

Tesis de Posgrado

Metabolismo del porfobilinógeno : Estudios de porfirinas y precursores en porfiria experimental en animales

Tigier, Horacio Alberto

1962

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tigier, Horacio Alberto. (1962). Metabolismo del porfobilinógeno : Estudios de porfirinas y precursores en porfiria experimental en animales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1121_Tigier.pdf

Cita tipo Chicago:

Tigier, Horacio Alberto. "Metabolismo del porfobilinógeno : Estudios de porfirinas y precursores en porfiria experimental en animales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1962.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1121_Tigier.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" METABOLISMO DEL PORFOBILINOGENO "

"Estudios de porfirinas y precursores en porfiria experimental en animales"

HORACIO ALBERTO TIGIER

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química
Orientación Química Biológica

Buenos Aires

1962

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"METABOLISMO DEL PORFOSILINÓGENO"

"Estudios de porfirinas y precursores en porfiria experimental en animales"

MORACIO ALBERTO TEOIER

Tratamiento de

Tesis presentada para optar al

Título de Doctor en Química

Orientación Química Biológica

Buenos Aires

1962

R. de Tesis: 1121

FOYDA

La primera parte de este trabajo de tesis es de carácter bibliográfico y consiste en una puesta al día acerca de los estudios realizados sobre porfobilinógeno (PBG) y porfiria experimental, desde las primeras observaciones de Sachs, hasta los trabajos de los grupos de Watson; Albrich & Lathe; Rimington; Eñard, Hajdos & Uggion-Brok y otros laboratorios en el período que va desde 1931 hasta los primeros meses de 1960 (1 al 74).-

En la segunda parte del segundo trabajo, se ha realizado un estudio experimental exhaustivo de la metodología relacionada con el PBG.

Se ha adaptado el método de aislamiento de PBG de orina porfirica descrito por Cookson & Rimington (24), así como distintas técnicas de identificación y valoración cuantitativa de PBG (forma cristalina, cromatografía en papel, determinaciones espectrofotométricas y comportamiento frente a resinas de intercambio iónico).

Se determinaron coeficientes de extinción molar específica con distintos reactivos de Ehrlich y con material cristalino aislado de orina porfirica; los valores obtenidos coinciden con los de la literatura (27 y 28).

Se han estudiado las condiciones óptimas de absorción, elución y recuperación de soluciones puras de PBG, o resolado previamente, con orinas normales y porfiricas; en columnas de resina de intercambio Dowex 2, empleadas en la técnica de Mauzerall & Granick (28).

Se ha encontrado como dato interesante que, aún con cantidades del orden de 1 mg de PBG absorbido en la columna, no se llega al punto de saturación, trabajando las condiciones descritas por los autores arriba citados.

En la tercera parte se han realizado estudios relativos al dosage cuantitativo de ácido delta amine levúlico (δ AL), PBG y porfirinas en orina de ratas y conejos sometidos a la porfiria experimental, mediante el suministro de a111 isopropil acetamida (AIA) o Sedormid (A113 isopropil acetil carbonida) y en orina de una paciente afectada de porfiria aguda. Para tal fin se han aplicado técnicas descritas por Mauzerall & Granick (28), Schwartz, Zieve & Watson (75) y otros autores (76,77, y 78).

Además se ha efectuado una identificación de los distintos tipos de porfirinas urinarias que se excretan en porfiria experimental y aguda, aplicando técnicas cromatográficas en columna y papel descritas por Watson, Falk & Benson y otros autores -- con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (37,78,79,80,81 y 82).

En estos estudios se han obtenido los siguientes resultados:

1º: Tanto en las ratas como en los conejos llama la atención la gran desproporción en los sueros de δ AL y PBG, con respecto a los de ure- y coproporfirina, aunque la

excreción de δ AL en los conejos estuvo por debajo de la de las ratas. Además en los primeros se notó una mayor excreción de uroporfirinas que en las segundas.

2º: El cuadro químico ofrecido por la administración de AIA en ambas especies de animales, resultó prácticamente similar al producido por Sedormid.

3º: La medición comparativa de PBG por el método de Vahlquist (5), con la técnica de las recinas descritas por Mauzerall & Granick (28), ha demostrado que los resultados obtenidos por el método directo pueden dar errores por exceso hasta de un 100%.

Además conviene hacer notar que los estudios realizados en la fracción "uroporfirina" fueron hechos en orina sin precalentar, a diferencia de los efectuados por otros autores.

Los resultados obtenidos son coincidentes con los comunicados por Abbot y Rudolph (94) en 1961 y discrepan con los de Stich (73) que sugiere una diferencia entre la porfiria aguda humana y la porfiria experimental, basada en los distintos niveles de excreción de δ AL.

Con respecto al tipo de las distintas porfirinas encontradas en la orina, tanto procedentes de porfiria experimental como del caso humano se ha demostrado que la mayor parte de la uro- y coproporfirinas son de tipo isomérico III. También se han encontrado -- proporciones de porfirinas de 7, 6 y 5 carboxilos.

La de siete carboxilos fue identificada como firiaporfirina III (37) cuyo porfirinógeno se considera precursor metabólico de la protoporfirina IX según Batlãe & Grinstein (95):

Todo este conjunto de resultados pueden ser interpretados mediante una hipótesis -- que considera la biosíntesis exagerada de δ AL, como responsable de la mayor producción de compuestos pirrólicos observada en la porfiria aguda. La acumulación de δ AL favorecería una mayor formación de PBG, através de un mecanismo de la actividad enzimática, en este caso sobre la dehidrasa del δ AL. Esto se realizaría por un mecanismo similar al que se distingue como "feed back" positivo (Davidson, 1960) (107). Los aumentos registrados en la excreción de porfirinas podrían explicarse en forma similar por el aumento de la biosíntesis de PBG. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Gibson (1955) (96), -- que encuentra una mayor actividad de la dehidrasa de δ AL en hígado de conejo tratado con Sedormid, y de Scott (1955) (97), que constata que en porfirias agudas humanas la transformación de δ AL en PBG es más rápida. Las variaciones que se pueden observar en uro- y coproporfirinas pueden deberse a diferencias de actividad de las enzimas que regulan su aparición o a diferentes niveles de su velocidad de excreción.

En una rata porfírica a la que se le suministró glicocola, ácido succínico y algunos cofactores, entre los que se encontraba ATP, se halló una disminución en la eliminación de porfirinas y precursores. Este hecho no tiene una explicación muy clara pero como en los últimos tiempos se ha encontrado que AMP (Bénard, Gajdos, Gajdos-Török & Callistin) (98) y la inosina (Lottsfeldt, Labbe & Aldrich) (99) producen un descenso en los niveles de excreción de porfirina y precursores; esta disminución podría explicarse como un efecto del ATP.

En la cuarta parte de este trabajo se han efectuado determinaciones de actividad enzimática de escofitrico deshidrogenasa, málico deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa en polvos acetónicos de hígado de ratas y plasma de conejos normales y sometidos a la porfiria experimental, no encontrándose alteraciones significativas de las mismas. (85 al 93). Esto aparentemente excluiría la posibilidad de que una formación anormal de succinil CoA fuera la responsable de la biosíntesis exagerada de SAL y PBO.

Por otra parte como conclusión general, se confirma una vez más la similitud de la porfiria experimental con la porfiria aguda humana, como ya fuera señalado en anteriores trabajos.-

Finalmente, en el apéndice, se hace una puesta al día de las últimas investigaciones en el campo de la porfiria experimental en los últimos dos años (98 al 106)



UNIVERSIDAD

A mis padres

Padrino de Tesis

Dr. MOISES GRINSTEIN

AGRADECIMIENTOS

Personales

En primer lugar, debo expresar mi agradecimiento al Dr. Moisés Grinstein, por la dirección de este trabajo y por haberme iniciado de ese modo en la investigación en el campo bioquímico.

También deseo agradecer a mis compañeros de trabajo en el laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales: Emilio Adolfo Rivas, Alcira María del Carmen Batlle, Sergio Nacht, Martha Kreimer de Birnbaum y Ana Tancioni, quienes, directa o indirectamente, han colaborado en algunas partes de este trabajo.

Expreso también mi reconocimiento a Pablo Díaz y Washington Napoleón León, por el cuidado de los animales de laboratorio sometidos a experimentación.

A instituciones y personas relacionadas con ellas

Agradezco a la Comisión Nacional de Energía Atómica, por intermedio del Dr. Aldo Mitta, por la cesión de las ratas Wistar.

Agradezco a los laboratorios Hoffman La Roche & Cía. Bs.As., por el suministro de alil isopropil acetamida (A.I.A.).

Finalmente agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, pues parte del trabajo fue realizado con una beca honoraria otorgada por dicha institución.-

ACLARACION PRELIMINAR

Algunos estudios relativos a porfiria experimental, que se describen en este trabajo de tesis, han sido realizados en colaboración con el Licenciado Emilio A. Rivas y serán incluidos también en su trabajo de tesis titulado "Metabolismo del ácido delta amino levúlico".

ABREVIATURAS USADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

PBG : Porfobilinógeno
pDMAB : para dimetil amino benzaldehido
AL : ácido delta amino levúlico
A.I.A. : alil isopropil acetamida
I.C.D. : Isocítrico deshidrogenasa
M.D. : Mállico deshidrogenasa
G.D. : Glutámico deshidrogenasa
A.D. : Alcohol deshidrogenasa

- - - - -

- -

INTRODUCCION

Antecedentes del porfobilinógeno

En 1931, Sachs (1) comprobó que la orina de un paciente de porfiria aguda daba un intenso color rojo con el reactivo de Ehrlich (pDMAB), mientras que no daba la reacción de Schlesinger, ni el espectro característico de la urobilina; obteniéndose en cambio, dos bandas en la zona espectral verde, a diferencia de una sola que da ese reactivo con la urobilina. Por otra parte, el compuesto coloreado era insoluble en cloroformo. También observó que la orina, expuesta a la luz, se oscurecía y luego no daba esta reacción característica.

Waldenström, en 1937, (2) estudió este "cromógeno" en orinas porfíricas pero no lo pudo aislar aunque demostró que, con un calentamiento en medio ácido, se obtenía un pigmento rojo que él llamó porfobilina. Este mismo autor junto con Vahlquist (3,4) observó que la urea interfería en la reacción de coloración y se interpretó que este cromógeno, responsable de esta reacción, era un compuesto dipirrólico que, de acuerdo con la teoría de Dobriner (5), por condensación de dos moléculas formaba porfirinas. Esa sustancia ellos la llaman, por primera vez, porfobilinógeno y en 1944 (6) describieron un método para su dosaje en unidades arbitrarias, definiendo como unidad de PBG a la cantidad de este compuesto presente en una solución, que da una densidad óptica de 0,545 a 552 m., cuando reacciona con el pDMAB al 2% en CLH 5 N.

En 1941, Watson y Schwartz (7) describieron un test cualitativo para diferenciar esta sustancia del urobilinógeno, aprovechando la distinta solubilidad en cloroformo del compuesto coloreado. Este es el test que se usa actualmente para identificar PBG en orinas patológicas.

Prunty (8), en 1945 basándose en todos estos resultados, describió la preparación de una solución de PBG purificado de orina e hígados patológicos, mediante la adsorción en columna de alúmina y posterior elución con ácido acético. Comprobó también por primera vez, que el PBG inyectado a conejos no produce un incremento significativo de porfirinas excretadas por orina.

Ya en ese tiempo, Prunty pensaba que el PBG era precursor de porfirinas y que el principal lugar de formación era el hígado.

El primer investigador que llegó a aislarlo en forma cristalina, fue Westall (9), pero esto recién ocurrió en 1952; aunque previamente Brockman,

Gray y Hawkinson se ocuparon de él, especialmente acerca de su propiedad de transformarse en uroporfirinas a distintos pH y tiempos de calentamiento (10, 11, 12 y 13).

Westall consiguió cristalizarlo a partir de orina porfirica, utilizando una técnica mediante la cual precipitaba el PBG con acetato mercúrico, liberándolo posteriormente con SH_2 . Para la ulterior purificación, utilizaba resinas de intercambio iónico del tipo Dowex 2, un nuevo tratamiento con acetato mercúrico y SH_2 y una purificación final con columna de alúmina, como ya había descrito Prunty. Los cristales fueron obtenidos al llevar este último eluido a pH 4.

En este trabajo, también describió la cromatografía en papel de PBG, que ya habían comenzado a utilizar Consden y colaboradores (14).

Westall discutió aquí la posibilidad de que el PBG no fuera intermedio normal en la biosíntesis de uroporfirinas, debido a la preponderante formación de porfobilina "in vitro", un pigmento de carácter bilirrubunoi- de. Además a esa altura de las investigaciones aún no se sabía a ciencia cierta si el PBG tenía una estructura mono o dipirrólica.

Watson, Wawkinson y Bossenmaier (15), en 1953, describieron la aparición en orinas porfiricas de un cromógeno de porfirinas, que reaccionaba negativamente con el reactivo de Ehrlich, haciendo notar la importancia del PBG en el diagnóstico de las porfirias agudas, pues ya se sabía que este compuesto no aparecía en orinas de pacientes con porfiria cutánea tarda o congénita.

De este modo, en ese mismo año, Cookson y Rimington (16) aclararon definitivamente la estructura monopirrólica del PBG, con la colaboración del Dr. L.A. Duncanson, en la determinación de los espectros infrarojos y de la Dra. Olga Kennard, en la determinación cristalográfica por rayos X y el peso molecular.

Granick y Bogorad (17) y el mismo Cookson (18), estudiaron una serie de derivados de PBG que aclararon definitivamente su estructura.

Por otro lado, en ese mismo año de 1953 que resulta decisivo en el estudio de este compuesto, Falk, Dresel y Rimington (19) demostraron que era un precursor biológico de porfirinas, pues, añadiendo PBG a hemolizados de glóbulos rojos de pollo, se convertía en proto-, copro- y uroporfirina.

Bogorad y Granick (20) confirmaron lo mismo usando extractos de algas Chlorella y Schwartz (21), en 1954, llegó a la misma conclusión con homogenatos de hígado de rata.

Los estudios realizados por distintos investigadores en varios laboratorios, han permitido aclarar el mecanismo de la biosíntesis del hemo. Una exposición detallada de los mismos ha sido hecha por Rimington (22).

La posición del PBG dentro del camino metabólico, está expuesto en las figuras Nros. 1, 2 y 3.

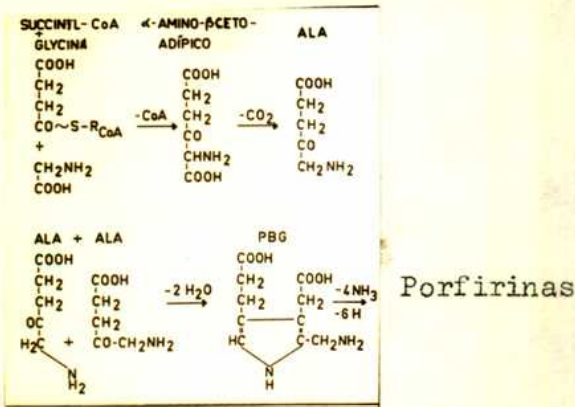


Figura N° 1.

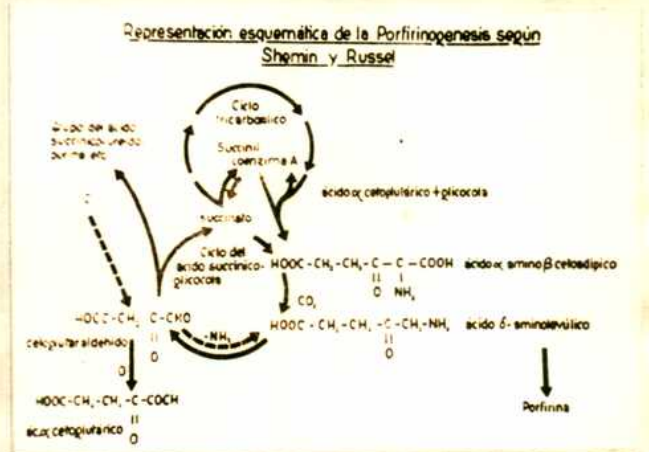


Figura N° 2. Extraído de Shemin, Russell y Abramsky. (23)

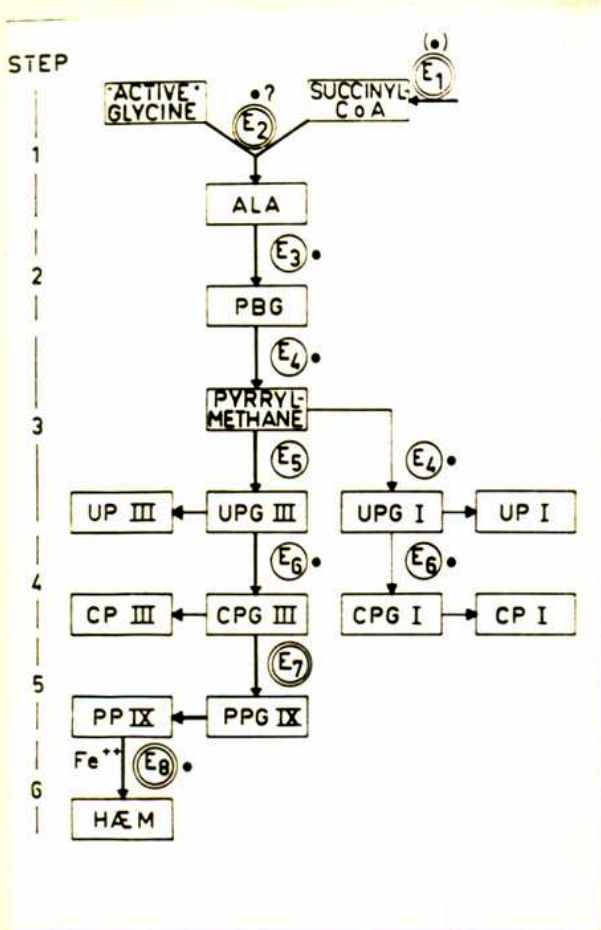


Figura N° 3: Los diferentes pasos en la biosíntesis del hemo. Aclaraciones: Step: Paso; Active Glycine: Glicina activa; Succinyl CoA: Succinil CoA; ALA: ácido delta amino levúlico; Pyrryl Methane: Pirril Metano; UPG: Uroporfirina; UPG I: Uroporfirinógeno; CP: Coproporfirina; CPG: Coproporfirinógeno; PP: Protoporfirina; PPG: Protoporfirinógeno; Haem: Hemo; E1: Enzimas del ácido cítrico; E2: ALA sintetasa; E3: ALA dehidrasa; E4: PBG deaminasa; E5: UPG isomerasa; E6: UPG decarboxilasa; E7: CPG oxidasa CPG decarboxilasa; E8: Hemo sintetasa.

En 1954, Cookson y Rimington (24) publicaron un trabajo completo sobre PBG, en el que se describe un método de aislación a partir de orinas porfiricas, que es el más usado actualmente. Tiene una importante ventaja sobre el de Westall, que es la supresión de las columnas de resina y alúmina para la purificación, las que son reemplazadas por un tratamiento con acetato de plomo. Con el PBG cristalino se obtuvieron 130 unidades Vahlquist por mg.

En esta misma publicación, describieron la preparación de algunos derivados del PBG, como asimismo la síntesis de algunos compuestos relacionados con él; discutiendo la formación de porfirinas a partir de PBG y su estructura química, que queda aclarada definitivamente como 2 amino-metil-4-2'-carboxietil-3-carboximetil pirrol. Dicha estructura fue confirmada por síntesis por Prasad, Raper, Rimington y Kroll (25 y 26).

En el año 1956, aparecieron casi simultáneamente en Europa y EE.UU., dos trabajos que resuelven el último problema serio que presentaba el PBG; su correcto dosaje frente a los inhibidores de la reacción de Ehrlich que se encuentran en la orina.

En el primero de ellos, Rimington, Kroll y Tooth (27) se ocuparon de la relación entre la intensidad del color y los diferentes reactivos de Ehrlich, que se pueden preparar con distintos ácidos y también de los diversos inhibidores que pueden aparecer en la orina. Discutieron además el mecanismo químico de la reacción de Ehrlich y suministraron datos sobre coeficientes de extinción molar específica de dicha reacción.

En el otro trabajo, Mauzerall y Granick (28) describieron el método de determinación de PBG y de Δ AL, mediante el uso de resinas de intercambio iónico, que anulan de este modo la inhibición de las interferencias. También suministraron datos sobre los coeficientes de extinción molar específicos y discutieron la reacción de Ehrlich.

El mecanismo químico de esta reacción está explicado en la figura N°.4

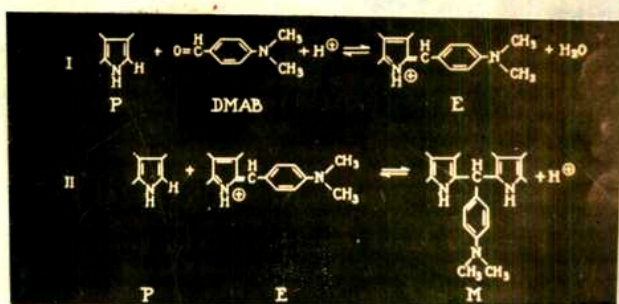


Figura N°.4: P: Pirrol; E: Com-
 puesto coloreado; M: Compuesto
 no coloreado. La reacción I
 es la que produce la colora-
 ción, mientras que si tiene
 lugar la II, se pierde el co-
 lor. Con un exceso de DMAB y
 en un medio ácido, está favo-
 recida la primera de las reac-
 ciones. También influyen los
 sustituyentes de P. Si son do-
 nores de electrones (ej.: Alqui-

lo), favorecen el color; en cambio los aceptores (ej.: acetilo, carboxi, nitro, etc.), tienen efecto opuesto. La elección de la concentración de ácido está gobernada por las velocidades de las reacciones I y II y por los numerosos equilibrios ácido base presentes en la reacción.-

Haeger, en 1958, empleó este método para determinar AL y PBG en dife-
 rentes tipos de porfiria (29). Tanto los estudios de Mauzerall y Granick
 como los de Haeger fueron realizados sobre orinas de pacientes con porfiria
 aguda.

Con respecto a estudios relativos a las transformaciones enzimáticas
 de PBG en porfirinas, se pueden ver trabajos de Hoare y Heath (30,31) y
 Lockwood y Benson (32) y con referencia a la condensación química de este
 compuesto en uroporfirinógenos, así como a la estabilidad termodinámica de
 estos últimos, existen trabajos relativamente recientes de Mauzerall (33,34).

Antecedentes sobre porfiria

La porfiria es una enfermedad asociada a un trastorno profundo del me-
 tabolismo de las porfirinas, tratándose de una anomalía metabólica de tipo
 constitucional; aunque también se puede pensar en porfirias adquiridas en
 un terreno sin predisposición especial y causada por un agente específico.
 Entre éstas se encontraría la porfiria experimental, que será tratada más
 adelante.

Como ya se ha demostrado, los núcleos pirrólicos sintetizados normal-
 mente en el organismo, se utilizan en su mayor parte para formar la proto-
 porfirina IX que, combinada al Fe, da lugar a la formación del hemo, grupo

prostético de la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasa y peroxidasas.

En los casos de porfiria, aumenta significativamente la excreción de distintos tipos de porfirinas y precursores, apareciendo simultáneamente distintos síntomas clínicos.

Günther, en 1922 (35) y Waldenström, en 1937 (2), elaboraron dos clasificaciones basadas en criterios diversos, que son las siguientes:

Clasificación de Günther

- Porfirias genuinas
- Porfirias tóxicas
- Porfirias crónicas
- Porfirias congénitas

Clasificación de Waldenström

- I Porfiria congénita
- II Porfiria cutánea tarda
- III Porfiria aguda
 - a) Latente
 - b) Forma abdominal
 - c) Forma nerviosa
 - d) Aguda clásica
 - e) Forma cromatosa, comienza como la a)

Más recientemente, Watson (36) clasificó a las porfirias del siguiente modo:

- I Porfiria eritropoyética
- II Porfiria hepática
 - a) Aguda
 - b) Cutánea tarda
 - c) Tipo mixto o combinado
 - d) Latente

Esta última clasificación está basada en el estudio de 161 casos de porfiria humana, además de las porfirias experimentales en animales.

En los casos que presentan una sintomatología similar al tipo congénito de Günther (caso Petry), las porfirinas anormales y las coproporfirinas

en cantidades anormalmente altas, se formarían en las células inmaduras de la médula ósea; por esa razón, se la conoce como eritropoyética y se caracteriza por la excreción abundante de copro- y uroporfirina de tipo isomérico I, no registrándose la presencia de precursores en la orina. En estos casos, los síntomas clínicos predominantes son la fotosensibilidad y la anemia hemolítica.

En cambio en las otras formas de porfiria, que son las más comunes, las porfirinas anormales y los precursores se formarían en el hígado.

La forma cutánea, que se presenta generalmente en edad avanzada y que se caracteriza por fotosensibilidad, pigmentación de la piel y disfunción hepática, posee la característica de excretar por orina, uroporfirina I más firiaporfirina III, conjunto antes conocido como porfirina de Waldenström (37) y coproporfirina, generalmente como complejo metálico.

La forma aguda intermitente tiene una sintomatología clínica muy diversa, que puede presentarse en forma de cólicos abdominales y, en algunos casos, con parálisis y trastornos psíquicos.

Esta última es una forma grave de esta enfermedad, más frecuente de lo que se piensa, pues muchas veces pasa desapercibida por dificultades en su diagnóstico. Se caracteriza por una gran excreción de precursores de porfirinas, tales como el PBG y el δ AL. También se excretan distintos tipos de porfirinas, pero en menor proporción y entre ellas, predominan las del tipo isomérico III.

Una de las formas más útiles de diagnóstico, es la reacción de Watson y Schwartz (7,38) ya mencionada anteriormente, aplicada a la orina patológica.

En nuestro laboratorio, tenemos registrados dos casos comprobados de porfiria aguda, que se han estudiado en su aspecto químico para completar la investigación relativa a porfiria experimental. Uno de ellos es una joven de 20 años, residente en Junín (Prov. de Bs. As.), con avanzados síntomas de parálisis y de cuya orina se hicieron las primeras aislaciones de PBG cristalino. El otro caso, mejor estudiado debido a su residencia en Buenos Aires, es una señora de 27 años, que no presenta síntomas tan extremos como los del caso anterior, pero, que en determinadas épocas, hace crisis con vómitos continuos y cólicos abdominales.

En un trabajo de Grinstein (39) están descriptos otros detalles relativos a los distintos tipos de porfiria.

Antecedentes de porfiria experimental.

Los estudios de porfiria experimental comenzaron con los trabajos de Schmid, Schwartz, Hanson y Keprios (40, 41, 42) en 1952 y fueron continuados por distintos grupos de trabajo, además de estos investigadores que pertenecen al grupo de Watson.

Para situar mejor el problema, se analizarán las contribuciones hechas al tema por los distintos grupos de trabajo hasta comienzo de 1960, año en el cual iniciamos nuestra investigación sobre este problema.

Investigaciones sobre porfiria experimental por el grupo de Watson(1952-1957)

Schmid, Hanson y Schwartz (40), hicieron la primer experiencia de porfiria experimental intoxicando conejos con plomo, produciendo en realidad un saturnismo experimental; de este modo, aislaron uroporfirina I cristalina de médula ósea, similar a la aislada de la orina de una paciente con porfiria fotosensitiva (eritropoyética).

En el segundo trabajo de esta serie, Schwartz, Keprios y Schmid (41), sometieron conejos a un tratamiento combinado de plomo, fenilhidracina y luz, consiguiendo un estado temporario similar a la porfiria humana. Se observó una excreción de uroporfirina I similar a la de la porfiria eritropoyética sin registrar anormalidades en las porfirinas formadas en el hígado, pero también presentaban las características de porfiria hepática, pues se excretaba PBG y se registraban aumentos en la coproporfirina III.

En el tercer trabajo, Schmid y Schwartz (42) trataron de producir una porfiria experimental similar a la de tipo hepático. Con ese fin, se basaron en el trabajo de Ellinger y Rieser (43), quienes en 1916 habían descrito la aparición de porfirinas insolubles en éter (tipo uro) en orina de pacientes intoxicados con trional (dimetil-sulfón-metil-etil-metano). Por otra parte Duesberg y Fisher en 1932 (44), habían hallado porfirinas similares en la orina de conejos tratados con sulfonal (dietil-sulfón-dietil-metano) y también Waldenström y Wendt (45) en 1939, habían comprobado que el dimetil-sulfón-dimetil-metano y el sulfonal aumentaban la excreción de coproporfirinas en conejos.

Pero lo que hizo que se eligiera el Sedormid (alil-isopropil-acetil-carbemida) como droga inductora de la porfiria experimental, fue un caso de un paciente que por intoxicación con esta droga, contrajo porfiria y fue relatado por Duesberg (46).

El mismo Schmid, en una de las discusiones del Symposium Ciba (1955), explicó este caso de la siguiente manera: "We have no experience with Sedormid poisoning in man, but Duesberg observed just such a case in 1932. Actually this report gave us the initial idea of using Sedormid to produce experimental porphyria in animals. The patient had suffered from chronic osteomyelitis and had been taking a variety of barbiturates. Later he switched to Sedormid of which he took daily large quantities. After several months on Sedormid, he was found to excrete large amounts of uroporphyrins. On autopsy the liver was analysed for porphyrins, but no uroporphyrin was found. Porphobilinogen was not known at that time. The only porphyrin present in the liver was coproporphyrin. These findings are certainly reminiscent of what one finds in autopsy material in acute hepatic porphyria that I know of and I believe that it was really a case of Sedormid porphyria, and not a latent hepatic porphyria, which was brought by Sedormid. It was a chronic abuse of this sedative over a long period of time, with progressive increase in porphyrin excretion".

De este modo, estos autores indujeron porfiria experimental en conejos mediante el suministro de Sedormid, encontrando que el hígado de estos animales contenía grandes cantidades de proto-, copro-, y uroporfirina, esta última principalmente en forma de precursores no fluorescentes; también hallaron PBG.

El contenido en porfirinas de los eritrocitos, médula ósea, bazo y cerebro, estaban dentro de los límites normales. Notaron parálisis pasajeras de las patas traseras de los conejos.

Estos autores piensan que el Sedormid actuaría sobre las enzimas de formación de ferroporfirinas en las células hepáticas.

En 1955, Schmid, Figen y Schwartz (47) midieron la actividad de la catalasa en hígados de conejo sometidos a la porfiria experimental, encontrando una caída rápida y marcada de la actividad de esta enzima, con un aumento simultáneo en la concentración hepática de porfirinas. No se encontraron alteraciones en la citocromo oxidasa y la succino deshidrogenasa. La medi-

ción de la incorporación de glicina 2-C¹⁴ en la catalasa, pareciera estar de acuerdo con la interpretación de que el Sedormid bloquea la formación de catalasa en el hígado.

En el Symposium Ciba (1955), se discute un trabajo similar, llegándose a la conclusión de que no se sabía si el bloqueo se producía en la unión hemo-proteína, o en la biosíntesis protéica; en ese momento, se carecía de datos referentes a otras proteínas hepáticas. En nuestro laboratorio, se está estudiando la biosíntesis de proteínas en porfiria experimental (49) en estos momentos.

Schwartz (50), Schwartz y Watson (51) y Merchante, Wasjchenberg y Schwartz (52), 1957, ponen de manifiesto que los homogenatos de hígado de ratas normales y sometidas a la porfiria experimental, transforman el PBG en porfirinas de la misma manera. Esto los hizo pensar que la biosíntesis exagerada de precursores, no podía sólo explicarse como un bloqueo enzimático; ellos pensaron que el gran incremento en la síntesis de pirroles intentaba compensar en el hígado, dicho bloqueo.

Schwartz e Ikeda, en el Symposium Ciba (1955) (53), describieron una experiencia similar, haciendo referencia a unas ciertas porfirinas verdes aisladas de hígado de conejos porfiricos. En trabajos posteriores de otros autores y en nuestras determinaciones, no pudimos confirmar la existencia de dichas porfirinas que, aparentemente, son diferentes formas de la proto-porfirina IX.

Investigaciones sobre porfiria experimental por el grupo de Aldrich y Labbe (1953-1959).

En 1953, Case, Aldrich y Neve (54) repitieron la experiencia realizada por Schmid y Schwartz, en ratas obteniendo resultados bastantes similares. Conviene hacer notar que estos autores dosaron uroporfirinas sin calentar y sólo hicieron reacción cualitativa de PBG. Las porfirinas que identificaron eran en su mayoría de tipo isométrico III.

En 1955, Talman, Case, Neve, Labbe y Aldrich (55), comenzaron una serie de experiencias relacionadas con el metabolismo de las porfirinas y la porfiria experimental en embrión de pollo mediante inyección de Sedormid en la yema de dichos embriones.

Encontraron PBG y porfirinas del tipo isomérico III en el fluido alantóico y que se retrasó el desarrollo de los embriones, apareciendo luego

anomalías congénitas.

En otros trabajos (56), Labbe, Talman y Aldrich verificaron que en la porfiria experimental en embrión de pollo, al aumentar la coproporfirina, disminuía el ácido úrico. Como luego de una inyección de adenina verificaron que ésta era metabolizada correctamente a ácido úrico, asociaron la porfiria a una falla en la biosíntesis de purinas. Estos autores pensaron que la gran superproducción de PBG, provenía de un exceso de δ AL y, por otra parte, Shemin y Russell (57) consideraron que existía una alteración en la desaminación del δ AL a α -cetoglutaraldehído, en el camino hacia las purinas.

En 1957 (58), estos mismos autores estudiaron la estructura molecular de los derivados de acetamida que afectan al metabolismo de las porfirinas, también en embrión de pollo y llegaron a la conclusión que era necesaria una acetamida mono o dialil sustituida.

En 1959 (59). Talman, Labbe, Aldrich y Sears, estudiaron el metabolismo de varias bases púricas en embriones de pollo normales y sometidos a la porfiria experimental y encontraron que en ambos casos la adenina se convertía bien en ácido úrico, pero no la xantina y la guanina. Un hecho muy importante fue que la adenina reducía la formación de porfirinas en los embriones sometidos a porfiria experimental, mientras que la adenosina fue, en cierto modo menos efectiva.

Todos estos hechos, abonaban en favor de una alteración metabólica de las purinas en la porfiria experimental.

Investigación sobre porfiria experimental por el grupo de Rimington (1954-1955)

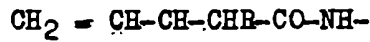
Como se sospechaba que los barbituratos afectaban el curso clínico de la porfiria aguda, Golderg en 1954 (60), probó el efecto de ellos en el metabolismo de las porfirinas en los conejos.

El ácido dialil-barbitúrico produjo un aumento de coproporfirina III, uroporfirina III y PBG, registrándose con el alilisopropilbarbitúrico y alil-(1-metil-butyl)-barbitúrico sólo aumentos en la coproporfirina III. Otros barbituratos, no afectaron el metabolismo porfirínico.

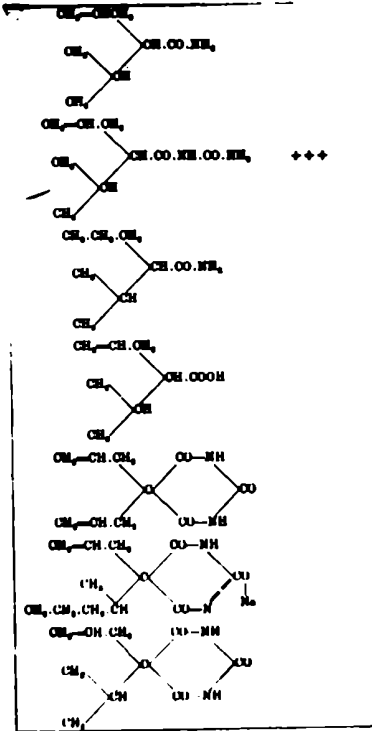
Este mismo autor, junto con Rimington (61-62) en 1954 y 1955, inyectaron PBG a ratas, sin registrar aumentos significativos de porfirina en la orina.

Tampoco hubo acumulación de PBG en el hígado y, por otra parte, la excreción del PBG inyectado era muy rápida.

Goldberg y Rimington (63) probaron distintas drogas inductoras, llegando a la conclusión de que la estructura química que afecta al metabolismo de las porfirinas es:



En la figura N°. 5 se pueden observar las distintas drogas probadas por Goldberg y Rimington y los efectos que obtuvieron.

droga	<u>Fig. N°. 5</u> estructuras	Efectos sobre la excreción urinaria de porfirinas.
alil-isopropil-acetamida (A.I.A.)		
Alil-isopropil-acetil-urea (Sedormid)		
n-propil-isopropil-acetamida		+++
alil-isopropil-ácido acético		
ácido dialil-barbitúrico (dial)		
alil-(1-metil-butil)-barbiturato de sodio (seconal)		
ácido alil-isopropil-barbitúrico		
+++ Efecto muy marcado (mucho copro-, uroporfirina y PBG).		
++ Efecto marcado (mucho coproporfirina y poco PBG y uroporfirina).		
+ Efecto moderado (solamente coproporfirina.)		
± Sólo aumenta ligeramente la coproporfirina. - - - Ningún efecto.		

Realizaron experiencias en distintos tipos de animales, tales como conejos, que fueron estudiados en detalle, ratas y pollos, obteniendo aumentos en la excreción de PBG, uro y coproporfirina, aunque para el dosaje de PBG usaron el método de Vahlquist y el dosaje de uroporfirinas fue hecho con previo calentamiento de la orina.

Verificaron que los conejos tratados con A.I.A. o Sedormid perdían apetito y peso y se costipaban. No observaron parálisis, ni cambios en la presión sanguínea y en los valores hematológicos.

Además, probaron también que el bloqueo del sistema retículo endotelial y la extirpación del bazo no disminuía la excrección de porfirinas ni PBG.

En opinión de estos autores, la porfiria experimental se debía a superproducción de porfirinas y no a la no utilización de ellas.

Investigaciones sobre porfiria experimental en el grupo de Bénard, Gajdos y Gajdos-Török. (1953-1955).

Estos investigadores, en una serie de trabajos realizados en el Hospital "Hôtel Dieu de Paris" entre 1953 y 1954 (64, 65, 66, 67, 68, 69, 70), ensayaron también por vía experimental en conejos con Sedormid y A.I.A.; esta última, fue suministrada en una dosis alta y única, registrando una elevada excrección de porfirinas y PBG a las pocas horas. También probaron porfiria experimental en conejos con hígados afectados por tetracloruro de carbono y llegaron a la conclusión de que no era necesaria la integridad del hígado, para la alteración del metabolismo porfirínico. Esto les hizo pensar que el PBG podría formarse también extrahepáticamente.

En 1955, estos mismos autores estudiaron la transformación de PBG a porfirinas en varios homogenatos de diferentes tejidos, en forma similar a lo que hicieron Watson y Schwartz. Además, probaron distintos inhibidores y activadores de esta transformación, encontrando que el novarsenobenzol, malonato, α -cetoglutarato y ATP inhibían la reacción, mientras que la adenosina monofosfato, la aceleraba.

Investigaciones de porfiria experimental en otros laboratorios (1955-1959)

Stich, en un artículo del Symposium Ciba (1955) (71), se ocupó de las distintas estructuras derivadas de acetamidas capaces de producir porfiria experimental y como verificó gran eficiencia con los alil derivados, supuso que en la porfiria experimental hay una competencia entre la succinil-CoA y la alquil succinil-CoA, formada a partir de los derivados alílicos de la acetamida. En la discusión suscitada en dicho Symposium por este trabajo, no fue muy aceptada la hipótesis de Stich. Falk dijo que suministrando

A.I.A. marcada a un conejo no se encontró PBG marcado.

En 1958 y 1959, Stich (72,73) publicó dos trabajos relativos a porfiria experimental en conejos en los que induce esta anomalía metabólica con Sedormid y otras drogas similares, encontrando una excrección elevada de PBG pero normal de δ AL.

En la Universidad de Maryland, Solomon y Figge (74), en 1959, administrando oralmente dietil-1-4-dehidro-2-4-6-trimetil-piridina-3-5-dicarboxilato a ratones, observaron un incremento de proto- y coproporfirinas en el hígado, mientras que en cobayos con este mismo compuesto, encontraron aumentada la coproporfirina urinaria y trazas de PBG urinario.

Situación de la porfiria experimental en los primeros meses de 1960. Introducción al trabajo experimental.

Como ya se ha visto, la porfiria experimental ha sido estudiada fundamentalmente por cuatro grupos de investigadores; uno en Minnesota (EE.UU.), bajo la dirección de Watson; otro en Londres (Gran Bretaña), dirigido por Rimington; otro en Portland, Oregón y Seattle, Washington (EE.UU.), en el que se destacan Aldrich y Labbe y, finalmente, el grupo francés, en el que trabajan Benard, Gajdos y Gajdos-Török, aunque, ultimamente, en la Universidad de Munich (Alemania Occidental), Stich ha realizado algunos estudios relativos a este tema.

De acuerdo a las teorías elaboradas por todos estos grupos de investigadores, parece bastante factible que en la porfiria experimental, así como probablemente en la porfiria aguda humana, haya una superproducción de porfirinas y precursores, más que una ~~no~~ utilización de ellas, como sugirió el grupo de Rimington.

De todos modos, la disminución de la actividad de la catalasa hace pensar al grupo de Watson, en un bloqueo enzimático, atribuyendo la gran formación de porfirinas a una compensación de aquel bloqueo. Lo que resultó experimentalmente evidente es que los hígados porfíricos pueden metabolizar bien el PBG "in vitro".

La única objeción fundamental que hace el grupo de Gajdos, es acerca de la posible formación extrahepática del PBG.

Por otro lado, Stich trató de elaborar una teoría de inhibición competitiva entre la succinil CoA y la alquil succinil CoA, pero no resultó muy aceptada por otros investigadores.

El grupo de Aldrich y Labbe ha enfocado el problema desde el punto de vista de una alteración en el metabolismo de los ácidos nucleicos.

En general, todos los grupos de investigación asocian la porfiria experimental con la porfiria aguda humana.

Con todos estos antecedentes, nos propusimos producir porfiria experimental, con el objeto de estudiar en forma más completa el cuadro químico correspondiente a porfirinas y precursores.

En este trabajo, se estudian la excreción de δ AL, PBG y porfirinas en porfiria experimental, utilizando métodos más exactos y específicos.

Finalmente, con la idea de verificar si existían alteraciones en las actividades de algunas enzimas relacionadas con la biosíntesis de δ AL y PBG, se midieron dichas actividades, en forma comparativa, en hígado de conejos normales y sometidos a la porfiria experimental. Un estudio similar se realizó en plasma de conejos.

Con ese fin, se determinó las actividades comparativas de isocítrico deshidrogenasa y málico deshidrogenasa, enzimas participantes del ciclo de Krebs y de la formación de succinil-CoA, punto de partida del ciclo de Shemin. Se hizo lo mismo con glutámico deshidrogenasa, relacionada con la formación de ácido α -cetoglutárico, que forma parte también del ciclo de Krebs.

Además, teniendo en cuenta que en determinados casos de porfiria, el alcohol la favorece y aumenta la excreción de porfirinas y precursores, se decidió medir la actividad comparativa de la alcohol deshidrogenasa.-

SEGUNDA PARTE

AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y VALORACION DEL PORFOBILINOGENO.

Aislamiento de PBG de orinas porfíricas.

Para el posterior estudio del metabolismo del PBG, la primer tarea realizada fue el aislamiento de este compuesto, en forma cristalina, a partir de orina de una paciente con porfiria aguda.

Como ya se dijo, el primer investigador que aisló PBG cristalino a partir de orina porfírica fue Westall (9), en 1952. Cookson y Rimington, en 1953, (24) modificaron el método, haciéndolo más sencillo y aumentando el rendimiento hasta el 60%.

Esta última técnica es la que se ha seguido para este trabajo, aunque utilizando la centrifugación, en lugar de la filtración, en todos los pasos.

El método consistió en llevar orina porfírica fresca a pH 4-4, 5 con ácido acético, para luego precipitar el PBG con solución de acetato mercúrico (15% peso/volumen). Se formó un precipitado muy fino, ligeramente coloreado, que probablemente sea un complejo mercúrico del PBG. Debido a las dificultades que presentó la filtración, se prefirió decantar el sobrenadante después de algunas horas y centrifugar el resto. Para determinar el final de la precipitación, se tomaron muestras parciales y sobre los filtrados se efectuó la reacción de Ehrlich; se dejó de añadir solución de acetato mercúrico, cuando esta reacción dió negativa. El precipitado, una vez centrifugado, se lavó dos o tres veces con solución de acetato mercúrico (1% peso/volumen).

Es muy importante para la eficacia del método, el uso de acetato mercúrico de muy buena calidad. Este debe disolverse con facilidad en agua en las proporciones antedichas. No es recomendable dejar preparadas soluciones de esta droga por períodos mayores de una hora, pues se hidroliza muy fácilmente.

El siguiente paso, consistió en liberar el PBG mediante una corriente activa de SH_2 ; para tal fin, se suspendió el precipitado obtenido anteriormente en la menor cantidad de agua y se hizo pasar SH_2 , dando por finalizada la reacción cuando toda la suspensión tomó color negro.

El precipitado de SHg , de aspecto coloidal, se centrifugó y se separó del sobrenadante. Debieron efectuarse tres o cuatro lavados con agua, pues

el SHg retiene parte del PBG; pero fue muy difícil llegar a una reacción negativa de Ehrlich en estos lavados.

El sobrenadante, más los lavados, se aereó para eliminar restos de sulfuros y luego se trató con acetato de plomo (10% peso/volumen) para precipitar todos los pigmentos que interfieren en la obtención de PBG. En este caso, se repitió el mismo procedimiento anterior, lavando con acetato de plomo (1% peso/volumen).

El nuevo sobrenadante, se trató con nitrato de plata al 20% peso/volumen, con el objeto de eliminar los acetatos. También aquí se efectuaron tres o cuatro lavados con nitrato de plata al 1%. Tanto el precipitado de los pigmentos como el de los acetatos, fueron de tipo coloidal, por lo que resultó aconsejable la centrifugación.

La solución resultante de todos estos procesos, resultó ser casi incolora o de leve tono amarillento y se volvió a tratar con un exceso de acetato mercúrico (15% peso/volumen), obteniéndose un precipitado que fue casi blanco; éste se separó por centrifugación y se liberó el PBG haciendo pasar SH₂, sin adición posterior de líquido.

Una vez concluido este tratamiento, se centrifugó este precipitado; el sobrenadante se filtró para evitar que pasaran partículas de sulfuro y aereó para eliminar el exceso de SH₂. Este sobrenadante de color amarillo, se ajustó a pH 4 con amoníaco y, por posterior enfriamiento cristalizó el PBG. Fue posible obtener mayor rendimiento, tratando el precipitado final de SHg con pequeñas porciones de agua.

Una vez observados los cristales de PBG, al microscopio, se filtró por un embudo de clavo y se lavó con agua acidulada con ácido acético y luego con acetona. Estos cristales eran de un ligero tono rosado. En lugar de recrystalizarlo disolviéndolo en amoníaco 0,5 N, con posterior tratamiento de ácido acético 1 N hasta pH 4, se prefirió transformarlo en clorhidrato de PBG, que es más estable que la base libre.

Para este fin, se disolvió el material crudo en CLH 2 N (1ml por cada 50 mg) y se calentó unos minutos a 45-50°C; se filtró rápidamente por embudo de clavo, para eliminar las impurezas y el filtrado se enfrió bruscamente con hielo y sal, obteniéndose agujas casi incoloras que se lavaron con CLH 2 N frío y acetona.

En las figuras Nros. 6 y 7, se pueden observar fotografías de los cristales de PBG y su correspondiente clorhidrato.

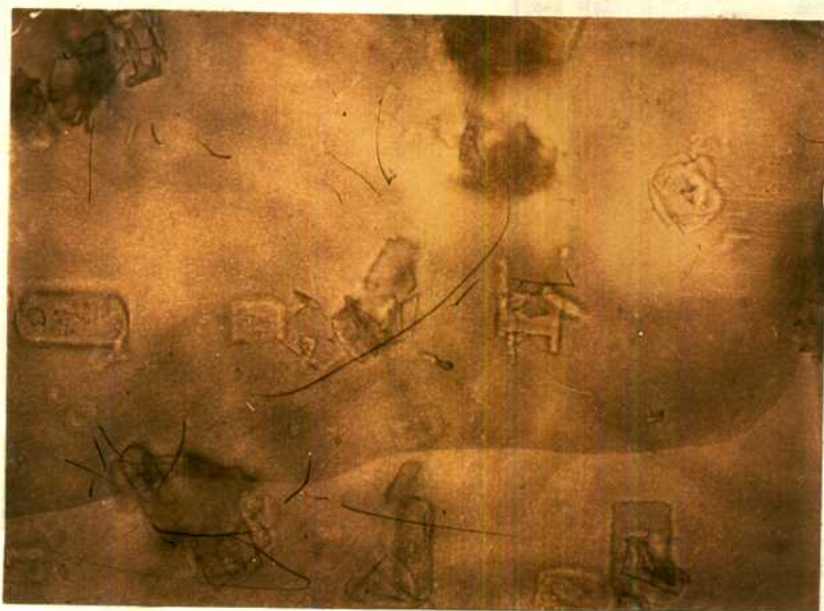


Figura N° 6
Cristales de por-
fobilinógeno.



Figura N° 7
Cristales de clo-
rhidrato de por-
fobilinógeno.

La estabilidad del segundo compuesto, es mayor que la del primero, pero también se altera con el tiempo. Lo aconsejable, es guardarlo al vacío y a baja temperatura.

Cookson y Rimington (24) obtienen un rendimiento de alrededor del 60% de PBG. En las repetidas experiencias se han logrado aislar cantidades del orden del 40 - 50% de lo teórico según la técnica de Mauzerall y Granick (28).

Estudios sobre identificación y valoración del PBG

Aquí se describen las diferentes técnicas que han debido ser utilizadas, tanto para identificar el PBG cristalino, como para valorar dicha sustancia en soluciones puras y orina humana, de ratas y conejos.

Criterios de identificación de PBG

La forma cristalina observada al microscopio, sirvió como primer criterio de identificación. Al no poseer ninguna de las dos sustancias, un punto de fusión determinado, ésta no era forma práctica de reconocimiento. Westall (9) dice que los cristales de PBG se oscurecen entre 120-130°C y se descomponen a 175-180°C, mientras que el clorhidrato se descompone a 165-170°C. A pesar de esto, y mediante la utilización de un aparato para micropunto de fusión con calentamiento eléctrico, se hicieron estas determinaciones con el material obtenido de la orina porfírica, observándose que el PBG se oscureció entre los 115 y los 140°C, mientras que la descomposición se observó entre los 175 y 180°C. El punto de descomposición del clorhidrato, coincidió con el de la literatura.

Cromatografía en papel de PBG

En base a los métodos cromatográficos descritos por Westall, Cookson & Rimington y Mauzerall & Granick (9,24, 28), se utilizó este criterio de identificación para soluciones de PBG o clorhidrato de PBG, aislados de orina porfírica y en eluidos de las columnas de resinas de intercambio iónico, que se emplearon para valorar PBG de orina y que se describen más adelante.

Se utilizó como solvente, la fase superior separada a 17°C de una mezcla de butanol, ácido acético, agua en la proporción 4:1:5 (v/v); el papel utilizado fue Whatman N° 1 y el tiempo de corrimiento, de 7 horas.

Se emplearon dos métodos diferentes de revelado; en uno de ellos, se pulverizó el papel con reactivo de Ehrlich hasta la aparición de una mancha roja, mientras que en el otro, se sometió la hoja cromatográfica a vapores de ácido acético durante 10 minutos; al cabo de ese tiempo, se pudo observar con una lámpara ultravioleta una fluorescencia roja, debida a uroporfirina formada, en el sitio donde corrió el PBG.

En todos los casos de una serie de cromatogramas, hechos en estas condiciones, el Rf fue de alrededor de 0,5, como señala la literatura.

Se intentó hacer correr orina porfirica directamente, pero no se tuvo éxito en el revelado.

Estudios relativos a la reacción de Ehrlich

Como ya se dijo oportunamente, diferentes autores probaron distintos tipos de reactivos de Ehrlich. Para esta serie de ensayos, se decidió utilizar fundamentalmente tres tipos de reactivos; el normal de Ehrlich, el modificado con ácido perclórico, descrito por Mauzerall & Granick(28) y uno con ácido acético, descrito por Rimington, Kroll & Töoth (27).

El primero de ellos, contiene 2% de pDMAB en ClH 6 N; para el segundo, se disuelve 1 g. de DMAB en alrededor de 30 ml de ácido acético glacial, se añaden 8 ml de ácido perclórico al 70% y la solución se diluye a 50 ml con ácido acético. El tercero, está compuesto de 15 g. de DMAB disueltos en 65,6 ml de ClH concentrado y 194,4 ml de ácido acético glacial.

Con estos tres reactivos, se determinó la relación entre la densidad óptica y el tiempo, obteniéndose los resultados que muestra la figura N° 8.

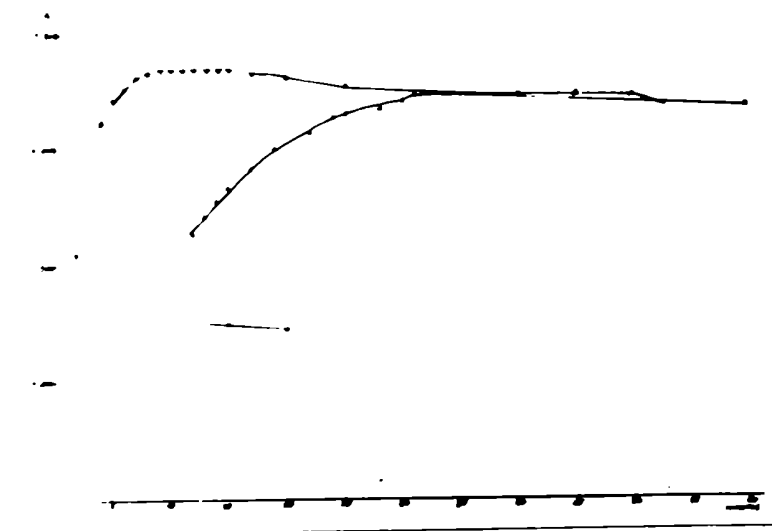


Figura N° 8: ... : Reactivo normal de Ehrlich

△△△: Reactivo de Ehrlich modificado con ácido perclórico 2 N. xxx: Reactivo de Ehrlich recomendado por Rimington, Kroll & Töoth.

Curva de absorción

Es espectro de absorción, por ser característico de una determinada sustancia, sirve también como criterio de identificación y también nos indica la longitud de onda más adecuada para efectuar las mediciones en caso de tener que usar esta reacción como método cuantitativo de valoración de PBG.

El espectro de absorción de la reacción PBG más DMAB, tiene dos máximos de absorción uno a 522 m μ y otro a 555 m μ . Este último, que es el mayor de los dos, es el que se utiliza para las determinaciones cuantitativas de PBG.

Se reprodujo este espectro utilizando clorhidrato de PBG cristalino aislado de orina porfírica, en disolución adecuada y con el reactivo de Ehrlich, recomendado por Rimington y colaboradores, obteniéndose un resultado plenamente coincidentes con los descritos por otros autores, como lo muestra la figura N $^{\circ}$. 9

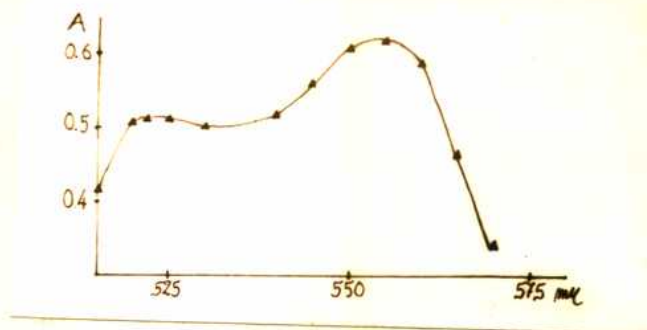


Figura N $^{\circ}$ 9: Curva de absorción de la reacción de Ehrlich con el PBG

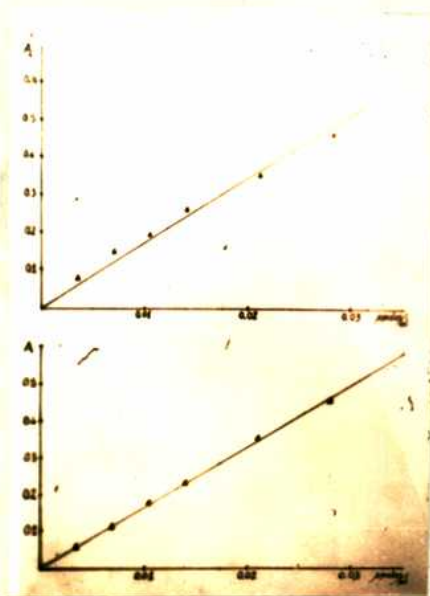
Determinación de los coeficientes de extinción molar específica

Como método de control para las posteriores determinaciones de PBG en orina de los animales sometidos a la porfiria experimental y como un criterio más de pureza para el producto aislado de orina porfírica, se procedió a la determinación de los coeficientes de extinción molar específica con los tres reactivos descritos anteriormente.

Para tal fin, se hicieron diluciones apropiadas de clorhidrato de PBG para poder hacer una representación gráfica de densidad óptica en función

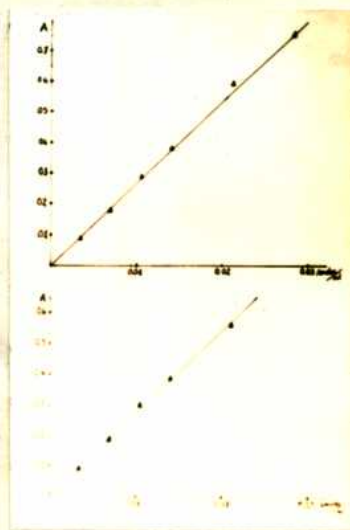
de concentración. Una vez obtenido los puntos representativos, para el trazado de la recta se utilizó el procedimiento matemático de los cuadrados mínimos. Las representaciones gráficas se encuentran en las figuras N°s. 10 y 11.

Figura N°. 10



Arriba: Reactivo de Ehrlich normal
(determinación con "Spectronic")
Abajo: Idem (det. con "Beckman")

Figura N°. 11



Arriba: Reactivo recomendado por Rimmington.
Abajo: Reactivo de Ehrlich modificado (ambas determinaciones con "Beckman")

Las determinaciones superiores a 0,6 de densidad óptica, no se tuvieron en cuenta, pues ya no cumplen la Ley de Beer.

Con estos datos, se procedió a calcular los coeficientes de extinción molar específica de esta reacción, con los tres tipos diferentes de reactivo. Todas las determinaciones se hicieron a 555 $m\mu$ de longitud de onda. Los resultados están expuestos comparativamente con los de la literatura en la tabla N°. 1.

TABLA N° 1.

Reactivos utilizados	Instrumental utilizado	Datos de la literatura	Datos experimentales
Reactivo normal de Ehrlich	Beckman "DU"	36.000	33.100
Reactivo normal de Ehrlich	Spectronic "20"	---	34.800
Reactivo de Ehrlich modificado con ácido perclórico 2N	Beckman "DU"	61.000	54.200
Reactivo de Ehrlich recomendado por Rimington y colaboradores.	Beckman "DU"	53.640	53.800

En esta experiencia, se utilizó un espectrofotómetro Beckman modelo "DU" y un fotocolorímetro Spectronic "20". Las mediciones realizadas en este último, no son tan precisas como las realizadas en el primero; pero al tener que efectuar series de mediciones, resulta más práctico utilizar el Spectronic.

En cuanto a los reactivos, por razones de mejor conservación, se prefirió utilizar para las series de mediciones el reactivo normal de Ehrlich, pues los otros dos deben ser preparados en el momento de ser utilizados, por su inestabilidad.

Método de valoración de PBG en orina mediante el uso de resinas de intercambio iónico.

Descripción del método

Con el objeto de poder valorar el PBG y el \int AL presentes en orinas de pacientes porfíricos, con un mínimo de error y sobre todo en los casos en que había poca cantidad de estos compuestos, Mauzerall y Granick (28) idearon un método usando columnas de resinas de intercambio iónico.

En este, trabajo, se utilizó el método ya referido para las determinaciones de \int AL y PBG, con el objeto de hacer un estudio más completo de la porfiria experimental en ratas y conejos, como ya se dijo en la introducción.

Antes de la aplicación del método, se hicieron algunos ensayos previos, tales como curva de "breack through" (saturación), curva de elución y

pruebas de recuperación.

La descripción detallada de la valoración de $\int AL$, figurará en el trabajo de tesis del Licenciado Emilio Rivas.

El método consistió en hacer pasar orina a través de una columna de resina Dowex 2, en su forma acetato, de tal modo el PBG quedó retenido en la columna, mientras que la urea y el $\int AL$ pasaron a través de ella. Luego el PBG se eluyó con ácido acético y determinó colorimétricamente con el reactivo de Ehrlich. Los eluidos de la primera columna, se hicieron pasar a través de otra columna con resina Dowex 50, en su forma ácida. Aquí se retuvo el $\int AL$, dejando pasar la urea.

El $\int AL$ se eluyó con acetato de sodio y se hizo reaccionar luego con acetyl acetona o ácido acetyl acético, para formar un pirrol que también reaccionó con el reactivo de Ehrlich.

La absorción y la elución de estas resinas tiene por objeto eliminar las sustancias interferentes, como por ejemplo el mesobilirrubinógeno, que se absorbe en la resina Dowex 2, pero no se eluye con ácido acético.

Según los autores del método, la recuperación del PBG en la resina es de alrededor del 90%.

Aplicación del método

Como, por la índole del trabajo a realizar, era necesario hacer numerosa determinaciones tanto de PBG, como de $\int AL$, junto con el Licenciado Emilio Rivas ideamos un portacolumna de madera que permitía trabajar con doce columnas en forma simultánea; dicho porta-columna se puede observar en la figura Nro. 12.

El esquema de las columnas puede verse en la figura N°. 13, mientras que la figura N°. 14 muestra el procedimiento de "back wash" (lavado hacia atrás), que tenía por objeto el mejor ordenamiento de las partículas de resina.

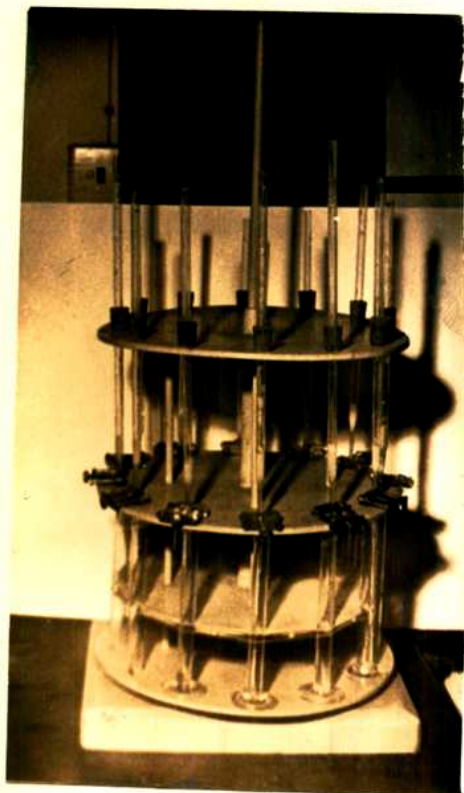


Figura N° 12
Portacolumna

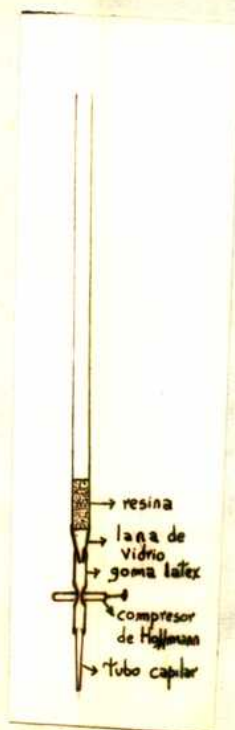


Figura N° 13
Columna

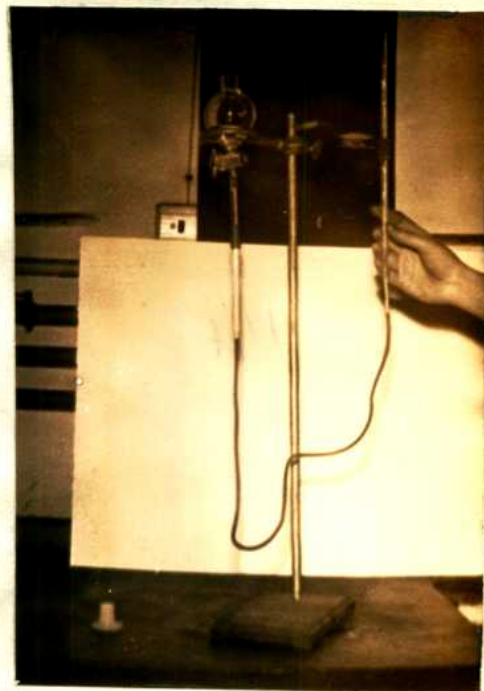


Figura N° 14
"Back wash"

Las características de la resina utilizada son las siguientes: Resina de intercambio aniónica Dowex 2-x8, de malla 20-50 (fue molida para llegar a malla 200-400 como indicaba la técnica), porosidad media, tipo estireno, amonio cuaternario reemplazada en forma de cloruro, con una capacidad total de $3,0 \pm 0,3$ miliequivalentes por gramo seco y una humedad del 35 al 41%.

El anión cloruro, se reemplazó por acetato, mediante el pasaje a través de la columna de acetato de sodio 3N, eliminando luego el exceso de acetato con agua. Se verificó la eliminación de cloruro, con acetato de sodio 3N, eliminando luego el exceso de acetato con agua. Se verificó la eliminación de cloruro, con acetato de plomo y la de acetato, con nitrato de plata.

Una vez que la columna de resina se encontraba en la forma acetato, se hacía pasar 1 ml de la orina en estudio y luego se añadían 4 ml de agua.

Este eluido se hacía pasar por la resina Dowex 50, para la posterior determinación de Ca^{2+} ; los detalles de esta operación estarán descriptos en la tesis del Licenciado Emilio Rivas.

Sin dejar secar la columna, el PBG se elufa con 2 ml. de ácido acético 0,1 M. Luego se llevaba a 10 ml. de volumen y se efectuaba la reacción colorimétrica en una parte alícuota a la que se añadía un volumen igual de reactivo de Ehrlich.

Se cuidó mucho la velocidad del flujo del líquido a través de la columna, manteniéndose en alrededor de 3 mil cada 10 minutos, pues con velocidades mayores se obtenían datos falsos.

Por otra parte, algunas orinas alcalinas, especialmente las de conejos, fue necesario lavarlas a un pH entre 5 y 7 con ácido acético pues sino la elución presentaba dificultades debido al intenso desprendimiento de gas.

En todas las determinaciones colorimétricas, se utilizó el reactivo normal de Ehrlich y un fotocolorímetro Spectronic "20".

Estudio experimental del comportamiento del PBG frente a la resina Dowex 2. de "breack through" (saturación).

Se intentó hacer esta representación, con el objeto de conocer qué cantidad de PBG podía retener esta columna de resina, sin que apareciera el punto de "breack through" (saturación). Como luego de ser absorbido 1 mg. de PBG, dicho punto no aparecía y como esa cantidad superaba ampliamente a la que se podía hallar en 1 ml. de orina porfirica, no tenía mayor interés práctico continuar con esta determinación y, por lo tanto, no se probó con cantidades mayores de PBG.

Curva de elución

El objeto de la determinación de esa curva, fue verificar en que fracción de los eluidos con ácido acético se detectaba la mayor parte del PBG y comprobar así mismo que en, las condiciones de la experiencia, se eluye practicamente la totalidad del PBG absorbido.

Se efectuaron curvas de elución con una solución de PBG puro y con orina porfirica, en la forma que muestra la figura N°. 15.

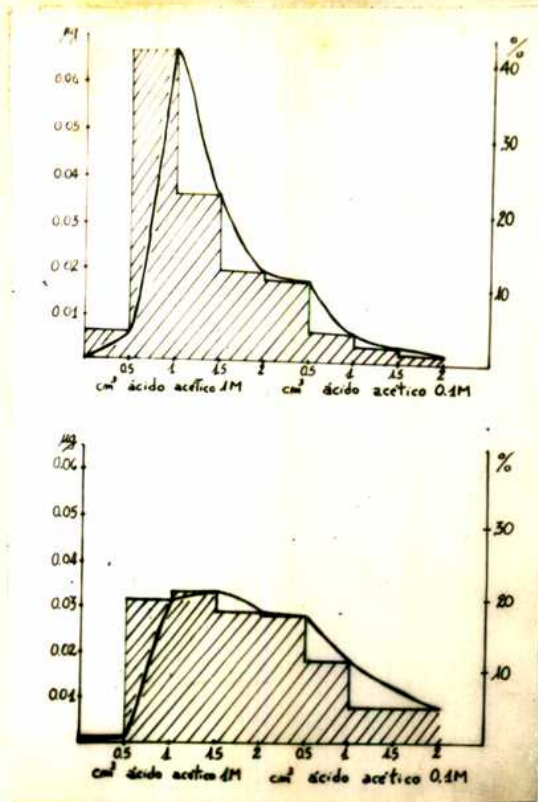


Figura N° 15 : Arriba elución con PBG puro; Abajo elución de orina porfirica.

Se pudo concluir que, absorbiendo PBG puro en solución, ya se eluye el 80 % del total con 2 ml. de ácido acético 1 M mientras que, absorbiendo PBG de orina en las mismas condiciones, se eluye solo el 63% del total; resultado que, en cierto modo, era lógico de esperar.

Ensayo de recuperación

Con el objeto de determinar la eficacia de las resinas de intercambio iónico en la absorción y elución de PBG, se efectuaron tres diferentes ensayos de recuperación.

En el primero de ellos, se utilizó solución acuosa de clorhidrato de PBG y se absorbió en la columna cantidades de este compuesto similares a las que aparecen en orinas patológicas. Luego de repetidos ensayos en estas condiciones, se obtuvieron recuperaciones del orden del 87 al 93%.

Otro ensayo consistió en añadir clorhidrato de PBG a orina normal, midiendo previamente en ella la pequeña cantidad que siempre hay de PBG. Los resultados obtenidos en este caso, dan recuperaciones del orden del

78 al 88 %.

Finalmente, se ensayó con orina patológica a la que se le añadió el clorhidrato de PBG, obteniéndose recuperaciones del orden de 88 al 91%.

Como se desprende de los resultados obtenidos, se ha comprobado una buena eficacia del método y de las resinas que fueron usadas en todas estas experiencias.

Hay que hacer notar que las valoraciones colorimétricas de los ensayos y curvas descritos anteriormente, también se hicieron utilizando un fotocolorímetro Spectronic "20".

- FIN DE LA SEGUNDA PARTE -

TERCERA PARTE

PORFIRIA EXPERIMENTAL.

En esta parte de la tesis, se describen los métodos utilizados para el estudio de las porfirinas y sus precursores, en orina y órganos de animales sometidos a la porfiria experimental, además de la orina de una paciente con porfiria aguda; excepto la descripción del método de valoración de PBG con resinas de intercambio iónico, que ya ha sido motivo de un estudio detallado en el capítulo anterior.

Figuran también aquí, los resultados obtenidos en estas experiencias; no así las conclusiones que se tratan en conjunto en la última parte del trabajo.

La mayoría de las experiencias descritas en este capítulo, han sido realizada en colaboración con el Licenciado Emilio Rivas.

Parte experimental.

Para el estudio de las porfirinas y sus precursores eliminadas por orina de animales sometidos a la porfiria experimental; se hicieron dos series de experiencias con seis animales cada una; una correspondió a conejos, tres tratados con Sedomid y tres tratados con A.I.A. y otra correspondió a ratas y fue hecha en forma similar.

Los conejos utilizados fueron en su mayoría blancos, de ambos sexos, de tres a cinco meses de edad, con un peso que oscilaba entre 1700 y 2700 gramos; mientras que las ratas fueron machos, de raza Wistar, de alrededor de 400 gramos de peso y tres meses de edad.

Las determinaciones de δ AL, PBG, copro- y uroporfirinas se hicieron en orina de 24 a 48 horas y, excepcionalmente, de 72 horas.

Tanto las ratas como los conejos fueron colocados en jaulas metabólicas, siendo alimentados, sin restricciones, antes y durante la experiencia con Forramex Lab.

En el caso de las ratas, se suministró AIA como solución acuosa, en concentraciones del orden de 24 mg. por ml. y en cantidades diarias de 200 a 400 mg. por Kg. de peso, por vía parenteral o intragástrica, según el caso; mientras que el Sedomid fue suministrado en forma de suspensión acuosa, homogeneizado con "Tween 80", en concentraciones del orden de 50 mg. por ml. y

en cantidades diarias de 250 a 500 mg. por Kg. de peso.

En los conejos, ambas drogas fueron suministradas en cápsulas de gelatina por vía intragástrica, en dosis diaria de 150 a 200 mg. por Kg de peso.

Se probó en algunas ratas, el efecto que producía la administración de glicocola, ácido succínico y otros cofactores sobre la excreción de porfirinas y precursores, considerando que ambos intervienen en la biosíntesis de PBG y porfirinas. Para ello, se inyectó a los animales una dosis diaria de 50 micro moles de ácido succínico, 50 micro moles de glicocola, 1 micro mol de ácido pantoténico, 0,25 micro moles de piridoxal, 5 micro moles de ATP y 5 micro moles de Cl_2Mg , todo disuelto en una solución tampón de fosfatos de pH 7,3.

Para las determinaciones de isómeros de porfirinas en orina y en los estudios realizados en órganos, se utilizaron otras series de animales que fueron sometidos a porfiria experimental de la misma manera.

Método de dosaje de porfirinas en porfiria experimental

Como se tenía la intención de hacer frecuentes dosajes de las dos principales fracciones de porfirinas que se excretan por orina (o sea: las solubles en éter que incluye fundamentalmente a las coproporfirinas y las insolubles en éter, que comprende a las uroporfirinas y porfirinas de 7 carboxilos), se utilizó el método de Schwartz, Zieve y Watson (73), que describe fundamentalmente la extracción de la fracción "copro" para su dosaje y la separación de la fracción "uro" con solución de acetato de sodio. Para poder dosar esta última fracción se adoptaron técnicas descritas por Dressel y Tooth (74) y algunos otros autores.

Esta última variante del método, se consideró aplicable debido a que las uroporfirinas excretadas por orina en casos de porfiria aguda humana o experimental, nunca pueden llegar a valores muy altos, como pueden ser los obtenidos en algunos casos de porfiria cutánea tarda.

Una amplia discusión sobre la determinación más minuciosa de uroporfirinas, se puede encontrar en un trabajo de Dressel, Rimington & Tooth (75).

El método aplicado en este trabajo consistía en los siguientes: A 1; 2 o 5 ml. de orina, según fuera la intensidad de la fluorescencia roja que

presenta la orina a la luz ultravioleta, se añadía el mismo volumen de una solución tampón, compuesta de cuatro partes de ácido acético glacial y una parte de solución de acetato de sodio saturado. Luego, se agregaba el mismo volumen de agua y se extraían las porfirinas con un exceso de acetato de etilo para evitar posibles emulsiones. Posteriormente, se extraía la fracción "uro" del acetato de etilo, lavándolo con dos o tres porciones de solución de acetato de sodio al 1%.

Si la cantidad de porfirinas era muy grande, se juntaba la primera fracción acuosa con las del acetato de sodio y se hacía una nueva extracción con acetato de etilo, para recuperar la "copro" que pudiera haber pasado.

De este modo, se tenían ya separadas las dos fracciones: "uro", en acetato de sodio y "copro", en acetato de etilo. La primera de ellas, se llevaba a pH 3-3,2 con ácido acético y luego se extraía la "uro", con acetato de etilo. Posteriormente, se trataba con una solución de iodo al 0,005% para oxidar los posibles porfirinógenos. Finalmente, se hacían extracciones de ClH 10% (3 N), hasta desaparición de la fluorescencia.

A la otra fracción, o sea la "copro", también se la oxidaba con iodo, como la anterior; posteriormente, se hacía la extracción con ClH 5%(1,5 N), también hasta fluorescencia negativa.

De tal modo, se tenían las dos fracciones en ClH, adoptándose para su dosaje métodos espectrofotométricos, utilizando los coeficientes de extinción específica determinados por Salum, Batlle & Grinstein (78).

Identificación de porfirinas excretadas por orina.

Para la identificación de porfirinas excretadas por orina, se siguieron fundamentalmente las técnicas del laboratorio de Watson, con algunas modificaciones aconsejadas por las circunstancias.

En el caso de las ratas, que fué la primera serie de experiencias de este tipo, se siguió un camino un poco indirecto, pues de un "pool" de orina de ratas sometidas a la porfiria experimental, se extrajeron las porfirinas con acetato de etilo.

De este solvente, luego de una oxidación con iodo, se separó el conjunto de porfirinas mediante sucesivas extracciones con ClH 3N.

Una vez llevadas esta última solución a Ph 3-3,2 con acetato de sodio saturado se procedió a absorber las porfirinas con talco, hasta desaparición en el sobrenadante de las bandas de absorción características que presentaban en la observación espectroscópica.

Luego, se extrajeron del talco suspendiéndolo en sucesivas porciones de una solución de 19 partes de metanol y una parte de SO_4H_2 que, simultáneamente las esterifica.

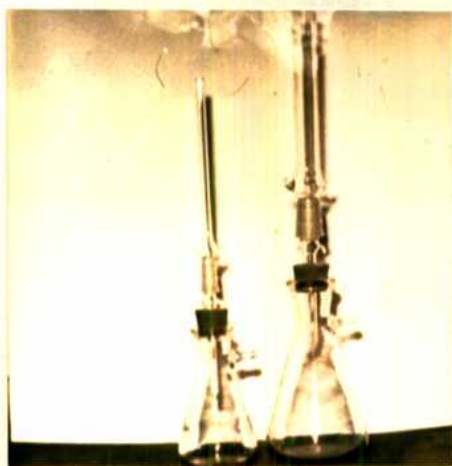
Después de estacionar esta solución durante 48 horas para conseguir una buena esterificación, las porfirinas se pasaron a cloroformo, agregando un exceso de agua para eliminar el metanol; luego, se lavó dos veces con agua la capa clorofórmica, una con NH_4OH al 10%, nuevamente con agua y, finalmente, con solución de ClNa al 7%. para evitar las emulsiones, se filtró a través de un papel embebido en cloroformo y se concentró casi a sequedad, por medios de una destilación al vacío. En estas condiciones, las porfirinas pueden ser sometidas a procesos cromatográficos.

Para una separación primaria de los distintos tipos de porfirinas, se adoptó el método de la cromatografía en columna que, primitivamente ideado por Tswett fue aplicado a las porfirinas en el laboratorio de Watson.

Este método cromatográfico con CO_3Ca , de muy frecuente uso en nuestro laboratorio, se haya descrito en un trabajo de Grinstein (37). En la figura N° 16 pueden observarse dos columnas cromatográficas de diferentes medidas.

Figura N° 16

Columnas cromatográficas



Según el tipo de porfirinas que se sospechaba tener en los extractos, se usaron diferentes tipos de solventes para su absorción y desarrollo en la columna cromatográfica.

Las porfirinas de menor número de carboxilos, corren más rápidamente y, por lo tanto, fue necesario utilizar benceno y, en algunos casos, éter de petróleo para absorberlas, pero a una temperatura de alrededor de 40 a 50°C, debido a la poca solubilidad de estas porfirinas en ellos. Los solventes de desarrollo, eran distintas mezclas de cloroformo benceno, aumentando la proporción del primero de ellos cuanto mayor era el número de carboxilos en las porfirinas.

Cada fracción separada del cromatograma se sometió, si era necesario, a recromatografías hasta obtención de banda única y poder, de ese modo, cristalizar de metanol los correspondientes ésteres de porfirinas, determinando así sus formas cristalinas y puntos de fusión o, de lo contrario, se sometieron las fracciones a la cromatografía en papel, que permite una más exacta identificación.

Cromatografía en papel de ésteres de porfirinas.

Para la cromatografía en papel de ésteres de porfirinas, se utilizó el método descrito por Falk y Benson (79), con algunas modificaciones, sobre todo en su aplicación cuantitativa, que fueron efectuadas por Batlle y Grimpstein (80) en este mismo laboratorio.

Esta cromatografía consiste en hacer correr los ésteres de porfirinas en tiras cromatográficas de papel Whatman N°. 1, primero con un solvente compuesto de 4 partes de kerosene, fracción destilada sobre cloruro de calcio entre 190 y 250°C, y 6 partes de cloroformo etanólico al 1% durante 15 minutos, para eliminar las impurezas, en una cuba saturada previamente con cloroformo.

Luego de eliminar las impurezas, cortando el extremo inferior de la tira cromatográfica, previo secado del papel y marcado de las manchas, se procedió a hacer correr las muestras en el segundo solvente, compuesto de 4 partes de kerosene similar al anterior y dos partes de dioxano.

En poco más de dos horas, al frente corre unos 20 cm. y se puede revelar el cromatograma empleando la luz ultravioleta.

Para adoptar el método cromatográfico en forma cuantitativa, fue necesario cargar la solución clorofórmica de los ésteres de porfirinas, cuya concentración era conocida mediante una medición previa en el espectrofotómetro, en la tira cromatográfica con una micropipeta graduada que permitía conocer la cantidad de porfirinas agregadas. En una línea de 5 cm., se cargaron alrededor de 8 μ g de porfirinas en cada tira cromatográfica.

Una vez revelado el cromatograma con la luz ultravioleta, se cortaron las manchas de cada porfirina, identificada mediante los testigos, y se eluyeron con una cantidad conocida de cloroformo; de este modo, haciendo uso del espectrofotómetro, se determinó la proporción de cada porfirina en la mezcla.

Se utilizaron testigos de uroporfirina I (aislada de orina de pacientes con porfiria cutánea tarda), uroporfirina III (aislada de turacina), firiaporfirina III de origen similar a la uroporfirina I), coproporfirina III (aislada de orina de pacientes con saturnismo) y protoporfirina 9 (aislada de glóbulos rojos), gentilmente cedidos por la Licenciada Alcira Batlle. Con respecto a los coeficientes de extinción, se usaron los que figuran en el trabajo de Salum, Batlle y Grinstein (78). Las supuestas porfirinas de 6; 5 y 3 carboxilos, se dedujeron por la posición en el cromatograma. Asimismo, en muchos casos fue necesario utilizar coeficientes de extinción estimativos promedios, como por ejemplo en el caso de las mezclas o de los ésteres de porfirinas recientemente citados.

Como se puede ver en la descripción de este método, éste no tuvo por objeto determinar la cantidad de los distintos tipos de porfirinas en estudio, sino simplemente estimar las proporciones de cada una de ellas y con ese fin se utilizó.

Las recuperaciones, o sea la relación entre la suma de las distintas fracciones cortadas y eluidas con cloroformo, con respecto a la cantidad cargada en la tira cromatográfica, fue variable; pero, en la mayoría de los casos, osciló entre el 80 y el 95%.

Cromatografía en papel de porfirinas libres.

En el curso de la identificación de las distintas porfirinas excretadas por orina, se utilizó también, aunque no con tanta frecuencia como el método anteriormente descrito, la técnica cromatográfica en papel para porfirinas

libres de Nicholas & Rimington (81) modificada por Ericksen (82) y puesta a punto por Batlle, en nuestro laboratorio.

Esta cromatografía, consiste en hacer correr en una cuba saturada con NH_4OH , porfirinas libres disueltas en NH_4OH 2 N sobre papel Whatman N° 1 y con un sistema de solventes consistentes en 3,5 partes de agua y 7 partes de 2-6 lutidina, en la oscuridad y durante cerca de 14 horas.

Este método, permite la diferenciación más o menos clara, según sean las proporciones, de coproporfirina I y III.

Descarboxilación de uroporfirinas.

Esta técnica tiene como fin la identificación o confirmación, según el caso, del tipo isomérico de las uroporfirinas, pues las coproporfirinas obtenidas se cromatografían por el método descripto anteriormente.

Para poder descarboxilarlos, los ésteres de porfirinas se llevaron a sequedad en un tubo de descarboxilación de Carius, al que se añadió luego ClH 1 % (0,3 N). Luego se hizo el vacío y se cerraron los tubos a la llama, sometiéndolos a un calentamiento de 180°C durante 4 horas. La etapa siguiente consistió en eliminar el ClH mediante vacío. Posteriormente, las porfirinas descarboxiladas fueron esterificadas y llevadas a cloroformo por métodos ya descriptos, para la ulterior purificación por columnas de CO_3Ca . Finalmente, para poder hacer la cromatografía de porfirinas libre fue necesario hacer una nueva saponificación.

Aislamiento de porfirinas de órganos.

Para este trabajo se recurrió a un método de Schwartz e Ikeda (53), al que fue necesario aplicarle algunas modificaciones para el fin que se perseguía.

El método consistió fundamentalmente en tratar los tejidos, con una mezcla de acetato de etilo (4 partes), y ácido acético (1 parte), en sucesivas porciones para lograr una buena extracción.

Esta solución se trató con acetato de sodio al 3%, que eliminó la acidez y extrajo las uroporfirinas, las que fueron tratadas en la forma que se describió para la orina.

Las coproporfirinas restantes, extraídas con acetato de etilo, también

sufrieron el mismo tratamiento que en el caso de la orina.

Como interesaba hacer una identificación del tipo de porfirinas existentes, se eliminó el ácido acético de la mezcla mediante sucesivos lavados con agua y luego, rápidamente, se extrajo el conjunto de porfirinas con varias porciones de ClH 10%. Las porfirinas disueltas en ClH, se llevaron a pH 3-3, 2 y se absorbieron con talco. De aquí en adelante, la identificación se hizo por técnicas ya descritas en este trabajo.

Estos procedimientos fueron aplicados a hígado y riñones de animales sometidos a la porfiria experimental.

Para estudiar las porfirinas presentes en la glándula de Harder (83) de las ratas, se procedió a extraerlas y, simultáneamente, a esterificarlas mediante la mezcla de metanol-SO₄H₂, ya descrita anteriormente; de esta manera, se evitó el camino indirecto que es necesario seguir para obtener ésteres de porfirinas. Para ello se trataron las glándulas con sucesivas porciones de metanol-SO₄H₂ (19:1), hasta que desapareció la fluorescencia roja de la glándula frente a la luz ultravioleta.

El extracto, luego de ser filtrado o centrifugado, se dejó 48 horas en la oscuridad para la total esterificación de las porfirinas. Los procesos que siguen, ya han sido descritos anteriormente en este mismo trabajo.

RESULTADOS OBTENIDOS

En las figuras 17 y 18 se exponen los resultados más representativos de las de terminaciones de δ AL, PBG, uro y coproporfirinas, realizados en orina de ratas y conejos, antes y durante la porfiria experimental.

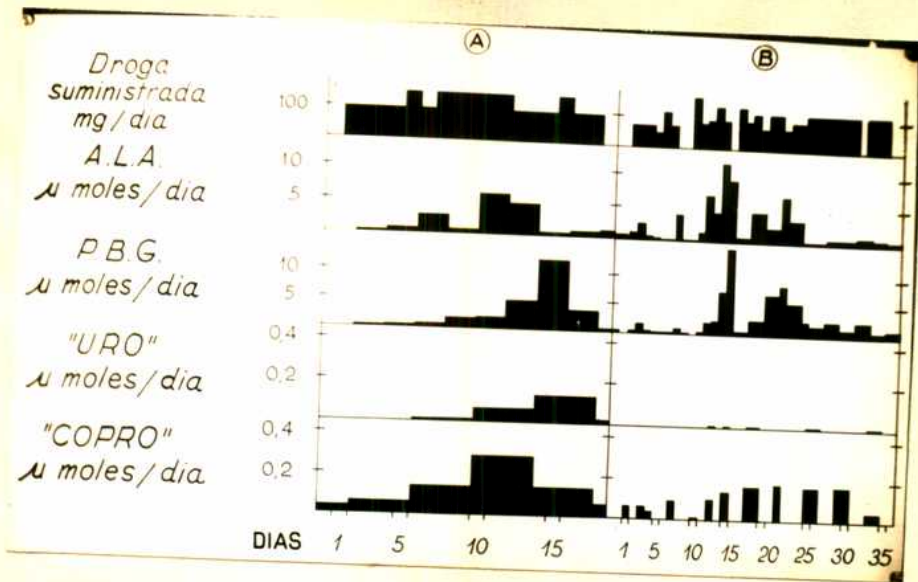


Figura N° 17

SAL, PBG y porfirinas excretadas por orina de ratas tratadas con A: Sedormid; B: AIA.

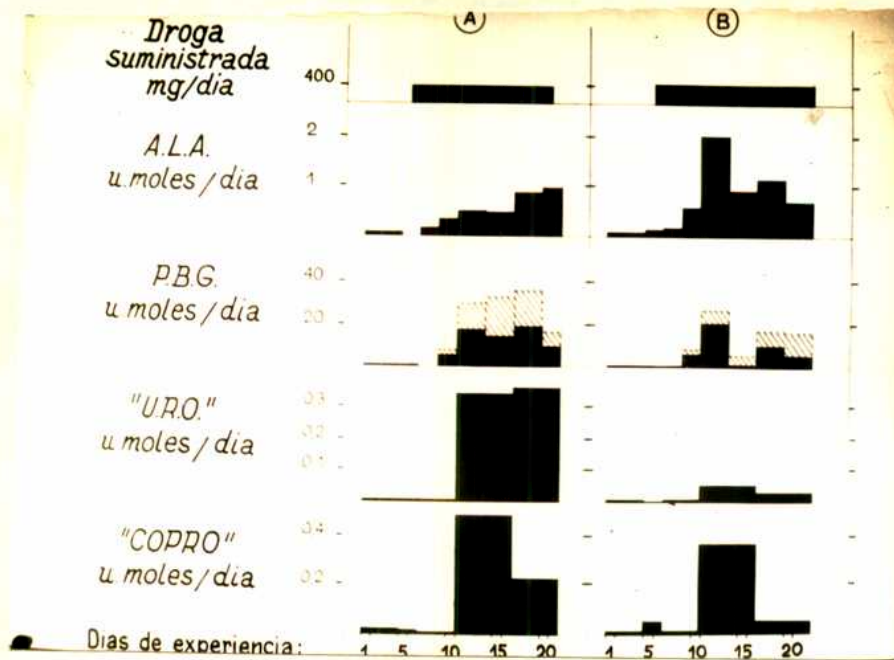


Figura N° 18

SAL, PBG y porfirinas excretadas por orina de conejos tratados con: A Sedormid; B: AIA. El rayado del cuadro de PBG corresponde al dosaje directo por dilución de la orina. Método de Vahlquist (6) aplicado también por Maurerall & Granick (28).

Se observan aumentos de SAL al segundo día de iniciadas las ingestión de droga, los que se acéntúan en el sexto día para las ratas y noveno o décimo día para los conejos. Hacemos notar que los aumentos registrados en las ratas, son mucho más pronunciados que en los conejos. Resultados similares

se observaron para PBG, constatándose por lo general, que los aumentos más pronunciados aparecen en el octavo o noveno días en las ratas y décimo primero o decimosegundo día en los conejos. En las ratas, se observa con frecuencia que los máximos de excreción de δ AL, preceden a los de PBG.

La identificación cromatográfica en papel de dichos precursores, coincidió con los Rf de las sustancias patrón.

Con respecto a las porfirinas, se observan aumentos significativos de copro- y en menor cantidad de uroporfirinas en las ratas; mientras que en los conejos, se notan aumentos similares en la excreción de ambas porfirinas. Los valores de uroporfirina registrados en esta experiencia, son muy inferiores a los de los trabajos citados oportunamente. En dichos trabajos gran parte de las uroporfirinas dosadas, son sintetizadas "in vitro" por el precalentamiento de la orina acidificada.

TABLA N° 2

PORFIRINAS Y PRECURSORES EXCRETADOS POR ORINA

VALORES NORMALES

	δ AL			PBG			"URO"		"COPRO"	
	μ g por día	μ mol por día	μ mol equiv p/día	μ g por día	μ mol por día	μ mol equiv p/día	μ g por día	μ mol por día	μ g por día	μ mol por día
RATAS	18	0,14	0,02	27	0,12	0,03	0	0,00	37	0,05
CONEJOS	22	0,17	0,02	18	0,08	0,02	9	0,01	29	0,04

VALORES MAXIMOS

RATA		DRO GA.									
1	Δ IA	2.750	21,10	2,64	4.760	20,77	5,18	0	0,00	98	0,15
2	Δ IA	1.650	12,60	1,57	3.400	15,47	3,86	0	0,00	118	0,18
3	Δ IA	210	1,38	0,17	190	0,84	0,21	18	0,02	89	0,12
4	Δ IA	200	1,54	0,19	200	0,67	0,17	26	0,03	90	0,13
5	Sed.	750	5,85	0,73	1.280	5,76	1,44	89	0,10	190	0,30
6	Sed.	800	6,16	0,77	1.400	6,20	1,55	350	0,39	125	0,19
CONEJO.											
1	Sed.	140	1,07	0,13	4.000	17,40	4,35	85	0,10	75	0,12
2	Sed.	290	2,30	0,28	5.600	24,60	6,15	200	0,24	165	0,26
3	Sed.	150	1,00	0,12	4.400	18,20	4,55	300	0,36	325	0,48
4	Δ IA	900	7,00	0,87	29.000	130,00	32,50	670	0,80	330	0,48
5	Δ IA	230	1,90	0,24	4.800	21,10	5,30	40	0,06	235	0,37
6	Δ IA	240	1,90	0,24	8.000	35,40	8,85	150	0,18	290	0,44
CASO HUMANO											
		108mg	825	106	366mg	1,620	405	300	0,36	1.300	2.00

ACLARACION: Los valores normales de ratas y conejos corresponden a promedios de nuestras determinaciones. Haeger (84) en 1960 da como valores normales de excreción de δ AL en humanos 3 mg. por día y para PBG 1 mg. por día. Distintos investigadores dan como excreción normal de uroporfirina en humanos: 15 μ g por día y para coproporfirina: de 100 a 300 μ g diarios.

En la tabla N° 2 están expuestos los valores normales de porfirinas y precursores de porfirinas, en ratas y conejos, así como los máximos de excreción urinaria de δ AL, PBG y porfirinas observados en el transcurso de la experiencia. Para facilitar la comparación entre estos datos, los precursores se expresan también en sus equivalentes de porfirinas, teniendo en cuenta que una molécula de esta última equivale a 8 moléculas de δ AL y 4 de PBG. En la misma tabla figuran los máximos de excreción correspondientes a la orina del caso humano.

El análisis de los datos consignados, demuestra que la excreción de precursores es mucho mayor que la de porfirinas y, dentro de ellos, predomina el PBG. Un fenómeno similar se observa en el caso humano, lo que confirmaría una similitud ya señalada por otros autores.

En la tabla N° 3 se pueden observar los resultados comparativos de PBG, uro- y coproporfirinas obtenidos en los distintos laboratorios y por nosotros, en ratas y conejos; se consideran los valores máximos en cada caso.

TABLA N° 3

Laboratorio de investig.	Animales de experim.	PBG mg/día	"URO" μ g/día	"COPRO" μ g/día
Watson	Conejos		13.500x	450
Aldrich	Ratas		110	150
			1.500x	
Rimington	Conejos	110xx	18.500x	340
	Ratas	6xx	---	52
Grinstein	Conejos	29	670	350
	Ratas	3	xxx	190

ACLARACION: x: Orina precalentada y acidificada; xx: Método de Vahlquist; xxx: Sólo registramos un caso de 450 μ g por día. Indica solo reacción cualitativa.

L La figura N° 20 muestra un resultado similar al de las figuras 17 y 18, pero en ella aparece el efecto producido por el suministro de cofactores a una rata sometida porfiria experimental. Durante el período en el que se le

suministraron cofactores, se observó un descenso en la excreción de precursores y porfirinas.

Sin embargo, con otros animales se obtuvieron algunos resultados un poco contradictorios.

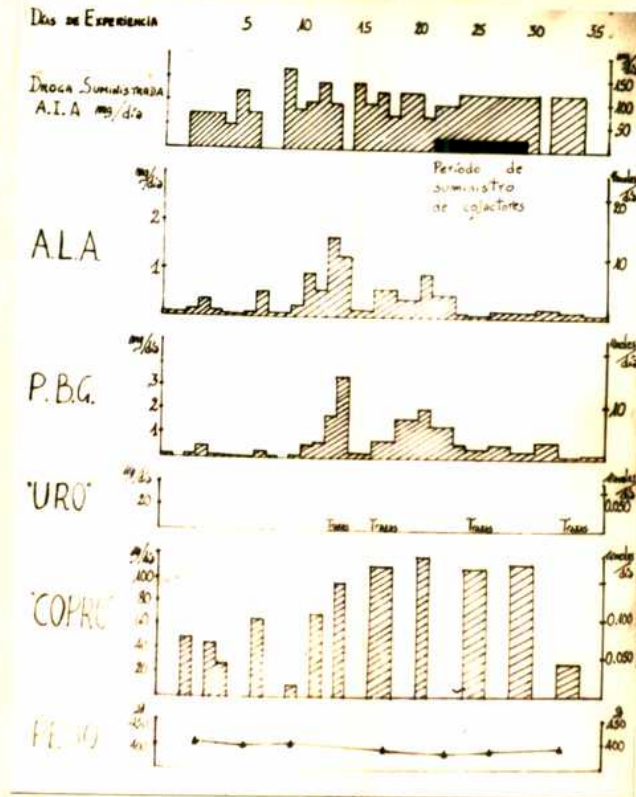


Figura No 20: Efecto de los cofactores.

El cuadro clínico, no mostró mayores diferencias con el que observaron los investigadores ya citados; sin embargo, la pérdida gradual de peso fue bien notoria en las ratas, pero no en los conejos. Además, conviene hacer notar que en los animales muertos espontáneamente o sacrificados, se observó un gran aumento del tamaño del hígado.

Se hizo un estudio cualitativo del tipo de porfirinas que se excretaron en orina de ratas durante la porfiria experimental, extrayéndolas con acetato de etilo y ClH , con una posterior adsorción en talco y esterificación con metanol- SO_4H_2 , por los métodos ya descriptos.

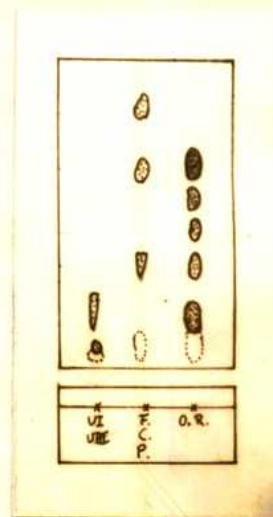


Figura No 21

- UI: Uroporfirina I
- UIII: Uroporfirina III
- F: Firiaporfirina III
- C: Coproporfirina
- P: Protoporfirina IX
- O: R. Esteres de porfirinas de orina de ratas

La identificación se hizo mediante la cromatografía de Falk y Benson, (79) obteniéndose manchas correspondientes a uroporfirina I, uroporfirina III, firiaporfirina III y coproporfirinas, en una corrida simultánea con testigos de estos compuestos.

También aparecieron manchas entre firiaporfirina y coproporfirina, con Rf que, muy probablemente, correspondan a porfirinas de 6 y 5 carboxilos, como puede verse en la figura 21.

En la orina de los conejos y la humana, por contar con mayor volumen, se efectuó directamente la absorción de las porfirinas con talco, previo ajuste del pH a 3-3,2, siguiendo luego con las técnicas ya explicadas para la obtención de ésteres de porfirinas.

En este caso, se determinó la proporción de cada tipo de porfirinas mediante el método de cromatografía en papel de Falk y Benson, modificado para su uso cuantitativo.

En la figura N° 22 y en la tabla N° 4 se indica el proceso seguido para calcular distintas proporciones de porfirinas, mediante columnas cromatográficas de carbonato de calcio y cromatografía en papel cuantitativa, en el caso de la orina humana.

Las proporciones finales de este caso, como las de la orina de los conejos al comienzo y avanzada la porfiria, figuran en la tabla N°. 5.

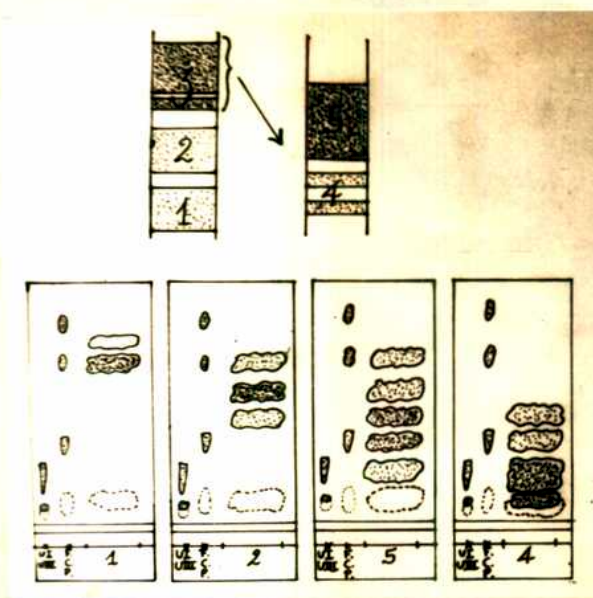


Figura N° 22:Valen aclaraciones de la figura N° 21

TABLA N° 4

Fracción	Porcentaje sobre el total de porfirinas de la fracción 1, 2 ó 3	Porcentaje de cada porfirina en las fracciones 1 ó 2	Fracción	Porcentaje en la fracción N° 3	Porcentaje de las fracciones 4 y 5 sobre el total de porfirinas	Porcentaje de cada porfirina en la fracción 4 ó 5	Porcentaje de cada porfirina en el total
1	22,2	C:91,5 T: 8,5					C:20,3 T: 1,9
2	17,7	C:29,0 P:43,5 H:27,6					C':5,14 P: 7,7 H: 5,47
3	60,1		4	6,6	3,9	UIII:18,2 F :22,2 H' :28,4 P' :17,6 C'' :13,6	UIII:0,71 F :0,86 H' :1,1 P' :0,69 C'' :0,53
			5	93,4	56,2	UI :39,9 UIII':37,8 F' :13,4 H'' : 9,1	UI :22,4 UIII':21,2 F' : 7,5 H'' : 5,1

ACLARACION:C: Coproporfirina en la fracción 1; T: Porfirina tricarboxílica en la fracción 1; C': Coproporfirina en la fracción 2; P: Porfirina pentacarboxílica en la fracción 2; H: Porfirina hexacarboxílica en la fracción 2; UIII: Uroporfirina III en la fracción 4; F: Firiaporfirina III en la fracción 4; H': Porfirina hexacarboxílica en la fracción 4; P': Porfirina pentacarboxílica en la fracción 4; C'': Coproporfirina en la fracción 4; UI: Uroporfirina I en la fracción 5; UIII': Uroporfirina III en la fracción 5; F': Firiaporfirina III en la fracción 5; H'': Porfirina hexacarboxílica en la fracción 5.

TABLA N° 5

CANTIDADES RELATIVAS DE PORFIRINAS AISLADAS DE ORINA DE CONEJOS Y HUMANA.

Porfirinas	Orina de conejos Estado % inicial	porfíricos estado % avanzado	Orina humana Porfirina % aguda
"Protoporfirina"	3,5	1,0	—
"Tricarboxílicas"	1,3	1,3	2,0
"Coproporfirinas"	45,0	11,0	26,0
"Pentacarboxílicas"	12,9	6,4	8,0
"Hexacarboxílicas"	6,7	3,2	12,0
"Firiaporfirina III"	10,9	9,2	8,0
"Uroporfirina III"	4,5	47,8	22,0
"Uroporfirina I"	15,3	20,0	22,0

ACLARACION: Protoporfirina IX, firiaporfirina III, uroporfirina III y uroporfirina I, coincidieron en Rf con los testigos puros. Las porfirinas tri- penta- y hexacarbo-xílicas fueron deducidas de su posición en el cromatograma.

Aparte de estas mediciones, algunas bandas de la cromatografía en columna fueron recromatografiadas hasta obtención de banda única y, de este modo, se logro cristalizar copro-,uro- y firiaporfirina III.

La coproporfirina observada al microscopio, permitió ver cristales de las formas isoméricas I y III. El punto de fusión obtenido luego se sucesivas recristalizaciones, en un aparato para micropunto de fusión Fisher con calentamiento eléctrico fue, para la primera recristalización de 145-147°C y para las siguientes, 155-157°C y 163-165°C, lo que demostraba una mezcla de los dos isómeros con enriquecimiento del I en las recristalizaciones, pues los puntos de fusión para los productos puros son: Coproporfirina I 252° C y coproporfirina III doble punto de fusión a 142 y 172°C. La cromatografía de lutidina agua, reveló también una mezcla de los dos isómeros, con preponderancia del tipo isomérico III.

La uroporfirina presentó la misma característica al microscopia y el punto de fusión dió, en una oportunidad, 270-275°C repitiéndose el mismo dato en la recristalización. En otra partida se obtuvo 260-264°C para la primera recristalización y 262-267°, para la segunda. Como los puntos de fusión teóricos son 293-302°C y 256-258°C, para la uroporfirina I y III respectivamente, aquí también se estaba en presencia de una mezcla. Tanto cromatografía

de Falk y Benson directamente, como la cromatografía de lutidina agua de las coproporfirinas obtenidas por descarboxilación de las uroporfirinas arriba citadas, dió una mezcla de los dos isómeros con preponderancia del tipo isomérico III.

En la firiaporfirina III se hizo la observación microscópica, se determinó el punto de fusión, que dió 208-214°C en la primera recristalización y 210-214°C, en la segunda (el valor teórico es de 213-215°C) y además, se determinó la curva espectrofotométrica característica, que coincidió ampliamente con una firiaporfirina III, testigo, aislada de una paciente con porfiria cutánea tarda. Ver figura N°. 23.

Las distintas proporciones de porfirinas encontradas en hígados y riñones de conejos, aparecen en la tabla N°. 6.

Con las porfirinas de la glándula de Harder de las ratas, se realizó una columna cromatográfica como muestra la figura 24, pero en la cromatografía en papel, ambas fracciones solo dieron proporfirina IX. Además se logró cristalizar dicha protoporfirina a la que se le hizo una observación microscópica y una determinación de punto de fusión, que coincidió con el teórico de 228°C.

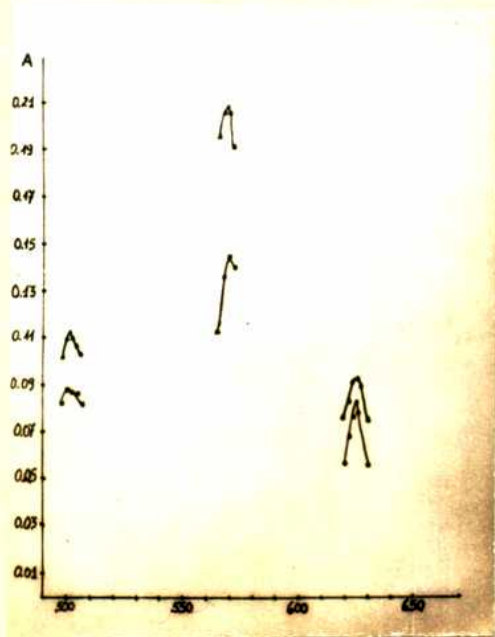


Figura N° 23
Curvas espectrofotométricas de
firiaporfirina III

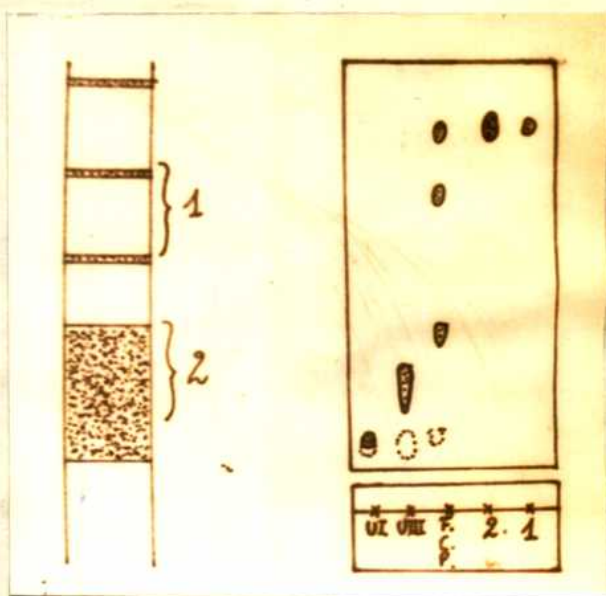


Figura N° 24
Cromatografía de ésteres de por-
firinas de la glándula de Harder
de las ratas.

TABLA N° 6

CANTIDADES RELATIVAS DE PORFIRINAS AISLADAS DE HIGADO Y RIÑÓN DE CONEJO.

Porfirinas	Hígado %	Riñón %
"Protoporfirina"	47,0	18,5
"Tricarboxílicas "	33,0	—
"Coproporfirinas"	7,0	27,5
"Pentacarboxílicas"	3,0	5,0
"Hexacarboxílicas"	3,5	5,0
"Firisporfirina III"	5,0	12,0
"Uroporfirina III"	1,5	32,0

ACLARACION: Rigen las mismas aclaraciones que en la tabla N° 5.

CUARTA PARTE

ESTUDIO RELATIVO A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALGUNOS PRECURSORES DEL PBG.

Se describen aquí, los métodos aplicados y los resultados obtenidos con la medida de actividad de algunas enzimas relacionadas con la formación de succinil CoA que, como se sabe es intermediario en la biosíntesis de PBG y porfirinas.

En esta parte del trabajo se midió la actividad enzimática de isocítrico deshidrogenasa, málico deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, en forma comparativa en polvos acetónicos de hígado de ratas normales y sometidos a la porfiria experimental. Además, se hicieron similares determinaciones con isocítrico deshidrogenasa y málico deshidrogenasa en plasma de conejos antes y durante una experiencia similar.

Fundamento del método para la medición de actividades de deshidrogenasas.

Debido a que algunas deshidrogenasas tienen como coenzimas a los piridín nucleótidos y como, por otra parte, la forma reducida de dichas coenzimas presenta un máximo de absorción característico a 340 m μ ; se aprovecha esta propiedad para seguir la acción enzimática a través de un determinado tiempo, pues trabajando con un exceso de sustrato y en condiciones experimentales adecuadas, a medida que actúa la enzima en estudio se puede leer en un espectrofotómetro la variación de la densidad óptica debida a la aparición de la forma reducida de la coenzima I, o su desaparición según sea el caso. De este modo, se cumple que a mayor cantidad de enzima presente la actividad sea mayor en una proporción directa, siempre que se sitúe en la parte de la curva en que se cumple una relación lineal entre la densidad óptica y el tiempo.

Aprovechando las variaciones de densidad óptica se definen unidades de actividad enzimática en relación a dicho cambio, en un período determinado de tiempo; estas definiciones son diferentes según sean las enzimas que se consideran. En el caso de extractos, en donde, pueden variar las proteínas totales se definen actividades específicas refiriendo las unidades enzimáticas a los mg. de proteínas presentes. Se encuentran dentro de este caso las mediciones realizadas en extractos de polvos acetónicos de hígado de ratas. En cambio, en el caso de mediciones realizadas en suero o plasma es frecuente la referencia a unidades de actividad enzimática por ml de suero o plasma.

Métodos

Preparación de polvos acetónicos de hígado.

Para la preparación de los polvos acetónicos se siguieron técnicas descriptas por Morton en "Methods in Enzimolgy" de Collowick y Kaplan(85) con muy ligeras modificaciones.

Para esta experiencia se utilizaron ratas sometidas a porfiria experimental, que fueron sacrificadas cuando se registró una gran excreción de PBG por orina.

El hígado extraído rápidamente fue cortado en pequeños trozos y homogeneizado con acetona muy purificada a 15°C en un homogeneizador Virtis "45".

Luego de una centrifugación a la misma temperatura en una centrífuga refrigerada "International", se repitió el tratamiento con acetona y la centrifugación.

Para eliminar la acetona, se lavó con éter etílico libre de peróxidos en dos oportunidades, con posterior filtración rápida y al vacío.

El secado final se hizo al aire con la ayuda de un secador de cabello. Una vez obtenido el polvo bien seco y tamizado se guardó al vacío y a 15° bajo cero.

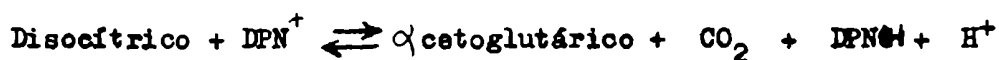
Las determinaciones en los polvos acetónicos se hicieron dentro de la semana de obtenido y en cada uno de ellos, tanto correspondiente a hígado de ratas normales como porfíricas, se hicieron determinaciones cuadruplicadas de cada medición de actividades enzimáticas (en realidad dos duplicados en días diferentes).

Además, los polvos acetónicos fueron preparados con un "pool" de hígados provenientes de tres ratas normales y tres ratas porfíricas respectivamente, en forma simultánea para que los datos obtenidos fueran más comparativos.

Se usaron en total 24 ratas, 12 como control y 12 sometidas a porfiria experimental, de las cuales 3 fueron intoxicadas con AIA y 9 con Sedormid.

Métodos utilizados para la medición de actividades enzimáticas.

Isocítrico deshidrogenasa (ICD).



Se adoptó el método descrito por Plaut y Sung (86) para la determinación de la actividad enzimática. Estos autores definen una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima, que produce un incremento en la densidad óptica de 0.01 por minuto bajo condiciones tales, en que la velocidad de incremento de la densidad óptica se mantenga lineal durante por lo menos 5 minutos. La actividad específica se determina en unidades por mg de proteínas.

La extracción de la enzima, se hizo con un buffer de fosfatos 0.01 M de pH 6.5 en la proporción de 20 cm³ de buffer por gramo de polvo acetónico, mediante agitado mecánico durante media hora a una temperatura de alrededor de 0 a 5°C. Luego se centrifugó a 0°C durante 30 minutos y 25.000 g en centrífuga refrigerada. Para la determinación, este extracto enzimático se diluyó 25 veces y la sustancia empleada para esta medición realizada en un espectrofotómetro Beckman modelo DU fueron los siguientes:

TPN	0.0015 M	,,.....0,	2 ml.
dl isocitrato	0.08 M.....	0.05 ml.	
SO ₄ Mn	0.02 M	0.1 ml.	
Buffer tris pH	7.4	1 ml.	
Agua destilada	1.5 ml.	
Solución enzimática (dilución 1/25).....		0.2 ml.	

Málico deshidrogenasa (MD).

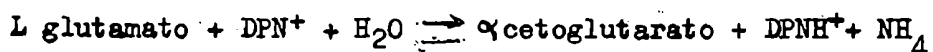


Para esta determinación se adaptó el método de Ochoa (87) que define la unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce una disminución de 0.01 de densidad óptica por minuto, cuando la caída en el valor de densidad óptica entre los 30 y 45 segundos de comenzada la reacción no pasa de 0.025. La actividad específica se expresa en unidades por mg. de proteína.

El procedimiento de extracción es exactamente similar al anterior y la sustancias empleadas para la medición en el espectrofotómetro fueron las siguientes:

Buffer tris pH 7.4	0.3 ml.
DPNH 0.0015 M.....	0.1 ml.
Solución enzimática (dilución 1/350).....	0.1 ml.
Oxalacetato 0.0076 M.....	0.1 ml.
Agua destilada.....	2.3 ml.

Glutámico deshidrogenasa (GD)



Se aplicó la técnica de Strecker (88), que define la unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un cambio en la densidad óptica de 0.001 por minuto, considerando el intervalo entre 15 y 30 segundos después de añadido el último reactivo. La actividad específica como en los otros casos se expresa en unidades por mg. de proteínas. Las extracciones son similares a las de las otras dos enzimas pero usando un buffer de fosfato 0.05M de pH 7.6.

Las sustancias empleadas para la medición en el espectrofotómetro son las siguientes:

Buffer de fosfato pH 7.6.....	2.6 ml.
DPN 0.0027 M.....	0.1 ml.
Solución enzimática sin diluir.....	0.1 ml.
Glutamato de potasio 0.5 M.....	0.2 ml.

Alcohol deshidrogenasa.



Se utilizó la técnica de Bonnichsen y Brink (89). Según estos autores una 8 de enzima por ml. da un incremento de la densidad óptica de 0.045 en tres minutos. Como los otros casos la actividad específica se expresa por mg. de proteína.

La forma de extraerla del polvo acetónico es similar a las enzimas anteriores con buffer de fosfatos 0.01M de pH 7.

Las sustancias empleadas para las soluciones espectrofotométricas son las siguientes:

Buffer de Glicina - NaOH pH 9.6 (0.1M).....	2.5 ml.
DPN 0.0027 M).....	0.1 ml.
Alcohol etílico	0.1 ml.
Solución enzimática (Dilución 1/s).....	0.1 ml.

Todos estos métodos son adaptaciones de los originales a los efectos de poder hacer las determinaciones en extractos de polvos acetónicos. Dichas variantes fueron posibles pues se tenía la intención de obtener solamente datos comparativos.

En la figura N° 25 se muestra el comportamiento de la ICD en un determinado hígado de rata y uno de control con extracto de polvo acetónico de hígado de bovino; en la determinación espectrofotométrica de aparición de la banda de absorción correspondiente a DPNH en 340 $m\mu$

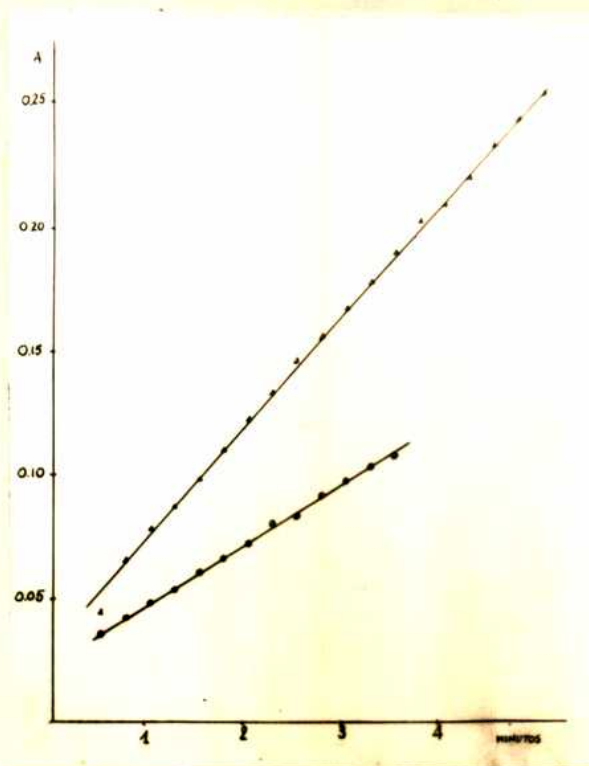


Figura N° 25: Actividades específicas de I. C. D.

ACLARACION: La actividad menor, corresponde a determinaciones efectuadas con extractos de polvos acetónicos de hígado de bovino; la mayor a preparaciones similares de hígado de rata.

Determinaciones enzimáticas en plasma de conejo.

En cuatro conejos se hicieron extracciones de sangre de la vena marginal de la oreja utilizando heparina como anticoagulante, en diferentes días, antes y durante una intoxicación producida por Sedormid.

Se centrifugó la sangre para obtener plasma y sobre el se determinaron ICD y MD según técnicas de los laboratorios Sigma Chemical Co. Las sustancias utilizadas para la determinación de ICD fueron:

Buffer Tris. Ph 7.4	1.75 ml.
TPN 0.0015 M.....	0.65 ml.
SO ₄ Mn.....	0.1 ml.
Plasma de conejo.....	0.5 ml.
dl isocitrato.....	0.1 ml.

Las unidades enzimáticas fueron definidas por Wolfson y Williams-Ashman (90) y consisten en el valor del incremento de la densidad óptica por minuto multiplicado por 30,000 debiéndose leer en el espectrofotómetro durante por lo menos tres minutos.

En la determinación de málico deshidrogenasa se utilizaron las siguientes sustancias:

Buffer de fosfatos 0,1 M Ph 7.5	2.0 ml.
DPNH 0.0015 M.....	0.25 ml.
Plasma de conejo.....	0.1 ml.
Oxalacetato 0.5 M pH 7.0.....	0.1 ml.
Agua destilada.....	0.65 ml.

con incubación a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos.

Las unidades definidas por Siegel y Bing (91) consisten en la disminución de 0.001 de densidad óptica por minuto.

Ambas técnicas descriptas para sueros humanos fueron adaptadas para plasma de conejo con las mismas salvedades hechas con los extractos de los polvos acetónicos.

Método de dosaje de proteínas totales.

Para la determinación de la cantidad total de proteínas se describen diversos métodos pero el que resultó más aconsejable para este tipo de experiencias fue el de espectrofotometría ultravioleta descrito por Warburg y Christian en 1941 (92).

Este Método, que está basado en la absorción que presentan las proteínas debido principalmente a su contenido de tirosina y triptofano, a 280 $m\mu$ en la zona espectral ultravioleta, permite dar un valor bastante aproximado de la cantidad de proteínas totales con una dilución adecuada para evitar las interferencias. Debido a la absorción que presentan los ácidos nucleicos a 260 y 280 $m\mu$ es necesario efectuar una corrección debida a esa causa. Para tal fin se aplican diversas fórmulas empíricas, luego de leer las densidades ópticas a 260 y 280 $m\mu$. En las experiencias realizadas se apli-

có una, descripta por Layne (93) que es la siguiente.

$$\text{Concentración de proteínas (mg/ml)} = 1.55 \times D_{280-0} / 0.76 \times D_{260}$$

Para evitar errores en estas determinaciones, las mismas fueron hechas en cada caso por triplicado.

Resultados obtenidos

En la tabla N° 6 están resumidos los datos correspondientes a actividades específicas enzimáticas de los extractos de polvos acetónicos de hígado de ratas; tanto los controles como los sometidos a porfiria experimental, mientras que en la tabla N°. 7 se pueden observar los valores de unidades enzimáticas correspondientes a plasma de conejos antes y durante una experiencia de porfiria.

TABLA N°. 7

Enzima Hígado	I. C. D.		M. D.		G. D.		A. D.	
	Normal	Porf.	Normal	Porf.	Normal	Porf.	Normal	Porf.
"Pool" N° 1	25,4	30,8	21,6	19,4	12,0	12,8	1,16	1,5
	23,2	32,4	28,8	17,5	11,0	17,2	1,86	1,86
	34,8	41,0	53,0	29,0	22,4	18,7	0,58	1,16
	28,8	36,8	53,0	—	18,8	16,4	1,35	1,02
"Pool" N° 2	22,6	24,2	42,3	50,0	7,8	10,4	—	—
	33,0	27,4	40,6	38,8	8,8	9,6	—	—
	26,3	17,4	19,7	17,5	10,8	12,6	1,12	1,11
	20,5	18,0	16,3	16,3	—	9,6	2,12	0,87
"Pool" N° 3	13,1	21,3	9,2	27,6	9,2	10,4	1,18	1,00
	17,6	20,0	18,4	28,0	9,7	6,8	1,10	0,73
	22,2	20,8	12,0	11,7	9,8	7,5	—	—
	31,2	19,8	9,0	11,1	10,8	7,9	—	—
"Pool" N° 4	38,8	45,3	33,0	27,6	12,2	18,3	1,33	1,62
	33,6	40,5	59,4	24,4	17,8	21,7	1,28	1,74
	40,5	26,2	—	9,1	12,8	15,8	1,54	1,55
	32,0	33,0	19,7	12,2	14,8	16,2	1,16	1,11
Promedios	27,1	28,4	29,0	22,6	12,5	13,2	1,31	1,27

ACLARACION: Cada "pool" corresponde a polvos acetónicos de hígado de tres ratas normales y tres sometidas a la porfiria experimental. El primero de ellos corresponde a un tratamiento con AIA y los restantes a un tratamiento similar con Sedormid. De cada "pool" figuran los cuadruplicados (dos duplicados en días diferentes) de las actividades específicas enzimáticas expresadas en las unidades ya referidas anteriormente en el texto.

TABLA N° 7

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN PLASMA DE CONEJOS.

Enzima	Normales	Sometidos a porfiria experimental		
		4° día	8° día	12° día
ICD	2.704	1.571	1.138	1.074
LD	335	117	125	110

ACLARACION: Las unidades en las actividades enzimáticas son las ya señaladas en el texto correspondiente.

Como se puede observar no hay variaciones significativas entre las actividades específicas de los extractos de polvos acetónicos de hígado de ratas normales y sometidas a porfiria experimental.

En plasma parece haber una caída en los valores de las unidades enzimáticas con el avance de la porfiria pero no son lo suficientemente significativos, pues la alteración de estos valores en algunas enfermedades humanas son mucho mayores.

FIN DE LA CUARTA PARTE

DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la primer parte del presente trabajo se ha realizado un estudio experimental exhaustivo de la metodología relacionada con el PBG.

Se ha adaptado el método de aislamiento de PBG de orina porfírica descrito por Cookson y Rimington (24), así como distintas técnicas de identificación y valoración cuantitativa de PBG (forma cristalina, cromatografía en papel, determinaciones espectrofotométricas y comportamiento frente a resinas de intercambio iónico).

Se determinaron coeficientes de extinción molar específico con distintos reactivos de Ehrlich y con material cristalino aislado de orina porfíricas, Los valores obtenidos coinciden con los de la literatura.

Se han estudiado las condiciones óptimas de absorción, elución y recuperación de soluciones puras de PBG o mezclado previamente, con orinas normales y porfíricas; en columnas de resinas de intercambio iónico Dowex 2 empleadas en la técnica de Mauzerall y Granick (28).

Se ha encontrado como dato interesante que, aún con cantidades del orden de 1 mg. de PBG absorbido en la columna, no se llega al punto de saturación, trabajando en las condiciones descritas por los autores arriba citados.

En los estudios realizados sobre porfiria experimental, en los que se han empleado las técnicas de Mauzerall y Granick (28) para la Valoración de δ AL y PBG urinario y otros métodos adaptados de diversos autores para la determinación e identificación de las porfirinas excretadas por orina, se obtuvieron los siguientes resultados:

1º: Tanto en las ratas como en los conejos llama la atención la gran desproporción en los aumentos de δ AL y PBG, con respecto a los de uro- y coproporfirinas, aunque la excreción de δ AL en los conejos estuvo por debajo de la de las ratas. Además, en los primeros se notó una mayor excreción de uroporfirinas que en las segundas.

2º: El cuadro químico ofrecido por la administración de AIA en ambas especies de animales, resultó prácticamente similar al producido por Sedorimid.

3º: La medición comparativa de PBG por el método de Vahlquist (6) con la técnica de las resinas descritas por Mauzerall & Granick ha demostrado

que, los resultados obtenidos por el método directo pueden dar errores por exceso hasta de un 100%.

Además conviene hacer notar que los estudios realizados en la fracción "uroporfirina" fueron hechos en orina sin precalentar, a diferencia de los efectuados por otros autores.

Los resultados obtenidos son coincidentes con los comunicados por Abbott y Rudolph (94) en 1961 y discrepan con los de Stich (73) que sugiere una diferencia entre la porfiria aguda humana y la porfiria experimental, basada en los distintos niveles de excreción de δ AL.

Con respecto al tipo de las distintas porfirinas encontradas en la orina, tanto procedentes de porfiria experimental como del caso humano, se ha demostrado que la mayor parte de la uro- y coproporfirina es de tipo isomérico III. También se ha encontrado proporciones variables de porfirinas de siete, seis y cinco carboxilos.

La de siete carboxilos fue identificada como firiaporfirina III (37) cuyo porfirinógeno se considera precursor metabólico de la protoporfirina IX según Batlle & Grinstein (95).

Todo este conjunto de resultados pueden ser interpretados mediante una hipótesis que considera la biosíntesis exagerada de δ AL, como responsable de la mayor producción de compuestos pirrólicos observada en la porfiria aguda. La acumulación de δ AL favorecería una mayor formación de PBG, a través de un mecanismo de estimulación de la actividad enzimática; en este caso, sobre la dehidrasa del δ AL. Esto se realizaría por un mecanismo similar al que se distingue como "feed back" positivo (Davidson, 1960)⁽¹⁰⁷⁾. Los aumentos registrados en la excreción de porfirinas podrían explicarse en forma similar por el aumento de la biosíntesis de PBG. Esto estaría de acuerdo con los resultados de Gibson (1955) (96) que encuentra una mayor actividad de la dehidrasa de δ AL en hígado de conejo tratado con Sedormid, y de Scott (1955) (97), que constata que en porfirias agudas humanas la transformación de δ AL en PBG es más rápida. Las variaciones que se pueden observar en uro- y coproporfirinas, pueden deberse a diferencias de actividad de las enzimas que regulan su aparición o a diferentes niveles de su velocidad de excreción.

La disminución de la eliminación de porfirinas y precursores en una rata porfírica a la que se le suministró glicocola, ácido succínico y algunos cofactores entre los que se encontraba ATP no tiene una explicación muy clara, pero como en los últimos tiempos se ha encontrado que el AMP (Benard, Gajdos, Gajdos-

Török & Gallistin) (98) y la inosina (Lottsfeldt, Labbe & Aldrich) (99) producen un descenso en los niveles de excreción de porfirinas y precursores, esta disminución podría explicarse como un efecto del ATP.

Los estudios realizados con las actividades enzimáticas de isocítrico deshidrogenasa, málico deshidrogenasa, glutámico deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa en polvos acetónicos de hígado de ratas y plasma de conejos normales y sometidos a la porfiria experimental, no manifiestan alteraciones significativas de las mismas en dicha enfermedad. Esto aparentemente excluiría la posibilidad de que una formación anormal de succinil CoA fuera la responsable de la biosíntesis exagerada de δ AL y PBG.

Finalmente, los resultados del presente trabajo confirman una vez más, la similitud de la porfiria experimental con la porfiria aguda humana, como ya fuera señalado en anteriores trabajos.

APENDICE.

Ultimas investigaciones en el campo de la porfiria experimental.

Solomon y Figge en 1960 (100) continuaron los estudios de porfiria experimental en ratones con derivados de la colidina. Encuentran coproporfirina III y protoporfirina en hígado sin hallar las porfirinas verdes descritas por Schwartz e Ikeda (53). La droga oxidada parece no tener efecto.

Richards y Richard & Scott (101 y 102) en 1961 comprueban un incremento de δ AL y PBG suministrando glicina a animales sometidos a la porfiria experimental y a pacientes afectados de porfiria aguda.

Ockner y Schmid (103), en 1961 analizando la aparición de porfiria cutánea en Turquía, en la que se registraban síntomas abdominales y neurológicos y pensando que pudo ser originada por ingestión de hexaclorobenceno mezclado con el trigo con el que se fabricaba pan; hacen una experiencia con ratas a las que suministran esta droga con la comida.

Después de tres a ocho semanas observan aumentos de δ AL, PBG, uro- y coproporfirina como en la porfiria producida por Sedormid. Sin embargo no registran disminución de la catalasa hepática.

De Matteis, Prior & Rimington (104) continúan con estas experiencias observando que los experimentos con ratas confirman los resultados de Ockner y Schmid pero el orden de aparición de los compuestos anormales es primero copro- y uroporfirina, luego PBG y finalmente δ AL. En conejos la enfermedad se parece más a la humana con Excreción de uroporfirina III, pseudouroporfirina (hoy conocida como firiaporfirina III) y por firinas de seis y cinco carboxilos y aparición de PBG.

Estos mismos autores en 1962 (105) han hecho una porfiria experimental comparativa entre los derivados de la colidina y el Sedormid y encuentran que actúan en forma similar. La catalasa hepática también cae pero la nueva droga fue menos lenta en producir esa disminución.

Labbe, Hanawa y Lottsfeldt, (106) integrantes del grupo de Aldrich que antes trabajaba en Oregon y actualmente lo hace en Seattle, en una comunicación preliminar describe un aumento de la incorporación del Fe al hemo y en la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado de ratas porfíricas.

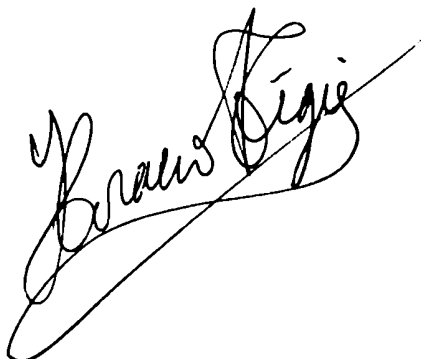
En otra comunicación preliminar, Lottsfeldt, Labbe y Aldrich (99) encuentran que la inosina disminuye la excreción porfirinas en ratas sometidas a la

porfiria experimental y consideran la posibilidad de un efecto benéfico de este compuesto en porfiria aguda humana.

Por otra parte Gajdos y Gajdos Török (98) prueban el efecto de la adenosina 5 mono fosfato en porfiria experimental en embrión de pollo con resultados similares a los de la inosina. También encuentran que actúa favorablemente en la porfiria debida a hexaclorobenceno.

Cómo se puede observar el metabolismo de las purinas ocupa un lugar preponderante en los futuros estudios de porfiria experimental.

FIN DEL TRABAJO DE TESIS



BIBLIOGRAFIA

- (1) SACHS, P. *Klin. Wnschr.* 10, 1123, (1931).
- (2) WALDENSTROM, J. *Acta med. scand. Suppl* 82, 254, (1937).
- (3) WALDENSTROM, J. & VAHLQUIST, B. *Hoppe-Syl. Z.* 259, 213, (1939).
- (4) WALDENSTROM, J. & VAHLQUIST, B. *Hoppe-Seyl. Z.* 260, 189, (1939).
- (5) DOBRINER, K., STRAIN, W.H. & LOCALIO, S.A. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 36, 752, (1937)
- (6) WALDENSTROM, J. & VAHLQUIST, B. *Acta med. scand.* 117, 1, (1944).
- (7) WATSON, C.J. & SCHWARTZ, S. *Proc. Soc. expe. Biol., N.Y.*, 47, 393, (1941).
- (8) PRUNTY, F.T.G. *Biochem. J.* 39, 446, (1945).
- (9) WESTALL, R.G. *Nature*, 170, 614, (1952).
- (10) GRAY, C.H., *Biochem. J.*, 48, LIV. (1951)
- (11) BROZZAN, P. & GRAY, C.H. *Biochem. J.* 49, LXXI, (1951).
- (12) HAWKINSON, V.E. & WATSON, C.J., *Sciencia*, 115, 496, (1952).
- (13) HERBERT, F.K., *Biochem. J.*, 52, XII, (1952).
- (14) CONSDEN, R., GORDON, A.H. & MARTIN, A.J.P., *Biochem. J.*, 38, 224, (1944).
- (15) WATSON, C.J., HAWKINSON, V. & BOSSENMAIER, I., *Trns. Assn. Am. Phys.* 66, 144, (1953).
- (16) COOKSON, G.H. & RIMINGTON, C., *Nature*, 171, 875, (1953).
- (17) GRANICK, S. & BOGORAD, L., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 3610, (1953).
- (18) COOKSON, G.H., *Nature*, 172, 457, (1953).
- (19) FALK, J.E., DRESEL, E.I.B. & RIMINGTON, C., *Nature*, 172, 292, (1953).
- (20) BOGORAD, L. & GRANICK, S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 39, 1176, (1953).
- (21) SCHWARTZ, S., *Fed. Proc.*, 13, 293, (1954).
- (22) RIMINGTON, C., *Reviews of pure and applied chemistry*, 8, 130, (1958).
- (23) SHEMIN, D., RUSSELL, C.S. & ABRANSKY, T.J., *Biol. Chem.*, 215, 613, (1955).
- (24) COOKSON, G.H. & RIMINGTON, G., *Biochem. J.*, 57, 476, (1954).
- (25) PRASAD, K.S.N. & RAPER, R., *Nature*, 175, 629, (1955).
- (26) RIMINGTON, C. & KROL, S., *Nature*, 175, 630, (1955).
- (27) RIMINGTON, C., KROL, S. & TOOTH, B., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8, 251, (1956).
- (28) MAUZERALL, D. & GRANICK, S., *J. Biol. Chem.*, 219, 435, (1956).
- (29) HAEGER, B., *Lancet, Lond.*, 2, 606, (1958).
- (30) HEATH, H. & HOARE, D.S., *Biochem. J.*, 72, 14, (1958).
- (31) HOARE, D.S. & HEATH, H., *Biochim. Biophys. Acta.* 39, 167, (1960)
- (32) LOCWOOD, W.H. & BENSON, A., *Biochem. J.* 75, 372, (1960).

- (33) MAUZERALL, D., J. Am. Chem. Soc., 82, 2601, (1960).
- (34) MAUZERALL, D., J. Am. Chem. Soc., 82, 2605, (1960).
- (35) GUNTHER, H., *Ergebn. d. allg. Path. u. path. Anat.*, 20, 607, (1922)
- (36) WATSON, C. J., *Advances in internal Medicine*, vol VI. Year book Publishers
Chicago, pag. 235.
- (37) GRINSTEIN, M., *La prensa médica Argentina.*, 42, 2683, (1955).
- (38) MORERA, V., *Tratado de Análisis Biológicos*, Ed. Mundi S. R. L., Bs. As., 1, 197
(1958).
- (39) GRINSTEIN, M., *Rev. Asoc. Med. Arg.*, 73, 518, (1959).
- (40) SCHMID, R., HANSON, B. & SCHWARTZ, S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 79, 459, (1952).
- (41) SCHWARTZ, S., KEPRIOS, M. & SCHMID, R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 79, 463, (1952)
- (42) SCHMID, R. & SCHWARTZ, S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81, 685, (1952).
- (43) ELLINGER, A. & RIESER, O., *Z. f. Physiol. Chemie.*, 98, 1, (1916).
- (44) FISHER, H. & DUESBERG, R., *Arch. exp. Pathol. und Pharmacol.*, 166, 95, (1932)
- (45) WALDENSTROM, J. & WENDT, S., *Z. physiol. Chem.*, 259, (1939).
- (46) DUESBERG, R., *Muenchener Med. Wochschr.*, 79, 1821, (1932).
- (47) SCHMID, R., FIGEN, J. F. & SCHWARTZ, S., *J. Biol. Chem.*, 217, 263, (1955).
- (48) SCHMID, R. & SCHWARTZ, S. *Ciba Foundation Symposium on Porphyrins biosynthesis and Metabolism*, London, Wolstenholme G. E. W., Millar E. C. P. (ed.), 196, (1955).
- (49) RIVAS, E. A. GARCIA, A. & GRINSTEIN, M., (1962), próximo a publicarse.
- (50) SCHWARTZ, S., *Federation Proc.*, 14, 717, (1955).
- (51) SCHWARTZ, S. & WATSON, C. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95, 216, (1957).
- (52) MERCHANT, A., WAJCHEMBERG, B. L. & SCHWARTZ, S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95,
221, (1957).
- (53) SCHWARTZ, S. & IKEDA, K., *Ciba Found. Symp.* (id. cita 48), 209, 1955).
- (54) CASE, J. D., ALDRICH, R. A. & NEVE, R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83, 566, (1953).
- (55) TALMAN, E. L., CASE, J. D., NEVE, R., LABBE, R. F. & ALDRICH, R. A., *J. Biol. Chem.*, 212,
663, (1955).
- (56) LABBE, R. F., TALMAN, E. L. & ALDRICH, R. A., *Biochim. et Biophys. Actas*, 15, 590, (1954)
- (57) SHEMING, D., & RUSSELL, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4873, (1953).
- (58) TALMAN, E. L., LABBE, R. F. & ALDRICH, R. A., *Arch. Biochem. & Biophys.*, 66, 289, (1957).
- (59) TALMAN, E., LABBE, R., ALDRICH, R., SEARS, D., SCHAFER, M. *Arch. Biochem. & Biophys.*
80, 446, (1959).
- (60) GOLDBERG, A., *Biochem. J.*, 57, 55, (1954).
- (61) GOLDBERG, A. & RIMINGTON, C., *Lancet*, 2, 172, (1954).
- (62) GOLDBERG, A., *Biochem. J.* 59, 37, (1955).

- (63) GOLDBERG, A. & RIMINGTON, C., Proc. Roy. Soc. B., 143, 257, (1955)
- (64) BENARD, H., GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Compt. Rend. Soc. Biol., 147, 1591, (1953)
- (65) BENARD, H., GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Compt. Rend. Soc. Biol., 148, 838, (1954).
- (66) BENARD, H., GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Compt. Rend. Soc. Biol., 148, 869, (1954).
- (67) BENARD, H., GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Compt. Rend. Soc. Biol., 148, 1754, (1954).
- (68) GAJDOS-TOROK, M. BENARD, H., GAJDOS, A., Compt. Rend. Soc. Biol., 149, 68, (1955).
- (69) BENARD, H., GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Compt. Rend. Soc. Biol., 149, 312, (1955).
- (70) GAJDOS, A., GAJDOS-TOROK, M., Ciba Found. Symp. (id. cita 48), 229, (1955).
- (71) STICH, W & DECKER, P., Ciba Found. Symp. (id. cita 48), 254, (1955).
- (72) STICH, W., Freiburger, Symposium med. Univ. Klinik., 4, 266; (1956).
- (73) STICH, W., Klin. Wochschr., 36, 386, (1958).
- (74) SOLOMON, H.M., FIGGE, F.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 583, (1959).
- (75) SCHWARTZ, S., ZIEVE, L., WATSON, C.J., J. Lab. & Clin. Med. 37, 843, (1955)
- (76) DRESEL, E. I. B., & TOOTH, B. E., Nature, London, 174, 271, (1954).
- (77) DRESEL, E. I. B., RIMINGTON, C. & TOOTH, B. E., Scandnav. J. Lab. & Clin. Inv. 1,
12, (1949).
- (78) SALUM, Y., BATLLE, A. M. del C. & GRINSTEIN, M., An. Asoc. Quim. Arg., 49, (1962).
- (79) FALK, J. E., & BENSON, A., Biochem. J. 55, 101, (1953).
- (80) BATLLE, A. M. del C. & GRINSTEIN, M., Trabajo a presentarse en el VIII Con-
greso Latino Americano de Química.
- (81) NICHOLAS, R. E. H. & RIMINGTON, C. Scandnav. J. Lab. & Clin. Inv. 1, 12, (1949).
- (82) ERICKSEN, L., Scandnav. J. Lab. & Clin. Inv.
- (83) TOWBIN, E., FANTA, P. E. & HOOGE, H. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 60, 228, (1945)
- (84) HAEGER-ARONSEN, B., Scandnav. J. Clin. & Lab. Inv. 12, Suppl 47. (1960).
- (85) MORTON, R. K., Methods in Enzimology, Ed. : Colowick, S. P. & KAPLAN, N. Ac. Press
Inc. Publishers N.Y. 1, 34, (1955).
- (86) PLAUT, W. E. & SUNG, S. C. (Id. cita 85), 1, 710, (1955).
- (87) OCHOA, S. (Id. cita 85), 1, 735, (1955).
- (88) STRECKER, H. J. (Id. cita 85), 2, 220, (1955).
- (89) BONNICHSEN, R. K. & BRINK, N. G. (Id. cita 85), 1, 495, (1955)
- (90) WOLFSON, S. K. Jr. & WILLIAMS-ASHMAN, H. G., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 96, 231,
(1957).
- (91) SIEGEL & BING., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 91, 604, (1956).
- (92) WARBURG, O. & CHRISTIAN, W., Biochim. Z. 310, 384, (1941).
- (93) LAYNE, E. (Id. cita 85) 3, 447, (1955).
- (94) ABBOT, J. D. & RUDOLPH, S. G., Federation Proc. 20, 276, (1961).

- (95) BATTLE, A. M. del C. & GRINSTEIN, M., *Biochim et Bioph. Acta* (en prensa).
- (96) GIBSON, K. D., *Ciba Found. Symp.* (Id. cita 48), 27, (1955).
- (97) SCOTT, J. J., *Ciba Found. Symp.* (Id. cita 48), 43, (1955).
- (98) GAJDOS, A. & GAJDOS-TOROK, M., *Lancet*, 2, 7195, (1961).
- (99) LOTTSELDT, F. I., LABBE, R. F. & ALDRICH, R. A., *J. A. M. A.* 178, 928, (1961).
- (100) SOLOMON, H. M. & FIGGE, F. H. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 484, (1960).
- (101) RICHARDS, F. F., *Brit. J. Haematol.* 6, 34, (1960).
- (102) RICHARDS, F. F. & SCOTT, J. J., *Clin. Sci.*, 20, 387, (1961).
- (103) OCKNER, R. K. & SCHMID, R., *Nature, London*, 189, 499, (1961).
- (104) DE MATTEIS, F., PRIOR, B. E. & RIMINGTON, C., *Nature, London*, 191, 363, (1961)
- (105) DE MATTEIS, F., & PRIOR, B. E., *Biochem. J.* 83, 1. (1962).
- (106) LABBE, R. F., HANAWA, Y. & LOTTSELDT, F. I., *Arch. Biochem. & Bioph.* 92, 373, (1961)
- (107) DAVIDSON, J. N.: *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. London: Methuen & Co. Ltd. (Ed.). 4^a Edición, 1960, pag 188.

—oOo—

INDICE.

INTRODUCCION.....	Pag. 5
Antecedentes del porfobilinógeno.....	5
Antecedentes sobre porfiria.....	9
Antecedentes de porfiria experimental.....	12
Investigación sobre porfiria experimental p/el grupo Watson(1952-1957);	12
Investigación sobre porfiria experim.p/el grupo Aldrich y Labbe (1953-1959).....	14
Investigación sobre porfiria experim.p/el grupo Rimington(1954-1955)	15
Investigación sobre porfiria experimental por el grupo de Bénard, Gajdos y Gajdos-Torok (1953-1955).....	17
Investigación de porfiria experimental en otros laboratorios(1955-59)	17
Situación de la porfiria experim.en los,primeros meses de 1960.	
Introducción al trabajo experimental.....	18
SEGUNDA PARTE: AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y VALORACION DEL PORFO- BILINOGENO.....	20
Aislamiento de PBG de orinas porfíricas.....	20
Estudios sobre identificación y valoración de PBG.....	23
Criterios de identificación de PBG.....	23
Cromatografía en papel de PBG.....	23
Estudios relativos a la reacción de Ehrlich.....	24
Curva de absorción.....	25
Determinación de los coeficientes de extinción molar específica..	25
Método de valoración de PBG en orina mediante el uso de resinas de intercambio iónico.....	27
Descripción del método.....	27
Aplicación del método.....	28
Estudios experimentales del comportamiento del PBG frente a la re- sina Dowex 2.Curva de "break through"(saturación).	30
Curva de elución.....	30
Ensayos de recuperación.....	31
TERCERA PARTE: PORFIRIA EXPERIMENTAL.....	33
Parte experimental.....	33
Método de dosaje de porfirinas en porfiria experimental.....	34
Identificación de porfirinas excretadas por orina.....	35
Cromatografía en papel de ésteres de porfirinas.....	37
Cromatografía en papel de porfirinas libres.....	38
Descarboxilación de uroporfirinas.....	39
Aislamiento de porfirinas de órganos.....	39
Resultados obtenidos.....	40
CUARTA PARTE: ESTUDIOS RELATIVOS A LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALGU- NOS PRECURSORES DE PBG.....	50
Fundamento del método para la medición de actividades d/deshidrog.	50
Métodos.....	51
Preparación de polvos acetónicos de hígado.....	51
Métodos utilizados p/la medición de actividades enzimáticas.....	52
Isocítrico deshidrogenasa.....	52
Málico deshidrogenasa.....	52
Glutámico deshidrogenasa.....	53
Alcohol deshidrogenasa.....	53
Determinaciones enzimáticas en plasma de conejo.....	54
Método de dosaje de proteínas .totales.....	55
Resultado obtenido.....	56
DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	58
APENDICE: Ultimas investigaciones en el campo de la porfiria exp.	61