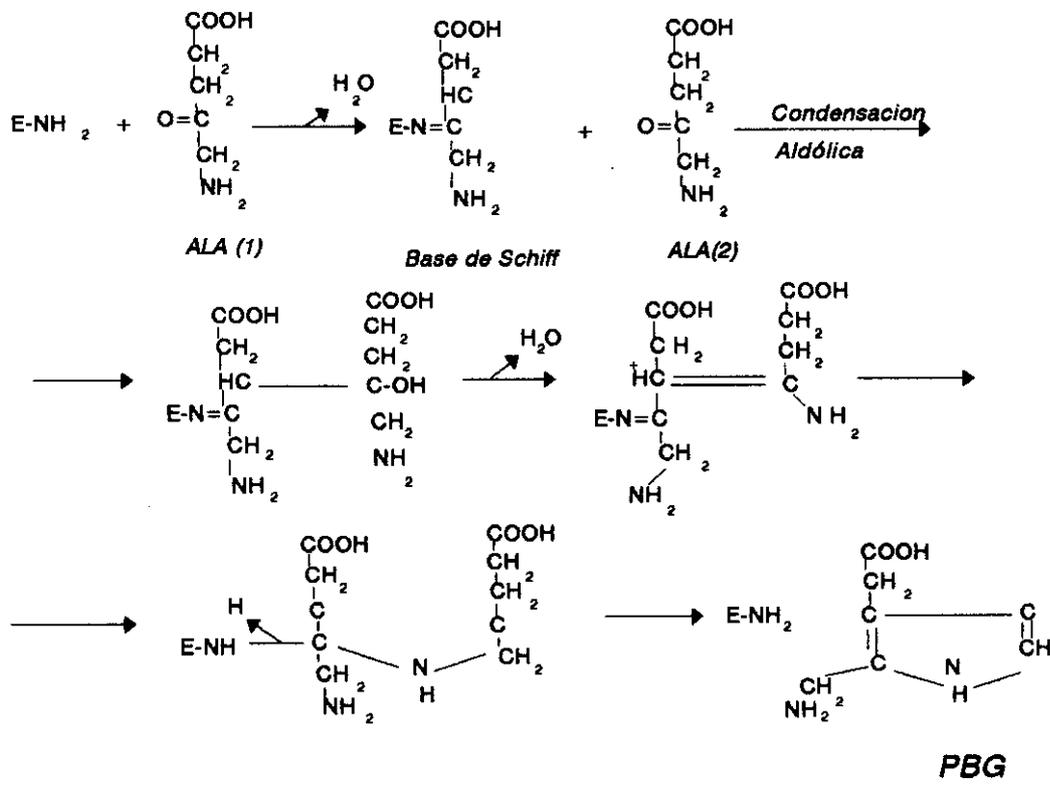


Fig.6. Formación enzimática del porfobilinógeno.

La uroporfirinógeno I sintetasa (URO-S) también denominada porfobilinógeno desaminasa (PBGD) o hidroximetilbilano (HMB) sintetasa (E.C.4.3.1.8.) cataliza la polimerización de cuatro moléculas de PBG, dando lugar a un tetrapirrol intermediario que es denominado hidroximetilbilano o preuroporfirinógeno. En esta reacción cuatro subunidades de PBG son ensambladas cabeza a cola por esta enzima, comenzando por el anillo A y uniéndose sucesivamente los anillos B,C,D en el sentido de las agujas del reloj.

En ausencia de la uroporfirinógeno III cosintetasa (E.C.4.2.1.75) el hidroximetilbilano es liberado de la enzima y se cicla de forma espontánea, dando lugar así al uroporfirinógeno I (Fig.7)

Cuando la cosintetasa está presente, ésta rápidamente convierte el intermediario en uroporfirinógeno III, por inversión de la molécula de PBG del anillo D y posterior ciclación (24).

Estudios llevados a cabo en eritrocitos humanos demuestran que la actividad de la cosintetasa predomina sobre la sintetasa, lo cual favorece la síntesis del uroporfirinógeno III, que es el sustrato fisiológico para la formación del hemo.

FORMACION DE LOS COPROPORFIRINOGENOS I Y III

Una vez formados los uroporfirinógenos I y III, éstos van a ser transformados en coproporfirinógenos por la participación de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D) (E.C.4.1.1.37), enzima citosólica que lleva a cabo la descarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales del ácido acético de los uroporfirinógenos. La descarboxilación transcurre en pasos desde el uroporfirinógeno con, 8 COOH, hasta el coproporfirinógeno, con 4 COOH

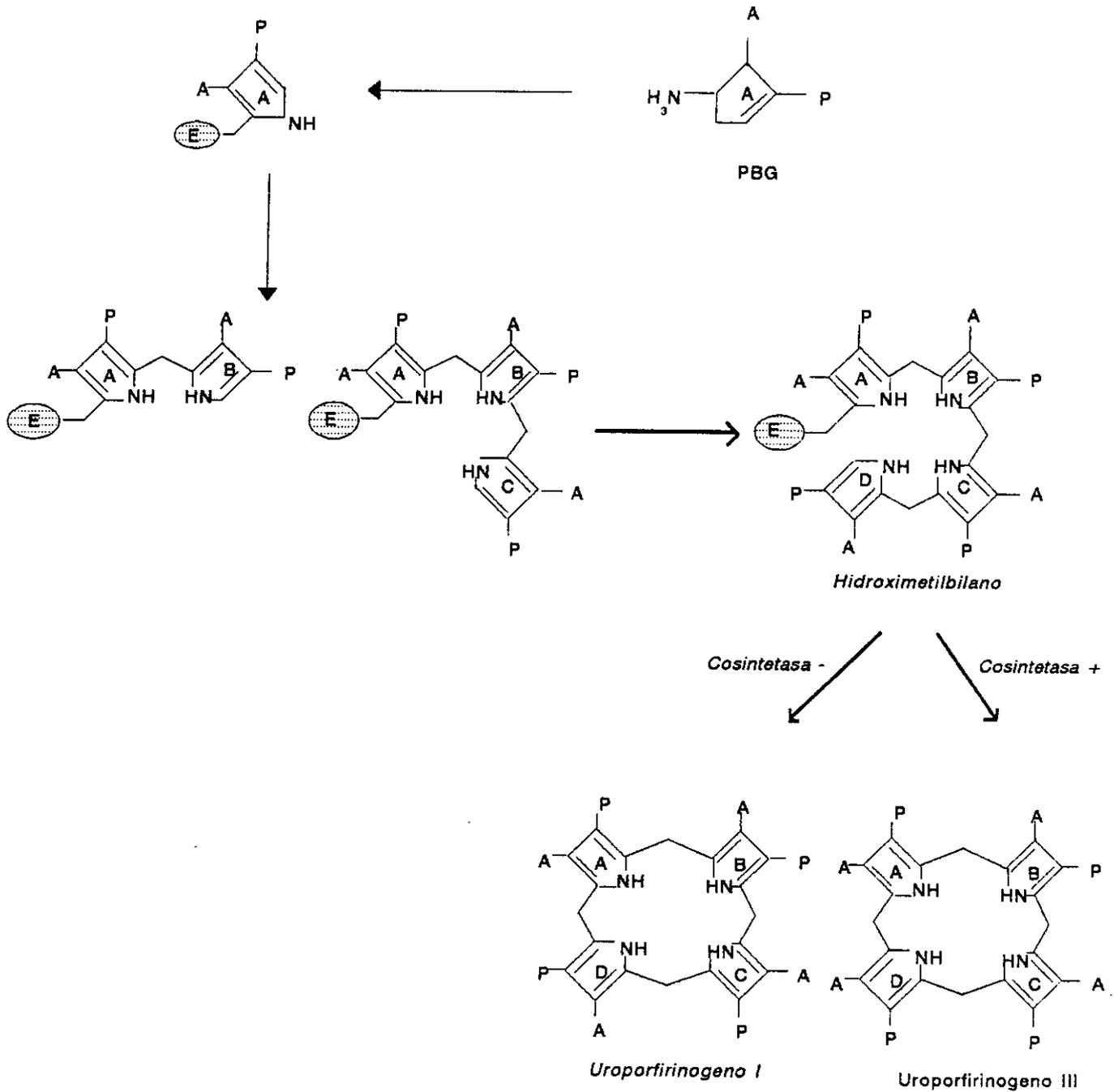


Fig.7. Formación de los uroporfirinógenos I y III a partir del PBG.

- E: PBG-D
- A: acético ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$)
- P: propiónico ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

existiendo intermediarios con 7, 6 y 5 COOH que no tienen nombres específicos sino que se designan atendiendo al número de COOH; por tanto se denominarán porfirinógenos hepta, hexa y penta carboxílicos, respectivamente.

No se ha conseguido desdoblar esta enzima en subunidades ni se ha visto que forme parte de algún complejo, por lo que se piensa que posee más de un centro activo y así actúa secuencialmente.

Según Jackson y cols. la descarboxilación del uroporfirinógeno III tiene lugar en sentido de las agujas del reloj iniciándose sobre el anillo D. (Fig.8) (25).

Esta misma enzima no sigue una ruta específica cuando se trata de descarboxilar los cuatro restos acetato del uroporfirinógeno I sino que lo convierte en el correspondiente coproporfirinógeno I por otras dos vías alternativas (Fig.9)

La URO-D es una enzima sulfidráulica y termosensible. Es una enzima anaeróbica, siendo por tanto inhibida por el oxígeno, suponiendo que esto es debido bien a la acción directa que pudiese tener el oxígeno sobre la enzima o por la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas, las cuales ya no son sustrato de esta enzima.

El β mercaptoetanol y el GSH ejercen efecto activador sobre la enzima mientras ésta también se inhibe por metales pesados, Cu, Hg, Pt.(26)

Elder ha demostrado una vía alternativa a partir del pentaporfirinógeno, que teniendo como intermediario el deshidroisocoproporfirinógeno, se transforma en harderoporfirinógeno que conduce a la formación del protoporfirinógeno y consecuentemente del hemo. Este intermediario es el precursor u origen de las denominadas isocoproporfirinas o porfirinas de la serie P de Elder aisladas en pacientes con porfiria cutanea tarda y en ratas intoxicadas con hexaclorobenceno, situaciones ambas en las que ésta ruta alternativa es importante (27).

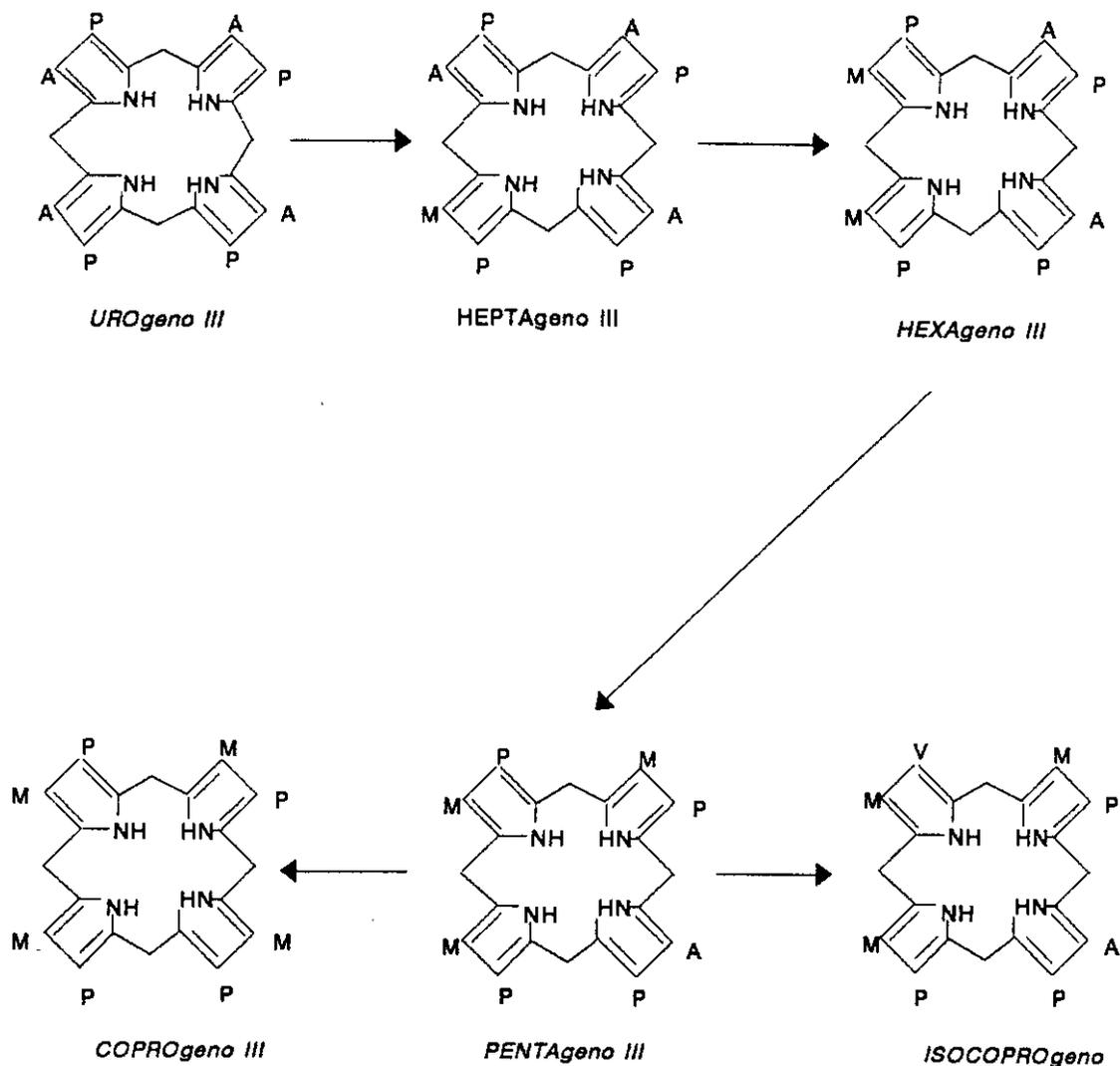


Fig.8. Ruta de descarboxilación enzimática del uroporfirinógeno III. Se representa también la formación del isocoproporfirinógeno por descarboxilación del pentaporfirinógeno III.

- A: acético ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$)
- M: metilo ($-\text{CH}_3$)
- P: propiónico ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$)
- V: vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$)

La URO-D de eritrocitos e hígado en humanos es similar pero no idéntica (28). Las diferencias residen en la estructura secundaria de la proteína. Si se tratara de un dímero, una de las subunidades estaría presente en los dos tejidos, existiendo subunidades específicas para cada tejido o una mezcla de isoenzimas.

FORMACION DEL PROTOPORFIRINOGENO IX

La línea isomérica I se detiene en este punto, constituyendo una vía fisiológicamente muerta. Esto es debido a que la enzima coproporfirinógeno oxidasa (E.C.1.3.3.3.) no va a tener como sustrato el coproporfirinógeno I y sí actúa en cambio sobre el coproporfirinógeno III. Este coproporfirinógeno III, formado en la etapa anterior entra en la mitocondria, ya que la citada enzima se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria con una fracción unida débilmente a la membrana interna mitocondrial, donde la enzima provoca la descarboxilación de dos radicales propionato dando lugar a una molécula con solo dos grupos carboxílicos (COOH) que recibe el nombre de protoporfirinógeno IX. (también llamado protoporfirinógeno III_g) (Fig 10) (29).

Esta enzima requiere oxígeno molecular como aceptor de hidrógenos. La configuración de su centro activo es tal que sólo acepta en primer lugar el resto propiónico del anillo A. A continuación, se hace accesible al mismo centro activo el ácido propiónico del anillo B, con lo que el harderoporfirinógeno, porfirinógeno inestable tricarboxílico, da lugar al protoporfirinógeno IX (30).

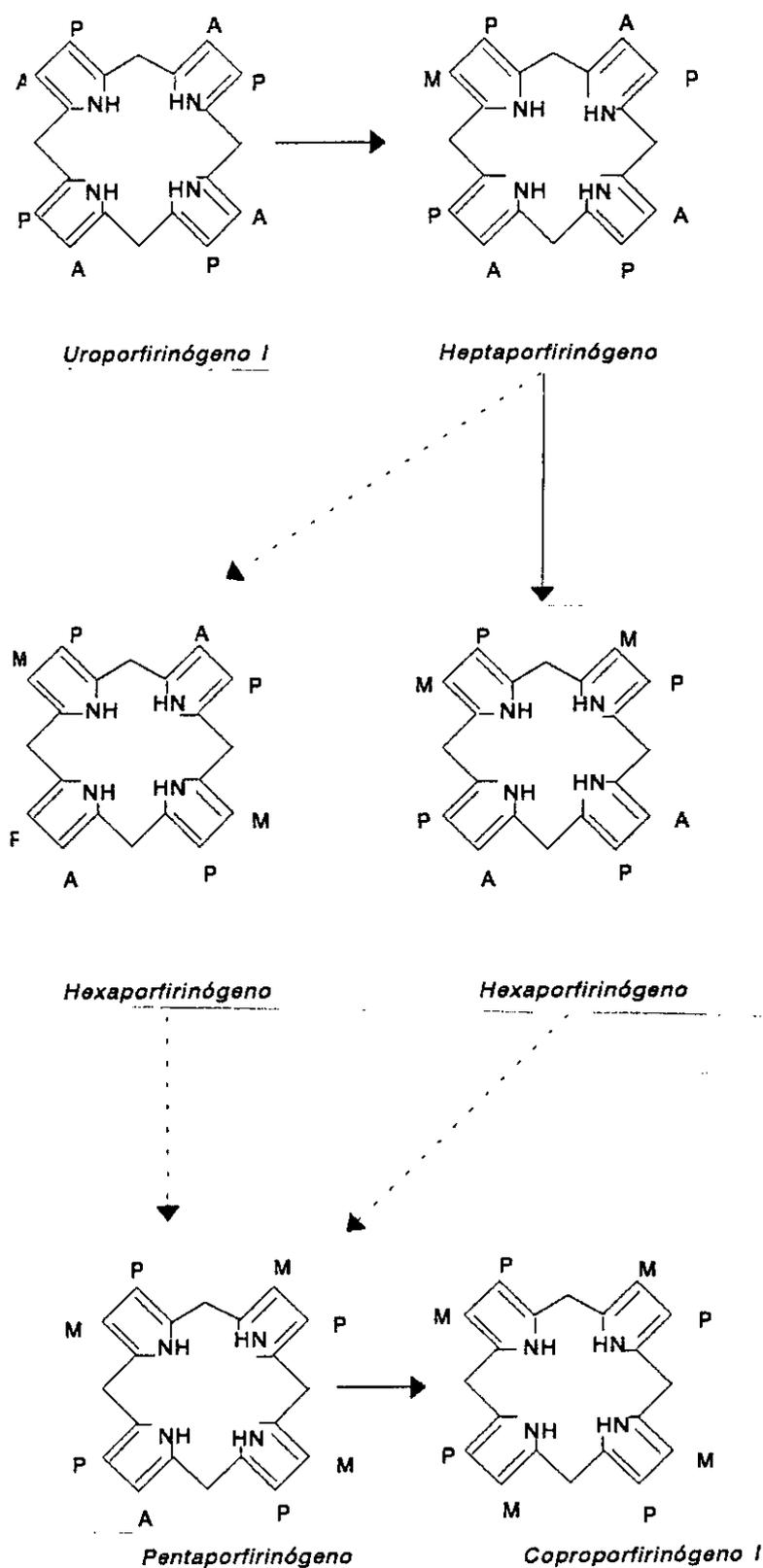


Fig.9. Rutas alternativas simultaneas para la descarboxiliación enzimática del uroporphirinógeno I en coproporphirinógeno I.

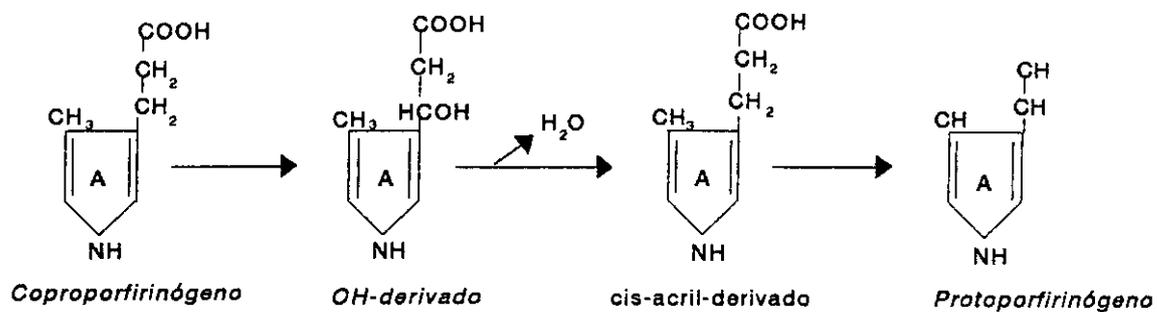


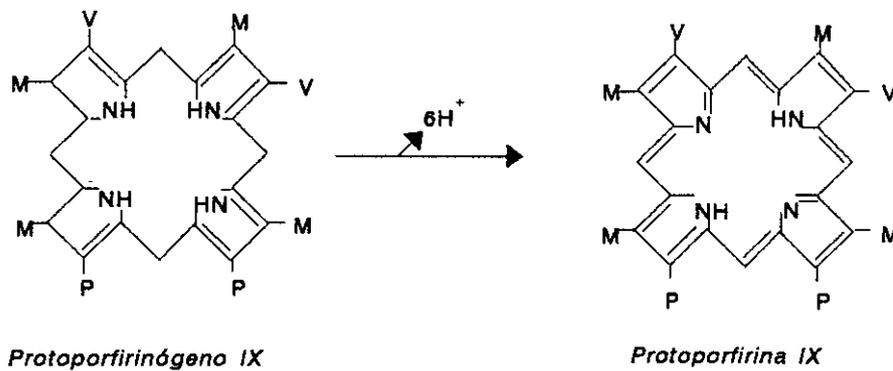
Fig.10. Mecanismo de descarboxilación oxidativa del coproporphirinógeno III a protoporphirinógeno IX.

FORMACION DE PROTOPORFIRINA IX

Una vez que se ha formado en el interior de la mitocondria el protoporfirinógeno IX, va a actuar la siguiente enzima que es la protoporfirinógeno oxidasa (E.C.1.3.3.4.) que cataliza la oxidación a protoporfirina IX.

La enzima necesita oxígeno como aceptor de electrones. Se encuentra probablemente asociada a la membrana interna mitocondrial. Se trata de una enzima sulfidrílica con gran especificidad por el sustrato protoporfirinógeno IX, aparentemente no requiere cofactores para su actividad y no le afectan los agentes quelantes.

La oxidación del sustrato implica la pérdida estereoespecífica de seis átomos de hidrógeno localizados en sólo uno de los lados del tetrapirrol (Fig.11).



- M: METILO (-CH₃)
- P: PROPIONICO (-CH₂-CH₂-COOH)
- V: VINILO (-CH=CH₂)

Fig.11. Formación de la protoporfirina IX a partir del protoporfirinógeno.

FORMACION DEL HEMO

Esta protoporfirina IX es la única porfirina metabólicamente activa ya que es sustrato de la ferroquelatasa o hemosintetasa (E.C. 4.99.1.1) que cataliza la inserción de hierro ferroso (Fe^{2+}) en el anillo tetrapirrólico para dar así una molécula de hemo.(Fig.12)

Esta enzima se encuentra fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria, es una enzima sulfidrónica de naturaleza lipoproteica con dos sitios activos: uno para el metal, por el cual es muy específico, y otro para la porfirina.

La actividad enzimática se ve incrementada con ácidos grasos y agentes sulfidrónicos reductores. Su actividad es inhibida por metales divalentes: Co, Mn, Pb, Zn y por oxígeno.

Los agentes sulfidrónicos reductores protegen los grupos -SH de la enzima y además mantienen el hierro en estado ferroso.

El hemo inhibe la actividad de la ferroquelatasa, así como también puede ser inhibida por la protoporfirina.

A diferencia del resto de las enzimas de la ruta, la ferroquelatasa no utiliza porfirinógenos como sustrato. Además de la protoporfirina IX puede utilizar como sustrato porfirinas dicarboxílicas como deuterio y mesoporfirinas.

Sólo el hierro en forma reducida Fe^{2+} es incorporado a la protoporfirina IX y no la forma oxidada Fe^{3+} .

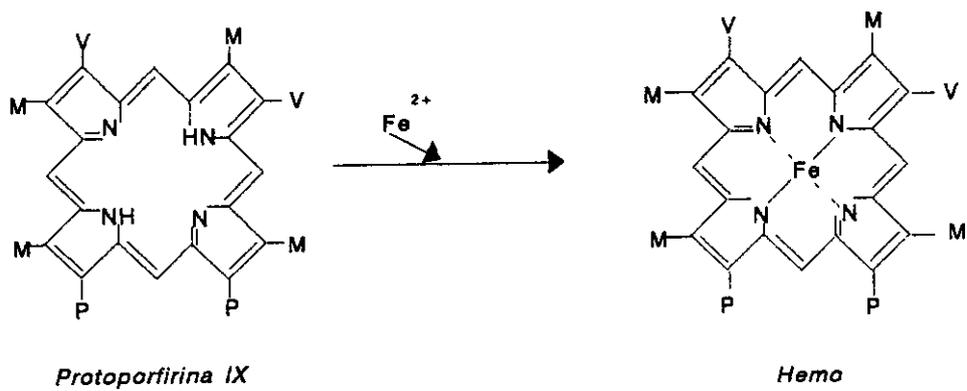


Fig.12. Formación del hemo a partir de la protoporfirina IX e hierro ferroso.

**CAPITULO II: FISIOPATOLOGIA DE LA
EXCRECION DE PORFIRINAS**

Las porfirinas pueden seguir diferentes vías para su eliminación del organismo; la ruta de excreción que van a seguir depende de su hidrosolubilidad y ésta es función del número de grupos carboxílicos libres presentes en las cadenas laterales de sus moléculas.

La uroporfirina (UP), octocarboxílica, es muy hidrosoluble, por lo que se excreta casi exclusivamente por orina, al igual que su porfirinógeno mientras que la protoporfirina y otras porfirinas dicarboxílicas, poco hidrosolubles, son eliminadas únicamente por bilis (31) (32), de forma parecida a la bilirrubina y bromosulfoftaleína, utilizando mecanismos transportadores comunes (33).

La coproporfirina (CP) tetracarboxílica se excreta preferentemente por vía biliofecal, mientras que su porfirinógeno puede seguir ambas rutas excretorias.

El ácido delta-aminolevulínico (ALA) y el porfobilinógeno (PBG) infundidos en vena son eliminados exclusivamente por orina al igual que la uroporfirina y el uroporfirinógeno (Fig.13).

El comportamiento excretorio de las porfirinas tetracarboxílicas es flexible ya que pueden seguir ambas rutas dependiendo de la integridad funcional de los órganos que las rigen, hígado y riñón.

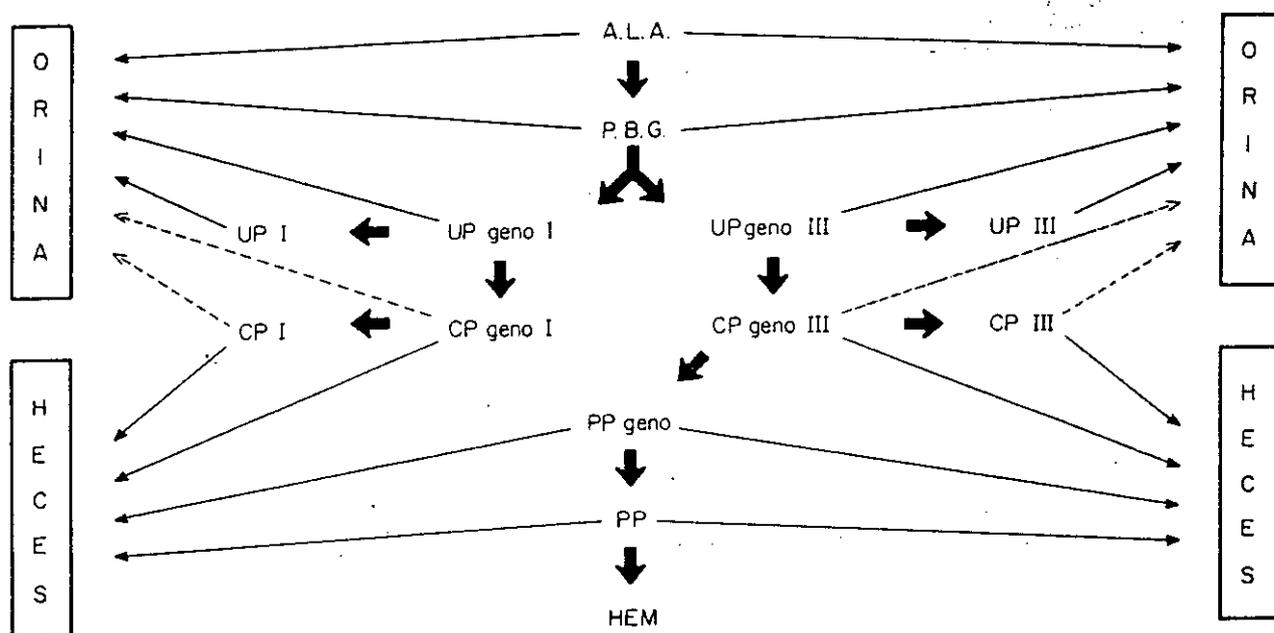


Fig.13. Ruta de excreción de las porfirinas (Tomado de Rev. Clín. Esp.,155, 1, 1979).

Hoffbauer y colaboradores observaron como la coproporfirina inyectada intravenosamente a ratas normales no era eliminada por orina si no se había ligado previamente el conducto biliar común (34).

Tras la ligadura del conducto biliar, la coproporfirina inyectada es captada ávidamente por los hepatocitos pero al estar imposibilitada su excreción biliar, regurgita a plasma y es excretada por vía renal. Igualmente se consiguió observar eliminación urinaria de coproporfirina inyectada tras haber lesionado severamente las células hepáticas con tetracloruro de carbono.

En condiciones normales la coproporfirina es eliminada exclusivamente por bilis, mientras que su porfirinógeno, captado menos ávidamente por el hepatocito, puede transformarse en protoporfirina y eliminarse como tal en bilis, o bien ser excretado por orina constituyendo, tras su oxidación, la fracción normal urinaria de coproporfirina.

La lesión del hepatocito (por medio de tetracloruro de carbono) que disminuye la capacidad de aclarar la coproporfirina del plasma o la alteración de los mecanismos de excreción biliar (ligadura del conducto biliar común) que imposibilita su eliminación biliar, darían lugar a que dicha porfirina y su porfirinógeno alcanzasen altas concentraciones plasmáticas siendo excretados pasivamente por el riñón (Fig.14).

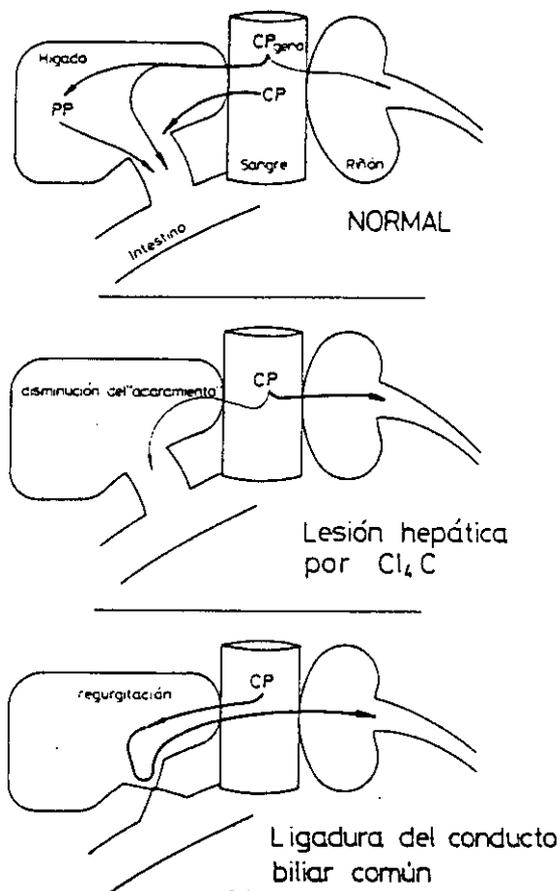


Fig.14. Comportamiento excretorio de la coproporfirina y coproporfirinógeno tras su administración intravenosa (Tomado de Rev. Clín. Esp. 155,1,1979).

Las porfirinas, sobre todo las menos hidrosolubles requieren un sistema de transporte plasmático, así concretamente la coproporfirina presente en plasma circula unida a proteínas fundamentalmente hemopexina (35).

La hemopexina es una glicoproteína de unos 57000 daltons de peso molecular sintetizada fundamentalmente en el hígado que es el órgano donde el complejo copro-hemopexina interacciona con un receptor específico, liberándose la coproporfirina hacia el citoplasma (36).

En el citoplasma la coproporfirina se une a diversas proteínas una de las cuales es inmunológicamente idéntica a la ligandina.

La afinidad de la unión con estas proteínas transportadoras es función inversa de la hidrofobicidad de las cadenas laterales de las moléculas porfirínicas; así la coproporfirina se une más fuertemente a la ligandina que la uroporfirina hidrosoluble, lo cual explica su exclusiva eliminación renal, al no ser transportada a través del hígado hacia la bilis.

Diversos trabajos experimentales han demostrado la existencia de fenómenos competitivos entre porfirinas y BSP (bromosulfoftaleína), comprobándose que las porfirinas pueden ser desplazadas de su punto de unión con la ligandina por la BSP.

La hipercoproporfirinuria de los enfermos hepáticos fue ya descrita por Garrod hace más de 90 años (37); Hymans Van den Bergh y cols (38) interpretaron el aumento de la coproporfirinuria en las ictericias obstructivas como debida a defecto de la excreción de la porfirina que normalmente debía eliminarse por bilis, sin embargo no siempre debe interpretarse la hipercoproporfirinuria de los enfermos hepáticos como secundaria a defecto excretorio o regurgitación biliar.

En las colestasis, lo característico es un aumento en orina del isómero I de la coproporfirina que es el que normalmente se excreta por bilis (39), mientras que en hepatopatías no colestásicas y etílicas se incrementa en orina

el isómero III.

La frecuente coproporfirinuria de las hepatopatías podría ser secundaria a un aumento de la porfirinosíntesis. Levere (40) encontró incremento de la actividad ALA-sintetasa hepática en cirróticos no porfíricos. Este incremento de la enzima limitante de la porfirinosíntesis podría ser secundario a la propia lesión hepática como piensan Levere y Doss y cols (41), o a la ingesta de alcohol, o bien al insuficiente catabolismo o conjugación de drogas u hormonas sexuales esteroideas cuya acumulación o la de sus metabolitos, incrementaría la porfirinosíntesis. Es posible también que la hepatopatía o sus causas conduzcan a deficiencias funcionales del enzima coproporfirinógeno oxidasa con lo cual se acumularía coproporfirinógeno que podría sufrir una rápida oxidación a coproporfirina, escapándose así de la cadena biosintética (42) (43). Sin embargo Shanley y cols (44) no encontraron ningún defecto en la actividad de dicha enzima en la siderosis hepática experimental causada por sobrecarga de hierro y alcohol.

La coproporfirina que normalmente se detecta en orina procede en gran proporción del coproporfirinógeno excretado que rápidamente sufre oxidación a coproporfirina (45) (46).

El hígado lesionado al igual que sucede experimentalmente en la hepatopatía por tetracloruro de carbono, muestra poca avidez para retener el coproporfirinógeno y la coproporfirina formados en exceso, con lo cual ambos regurgitan al plasma y son excretados por el riñón.

Por otro lado, en la insuficiencia renal crónica se apreció una disminución de la excreción urinaria de COPRO , bien por su baja eliminación o por su baja síntesis.

La biosíntesis del hemo se realiza con un alto grado de eficiencia pero se producen pequeñas pérdidas en los diferentes escalones metabólicos. Existen diversas revisiones bibliográficas sobre la cuantía normal de excreción de

Fisiopatología de la excreción de porfirinas

porfirinas realizadas por varios autores, entre ellos Eales y cols. en 1966, Fernandez y cols. en 1966, Watson y cols. y Fogstrup y With en 1979 (47) (48) (49) (50).

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado la excreción urinaria y fecal de porfirinas en individuos normales; el estudio se realizó mediante distintos métodos y sobre un colectivo de 219 individuos de ambos sexos (51).

Se determinaron las distintas carboxilporfirinas urinarias por cromatografía en capa fina (TLC). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

COOH	Carboxilporfirinas %	
	Media \pm DE	Percentil-95
8	15.32 \pm 8.15	29.93
7	4.48 \pm 2.82	9.35
6	0.84 \pm 1.20	2.47
5	2.25 \pm 2.06	5.58
4	76.77 \pm 11.7	59.00

Fisiopatología de la excreción de porfirinas

También se determinaron por técnicas de extracción solvente las fracciones COPRO y URO urinarias así como los precursores por medio de cromatografía en columna:

Fracciones: $\mu\text{g/l}$		
	Media \pm DE	Percentil-95
COPRO	51.00 \pm 2.75	108
URO	3.97 \pm 3.7	11

Precursores: mg/l		
	Media \pm DE	Percentil-95
ALA	2.11 \pm 1.24	3.39
PBG	1.55 \pm 1.02	2.6

**CAPITULO III: PORFIRIAS Y
PORFIRINOPATIAS.**

Los trastornos del metabolismo del hemo pueden ser de dos tipos: congénitos y adquiridos.

Trastornos adquiridos

La síntesis de porfirinas en sujetos normales no es un proceso estático sino sujeto a variaciones como se observó en las fluctuaciones de la síntesis del hemo durante el ciclo menstrual. Se ha comprobado que la edad tiene un cierto efecto sobre esta ruta metabólica.

Existen gran variedad de circunstancias que desembocan en una sobreproducción de porfirinas y su consiguiente aparición en cantidades incrementadas en orina (Tabla 2).

Como comentábamos en el capítulo anterior, en situaciones colestásicas bien sean congénitas (síndrome de Dubin-Johnson o síndrome Rotor, o adquiridas (inducidas por estrógenos, ictericias obstructivas, hepatitis) es clásico y frecuente comprobar incrementos de la eliminación urinaria de COPRO coincidente con disminución de excreción fecal.

La activa y eficiente ruta biosintética del hemo es muy sensible a la acción de diversos xenobióticos que pueden incidir sobre las actividades de las enzimas participantes.

No existe un mecanismo tóxico común para ellos, ni siquiera para un mismo metal, ya que puede depender de la forma química en que se encuentre.

Se ha demostrado que el aluminio y selenio aumentan la actividad de la ALA-S. La administración oral de sulfato de zinc a sujetos normales incrementó la actividad de la ALA-D. También se observó que el cadmio a bajas concentraciones activa la ALA-D eritrocitaria. El plomo inhibe la ALA-D, COPRO-oxidasa y ferroquelatasa lo que se traduce por eliminación urinaria

Tabla 2. Porfirinopatías secundarias.

1.- ENFERMEDADES HEMATOLOGICAS:

Anemia ferropénica
sideroblástica
hemolítica
perniciosa
Eritropoyesis ineficaz
Talasemia
Leucemias y linfomas

2.- ENFERMEDADES HEPATOBILIARES:

Cirrosis hepática
Hepatitis crónica y activa
Hepatitis tóxica e infecciosa
Esteatosis hepática
Hepatopatía etílica
Colestasis y colangitis
Cirrosis biliar primaria
Hemocromatosis
Tumores hepáticos
Ictericias congénitas(Rotor, Dubin-Jhonson, Gilbert)

3.- INTOXICACIONES

Etilismo crónico o agudo
Toxicos ambientales: Hexaclorobenceno
Dioxina
Cloruro de vinilo
Tetracloruro de carbono
Cloroformo
Benceno

Metales pesados: Plomo
Mercurio
Arsénico

Drogas: Analgésicos

Sedantes e hipnóticos: Barbitúricos
Hidrato de Cloral
Paraldehído
Morfina

4.- ENFERMEDADES METABOLICAS:

Diabetes Mellitus
Hemocromatosis
Tirosinemia hereditaria

5.- OTRAS: Mononucleosis

Poliomelitis
Infarto de miocardio
Embarazo
Ayuno
Cancer de pancreas

incrementada de ALA y de COPRO y por acúmulo eritrocitario de PROTO.

Trastornos congénitos

Las porfirias son errores congénitos del metabolismo de las porfirinas originados por la hipoactividad de una de las enzimas que intervienen en la ruta biosintética del hemo. Las distintas variedades de porfiria en relación con el defecto enzimático que las origina se muestran en la Tabla 3.

Existen tantas variedades (siete) de enfermedad porfírica como enzimas participantes en la ruta metabólica (excepción hecha de la enzima primera y limitante, cuya síntesis y actividad se incrementa de forma compensatoria).

El exceso fisiológico de las enzimas ALA-D y UROgenosintetasa condiciona el que las porfirias de Doss y Günther únicamente se manifiesten en homocigotos para el gen que respectivamente las origina. Los familiares heterocigotos con hipoactividades de alrededor del 50 % del valor normal, son asintomáticos. Las enfermedades como tales se heredan con carácter autosómico recesivo. Las otras variedades de porfiria se transmiten con carácter autosómico dominante. Los pacientes y familiares afectados son heterocigotos con una hipoactividad del 50 % lo cual representa la expresión completa del gen normal, alelo al gen silente mutante.

También se han identificado pacientes homocigotos en los que la enfermedad adquiere una más temprana e intensa expresividad clínica como lógica consecuencia de la muy marcada hipoactividad enzimática.

Se ha estimado que las porfirias transmitidas con carácter autosómico dominante, sólo se manifiestan clínicamente en un 20 % de los casos. Por tanto sólo se detecta una parte de la inmensa mayoría de estos errores congénitos del metabolismo de las porfirinas.

Tabla 3. Esquema de la biosíntesis del hemo y tipos de porfiria en relacion con la enzimopatía que las origina.

RUTA METABOLICA	ENZIMAS	TIPO DE PORFIRIA
ALA ALA-DESHIDRATASA	AGUDA DE DOSS
PBG UROgeno-SINTETASA	AGUDA INTERMITENTE
 UROgeno-COSINTETASA	CONGENITA DE GUNTHER
UROgenoI UROgenoIII UROgeno-DESCARBOXILASA	CUTANEA TARDA
COPROgenoI COPROgenoIII COPROgeno-OXIDASA	COPROPORFIRA
PROTOgeno IX PROTOgeno-OXIDASA	VARIEGATA
PROTO IX HEMO-SINTETASA	PROTOPORFIRIA
HEMO		

Porfiria aguda de Doss

Tras descartar la existencia de intoxicación por plomo y de tirosinemia hereditaria, el alemán Manfred Doss (52) ha descrito una nueva variante de la enfermedad porfírica originada por una posible mutación del gen estructural de la enzima ALA-D cuya actividad en los eritrocitos y células de médula osea de los pacientes era inferior al 3 % del valor normal.

La incrementada excreción urinaria de ALA y COPRO y la elevada concentración eritrocitaria de PROTO son rasgos que plantean el diagnóstico diferencial frente a la intoxicación por plomo o saturnismo.

Los familiares afectos heterocigotos, aunque asintomáticos, parecen mostrar un especial riesgo para desarrollar manifestaciones de saturnismo ante plumbemias no patológicas; esto es lógico ya que en tales circunstancias, se suman las consecuencias de una defectuosa síntesis de la enzima ALA-D y de una inhibición de su actividad catalítica.

Porfiria aguda intermitente

También se denomina porfiria sueca por su prevalencia en la región norte de este país.

El déficit de UROgeno I sintetasa (53) puede ser detectado en muy diversos tejidos: hígado, hematíes, linfocitos, cultivo de fibroblastos etc.

Como consecuencia de dicha hipoactividad y de la hiperactividad compensatoria de la ALA-sintetasa se acumulan y excretan grandes cantidades de precursores, es decir, ALA y PBG.

La presencia de PBG en la orina de estos pacientes hace que ésta adquiera una tonalidad oscura cuando se la expone durante varias horas a la luz solar (a pH ácido), lo cual se debe a la formación de polipirroles.

No existe cuadro de fotosensibilidad dérmica debido al acúmulo de porfirinas, ya que en este caso se acumulan los precursores.

Prácticamente nunca aparecen manifestaciones clínicas antes de la pubertad. Para que la enfermedad se manifieste clínicamente debe darse la actuación de factores precipitantes como pueden ser el ayuno, estrés, infecciones, periodos menstruales, tóxicos como el alcohol y algunos medicamentos.

Porfiria congénita de Günther

Esta variedad de porfiria se manifiesta únicamente en homocigotos. La hiperactividad compensatoria de los enzimas ALA-S y UROgenio I sintetasa evita que la síntesis de hemo sea deficitaria y también el incremento de precursores pero a costa de sobrecargar la ruta (54).

Por ello se acumulan y excretan masivas cantidades de porfirias sobre todo URO de la inútil variedad isomérica I que además tiene un fuerte efecto fotosensibilizante y estimula la síntesis de colágeno.

La masiva presencia de uroporfirina en orina y en los dientes de leche es responsable, respectivamente, del color de vino de Burdeos de la orina y de la eritrodoncia o color marrón-sucio (los dientes fluorescen en rojo cuando se los ilumina con luz ultravioleta).

Porfiria cutanea tarda (PCT)

Es la variedad más frecuente de las porfirias. La mayoría de los portadores de la alteración metabólica son asintomáticos. La naturaleza de la alteración metabólica radica en una hipoactividad hepática de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa (UROgenio-D).

Se distinguen dos tipos de porfiria cutanea tarda (55): familiar y esporádica. En la PCT familiar los pacientes y los familiares afectados presentan hipoactividad de la UROgenio-D en todos los tejidos: hígado, eritrocitos, cultivos de fibroblastos etc. En la forma esporádica el defecto enzimático queda

restringido al tejido hepático.

Hoy en día se ha demostrado que la porfiria hepatoeritrocitaria de Piñol Aguadé no es una nueva variedad de porfiria sino la forma homocigótica de la PCT familiar (56), en la cual se observa una gran hipoactividad de la UROgen-D.

Al igual que sucede con los animales de laboratorio puede originarse en el hombre una PCT realmente adquirida o tóxica tras la acción de diversos compuestos polihalogenados que inhiben la UROgen-D.

Como consecuencia del trastorno descarboxilativo se acumulan en hígado y plasma y se excretan por orina las porfirinas más policarboxílicas, es decir uroporfirina y heptacarboxilporfirina.

Coproporfiria hereditaria

La mayoría de los portadores son asintomáticos debido a la baja penetrancia del gen que origina hipoactividad de la enzima COPRO-oxidasa.

La enfermedad puede manifestarse con un síndrome dérmico similar al de la porfiria cutánea tarda, o también en forma de las crisis agudas que caracterizan a la porfiria intermitente aguda.

Los pacientes excretan grandes cantidades de COPRO por orina, pero mayoritariamente por heces.

Porfiria variegata

También se denomina porfiria surafricana por la elevada frecuencia entre la población blanca de dicho país.

La enfermedad se debe a la hipoactividad de la PROTO-oxidasa, lo cual conduce a acúmulo de PROTO y COPRO, que se excretan fundamentalmente en heces. Al igual que la coproporfiria hereditaria, la variegata es también una porfiria clínicamente mixta que puede presentarse bajo síndrome dérmico o

en forma de crisis aguda.

Protoporfiria eritropoyética

Se debe a la hipoactividad de la última enzima de la ruta biosintética del hemo, ferroquelatasa.

El cuadro clínico de fotosensibilidad aguda que suele comenzar en la infancia o juventud, es debido al acúmulo eritrocitario de PROTO libre no ligada a zinc que difunde al plasma y se une a las biomembranas siendo especialmente fotoactiva. Esta protoporfirina se excreta en grandes cantidades por heces.

Como hemos visto, las porfirias pueden expresarse clínicamente por manifestaciones dérmicas, debido a la acción de las porfirinas acumuladas, y por crisis agudas. Por tanto junto con la clásica clasificación de las porfirias en hepáticas y eritropoyéticas propuesta por Schmid y cols. a principios de los años 50 (57), consideramos también la clasificación de estas enfermedades en función de su sintomatología (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las Porfirias.

SEGUN SU ORIGEN	SEGUN SU SINTOMATOLOGIA
Eritropoyéticas:	
- Congénita de Günther	Cutáneas
- Protoporfiria	
Hepáticas:	
- Cutánea tarda	
- Variegata	Mixtas
- Coproporfiria	
- Aguda de Doss	Agudas
- Intermitente aguda	

CAPITULO IV: OBJETIVOS.

Son muy diversas las técnicas que rutinariamente se utilizan en la cuantificación de la concentración urinaria de porfirinas.

Los métodos que se emplean mayoritariamente son los de extracción y partición solvente que son relativamente laboriosos y requieren elevadas cantidades de muestra (50 ml).

Existen no obstante otra serie de micrométodos mediante los cuales puede realizarse el estudio de la porfirinuria.

El micrométodo descrito originariamente por Piomelli para la cuantificación de las porfirinas sanguíneas fue adaptado en nuestra Unidad de Porfirias para la valoración de la porfirinuria con buenos resultados; no obstante es un método que precisa varios pasos de extracción, previos a la valoración fluorimétrica final.

Posteriormente Westerlund y cols. describieron una rápida, sencilla y barata técnica de cuantificación de la porfirinuria basada en la simple dilución clorhídrica de una micromuestra (100 μ l) previa oxidación con yodo de los porfirinógenos a porfirinas y adición de una solución decolorante para su posterior valoración fluorimétrica.

El objetivo de nuestro trabajo fue el estudio comparativo de la porfirinuria mediante diferentes métodos analíticos y el análisis más específico de las características y aplicabilidad del método de Westerlund y cols.

Asimismo pretendimos un estudio de la porfirinuria desde el punto de vista cualitativo, para lo cual desarrollamos una técnica que nos permitiese conocer mediante barridos fluorimétricos de las muestras procesadas, por los citados

métodos de Piomelli y Westerlund, los máximos de excitación de las mismas; a partir de éstos y utilizando una recta patrón previamente elaborada, podemos conocer los porcentajes de las fracciones COPRO y URO presentes en la muestra, y consecuentemente las cantidades existentes de las mismas conociendo la porfirinuria total.

Desde el punto de vista cualitativo también nos propusimos analizar la porfirinuria mediante el empleo de cromatografía de capa fina, para conocer el reparto porcentual de diversas carboxilporfirinas existentes.

Por tanto los objetivos de nuestro trabajo fueron los siguientes:

1.- Cuantificación simultánea de la concentración urinaria de porfirinas en muestras, mediante diversos métodos, tomando como "gold standar" el método de Gajdos y Gajdos-Török.

2.- Analizar las características del método de Westerlund y cols.: recuperación y variabilidad.

3.- Estimar la presencia de las fracciones COPRO y URO a partir de los micrométodos de Piomelli y Westerlund.

4.- Obtener el perfil cromatográfico de las muestras estudiadas.

5.- Estudiar la existencia o no de ritmo nictameral en la excreción de porfirinas en una muestra de individuos normales para decidir si se puede analizar la porfirinuria en muestras aisladas o se precisa la recogida de orina de 24 horas.

6.- Estudiar la excreción urinaria de porfirinógenos en individuos normales y porfíricos, para determinar si se requiere

algún procedimiento de oxidación de porfirinógenos a porfirinas antes de la cuantificación de éstas.

CAPITULO V: MATERIAL Y METODOS.

V.1. MATERIAL

V.1.1. MATERIAL INSTRUMENTAL:

- * Espectrofluorímetro Hitachi, modelo F-4010 (Tokyo, Japan), con lámpara de xenón como fuente de luz y fotomultiplicador R937F sensible al rojo.
- * Espectrofotómetro Hitachi, modelo U-3200.
- * Medidor de pH, Crison.
- * Densitómetro CAMAG, SCANNER II.
- * Agitador Cenco y material usual de laboratorio.
- * Microjeringas.

V.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO:

El estudio ha sido llevado a cabo sobre muestras de orina de un colectivo de 346 individuos, estudiados en la Unidad de Investigación sobre Porfirias, entre los que se encontraban:

- * Pacientes porfíricos:
 - Porfiria cutánea tarda (PCT)..... 255
 - Porfiria intermitente aguda (PIA) 12
 - Porfiria variegata (PV) 7
 - Protoporfiria eritropoyética (PPE) ... 1
- * Individuos normales..... 55
- * Hepatópatas..... 9
- * Individuos con insuficiencia renal 7

V.1.3. REACTIVOS

- * Tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4: fosfato sódico 10 mM, NaCl 0.9 %.
- * Acetato de etilo y ácido acético glacial 7:2 (v/v)
- * HCl 1.5 N
- * HCl 3 N
- * Tiosulfato sódico $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0.5 mM
- * Eter sulfúrico
- * Acetato sódico 3 %
- * Tampón acético- acetato; pH 6.7

V.1.4. PRODUCTOS:

- * $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. MERCK
- * $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. MERCK
- * HCl 37 %. MERCK
- * Acetato de etilo. PROBUS
- * Acido acético glacial. PANREAC
- * Tiosulfato sódico. MERCK
- * Patrones de porfirinas en HCl 1 N: Coproporfirina III y Uroporfirina III, viales con concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. PORPHYRIN PRODUCTS INC. PO.BOX 31 LOGAN. UTAH 84321 USA.
- * Porfirinas puras, sólidas: Uroporfirina III, Coproporfirina III (Porphyrin Products).
- * Placas de gel de sílice para cromatografía en capa fina, 20 x 20 cm. MERCK, sin indicador de fluorescencia.

V.2. MÉTODOS DE LABORATORIO

V.2.1. MÉTODOS CUANTITATIVOS:

1.1.- Método de partición y extracción solvente de Gajdos y Gajdos-Torok (58)

Las porfirinas éter solubles son extraídas de 50 ml de orina en un embudo de decantación mediante éter acidificado con ácido acético (95:5, v/v). Tras la neutralización del exceso de acidez del éter con acetato sódico al 3 % y tras sucesivos lavados con agua destilada, la fracción COPRO es extraída del éter con una solución clorhídrica 1.5 N. La fase acuosa en la que queda la fracción URO, que no es extraída por el éter, se trata con acetato de etilo-ácido acético (3:1,v/v) que capta dicha fracción URO, siendo finalmente extraída con ClH 1.5 N.

Los extractos clorhídricos fueron leídos espectrofotométricamente y el cálculo de la concentración porfirínica se efectuó empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{COPRO } (\mu\text{g/l}) = 2 * D_{402} - (D_{430} + D_{380}) * 0.817 * V_f * 2 * 10$$

$$\text{URO } (\mu\text{g/l}) = 2 * D_{405} - (D_{380} + D_{430}) * 0.831 * V_f * 2 * 10$$

donde D representa la densidad óptica leída en el espectrofotómetro, siendo los subíndices 402 y 405 las longitudes de onda en las que aparecen los picos de máxima absorbancia para las fracciones COPRO y URO respectivamente.

Los factores 0.817 y 0.831 son factores de corrección obtenidos para las fracciones COPRO y URO respectivamente a partir del cociente peso molecular/coeficiente de extinción

molar. V_f representa el volumen final de los extractos clorhídricos. Las cifras 2 y 10 son factores de dilución utilizados para expresar el resultado en $\mu\text{g/l}$.

1.2.- Métodos espectrofluorimétricos.

1.2.1.- Método de Piomelli (59) (60). Este método emplea dos pasos de extracción; es un método sencillo, rápido y sensible que es capaz de detectar pequeñas cantidades de porfirinas urinarias. En éste método se parte de 100 μl de orina a los que se añaden 0.3 ml de una solución tampón fosfato (PBS) (Na_2HPO_4 10mM, ajustado a pH 7.4 con NaH_2PO_4 10mM).

Tras la dilución con PBS se añaden a las muestras 2 ml de reactivo acetato de etilo-ácido acético (7:2 v/v). Tras agitación, se añaden 2 ml de HCl 1.5 N para extraer las porfirinas presentes en la muestra, que quedarán en la fase inferior o clorhídrica.

Esta fase clorhídrica se lee en el espectrofluorímetro frente a coproporfirina estándar fijando la longitud de onda de excitación en 405 nm y la longitud de onda de emisión bien a 595 o 650 nm.

La concentración de porfirinas presentes en la muestra se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Porfirinas } (\mu\text{g/l}) = (\text{Cstd}/\text{UFstd}) * \text{UFm} * \text{VCIH}/\text{Vi}$$

siendo, Cstd, la concentración del estándar o patrón de coproporfirina, UFstd, las unidades de fluorescencia del patrón de coproporfirina, UFm, las unidades de fluorescencia de la

muestra, V_{CIH} , el volumen de la fase clorhídrica expresada en ml, V_i el volumen inicial de la muestra expresado en ml.

Para la lectura fluorimétrica se fijó la anchura de banda en 5 nm, tanto para la excitación como para la emisión.

1.2.2.- Método de Westerlund y col. (61). Este micrométodo permite la detección de pequeñas cantidades de porfirinas urinarias. A una muestra de 100 μ l de orina se le añade una gota de yoduro potásico yodado (solución lugol) al 1 % con el fin de oxidar los porfirinógenos no fluorescentes presentes en la muestra a porfirinas.

Las porfirinas son diluidas en 1 ml de HCl 3 N y en 3 ml de tiosulfato sódico 0.5 mM que decolora la tonalidad aportada por el yodo.

La concentración de porfirinas se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porfirinas } (\mu\text{g/l}) = (\text{Cstd}/\text{UFstd}) * \text{UFm} * \text{Vf}/\text{Vi}$$

siendo, Cstd, la concentración del estandar o patrón de coproporfirina, UFstd, las unidades de fluorescencia del patrón de coproporfirina, UFm las unidades de fluorescencia de la muestra, Vf el volumen final expresado en ml y Vi el volumen inicial de la muestra expresado en ml.

La lectura fluorimétrica se realiza fijando la longitud de onda de excitación en 405 nm y la longitud de onda de emisión bien en 595 ó 650 nm.

V.2.2. METODOS CUALITATIVOS.

2.1.- Individualización de carboxilporfirinas.

Los métodos anteriormente citados únicamente podrían diferenciar y cuantificar las clásicas fracciones COPRO y URO, constituídas en realidad por mezclas de diversas carboxilporfirinas. El análisis cualitativo de las distintas carboxilporfirinas se realiza por cromatografía en capa fina de sus esteres metílicos, aunque podría realizarse a partir de porfirinas libres (62). La individualización se realiza gracias a sus diferentes Rf, que vienen condicionados por el número de grupos carboxílicos presentes en las cadenas laterales de las moléculas porfirínicas.

Previamente a la separación cromatográfica, las porfirinas presentes en la orina fueron esterificadas mediante la adición de una solución de metanol:ácido sulfúrico (9:1 v/v) manteniéndose en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 horas. Las porfirinas urinarias fueron previamente absorbidas en talco no sólo para su concentración sino también para evitar el exceso de agua que entorpece el proceso de esterificación. Cada mg de talco a pH 3-4, es capaz de adsorber unos 4 ng de porfirinas (63). La presencia de hasta un 10 % de agua no afecta notoriamente a la esterificación que, por otra parte, nunca llega a ser completa, aun en ausencia aparente de agua, ya que la misma esterificación de COPRO y URO libera respectivamente 4 y 8 moles de agua por molécula de porfirina (64) (65).

Las diversas modalidades de esterificación de las porfirinas y desarrollo de los cromatogramas son ampliamente comentados por Elder, Falk, Doss y Smith (66)(67)(68)(69).

Los esteres metálicos fueron extraídos por cloroformo y aplicados sobre placas de gel de sílice (20 x 20 cm) de 200-250 μ de espesor y sin indicador de fluorescencia, en bandas de 0.5-1 cm de longitud (mediante el empleo de una jeringa Hamilton de 100 μ l).

Se somete la placa a un corto recorrido en cloroformo-metanol (130:20 v/v), de tal modo que las bandas asciendan de 1 a 2 cm y formen un nuevo frente más estrecho y purificado. Para proceder a la separación de las diferentes porfirinas esterificadas se realiza un nuevo recorrido de la placa empleando el sistema solvente propuesto por Sears y cols (70), compuesto por una fase móvil de tetracloruro de carbono, diclorometano, acetato de etilo y propionato de etilo (2:2:1:1 v/v/v/v) en la que con un sólo recorrido unidireccional nos permite la separación de la isocoprofirina de la también tetracarboxílica coproporfirina. Después, las placas de gel de sílice fueron sometidas a un segundo recorrido en queroseno/cloroformo (3:7 v/v) con objeto de intensificar la fluorescencia porfirínica, sin modificar el Rf, y de estabilizar la protoporfirina (71).

El barrido fluorimétrico nos proporciona un registro gráfico permanente del perfil de cada cromatograma. Sistemáticamente hemos despreciado las porfirinas que permanecen cerca del origen del cromatograma y las que tienen una migración (Rf) más lenta que la octocarboxílica uroporfirina. Esta confusa zona de las suburoporfirinas, en parte estudiada por Rimington y With, contiene no sólo hidroxiporfirinas y porfirinas péptido-conjugadas (porfirina X), sino también porfirinas parcialmente esterificadas y metaloporfirinas. Las porfirinas ligadas a cobre

no fluorescen bajo la luz ultravioleta mientras que las unidas a zinc emiten una característica fluorescencia naranja.

Los rasgos más característicos de la excreción cualitativa de carboxilporfirinas en la PCT se resumen con el índice urinario-PCT, ideado por Enriquez de Salamanca, cuyo cálculo se basa en las siguientes fórmulas (72)(73):

$$\text{Índice urinario PCT (Iu-PCT)} = \% \text{HEPTA} * 100 / \% \text{HEPTA} + \% \text{COPRO}$$

2.2.- Determinación de las fracciones COPRO y URO a partir de los máximos de excitación.

Los métodos fluorimétricos de Piomelli y Westerlund y cols. permiten un análisis cuantitativo de porfirinas totales urinarias como anteriormente se expuso, no obstante estos métodos pueden ser también utilizados desde un punto de vista cualitativo.

Las muestras procesadas por los citados métodos son sometidas a un barrido fluorimétrico, fijándose la longitud de onda de emisión a 650 nm y la longitud de onda de excitación entre 350 y 440 nm. Se utilizó una anchura de banda de 5 nm tanto para la emisión como para la excitación; la velocidad de barrido fue de 240 nm/min.

La primera derivada del espectro de excitación se utilizó para localizar con precisión el máximo de excitación.

A partir de dos soluciones equimolares de URO y COPRO se determinaron los máximos de excitación correspondientes a distintas proporciones de estas dos fracciones, pudiendo así construir una recta patrón, que nos proporcionará en función de un máximo de excitación conocido, los porcentajes de las

fracciones COPRO y URO presentes en una orina problema, este procedimiento será ampliamente explicado en el capítulo de comentarios.

2.3.- Método de valoración de porfirinógenos.

La excreción urinaria de porfirinógenos se determina como la diferencia entre la cantidad de porfirinas de las muestras oxidadas y las muestras sin oxidar.

Se recoge la segunda orina de la mañana y esta es procesada inmediatamente, mediante el método de Westerlund. Una alícuota de 100 µl de orina se procesa incluyendo la adición de lugol como agente oxidante , otra alícuota de 100µl es procesada obviando la adición del agente oxidante.

V.2.3. METODOS ESTADISTICOS.

3.1.- Transformación logarítmica: Tras comprobar mediante el test de Kolmogorov-Smirnov la no normalidad de la muestra, se procedió a su transformación logarítmica antes de realizar los análisis paramétricos.

3.2.- Análisis de la varianza (ANOVA), Test a posteriori Scheffé.

3.3.- Regresión lineal

3.4.- T-Student (para verificar si la pendiente de una recta de regresión difiere significativamente de 1)

3.5.- Test de Welch (Comparación de pendientes)

3.6.- Test no paramétricos (Mann-Whitney, muestras independientes, Wilcoxon, muestras apareadas)

3.7.- Test de Friedman, test a posteriori.

3.8.- Estudio de ciclos (Método de Merriam y Clifton).

CAPITULO VI : RESULTADOS Y COMENTARIOS.

VI.I. COMPARACION DE LOS DATOS OBTENIDOS TRAS LA DETERMINACION URINARIA DE PORFIRINAS POR DIFERENTES METODOS ANALITICOS

La orina normal o patológica, contiene una mezcla de porfirinas octo, hepta, hexa, penta y tetracarboxílicas cuya individualización analítica puede lograrse mediante complejas técnicas de TLC (74)(75) o HPLC (76)(77). Habitualmente la porfirinuria suele analizarse mediante métodos que cuantifican simplemente la excreción total de porfirinas y/o a lo sumo, sus fracciones predominantes (78)(79)(80).

Son muy diversas las técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de las porfirinas urinarias. Sin embargo muchas de ellas, fueron diseñados con fines de investigación por lo que resultan complejas para la mayoría de los laboratorios clínicos.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio comparativo de la porfirinuria mediante diversos micrométodos y mediante una rutinaria técnica analítica de extracción solvente.

En un primer estudio (81) se analizó la excreción urinaria de porfirinas en 44 pacientes con PCT en muy diferentes estadios evolutivos, mediante el uso de cinco técnicas analíticas diferentes. Como método estándar se consideró el macrométodo de Gajdos y Gajdos-Török, el cual cuantifica las fracciones COPRO y URO extraídas con éter acidificado o acetato de etilo-ácido acético respectivamente. Los extractos clorhídricos obtenidos son valorados espectrofluorimétricamente.

Los valores estadísticos obtenidos para cada uno de los métodos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros estadísticos obtenidos para la excreción urinaria de porfirinas ($\mu\text{g/l}$), en 44 pacientes afectados de PCT mediante los métodos analíticos de Gajdos y Gajdos-Török, Piomelli, Westerlund, Columnas cromatográficas y Dilución directa.

	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Gajdos	1213	380	2401	23	13577
Piomelli	1225	514	1890	45	10537
Westerlund	1093	366	1900	28	11394
Columnas	520	153	800	24	3106
Dilución	898	170	1738	22	9162

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los diferentes métodos (ANOVA. $F=2.09$ $P < 0.05$).

El método cromatográfico presentó una infravaloración de la porfirinuria debido en gran parte a la sobresaturación de la resina, lo cual se hace especialmente patente en aquellas muestras que poseen una elevada concentración de porfirinas. En el método de dilución directa se omite cualquier procedimiento que permita la oxidación de porfirinógenos a porfirinas, los cuales son compuestos carentes de fluorescencia que deben ser oxidados antes de la valoración fluorimétrica.

Descartados como métodos rutinarios el método cromatográfico y el método de dilución directa, se realizó un estudio más exhaustivo de los métodos de Gajdos y Gajdos-Török, Piomelli y Westerlund.

Para ello, se analizó la excreción urinaria de porfirinas en 346 individuos afectos de PCT, PIA, PV, Hepatópatas, individuos con insuficiencia renal e individuos no porfíricos, por cada uno de los métodos anteriormente citados. Los valores obtenidos para la excreción urinaria de porfirinas por los métodos de Gajdos, Piomelli y Westerlund, no siguen una distribución normal (test Kolmogorv-Smirnov), por lo tanto se utilizó la transformación logarítmica, antes de realizar los análisis paramétricos.

La cuantificación de la excreción urinaria de porfirinas difiere significativamente entre los métodos utilizados (ANOVA. $F_{2,1030} = 17.94$, $p < 0.001$) (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros estadísticos obtenidos para la excreción urinaria de porfirinas ($\mu\text{g/l}$), en pacientes afectos de PCT, PIA, PV, hepatópatas, enfermos con insuficiencia renal e individuos no porfíricos mediante los métodos analíticos de Gajdos y Gajdos-Török, Piomelli, Westerlund.

	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Gajdos (n=346)	352.94	600.95	2.00	4464.00
Piomelli (n=344)	612.05	1054.08	12.00	8087.18
Westerlund (n=343)	575.23	1058.70	12.00	6920.09

Existen diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por los métodos de Gajdos y Westerlund, así como entre los obtenidos entre los métodos de Gajdos y Piomelli (test a posteriori de Scheffé, $p < 0.05$). No se detectaron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por los métodos de Piomelli y Westerlund (test a posteriori de Scheffé).

Se llevó a cabo el estudio estadístico de las submuestras de individuos afectos de PCT e individuos no porfíricos, con el fin de confirmar los resultados anteriores independientemente de la cuantía de la excreción porfirínica. Se mantienen las diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por cada uno de los métodos (ANOVA. PCT: $F_{2,760} = 11.84$, $p < 0.001$; NORMAL: $F_{2,161} = 9.01$, $p < 0.001$) (Tablas 7 y 8).

Los análisis a posteriori para ambas submuestras indicaron que existen diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por los métodos de Gajdos y Westerlund y por los métodos de Gajdos y Piomelli (test de Scheffé). En las submuestras estudiadas (PCT, no porfíricos), no se detectaron diferencias significativas (test de Scheffé) entre los valores medios obtenidos por los métodos de Westerlund y Piomelli.

Tanto en la muestra global, como en las submuestras estudiadas, los valores medios obtenidos por los métodos de Piomelli y Westerlund son superiores a los detectados por el método de Gajdos.

Nuestro objetivo fue introducir como método rutinario en el laboratorio, un micrométodo para la cuantificación de porfirinas urinarias, que pudiese reemplazar al tradicional macrométodo de Gajdos y Gajdos-Török, lo cual supone el empleo de un menor

Tabla 7. Parámetros estadísticos obtenidos para la excreción urinaria de porfirinas ($\mu\text{g/l}$), en pacientes afectos de PCT, mediante los métodos analíticos de Gajdos y Gajdos-Török, Piomelli, Westerlund.

	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Gajdos (n=255)	402.24	671.49	9.00	4464.00
Piomelli (n=254)	721.05	1192.94	43.00	8087.18
Westerlund (n=254)	671.57	1174.19	28.00	6920.09

Tabla 8. Parámetros estadísticos obtenidos para la excreción urinaria de porfirinas ($\mu\text{g/l}$), en individuos no porfíricos mediante los métodos analíticos de Gajdos y Gajdos-Török, Piomelli, Westerlund.

	Media	D.E.	Mínimo	Máximo
Gajdos (n=55)	115.83	113.37	2.00	508.09
Piomelli (n=54)	206.91	171.63	12.00	722.18
Westerlund (n=55)	158.87	122.17	12.00	520.09

volumen de orina (100 μ l) y menor cantidad de reactivos.

La precisión del nuevo método ha de ser evaluada usando como referencia un método de exactitud conocida, como en nuestro caso el método de Gajdos y Gajdos-Török (82) (83). Para ello se utiliza el método estadístico de regresión lineal ($y=a+bx$), determinando la pendiente (b), el punto de corte (a) y el coeficiente de correlación (r).

La pendiente de la recta de regresión, nos da una estimación del error analítico proporcional y el punto de corte una estimación del error analítico sistemático.

Las muestras de orina de 346 pacientes fueron analizadas por duplicado por los métodos de Westerlund y Gajdos. Se utilizaron las medias de las duplicaciones de ambos métodos que son representadas en la figura 15. En el eje de abcisas se representan los valores obtenidos por el método estándar (Gajdos) y en el eje de ordenadas los obtenidos por el nuevo método en estudio (Westerlund).

El análisis de la regresión lineal nos dió los siguientes estadísticos: pendiente 1.58, punto de corte 14.2 (μ g/l) y coeficiente de correlación 0.90.

Estos estadísticos son interpretados de la siguiente forma, la pendiente difiere significativamente de 1 (t-Student, $t=14.14$, $p < 0.01$) mostrando que el error analítico proporcional es de un 58% a favor del nuevo método. El punto de corte refleja un error sistemático constante de 14.2 μ g/l. Este error sistemático constante es pequeño si consideramos que el rango de valores de las variables X e Y es de 2 μ g/l a 7000 μ g/l. El alto valor del coeficiente de correlación confirma que se ha estudiado un amplio

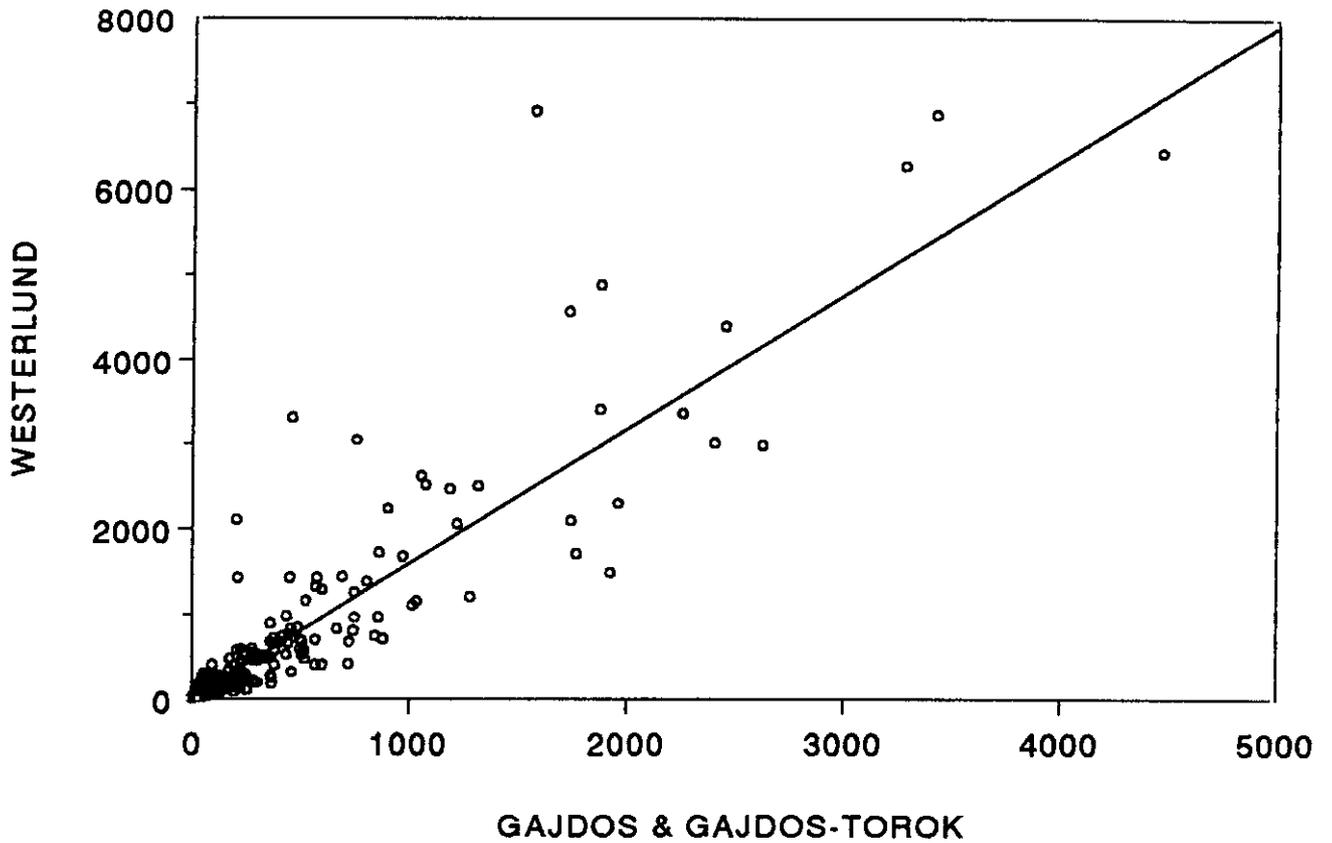


Fig.15. Regresión lineal de los valores de porfirinas urinarias ($\mu\text{g/l}$) obtenidos por el método de Westerlund y por el método de Gajdos ($y = 14.2 + 1.58X$, $r = 0.90$, $F = 1.50 \times 10^3$, $p < 0.001$).

rango de concentraciones y que los datos nos dan una estima real de la regresión estadística.

Las muestras urinarias se analizaron también por duplicado por los métodos de Piomelli y Gajdos. Se utilizaron las medias de las duplicaciones de ambos métodos, representándose en la figura 16. En el eje de abscisas se representan los valores obtenidos por el método de Gajdos y en el de ordenadas los obtenidos por el método de Piomelli.

El análisis de la regresión lineal nos da los siguientes estadísticos: pendiente 1.63, punto de corte 35.5 $\mu\text{g/l}$ y coeficiente de correlación 0.93.

La pendiente difiere significativamente de 1 (t-Student, $t=19.09$, $p < 0.01$) mostrando que el error analítico proporcional es de un 63 % a favor del método de Piomelli. El punto de corte refleja un error sistemático de 35.5 $\mu\text{g/l}$, pequeño si consideramos que el rango de valores para las variables X e Y es de 2 $\mu\text{g/l}$ a 8000 $\mu\text{g/l}$. El alto valor del coeficiente de correlación confirma al igual que en el caso anterior que nuestros datos nos dan una estima real de la regresión estadística.

Los criterios para la aceptación de un nuevo método dependen tanto de su aplicabilidad como de su eficacia. La aplicabilidad engloba factores tales como tamaño de muestra, tipo de muestra que se usa, velocidad del análisis, equipo necesario, coste y requerimientos personales. La eficacia considera los tipos y magnitud de los errores. Juntos la aplicabilidad y la eficacia definen los criterios de aceptabilidad. Estos criterios se toman en el laboratorio y para las condiciones clínicas en las que

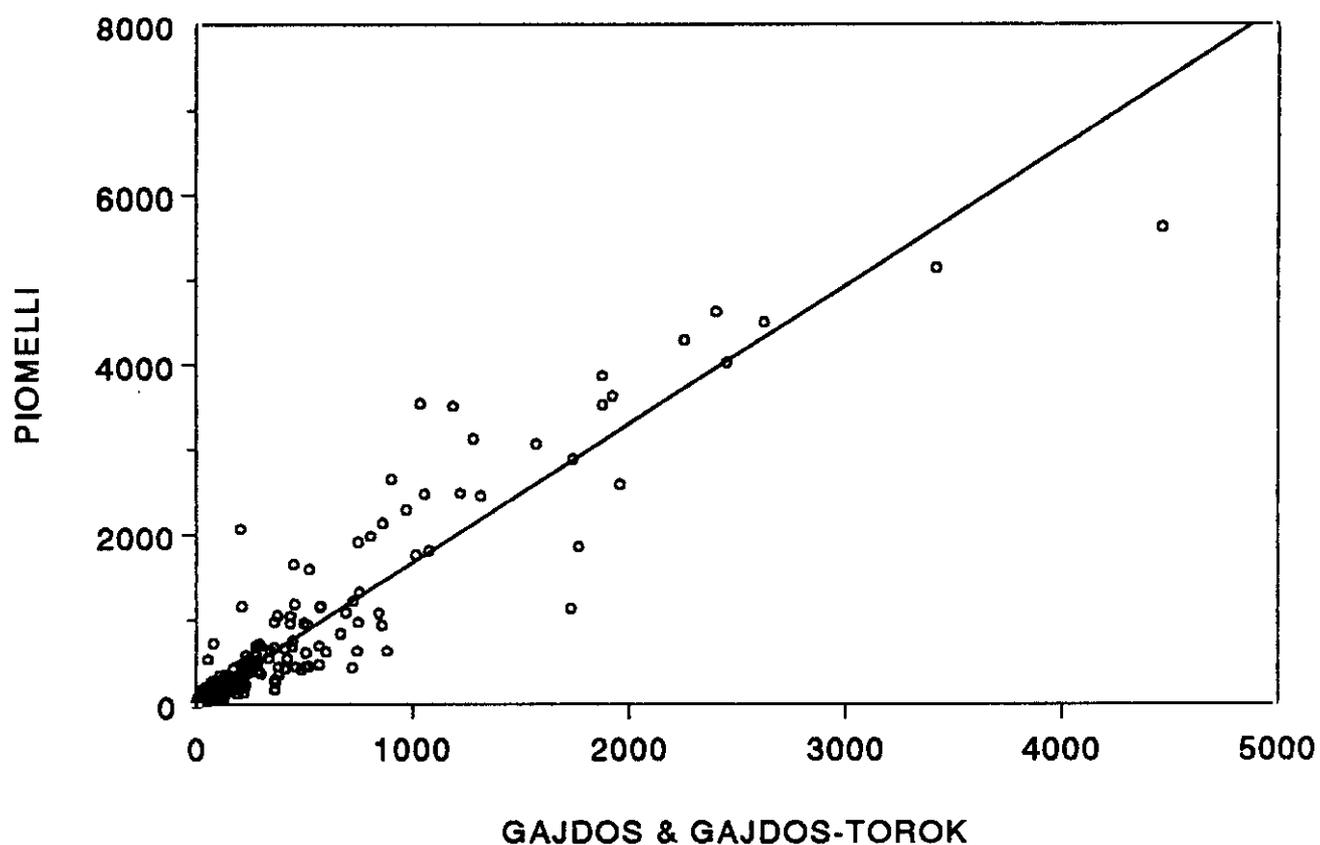


Fig.16. Regresión lineal de los valores de porfirinas urinarias ($\mu\text{g/l}$) obtenidos por el método de Piomelli y por el método de Gajdos ($y = 35.5 + 1.63X$, $r = 0.93$, $F = 2.34 \times 10^3$, $p < 0.001$).

los valores para dichos métodos van a ser utilizadas.

Ambos micrométodos Westerlund y Piomelli presentan similar eficacia, esto es error sistemático constante pequeño (14.2 µg/l, 35.5 µg/l) y un error analítico proporcional del 58% y 63% respectivamente. La comparación de las pendientes de las rectas de regresión de ambos métodos, se realizó mediante el test de Welch. No se detectaron diferencias significativas entre ambas pendientes ($t=0.94$, $p>0.5$).

Por tanto el criterio para la aceptación de uno de los dos micrométodos va a depender de su aplicabilidad. Ambos requieren muestras pequeñas de orina (100 µl) y el mismo equipo y requerimientos personales. Sin embargo el método de Piomelli, en principio diseñado para la cuantificación de porfirinas sanguíneas, y adaptado en nuestro laboratorio para la cuantificación de porfirinas urinarias, conlleva varios pasos de extracción, los cuales no son necesarios en el método de Westerlund. Con estos pasos de extracción se eliminan productos que pudiesen interferir en la fluorescencia, no obstante persiste fluorescencia no específica que lleva a una sobrevaloración de concentración de porfirinas. Asimismo el método de Westerlund introduce la oxidación de porfirinógenos (sin color) a porfirinas (fluorescentes) mediante la utilización del yoduro potásico yodado. En el método de Piomelli la oxidación de los porfirinógenos tiene lugar por la propia acidificación de la muestra. Con estos criterios consideramos que el método de Westerlund se muestra plenamente adecuado para el estudio de la porfirinuria total.

VI.2. RECUPERACION Y VARIABILIDAD DEL METODO DE WESTERLUND

Las porfirinas, como ya se comentó anteriormente, presentan un espectro de absorción cuyo máximo se sitúa alrededor de 400-410 nm, zona que se denomina banda de Soret. Este máximo de absorción aparece tanto si las porfirinas se encuentran en disoluciones ácidas como básicas, pero además pueden aparecer otras bandas que variarán dependiendo del disolvente que se utilice (84)(5).

Si las porfirinas se disuelven en PBS (buffer fosfato), que es débilmente alcalino, aparecerán además de la banda de Soret otras cuatro bandas que se denominan α , β , γ , δ cuyas longitudes de onda son 500, 542, 562 y 612 nm respectivamente.

Sin embargo, si las porfirinas se disuelven en HCl 1N persisten la banda de Soret y las bandas α y β pero desaparecen las bandas γ y δ (Fig.17).

Esto nos demuestra que las bandas de absorción son características para cada solvente, variando según el pH, pero en cualquier caso se mantiene la banda de Soret, razón por la cual esta se utiliza como máximo de excitación de la molécula porfirínica cuando se trata de hacer determinaciones espectrofluorimétricas.

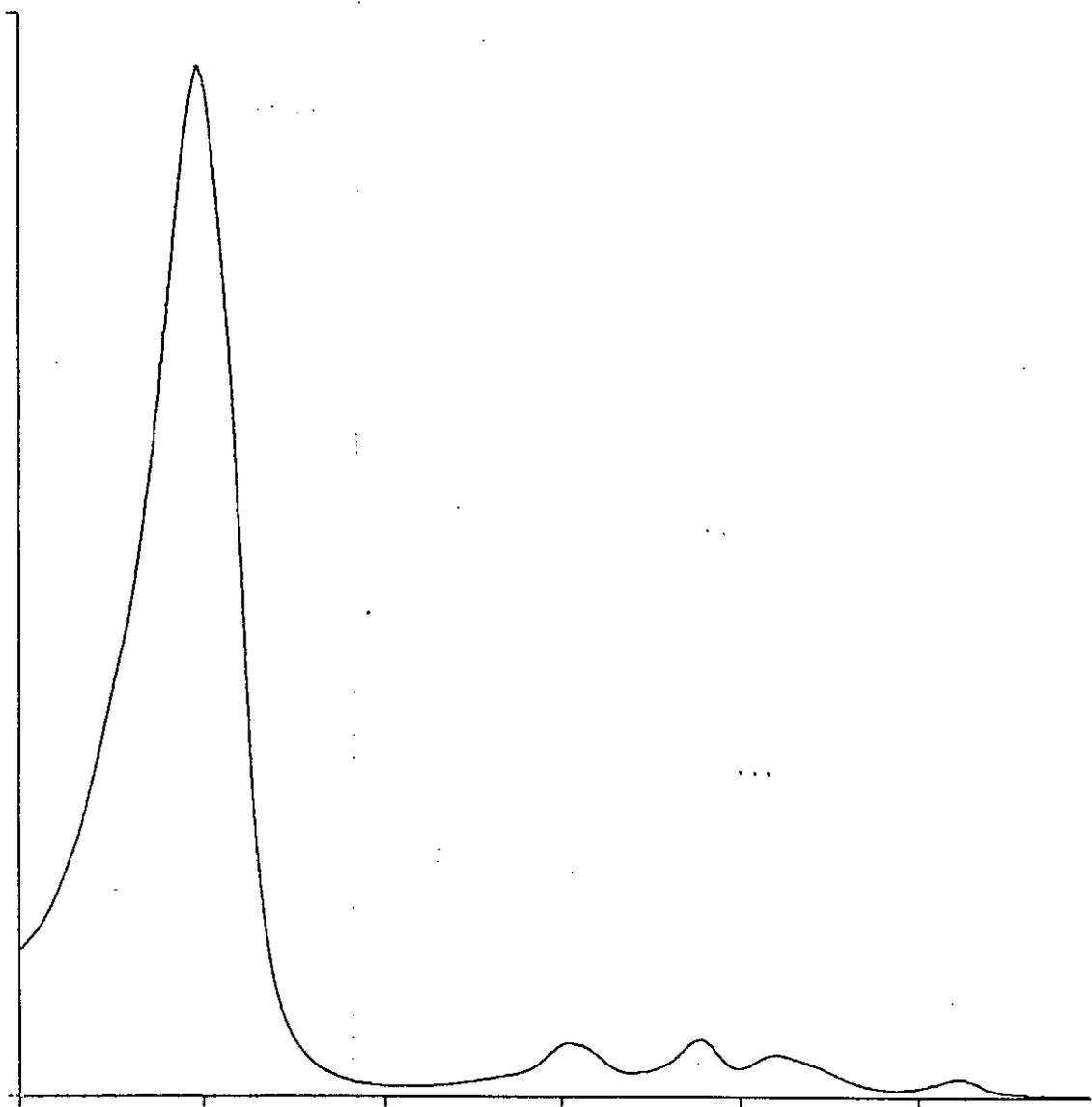


Fig.17. Espectro de absorción en el que aparecen la banda de Soret y las bandas α , β , γ y δ .

Fijada ya la longitud de onda de excitación queda por determinar cual es la más adecuada longitud de onda de emisión. En solución clorhídrica las longitudes de onda utilizadas para la emisión corresponden a 595 y 650 nm dado que cuando se realiza el espectro de emisión aparecen dos picos correspondientes a estas longitudes de onda, siendo el pico mayor a 595 nm que a 650 nm por lo cual habitualmente la longitud de onda utilizada para la emisión era de 595 nm (Fig.18).

Posteriormente se observó que el espectro de excitación presentaba un mayor pico con una longitud de onda de emisión de 595 nm pero también era más alta la línea base, lo cual quiere decir que en esta longitud de onda se detecta mayor cantidad de impurezas que a 650 nm por lo que coincidiendo con Westerlund consideramos que es más adecuado fijar la longitud de onda de emisión a 650 nm (Fig.19).

Una vez determinadas las longitudes de onda a las cuales deben realizarse los barridos espectrofluorimétricos, realizamos una serie de experiencias para determinar la reproductibilidad del método de Westerlund.

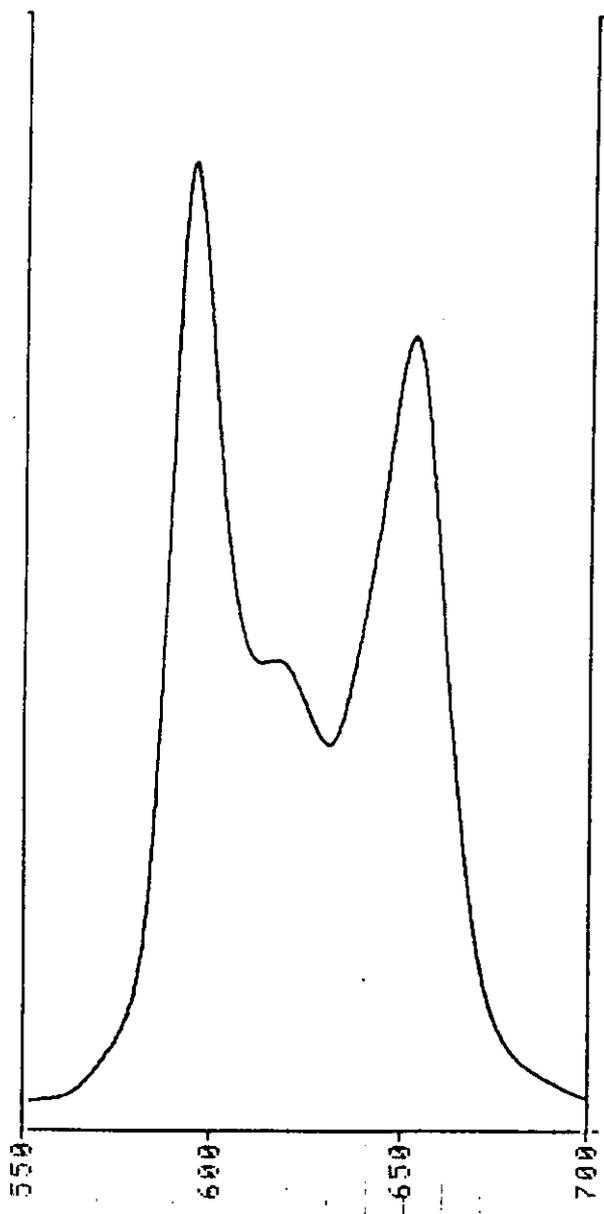


Fig.18. Espectro de emisión de coproporfirina estandar fijando lambda de excitación a 405 nm.

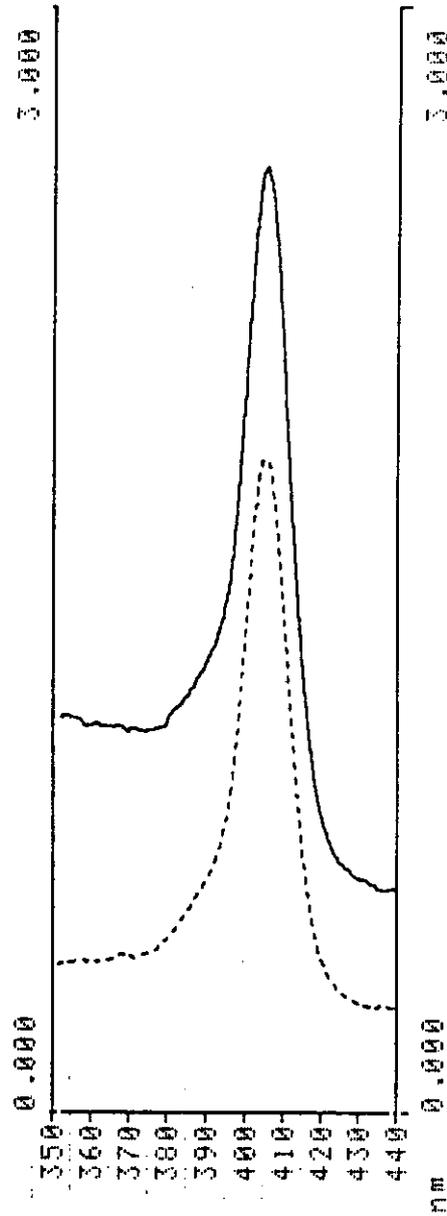


Fig.19. Espectros de excitación de porfirinas urinarias fijando lambda de emisión a 650 nm (—) o a 595 nm (----).

Una de las experiencias realizadas fue determinar el porcentaje de recuperación del método para determinar la posibilidad que tiene éste de medir correctamente cantidades puras añadidas a muestras analizadas rutinariamente (85)(86). Para ello se elaboró una orina artificial sobre la cual se añadieron los patrones de porfirinas previamente valorados, así podemos asegurar que las únicas porfirinas existentes son las añadidas. La orina artificial se elaboró según las recomendaciones de Katsumato T. y cols. (87) (11.6 g cloruro sódico, 2 g fosfato amónico dibásico, 15 g de urea, agua destilada).

Los patrones de porfirinas son valorados tanto espectrofluorimétrica como espectrofotométricamente, añadiéndose 100 µl de estos patrones a 200 µl de orina artificial.

En las tablas 9 y 10 aparecen los porcentajes de recuperación obtenidos tanto si se añade como patrón coproporfirina (COPRO III) como si el patrón añadido es uroporfirina (URO III).

El rango de recuperación varía entre 112% y 89% siendo el porcentaje medio de 99.8% para la coproporfirina y de 98.5% para la uroporfirina, lo cual supone un error proporcional de 0.02% y 1.5%, es decir, un error de 0.02 a 1.5 µg/l en una concentración total de 100 µg/l. Estos porcentajes son mayores que los obtenidos por el método de Piomelli cuyos resultados se reflejan en las tablas 11 y 12 (Crespo M.J. Tesina de licenciatura. Fac. de CC.Biológicas. Universidad Autónoma. 1988)

Tabla 9. Recuperación analítica de coproporfirina añadida a orina control.

Valoración de patrones añadidos ($\mu\text{g/l}$)		Orina artificial	
Espectrofotometría	Espectrofluorimetría	Muestra	% Recuperación
1797	1990	2025	101.7
1266	1377	1456	105.7
720	821	759	92.4
339	371	383	103.2
163	189	180	95.2
77	92	93	101.1

Fijando en todos los casos λ excitación 405 nm

λ emisión 650 nm

Porcentaje de recuperación total = 99.8 %

Tabla 10. Recuperación analítica de uroporfirina añadida a orina control.

Valoración de patrones añadidos ($\mu\text{g/l}$)		Orina artificial	
Espectrofotometría	Espectrofluorimetría	Muestra	% Recuperación
2620	3154	3478	110.0
1185	1427	1971	89.0
600	771	685	89.0
400	382	430	112.0
100	111	103	92.7
77	92	93	101.1

Fijando en todos los casos λ excitación 405 nm

λ emisión 650 nm

Porcentaje de recuperación total = 98.5 %

Tabla 11. Recuperación analítica de coproporfirinas determinadas por el método de Piomelli (ORINA CONTROL: \bar{X} = 234.1)

[COPRO] añadida a la orina ($\mu\text{g/l}$)	Piomelli ($\mu\text{g/l}$)	Recuperación (1)-234.1	%
25.3	249.9	15.8	62.4
39.6	260.3	26.2	66.2
63.4	282.9	48.8	77.0
105.6	305.4	71.3	67.5
158.4	333.8	99.7	62.9
253.5	409.4	175.3	69.1
396.1	491.3	257.2	64.9
633.8	616.1	382.0	60.3
1010.2	1108.8	874.7	86.6
1616.3	1397.4	1163.3	72.0
2486.6	1827.2	1593.1	64.1
4040.7	3709.9	3475.8	86.0
6465.2	5559.0	5324.9	82.3
10101.6	7943.0	7708.9	76.3
16163.0	11430.5	11196.4	69.3
17013.7	12445.2	12211.1	71.8

Tabla 12. Recuperación analítica de uroporfirinas determinadas por el método de Piomelli (ORINA CONTROL: \bar{X} = 234.1)

[URO] añadida a la orina ($\mu\text{g/l}$)	Piomelli ($\mu\text{g/l}$)	Recuperación (1)-234.1	%
25.1	200.9	36.0	143.4
39.3	204.8	39.9	101.5
62.9	222.2	57.3	91.1
104.8	286.5	79.4	75.8
157.3	333.1	121.6	77.3
251.7	427.9	168.2	66.8
393.3	578.5	263.0	66.9
629.2	687.4	413.6	65.7
993.5	1215.9	772.5	72.7
1573.1	1540.2	1051.0	66.8
2517.0	3034.0	1375.3	54.6
3775.5	4100.1	2869.1	76.0
6292.5	7070.5	3935.2	62.5
9935.5	10661.7	6905.6	69.5
15731.2	11394.2	10496.8	66.7
17161.3	12445.2	11229.3	65.4

Para analizar la precisión del método de Westerlund, debemos estudiar la variabilidad que se observa cuando una misma muestra se procesa varias veces ("within-run"); para ello nos basamos en los coeficientes de variación obtenidos ante diferentes concentraciones de porfirinas en orina (88)(89).

Para determinar el coeficiente de variación se realizó la siguiente experiencia. Una misma muestra de orina de un paciente porfírico con alta concentración de uroporfirina se diluyó sucesivas veces.

A- 5000 µg/l	H- 300 µg/l
B- 4000 "	I- 200 "
C- 3000 "	J- 100 "
D- 2000 "	K- 50 "
E- 1000 "	L- 40 "
F- 500 "	M- 30 "
G- 400 "	N- 10 "

Se tomaron 100 µl de cada una de las diluciones y cada muestra se procesó por sextuplicado mediante el método de Westerlund. Los resultados obtenidos se muestran en la tablas 13a y 13b.

Se observó cómo el coeficiente de variación aumenta a medida que disminuye la concentración de las muestras.

Con el fin de disminuir este coeficiente de variación se tomaron mayores volúmenes de muestra, 200 y 400 µl. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14 y 15, observándose una disminución del coeficiente de variación.

Tabla 13a. Valores obtenidos al procesar 100 μ l de crina de un paciente con uroporfirinuria mediante el método de Westerlund.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
4665	3728	2914	2175	1098	561	413	308	174	87	38	22	9	1
4526	3963	2898	2256	1116	589	433	319	185	98	37	10	7	3
4567	4011	2984	2166	1107	543	425	313	162	94	36	26	8	1
4280	3304	3055	1809	1094	608	430	321	182	86	42	22	10	4
4588	3354	3044	1929	1136	567	452	319	183	92	42	23	6	1
4329	4073	2995	2101	1108	577	441	317	185	82	35	21	6	1

Tabla 13b. Media, desviación estandar (DE) y coeficiente de variación (CV) de los valores obtenidos al procesar 100 μ l de orina de un paciente con uroporfirinuria mediante el método de Westerlund.

	Media	DE	CV
A (5000 μ l)	4492	153.2	3.40
B (4000 μ l)	3905	131.8	3.37
C (3000 μ l)	2982	64.8	2.17
D (2000 μ l)	2073	169.6	8.18
E (1000 μ l)	1100	15.0	1.30
F (500 μ l)	574	22.7	3.95
G (400 μ l)	432	13.4	3.10
H (300 μ l)	316	4.8	1.50
I (200 μ l)	178	9.1	5.10
J (100 μ l)	90	5.8	6.50
K (50 μ l)	38	3.1	7.80
L (40 μ l)	20	5.5	26.60
M (30 μ l)	8	1.6	21.30
N (10 μ l)	2	1.2	72.40

Tabla 14. Determinación del coeficiente de variación al procesar 200 μ l de orina de las muestras menos concentradas mediante el método de Westerlund.

	Diluciones (μ g/l)			
	K	L	M	N
	38	18	5	1.2
	37	16	8	2.0
	37	16	9	1.2
	36	15	8	1.5
	35	16	7	2.1
	37	15	8	1.0
Media	36.6	16	7.5	1.5
DE	1.03	1.1	1.3	0.5
CV	2.8	6.8	18.2	30.5

Tabla 15. Determinación del coeficiente de variación al procesar 400 μ l de orina de las muestras menos concentradas mediante el método de Westerlund.

	Diluciones (μ g/l)			
	K	L	M	N
	30	13	4.0	4.0
	31	13	4.0	4.0
	31	16	3.8	3.0
	30	11	4.2	3.1
	30	12	4.1	3.1
	31	11	3.0	3.0
Media	30.6	13	3.9	3.7
DE	0.5	1.8	0.2	0.7
CV	1.6	14.1	5.4	21.1

Por tanto en aquellos casos en los que se detecta una baja concentración de porfirinas se aconseja aumentar el volumen de orina antes de procesar la muestra por el método de Westerlund.

En casos de muestras con una elevada concentración de porfirinas no se observó un alto coeficiente de variación, por lo que si reducimos la cantidad de muestra tomada a 25 o 50 μl , se obtienen coeficientes de variación que no difieren significativamente de los obtenidos con la cantidad de 100 μl de orina (Tabla 16 y 17). Por tanto no es necesario reducir la cantidad de orina inicial tomada.

Se realizó la misma experiencia que en el caso anterior con una muestra de orina de un individuo que presentaba coproporfirinuria. El procedimiento seguido fue el mismo, a partir de una orina de concentración conocida se realizaron sucesivas diluciones. Una alícuota de 100 μl de cada una de las diluciones realizadas fue procesada por el método de Westerlund. Al igual que en el caso anterior se observa que el coeficiente de variación es elevado en aquellas muestras con concentraciones inferiores a 50 $\mu\text{g/l}$. Por tanto siempre que se trabaje con muestras poco concentradas puede conseguirse una menor variabilidad aumentando la cantidad de muestra tomada.

Tabla 16. Determinación del coeficiente de variación al procesar 25 µl de orina de pacientes con uroporfirinuria mediante el método de Westerlund.

	Diluciones (µg/l)						
	A	B	C	D	E	F	G
	5686	4455	3888	2025	972	486	324
	5824	4860	3888	2106	1134	518	405
	5492	3564	3807	1863	1053	518	324
	5370	4455	3726	1944	1012	429	324
	5103	4212	3726	1863	972	518	324
	5184	4617	3321	2025	1132	453	243
Media	5443	4360	3726	1971	1046	487	324
DE	281	444	211	58	74.5	38	51
CV	5.1	10.2	5.6	4.9	7.1	7.9	15.8

Tabla 17. Determinación del coeficiente de variación al procesar 50 µl de orina de pacientes con uroporfirinuria mediante el método de Westerlund.

	Diluciones (µg/l)						
	A	B	C	D	E	F	G
	6504	5651	4990	3397	1138	676	439
	7856	6375	4572	3171	1366	687	515
	7245	6617	4636	3226	1357	710	386
	7239	5651	4572	3181	1363	697	418
	7840	5828	4701	3121	1402	639	470
	7373	5941	4636	3268	1414	730	322
Media	7343	6010	4684	3227	1339	685	425
DE	497	399	157	97	101.4	256	67.1
CV	6.76	6.6	3.3	3.1	7.5	3.7	15.7

VI.3. ELABORACION DE RECTAS PATRON PARA DETERMINAR LAS FRACCIONES COPRO Y URO A PARTIR DE PORFIRINAS TOTALES

El tradicional método de Gajdos y Gajdos Török determina las fracciones COPRO y URO presentes en una muestra de orina, lo cual supone una ventaja frente a los micrométodos de Piomelli y Westerlund, los cuales cuantifican porfirinas totales.

Con el fin de determinar con exactitud las fracciones COPRO y URO mediante los citados métodos, se desarrolló un procedimiento que permitió la utilización de ambos micrométodos no sólo cuantitativa sino también cualitativamente.

Las muestras urinarias fueron procesadas mediante los métodos de Piomelli y Westerlund, y posteriormente se sometieron a un barrido fluorimétrico fijando la longitud de onda de emisión bien a 595 nm (método de Piomelli) o a 650 nm (método de Westerlund) y la longitud de onda de excitación entre 350 y 440 nm, obteniéndose de esta manera el espectro de excitación cuyo máximo se determinó con la ayuda de la primera derivada (Fig.20) (90)(91)(92)(93)(94). La derivada del espectro de excitación revela un punto de inflexión en la región de la banda de Soret, que corresponde al pico máximo del espectro. Existe una correlación lineal entre la concentración de porfirinas y el punto de corte con la línea base a una longitud de onda claramente definida.

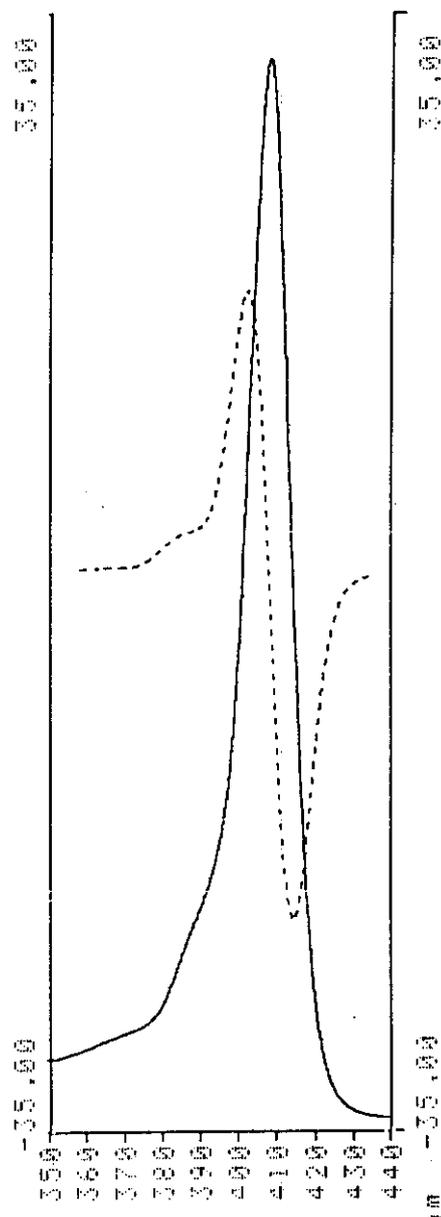


Fig.20. Espectro de fluorescencia de una muestra de orina, con su primera derivada.

Se ha observado que el punto de corte con la línea base en la primera derivada del espectro, proporciona una buena estimación de la proporción uroporfirina/coproporfirina presentes en una muestra de orina, hecho que se fundamenta en el progresivo desplazamiento del punto de corte al analizar diversas mezclas equimoleculares a proporciones variables de COPRO y URO estándar (95). Por tanto, la proporción uroporfirina/coproporfirina se calcula para la longitud de onda a la cual la derivada del espectro intercepta la línea base. Partimos de dos soluciones estándar equimoleculares de coproporfirina y uroporfirina (Coproporfirina III, Uroporfirina III con concentración de 0.5 µg/l). A partir de estas soluciones se obtuvieron una serie de muestras con concentraciones variables de coproporfirina y uroporfirina, partiendo de 100% de COPRO y 0% de URO, hasta alcanzar 0% de COPRO y 100% de URO (Tablas 18 y 19).

Cada una de estas muestras fue procesada por los métodos de Westerlund y Piomelli y se sometieron a un barrido fluorimétrico obteniéndose el correspondiente espectro de excitación a partir del cual se determinaron los máximos de excitación.

La relación entre las concentraciones de COPRO y URO de cada muestra y su correspondiente máximo de excitación, nos permitió establecer una ecuación a partir de la cual las fracciones COPRO y URO pueden ser estimadas conociendo el máximo de excitación de la muestra urinaria y la cantidad de porfirinas presentes en la muestra (Fig. 21 y 22).

Tabla 18. Máximos de excitación correspondientes a muestras con diferentes porcentajes de coproporfirina y uroporfirina estandares, obtenidos analizando las muestras con el micrométodo de Piomelli y utilizando longitud de onda de emisión de 595 nm.

Porcentajes de COPRO y URO	Máximos de excitación
100% COPRO- 0% URO	405.0
90% COPRO- 10% URO	405.5
80% COPRO- 20% URO	405.9
70% COPRO- 30% URO	406.4
60% COPRO- 40% URO	406.8
50% COPRO- 50% URO	407.3
40% COPRO- 60% URO	407.7
30% COPRO- 70% URO	408.06
20% COPRO- 80% URO	408.4
10% COPRO- 90% URO	408.8
0% COPRO-100% URO	409.0

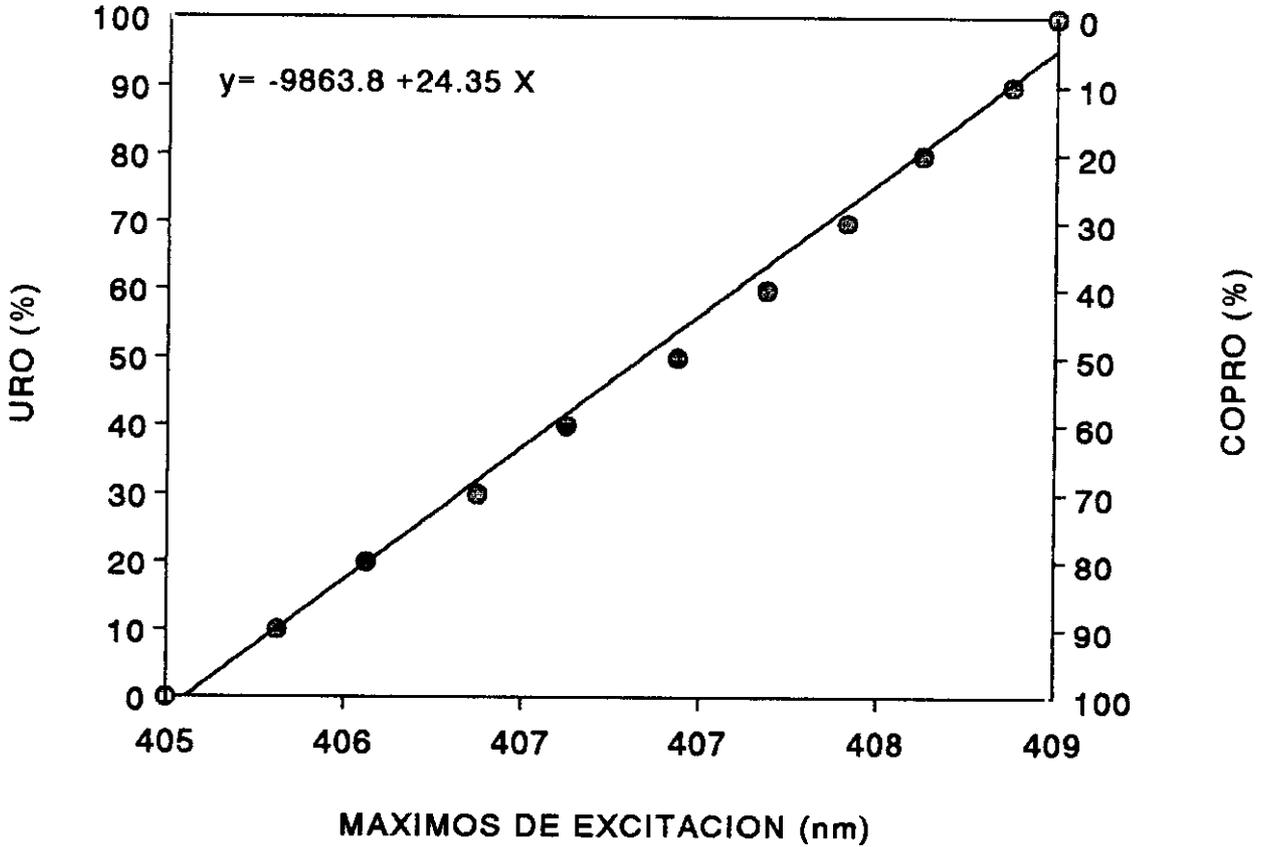


Fig.21. Regresión lineal entre los máximos de excitación (nm) obtenidos por el método de Piomelli y el porcentaje de URO y COPROporfirina ($y = -9863.8 + 24.35 X$, $r=0.99$, $F=1566.4$, $p<0.001$).

Tabla 19. Máximos de excitación correspondientes a muestras con diferentes porcentajes de coproporfirina y uroporfirina estandars, obtenidos analizando las muestras con el micrométodo de Westerlund y utilizando longitud de onda de emisión de 650 nm.

Porcentajes de COPRO y URO	Máximos de excitación
100% COPRO- 0% URO	403.6
90% COPRO- 10% URO	404.0
80% COPRO- 20% URO	404.4
70% COPRO- 30% URO	405.0
60% COPRO- 40% URO	405.45
50% COPRO- 50% URO	406.05
40% COPRO- 60% URO	406.4
30% COPRO- 70% URO	406.75
20% COPRO- 80% URO	407.28
10% COPRO- 90% URO	407.6
0% COPRO-100% URO	407.8

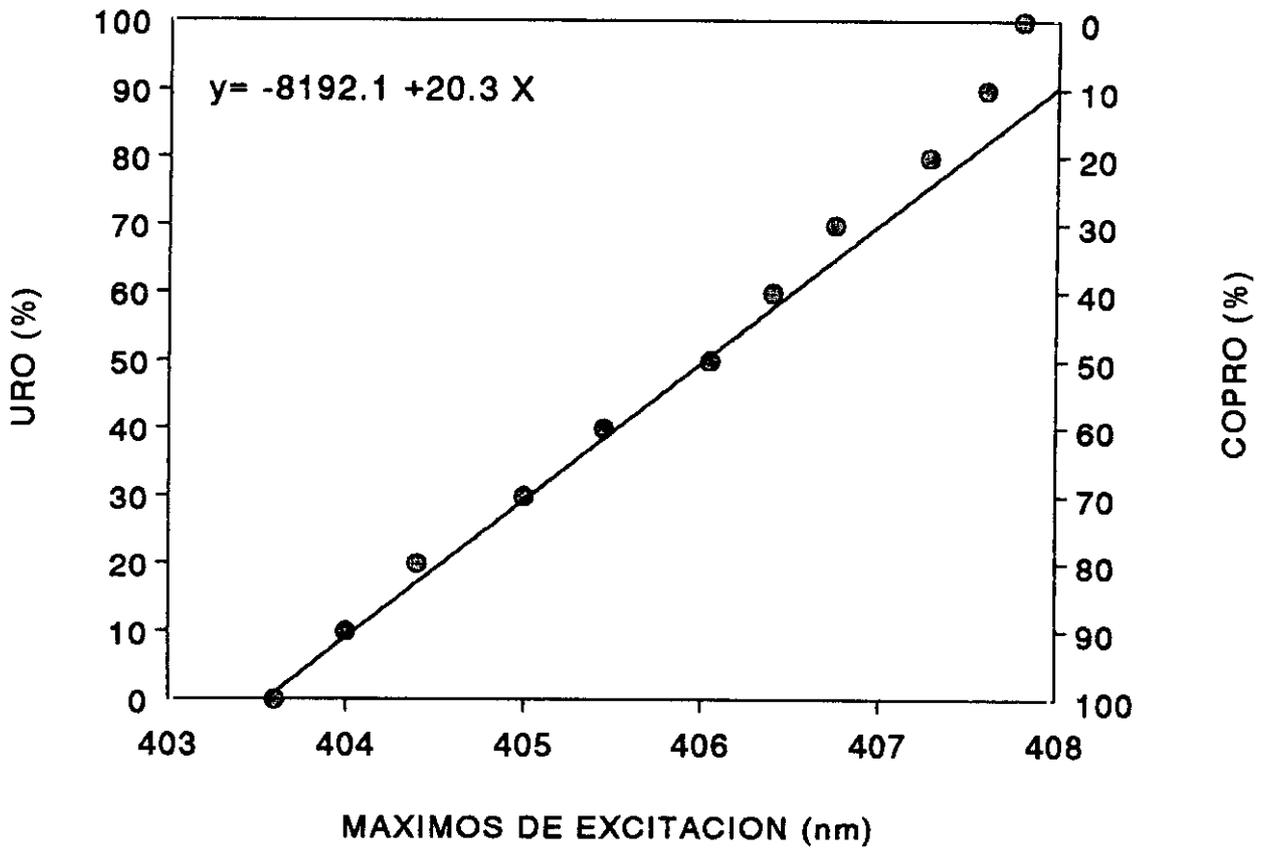


Fig.22. Regresión lineal entre los máximos de excitación (nm) obtenidos por el método de Westerlund y el porcentajes de URO y COPROporfirina ($y = -8192.1 + 20.3 X$), $r=0.99$, $F=700.1$, $p<0.001$).

VI.4. ESTUDIO DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE PORFIRINOGENOS EN INDIVIDUOS NORMALES Y EN PACIENTES CON PCT Y PIA

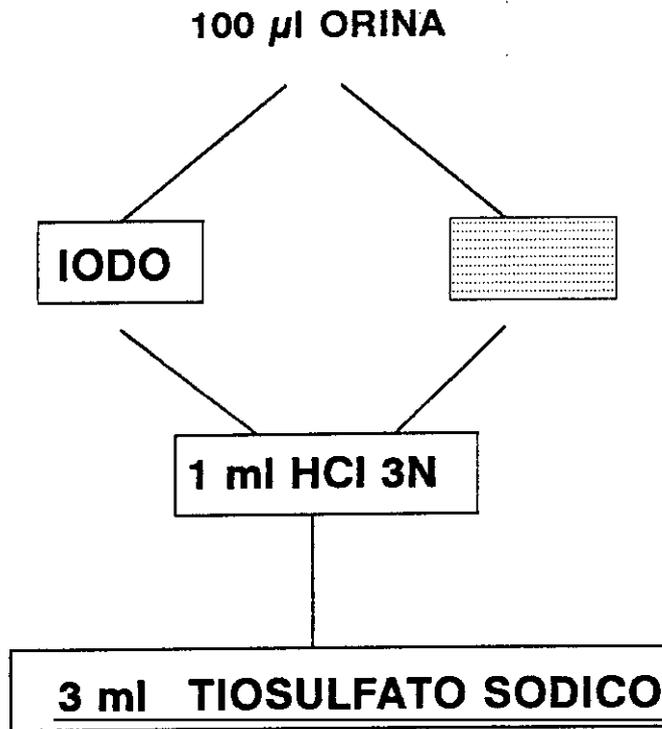
Los porfirinógenos y no las porfirinas son los verdaderos intermediarios de la ruta biosintética del hemo. Ambos son excretados en bilis y orina donde pueden ser determinados tras la oxidación de estos porfirinógenos a porfirinas fluorescentes. Aunque se conoce desde hace años que las porfirinas pueden ser excretadas en la forma oxidada y la reducida, sorprendentemente hay pocas referencias concernientes a la cuantificación de la excreción de porfirinógenos.

El objetivo de este trabajo fue analizar y comparar el porcentaje de excreción urinaria de porfirinógenos en individuos normales y en pacientes con porfiria cutánea tarda (PCT) y porfiria intermitente aguda (PIA), ya que en estos pacientes se aprecia una excreción masiva de porfirinas que podrían tener efecto sobre la oxidación de coproporfirinógenos.

La excreción urinaria de porfirinógenos y porfirinas fue analizada en 30 individuos normales, 30 individuos con PCT y 27 con PIA. El diagnóstico de ambos tipos de porfiria se basó en criterios clínicos y fue confirmado por pruebas bioquímicas.

Se recogió la segunda orina de la mañana y fue inmediatamente procesada. La concentración de porfirinas fue fluorimétricamente determinada de acuerdo con el método de Westerlund y cols. (Fig.23).

Las porfirinas fueron cuantificadas fijando longitudes de onda de excitación y emisión de 405 y 650 nm respectivamente usando coproporfirina I (Porphyrin Products, Logan, Utah, USA) como



Lambda Excitation: 405 nm

Lambda Emission: 650 nm

Fig.23. Representación esquemática del método de Westerland utilizado para la cuantificación de porfirinógenos.

estándar.

La cantidad de porfirinógenos fue determinada como la diferencia entre la cantidad de porfirinas de las muestras oxidadas y las muestras sin oxidar (Fig.24).

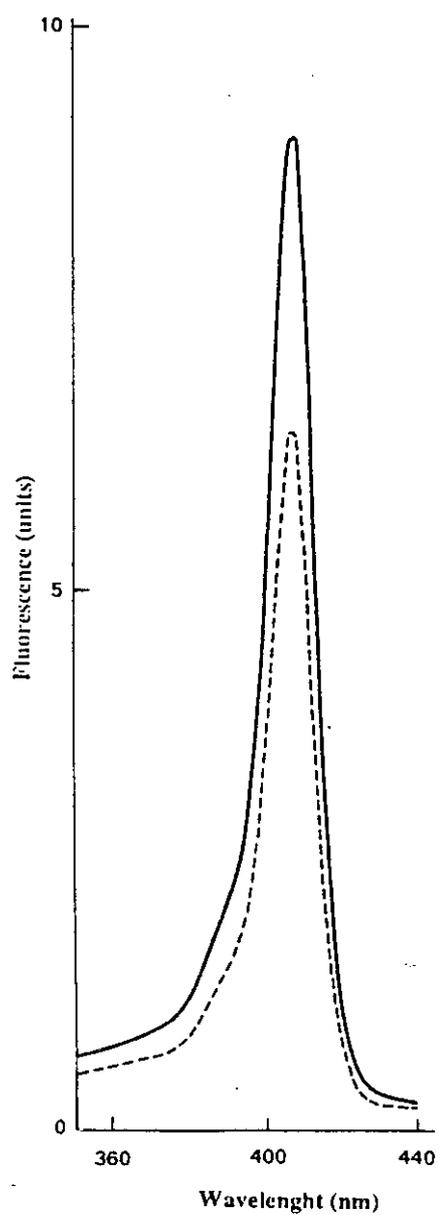


Fig.24. Espectros obtenidos antes (- - -) y después (—) de la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas con iodo.

Las fracciones molares de COPRO y URO se estimaron por la longitud de onda de la señal máxima obtenida al realizar un barrido fluorimétrico con longitud de onda de excitación entre 350 y 440 nm, fijando la longitud de onda de emisión en 650 nm.

Para localizar el pico máximo de cada espectro de excitación se utilizó la primera derivada, quedando localizado con exactitud este punto máximo en el punto de inflexión de la curva.

Las comparaciones estadísticas de la excreción urinaria de porfirinas entre grupos y dentro de cada grupo se realizaron mediante los test no paramétricos de Mann-Whitney (muestras independientes) y Wilcoxon (muestras apareadas), ya que ambas variables no seguían una distribución normal (test Kolmogorov-Smirnov). La comparación del porcentaje de porfirinógenos entre los diferentes grupos se realizó mediante el test paramétrico t-Student (variable seguía una distribución normal). Se realizaron también estudios de regresión y correlación.

En las tablas 20, 21 y 22 aparecen los parámetros estadísticos de los valores de excreción urinaria de porfirinas determinadas sin agente oxidante y tras la oxidación con yodo, así como los valores de porcentajes de porfirinógenos.

Como obviamente esperábamos los dos grupos de pacientes porfíricos mostraron una excreción de porfirinas significativamente mayor que los individuos normales ($p < 0.001$).

La adición de yodo como agente oxidante conduce a la oxidación de los porfirinógenos y por tanto la cantidad de porfirinas aumenta significativamente en los tres grupos ($p < 0.01$) (Tabla 23).

Tabla 20. Parámetros estadísticos de los valores de excreción urinaria de porfirinas sin agente oxidante

	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo	Rango
CONTROL (n=30)	58	30	68	20	121	101
PCT (n=30)	1350	1327	1059	49	4477	4428
PIA (n=27)	1934	3721	641	88	14834	14764

Tabla 21. Parámetros estadísticos de los valores de excreción urinaria de porfirinas tras oxidación con iodo.

	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo	Rango
CONTROL (n=30)	96	48	94	23	184	161
PCT (n=30)	1535	1451	1338	77	4851	4774
PIA (n=27)	2281	3904	815	102	15211	15109

Tabla 22. Parámetros estadísticos de los valores de porcentaje de porfirinógenos.

	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo	Rango
CONTROL (n=30)	38	15	39	4.95	60.9	39.4
PCT (n=30)	17	11	17	2.05	40.8	38.8
PIA (n=27)	20	15	17	2.48	56.9	54.4

Tabla 23. Porfirinas totales y porfirinógenos en orina.

GRUPO	PORFIRINAS ($\mu\text{g/l}$)		PORFIRINOGENOS (%)
	Mediana (Límites)		Media \pm DE
	Muestras sin oxidar	Muestras oxidadas	
Controles (n=30)	68* (20-121)	94 (23-184)	38 \pm 15
PCT (n=30)	1059* (49-4477)	1338 (77-4851)	17 \pm 11**
PIA (n=27)	641* (88-14834)	815 (102-15211)	20 \pm 15**

*p < 0.001

**p < 0.01 vs controles

La oxidación de porfirinógenos a porfirinas puede ser llevada a cabo por diferentes procedimientos. En nuestro grupo de trabajo usamos una solución yodada tal y como sugieren Watson y cols. y Martasek y cols (96)(97) tras descartar el empleo de cloranilo (2,3,5,6 tetracloro-1,4 benzoquinona) como agente oxidante por sus problemas de solubilidad e inestabilidad (98).

Otros autores sugieren exposición de las muestras a la luz solar, adición de NaHCO_3 para conseguir un pH alcalino o adición de peróxido de hidrógeno, observando que la adición de I_2 y H_2O_2 son comparables y con ambos reactivos se obtenían resultados similares de oxidación; no obstante se encontró que el uroporfirinógeno se oxidaba mas rápidamente tras la adición de peróxido de hidrógeno. También se observó que el uroporfirinógeno estaba menos sujeto a la oxidación espontánea durante la extracción con acetato de etilo que el coproporfirinógeno (99). La acidificación por sí sola es insuficiente ya que la oxidación de los porfirinógenos en medio ácido tiene lugar de forma lenta e incompleta.

El porcentaje medio de porfirinas urinarias excretadas como porfirinógenos fue similar en pacientes con PCT (17%) y en pacientes con PIA (20%) siendo en ambos casos significativamente menor que la cantidad observada en individuos normales (38%) Tabla 23. Estos resultados sugieren que la masiva excreción de porfirinas que tiene lugar en pacientes porfíricos puede ser un factor de oxidación para los porfirinógenos. Sin embargo sólo en pacientes con PCT se observó una correlación negativa entre el porcentaje de porfirinógenos y la excreción total de porfirinas (Fig.25).

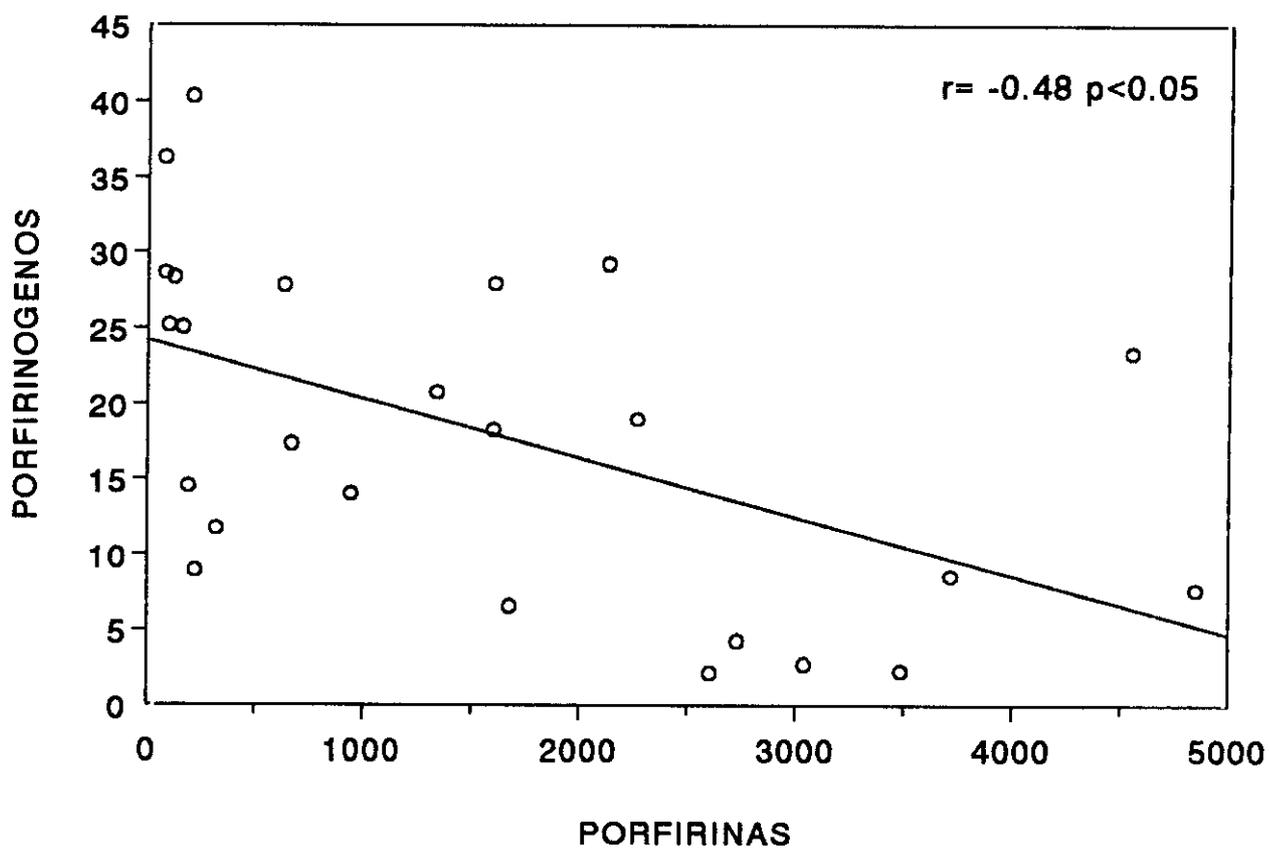


Fig.25. Relación entre el porcentaje de porfirinógenos y porfirinas ($\mu\text{g/l}$) en individuos con PCT.

El alto contenido de porfirinógenos en sujetos normales puede ser debido a la excreción predominante de coproporfirina (76.7%) ya que esta tetracarboxilporfirina es excretada mayoritariamente en la orina en forma de porfirinógeno.

Watson y cols. observaron que en orina reciente entre 25% y 66% de coproporfirina estaba presente en forma de coproporfirinógeno. Asimismo Holecek observó que en intoxicaciones por plomo aproximadamente un 97% de coproporfirina es excretada en forma de porfirinógeno (94)(100). Los estudios de Sano y Rimington muestran que sólo el coproporfirinógeno pasa a través del aparato renal excretándose así en la orina.

El porcentaje medio de la fracción coproporfirina en nuestros pacientes con PCT y PIA fue de 20% y 46.5% respectivamente. La uroporfirina y otras porfirinas altamente carboxiladas presentes principalmente en individuos porfíricos parecen ser excretadas preferentemente en forma oxidada, teniendo lugar esta oxidación en el organismo antes de la excreción urinaria.

Así encontramos porcentajes más bajos de porfirinógenos en la orina de individuos con PCT y PIA, con respecto a la de individuos normales, en los que se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de porfirinógenos y el porcentaje de fracción de COPRO ($r=0.54$, $p < 0.01$) con lo que se evidencia que la coproporfirina es excretada mayoritariamente como porfirinógeno.

Martasek y cols. encontraron similares resultados en el porcentaje de porfirinógenos en sus pacientes con PCT (22.5%)

pero difieren con nuestros resultados en cuanto al porcentaje de porfirinógenos de sus pacientes con PIA (77.1%) (Tabla 24).

El seguimiento de dos pacientes con PIA y dos sujetos normales durante 49 y 9 días respectivamente mostró una gran variedad en el porcentaje de porfirinógenos excretados en orina, reflejado en el alto coeficiente de variación (Tabla 25).

En conclusión, para evitar una infraestimación en la cuantificación de porfirinas, cualquier método analítico debe incluir la oxidación de los porfirinógenos. Tal procedimiento es especialmente importante en circunstancias en las que la excreción de coproporfirina es predominante (como por ejemplo en sujetos normales) y previamente a la adsorción en talco de la orina para su subsecuente análisis cromatográfico de capa fina, ya que los porfirinógenos no son adsorbidos en talco.

Tabla 24. Comparación de nuestros resultados con otros autores.

GRUPO	PORFIRINOGENOS (%)	
	Media \pm DS	
	Nuestros resultados	Otros resultados
CONTROL	38 \pm 15 (n= 30)	[25 - 66] *
PCT	17 \pm 13 (n= 30)	22.5 \pm 10 ** (n= 10)
PIA	20 \pm 16 (n= 27)	77.0 \pm 9.0 ** (n= 10)

(*) Watson y cols. J.Lab.Clin. Med. 37: 831-842;1951

(**) Martasek y cols. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 20:113-117; 1982

Tabla 25. Coeficiente de variación (CV) del porcentaje de porfirinógenos en dos crisis de porfiria intermitente aguda (PIA) y dos individuos normales.

GRUPO	PORCENTAJE	CV
PIA	33.5 ± 15.3 (n= 49)	46
	47.5 ± 26.7 (n= 9)	56
CONTROL	28.3 ± 12.1 (n= 9)	43
	18.7 ± 8.5 (n= 9)	45

VI.5. ESTUDIO DEL RITMO NICTAMERAL DE LA EXCRECION URINARIA DE PORFIRINAS EN SUJETOS NORMALES

La ritmicidad es una propiedad común a todos los seres vivos, que afecta prácticamente a la totalidad de las funciones del organismo. Si se hace una observación detallada de cualquier ser vivo, desde los unicelulares hasta el hombre, se puede comprobar que su actividad experimenta fluctuaciones a lo largo del tiempo, produciéndose los máximos y mínimos en determinados momentos del día. Estas fluctuaciones no siempre son una respuesta a un cambio ambiental, por lo que debe existir algún mecanismo de regulación interno, responsable de dichas variaciones.

Las primeras investigaciones llevadas a cabo sobre ritmos circadianos parten del año 1729 (101) en Paris donde el astrónomo Jean Jacques d'Ortous realizaba observaciones sobre el heliotropo. Posteriormente las investigaciones se centraron en el estudio de los ritmos diarios que se observaban en el hombre en algunos parámetros, tales como ritmo cardíaco, tensión arterial, temperatura corporal y la excreción urinaria que tienen sus más altos niveles en el día y los más bajos en la noche.

El estudio de los ritmos biológicos es denominado cronobiología. Muchos de estos ritmos persisten aunque las condiciones ambientales se modifiquen. Se han realizado experiencias en las que se hacía vivir a las personas durante semanas sin horario de comidas o sin ciclo día-noche y el ritmo continuaba aunque tendía a alargarse hasta 25 horas, de aquí surge una teoría que dice que hay un ciclo de 25 horas

predeterminado genéticamente en los seres humanos.

El objetivo del estudio fue comprobar si la excreción urinaria de porfirinas y de sus precursores en individuos normales mostraba algún ritmo circadiano. Para este estudio se llevó a cabo un método longitudinal, en el que los sujetos son registrados durante varios días, utilizando como diseño experimental, un diseño intragrupo con registros periódicos, lo cual implica interrupción de sueño.

Tomaron parte del estudio 20 voluntarios, 10 hombres y 10 mujeres de edades comprendidas entre 20 y 40 años, que no referían ingesta etílica superior a los 20 g de alcohol por día, no presentaban antecedentes patológicos y no estaban sometidos a ningún tipo de tratamiento, factores éstos que podrían incidir en las determinaciones realizadas.

Los horarios de comida eran los habituales, aproximadamente 8:30, 14:30 y 22:00 horas.

La orina se recogió en intervalos de 4 horas durante 24 horas; una vez cada tres semanas. Las muestras de orina se mantuvieron congeladas hasta su análisis, que se realizó tan pronto como llegaban a nuestro laboratorio. Cada muestra se procesó independientemente, por el ya mencionado método de Westerlund y se determinaron los valores de porfirinas urinarias que se expresan en: porfirinas totales en la muestra (μg porfirinas/L * diuresis (L)), Porfirinas por g. de creatinina en la orina (μg porfirinas/dl /g creatinina/dl), Porfirinas por litro (μg porfirinas/L). La porfirinuria también se expresa en función de sus fracciones mayoritarias coproporfirina y uroporfirina obtenidas a partir de los máximos de excitación de

cada muestra. Asimismo se determinaron los valores de pH, volumen, creatinina y precursores (ALA, PBG).

Los valores de porfirinas y pH no se distribuyen normalmente (test Kolmogorov-Smirnov) por lo que se usaron métodos no paramétricos como Friedman y coeficiente de correlación de Spearman. En caso de significación tras aplicar el test de Friedman, se aplicó un test a posteriori, para determinar las causas de la significación

$$t = \frac{R_i - R_j}{\sqrt{\frac{Ct(r+1)}{6}}} = t_{\text{exp}}$$

siendo R_i y R_j los rangos de cada uno de los grupos, C es igual a 1 cuando no hay empates, t es el tamaño de la muestra y r es el número de grupos. La t_{exp} debe compararse con t teórica correspondiente a la distribución de Tukey, t_{α} ($f=y, K=r$), para buscar así las causas de la significación en caso de que existieran (80).

La existencia de ciclos que determinaran la presencia de un ritmo circadiano fue analizada de acuerdo a Clifton y Steiner y por el sistema Pulsar (programación FORTRAM) descrito por Merriam y Wachter, gracias a la colaboración del Dr. Puig Domingo (102)(103).

Se realizó el estudio de la variación intrapersonal mediante la comparación apareada en las 6 determinaciones de los tres días en el global del colectivo en estudio. No se observaron diferencias significativas en la excreción de porfirinas, ni de

sus fracciones mayoritarias coproporfirinas y uroporfirina, así como tampoco existen diferencias significativas en la excreción de precursores ALA y PBG, ni en los valores del pH en las muestras de orina. Estos resultados se muestran en la tabla 26.

El mismo análisis se repitió subdividiendo la muestra en razón del sexo, no observándose diferencias significativas en los valores de las variables anteriormente mencionadas, los resultados obtenidos se muestran en las tablas 27 y 28.

En las tablas 29 a 37, se muestran los valores obtenidos para cada variable en cada uno de los días y durante los períodos en estudio, estos resultados son representados en las figuras 26-34.

Una vez comprobada la no existencia de variaciones intrapersonales, se realizó el estudio de la variación nictameral mediante la comparación de la porfirinuria obtenida en cada período horario, asimismo se analizaron las posibles variaciones en la excreción de precursores porfirínicos y de los valores de pH urinarios en cada período en estudio.

Tabla 26. Resultados del test de Friedman para las variables porfirinas(μg), COPRO (μg), URO(μg), ALA (mg/l), PBG(mg/l), pH, porfirinas/creatinina($\mu\text{g/g}$), COPRO/creatinina($\mu\text{g/g}$), URO/creatinina($\mu\text{g/g}$)

Período	Porfirinas		COPRO		URO		pH		ALA		PBG	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
1	2.1	0.3	2.7	0.3	3.9	0.2	4.9	0.1	0.7	0.7	0.4	0.8
2	1.2	0.5	0.7	0.7	0.3	0.8	0.3	0.8	1.2	0.5	0.2	0.9
3	1.9	0.4	1.3	0.5	1.1	0.6	0.3	0.8	1.0	0.6	6.2	0.1
4	0.9	0.6	0.1	0.9	0.5	0.8	0.3	0.8	0.7	0.7	0.9	0.6
5	0.8	0.7	0.7	0.7	3.6	0.2	0.4	0.8	1.3	0.5	5.7	0.1
6	2.7	0.3	1.2	0.5	0.5	0.7	2.1	0.3	3.6	0.1	9.3	0.1

Continua Tabla 26.

Período	Porfirinas/creatinina		COPRO/creatinina		URO/creatina	
	F	p	F	p	F	p
1	3.9	0.1	4.9	0.1	1.8	0.4
2	4.3	0.1	2.1	0.3	0.9	0.6
3	2.7	0.2	0.5	0.8	0.2	0.9
4	9.1	0.1	6.5	0.1	3.2	0.2
5	7.6	0.1	3.7	0.1	1.5	0.5
6	2.8	0.2	2.9	0.2	0.3	0.8

Tabla 27. Resultados del test de Friedman para las variables mencionadas en la Tabla 1 para el grupo de varones.

Período	Porfirinas		COPRO		URO		pH		ALA		PBG	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
1	1.4	0.5	1.4	0.5	3.8	0.1	3.8	0.1	0.1	0.9	0.6	0.7
2	1.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.7	0.0	1.0	0.5	0.8	1.9	0.4
3	5.6	0.1	4.2	0.1	4.2	0.1	1.4	0.5	2.7	0.2	1.5	0.4
4	3.2	0.2	0.8	0.7	3.2	0.2	1.8	0.4	0.3	0.8	0.2	0.9
5	2.4	0.3	1.4	0.5	3.8	0.1	2.6	0.3	1.9	0.3	2.2	0.3
6	3.8	0.1	1.8	0.4	2.4	0.3	0.6	0.7	1.1	0.6	2.6	0.3

Continua Tabla 27.

Período	Porfirinas/creatinina		COPRO/creatinina		URO/creatinina	
	F	p	F	p	F	p
1	4.2	1.2	4.2	0.1	4.6	0.1
2	3.8	0.1	3.8	0.1	0.8	0.6
3	2.6	0.3	2.2	0.3	0.1	0.9
4	5.2	0.5	10.2	0.06	6.6	0.1
5	6.2	0.05	4.2	0.1	2.2	0.3
6	6.3	0.05	4.2	0.1	0.8	0.6

Tabla 28. Resultados del test de Friedman para las variables mencionadas en la Tabla 1 para el grupo de mujeres.

Período	'Porfirinas		COPRO		URO		pH		ALA		PBG	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
1	2.6	0.3	3.2	0.2	7.2	0.1	0.3	0.7	2.1	0.4	1.4	0.5
2	1.1	0.6	0.8	0.7	2.6	0.3	0.6	0.7	2.4	0.2	0.5	0.7
3	0.2	0.9	0.2	0.9	2.4	0.3	0.1	0.9	0.4	0.8	6.2	0.1
4	0.2	0.9	0.6	0.7	1.4	0.5	4.5	0.1	2.1	0.3	0.8	0.7
5	0.4	0.8	0.2	0.9	1.4	0.5	1.4	0.5	1.5	0.5	3.8	0.1
6	0.2	0.9	0.6	0.7	0.6	0.7	0.1	0.9	4.0	0.1	7.4	0.1

Continua Tabla 28.

Período	Porfirinas/creatinina		COPRO/creatinina		URO/creatinina	
	F	p	F	p	F	p
1	0.6	0.7	1.4	0.5	0.6	0.7
2	2.4	0.3	1.4	0.5	1.4	0.5
3	0.8	0.6	0.6	0.7	0.2	0.9
4	1.8	0.4	0.8	0.6	0.0	1.0
5	4.2	0.1	2.6	0.3	0.6	0.7
6	0.2	0.9	0.1	0.9	0.1	0.9

Tabla 29. μg de porfirinas excretados en cada período durante los tres días de estudio.

PERIODO	PORFIRINAS TOTALES (μg)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	13.65 (3.0-28.4)	9.50 (0.6-30.6)	8.90 (2.9-27.0)
2	11.00 (3.0-21.4)	13.95 (2.5-38.0)	11.45 (0.9-38.7)
3	12.75 (2.8-50.2)	11.90 (1.1-30.4)	14.70 (3.8-43.9)
4	15.80 (3.2-96.0)	10.90 (1.7-30.8)	16.20 (3.4-37.3)
5	14.10 (3.8-35.8)	15.60 (2.0-58.4)	17.30 (2.8-51.2)
6	11.90 (5.4-60.2)	8.00 (1.9-36.8)	11.80 (2.2-33.8)

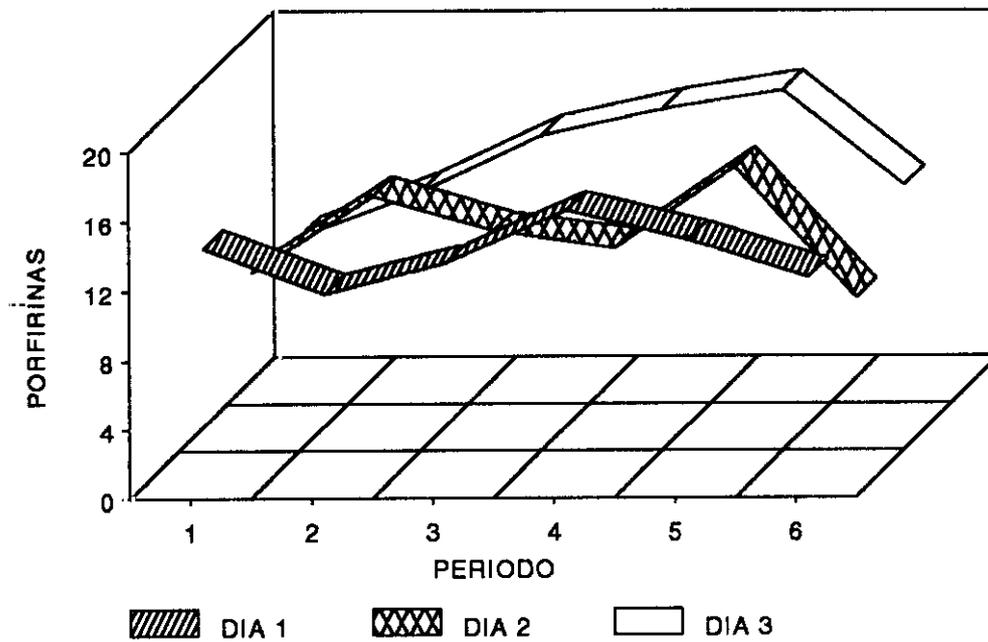


Fig.26. Variación en la excreción urinaria de μg de porfirinas durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 30. μg de porfirinas por g de creatinina excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	PORFIRINAS/CREATININA ($\mu\text{g/g}$)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	75.37 (40.0-252.8)	48.24 (4.1-342.8)	70.80 (7.6-330)
2	71.71 (13.4-223.0)	48.75 (11.1-176.2)	69.38 (5.5-336)
3	83.64 (24.2-200.0)	55.29 (10.3-154.6)	67.85 (22.5-358)
4	98.30 (23.8-219.8)	54.21 (8.7-185.8)	65.50 (12.2-231)
5	87.28 (24.6-264.4)	46.52 (9.6-304.3)	76.63 (26.7-286)
6	77.77 (24.5-143.3)	50.37 (14.0-157.4)	70.56 (12.3-222)

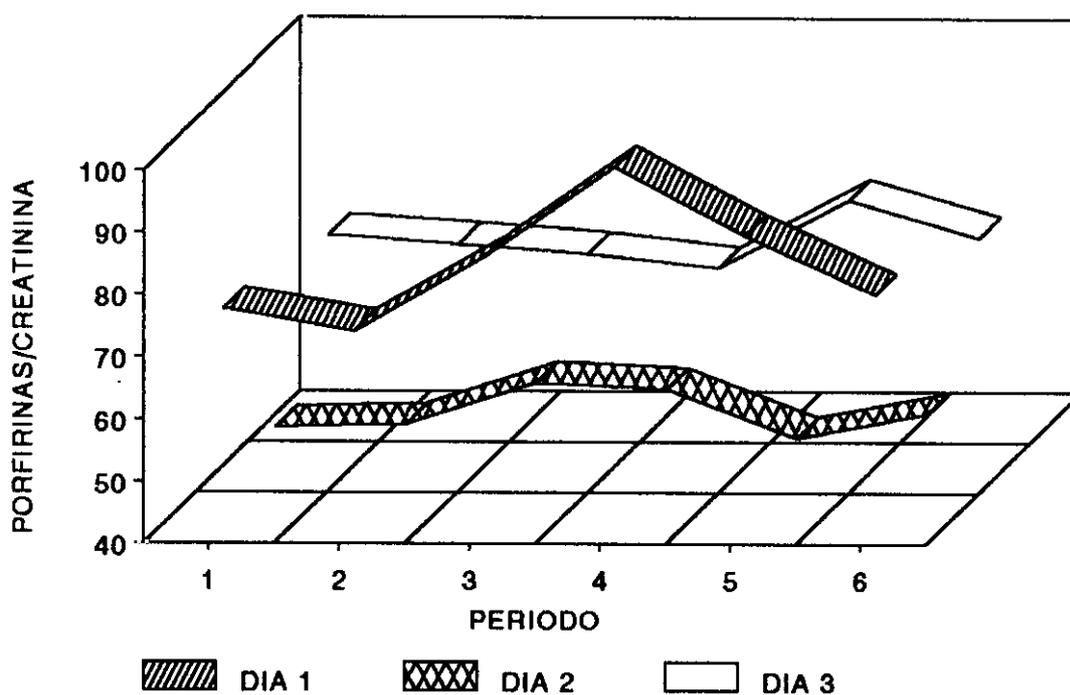


Fig.27. Variación en la excreción urinaria de μg de porfirinas por g de creatinina durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 31. μg de coproporfirina por g de creatinina excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	COPROPORFIRINA/CREATININA ($\mu\text{g/g}$)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	64.25 (24.0-205.4)	38.7 (2.3-274.2)	47.25 (4.7-207)
2	58.85 (10.9-181.2)	35.6 (6.2-143.7)	50.80 (4.5-289.8)
3	69.70 (12.0-162.5)	51.2 (5.8-123.7)	44.20 (17.5-308)
4	81.65 (13.2-184.2)	44.3 (4.9-130.1)	55.75 (7.5-150.9)
5	74.00 (20.0-185.1)	34.1 (4.8-213.0)	51.35 (21.7-200)
6	62.65 (19.9-123.6)	40.6 (7.9-125.9)	56.05 (9.8-224)

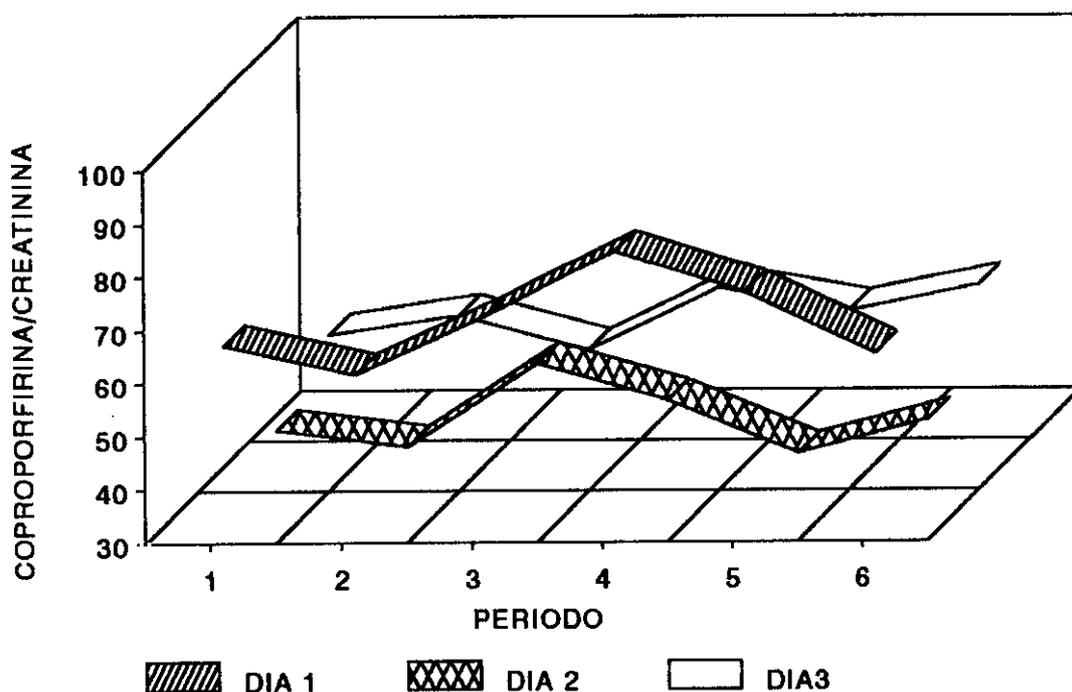


Fig.28. Variación en la excreción urinaria de μg de coproporfirina por g de creatinina durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 32. μg de uroporfirina por g de creatinina excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	UROPORFIRINA/CREATININA ($\mu\text{g}/\text{g}$)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	13.17 (2.9-47.4)	9.60 (1.8-68.6)	11.75 (1.8-177.3)
2	12.45 (2.5-91.8)	11.00 (2.6-33.1)	13.50 (1.0- 92.4)
3	13.80 (3.0-37.8)	11.70 (3.8-45.1)	11.60 (2.5- 93.3)
4	15.05 (3.4-85.2)	10.45 (2.6-55.7)	14.55 (2.3-147.5)
5	14.60 (3.5-79.3)	10.15 (2.5-91.3)	11.80 (3.5-143.5)
6	14.50 (3.5-41.3)	11.45 (6.1-39.7)	12.40 (2.4-94.70)

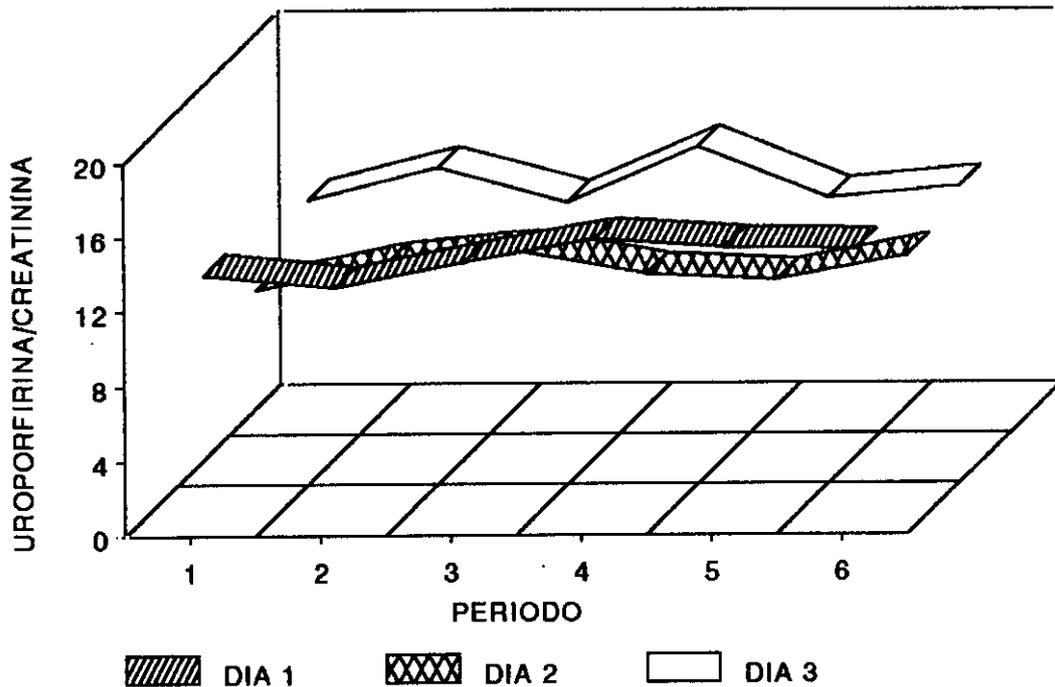


Fig.29. Variación en la excreción urinaria de μg de uroporfirina por g de creatinina durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 33. μg de coproporfirina excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	COPROPORFIRINA (μg)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	12.05 (2.7-27.3)	7.45 (0.3-24.6)	6.89 (1.6-16.7)
2	9.36 (2.4-18.4)	10.67 (2.1-30.8)	9.80 (0.7-23.9)
3	10.10 (2.3-43.2)	10.28 (0.6-23.3)	10.37 (1.9-34.8)
4	13.58 (3.1-87.6)	8.62 (0.9-25.1)	10.84 (2.1-27.9)
5	11.58 (3.4-32.6)	11.79 (1.5-44.5)	13.70 (1.7-49.2)
6	9.52 (4.4-45.9)	7.20 (1.3-33.5)	10.37 (1.1-30.8)

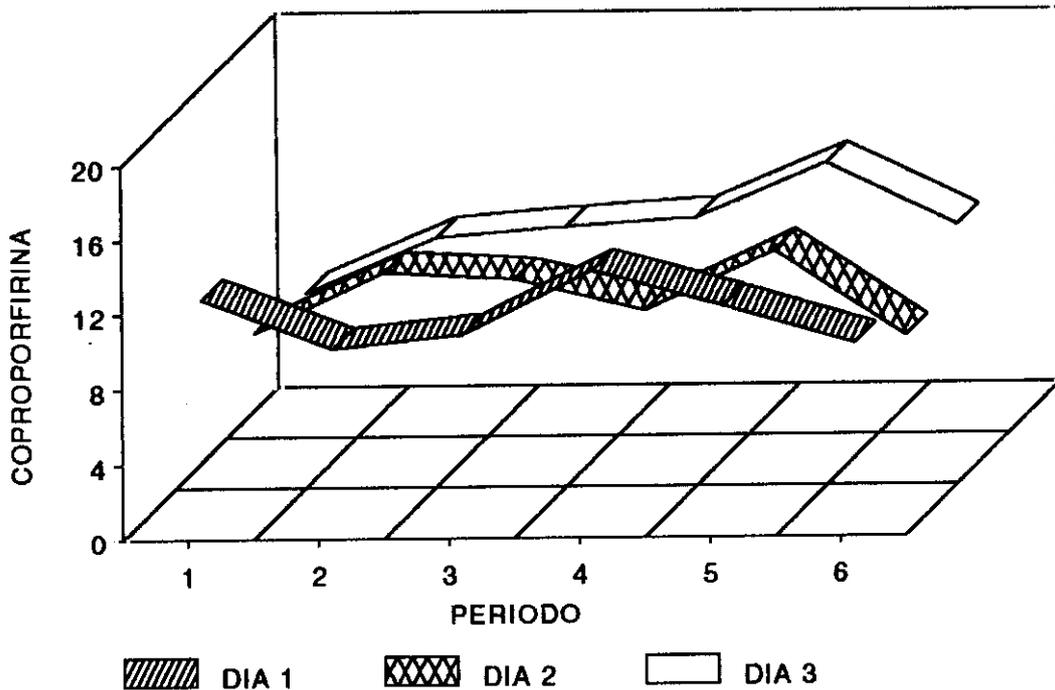


Fig.30. Variación en la excreción urinaria de μg de coproporfirina durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 34. μg de uroporfirina excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	UROPORFIRINA (μg)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	2.18 (0.2- 4.9)	1.33 (0.2- 5.6)	1.44 (0.3-17.2)
2	1.69 (0.3- 4.1)	1.98 (0.2- 7.1)	1.37 (0.1-20.8)
3	2.35 (0.2- 6.9)	1.54 (0.3- 7.2)	1.54 (0.7-23.6)
4	2.84 (0.1- 8.4)	1.76 (0.4- 7.3)	2.29 (0.6-23.1)
5	2.31 (0.3- 8.3)	2.79 (0.1-13.8)	2.14 (0.2-18.3)
6	1.97 (0.5-14.2)	1.65 (0.4- 4.2)	2.09 (0.2-18.3)

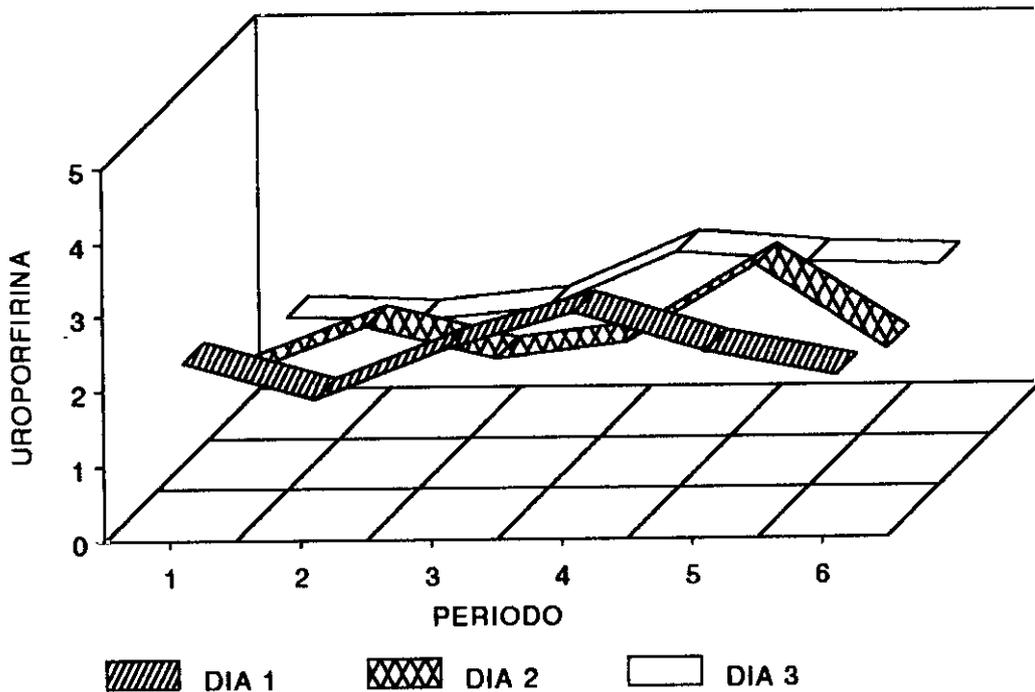


Fig.31. Variación en la excreción urinaria de μg de uroporfirina durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 35. mg/l de ALA excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	ALA (mg/l)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	1.47 (0.0-4.2)	0.71 (0.0-5.2)	0.86 (0.0-3.1)
2	1.19 (0.0-3.1)	0.68 (0.0-4.2)	1.31 (0.0-3.7)
3	1.05 (0.0-2.2)	0.40 (0.0-1.8)	0.69 (0.0-2.3)
4	1.16 (0.0-2.5)	0.66 (0.0-2.5)	1.11 (0.0-3.7)
5	1.25 (0.0-3.2)	1.04 (0.0-3.4)	1.10 (0.0-2.5)
6	1.66 (0.0-3.3)	0.23 (0.0-3.4)	0.99 (0.0-3.4)

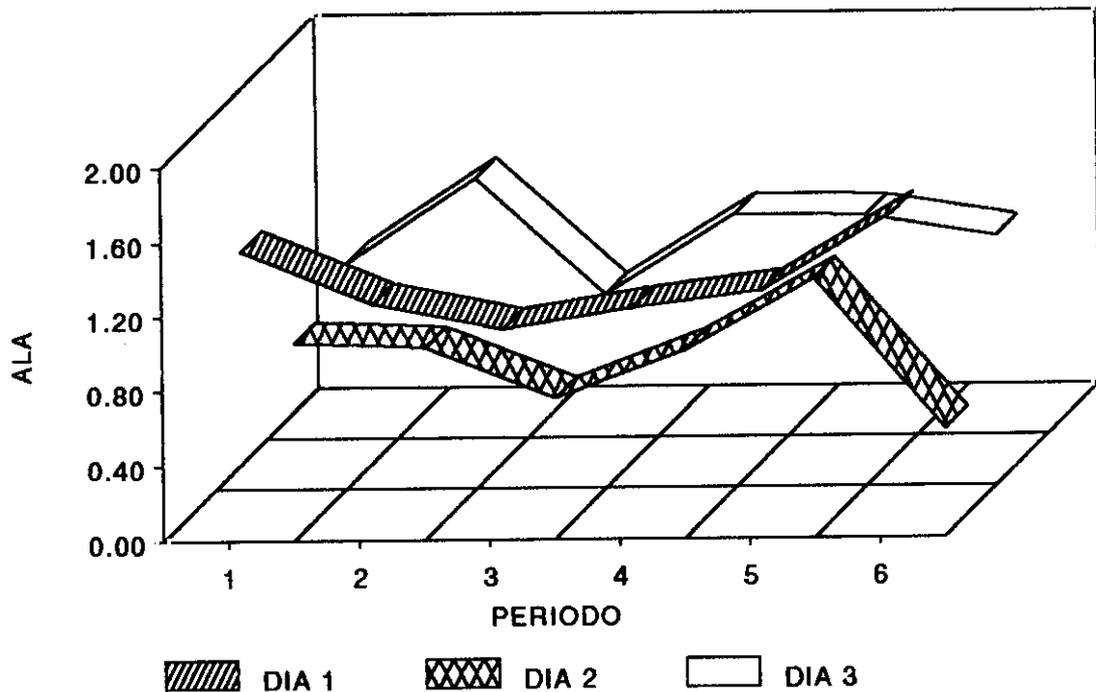


Fig.32. Variación en la excreción urinaria de ALA durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 36. mg/l de PBG excretados en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	PBG (mg/l)		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	1.76 (0.0-5.4)	1.68 (0.0-4.3)	1.32 (0.0-4.8)
2	2.03 (0.2-5.3)	1.82 (0.1-4.3)	1.85 (0.5-5.7)
3	1.83 (0.0-4.3)	1.13 (0.0-2.5)	1.09 (0.0-3.7)
4	1.33 (0.0-4.2)	1.33 (0.1-3.0)	1.21 (0.0-4.5)
5	1.84 (0.0-5.8)	1.34 (0.0-2.8)	1.61 (0.1-5.1)
6	2.23 (0.0-4.3)	1.12 (0.0-3.8)	1.49 (0.0-4.3)

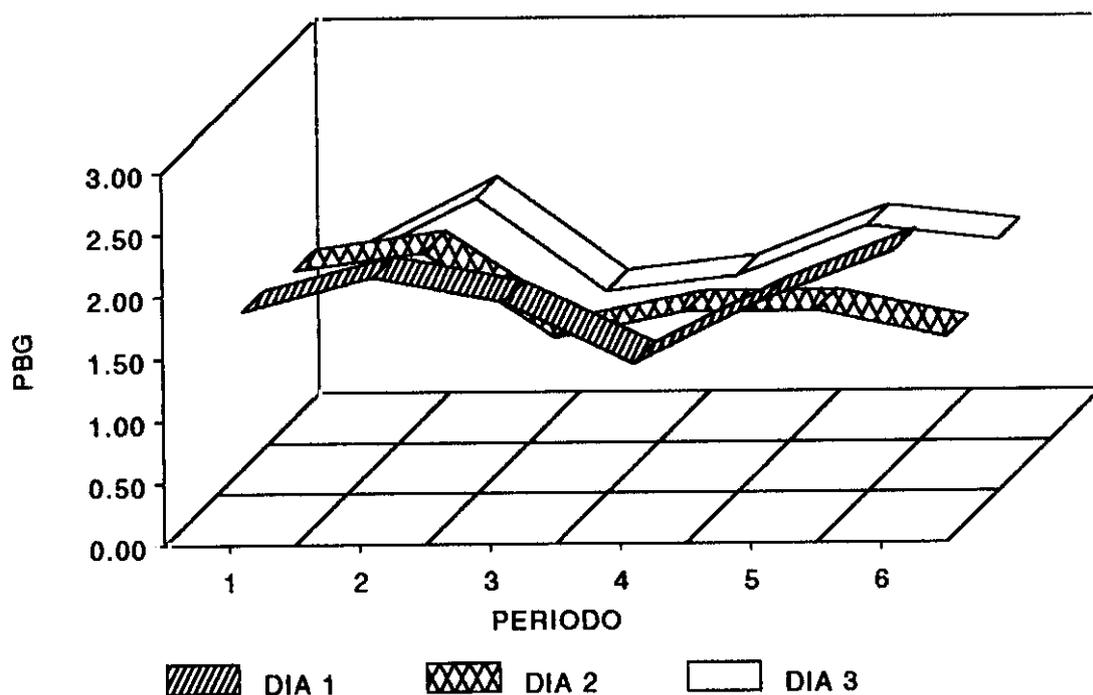


Fig.33. Variación en la excreción urinaria de PBG durante cada período en los tres días en estudio.

Tabla 37. Valores de pH urinarios en cada período durante los tres días en estudio.

PERIODO	pH		
	Mediana (Límites)		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	5.89 (5.4-7.3)	5.60 (5.1-7.4)	5.52 (5.0-7.8)
2	5.72 (5.2-7.4)	5.68 (5.2-7.5)	5.73 (5.3-6.5)
3	5.74 (5.1-7.4)	5.72 (5.2-7.7)	5.81 (5.1-6.9)
4	6.07 (5.1-7.5)	5.60 (5.5-7.1)	5.77 (5.0-6.9)
5	6.45 (5.2-7.7)	5.96 (5.2-7.9)	6.35 (5.4-8.4)
6	6.16 (5.2-7.2)	5.93 (5.2-7.7)	5.92 (5.2-7.1)

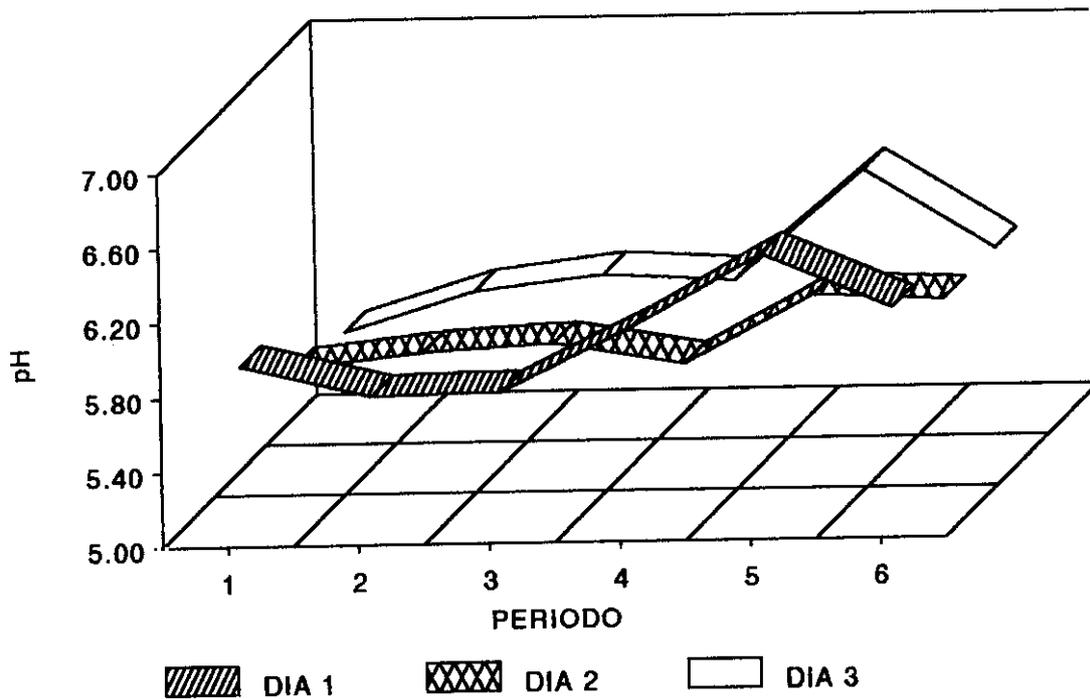


Fig.34. Variación en los valores de pH durante cada período en los tres días en estudio.

Se detectaron diferencias significativas entre los distintos períodos(test de Friedman) para los valores de porfirinas totales (F=19.74, p<0.001), coproporfirina (F=20.62, p<0.001), uroporfirina (F=21.53, p<0.001), pH (F=34.60, p<0.001), PBG (F=11.64, p<0.05). No se detectaron diferencias significativas para los valores de ALA (F=6.34, p=0.27), porfirinas/creatinina (F=10.02, p=0.07), coproporfirina/creatinina (F=11.53, p=0.04) y uroporfirina/creatinina (F=8.37, p=0.13) en los distintos períodos horarios.

Tras observar la significación del test de Friedman se realizaron los test a posteriori, para determinar las causas de la significación. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 38-41. Los valores obtenidos para cada variable en cada uno de los períodos se muestran en la tabla 42 y aparecen representados en las figuras 36-43.

Se detectaron variaciones temporales en la excreción de coproporfirina, uroporfirina y porfirinas totales a lo largo del día, alcanzándose picos en el período de 12-16 horas y principalmente en el de 16-20 horas, aunque no existe una correlación entre los valores de pH y la excreción porfírica (pH/uroporfirina, r= -0.082, p=0.12, pH/coproporfirina, r=0.067, p=0.20, pH/porfirinas, r=0.03, p=0.56), estos resultados aparecen reflejados en la figura 35.

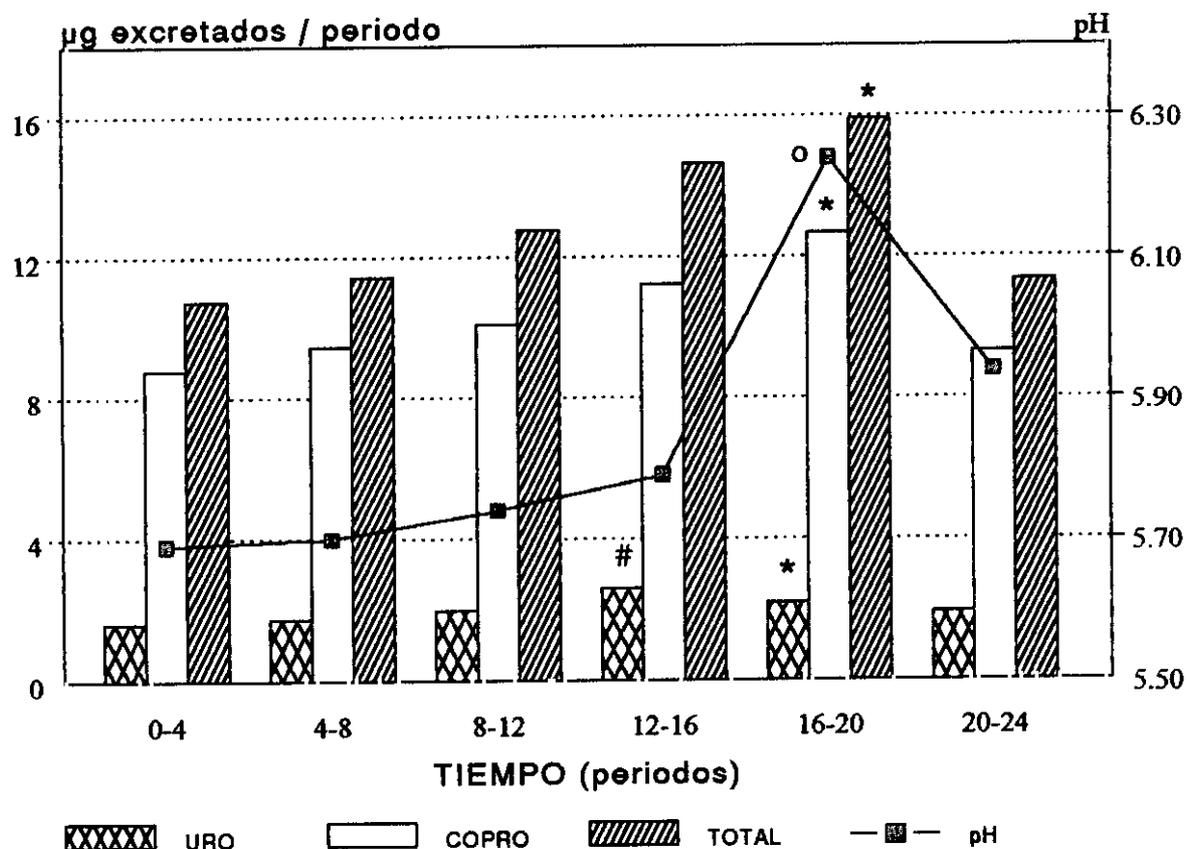


Fig.35. Cronograma en el que aparecen valores de porfirinas urinarias y valores de pH, en los distintos periodos analizados.

* $p < 0.05$ vs 0-4 y 4-8 horas.

o $p < 0.05$ vs 0-4 horas

> $p < 0.05$ vs 0-4, 4-8, 8-12 y 12-16 horas.

Tabla 38. Comparación de los valores de pH en los diferentes períodos considerados. (NS: $p > 0.05$)

	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h
0-4 h	NS	NS	NS	$p < 0.01$	NS
4-8 h		NS	NS	$p < 0.01$	NS
8-12 h			NS	$p < 0.01$	NS
12-16 h				$p < 0.01$	NS
16-20 h					NS

Tabla 39. Comparación de la excreción urinaria de porfirinas totales en los diferentes períodos considerados. (NS: $p > 0.05$)

	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h
0-4 h	NS	NS	NS	$p < 0.01$	NS
4-8 h		NS	NS	$p < 0.05$	NS
8-12 h			NS	NS	NS
12-16 h				NS	NS
16-20 h					NS

Tabla 40. Comparación de la excreción urinaria de coproporfirinas totales en los diferentes períodos considerados. (NS: $p > 0.05$)

	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h
0-4 h	NS	NS	NS	$p < 0.01$	NS
4-8 h		NS	NS	$p < 0.05$	NS
8-12 h			NS	NS	NS
12-16 h				NS	NS
16-20 h					NS

Tabla 41. Comparación de la excreción urinaria de uroporfirinas totales en los diferentes períodos considerados. (NS: $p > 0.05$)

	4-8 h	8-12 h	12-16 h	16-20 h	20-24 h
0-4 h	NS	NS	$p < 0.05$	$p < 0.01$	NS
4-8 h		NS	NS	$p < 0.05$	NS
8-12 h			NS	NS	NS
12-16 h				NS	NS
16-20 h					NS

El análisis estadístico anterior se repitió subdividiendo la muestra en función del sexo, observándose diferencias significativas entre los distintos períodos en estudio para los valores de pH urinarios ($F=27.79$, $p<0.001$), porfirinas totales ($F=17.24$, $p<0.01$), coproporfirinas ($F=16.91$, $p<0.01$) y uroporfirinas ($F=18.10$, $p<0.01$) en el subgrupo de mujeres, mientras que en el subgrupo de los hombres no se detectan diferencias significativas en las variables estudiadas. En la excreción de precursores ALA y PBG no se detectaron diferencias significativas, para los diferentes períodos, en ninguno de los subgrupos considerados.

Al utilizar los estadísticos específicos para determinar la existencia de ciclos que mostraran la presencia de un ritmo circadiano, no se detectaron elementos constitutivos de ciclos objetivos, ni en la excreción porfirínica, ni en los valores de pH urinarios. Las variaciones temporales que se observan en los diversos parámetros estudiados, no pueden ser objetivamente consideradas como ciclos, a pesar de que en alguno de los sujetos pueda aparentemente haberlo parecido.

Tabla 42. Valores de las diferentes variables en los diferentes periodos en estudio.

Periodo	Porfirinas	COPRO	URO	pH
1	10.75 (0.6-30.3)	8.78 (0.3-27.3)	1.60 (0.2-17.2)	5.69 (5.0-7.8)
2	11.45 (0.9-38.7)	9.48 (0.7-30.8)	1.72 (0.1-20.2)	5.70 (5.1-7.5)
3	12.75 (1.1-50.2)	10.10 (0.6-43.2)	1.96 (0.2-23.5)	5.74 (5.1-7.7)
4	14.65 (1.7-96.0)	11.24 (0.9-87.6)	2.59 (0.1-23.1)	5.79 (5.0-7.4)
5	15.9 (2.0-58.4)	12.67 (1.5-49.2)	2.18 (0.2-13.8)	6.24 (5.1-8.4)
6	11.35 (1.9-60.2)	9.31 (1.1-45.9)	1.90 (0.2-18.3)	5.94 (5.2-7.7)

Continua Tabla 42.

Período	ALA	PBG	Porf./creat.	COPRO/creat.	URO/Creat.
1	0.12 (0-0.7)	0.20 (0-0.9)	66.07 (4.1-342.8)	51.35 (2.3-274.2)	11.15 (1.8-177.3)
2	0.13 (0-1.1)	0.23 (0-1.7)	68.01 (5.5-336.0)	53.50 (4.5-289.8)	12.45 (1.0- 92.4)
3	0.10 (0-0.5)	0.16 (0-0.9)	70.42 (10.3-358.0)	59.70 (5.8-308.0)	13.10 (2.5- 93.3)
4	0.12 (0-0.5)	0.21 (0-1.2)	68.45 (8.7-231.4)	61.00 (4.9-184.2)	11.90 (2.3-147.5)
5	0.14 (0-1.8)	0.20 (0-1.3)	67.93 (9.6-304.3)	50.05 (4.8-213.0)	11.75 (2.5-143.5)
6	0.10 (0-0.7)	0.19 (0-1.2)	72.41 (12.3-222.0)	56.55 (7.9-224.0)	12.35 (2.4- 94.7)

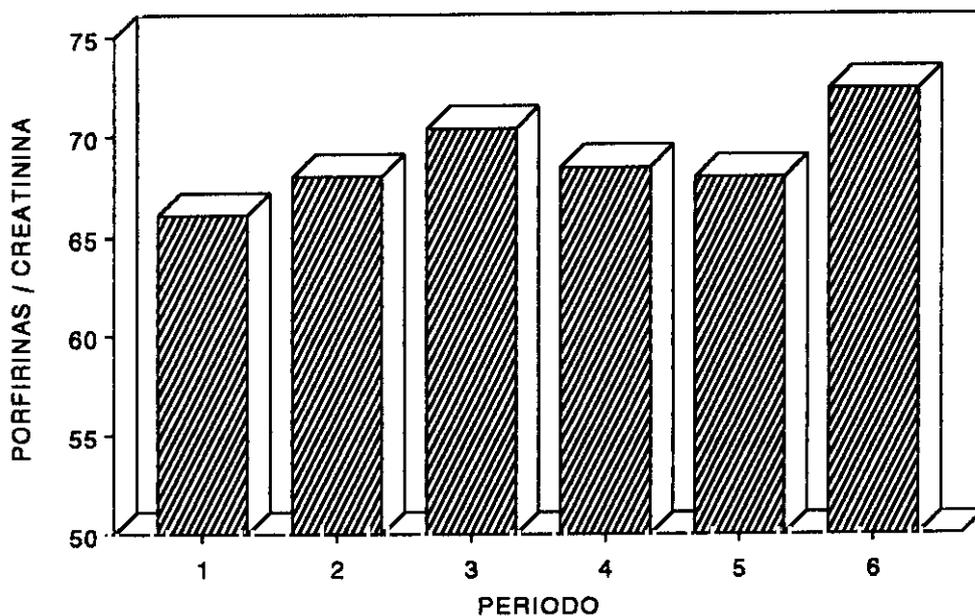


Fig.36. µg de porfirinas excretadas por g de creatinina en cada período considerado.

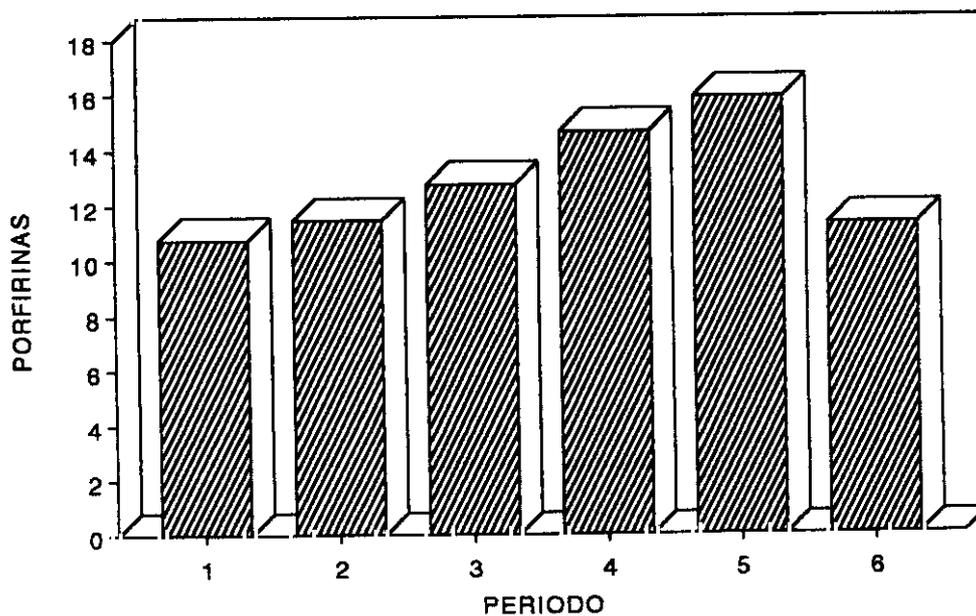


Fig.37. µg de porfirinas excretadas en cada período considerado.

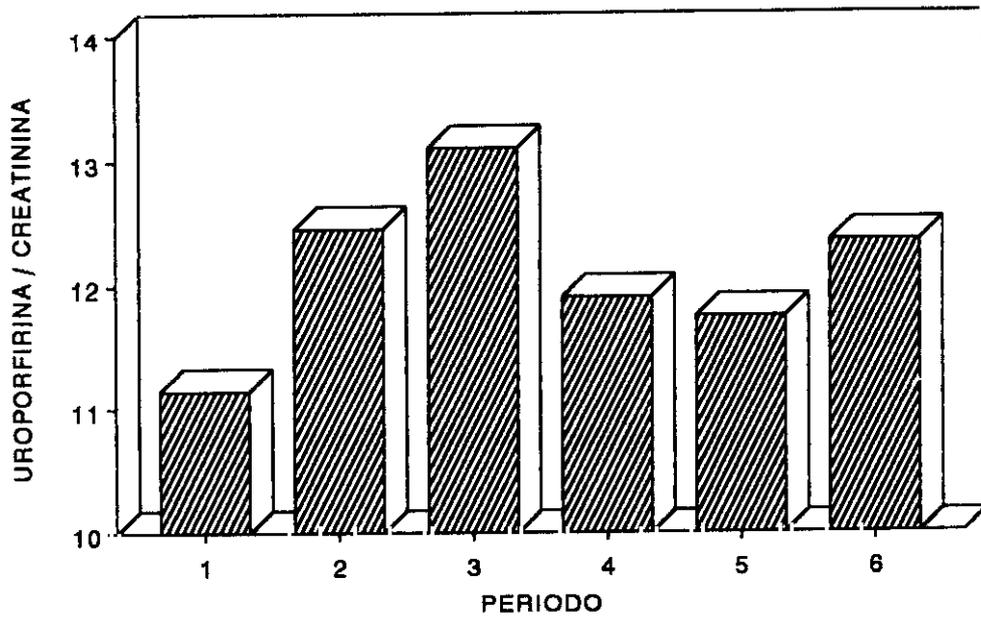


Fig.38. μg de uroporfirina excretados por g de creatinina en cada período considerado.

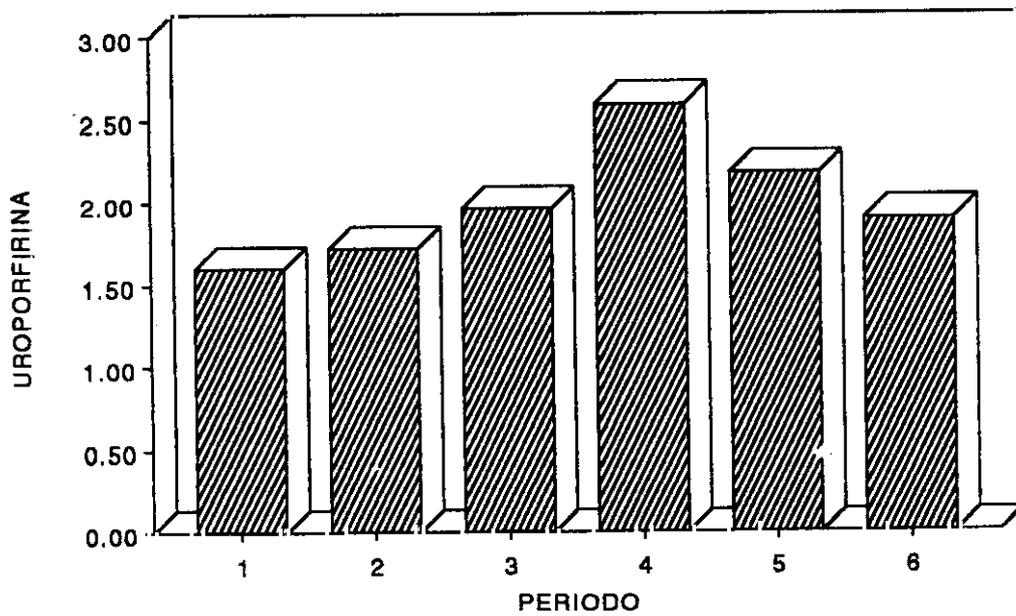


Fig.39. Variación en la excreción urinaria de μg de uroporfirina durante cada período en los tres días en estudio.

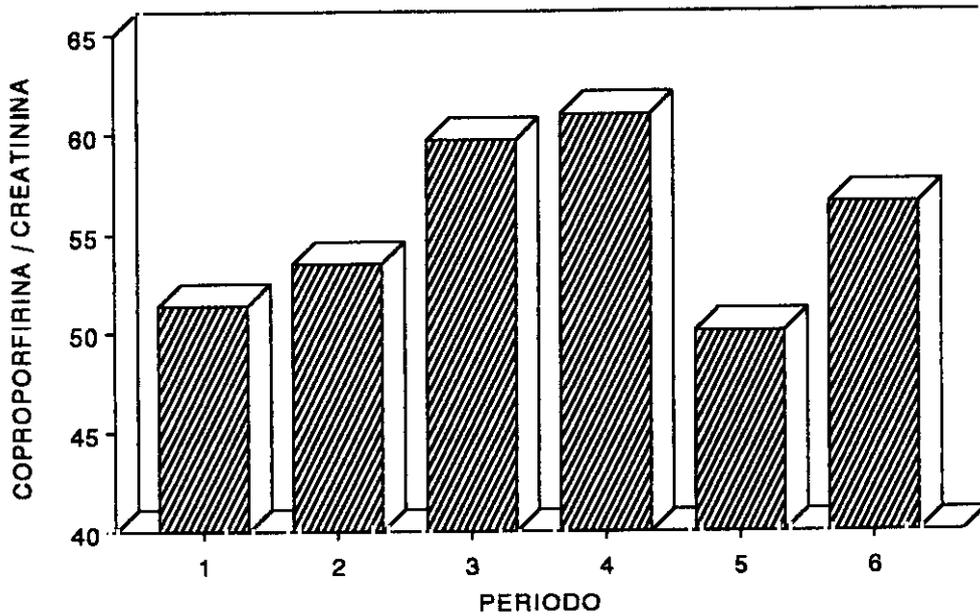


Fig.40. μg de coproporfirina excretados por g de creatinina en cada período considerado.

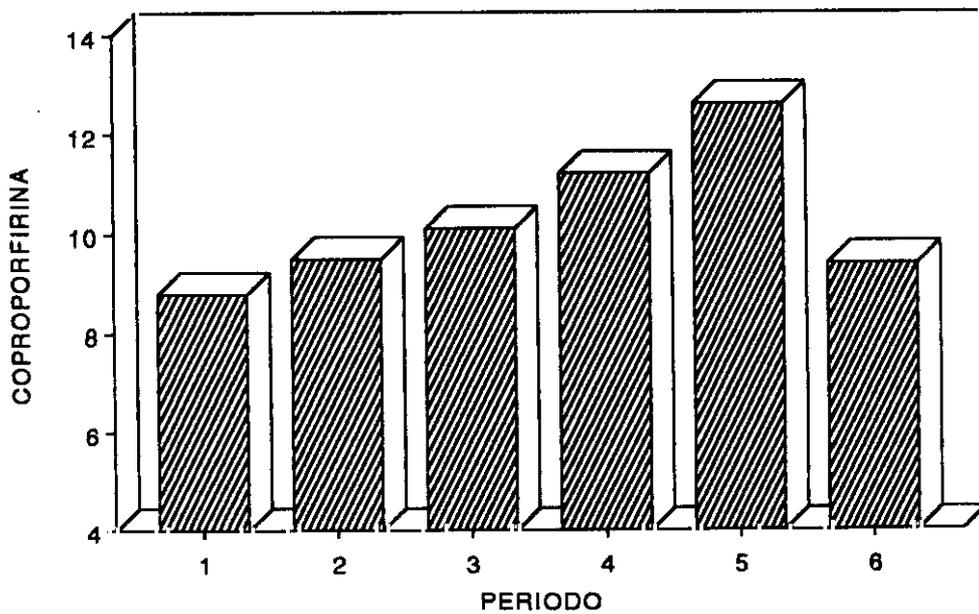


Fig.41. μg de coproporfirina excretadas en cada período considerado.

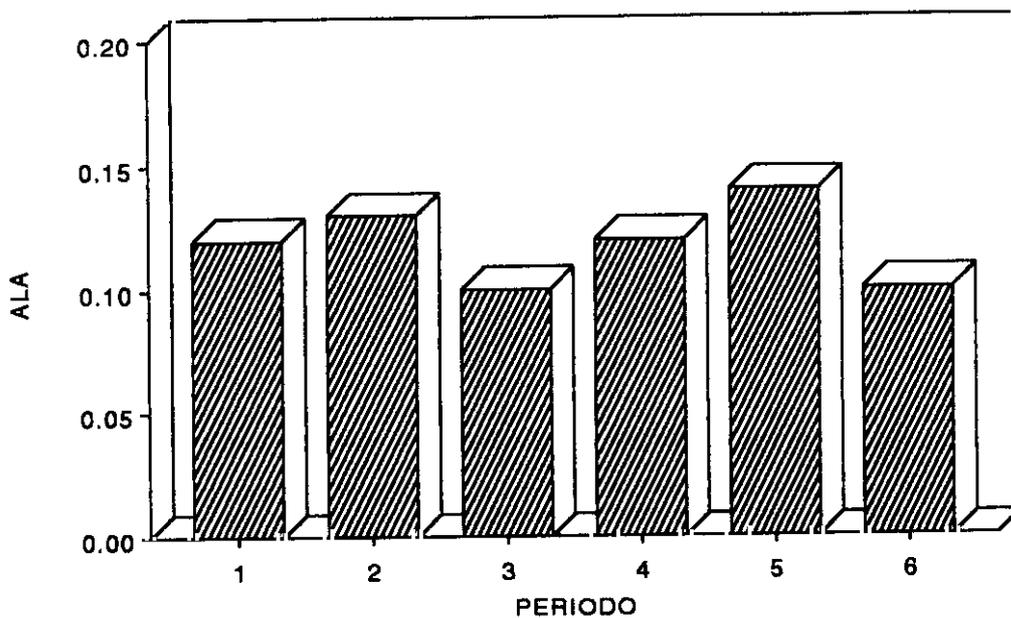


Fig.42. mg/l de ALA excretados en cada período considerado.

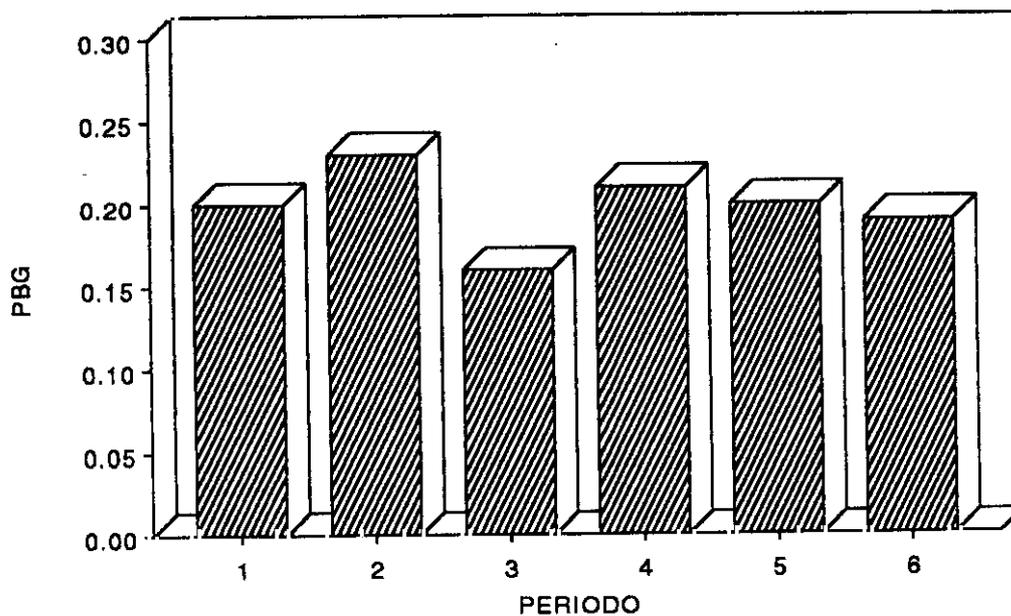


Fig.43. mg/l de PBG excretados en cada período considerado.

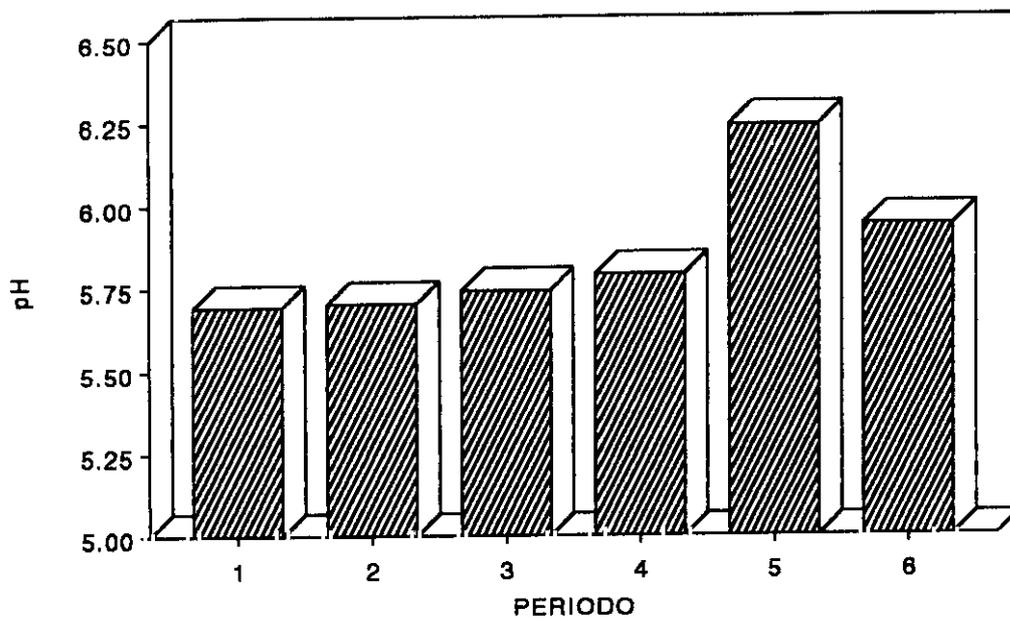


Fig.44. Valores de pH urinario en cada período considerado.

Para la determinación de porfirinas urinarias, tradicionalmente se ha venido utilizando orina de 24 horas, sin embargo frecuentemente la recogida de la orina por parte de los pacientes no se efectúa de forma correcta y ésta se hace especialmente complicada en el caso de niños (104).

La recogida de la primera o segunda orina de la mañana es mucho más sencilla, pudiéndose así determinar algunos parámetros en muestras parciales y expresar posteriormente los resultados por litro de orina o por gramo de creatinina.

Se han descrito variaciones circadianas en la excreción urinaria de porfirinas en condiciones normales y patológicas, aunque no todos los estudios fueron diseñados con precisión (105)(106)(107)(108). Estas variaciones diarias pueden estar relacionadas en parte con cambios en el pH urinario. Bourke y cols.(109) demostraron que el pH urinario influía considerablemente sobre la cuantía de la porfirinuria.

La coproporfirina, ácido orgánico débil, se encuentra no ionizada a pH ácido y en estas condiciones resulta liposoluble y puede atravesar las membranas lipídicas celulares. A pH alcalino, por encima de 7.2 se ioniza en más del 50 %, por lo que pasa a ser una molécula hidrosoluble y no se reabsorbe bien pasivamente a través de la pared del túbulo contorneado distal, siendo por tanto excretada en la orina. Basándose en estas consideraciones, Wiegand y cols.(110) propusieron la alcalinización metabólica como terapia en algunas alteraciones porfíricas. No obstante los cambios en el pH urinario no son la única causa de la variación en la eliminación de coproporfirina.

Nuestros resultados mostraron que aunque existen variaciones

temporales de los valores de pH y porfirinas, éstas no muestran la existencia de un ritmo circadiano. Ambos parámetros son elevados durante el período de 16-20 horas, pero no existe una correlación entre ellos. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Boyton y Roth (111) quienes no encuentran variaciones en la excreción de porfirinas urinarias durante el día en individuos normales. Por tanto la recogida de una muestra de orina al azar es un método rápido y fácil para un estudio inicial del metabolismo porfirínico.

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

- 1.- Tras estudiar simultáneamente la porfirinuria mediante diferentes técnicas analíticas, hemos comprobado que el método de Westerlund y cols. reúne los criterios de aplicabilidad y eficacia, para ser aceptado como método rutinario de laboratorio.
- 2.- Por su simplicidad, rapidez y bajo costo, hemos centrado más específicamente la atención de nuestro trabajo en el micrométodo de Westerlund y cols extrayendo las siguientes conclusiones:
 - a) Ante orinas con escasa concentración de porfirinas resulta preferible emplear una longitud de onda de emisión de 650 nm frente a 595 nm, ya que la menor interferencia por impurezas compensa la menor detección de energía emitida, evitándose así la sobrevaloración originada por sustancias no específicas.
 - b) La adición de diferentes concentraciones de coproporfirina y uroporfirina estandares a orina artificial nos permitió comprobar la excelente recuperación del micrométodo, siendo el porcentaje medio de 99.8% para la coproporfirina y de 98.5% para la uroporfirina.
 - c) Poca o escasa variabilidad excepto en muestras con baja concentración de porfirinas, en las que se aconseja aumentar el volumen de orina antes de procesar la muestra.
- 3.- El método de Westerlund permite calcular con fiabilidad las fracciones COPRO y URO, y se establece una ecuación entre el máximo de excitación de la muestra urinaria y la cantidad de porfirinas presentes en la muestra.
- 4.- Un tanto por ciento de las porfirinas urinarias son eliminadas en forma reducida, por tanto para evitar una infraestimación en la cuantificación de porfirinas, es necesario que el método utilizado incluya un paso previo de oxidación de

los porfirinógenos presentes en la orina. Tal procedimiento es especialmente importante en circunstancias en las que la excreción de coproporfirina es predominante.

5.- No existe ritmo nictameral o variaciones nictamerales en la excreción porfirínica, ni en los valores de pH urinarios. Por tanto la recogida de una muestra de orina al azar es un método rápido y fácil para un estudio inicial del metabolismo porfirínico.

CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFIA

- 1.- Moore M.R. The Biochemistry of the porphyrins. Clin. Haematol. 9:227-252 (1980).
- 2.- Kappas A., Sassa S., Galbraith R.A. y Nordmann Y. The Porphyrrias. En: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. y Valle D. (eds) McGraw-Hill, New York pp:2103-2159 (1995).
- 3.- Bonnet R. Nomenclature. En: The porphyrins. Vol I. Dolphin D. (Ed). Academic Press, Nueva York. pp:2-27 (1978).
- 4.- Commission on Biochemical Nomenclature. Biochemistry 1974.
- 5.- Elder G.H. The Porphyrrias: Clinical chemistry, diagnosis and methodology. Clin. Haematol. 9:371-398 (1980).
- 6.- Elder G.H. Metodología diagnóstica de las porfirias. Endocrin. Clin. Metabol. 4:21-31 (1982).
- 7.- Battle A.M.C., Magnin P.H. y Wider E.A. Porfirinas y Porfirias. Ed. Universitaria. Buenos Aires (1981).
- 8.- Smith K.M. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. En: Porphyrins and metalloporphyrins. K.M. Smith Elsevier (ed). Amsterdam (1975).
- 9.- Eales L. Clinical chemistry of the porphyrins. En: The porphyrins, vol.VI. Dolphin D. (ed) Nueva York, Academic Press. pp:663-804 (1979).
- 10.- Polo C.F., Frisardi A.L. y Resvik R.E. et al. Factors influencing the fluorescence spectra of free porphyrins. Clin. Chem. 34:757-760 (1988).
- 11.- Neuberger A. Aspects of the metabolism of glycine and of porphyrins. Biochem. J. 78:1-10 (1961).
- 12.- Granick S. The induction in vitro of the synthesis of δ aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones and foreign chemicals. J. Biol.

Chem. 241:1359-1375 (1966).

13.- Battle A.M.C. Biosíntesis de los tetrapirroles y su regulación. *Endocrin. Clin. Metabol.* 4:7-20 (1982).

14.- Moore M.R., McColl K.E.L., Rimington C. y Goldberg A. Disorders of porphyrin metabolism. Plenum medical book Co. New York (1987).

15.- Moore M.R. y Disler P.B. Chemistry and Biochemistry of the porphyrins and porphyrias. *Clin. Dermatol.* 3:7-23 (1985).

16.- Battle A.M.C. y Magnin P. Porfirias y porfirinas. Aspectos clínicos y bioquímicos. Federación Bioquímica de la provincia de Buenos Aires (1988).

17.- Grandchamp B. y Nordmann Y. Enzymes of the heme biosynthesis pathway: Recent Advances in Molecular Genetics. *Semin. Hematol.* 25:303-311 (1988).

18.- Jordan P.M. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acids and its transformation into coproporphyrinogen in animals and in bacteria. En : Biosynthesis of heme and chlorophylls. cap.3. Dailey H.A. (ed) McGraw Hill, New York. pp:123-161 (1990).

19.- Shemin D. The succinate- glicine cycle; The role of δ -aminolevulinic acid in porphyrin synthesis. En: Porphyrin biosynthesis and metabolism. Ciba foundation symposium. Wolstenholme G.E.W. y Millar E.C.P. (Eds) Churchill. Londres. pp:4-26 (1955).

20.- Beale S.I., Gough S.P. y Granick S. Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:2719-2723 (1975).

21.- Nandi D.I. y Shemin D. δ -aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides*. Mechanism of porphobilinogen

- synthesis. *J. Biol. Chem.* 243:1236-1242 (1968).
- 22.- **Chinarro S., Stella A.M., Berges L., Enriquez de Salamanca R. y Batlle A.M.C.** Aminolevulinato dehidratasa: propiedades y mecanismo. *N. Arch. Fac. Med.* 41:93-102 (1983).
- 23.- **Jordan P.M., Marshall L. y Thomas S.** The enzymes of uroporphyrinogen III biosynthesis. En: *Porphyrins and Porphyrins*. Nordmann Y. (ed) Colloque INSERM/ John Libbey Eurotest, Paris. pp.83-93 (1986).
- 24.- **Kappas A., Sassa S., Anderson K.E.** The porphyrias. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Stambury J.B., Wyngaarden J.B., Frederickson D.S. et al (eds). McGraw-Hill Book Co. Nueva York. pp:1301-1367 (1983).
- 25.- **Jackson A., Sancovich M.A., Ferramola A. et al.** Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrin; *Philos. Trans. Roy. Soc. Londres*; 273:191-206 (1976).
- 26.- **Kushner J.P., Barbuto A.J. y Lee G.R.** An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda. Decreased of uroporphyrinogen descarboxylase activity. *J. Clin. Invest.* 58:1089-1097 (1976).
- 27.- **Elder G.H.** Identificación of a group of tetracarboxylate porphyrins, containing one acetate and three propionate β -substituents in faeces from patients with symptomatic cutaneous hepatic porphyria and from rats with porphyria due to hexachlorobenzene. *Biochem. J.* 126:877-879 (1972).
- 28.- **Elder G.H., Sheppard D.M., Torey J.A. y Urquhart A.J.** Immunoreactive uroporphyrinogen decarboxylase in porphyria cutanea tarda. *Lancet.* 1:1301-1304 (1983).
- 29.- **Grandchamp B., Phung N. y Nordmann Y.** The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase. *Biochem. J.* 176: 97-102 (1978).

- 30.- Nordmann Y., Grandchamp B., De Vernuil H., Phung L., Cartigny B. y Fontaine G. Harderoporphyria: a variant hereditary coproporphyria. *J. Clin. Invest.* 72:1139-1149 (1983).
- 31.- Reese A.J.M. y Rimington C. Biliary and urinary excretion of porphyrins in the rat studied by intravital fluorescence microscopy. *Br. J. Path.* 45:30- (1964).
- 32.- Sano S. y Rimington C. Excretion of various porphyrins and their corresponding porphyrinogens by rabbits after intravenous injection. *Biochem. J.* 86:203-212 (1963).
- 33.- Arnalich F., Enriquez de Salamanca R., Catalan T., Mas V. y Garcia Puig J. Alteraciones del balance excretorio coproporfirina urinaria/coproporfirina fecal en algunas situaciones colestásicas. *Rev. Clin. Esp.* 155:13-16 (1979).
- 34.- Hoffbauer F.W., Watson C.J. y Schwartz S. Urinary and fecal coproporphyrin excretion in rats. III. Excretion of injected coproporphyrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:238-241 (1953).
- 35.- Morgan W.T., Sutor R.P. y Müller-Eberhard U. Interaction of rabbit hemopexin with copro and uroporphyrins. *Biochim. Biophys. Acta.* 400-415 (1975).
- 36.- Koskelo P., Sundberg L. y Hakansson U. Isolation and partial characterization of rat liver porphyria binding proteins. *Ann. Clin. Res.* 8:244-249 (1976).
- 37.- Garrod A.E. The urinary pigments in their pathological aspects. *Lancet* 2:1323- (1900).
- 38.- Hymans Van den Bergh A.A., Hymans W., Grotepass W. y Revers F.E. Beitrag über das porphyrin in blut and galle. *Klin. Wochenschr.* 11:1532-1535 (1932).
- 39.- Kaplowitz N., Javitt N. y Kappas A. Coproporphyrin I and III excretion in bile and urine. *J. Clin. Invest.* 51:2845-2859 (1972).

- 40.- Levere R.D. Porphyrin synthesis in hepatic cirrhosis increase in δ -aminolevulinic acid synthetase. *Biochem. Med.* 1:92-97 (1967).
- 41.- Doss M., Look D., Henning H., Nawrocki P., Schmidt A. Döble W., Korb G., Lüders C.J. y Strohmeyer G. Hepatic porphyrins and urinary porphyrins precursor in liver cirrhosis. *Klin.Wochenschr.* 50(22):1025-1032 (1972).
- 42.- Koskelo P. y Hikkilä J. Urinary excretion of porphyrin precursors in myocardial infarction. *Acta Med. Scand.* 178:681-685 (1965).
- 43.- Heikel T., Lockwood W.H. y Rimington C. Formation of nonenzymatic haem. *Nature* 182:313-321 (1958).
- 44.- Shanley B.C., Zail S.S. y Joubert S.M. Porphyrin metabolism in experimental hepatic siderosis in the rat. *Br. J. Haemat.* 18:79-103 (1970).
- 45.- Watson C.J., Pimenta de Melo R., Schwartz S., Hawkinson V. y Bossenmaier I. Porphyrin chromogens or precursors in urine, blood, bile and faeces. *J. Lab. Clin. Med.* 37:831-842 (1951).
- 46.- Herbert F.K. The coproporphyrin precursor of human urine and another pigment formed from a chromogen. *Biochem. J.* 69:10-25 (1958).
- 47.- Eales L., Levey V.S. y Sweeney G.D. The place of screening tests and quantitative investigations in the diagnosis of the porphyrias with particular reference to variegate and symptomatic porphyria. *S. Afr. Med. J.* 40:63-68 (1966).
- 48.- Fernandez A.A., Henry R.J. y Goldenberg H. Assay of urinary porphyrins. *Clin. Chem.* 12:463-471 (1966).
- 49.- Watson C.J., Linch F., Bossenmaier I. y Cardwal R. Griseofulvin and porphyrins metabolism. Special reference to

normal fecal porphyrin excretion. Arch. Dermatol. 98:451-468 (1968).

50.- Fogstrup J. y With T.K. Urinary total porphyrins by ion exchange analysis: reference values for the normal range on remarks on preformed porphyrins in acute porphyria urine. J. Clin. Pathol. 32:109-113 (1979).

51.- Enriquez de Salamanca R., Peña M.L., Chinarro S. et al. Quantitative and qualitative porphyrin excretion in normal subjects. Int. J. Biochem. 14:251-254 (1982).

52.- Doss M. Enzymatic deficiencies in acute hepatic porphyrias: porphobilinogen synthase deficiency. Semin. Dermatol. 5:161-168 (1986).

53.- Enriquez de Salamanca R. Porfirias: errores congenitos del metabolismo. An. Med. Intern. 2:412-415 (1985).

55.- De Vernuil H., Aitken G. y Nordman Y. Familial and sporadic porphyria cutanea. Two different diseases. Hum. Genet. 42:145-151 (1978).

56.- Enriquez de Salamanca R., Chinarro S., Valls V. et al. Porfiria cutanea tarda. Endocr. Clin. Metabol. 4:46-67 (1982).

57.- Schmid R., Schwartz S. y Watson C.J. Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. Arch. Intern. Med. 93:167-171 (1954).

58.- Gajdos A. y Gajdos-Torok M. Porphyries et porphyrines. Biochemie et clinique. Masson (ed). Paris. pp:212-220 (1969).

59.- Piomelli S. A micromethod for free erythrocyte porphyrins. The FEP test. J. Lab. Clin. Med. 81:932-939 (1973).

60.- Piomelli S. Free erythrocyte porphyrins in the detection of undue absorption of Pb and Fe deficiency. Clin. Chem. 23:264-269 (1977).

- 61.- Westerlund J., Pudek M. y Schreiber E.W. A rapid and accurate spectrofluorometric method for quantification and screening of urinary porphyrins. Clin. Chem. 34:345-351 (1988).
- 62.- With T.K. Thin layer chromatography of free and esterified porphyrins on talc. J. Chromatog. 42:389-392 (1969).
- 63.- Watson C.J., Berg M.H., Hawkinson V.E. y Bossemaier I. Studies on the uroporphyrins. Clin. Chem. 6:71-76 (1960).
- 64.- With T.K. On porphyrin esterification and ester hydrolysis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Supl.134 (1973).
- 65.- Elder G.H. The porphyrias: clinical chemistry diagnosis and methodology. Clin.Haematol. 9:371-376 (1980).
- 66.- Falk J.E. Porphyrins and metalloporphyrins. Elsevier Publ. Co., Amsterdam. pp:232-253 (1964).
- 67.- Doss M. Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8:197-202 (1970).
- 68.- Smith S.G. The use of thin layer chromatography in the separation of free porphyrins and porphyrin methyl esters. Br. J. Dermatol. 93:291-296 (1975).
- 69.- Sears W.G., Daroche T. y Eales L. Thin layer chromatographic behaviour of the coproporphyrin isomers in the relation to porphyrin P_I. Enzyme 17:69-75 (1974).
- 70.- Day R.S., de Salamanca R.E. y Eales L. The use of thin-layer chromatography to study the variation in fluorescence of porphyrin methyl-esters. Clin. Chim. Acta 89:25-34 (1978).
- 71.- Enriquez de Salamanca R., Pena M.L., Olmos A., Jimenez F.J. y Catalan M. Índice característico de la excreción urinaria de porfirinas en la porfirina cutánea tarda. Biométrica 2:29-34 (1979).

- 72.- Enriquez de Salamanca R., Romero F., Martin A., Mas V., Olmos A. y Peña M.L. Índice característico del patrón excretorio fecal de la porfiria cutánea tarda. *Biométrica* 3:73-79 (1979).
- 74.- Day R.S., de Salamanca R.E. y Eales L. Quantitation of red cell porphyrins by fluorescence scanning after thin-layer chromatography. *Clin. Chim. Acta.* 89:25-34 (1978).
- 75.- Smith S.G. The use of thin layer chromatography in the separation of free porphyrins and porphyrin methyl esters. *Br. J. Dermatol.* 93:291-295 (1975).
- 76.- Seubert A. y Seubert S. High-performance liquid chromatographic analysis of porphyrins and their isomers with radial compression columns. *Anal. Biochem.* 124:304-307 (1982).
- 77.- Sagen E. y Romslo I. Determination of porphyrins by high performance liquid chromatography: fluorescence detection compared to absorbance detection. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 45:309-314 (1985).
- 78.- Deacon A.C. Performance of screening tests for porphyria. *An. Clin. Biochem.* 25:392-397 (1988).
- 79.- Disler P.B., Blekkenhorst G.H., Eales L. The biochemical diagnosis of the porphyrias. *Int. J. Dermatol.* 23:2-10 (1984).
- 80.- Moore M.R. Laboratory investigation of disturbances of porphyrin metabolism. Association of clinical pathologists. *Br. Med. Assoc. Londres* 1983.
- 81.- Sepúlveda P. Estudios metodológicos sobre la concentración urinaria de porfirinas. Tesina de licenciatura. Facultad de C.C. Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 1990.
- 82.- Peters T. y Westgard J. Evaluation of methods. En: *Textbook of clinical chemistry.* Tietz N.W. (ed) Philadelphia. pp:410-423 (1986).

- 83.- Westgard J. y Hunt M. Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. Clin. Chem. 19: 49-57 (1973).
- 84.- Moore M.R. y Disler P.B. Biochemical diagnosis of the porphyrias. Clin. Dermatol. 3:24-40 (1985).
- 85.- Büttner J., Borth R., Boutwell J.H., Broughton P.M. y Bowyer R.C. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Parte 2: Assessment of analytical methods for routine use. Clin. Chem. 22:1922-1932 (1976).
- 86.- Büttner J., Borth R., Boutwell J.M. y Broughton P.M. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part 1: General principles and terminology. Clin. Chem. 22:532-540 (1976).
- 87.- Katsumato T., Masayoshi I. y Yukio H. Optimized liquid chromatographic method for fluorometric determination of urinary delta-aminolevulinic acid in workers exposed to lead. Clin. Chem. 33:1665-1667 (1987).
- 88.- Krouwer J.F. C.V. A detection limit. Clin. Chem. 35:900-901 (1989).
- 89.- Ernest J. The pursuit of quality in clinical laboratory analyses. Clin. Chem. 36:1602-1604 (1990).
- 90.- Christensen N., Johannessen B. y Romslo J. A rapid assay for urinary porphyrins by dual-wavelength spectrophotometry. Clin. Chim. Acta 81:229-235 (1977).
- 91.- Giessen A.W. y Wijk E.M. An improved method for quantitative determination of urinary porphyrins by use of second-derivative spectroscopy. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28:605-609 (1990).
- 92.- Sobel C., Cano C. y Thiers R. Separation and quantitation of coproporphyrin and uroporphyrin in urine. Clin. Chem. 20:1379-

1402 (1974).

93.- Martinez C. y Mills G. Spectrophotofluorometric determination of porphyrins in urine. Clin. Chem. 17:199-205 (1971).

94.- Jones K.G. y Sweeny G.D. Quantitation of urinary porphyrins by use of second derivative spectroscopy. Clin. Chem. 25:71-74 (1979).

95.-Walters M. y Thornton D.J. Multiwavelength analysis of derivative spectra: an application for the determination of urinary porphyrins. Clin. Chim. Acta 157:311-316 (1986).

96.- Watson C.J., Schwartz S., de Mello R., Hawkinson V. y Bossenmaier I. Porphyrin chromogens or precursors in urine, blood, bile and feces. J. Lab. Clin. Med. 37:843-859 (1951).

97.- Martasek P., Jirsa M. y Kordac V. Porphyrinogens in urine in various types of pophyrias. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20:113-117 (1982).

98.- Schwartz S., Edmondson P., Stephenson B., Sarkar D. y Freyholtz M. Direct spectrofluorometric determination of porphyrins in diluted urine. An. Clin. Res. 8:156-161 (1976).

99.- Jones K.G. y Sweeney D. Measurement of urine porphyrins and porphyrinogens. Biochem. Med. 15:223-232 (1976)

100.- Holecek V. Excretion of various porphyrins and their corresponding porphyrinogens by rabbits after intravenous injection. Br. J. Med. 14:198 (1975).

101.- Levine J. Keeping time to circadian rythms. FDA Consumer. pp:19-21 (1990).

102.- Merriam G.R. y Wachter K.W. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. Am. J. Physiol. 243(6):E310-E318 (1982).

- 103.- Clifton D.K. y Steiner R.A. Cycle detection: a technique for estimating the frequency and amplitude fluctuations in blood hormone and substrate concentrations. *Endocrinology* 112:1057-1064 (1983).
- 104.- Bloom K.E., Zaider E.F., Morledge L.J. y Poh-Fitzpatrick M.B. Urinary porphyrin excretion in normal children and adults. *Am. J. Kidney Dis.* 18:483-489 (1991).
- 105.- Araki S., Murata K., Yokoyama K. et al. Circadian rhythms in the urinary excretion of metals and organic substances in "healthy" men. *Arch. Environ. Health.* 38:360-366 (1983).
- 106.- Sanguinetti F., Dompé M. y Mantovani S. Circadian rhythms in urinary coproporphyrin and delta-aminolevulinic acid excretion. *Ann. Ist. sup. Sanita* 14:601-605 (1978).
- 107.- Martásek P., Jirsa M. y Kordac V. Role of the kidneys in porphyrias. *Nephron* 32:277-278 (1982).
- 108.- Peña M.L., Olmos A., Chinarro S. et al. Estudios sobre el posible ritmo nictameral de la excreción urinaria de porfirinas. *Biométrica* 6:103-110 (1981).
- 109.- Bourke E., Copeman P.W., Milne M. y Stokes G. Effect of urinary pH on excretion of porphyrias. *Lancet* 1:1394-1396 (1966).
- 110.- Wiegand S.E., Copeman P.W.M., Milne M.D. y Stokes G.S. Metabolic alkalization in porphyria cutanea tarda. *Arch. Derm.* 100:544-549 (1969).
- 111.- Boytoon S.B. y Roth K.S. Rapid and accurate random urinary porphyrin quantitation. *Clin. Chim. Acta* 226:1-11 (1994)