Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Porfirias hepáticas agudas : Relación con el estrés oxidativo y patologías asociadas

Granata, Bárbara Xoana

2013-12-09

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:
Granata, Bárbara Xoana. (2013-12-09). Porfirias hepáticas agudas : Relación con el estrés oxidativo y patologías asociadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Granata, Bárbara Xoana. "Porfirias hepáticas agudas : Relación con el estrés oxidativo y patologías asociadas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-12-09.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica.

Porfirias hepáticas agudas. Relación con el estrés oxidativo y patologías asociadas.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Barbara Xoana Granata

Director de tesis: Dra. María Victoria Rossetti.

Consejero de estudios: Dra. María Victoria Rossetti – Dr. Juan Carlos Calvo.

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, Hospital de Clínicas José de San Martín, CONICET – Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

Buenos Aires, 2013.

Porfirias Hepáticas Agudas. Relación con el estrés oxidativo y patologías asociadas.

Las porfirias son desórdenes metabólicos causados por la deficiencia parcial primaria de alguna de las enzimas involucradas en el camino de biosíntesis del grupo hemo. En particular, las Porfirias Hepáticas Agudas, comprenden la Nueva Porfiria Aguda (NPA), Porfiria Aguda Intermitente (PAI), la Coproporfiria Hereditaria (CPH), y la Porfiria Variegata (PV). Individuos con estas patologías padecen ataques neuroviscerales. Por otra parte, en PV y CPH pueden aparecer además síntomas cutáneos. En cuanto a la naturaleza del ataque porfirico, si bien no se conoce exactamente el mecanismo por el cual se generan los disturbios neurológicos, se sabe que el precursor neurotóxico ALA puede autooxidarse generando ROS.

Siendo estas enfermedades genéticas, se describieron diversas mutaciones en los genes que codifican las enzimas deficientes. En este trabajo nos focalizamos en el estudio molecular de la PV y diagnosticamos, mediante PCR y secuenciación automática, 10 nuevas familias Argentinas a nivel molecular. Encontramos 5 mutaciones nuevas en la literatura mundial y otras 5 previamente descriptas.

Estas familias, sumadas a las anteriormente diagnosticadas en el CIPYP, elevan el total de familias Argentinas PV a 36. Comparamos los tipos de mutaciones con el tipo de sintomatología en todas las familias, con el objeto de hallar alguna correlación entre dichos parámetros. Sin embargo, como ocurre en la mayoría de las poblaciones, no pudimos establecer una relación genotipo-fenotipo en nuestros pacientes.

Con el objetivo de comprobar que la alteración genética presente en cada paciente es efectivamente la causante de la patología, procedimos con la caracterización funcional de las mutaciones nuevas. Empleando un sistema de expresión procariotico en el caso de las mutaciones missense y un sistema de

minigenes en el caso de mutaciones de splicing, pudimos corroborar que las primeras reducen la actividad enzimática de la PPOX y que las segundas provocan la exclusión del exón afectado durante el procesamiento del ARNm de este gen.

Las porfirias son patologías genéticamente heterogéneas y cada mutación es privativa de una o a lo sumo dos familias. En nuestro país se destaca la mutación c.1.042_1.043insT, dado que no sólo fue descripta únicamente en Argentina, sino que también está presente en el 40% de las familias diagnosticadas genéticamente. De esta forma, hipotetizamos la posible existencia de un ancestro común para la mutación en nuestra población y en función de ésta realizamos un análisis de haplotipos basado en microsatélites o STRs. Encontramos un haplotipo común a todos los pacientes portadores de la mutación en cuestión, el cual es significativamente diferente al de los controles y de otros pacientes PV. Así concluimos que existe un efecto fundador en nuestra población para esta mutación en particular.

Por último, teniendo en cuenta la relación existente entre el ataque porfirico y el estrés oxidativo, nos propusimos estudiar parámetros de estrés oxidativo en pacientes y controles, con el fin de identificar algún marcador de la disfunción neurológica. Los resultados obtenidos no son concluyentes dado que el número de individuos analizados es aún bajo y además porque se trata de pacientes controlados y/o en tratamiento, cuyo sistema de defensa antioxidante ya logró, probablemente, adaptarse al cuadro porfirico.

Palabras claves:

Porfirias Hepáticas Agudas, Porfiria Variegata, diagnóstico genético, ensayo funcional, mutaciones, haplotipo, efecto fundador, estrés oxidativo.

Acute Hepatic Porphyrias. Relationship with oxidative stress and associated pathologies.

The porphyrias are a group of metabolic disorders caused by the partial deficiency of one of the enzymes involved in the heme biosynthetic pathway. Particularly, acute hepatic porphyrias comprise ALA-D Deficiency Porphyria (ADP), Acute Intermittent Porphyria (AIP), Hereditary Coproporphyria (HCP), and Variegate Porphyria (VP). Individuals with these conditions suffer neurovisceral attacks. Moreover, in VP and HCP cutaneous symptoms may also appear. Regarding the nature of the porphyric attack, although the mechanism by which neurological disturbances are produced is not well characterized, it is known that the neurotoxic precursor ALA may oxidize itself resulting in the formation of ROS.

As these diseases are genetic, various mutations in the genes that are responsible of each porphyria have been described. We focused on the genetic study of VP and we diagnosed, by means of PCR and automated sequencing, 10 new Argentinean families at the molecular level. We found five novel mutations in the literature and another 5 previously described.

These families, together with those previously diagnosed at the CIPYP, bring the total up to 36 Argentinean VP families. We compared the types of mutations with the type of symptom in all of these families, in order to find a correlation between these parameters. However, as in most populations, we could not establish a genotype-phenotype relationship in our patients.

Aiming to ensure that the genetic alteration present in each patient is indeed the cause of the pathology we performed the functional characterization of the novel mutations. Using a prokaryotic expression system in the case of missense mutations and a minigene system in the case of splicing mutations, we describe the first ones reduce PPOX enzymatic activity and the second ones lead to the exclusion of the affected exon during the mRNA processing of this gene.

The porphyrias are genetically heterogeneous diseases and each mutation is exclusive to one or two families. Among the mutations responsible for VP, in our country c.1.042_1.043insT stands out, since it was described only in Argentina and is present in 40% of genetically diagnosed families. Thus, we hypothesized the possible existence of a common ancestor for the mutation in our population and thus we conducted a study based on microsatellite haplotypes or STRs haplotypes. We found a common haplotype in all of the patients carrying the mutation, which is significantly different from controls and other PV patients. Therefore we conclude that there is a founder effect in our population for this particular mutation.

Finally, taking into account the relationship between the porphyric attack and oxidative stress, we decided to study oxidative stress parameters in patients and controls, in order to identify a marker of neurological dysfunction. Results obtained in this work were not conclusive since the number of individuals analyzed is still low and because the patients are either controlled or treated so their antioxidant defense system is probably adapted to the pathology.

Keywords:

Acute Hepatic Porphyrias, Variegate Porphyria, genetic diagnosis, functional assay, mutations, haplotype, founder effect, oxidative stress.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que forman parte de mi vida y contribuyeron, aun sin darse cuenta, con el proceso de esta Tesis.

Al CIPYP y la Dra. Alcira Batlle por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación.

A la Dra. María Victoria Rossetti por dirigir mi Tesis con seriedad y compromiso. Por acompañarme, escuchar mis ideas y propuestas y soportar mis locuras.

Al ICGEB de Trieste, Italia por otorgarme la beca que me permitió aprender tanto sobre minigenes de la mano de los Dres. Marco y Francisco Baralle.

A las "chichis" del CIPYP (Belén, Vero, Gabi C, Gabi D, Juli, Bere, Ale, Lore, Sil, Johi) por ese mate amigo que le pone una sonrisa al día de trabajo. Y al resto de mis compañeros que hacen del CIPYP un lugar amigable. A Carmen un gracias especial por la invaluable contribución en la realización del trabajo.

A mis amigas, Emi, Caro, Noe, Cavi, por aguantarme siempre y quererme.

A mi familia, por todo. Mi mamá, mis hermanos, mis padrinos, mis bichos, a todos los quiero muchísimo y les agradezco el aguante ahora y siempre.

A mi futuro marido, Pablo, por no dejar de quererme aun mientras escribía esta Tesis. Y a nuestros tres bichitos, Bea, Pol y Teo, que me acompañan incondicionalmente, como él. Los amo.

A la memoria de mi abuelo Tata

A la memoria de Lucas

Contenido

Resumen y palabras claves en español i
Resumen y palabras claves en inglés. iii
AGRADECIMIENTOS v
INTRODUCCIÓN 5
Capítulo I: Metabolismo del grupo hemo 6
I.1: Las Porfirinas y el grupo hemo 6
I.2: Biosíntesis del grupo hemo 7
I.3: Regulación de la síntesis del hemo 13
I.4: Catabolismo del hemo 16
I.5: Referencias 20
Capítulo II: Deficiencias en la biosíntesis del hemo 25
II.1: Las Porfirias 25
II.2: Porfirias Hepáticas Agudas 29
II.2.1: Porfiria Aguda Intermitente 33
II.2.2: Coproporfiria Hereditaria 35
II.2.3: Nueva Porfiria Aguda 37
II.4: Referencias 39
Capítulo III: Protoporfirinógeno oxidasa y Porfiria Variegata 48
III.1: Caracterización de la enzima PPOX 48
III.2: Biología molecular del gen PPOX 53
III.3: Porfiria Variegata 54
III.4: Porfiria Variegata en la Argentina 56
III.5: Referencias 58
Capítulo IV: Porfirias Hepáticas Agudas y estrés oxidativo 64
IV.1: Estrés oxidativo: ROS y sistema de defensa antioxidante 64
IV.2: Neuropatía porfírica 67
IV.3: Referencias 71
Capítulo V: Objetivos 77
V.1: Objetivo general 77
V.2: Objetivos específicos 77

MÉTODO EXPERIMENTAL 78
Capítulo I: Análisis genético de pacientes PV 79
I.1: Pacientes 79
I.2: Extracción y cuantificación de ADN genómico 79
I.3: Amplificación del gen de la PPOX 80
I.4: Purificación de los productos de PCR 81
I.5: Secuenciación de los productos de PCR 82
I.6: Sistema de numeración y nomenclatura de mutaciones 82
I.7: Referencias 83
Capítulo II: Caracterización de mutaciones nuevas en el gen de la PPOX 85
II.1.1: Análisis bioinformático de las nuevas mutaciones missense 85
II.1.2: Expresión de mutaciones missense 85
II.1.2.1: Preparación de los constructos mutantes 85
II.1.2.2: Expresión de las proteínas mutantes 89
II.1.2.3: Sistema de incubación in vitro 90
II.1.2.4: Determinación de la actividad enzimática 90
II.2.1: Análisis bioinformático de mutaciones de splicing 91
II.2.2: Expresión de mutaciones de splicing 92
II.2.2.1: Preparación de los constructos 92
II.2.2.2: Expresión de los minigenes 97
II.2.2.3: Análisis del perfil de expresión de ARNm 97
II.3: Referencias 99
Capítulo III: Análisis de haplotipos 101
III.1: Selección de marcadores moleculares: STRs 101
III.2: Pacientes y controles 102
III.3: Genotipificación de STRs y análisis de los datos obtenidos 102
III.4 Referencias 106
Capitulo IV: Determinaciones bioquímicas de estrés oxidativo 108
IV.1: Pacientes y controles 108
IV.2: Estado Oxidante Total 108
IV.3: Peroxidación lipídica: determinación de malóndialdehido 108

IV.4: Daño oxidativo a proteínas: determinación de grupos carbonilos ... 109
IV.5: Determinación de glutatión reducido ... 110
IV.6: Capacidad Antioxidante Total ... 111
IV.7: Actividad de Catalasa ... 111
IV.8: Determinación de homocisteína ... 112
IV.9: Análisis de los resultados ... 112
IV.10: Referencias ... 114
RESULTADOS y DISCUSIÓN ... 115
Capítulo I: Análisis genético de pacientes PV ... 116
I.1: Detección de mutaciones en pacientes PV Argentinos ... 116
I.2: Detección de nuevas mutaciones en pacientes PV Argentinos ... 117
I.3: Relación genotipo-fenotipo ... 118
I.4: Discusión ... 121
I.5: Referencias ... 125
Capítulo II: Caracterización de mutaciones nuevas en el gen de la PPOX ... 127
II.1.1: Análisis bioinformático de mutaciones missense ... 127
II.1.2: Expresión de mutaciones missense ... 128
II.2.1: Análisis bioinformático de mutaciones de splicing ... 128
II.2.2: Expresión de mutaciones de splicing ... 129
II.3: Discusión ... 132
II.4: Referencias ... 138
Capítulo III: Análisis de haplotipos ... 140
III.1: Caracterización de STRs en la población normal ... 140
III.2: Caracterización de STRs en pacientes PV ... 142
III.3: Haplotipos ... 145
III.4: Discusión ... 146
III.5: Referencias ... 149
Capítulo IV: Relación de las PHAs con el estrés oxidativo ... 151
IV.1: Evaluación de parámetros de estrés oxidativo ... 151
IV.2: Discusión ... 152
IV.3: Referencias ... 154

CONCLUSIONES GENERALES 156
Referencias 160
APÉNDICE 162
Pacientes PV: mutación y síntomatología 163
Mutaciones nuevas en la literatura y nuevas en Argentina. 167
Pedigrees y haplotipos 168
Abreviaturas 173

INTRODUCCIÓN

Capítulo I: Metabolismo del grupo hemo

I.1: Las Porfirinas y el grupo hemo

Las porfirinas, precursoras del hemo en el reino animal y de la clorofila en el reino vegetal (Nordmann et al, 2002), son moléculas de gran importancia ya que participan en procesos metabólicos esenciales que incluyen transferencia de electrones durante la respiración celular, fotosíntesis y catálisis enzimática (Layer et al, 2010). Probablemente sean el grupo prostético más antiguo de todos los organismos vivos y sus propiedades físicas, químicas y biológicas son las que les conceden un rol fundamental en el funcionamiento de los seres vivos (Mochizuki et al, 2010). Constituyen el requerimiento básico tanto en metabolismos aeróbicos como anaeróbicos y son por tanto consideradas, acertadamente, los pigmentos de la vida (Batlle, 1997).

Estas moléculas son macrociclos complejos formados por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D) interconectados por cuatro puentes meteno (α, β, γ y δ), que además contienen cadenas laterales sustituyentes en los carbonos β de cada pirrol. Como se puede ver en la Figura I.1, estos compuestos poseen dobles enlaces conjugados y por lo tanto son coloreados. Son de estructura planar rígida, aromáticos y relativamente grandes y estas características le confieren a la molécula hidrofobicidad. Sin embargo, los sustituyentes laterales aportan grupos alifáticos y carboxílicos que modifican esta condición.

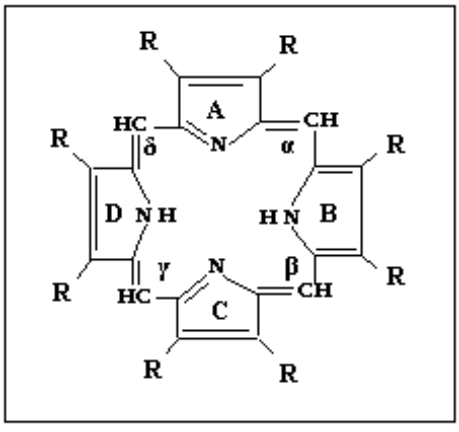


Figura I.1: Estructura de una porfirina. A, B, C y D corresponden a los cuatro anillos pirrólicos, unidos a través de los cuatro puentes meteno α, β, γ y δ. R indica la posición de los sustituyentes.

Las porfirinas pueden coordinar metales, como hierro y magnesio en su cavidad central generando así los grupos prostéticos de la hemoglobina y la clorofila, respectivamente. Por lo tanto son las porfirinas las que confieren el color rojo a la sangre y el color verde a las plantas (Heinemann et al, 2008).

Los tetrapirroles cíclicos se subdividen en hemo, bacterioclorofilas, clorofilas, vitamina B_{12}, coenzima F_{430}, etc. (Thauer & Bonacker, 1994; Banerjee & Ragsdale, 2003; Heinemann et al, 2008). Estas moléculas cíclicas in vivo difieren entre sí en el estado de oxidación del anillo pirrólico, en la naturaleza del metal quelado y los sustituyentes presentes en el anillo (Frankenberg et al, 2003; Heinemann et al, 2008). Otra característica sobresaliente es la capacidad de quelar diferentes iones metálicos divalentes como Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} y Co^{2+}. Por ejemplo, el Ni^{2+} está presente en la coenzima F_{430}, de color amarillo, que participa en la formación de metano en las arqueas metanogénicas (Thauer & Bonacker, 1994).

La hemoglobina es una hemoproteína cuyo grupo prostético es el ya mencionado grupo hemo, que contiene en su cavidad central un átomo de hierro. En este contexto, el grupo hemo coordina oxígeno molecular y dióxido de carbono, siendo así responsable de su transporte en el sistema cardiovascular (Heinemann et al, 2008). El grupo hemo también está presente en otras hemoproteínas tales como la mioglobina, citocromos y peroxidasas. Este tipo de proteínas cumplen diversas funciones biológicas que incluyen transporte y detección de gases, como la hemoglobina y la mioglobina; transporte de electrones, siendo ejemplo en este caso el citocromo c; catálisis química, donde se pueden mencionar a las peroxidasas y a la citocromo c oxidasa; y transporte activo a través de membrana, como es el caso de los citocromos.

I.2: Biosíntesis del grupo hemo

La síntesis de porfirinas ocurre en prácticamente todas las células vivas, y en células de mamíferos este proceso tiene lugar mayoritariamente en hígado y tejido eritropoyético (Nordmann et al, 2002).

En humanos, el 85% del hemo es sintetizado en células eritroideas, donde la mayoría es utilizada para la formación de hemoglobina. Un 14% es sintetizado en hígado, donde el 80% de ese total es destinado a la creación de diferentes citocromos (Kauppinen, 2005).

La síntesis de las porfirinas, que comienza en las mitocondrias, continúa en citoplasma y finaliza en las mitocondrias, requiere del trabajo coordinado de 8 enzimas diferentes, lo cual muestra el amplio espectro de estrategias catalíticas empleadas (Heinemann et al, 2008). Las enzimas que participan de este camino de biosíntesis se estudiaron intensivamente, además todos los genes involucrados se clonaron y se determinaron las estructuras cristalográficas (Ajioka et al, 2006).

El camino comienza con la formación de ácido δ-amino levulínico (ALA), molécula que aporta todos los átomos de carbono y nitrógeno necesarios para la formación de las porfirinas (Heinemann et al, 2008; Layer et al, 2010). Existen en la naturaleza dos caminos alternativos que confluyen en la formación de ALA. El camino de Shemin fue el primero en ser descripto y es el empleado por animales, hongos y el grupo α de proteobacterias; en él la formación de ALA se obtiene por la condensación de succinil CoA y glicina, con la eliminación de CO_2 (Fig. I.2; Shemin & Russel, 1953; Bisbis et al, 1997). La otra vía, llamada C_5, ocurre a partir del C_5 del esqueleto del glutamato; esta ruta es empleada por arqueas, la mayoría de las bacterias y plantas, donde es dependiente de la luz (Fig. I.2; Beale & Castelfranco, 1973; Avissar et al, 1989; Bisbis et al, 1997).

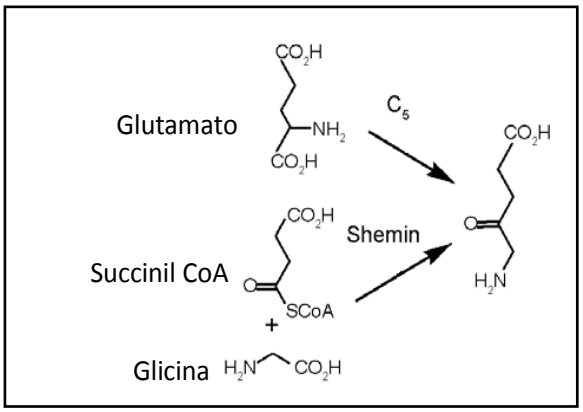


Figura I.2: Síntesis del ácido δ-amino levulínico por dos vías diferentes: Shemin y C_5.

Son ocho las enzimas involucradas en este camino metabólico, siendo la primera y las tres últimas mitocondriales y las cuatro restantes citoplasmáticas (Fig. I.3). En este proceso se generan, en primera instancia, ácido δ-amino levulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), que son los precursores del hemo. A partir de ellos se sintetizan los diferentes porfirinógenos, que son porfirinas reducidas sin dobles enlaces conjugados. Los intermediarios normales en la célula no son las porfirinas, sino los porfirinógenos.

En mamíferos, la primer enzima de este proceso es la llamada ácido δ-amino levulínico sintetasa (ALA-S), que utiliza como sustratos a la glicina y al succinil CoA, para generar como producto ALA (Hunter & Ferreira, 2011; Dailey & Meissner, 2013). Es una enzima mitocondrial que posee una corta vida media, es lábil e inestable, características que le confieren un rol regulatorio en este camino biosintético, es decir, la reacción catalizada por ella es considerada el paso limitante fundamental de este proceso metabólico.

Una vez sintetizado el ALA, éste es exportado fuera de la matriz mitocondrial de forma de encontrarse, en el citoplasma, con la segunda enzima de esta ruta biosintética (Dailey & Meissner, 2013), la ácido δ-amino levulínico dehidrasa (ALA-D) o porfobilinógeno sintetasa (PBG-S) que cataliza entonces la condensación de dos moléculas de ALA para generar el monopirrol llamado porfobilinógeno (PBG). No se conoce el mecanismo exacto de transporte de ALA fuera de la mitocondria, pero existen evidencias que sugieren la presencia de una proteína transportadora en la membrana interna mitocondrial, SLC25A38, que sería la responsable de dicho transporte (Guernsey et al, 2009).

El próximo paso es catalizado por la enzima porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) o hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S), que utiliza como sustrato a cuatro moléculas de PBG. En esta reacción, que ocurre en el citoplasma de la célula, las unidades de PBG se ensamblan en sentido “cabeza-cola” generando así un tetrapirrol abierto, llamado hidroximetilbilano (HMB), el cual tiene un ordenamiento simétrico de sus sustituyentes laterales (Battersby et al, 1978; Jordan & Seehra, 1979).

En condiciones no enzimáticas el HMB es capaz de ciclarse espontáneamente, generando uroporfirinógeno I (urogen I), que no es el producto fisiológico (Dailey & Meissner, 2013). El porfirinógeno normalmente encontrado en la célula es el uroporfirinógeno III (urogen III) sintetizado por acción de la enzima isomerasa o uroporfirinógeno III sintetasa (UROgen III sintetasa), que rota el anillo pirrólico D del HMB, obteniéndose así una disposición asimétrica de los sustituyentes, que finalmente se cicla generando el urogen III. La isomerasa es citoplasmática, no utiliza cofactores y se encuentra en exceso respecto de la enzima PBG-D, asegurando de esta forma la síntesis casi exclusiva del intermediario fisiológico (urogen III). Dicha enzima es incapaz de actuar sobre el urogen I, con lo cual si este compuesto se forma, en condiciones patológicas, es directamente utilizado como sustrato en la siguiente etapa.

El paso siguiente consiste en la decarboxilación progresiva de los cuatro restos de ácido acético (-CH2-COOH) del urogen III, que serán trasnformados en grupos metilo (-CH3), para finalmente obtener coproporfirinógeno III (coprogen III). La enzima que interviene en esta reacción es la última enzima citoplasmática involucrada en el camino, la uroporfirinógeno III decarboxilasa (URO-D), y como se dijo anteriormente, puede utilizar como material de partida al urogen III o al urogen I; por lo tanto, dependiendo del sustrato, se podrá obtener coprogen de la serie III o de la serie I, respectivamente. Esta enzima citoplasmática es incapaz de actuar sobre porfirinas, siendo los porfirinógenos sus sustratos fisiológicos. La decarboxilación en etapas de los sustituyentes laterales del urogen III, se realiza partiendo de un compuesto de ocho carboxilos (urogen III), pasando por intermediarios de siete (firia o heptaporfirinógeno III), seis (hexaporfirinógeno III) y cinco carboxilos (pentaporfirinógeno III), hasta llegar al compuesto de cuatro carboxilos (coprogen III). En presencia de altas concentraciones de urogen, esta enzima lleva a cabo la decarboxilación en forma azarosa, pero se cree que in situ la reacción procede siguiendo el sentido de las agujas del reloj comenzando por el anillo D (Dailey & Meissner, 2013) y con una velocidad mayor en el caso de los isómeros de la serie III que los de la serie I, asegurándose así que no se acumulen en la célula porfirinógenos no fisiológicos.

El coprogen III es transportado hacia el espacio intermembrana de la mitocondria, por un mecanismo que, si bien aún no se conoce, podría involucrar al transportador dependiente de ATP llamado ABCB6 (Krishnamurthy et al, 2006; Krishnamurthy & Schuetz, 2011) o a una porina dado el tamaño de la molécula a transportar (Dailey & Meissner, 2013). En la mitocondria el coprogen III es sustrato de la siguiente enzima del camino biosintético del hemo, la coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa), encargada de catalizar la decarboxilación oxidativa del coprogen III, para dar como producto protoporfirinógeno IX (protogen IX). En esta reacción sólo se ven afectados los anillos pirrólicos A y B cuyos restos de ácido propiónico (-CH2-CH2-COOH) son transformados en grupos vinilo (-CH=CH2). Si por alguna falla en este metabolismo se generan isómeros de la serie I (coprogen I), la CPGasa no es capaz de utilizarlos como sustrato y por lo tanto son excretados de la célula como coproporfirina I.

En el penúltimo paso de la biosíntesis del hemo, el protogen IX es oxidado a protoporfirina IX (proto IX) gracias a la acción de la enzima mitocondrial protoporfirinógeno oxidasa (PPOX; Brenner & Bloomer, 1980; Dailey, 1990; Akhtar, 2003; Layer et al, 2010). En esta reacción donde la PPOX emplea como cofactor al FAD y al oxígeno molecular como último aceptor de electrones, se eliminan seis átomos de hidrógeno para generar el compuesto aromático y por tanto coloreado, proto IX (Heinemann et al, 2008).

La última reacción de este camino metabólico también tiene lugar en mitocondrias y es catalizada por la enzima ferroquelatasa o hemo sintetasa (Dailey & Dailey, 2003), enzima asociada a la membrana interna de la mitocondria (Harbin & Dailey, 1985; Dailey & Meissner, 2013). Ésta inserta el hierro ferroso en el anillo porfirínico de su sustrato (proto IX), para generar el producto final de todo este proceso, el grupo hemo.

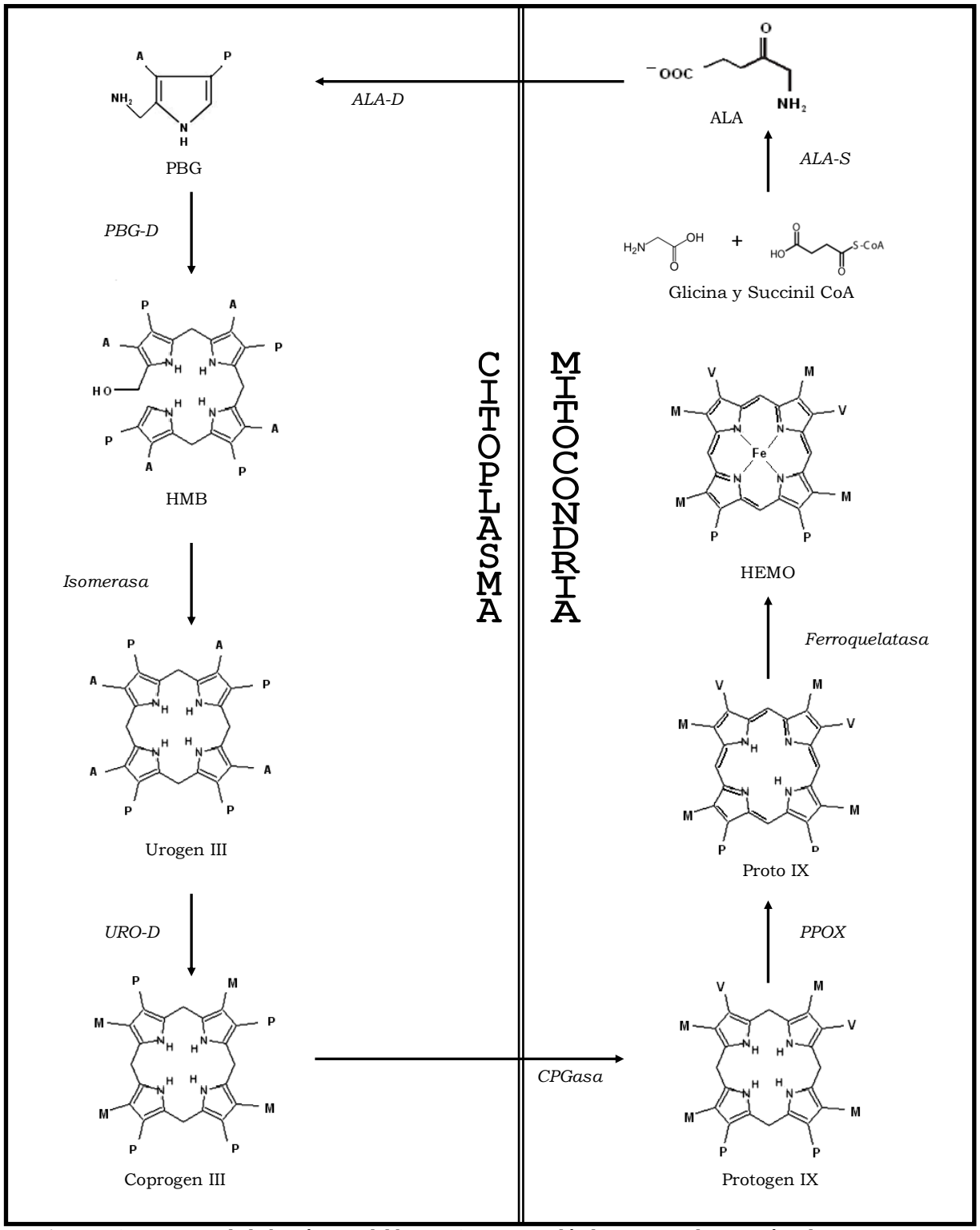


Figura I.3: Esquema de la biosíntesis del hemo. Se muestra dónde ocurre cada reacción y las enzimas involucradas (cursiva). A: ácido acético (-CH_2-COOH), M: metilo (-CH_3), P: ácido propiónico (-CH_2-CH_2-COOH), V: vinilo (-CH=CH_2).

Mientras que las porfirinas exhiben una estructura altamente conjugada, son coloreadas y emiten una intensa fluorescencia roja, los porfirinógenos, al no poseer dobles enlaces conjugados, no son coloreados ni emiten fluorescencia. Además, la solubilidad en agua de estos compuestos aumenta con el número de cadenas laterales acídicas, entonces es de esperarse que ALA, PBG y uro se excreten en orina, copro en orina y bilis, y proto sólo en bilis (Batlle, 1997).

Como se dijo previamente, el 85% de esta síntesis se destina a la formación de hemoglobina (Fig. I.4). Esta hemoproteína está formada por cuatro cadenas polipeptídicas globulares, dos subunidades α y dos subunidades β, cada una de las cuales se combina con un grupo hemo. El hierro del centro de la porfirina establece enlaces de coordinación con los nitrógenos de los anillos pirrólicos, con el nitrógeno de una histidina de la parte proteica y un último enlace de coordinación con la molécula de gas (O_2 o CO_2) a ser transportada.

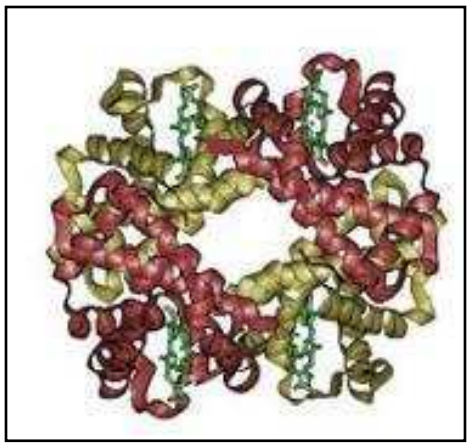


Figura I.4: Estructura tridimensional de la hemoglobina. En amarillo y rojo se muestran las subunidades protéicas y en verde los cuatro grupos hemo.

I.3: Regulación de la síntesis del hemo

Los niveles celulares de hemo son estrictamente controlados y esto se logra gracias a un delicado balance entre su biosíntesis y su catabolismo (Ponka, 1999). Los mecanismos de control de su biosíntesis difieren entre hígado y tejido eritroideo (Nordmann et al, 2002). La regulación de la síntesis de hemo comienza con la modulación de la actividad de la enzima ALA-S (Dailey & Meissner, 2013).

Existen dos isoenzimas de ALA-S, las cuales son codificadas por genes diferentes, uno específico de células eritroideas, ALA-S2 ubicado en el cromosoma X, y otro ubícuo, ALA-S1 ubicado en el cromosoma 3 (Nordmann et al, 2002). Diferencias en el metabolismo del hierro y en los genes que codifican para estas isoenzimas, son responsables de las diferencias en la regulación y velocidad de síntesis del hemo (Ponka, 1999). De hecho, ALA-S1 está presente en células precursoras de células eritroideas, pero su gen deja de expresarse cuando comienza a expresarse ALA-S2 (Conder et al, 1991; Yin & Dailey, 1998). Por lo tanto, las isoformas de ALA-S no pueden sustituir sus propias deficiencias entre ellas, dado que no se expresan al mismo tiempo (Dailey & Meissner, 2013).

En hígado esta regulación se da por retroinhibición negativa ejercida por el pool de hemo libre sobre la enzima ALA-S1 (Nordmann et al, 2002; Ponka, 1999). Este proceso puede tener lugar por dos mecanismos diferentes, uno a nivel transcripcional y otro a nivel post-traduccional. La represión de la transcripción del gen de ALA-S1 se da por activación, dependiente de hemo, de un represor de este gen. En cuanto a la represión post-traduccional, el hemo es capaz de unirse a la enzima en un sitio diferente al sitio activo, inhibiéndola, generándose así una retroinhibición negativa por producto final. También se ha descripto una regulación de los niveles del ARNm de ALA-S por el pool de hemo a nivel de la estabilidad del mensajero (Cable et al, 2000).

En células eritroideas, la regulación es más compleja y el hemo induce la síntesis de hemoglobina (Kauppinen, 2005). La región 5’ no traducible (5’ UTR) del ARNm de ALA-S2 contiene la secuencia de respuesta a hierro llamada IRE (iron responsive element) (Fig. I.5), que permite una regulación a nivel traduccional mediada por la concentración celular de hierro (Dierks, 1990; Bhasker et al, 1993; Melefors et al, 1993). La proteína IRP (iron regulatory protein) es capaz de reconocer estas secuencias y como resultado de esta interacción se controlará la traducción de los ARNm que contengan dichas secuencias. En condiciones de depleción de hierro, la forma libre de hierro de IRP puede unirse con alta afinidad a las secuencias IRE (Pérez et al, 2005;

Wallander et al, 2006), bloqueando la traducción del ARNm de ALA-S2 cuando la concentración celular de hierro es insuficiente para una síntesis óptima de hemo. Cuando aumentan los niveles de hierro, IRP unido a hierro adopta una conformación que le impide interactuar con las secuencias IRE de los ARNm (Pérez et al, 2005; Wallander et al, 2006), con lo cual ALA-S2 se traduce. Por lo tanto, la máxima actividad de ALA-S2 requiere no sólo de inducción génica mediada por factores de transcripción eritro-específicos sino también de un nivel intracelular de hierro suficiente para soportar la síntesis de hemo (Dailey & Meissner, 2013).

Existen dos proteínas claves en el metabolismo del hierro, que también están sujetas a este tipo de regulación: la ferritina, quien se encarga del almacenamiento de hierro y la transferrina, proteína que transporta el hierro en plasma. Como en el caso de ALA-S2, el ARNm de la ferritina contiene una región IRE en el 5' UTR y en condiciones de depleción de hierro su traducción se ve impedida mientras que al aumentar los niveles del metal habrá traducción de este ARNm para posibilitar el almacenamiento de hierro (Fig. I.5). El ARNm del receptor de transferrina (RTf) cuenta con tres regiones IRE en su 3' UTR, que impedirán la traducción frente a elevadas concentraciones de hierro y la permitirán al descender los niveles del metal (Fig. I.5).

Entonces, las proteínas IRP, en su forma libre de hierro se unen a los IREs localizados en la región 5' o 3' UTR de cada ARNm. En condiciones de bajo Fe, IRP se une con alta afinidad a los IREs ubicados a 5' del ARNm de ferritina y ALA-S2, reprimiendo su traducción, y en el caso de los IREs ubicados a 3' del ARNm de RTf, esta unión activa su traducción. Cuando el hierro aumenta en la célula, IRP se une a éste, liberando los transcriptos de modo que se activa la traducción de ferritina y ALA-S2 y se reprime la traducción de RTf por degradación del mensajero (Wallander et al, 2006).

De esta forma, cuando la célula necesita hierro, se favorece la traducción del receptor de la transferrina y se frena la utilización del metal al impedir la traducción de ALA-S2 y ferritina. En cambio, ante una sobrecarga de hierro es necesario aumentar su utilización y es allí cuando se favorece la traducción de

ALA-S2 y ferritina, pero no se ve favorecido el transporte (se impide la síntesis del receptor de transferrina) ya que la célula no necesita más hierro.

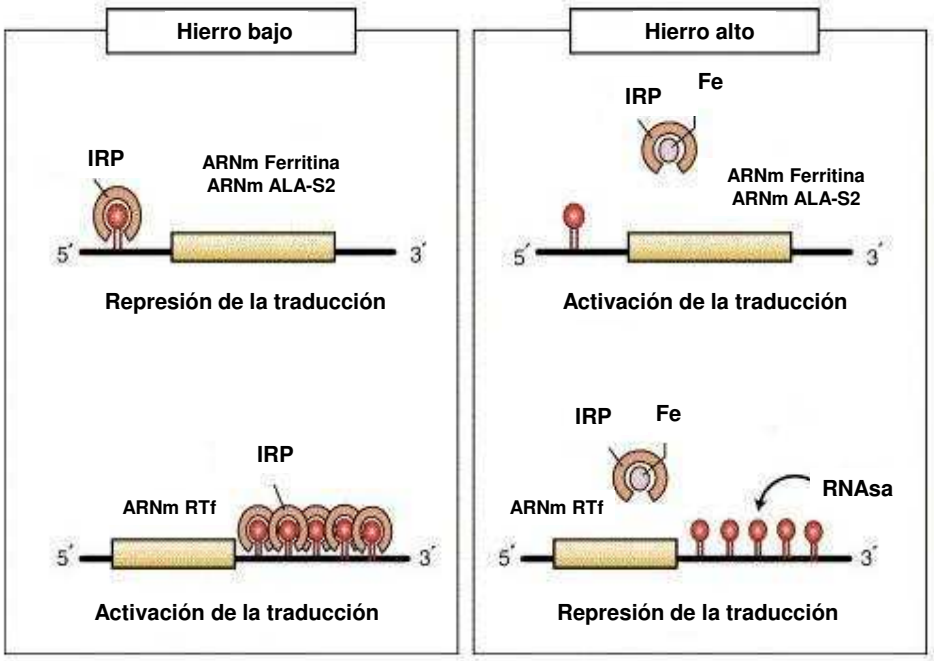


Figura I.5: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo en células eritroideas.

Además de los mecanismos de regulación arriba mencionados, existen otros puntos de control que incluyen la interconexión con otros caminos metabólicos y efectos del medio celular. En el primer caso se puede mencionar la succinil CoA, que proviene del ciclo de Krebs. En cuanto a los efectos del medio ambiente, estos pueden ser la disponibilidad de O_2, que afectará a los pasos que dependan de enzimas aeróbicas o anaeróbicas y la iluminación, ya que los porfirinógenos se oxidan a la luz (Batlle, 1997).

I.4: Catabolismo del hemo

Los glóbulos rojos, portadores de la hemoglobina, tienen un tiempo de vida media de 120 días y luego de este periodo son degradados. La parte proteica se hidroliza por la acción de proteasas pancreáticas (Pérez et al, 2005), mientras que el grupo hemo sufre transformaciones secuenciales, que tienen como

objetivo conservar el hierro y solubilizar el anillo porfirínico para convertirlo en un metabolito excretable.

La fase inicial de esta secuencia de transformaciones se lleva a cabo en células del sistema retículo endotelial (SRE.), principalmente en hígado, bazo y médula ósea. El glóbulo rojo senescente es fagocitado por macrófagos del sistema retículo endotelial, como las células hepáticas de Kupfer (Knutson & Wessling-Resnick, 2003). En estas células el hemo es degradado por la acción de un complejo multienzimático llamado hemo-oxigenasa (HO). Este complejo forma parte de la familia de proteínas HSP (Heat Shock Protein), un grupo altamente conservado en la evolución y además es el principal sistema fisiológico efectivo en la catálisis de la oxidación del hemo (Maines, 2000).

El complejo HO cataliza la oxidación del hierro ferroso (Fe^{2+}) y del puente meteno α, obteniéndose así, hierro férrico (Fe^{3+}) y monóxido de carbono (CO). En esta reacción participan el O_2 y el NADPH como poder reductor, y como consecuencia de ella se produce la apertura del anillo tetrapirrólico. Este compuesto obtenido por acción de la HO es un pigmento de color verde llamado biliverdina, constituido por una cadena de cuatro pirroles sin hierro (Bonkovsky et al, 2013). El hierro liberado es captado por la transferrina y luego por la ferritina y de esta forma se contribuye con el pool de almacenamiento de hierro.

La siguiente reacción, en la que la biliverdina actúa como sustrato, la enzima involucrada es la biliverdina reductasa. Por una reducción entre los pirroles C y D, con participación de NADPH, se obtiene como producto bilirrubina. Éste es un pigmento de color amarillo, insoluble en agua y soluble en lípidos, por lo que es capaz de atravesar membranas celulares, incluyendo la barrera hematoencefálica, razón por la cual es importante que este compuesto sea excretado. Si la bilirrubina se acumula en sangre provoca una coloración anormal de tejidos, cuadro denominado ictericia.

Debido a que la bilirrubina es insoluble debe unirse a proteínas plasmáticas como la albúmina y de esta manera es transportada por el torrente sanguíneo hasta el hígado. Una vez allí, la bilirrubina y la albúmina se separan y la primera ingresa al hepatocito.

La próxima reacción consiste en convertir a la bilirrubina en un metabolito hidrosoluble que pueda ser excretado por la bilis. Este paso es catalizado por la enzima bilirrubina-glucuronil transferasa (BGT), quien le adiciona a la bilirrubina restos de ácido glucurónico. El dador de este ácido es el uridinadifosfato-glucurónico (UDP-glucurónico), y como resultado se obtienen mono- y diglucurónido de bilirrubina; estos últimos sí son solubles en agua y son excretados por bilis.

Una vez en intestino, el glucurónido de bilirrubina es hidrolizado y la bilirrubina es reducida por acción de las bacterias de la flora intestinal. El producto final de esta etapa es el estercobilinógeno, un compuesto incoloro que se elimina parcialmente con la materia fecal. Éste se oxida en contacto con el aire, transformandose en estercobilina, tomando así la coloración oscura característica de las heces (Fig. I.6).

Como se puede ver en la Figura I.6, parte de los metabolitos generados en el intestino son reabsorbidos y alcanzan nuevamente el hígado. Allí se regeneran glucurónidos de bilirrubina, que otra vez se excretan con la bilis hacia el intestino, cerrando así el llamado ciclo enterohepático.

Algunos de los pigmentos reabsorbidos pasan a circulación general y se excretan por orina, y en este caso el compuesto recibe el nombre de urobilinógeno y su forma oxidada, urobilina (Fig. I.6).

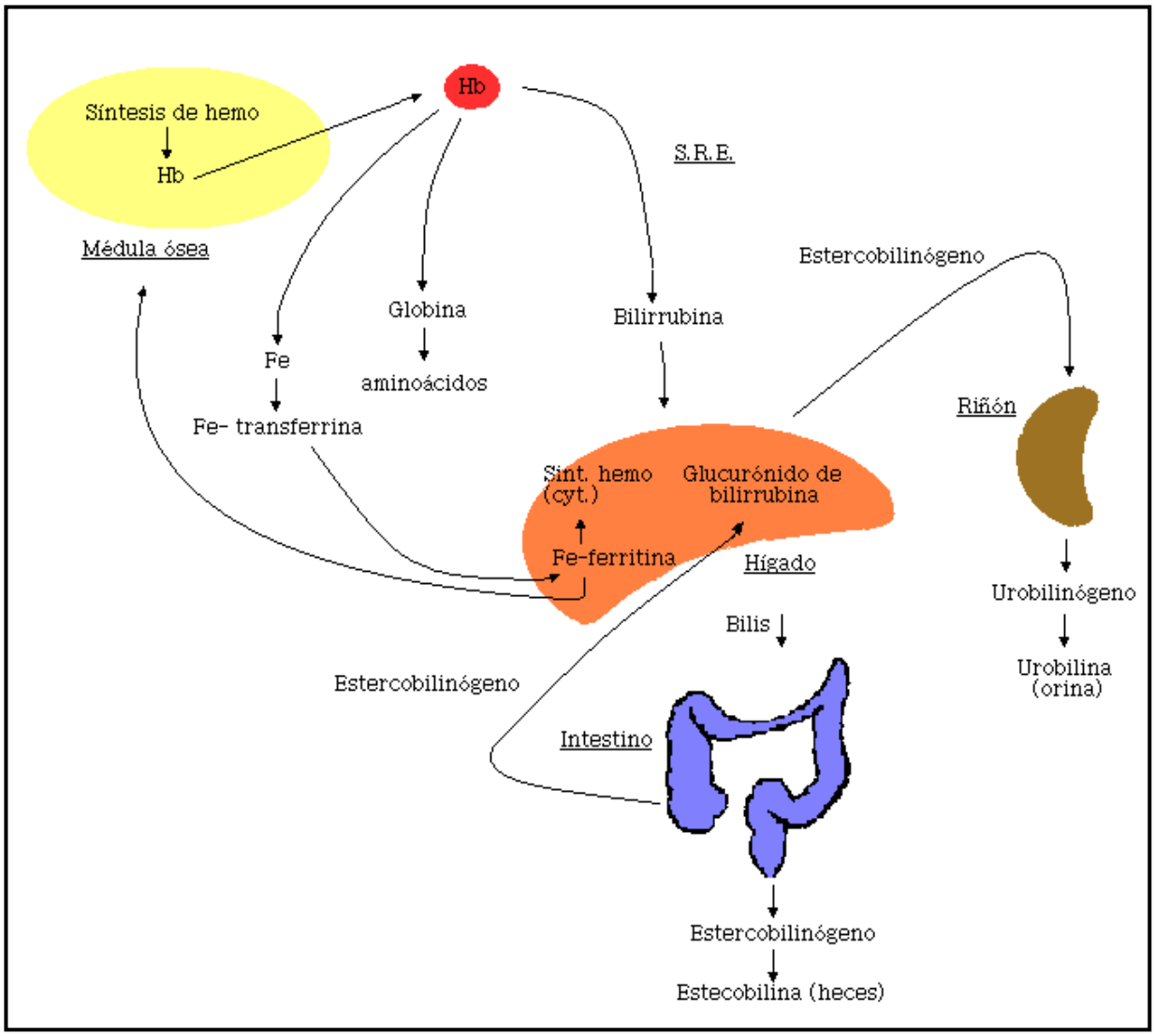


Figura I.6: Esquema general del catabolismo del grupo hemo. Los eritrocitos senescentes son captados por el SRE y por una secuencia de reacciones se obtienen bilirrubina y el hierro (Fe). La bilirrubina generará los pigmentos biliares que serán finalmente excretados. El Fe es captado por la transferrina y llevado hacia el hígado, donde será utilizado en la síntesis de hemo o será almacenado por la ferritina; de allí puede ser transportado hacia médula ósea para proseguir con la síntesis de hemo que ocurre en ese órgano.

I.5: Referencias

Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals (2006). Biochim Biophys Acta. 1763(7):723-736.

Akhtar M. Coproporphyrinogen III and protoporphyrinogen IX oxidase (2003). In The porphyrin handbook (ed. Kadish KM, Smith KM, Guilard R), pp. 75–92. Academic, San Diego.

Avissar YJ, Ormerod JG, Beale SI. Distribution of delta-aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups (1989). Arch. Microbiol. 151(6):513–519.

Banerjee R, Ragsdale SW. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes (2003). Annu Rev Biochem. 72:209-247.

Batlle AM del C. Porfirinas y Porfirias. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. Actualizaciones médico-bioquímicas (1997). Acta Bioquím Clín Latinoam. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.

Battersby AR, Fookes CJR, Matcham GWJ, McDonald E. Biosynthesis of natural porphyrins: enzymic experiments on isomeric bilanes (1978).J Chem Soc, Chem Commun. 23:1064-1066.

Beale SI, Castelfranco PA. 14C incorporation from exogenous compounds into δ-aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons (1973). Biochem Biophys Res Commun. 52(1):143–149.

Bhasker CR, Burgiel G, Neupert B, Emery-Goodman A, Kuhn LC, May BK. The putative iron-responsive element in the human erythroid 5-aminolevulinate synthase mRNA mediates translational control (1993). J Biol Chem. 268:12699–12705.

Bisbis B, Billard JP, Huault C, Kevers C, Le Dily F, Gaspar T. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid via the Shemin pathway in a green sugar beet callus (1997). Biol Plant. 40(4):493-497.

Bonkovsky HL, Guo JT, Hou W, Li T, Narang T, Thapar M. Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias (2013). Compr Physiol. 3(1):365-401. DOI: 10.1002/cphy.c120006.

Brenner DA, Bloomer JR. The enzymatic defect in variegate prophyria. Studies with human cultured skin fibroblasts (1980). N Engl J Med. 302(14):765-769.

Cable EE, Miller TG, Isom HC. Regulation of heme metabolism in rat hepatocytes and hepatocyte cell lines: delta-aminolevulinic acid synthase and heme oxygenase are regulated by different heme-dependent mechanisms (2000). Arch Biochem Biophys. 384(2):280-295.

Conder LH, Woodard SI, Dailey HA. Multiple mechanisms for the regulation of haem synthesis during erythroid cell differentiation. Possible role for coproporphyrinogen oxidase (1991). Biochem J. 275:321–326.

Dailey HA, Dailey TA. Ferrochelatase (2003). In The porphyrin handbook (ed. Kadish KM, Smith KM, Guilard R), pp. 93–122. Academic, San Diego.

Dailey HA, Meissner PN. Erythroid heme biosynthesis and its disorders (2013). Cold Spring Harb Perspect Med. 3(4):a011676. DOI: 10.1101/cshperspect.a011676.

Dailey HA. Conversion of coproporphyrinogen to protoheme in higher eukaryotes and bacteria: Terminal three enzymes (1990). In Biosynthesis of heme and chlorophylls (ed. Dailey HA), pp. 123–161. McGraw-Hill, New York.

Dierks P. Molecular biology of eukaryotic 5-aminolevulinate synthase (1990). In Biosynthesis of heme and chlorophylls (ed. Dailey HA), pp. 201–233. McGraw-Hill, New York.

Frankenberg N, Moser J, Jahn D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application (2003). Appl Microbiol Biotechnol. 63(2):115-127.

Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, Lachance M, Matsuoka M, Nightingale M, Rideout A, Saint-Amant L, Schmidt PJ,Orr A, Bottomley SS, Fleming MD, Ludman M, Dyack S, Fernandez CV, Samuels ME. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia (2009). Nat Genet. 41:651–653.

Harbin BM, Dailey HA. Orientation of ferrochelatase in bovine liver mitochondria (1985). Biochemistry. 24(2):366-370.

Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis (2008). Arch Biochem Biophys. 474(2):238-251. DOI: 10.1016/j.abb.2008.02.015.

Hunter GA, Ferreira GC. Molecular enzymology of 5-aminolevulinate synthase, the gatekeeper of heme biosynthesis (2011). Biochim Biophys Acta 1814:1467–1473.

Jordan PM, Seehra JS. The biosynthesis of uroporphyrinogen III: order of assembly of the four porphobilinogen molecules in theformation of the tetrapyrrole ring (1979). FEBS Lett. 104(2):364-366.

Kauppinen R. Porphyrias. Seminar (2005). Lancet 365:241-52.

Krishnamurthy P, Schuetz JD. The role of ABCG2 and ABCB6 in porphyrin metabolism and cell survival (2011). Curr Pharm Biotechnol 12:647–655.

Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter (2011). Nature 443:586–589.

Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system (2003). Crit Rev Biochem Mol Biol. 38:61–88.

Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis (2010). Protein Sci. 19(6):1137-1161. DOI: 10.1002/pro.405.

Maines MD. The heme oxygenase system and its functios in the brain (2000). Cell Mol Biol. 46 (3):573-585.

Melefors O, Goossen B, Johansson HE, Stripecke R, Gray NK, Hentze MW. Translational control of 5-aminolevulinate synthase mRNA by iron-responsive elements in erythroid cells (1993). J Biol Chem. 268:5974–5978.

Mochizuki N, Tanaka R, Grimm B, Masuda T, Moulin M, Smith AG, Tanaka A, Terry MJ. The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle (2010). Trends Plant Sci. 15(9):488-98. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.012.

Nordmann Y, Puy H. Human hereditary hepatic porphyrias (2002). Clin Chim Acta. 325:17-37.

Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación (2005). Acta Bioquím Clín Latinoam 39 (3): 301-314.

Ponka P. Cell biology of heme (1999). Am J Med Sci. 318(4):241-256.

Shemin D, Russel CSJ. δ-aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines (1953). Am. Chem. Soc. 75:4873–4875.

Thauer RK, Bonacker LG. Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis (1994). Ciba Found Symp. 180:210-222; discussion 222-227.

Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins (2006). Biochim Biophys Acta. 1763(7):668-689.

Yin X, Dailey HA. Erythroid 5-aminolevulinate synthase is required for erythroid differentiation in mouse embryonic stem cells (1998). Blood Cells Mol Dis. 24:41-53.

Capítulo II: Deficiencias en la biosíntesis del hemo

II.1: Las Porfirias

Cuando nos referirnos a desórdenes relacionados con el metabolismo del hemo, se deberían considerar tanto la síntesis como la degradación de este grupo prostético. Sin embargo, la degradación no ocurre en forma significativa en los glóbulos rojos (Dailey & Meissner, 2013) y en el hígado las hemoproteínas son rápidamente degradadas en respuesta a las necesidades metabólicas de la célula (Nordman & Puy, 2002). Es por ello que se presta especial atención a alteraciones en la síntesis del grupo hemo, proceso donde los glóbulos rojos y el hígado están involucrados en forma significativa.

Los intermediarios de esta ruta de biosíntesis, los porfirinogenos, son compuestos relativamente reactivos que pueden resultar citotóxicos, debido a su fotoreactividad. De hecho, deficiencias en esta ruta metabólica producen también una enfermedad clínica en animales (Elder et al, 2009) y la inhibición de alguno de los pasos tardíos puede generar muerte foto-inducida en plantas o incluso en microorganismos (Dailey & Meissner, 2013).

Estos desórdenes metabólicos, llamados porfirias, se presentan cuando se genera una deficiencia parcial primaria en alguna de las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo. Esto corresponde a fallas en este metabolismo luego de la etapa limitante del proceso, es decir, luego de la acción de la enzima ALA-S; por lo tanto son siete las enzimas que se pueden ver afectadas. Estos errores resultarán en la acumulación y excreción excesiva de porfirinas y/o sus precursores (Nordmann & Puy, 2002) y están, además, asociados a un aumento secundario en la actividad de ALA-S.

Existen diferentes tipos de porfirias, dependiendo de cuál de estas enzimas esté afectada (Tabla II.1). Se trata en general de enfermedades genéticas y su herencia es principalmente autosómica dominante, pero también existen formas adquiridas o de herencia autosómica recesiva. La mayor parte de las mutaciones responsables de una porfiria en heterocigosis pueden causar pérdida de la función de una proteína específica, pero la actividad enzimática codificada

por el alelo normal usualmente es suficiente para mantener la demanda de hemo dentro de parámetros normales (Kauppinen, 2005). Además, es necesario considerar que las porfirias presentan una penetrancia variable, por tanto sólo el 30%-40% de los individuos portadores de una falla genética padecen síntomas clínicos (Dailey & Meissner, 2013). También es importante tener en cuenta que en el desarrollo de estas enfermedades existe una significativa interrelación entre la carga genética y los factores ambientales, lo cual determinará la expresividad de los síntomas clínicos (Anderson & Kappas, 2010).

Porfiria	Enzima defectuosa	Locus	Modo de herencia	Clasificación	Características
NPA	ALA-D	9q33.1	Autosómica recesiva	Hepática/aguda	Muy rara. Ataques agudos o neuropatía crónica.
PAI	PBG-D	11q23.3	Autosómica dominante	Hepática/aguda	Muy común. Ataques agudos.
PCE	Isomerasa	10q25.3-q26.3	Autosómica recesiva	Eritropoyética/cutánea	Severa fotosensibilidad y hemólisis.
PCT	URO-D	1p34	Autosómica dominante/adquirida	Hepática/cutánea	Muy frecuente. Fragilidad cutánea y enfermedad hepática crónica.
PHE	URO-D	1p34	Autosómica recesiva	Hepatoeritropoyética/ cutánea	Variante homocigota de la PCT. Fotosensibilidad aumentada.
CPH	CPGasa	3q11.2-q12.1	Autosómica dominante	Hepática/mixta	Rara. Ataques agudos y fragilidad cutánea.
PV	PPOX	1q22-23	Autosómica dominante	Hepática/mixta	Ataques agudos y fragilidad cutánea.
PPE	Ferroquelatasa	18q21.3	Autosómica dominante	Eritropoyética/cutánea	Fotosensibilidad y en el 5% de los casos daño hepático.

Tabla II.1: Aspectos generales de las porfirias. Modificado de Kauppinen (2005), Poblete-Gutiérrez et al (2006a) y Poblete-Gutiérrez et al (2006b).

Estos desórdenes se pueden clasificar según el órgano principalmente afectado por la deficiencia enzimática y/o según la sintomatología. En el primer caso, las porfirias pueden ser hepáticas, eritropoyéticas o hepatoeritropoyéticas. En cuanto al síntoma clínico primario, se las divide en cutáneas y agudas, existiendo además algunas porfirias de sintomatología mixta (Tabla II.1).

En las porfirias la deficiencia enzimática y la consiguiente acumulación de intermediarios de este camino metabólico se concentra en un dado tejido. Por tanto, cuando una porfiria es hepática esto indica que el principal sitio de acumulación de porfirinas es el hígado y cuando es eritropoyética, el principal sitio de acumulación son los eritrocitos. No obstante también existe una variante en la que estos intermediarios se acumulan tanto en hígado como en tejido eritroideo (PHE).

Entre las porfirias hepáticas agudas se encuentran la nueva porfiria aguda (NPA) y la porfiria aguda intermitente (PAI). La porfiria variegata (PV) y la coproporfiria hereditaria (CPH), son desórdenes mixtos, es decir, son agudas y pueden también presentar síntomas cutáneos. Otra porfiria hepática es la porfiria cutánea tarda (PCT), que presenta sintomatología cutánea; existe una variante de ésta, de herencia autosómica recesiva, llamada porfiria hepatoeritropoyética (PHE), en la cual la sintomatología es también cutánea, pero no sólo se ve afectado el hígado si no también los eritrocitos. Dentro de las porfirias eritropoyéticas y cutáneas se encuentran la porfiria congénita eritropoyética (PCE) y la protoporfiria eritropoyética (PPE).

Los pacientes con porfirias agudas pueden presentar un amplio espectro de síntomas, como dolores abdominales y cólicos crónicos, náuseas y vómitos, diarrea, taquicardia, hipertensión, convulsiones, debilidad muscular, paraplejia, tetraplejia, entre otros signos neurológicos (Poblete-Gutiérrez et al, 2006b). Los ataques agudos son similares en las cuatro porfirias hepáticas agudas (PAI, CPH, PV y NPA) y estos episodios pueden poner en riesgo la vida del paciente, aunque la baja penetrancia de estas enfermedades hace que los ataques sean infrecuentes (Puy et al, 2010). Las manifestaciones clínicas aparecen luego de la pubertad y son más comunes en mujeres de entre 18 y 40 años de edad (Kauppinen, 2005; Nordmann & Puy, 2002). Los ataques agudos se pueden desencadenar por diversos factores como drogas porfirinogénicas, alcohol, cambios hormonales, infecciones crónicas o recurrentes e ingesta reducida de calorías (Poblete-Gutiérrez et al, 2006b). El dolor puede ceder al cabo de una semana, pero si se suma al cuadro un factor precipitante, la neuropatía vuelve a manifestarse y esta

vez puede conducir a parálisis respiratoria (Kauppinen, 2005). Durante el ataque, los precursores ALA y PBG se excretan de forma masiva desde el hígado; éstos son neurotóxicos y tanto el sistema nervioso autónomo como el periférico, dado que no poseen barreras protectoras, son vulnerables a su acción (Kauppinen, 2005). Si bien no se conoce con certeza el mecanismo por el cual estos precursores provocan disturbios neurológicos, se ha postulado una hipótesis para el posible mecanismo de acción del ALA. Este precursor puede autooxidarse generando especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales aumentan el grado de estrés oxidativo en la célula y esto sería la causa del cuadro observado (Demasi et al, 1997; Onuki et al, 2004).

Las porfirias cutáneas presentan sus síntomas en áreas del cuerpo expuestas al sol, ya que las porfirinas se acumulan debajo de la piel y se excitan con la luz solar, generando al volver a su estado basal, radicales libres. El daño celular provocado por los radicales libres es el responsable de las lesiones cutáneas y de la fotosensibilidad de los pacientes que padecen esta enfermedad. Entonces, en las áreas de la piel expuestas a la radiación solar aumenta la fragilidad cutánea, aparecen vesículas y ampollas, erosiones y excoriación, prurito, hipertricosis, hiperpigmentación y, en el caso de PCE y PHE, leve a severa mutilación (Poblete-Gutiérrez et al, 2006b).

Como se mencionó anteriormente, las porfirias ocurren por deficiencias de las enzimas que actúan luego de la enzima limitante de esta ruta metabólica, ALA-S. No obstante, existe una variante llamada Protoporfiria ligada al cromosoma X (XLP) causada por mutaciones de ganancia de función en el gen de la ALA-S2. Ésta porfiria se presenta con fotosensibilidad desde la infancia y mientras en hombres es severa, en mujeres heterocigotas puede variar desde asintomática hasta severa (Whatley et al, 2008; Blawani et al, 2013).

Además de los desórdenes hasta aquí descriptos, se han reportado combinaciones de porfirias, denominadas porfirias duales. En esta variante inusual, existen deficiencias simultáneas en dos enzimas del camino biosintético del hemo en un individuo o en una familia (Poblete-Gutiérrez et al, 2006b). En la mayoría de los casos se encuentran defectos en la enzima URO-D en

combinación con defectos en PBG-D o CPGasa o PPOX, respectivamente (Rossetti et al, 2006), y, según Poblete-Gutiérrez et al (2006b), esto es razonable ya que la PCT (donde el gen de URO-D se ve afectado) es, en general, el tipo de porfiria más frecuente.

II.2: Porfirias Hepáticas Agudas

Este grupo de porfirias, donde el principal órgano afectado por la deficiencia enzimática es el hígado, se asocia con ataques neurovisceral es, e incluyen a la porfiria aguda intermitente (PAI), la porfiria variegata (PV), la coproporfiria hereditaria (CPH) y la nueva porfiria aguda (NPA). Además del ataque neurovisceral, los pacientes con PV y CPH pueden presentar fotosensibilidad y ampollas en forma crónica (Anderson & Kappas, 2010).

Las porfirias hepáticas agudas (PHA) son desórdenes raros, que afectan a ambos sexos y a todas las etnias por igual (Bickers & Frank, 2007). A excepción de la NPA, los síntomas no suelen aparecer hasta la pubertad o la edad adulta (Doss et al, 2004). Respecto de su prevalencia, este dato aún no se conoce con certeza, principalmente por las diferencias geográficas, los probables casos no diagnosticados o mal diagnosticados y la penetrancia incompleta característica de la PAI, PV y CPH (Frank & Christiano, 1998).

Clínicamente, las PHAs pueden manifestarse con un amplio rango de síntomas no específicos, los síntomas neurovisceral es (Siegesmund et al, 2010). Estos incluyen dolor abdominal, náuseas y vómitos, diarrea, taquicardia, hipertensión, fiebre, debilidad muscular, parálisis respiratoria así como también diversos signos neurológicos y psiquiátricos (Batlle, 1997; Crimlisk, 1997; Bickers & Frank, 2007; Puy et al, 2010). La parálisis respiratoria puede llevar a coma y muerte cuando el paciente no es diagnosticado y/o tratado a tiempo (Lip et al, 1993; Bickers & Frank, 2007), dado que el ataque agudo puede evolucionar hacia una neuropatía motora aguda. Además de la sintomatología hasta aquí descripta, pacientes con PV y CPH pueden manifestar signos cutáneos, que clínicamente resultan muy similares a los presentados por pacientes con PCT, por tal motivo estas dos porfirias son también llamadas porfirias neurocutáneas

(Bickers & Frank, 2007; Siegesmund et al, 2010). Si bien la CPH también puede presentarse con manifestaciones cutáneas, éstas son más comunes y severas entre pacientes PV; por otra parte los ataques agudos no son tan comunes entre pacientes PV en comparación con PAI, NPA y CPH (Fig. II.1).

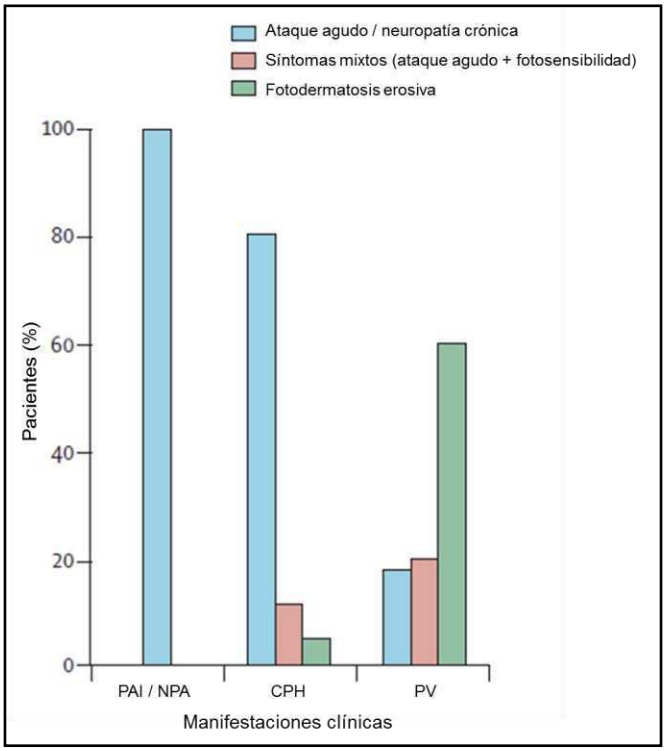


Figura II.1: Características clínicas de las 4 porfirias hepáticas agudas. Modificado de Puy et al (2010).

El mecanismo subyacente al ataque agudo aún no fue descripto con exactitud, sin embargo se conocen una serie de factores ambientales que pueden desencadenarlo, incluyendo el consumo de alcohol, cambios hormonales, infecciones crónicas o recurrentes, dietas o ayuno, así como también una extensa lista de drogas porfirinogénicas (Bieckers & Frank, 2007; Siegesmund et al, 2010; Puy et al, 2010). Estas drogas se metabolizan en hígado a través del sistema citocromo P450, mediante dos posibles mecanismos: algunas drogas llevan a una inactivación potencialmente dañina del citocromo involucrado, mientras que otras sobreactivan la síntesis del citocromo. En ambos casos el efecto sobre el citocromo es acompañado por un aumento de la actividad de ALA-S, aumentando consecuentemente la producción de porfirinas (Hift, 2012).

En algunas situaciones, la droga puede directamente activar a la enzima ALA-S (Thunell, 2006; Thunell et al, 2007).

Por otra parte, existe evidencia acerca de un efecto tóxico directamente ejercido por los compuestos acumulados durante el ataque, especialmente el ALA, en neuronas, así como también un efecto indirecto de la deficiencia de hemo en estas mismas células (Lin et al, 2011). No obstante, un trasplante de hígado resulta efectivo en el tratamiento de la PAI y PV, lo que sugiere que alteraciones en el metabolismo del hemo a nivel hepático son responsables de las manifestaciones clínicas observadas (Soonawalla et al, 2004; Stojeba et al, 2004; Seth et al, 2007; Dar et al, 2010; Wahlin et al, 2010; Hift, 2012).

Cuando se sospecha un ataque agudo, el primer test a realizar es detectar el exceso de PBG en orina, en forma cualitativa. Luego, se determina en forma cuantitativa ALA y PBG urinarios para confirmar el ensayo cualitativo de PBG y para detectar niveles elevados de ALA en pacientes con NPA (Balwani & Desnick, 2012).

Un análisis de porfirinas en orina y heces puede sugerir el tipo de PHA padecida por el paciente (Balwani & Desnick, 2012), aunque este estudio en orina no es suficiente (Puy et al, 2010). La determinación de porfirinas totales en materia fecal, por otra parte, sí puede indicar más acertadamente el tipo de porfiria hepática aguda: protoporfirina IX es indicativo de PV, mientras que hallar coproporfirina indica el desarrollo de CPH y en el caso de PAI, los valores de porfirinas en materia fecal se mantienen normales (Puy et al, 2010).

Otro ensayo empleado para determinar el tipo de porfiria es la determinación del índice de porfirinas plasmáticas (IPP), ya que un pico de emisión a 624-628 nm es característico de PV, sin embargo este índice no permite distinguir entre PAI y CPH cuyos picos de emisión son, en ambos casos, a 618-620nm (Da Silva et al, 1995; Batlle, 1997; Kuhnel et al, 2000; Hift et al, 2004).

Una vez establecido el diagnóstico bioquímico debe realizarse el análisis molecular de los genes involucrados, de modo de concluir definitivamente el diagnóstico diferencial del tipo de porfiria hepática aguda. Esto es especialmente

útil en casos de pacientes en los cuales el ataque agudo ya ocurrió y para identificar miembros de la familia portadores de la falla genética antes de que manifiesten la enfermedad. La descripción de portadores asintomáticos dentro de una familia es de vital importancia dado que de esa forma se los puede aconsejar sobre drogas precipitantes, cambios hormonales, dietas y otros factores que puedan precipitar el ataque agudo (Balwani & Desnick, 2012).

El tratamiento del ataque agudo consiste en la administración de hemina en los casos moderados a severos. En los casos leves también puede emplearse cuando la administración de carbohidratos no es suficiente (Balwani & Desnick, 2012), aunque es probable que cesen de forma espontánea. La hemina actúa en el hígado inhibiendo rápidamente la enzima ALA-S con la consecuente caída de la producción de precursores y porfirinas. Sin embargo, ésta no es capaz de revertir una neuropatía establecida, pero si puede prevenir su inicio y frenar su progresión si es administrada dentro de los primeros días luego del ataque (Melito et al, 2013).

Además es importante suspender inmediatamente la administración de cualquier droga porfirinogénica y corregir dietas hipocalóricas, entre otros. El riesgo de hiponatremia severa, que puede llegar a provocar convulsiones, se evita controlando cuidadosamente el balance de fluidos. Complicaciones cardiovasculares como hipertensión y taquicardia esporádicamente se vuelven severos, casos en los cuales se torna necesario el tratamiento con β-bloqueadores (Puy et al, 2010). Muy raramente se observan crisis adrenérgicas severas acompañando al ataque agudo, en forma de hipertensión, encefalopatía, convulsiones e isquemia; síntomas que pueden controlarse efectivamente con la administración de sulfato de magnesio. En los casos donde se observa parálisis de los músculos intercostales, es necesario recurrir a la ventilación artificial (Puy et al, 2010).

Con el correcto cuidado médico, la mayoría de los pacientes nunca desarrollaran un ataque agudo. En el eventual caso de que esto ocurra, prácticamente en todos los casos se resuelve rápida y efectivamente si se brinda la atención médica adecuada antes de la aparición del daño neurológico (Hift et

al, 2004; Hift & Meissner, 2005; Hift, 2012). El ataque agudo se puede prevenir y es por esto que los ataques severos y/o recurrentes sólo ocurren en aquellos casos donde el paciente nunca fue diagnosticado como porfirico, el ataque no es tratado apropiadamente o no es reconocido a tiempo y en un pequeño número de pacientes con PAI que sufren de ataques frecuentes aun contando con un buen cuidado médico. En este último caso los pacientes pueden llegar progresivamente a la parálisis neurológica y son considerados de mal pronóstico ya que, frecuentemente, luego de algunos años el daño neurológico culmina con la muerte del paciente (Hift, 2010).

A continuación nos referiremos a los distintos tipos de PHAs, a excepción de la Porfiria Variegata, que será abordada en el próximo capítulo (Introducción, Capítulo III).

II.2.1: Porfiria Aguda Intermitente

La porfiria aguda intermitente es el tipo de PHA más frecuente y más severa. Se produce por mutaciones en el gen que codifica para la enzima PBG-D, que resultan en una deficiencia parcial de esta enzima, cuya actividad se reduce a un 50%. Es más común en mujeres que en hombres, debido a que los cambios hormonales y los ayunos prolongados son más habituales en el primer grupo. Se estima que afecta a 1 en 75.000 personas en Europa, con excepción de Suecia donde la frecuencia es aún mayor debido a un efecto fundador (Andersson et al, 2003; Bylesjo et al, 2009; Siegesmund et al, 2010); mientras que en Argentina su prevalencia es de 1:125.000 (Parera et al, 2003)

La típica manifestación clínica de esta enfermedad, que usualmente se relaciona con otros factores precipitantes como drogas y el estado nutricional, es una disfunción neurológica que puede afectar al sistema nervioso periférico, autónomo y central (Anderson & Kappas, 2010). El signo que inicia el ataque agudo es el dolor abdominal, pero también pueden aparecer vómitos, constipación o diarrea, distensión abdominal, retención urinaria, incontinencia, dolor en las extremidades, espalda y pecho. Normalmente, la neuropatía motora comienza con las extremidades superiores, con dolores y debilidad muscular. La

neuropatía axonal, que se presenta en forma de debilidad muscular, es característica de ataques severos o prolongados y puede evolucionar a cuadriparesia, parálisis respiratoria y paro. En ciertos casos aparecen convulsiones durante el ataque. Otras complicaciones a largo plazo incluyen falla renal crónica, carcinoma hepatocelular e hipertensión. En el caso de complicaciones renales serias puede producirse un descenso en la excreción de uroporfirina, lo que genera síntomas cutáneos, que normalmente no aparecen en el desarrollo de la PAI. La mayoría de los pacientes PAI experimentan uno o algunos pocos ataques durante su vida y solamente el 5%, principalmente las mujeres por las razones ya expuestas, pueden presentar ataques recurrentes que persistan con los años (Whatley & Badminton, 2005; Anderson & Kappas, 2010).

Los pacientes con PAI manifiesta excretan cantidades elevadas de ALA, PBG y porfirinas, principalmente uroporfirina, en la orina durante el ataque y en algunas ocasiones, entre ataques (Anderson & Kappas, 2010). También se emplea la determinación de la actividad enzimática PBG-D como herramienta diagnóstica, aunque este dato no resulta muy confiable, ya que existen individuos normales con bajos valores de actividad enzimática e individuos portadores de este defecto con valores de actividad altos. (Astrup, 1978; Lamon et al, 1979; Parera et al, 2003). En los familiares asintomáticos, el aumento de ALA y PBG en orina se observa sólo en el 10 % de los casos y la actividad enzimática PBG-D en eritrocitos no siempre se encuentra muy disminuida, con lo cual se vuelve de suma importancia el uso de técnicas moleculares para completar el diagnóstico diferencial en estos casos (Anderson et al, 2005; Anderson & Kappas, 2010).

La enzima PBG-D, que cataliza la condensación de 4 moléculas de PBG para generar HMB, es la que se encuentra alterada en esta porfiria. El gen que codifica para esta enzima se encuentra en el cromosoma 11, posición 11q23.3. Presenta una longitud de 10024pb, con 15 exones y 14 intrones que pueden llegar a una extensión de 2kb (Yoo et al, 1993). Un único gen regula la expresión de dos isoformas de esta enzima, una ubicua y una eritroidea. La diferencia entre las isoenzimas es a nivel del splicing del mensajero, que en ambos tejidos ocurre en

modo diferente, permitiendo así distintos tipos de regulaciones del camino del hemo (Chretien et al, 1988). Este splicing diferencial se logra a partir de dos trasncriptos generados por dos promotores presentes en el gen, separados entre sí por 3kb: mientras que el promotor ubicado río arriba es activo en todos los tejidos, el promotor presente río abajo es especifico de células eritroideas (Dynan, 1986; Mignotte et al, 1989). Las dos isoformas difieren en 17 aminoácidos ubicados en extremo N-terminal, residuos cuya finalidad aún se desconoce (Raich, 1986; Grandchamp, 1987).

Se han descripto hasta el momento más de 300 mutaciones diferentes en este gen, responsables de PAI (Anderson & Kappas, 2010; Human Genome Mutation Database http://www.hgmd.org). Estas incluyen mutaciones missense, nonsense, mutaciones de splicing, deleciones e inserciones. La gran parte de estas fallas genéticas sólo se han hallado en una familia (Kauppinen et al, 1995; Puy et al, 1997), excepto en el caso de Noruega y Suecia donde se ha reportado un efecto fundador para la mutación p.W198X. Si bien existe otra mutación, p.R116W, también muy prevalente en varias poblaciones europeas, se demostró que no se debe a ancestralidad común sino a que se ubica en un dinucleotido CpG, el cual constituye un hot-spot mutacional (Tjensvoll et al, 2003). En Argentina, la mutación p.G111R es altamente prevalente (más del 50% de la población PAI del país) y se demostró que su origen se debe a un efecto fundador, al analizar una serie de marcadores moleculares intra y extra-génicos (De Siervi et al, 1999; Cerbino, 2011).

Hasta el momento no se ha establecido una relación genotipo-fenotipo. Esto se debe a que una misma mutación, en individuos diferentes, produce distintos fenotipos (Grandchamp, 1998).

II.2.2: Coproporfiria Hereditaria

La coproporfiria hereditaria se produce por deficiencias en la actividad de la enzima CPGasa, que cataliza la decarboxilación del coprogen III en el camino biosintético del hemo. Es un desorden de carácter autosómico dominante, de baja penetrancia y más frecuente en mujeres que en hombres, por los mismos

motivos que en PAI. No suele presentarse antes de la pubertad y su incidencia es muy baja, existen reportados menos de 50 casos (Siegesmund et al, 2010). En Argentina su prevalencia es muy baja, sólo se diagnosticaron 17 familias (Stella et al, 1998; Melito et al, 2006).

La sintomatología neurovisceral característica no es distinguible de la sufrida por pacientes con otras porfirias agudas. Dolor abdominal, vómitos, constipación, neuropatías y manifestaciones psiquiátricas son comunes. Los mismos factores precipitantes de la PAI actúan en esta porfiria. Pueden aparecer lesiones cutáneas, pero más esporádicamente que en pacientes PV (Fig. II.1). A largo plazo, es recomendable controlar la función renal y hepática, así como también el monitoreo de carcinoma hepatocelular (Anderson & Kappas, 2010).

Bioquímicamente, se caracteriza por una elevada excreción de coproporfirina, especialmente del isómero III, en orina y materia fecal. Durante el ataque agudo, se encuentran ALA y PBG en exceso en orina, que caen rápidamente luego del ataque, más aún que en pacientes con PAI (Anderson & Kappas, 2010). La excreción urinaria de coproporfirina es más persistente en el tiempo. En cuanto a la copro hallada en materia fecal, una elevada relación entre copro III y copro I puede ser útil para detectar casos latentes (Blake et al, 1992).

El gen que codifica para esta enzima, la CPGasa, se encuentra en el cromosoma 3, específicamente en la posición 3q11.2-q12.1 (Cacheux et al, 1994). El gen se extiende unas 14kb y consiste de 7 exones y 6 intrones, que pueden llegar a tener una longitud de 5kb (Delfau-Larue et al, 1994).

Hasta la fecha se reportaron alrededor de 64 mutaciones responsables de CPH (Rosipal et al, 1999; Human Genome Mutation Database http://www.hgmd.org). Entre ellas encontramos mutaciones missense y nonsense, grandes deleciones, pequeñas deleciones e inserciones, indels y mutaciones de splicing.

Como ya se mencionó, esta porfiria es de herencia autosómica dominante; sin embargo existen casos, aún más raros, donde se detectan mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta. Esta variante recesiva, donde la actividad enzimática puede descender hasta un 98% del valor normal

(Grandchamp et al, 1980) y puede manifestarse antes de la pubertad, es llamada hardeporfiria dado que estas mutaciones impiden que se complete la decarboxilación catalizada por la CPGasa, formándose así la harderocopropofirina, una porfirina con 3 cadenas laterales carboxílicas. Esta porfirina atípica es hallada en orina y heces. Además, en esta variante de la CPH puede estar comprometido el tejido eritropoyético (Schmitt et al, 2005; Anderson & Kappas, 2010).

II.2.3: Nueva Porfiria Aguda

La nueva porfiria aguda es una enfermedad extremadamente rara, ya que hasta el momento hay reportados menos de 10 casos a nivel mundial (Siegesmund et al, 2010). De hecho, todos los casos descriptos hasta el momento son en hombres (Plewinska et al, 1991; Ishida et al, 1992; Akagi et al, 2000; Doss et al, 2004; Akagi et al, 2006) y la manifestación de la enfermedad puede ser tanto antes como después de la pubertad.

Esta porfiria caracterizada por una deficiencia severa en la enzima ALA-D se presenta con los mismos síntomas que las otras porfirias agudas. Además, no se observa el desarrollo de manifestaciones cutáneas.

Bioquímicamente, se puede diferenciar de la PAI en función de la excreción de PBG, que en el caso de la NPA se mantiene prácticamente en valores normales. En orina se encuentra un aumento apreciable de copro III. La caída en la actividad enzimática de ALA-D es muy marcada tanto en eritrocitos como en otros tejidos, con valores menores al 2% de actividad residual (Anderson & Kappas, 2010).

El gen de la ALA-D está ubicado en el cromosoma 9 (9q33.1) y su estructura genómica es de 16kb, con 12 exones. Cuenta con dos promotores y dos exones alternativos no codificantes, 1A y 1B, que generan el transcripto ubicuo y el eritroideo, respectivamente (Kaya et al, 1994); aunque ambos codifican para la misma secuencia de aminoácidos dado que la traducción comienza en el exón 2. Entre los casos reportados a nivel mundial se han descripto 12 alelos mutantes (Human Genome Mutation Database http://www.hgmd.org). Al ser una

enfermedad de herencia autosómica recesiva, el propósito debe heredar un alelo mutado de cada padre y aunque estos no son sintomáticos, normalmente sus valores de actividad enzimática son de alrededor del 50% (Anderson & Kappas, 2010).

II.4: Referencias

Akagi R, Kato N, Inoue R, Anderson KE, Jaffe EK, Sassa S. delta-Aminolevulinate dehydratase (ALAD) porphyria: the first case in North America with two novel ALAD mutations (2006). Mol Genet Metab. 87(4):329-36.

Akagi R, Nishitani C, Harigae H, Horie Y, Garbaczewski L, Hassoun A, Mercelis R, Verstraeten L, Sassa S. Molecular analysis of delta-aminolevulinate dehydratase deficiency in a patient with an unusual late-onset porphyria (2000). Blood. 96(10):3618-23.

Andersson C, Innala E, Backstrom T. Acute intermittent porphyria in women: clinical expression, use and experience of exogenous sex hormones. A population-based study in northern Sweden (2003). J Intern Med 254:176–83.

Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach CA, Pimstone NR, Desnick RJ. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias (2005). Ann Intern Med. 142(6):439-450.

Anderson KE, Kappas A. The porphyrias (2010). In: BC Decker inc (ed): Metabolism, 33(4). DOI: 10.2310/7900.1162.

Astrup EG. Family studies on the activity of uroporphynogen I synthase in the diagnosis of acute intermittent porphyria (1978). Clin Sci Mol Med. 54:251-256.

Balwani M, Bloomer J, Desnick R. Porphyrias Consortium of the NIH-Sponsored Rare Diseases Clinical Research Network. X-Linked Protoporphyria. (2013). In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121284/

Balwani M, Desnick RJ. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment (2012). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 19-27. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.19.

Batlle AM del C. El laboratorio de las Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular (1997). Actualizaciones médico-bioquímicas. Acta Bioquím Clín Latinoam. 145-171.

Bickers DR, Frank J. The porphyrias (2007). In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller A, Leffell DJ, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. McGraw Hill.pp. 1228–1256.

Bissell DM, Wang B, Cimino T, Lai J. Hereditary Coproporphyria (2012). In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013.Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114807/.

Blake D, McManus J, Cronin V, Ratnaike S. Fecal coproporphyrin isomers in hereditary coproporphyria (1992). Clin Chem. 38(1):96-100.

Bylesjo I, Wikberg A, Andersson C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a populationbased study (2009). Scand J Clin Lab Invest 69:612–618.

Cacheux V, Martasek P, Fougerousse F, Delfau MH, Druart L, Tachdjian G, Grandchamp B. Localization of the human coproporphyrinogen oxidase gene to chromosome band 3q12 (1994). Hum. Genet. 94: 557-559.

Cerbino GN. Alta prevalencia de la mutación p.G111R en pacientes argentinos con Porfiria Aguda Intermitente. Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la PBG-D. Estudios bioquímicos y genéticos (2011). Tesina de grado

presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para optar por el título Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Chernova T, Nicotera P, Smith AG. Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of N-methyl-d-aspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons (2006). Mol Pharmacol. 69:697–705.

Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, Romeo PH. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression (1988). Proc Natl Acad Sci USA. 85(1):6-10.

Crimlisk HL. The little imitator-porphyria: a neuropsychiatric disorder (1997). J Neurol Neurosurg Psychiatry 62:319–328.

Da Silva V, Simonin S, Deybach JC, Puy H, Nordmann Y. Variegate porphyria: diagnostic value of fluorometric scanning of plasma porphyrins (1995). Clin Chim Acta 238:163‑168.

Dailey HA, Meissner PN. Erythroid heme biosynthesis and its disorders (2013). Cold Spring Harb Perspect Med. 3(4):a011676. DOI: 10.1101/cshperspect.a011676.

Dar FS, Asai K, Haque AR, Cherian T, Rela M, Heaton N. Liver transplantation for acute intermittent porphyria: a viable treatment? (2010). Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 9(1):93-96.

De Siervi A, Rossetti MV, Parera V, Astrin K, Aizencang G, Glass I, Battle A, Desnick R. Identification and characterization of HMBS mutations causing AIP; evidence for an ancestral founder of the common G111R mutation (1999). Am. J. Med. Genet. 86:366-375.

Delfau-Larue MH, Martasek P, Grandchamp B. Coproporphyrinogene oxidase: gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping (1994). Hum. Molec. Genet. 3:1325-1330.

Doss MO, Stauch T, Gross U, Renz M, Akagi R, Doss-Frank M, Seelig HP, Sassa S. The third case of Doss porphyria (delta-amino-levulinic acid dehydratase deficiency) in Germany (2004). J Inherit Metab Dis. 27:529–536.

Dynan WS. Promoter for housekeeping genes (1986). Trends Genet. 2, 196-197.

Elder GH, Gouya L, Whatley SD, Puy H, Badminton MN, Deybach JC. The molecular genetics of erythropoietic protoporphyria (2009). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 55:118–126.

Frank J, Christiano AM. The genetic basis of the porphyrias (1998). Skin Pharmacol Appl Skin Physiol;11:297–309.

Grandchamp B, Deybach JC, Grelier M, de Verneuil H, Nordmann Y. Studies of porphyrin synthesis in fibroblasts of patients with congenital erythropoietic porphyria and one patient with homozygous coproporphyria (1980). Biochim Biophys Acta. 29(3):577-586.

Grandchamp B. Acute Intermittent Porphyria (1998). Semin Liver Dis. 18, 17-24.

Hift RJ, Davidson BP, van der Hooft C, Meissner DM, Meissner PN. Plasma fluorescence scanning and fecal porphyrin analysis for the diagnosis of Variegate Porphyria: precise determination of sensitivity and specificity with detection of protoporphyrinogen oxidase mutations as a reference standard (2004). Clin Chem 50:915‑923.

Hift RJ, Meissner D, Meissner PN, A systematic study of the clinical and biochemical expression of Variegate Porphyria in a large South African family (2004). Br J Dermatol 151:465–471.

Hift RJ, Meissner PN, An analysis of 112 acute porphyric attacks in Cape Town, South Africa: Evidence that acute intermittent porphyria and Variegate Porphyria differ in susceptibility and severity (2005). Medicine (Baltimore) 84:48–60.

Hift RJ. The Acute Porphyrias (2012). European Gastroenterology and Hepatology Review 8(1):17-21.

Ishida N, Fujita H, Fukuda Y, Noguchi T, Doss M, Kappas A, Sassa S. Cloning and expression of the defective genes from a patient with delta-aminolevulinate dehydratase porphyria (1992). J Clin Invest. 89(5):1431-1437.

Kauppinen R, Mustajoki S, Pihlaja H, Peltonen L and Mustajoki P. AIP in Finland: 19 mutations in PBG-D gene (1995). Hum. Mol. Genet. 4:215-222.

Kauppinen R. Porphyrias. Seminar (2005). Lancet 365:241-52.

Kaya AH, Plewinska M, Wong DM, Desnick RJ, Wetmur JG. Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs (1994). Genomics. 9(2):242-248.

Kuhnel A, Gross U, Doss MO. Hereditary coproporphyria in Germany: clinical-biochemical studies in 53 patients (2000). Clin Biochem 33:465‑473.

Lamon JM, Frykholm BC, Hess RA, Tschudy DP. Hematin therapy for acute porphyria (1979). Medicine (Baltimore). 58(3):252-269.

Lin CSY, Lee MJ, Park SB, Kiernan MC, Purple pigments: The pathophysiology of acute porphyric neuropathy (2011). Clin Neurophysiol 122:2336–2344.

Lip GY, McColl KE, Moore MR. The acute porphyrias (1993). Br J Clin Pract 47:38–43.

Melito VA, Rossetti MV, Batlle A, Parera VE. Biochemical and Clinical Permanent Remission in Argentinean AIP Patients. An Overview of the Last 36 Years (2013). Clin Chem Lab Med. 51(5):eA38.

Melito VA, Rossetti MV, Parera VE, Batlle A. Porfirias poco frecuentes. Casos detectados en la población argentina (2006). Rev argent dermatol [online]. 87(4):248-263. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2006000300003&Ing=es&nrm=iso.

Mignotte V, Elquet JF, Raich N, Romeo PH. Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythoid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6548-6552.

Muñoz Morón U, Castilla-Cortázar I. Protection against oxidative stress and "IGF-I deficiency conditions", antioxidant enzyme (2012). Prof. Mohammed Amr El-Missiry (Ed.). DOI: 10.5772/51047. http://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/protection-against-oxidative-stress-and-igf-i-deficiency-conditions-.

Nordmann Y, Puy H. Human hereditary hepatic porphyrias (2002). Clin Chim Acta. 325:17-37.

Parera VE, De Siervi A, Varela L, Rossetti MV, Batlle AM. Acute porphyrias in the Argentinean population: a review (2003). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 49(4):493-500.

Plewinska M, Thunell S, Holmberg L, Wetmur JG, Desnick RJ. delta-Aminolevulinate dehydratase deficient porphyria: identification of the molecular lesions in a severely affected homozygote (1991). Am J Hum Genet. 49(1):167-174.

Poblete-Gutiérrez P, Badeloe S, Wiederholt T, Merk HF, Frank J. Dual porphyrias revisited (2006a). Exp Dermatol 15:685-691.

Poblete-Gutiérrez P, Wiederholt T, Merk HF, Frank J. The porphyrias: clinical presentation, diagnosis and treatment (2006b). Eur J Dermatol. 16 (3):230-240.

Puy H, Deybach JC, Lamoril J, Robreau AM, Silva VD, Gouya L, Grandchamp B, Nordmann Y. Molecular epidemiology and diagnosis of PBGD gene defects in AIP (1997). Am. J. Hum. Genet. 60:1373-1383.

Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias (2010). Lancet 375:924-937.

Rosipal R, Lamoril J, Puy H, Da Silva V, Gouya L, De Rooij FW, Te Velde K, Nordmann Y, Martàsek P, Deybach JC. Systematic analysis of coproporphyrinogen oxidase gene defects in hereditary coproporphyria and mutation update (1999). Hum Mutat. 13:44–53.

Rossetti MV, Melito VA, Gerez E, Batlle A, Parera VE. Coexistencia de porfirias con sintomatología aguda y cutánea en dos familias (2006). Medicina, Buenos Aires. 66(II):164.

Schmitt C, Gouya L, Malonova E, Lamoril J, Camadro JM, Flamme M, Rose C, Lyoumi S, Da Silva V, Boileau C, Grandchamp B, Beaumont C, Deybach JC, Puy H. Mutations in human CPO gene predict clinical expression of either hepatic hereditary coproporphyria or erythropoietic harderoporphyria (2005). Hum Mol Genet. 14(20):3089-3098.

Sengupta A, Hon T, Zhang L. Heme deficiency suppresses the expression of key neuronal genes and causes neuronal cell death (2005). Mol Brain Res. 137:23–30.

Seth AK, Badminton MN, Mirza D, Russell S, Elias E. Liver transplantation for porphyria: who, when, and how? (2007). Liver Transpl. 13(9):1219-1227.

Soonawalla ZF, Orug T, Badminton MN, Elder GH, Rhodes JM, Bramhall SR, Elias E. Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria (2004). Lancet. 363(9410):705-706.

Stella AM, Parera VE, Melito VA, Noriega G, Muramatsu H, Tomassi L, Magnin PH, Battle AMC. Coproporfiria hereditaria. Estudios bioquímicos en 7 pacientes sintomáticos y familiares (1998). Rev argent dermatol. 79(3):144-152.

Stojeba N,Meyer C, Jeanpierre C, Perrot F, Hirth C, Pottecher T, Deybach JC. Recovery from a Variegate Porphyria by a liver transplantation (2004). Liver Transpl. 10(7):935-938.

Thunell S. (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria (2006). Physiol Res 55(2):S43–66.

Thunell S, Pomp E, Brun A, Guide to drug porphyrogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias (2007). Br J Clin Pharmacol. 64:668–679.

Tjensvoll K, Bruland O, Floderus Y, Skadberg Ø, Sandberg S, Apold J. Haplotype analysis of Norwegian and Swedish patients with acute intermittent porphyria (AIP): Extreme haplotype heterogeneity for the mutation R116W (2003). Dis Markers. 19(1):41-46.

Wahlin S, Harper P, Sardh E, Andersson C, Andersson DE, Ericzon BG. Combined liver and kidney transplantation in acute intermittent porphyria (2010). Transpl Int. 23(6):e18-21. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.01035.x. E.

Whatley SD, Badminton MN. Acute Intermittent Porphyria (2005; Updated 2013). In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al, editors. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1193/.

Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, Grandchamp B, Beaumont C, Badminton MN, Elder GH, Holme SA, Anstey AV, Parker M, Corrigall AV, Meissner PN, Hift RJ,Marsden JT, Ma Y, Mieli-Vergani G, Deybach JC, Puy H. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload (2008). Am J Hum Genet. 83(3):408-414. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.08.003.

Yoo HW, Warner CA, Chen CH, Desnick RJ. Hydroximethylbilane synthase: complete genomic sequence and amplifiable polymorphisms in the human gene (1993). Genomics 15, 21-29.

Capítulo III: Protoporfirinógeno oxidasa y Porfiria Variegata

III.1: Caracterización de la enzima PPOX

La PPOX es la enzima encargada de catalizar el séptimo paso del camino de biosíntesis del hemo, el cual consiste en la oxidación del protogen IX a proto IX. Esta reacción de aromatización ocurre mediante la eliminación de seis átomos de hidrógeno y requiere de oxígeno molecular y de FAD como cofactor (Dailey & Dailey, 1996).

La PPOX es una flavoproteína de 477 aminoácidos y de un peso molecular de 50,8 kDa (Morgan et al, 2004), la cual es capaz de unir una molécula de FAD por monómero de forma no covalente. En eucariotas se encuentra anclada en la membrana interna de la mitocondria, con el sitio catalítico expuesto hacia el espacio intermembrana (Dailey & Dailey, 1996). De acuerdo a la estructura cristalográfica de la PPOX humana, esta proteína se compone por tres dominios: un dominio de unión al cofactor, un dominio de unión al sustrato y un dominio de unión a membrana (Fig. III.1); estos dominios presentan las mismas características que aquellos descriptos para Nicotiana tabacum (Koch et al, 2004; Qin et al, 2011).

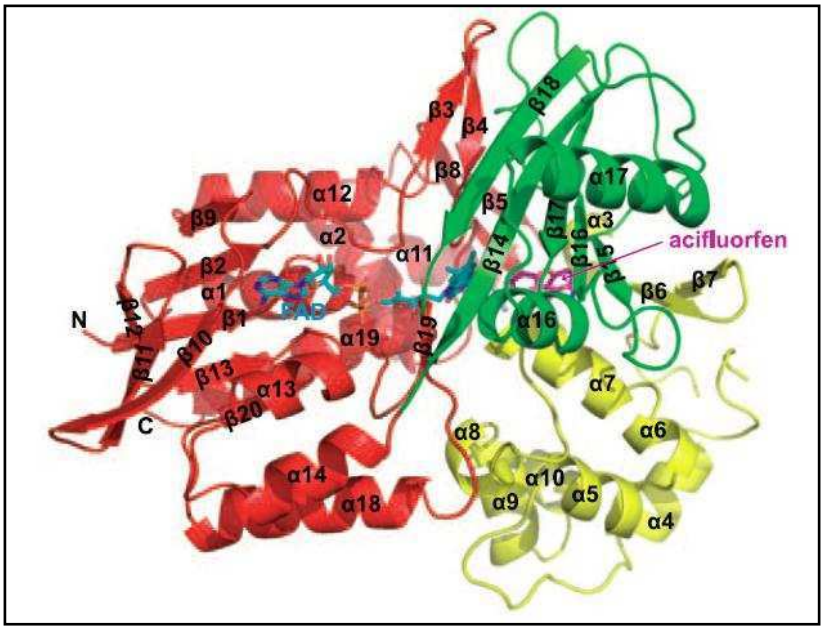


Figura III.1: Estructura de la PPOX humana. Se muestran el dominio de unión a sustrato (verde), unión a FAD (rojo) y de unión a membrana (amarillo). También se observan el cofactor FAD (celeste) y el inhibidor acifluorfen (violeta). N: extremo N-terminal; C: extremo C-terminal. Qin et al, 2011.

El dominio de unión al cofactor FAD está compuesto por 13 hojas plegadas β y 8 α-hélices, involucrando a los residuos 1 a 91, 210 a 310 y 417 a 477. La estructura de este dominio es similar al descripto para la misma enzima en otras especies como Nicotiana tabacum, Myxococcus xanthus y Bacillus subtilis (Koch et al, 2004; Corradi et al, 2006; Qin et al, 2010). La molécula de FAD, como se observa en la Figura III.1, se encuentra enterrada en el dominio y es reconocida por la estructura secundaria canónica βαβ (Wierenga et al, 1986). Además, la enzima humana comparte una homología significativa con un cierto número de oxidasas que contienen un motivo de unión a FAD en su extremo N-terminal (Dailey & Dailey, 1996).

El dominio de unión a sustrato, conformado por los aminoácidos 311 a 416, consta de 5 hojas β rodeadas por 3 α-hélices. El sustrato interactúa directamente con los aminoácidos F98, G332 y R97, entre otros (Fig. III.2). Cierto número de aminoácidos aromáticos y alifáticos forman parte de este dominio.

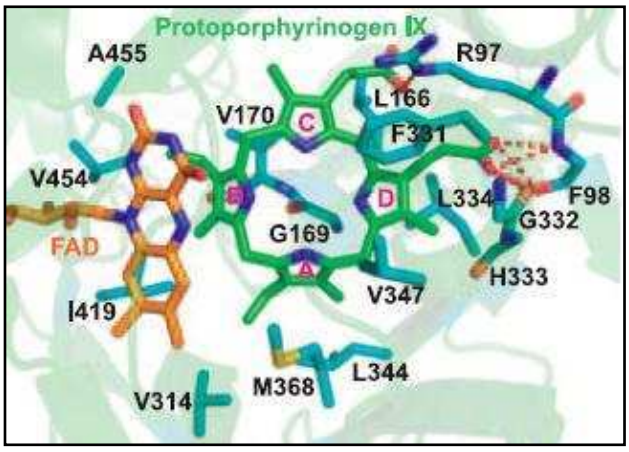


Figura III.2: Bolsillo de unión a sustrato. Los principales residuos involucrados en la interacción con el sustrato se muestran en celeste. Qin et al, 2011.

El dominio de unión a membrana contiene un canal en forma de U abierto de un lado, desde el sitio activo de la PPOX hacia la membrana de la mitocondria, que tendría como función canalizar a la proto para que ésta sirva como sustrato para la siguiente enzima de este camino biosintético, la Ferroquelatasa (Koch et al, 2004). Este dominio que comprende a los

aminoácidos 92 a 209, está conformado por 8 α-hélices y 2 hojas β (Qin et al, 2011).

La PPOX había sido descripta como un homodímero en ensayos de cromatografía de exclusión por tamaño (Dailey & Dailey, 1996), sin embargo los estudios cristalográficos y de cromatografía en presencia de detergente realizados con la PPOX humana revelan la presencia de una única molécula. De esta forma, Qin y colaboradores (2011) concluyen que in vitro la PPOX se comporta como monómero, aunque no descartan la posibilidad de que in vivo forme dímeros, proceso que podría ser mediado por la ferroquelatasa en la membrana interna de la mitocondria (Ferreira et al, 1988; Proulx et al, 1993; Koch et al, 2004).

En cuanto a su mecanismo de acción, éste requiere de tres moléculas de oxígeno como aceptor final de electrones, tanto en eucariotas como en la mayoría de los procariotas aeróbicos. Además involucra tres pasos de óxido-reducción de dos electrones cada una, que conforman finalmente la eliminación de los seis átomos de hidrógeno (Dailey & Dailey, 1996).

La mayoría de las proteínas destinadas a mitocondrias contienen una presecuencia, una secuencia clivable específica hacia el N-terminal que les confieren la señal de importación y localización mitocondrial. A pesar de que el extremo N-terminal de la PPOX contiene un posible dominio de importación y localización mitocondrial dado que está compuesto por tres aminoácidos básicos y ninguno ácido y además es capaz de formar una α-hélice (von und zu Fraunberg, et al, 2003), no contiene una presecuencia clivable, sino que aparentemente contendría señales de importación mitocondrial en su extremo N-terminal o bien señales más distales (Morgan, et al, 2004). Aún hoy no existe consenso acerca de cuáles son los residuos involucrados en esta señalización, pero aparentemente todos los autores estarían de acuerdo en que existe una señal principal en el N-terminal que interactuaría con otras señales internas (von und zu Fraunberg, et al, 2003; Morgan, et al, 2004; Davids, et al, 2006).

Davids y colaboradores (2006) proponen un posible mecanismo de importación y localización en mitocondrias para la PPOX (Fig. III.3). La enzima se sintetiza en el citoplasma y post traduccionalmente se dirige a una zona central

de entrada a la mitocondria por una chaperona como Hsc 70. En esta zona está ubicado el complejo TOM (complejo de translocasas de la membrana mitocondrial externa). Los primeros 17 aminoácidos del N-terminal de la PPOX se unen al complejo TOM 20-22 y así transloca al compartimiento mitocondrial correcto, donde la asociación a membrana es dirigida por un motivo hidrofóbico o por una secuencia de localización interna. En ausencia de los primeros 17 aminoácidos, la translocación ocurre por una vía alternativa que involucra al complejo TOM 34-70. Una vez atravesado el poro general de ingreso (GIP) la PPOX es dirigida por complejos de pequeñas translocasas de la membrana mitocondrial interna (TIM) a través del espacio intermembrana. Así se inserta en la membrana interna vía translocasas transportadoras (complejo TIM-22). Aún no se conoce en qué momento de la síntesis o de la translocación de la enzima se incorpora el FAD.

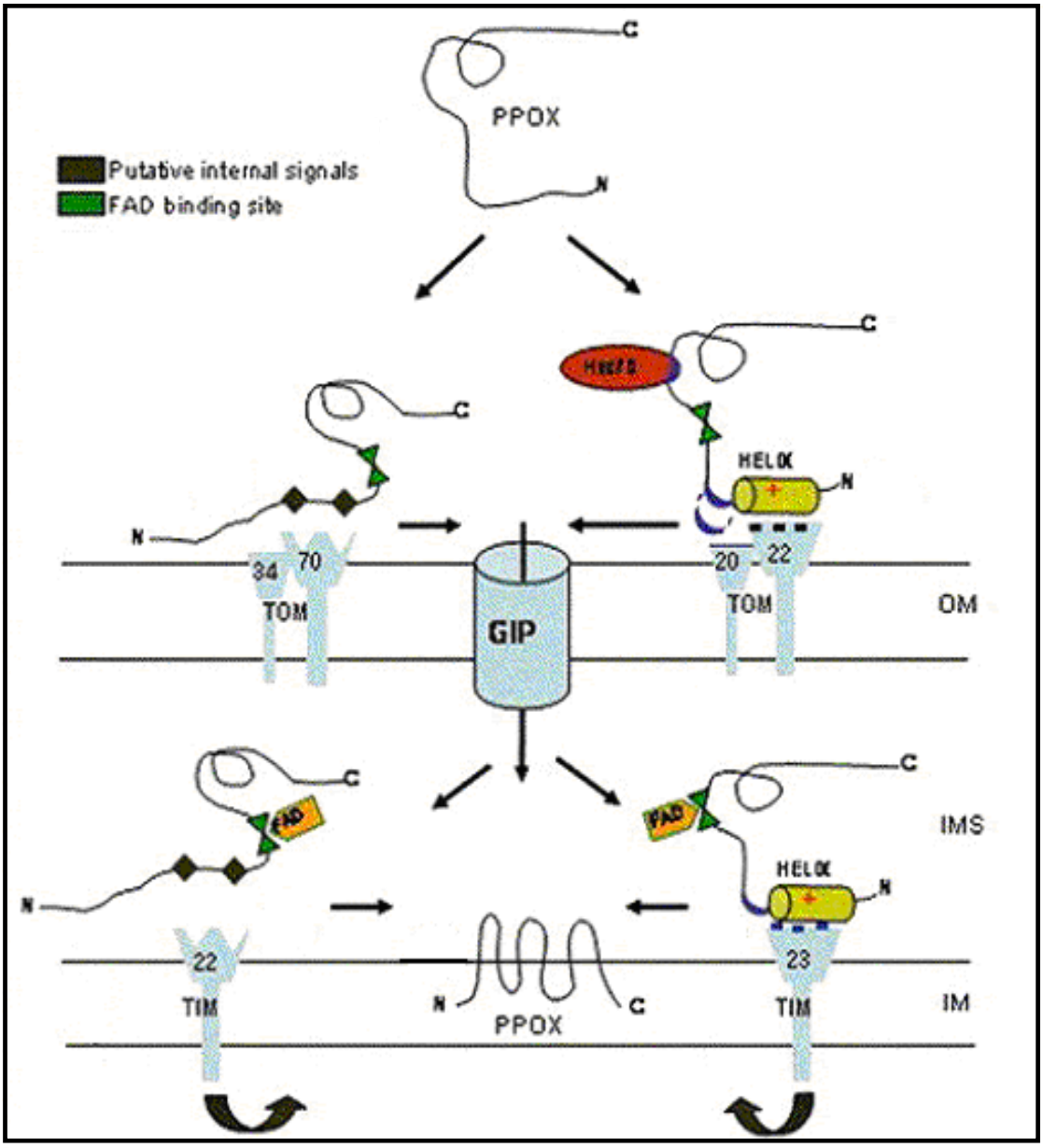


Figura III.3: Mecanismo de targeting mitocondrial de la PPOX propuesto por Davids, et al (2006) (modificado). En el esquema se considera que el FAD se incorpora una vez que la PPOX ha pasado a través del poro general de ingreso. OM: membrana externa mitocondrial, IMS: espacio intermembrana, IM: membrana interna mitocondrial.

III.2: Biología molecular del gen PPOX

El gen de la PPOX humana se ha mapeado en la banda 22-23 del brazo largo del cromosoma 1 (Roberts et al, 1995; Taketani et al, 1995). En una primera instancia, de acuerdo a los ensayos de ligamiento realizados por de Bissbort y colaboradores (1988), se pensó que este locus se encontraba ligado al gen de α-1 antitripsina en el cromosoma 14, pero Taketani y colaboradores (1995), demostraron que esto no es así, argumentando que la posible diferencia de resultados se debería a que el producto de un gen del cromosoma 14 podría estar interactuando con la PPOX afectando su expresión o su actividad.

El gen contiene 13 exones en una longitud de 5,5kb (Puy et al, 1996), de los cuales los últimos 12 son codificantes (Fig. III.4) y todas las uniones intrón-exón contienen secuencias consenso de splicing (Roberts, et al, 1995; Taketani, et al, 1995). Se transcribe generando un ARNm de 1,8 kb (Dailey & Dailey, 1996), el cual se sintetiza como el mismo transcripto en células eritroideas y no eritroideas, y además contiene dos posibles sitios de inicio de la transcripción (Taketani et al, 1995). Se ha demostrado que el exón 1 no codificante aumenta la actividad del promotor en tejido eritroideo gracias a que posee dos sitios de unión a GATA-1, un conocido modulador de la regulación transcripcional eritro-específica. Estos sitios son esenciales para la expresión de la PPOX en este tejido, pero no poseen un rol regulatorio en la expresión constitutiva (de Vooght et al, 2007).

Se han identificado una amplia variedad de mutaciones diferentes en el gen de la PPOX responsables de PV, que a la fecha se aproximan a 150 (Human Genome Mutation Database http://www.hgmd.org). Éstas incluyen mutaciones nonsense/missense (75), de splicing (24), pequeñas y grandes deleciones (31 y 1), pequeñas inserciones (16), pequeños indels (1) y grandes inserciones/duplicaciones (1). Esta gran variedad de mutaciones refleja el grado de heterogeneidad molecular de la enfermedad.

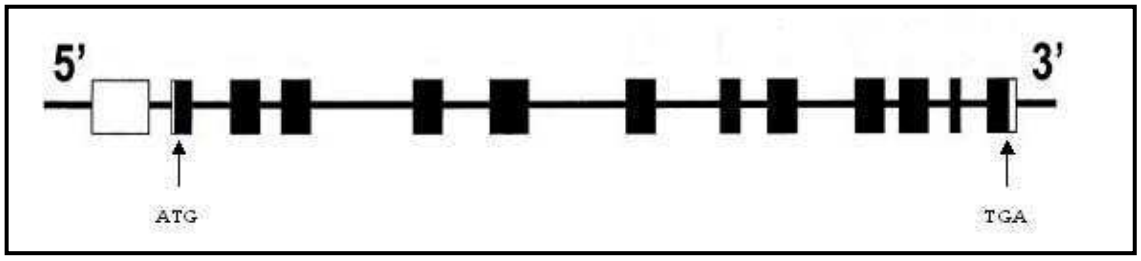


Figura III.4: Organización del gen de la PPOX humana. Los rectángulos llenos representan a los exones codificantes, mientras que los rectángulos vacíos representan a regiones no codificantes. Se muestran también los codones de inicio (ATG) y de terminación (TGA). Modificado de Whatley et al, 1999.

III.3: Porfiria Variegata

Deficiencias en la actividad de la PPOX son responsables de la aparición de porfiria variegata (PV). Esta es una porfiria hepática mixta, de herencia autosómica dominante, de penetrancia incompleta y generalmente de manifestación adulta, en la cual la actividad de la enzima se encuentra disminuida aproximadamente al 50%.

La manifestación clínica de esta enfermedad es variable, dado que los síntomas agudos y cutáneos ocurren en conjunto o por separado en los individuos afectados (Poblete-Gutiérrez et al, 2006a). Entre las manifestaciones cutáneas se pueden mencionar la fragilidad cutánea, fotosensibilidad, ampollas y cambios en la pigmentación en zonas expuestas a la luz solar (Batlle, 1997), debido a la acumulación debajo de la piel de copro y protoporfirina. En cuanto a los síntomas neurológicos se encuentran dolores abdominales intermitentes, trastornos agudos, constipación, vómitos, hipertensión, taquicardia, fiebre, entre otros (Kappas et al, 1995; Nishimura et al, 1995; Kauppinen et al, 2001). Los ataques agudos son frecuentemente el resultado de la exposición a agentes desencadenantes, como por ejemplo, drogas porfirinogénicas, ingesta de alcohol, dietas reducidas en calorías, hormonas, que finalmente logran estimular la síntesis del hemo por inducción de la ALA-S, lo cual lleva a la acumulación de ALA y PBG, que como se ha mencionado, son los responsables de dichos ataques (Frank, et al 2001; Kauppinen et al, 2001; Kauppinen, 2005). La sintomatología neurológica es idéntica a la observada en pacientes con PAI y

CPH; sin embargo, la fotosensibilidad es más común y las lesiones resultantes suelen ser más crónicas que en el caso de CPH (Sassa, 2002).

Bioquímicamente se caracteriza por presentar concentraciones elevadas de copro y proto en materia fecal, copro en orina y, sólo durante el ataque, ALA y PBG en orina. Las porfirinas plasmáticas emiten fluorescencia a 626 nm cuando son excitadas por la luz UV lejana (máximo: 400 nm), lo que probablemente represente la formación de un conjugado proto-péptido (Sassa, 2002).

Dado que la acción de la PPOX en el camino de biosíntesis del hemo se produce con posterioridad a la formación de ALA y PBG (cuatro pasos luego de la formación de PBG), no resulta inmediata la explicación de por qué estos intermediarios se acumulan en la PV. El hecho de que ALA y PBG aumenten su excreción durante un ataque agudo sugiere que la reacción catalizada por la enzima PBG-D es el paso limitante. Se ha propuesto que este fenómeno puede deberse a la acumulación de algún producto inmediatamente posterior al PBG que inhibe a la PBG-D, así como también la existencia de mutaciones en el gen de la PBG-D. Ninguna de estas hipótesis parece correcta ya que, en el caso de la primera se observa que en la PCT la acumulación de urogen III no se relaciona con concentraciones elevadas de ALA y PBG. En el caso de la segunda hipótesis propuesta, sería improbable que un mismo individuo porte un defecto hereditario en dos genes codificados por diferentes cromosomas (Meissner et al, 1993), salvo que se trate de un caso de porfiria dual.

Meissner y colaboradores (1993) postularon una tercera hipótesis en la cual el aumento de ALA y PBG tanto en pacientes con PV como en pacientes con CPH se debe a la acumulación de las porfirinas comúnmente observadas en estos dos tipos de porfirias. Se encontró que en pacientes PV existe una disminución en la actividad de la PBG-D, cuyas características cinéticas sugieren inhibición alostérica; este efecto fue abolido al remover los porfirinógenos del sistema y reproducido al adicionar coprogen III y protogen IX, pero no al agregar urogen III o porfirinas. Resultados similares se encontraron al adicionar protogen

a la enzima PBG-D humana purificada, sugiriéndose así que este porfirinógeno posee un efecto directo sobre la actividad de la PBG-D.

A pesar de ser considerada una enfermedad de herencia autosómica dominante se han reportado casos de PV en homocigosis, ya sea en heterocigosis compuesta (70% de los casos) o en homocigosis verdadera. Esta variante es de manifestación infantil y presenta una disminución de la actividad enzimática menor al 25% respecto de la actividad normal. El fenotipo de estos pacientes es severo e incluye síntomas como retardo mental y del crecimiento, braquidactilia, convulsiones y fotosensibilidad (Kordac et al, 1984; Hift et al, 1993; Roberts et al, 1998; Corrigall et al, 2000; Kauppinen et al, 2001; Palmer et al, 2001; Poblete-Gutierrez et al, 2006b).

En general, todas las mutaciones responsables de PV se han encontrado solamente en una familia, sin embargo ciertas mutaciones están presentes en más de una familia no relacionada. Este es el caso de la mutación p.R59W, que en la población blanca sudafricana se ha hallado en una muy alta prevalencia (3:1.000), la cual se debe a un efecto fundador, generado cuando una pareja holandesa, portadora de la mutación se estableció en Ciudad del Cabo (Warnich, et al, 1996; Groenewald, et al, 1998). Fuera de la población antes descripta, la PV no es tan común, y dado que es una enfermedad de baja penetrancia y fácilmente confundible con otras porfirias hepáticas, estimar su frecuencia es una tarea complicada (Roberts, et al, 1995).

III.4: Porfiria Variegata en la Argentina

En la población Argentina, la prevalencia de la PV es de 1:500.000 (Méndez et al, 2012). Ésta resulta baja comparada con la reportada para otras poblaciones, como por ejemplo la ya mencionada en Sudáfrica que es de 3:1.000 (Warnich et al, 1996) y en Finlandia que resulta de 1,9:100.000 (von und zu Fraunberg et al, 2002), entre otras.

En el Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) en los últimos años se han diagnosticado bioquímica y genéticamente como PV a más de 100 individuos. Hasta el año 2008 el 28% presentan sólo sintomatología

aguda, mientras que el 35% sólo síntomas cutáneos y el restante 37% padecen síntomas mixtos (Rossetti et al, 2008). La enfermedad en nuestro país es más común en mujeres que en hombres (11:9; Parera et al, 2003).

Según los resultados obtenidos hasta el momento, no habría evidencias de relación genotipo-fenotipo ya que no fue posible adjudicar a un defecto genético dado un solo tipo de síntoma clínico (Rossetti et al, 2008), resultados similares a los descriptos en otras poblaciones (Whatley et al, 1999). Contrariamente, von und zu Fraunberg y colaboradores (2002) encontraron una relación de este tipo para la población finlandesa.

Se han encontrado en nuestra población una gran variedad de mutaciones en el gen de la PPOX, responsables de PV; algunas ya reportadas y otras nuevas (Rossetti et al, 2008; Méndez et al, 2012; resultados no publicados). De todas ellas, se destaca la mutación c.1.042_1.043insT, con una elevada prevalencia de alrededor del 40%. Esta pequeña inserción fue descripta por primera vez en el CIPYP (De Siervi et al, 2000) y nunca se ha descripto en otras poblaciones.

III.5: Referencias

Batlle AM del C. El laboratorio de las Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular. Actualizaciones médico-bioquímicas (1997). Acta Bioquím Clín Latinoam. 145-171.

Bissbort S, Hitzeroth HW, de Wentzel DP, Van den Berg CW, Senff H, Wienker TF, Bender K. Linkage between the Variegate Porphyria (VP) and the alpha-1-antitrypsin (PI) genes on human chromosome 14 (1988). Hum Genet. 79:289-290.

Corradi HR, Corrigall AV, Boix E, Mohan CG, Sturrock ED, Meissner PN, Acharya KR. Crystal structure of protoporphyrinogen oxidase from Myxococcus xanthus and its complex with the inhibitor acifluorfen (2006). J Biol Chem. 281:38625–38633.

Corrigall AV, Hift RJ, Davids LM, Hancock V, Meissner D, Kirsch RE, Meissner PN. Homozygous Variegate Porphyria in South Africa: genotypic analisis in two cases (2000). Mol Genet Metab. 69:323-330.

Dailey TA, Dailey HA. Human protoporphyrinogen oxidase: expression, purification and characterization of the cloned enzyme (1996). Protein Sci. 5:98-105.

Davids LM; Corrigall AV, Meissner PN. Mitochondrial targeting of human protoporphyrinogen oxidase (2006). Cell Biol Int. 30:416-426.

De Siervi A, Parera VE, Varela LS, Batlle A, Rossetti MV. A novel mutation (1320InsT) identified in two Argentine families with Variegate Porphyria (2000). Hum Mut 16:96-98.

de Vooght KMK, van Wijk R, van Solinge WW. GATA-1 binding sites in exon 1 direct erythroid-specific transcription of PPOX (2007). Gene. 409:83–91.

Ferreira GC, Andrew TL, Karr SW, Dailey HA. Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex (1988). J Biol Chem. 263:3835–3839.

Frank J, Aita VW, Ahmad W, Lam H, Wolff C, Christiano AM. Identification of a founder mutation in the protoporphyrinogen oxidase gene in Variegate Porphyria patients from Chile (2001). Hum. Hered. 51:160-168.

Groenewald JZ, Liebenberg J, Groenewald IM, Warnich L. Linkage desequilibrium analysis in a recently founded population: evaluation of the Variegate Porphyria founder in South African Afrikaners (1998). Am J Hum Genet. 62:1254-1258.

Hift RJ, Meissner PN, Todd G, Kirby P, Bilsland D, Collins P, Ferguson J Moore, MR. Homozygous Variegate Porphyria: an evolving clinical syndrome (1993). Postgrad. Med. J. 69:781-786.

Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y. The porphyrias (1995). In: Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS (ed): Metabolic and molecular bases of inherited disease, 7th ed. New York: McGraw-Hill. 2103-2160.

Kauppinen R, Timonen K, von zu Fraunberg M, Laitinen E, Ahola H, Tenunen R, Taketani S, Mustajoki P: Homozygous variegate Porphyria: 20 y follow-up and characterization of molecular defect (2001). J Invest Dermatol. 116:610-613.

Kauppinen R. Porphyrias. Seminar (2005). Lancet 365: 241-52.

Koch M, Breithaupt C, Kiefersauer R, Freigang J, Huber R, Messerschmidt A. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis (2004). EMBO J. 23:1720–1728.

Kordac V, Deybach JC, Martasek P, Zeman J, da Silva V, Nordmann Y, Houstkova H, Rubin A, Holub J. Homozygous Variegate Porphyria (1984). Lancet. 1:851.

Meissner PN, Adams P, Kirsch R. Allosteric inhibition of human lymphoblast and purified porfphobilinogen deaminase by protoporphyrinogen and coproporphyrinogen. A possible mechanism for the acute attack of Variegate Porphyria (1993). J Clin Invest. 91:1436-1444.

Méndez M*, Granata BX*, Moran Jiménez MJ, Parera VE, Batlle A, Enriquez de Salamanca RE, Rossetti MV. Functional characterization of five protoporphyrinogen oxidase missense mutations found in Argentinean Variegate Porphyria patients (2012). JIMD Rep. 4:91-97. DOI: 10.1007/8904_2011_77. MM* y BXG* contribuyeron igualmente a la realización del trabajo.

Morgan RP, Errington R, Elder GH. Identification of sequences required for the import of human protoporphyrinogen oxidase to mitochondria (2004). Biochem J. 377:281-7.

Nishimura K, Taketani, S; Inokuchi H: Cloning of a human cDNA for protoporphyrinogen oxidase by complementation in vivo of a hemG mutant of Escherichia coli (1995). J Biol Chem. 270:8076-8080.

Palmer RA, Elder GH, Barret DF, Keohane SG. Homozygous Variegate Porphyria: a compound heterocigote whith novel mutations in the protoporphyrinogen oxidase gene (2001). Br J Dermatol. 144:866-869.

Parera VE, De Servi A, Varela LS, Rossetti MV, Batlle A. Acute Porphyrias in the Argentinean population. A review (2003). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 49:493-500.

Poblete-Gutiérrez P, Wiederholt T, Merk HF, Frank J. The porphyrias: clinical presentation, diagnosis and treatment (2006a). Eur J Dermatol. 16(3):230-240.

Poblete-Gutiérrez P, Wolff C, Farias R, Frank J. A Chilean boy with severe photosensitivity and finger shortening: the first case of homozygous Variegate Porphyria in South America (2006b). Br J Dermatol. 154(2):368-371.

Proulx KL, Woodard SI, Dailey HA. In situ conversion of coproporphyrinogen to heme by murine mitochondria: terminal steps of the heme biosynthetic pathway (1993). Protein Sci: 2:1092–1098.

Puy H, Roréau AM, Rosipal R, Nordmann Y, Deybach JC. Protoporphyrinogen oxidase: complete genomic sequence and polymorphisms in the human gene (1996). Biochem Biophys Res Commun. 226:226-230.

Qin X, Sun L, Wen X, Yang X, Tan Y, Jin H, Cao Q, Zhou W, Xi Z, Shen Y. Structural insight into unique properties of protoporphyrinogen oxidase from Bacillus subtilis (2010). J Struct Biol. 170:76–82.

Qin X, Tan Y, Wang L, Wang Z, Wang B, Wen X, Yang G, Xi Z, Shen Y. Structural insight into human Variegate Porphyria disease (2011). FASEB J. 25(2):653-664. DOI: 10.1096/fj.10-170811.

Roberts AG, Puy H, Dailey TA: Molecular characterization of homozygous Variegate Porphyria (1998). Hum Mol Genet. 7:1921-1925.

Roberts AG, Whatley SH, Daniels J, Holmans P, Fenton L, Owen MJ, Thompson P, Long C, Elder GH. Partial characterization and assignment of the gene for protoporphyrinogen oxidase and Variegate Porphyria to human chromosome 1q23 (1995). Hum Mol Genet. 4:2387-2390.

Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, Parera VE, Batlle A. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2008). BMC Med Genet. 9:54. DOI: 10.1186/1471-2350-9-54.

Sassa S. The porphyrias (2002). Photodermatol Photoimmunol Photomed 18:56-67.

Taketani S, Inazawa J, Abe T, Furukawa T, Kohno H, Tokunaga R, Nishimura K, Inokuchi H. The human protoporphyrinogen oxidase (PPOX) gene: organization and location to chromosome 1 (1995). Genomics. 29:698-703.

von und zu Fraunberg M, Nyronen T, Kaupinnen R. Mitochondrial targeting of normal and mutant protoporphyrinogen oxidase (2003). J Biol Chem. 278:13376-13381.

von und zu Fraunberg M, Timonen K, Mustajoki P, Kauppinen R. Clinical and biochemical characteristics and genotype – phenotype correlation in Finnish Variegate Porphyria patients (2002). Eur J Hum Genet. 10:649-657.

Warnich L, Kotze MJ, Groenewald IM, Groenewald JZ, van Brakel MG, van Heerden CJ, de Villiers JNP, van de Ven WJM, Schienmarcadors EFPM, Taketani S, Retief AE. Identification of three mutations and associated

haplotypes in the protoporphyrinogen oxidase gene in South African families with Variegate Porphyria (1996). Hum Mol Genet. 5:981-984.

Whatley SD, Puy H, Morgan RR, Robreau AM, Roberts AG, Nordman Y, Elder GH, Deybach JC. Variegate Porphyria in Western Europe: identification of PPOX gene mutations in 104 families, extent of allelic heterogeneity, and absence of correlation between phenotype and type of mutation (1999). Am J Hum Genet 65:984-994.

Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint (1986). J Mol Biol 187:101–107.

Capítulo IV: Porfirias Hepáticas Agudas y estrés oxidativo

IV.1: Estrés oxidativo: ROS y sistema de defensa antioxidante

En el metabolismo normal de las células se generan a partir de reacciones de óxido-reducción, radicales libres, moléculas que presentan un número impar de electrones y una alta tendencia a formar pares estables.

Los radicales libres son altamente reactivos y, aunque son producto del metabolismo normal de la célula, en concentraciones elevadas pueden atacar a biomoléculas tales como proteínas, ADN y lípidos de membranas celulares (Bendich, 1990; Afonso et al, 1996; Ross et al, 2000; Smirnova et al, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1999), provocando así daño celular y tisular. Esta situación, llamada estrés oxidativo, ocurre cuando existe un desbalance fisiológico entre la producción de prooxidantes y antioxidantes que conlleva a la acumulación de especie prooxidantes.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son una variedad de moléculas derivadas del O_2 (Herrero et al, 2008) (Tabla IV.2) que pueden generarse durante reacciones enzimáticas implicadas en la cadena respiratoria por reducción incompleta del O_2 (Han et al, 2001; Raha & Robinson, 2000), en la fagocitosis y en la síntesis de prostaglandinas, durante reacciones no enzimáticas entre el O_2 y compuestos orgánicos, mediante la oxidación de ácidos grasos y peroxidación lipídica de membranas celulares, y por efecto de radiaciones ionizantes (Zorrilla García, 2002). Las ROS son agentes oxidantes y abarcan tanto especies radicalarias como no radicalarias que son fácilmente convertidas a radicales (Avello & Suwalsky, 2006). Por otras parte dos especies radicalarias al compartir sus electrones desapareados se vuelven no radicalarias (Birben et al, 2012).

	Oxidante	Fórmula
Especies Radicalarias	Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$
	Radical hidroxilo	$HO^{\cdot}$
	Radical peroxilo	$ROO^{\cdot}$
	Radical hidroperoxilo	$HOO^{\cdot}$
Especies no Radicalarias	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
	Hipoclorito	HOCl
	Oxígeno singulete	$^1O_2$

Tabla IV.2: Especies reactivas del oxígeno. Se muestran algunos ejemplos de oxidantes tanto radicalarios como no radicalarios.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) es el precursor de la mayoría de las ROS. La dismutación de éste, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que gracias a la acción de diversas oxidasas, como la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), puede ser reducido a H_2O. Sin embargo, en presencia de metales de transición, la reducción parcial del H_2O_2 genera el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), uno de los más potentes oxidantes de la naturaleza (Herrero et al, 2008), que al ser tan reactivo puede dañar proteínas, carbohidratos, ADN y comenzar el proceso de peroxidación lipídica (Fig. IV.2). Cuando el metal involucrado es hierro, puede ocurrir tanto una reacción de Fenton (2) como una reacción de Haber-Weiss (2) (Kehrer, 2000):

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad (1)$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot} \quad (2)$$
$$\text{Reacción neta: } O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$$

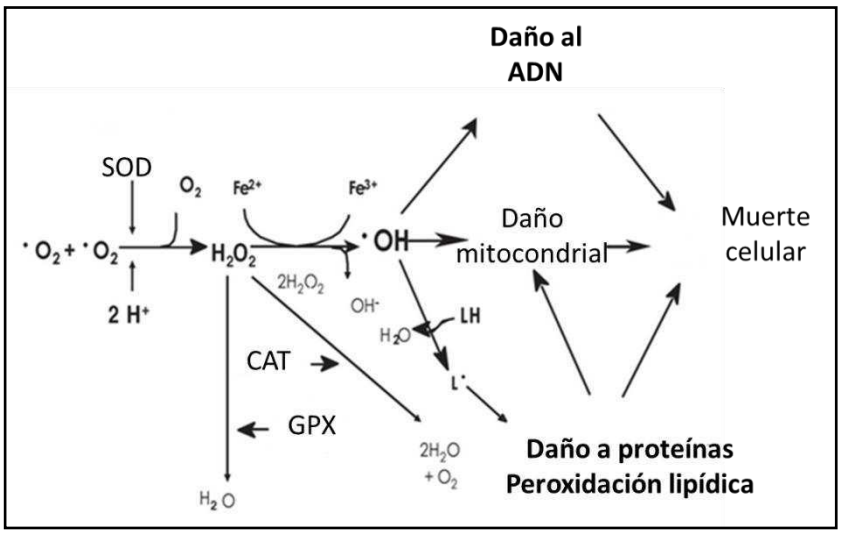


Figura IV.2: Generación de ROS y principales enzimas de la defensa antioxidante (Muñoz Morón & Castilla-Cortázar, 2012).

Las células cuentan con un sistema de defensa antioxidante, tanto enzimático como no enzimático, encargado de mantener a las especies radicalarias dentro de niveles normales. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando electrones para que éstos los capten, manteniendo así su estabilidad (Avello & Suwalsky, 2006).

Entre las defensas enzimáticas encontramos a las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Fig. II.2) que remueven anión superóxido y peróxido de hidrógeno antes de que, en presencia de metales, se produzcan especies más reactivas como el radical hidroxilo por reacciones de tipo Fenton o Haber-Weiss. Existen otras enzimas antioxidantes como la hemo-oxigenasa, la glutatión reductasa y la glutatión S transferasa.

En cuanto al sistema de defensa antioxidante no enzimático, podemos destacar a las vitaminas E y C, los betacarotenos, los flavonoides y los licopenos, los cuales son incorporados mediante la dieta (Zorrilla García, 2002), además del glutatión (GSH), carotenos y ácido úrico, entre otros. Estos compuestos ejercen su acción antioxidante mediante la estabilización de los radicales libres.

Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, son considerados como la primera línea de defensa, pero, dado que no es un sistema totalmente efectivo, existe una segunda línea de defensa. Esta última involucra sistemas de reparación de daño al ADN y sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroxiproteinasas y las endonucleasas (Pérez Gastell & Pérez de Alejo, 2000).

El incremento del estrés oxidativo puede resultar de un aumento en la producción de precursores de ROS, de un aumento de ROS, de un incremento de las catálisis prooxidantes, de una reducción de los sistemas antioxidantes o de una combinación de todos los anteriores (Zorrilla & Fernández, 1999). Este proceso dará como resultado daño a membranas celulares mediante peroxidación lipídica, donde se genera como producto malondialdehído (MDA).

La determinación en plasma y sangre de los niveles de peróxido de hidrogeno, radical superóxido, glutatión oxidado, malondialdehído, etc. se pueden emplear como índices de estrés oxidativo (Birben et al, 2012).

Niveles plasmáticos elevados de homocisteína también se pueden considerar como factor de riesgo para diversas patologías como enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, impedimentos cognitivos, enfermedad de Alzheimer, entre otras (Glushchenco & Jacobsen, 2007; Sachdev, 2005) debido a su capacidad de generar ROS e inducir oxidación de proteínas (Sibrian-Vazquez et al, 2010). Este aminoácido azufrado es un producto intermediario del metabolismo de la metionina que no se incorpora con la dieta y tampoco a las proteínas (Sayar et al, 2007). La homocisteína es remetilada a metionina por la 5-metiltetrahidrofolato S-metil-transferasa; también es metabolizada por la vía de la trans sulfuración catalizada por la cistationina β sintetasa (CβS) a través de la condensación de homocisteína y L-serina para dar cistationina, la cual es clivada a cisteina y 2-cetobutarato por la cistationina γ liasa. La enzima CβS, dependiente de fosfato de piridoxal que contiene hemo como cofactor, está presente en cerebro pero la cistationina γ liasa no lo está, esto explica la elevada concentración de cistationina en dicho órgano (Dwyer et al, 2004).

IV.2: Neuropatía porfírica

En las PHAs, como ya se mencionó, los precursores ALA y PBG se excretan en forma masiva durante el ataque. Estos, especialmente el ALA, son neurotóxicos. Si bien no se conoce con certeza el mecanismo por el cual estos precursores provocan disturbios neurológicos, se ha postulado una hipótesis para el posible mecanismo de acción del ALA. Este precursor puede autooxidarse generando ROS, las cuales aumentan el grado de estrés oxidativo en la célula y esto sería la causa del cuadro observado (Demasi et al, 1997; Onuki et al, 2004). La autooxidación del ALA es catalizada por hierro y de esta manera se genera el ácido 4,5 dioxovalérico (DOVA), un eficiente alquilante de ADN in vitro (Demasi et al, 1996; Atamna & Frey, 2004).

Si bien la relación entre el estrés oxidativo y el deterioro hepático en pacientes con PHAs cuenta con fuertes evidencias a favor, que indican que el mecanismo carcinogénico es mediado por radicales libres, particularmente por la autooxidación del ALA a DOVA (Doss et al, 1978; Hermes-Lima et al, 1991; Di Mascio et al, 2000), aún no se conoce con exactitud el mecanismo involucrado en la patogénesis de la disfunción neurológica.

Existen dos hipótesis principales acerca del mecanismo de neurotoxicidad de la neuropatía porfírica y ambas contribuyen al desarrollo de la disfunción nerviosa. La primera propone que la deficiencia de hemo en hígado y probablemente en tejido neuronal, producida durante el ataque agudo, afectaría procesos celulares fundamentales dependientes de hemo proteínas, como puede ser la producción de energía por cadena de transporte de electrones. La segunda se relaciona con la acumulación de ALA, el cual tiene propiedades neurotóxicas y oxidativas, que influyen directamente en el daño neuronal.

En cuanto a la última hipótesis mencionada, se ha reportado daño oxidativo a las mitocondrias, lisosomas, ADN y proteínas en modelos animales tratados con ALA exógeno, dado que este precursor, como se mencionó anteriormente, puede oxidarse mediante una reacción catalizada por hierro, generando ROS y DOVA (Demasi et al, 1996; Onuki et al, 2004). Además, las ROS generadas por ALA provocan la liberación del hierro de la ferritina (Oteiza et al, 1995; Onuki et al, 2004) y daño oxidativo a ésta (Rocha et al, 2000). Todos los factores hasta aquí expuestos llevarían a un aumento del grado de estrés oxidativo de la célula, con el consecuente aumento inicial de la capacidad antioxidante en plasma por inducción del sistema de defensa.

No obstante, el ALA por sí solo no es suficiente para producir el ataque agudo dado que los niveles encontrados durante el ataque no correlacionan con la severidad de las manifestaciones clínicas observadas (Gorchein & Webber, 1987); y por otra parte, la administración del precursor a individuos normales no produce síntoma alguno (Dowdle et al, 1968; Mustajoki et al, 1992). Esto indica que existen otros factores involucrados en la patogénesis y desarrollo de la neuropatía porfírica. De esta forma, ambas hipótesis se interrelacionan, ya que la

deficiencia relativa de hemo en estos pacientes en hígado y cerebro contribuye a la disfunción del sistema nervioso in vivo (Meyer et al, 2005).

En cuanto a la insuficiencia de hemo, podemos decir que esto puede llevar a defectos en la distribución de energía por deficiencias en el transporte de electrones mitocondrial, afectando así la función neuronal y el transporte axonal (Sengupta et al, 2005; Chernova et al, 2006). Además, se ve afectada la capacidad mitocondrial de defensa frente al daño oxidativo (Meyer et al, 1998; Ferrer et al, 2010) y el sistema detoxificante de drogas citocromo P450 (Anderson et al, 1976; Thunell et al, 2000; Lavandera et al, 2007).

Aún no se conoce el mecanismo por el cual el ALA atraviesa la barrera hematoencefálica, pero algunos trabajos proponen a la difusión pasiva como posible mecanismo de acumulación en tejido neuronal (Ennis et al, 2003). Sin embargo, se ha demostrado la captación y acumulación de ALA en cerebelo y corteza cerebral de rata y la posterior inducción de perooxidación lipídica (Princ et al, 1994; Princ et al, 1998; Junkat et al, 1995), indicando que esta molécula es capaz de alcanzar dichos tejidos.

Se ha descripto que la deficiencia o desregulación de hemo sería un componente importante del proceso neurodegenerativo (Atamna et al, 2002) encontrándose alteraciones de su biosíntesis en la enfermedad de Alzheimer (Atamna & Frey, 2004), donde el daño oxidativo se relaciona, desde etapas tempranas, con la disfunción neurológica (Siedlac et al, 2009). En pacientes con Alzheimer se encontraron niveles elevados de hemo oxigenasa y de bilirrubina en forma crónica, y disminución del complejo IV mitocondrial, formado por hemo, además de una disminución en la expresión de las enzimas ALAS y PBG-D en cerebros de estos pacientes (Atamna & Frey, 2004; Dwyer et al, 2009). Por lo tanto la desregulación observada en el metabolismo del hemo contribuiría con las alteraciones encontradas en cerebros con Alzheimer (Atamna & Frey, 2004). Por otra parte, se han descripto pacientes PAI con niveles plasmáticos de homocisteína elevados (To-Figueras et al, 2010), parámetro considerado de riesgo en la enfermedad de Alzheimer.

En condiciones de deficiencia de hemo se pierde la regulación óxido-reducción necesaria para mantener activa a la enzima CβS y por lo tanto se acumula homocisteína. Se sabe que ésta interfiere con la captación de hierro por la ferritina, lo cual llevaría a un aumento de Fe y del estrés oxidativo en la neurona explicando la formación de las placas β amiloides características de la enfermedad de Alzheimer. Esta situación además provoca una inducción de la hemo oxigenasa agravando así la deficiencia de hemo y resultando en un círculo vicioso (Dwyer et al, 2004).

Considerando que la deficiencia de hemo tendría un importante rol en los procesos neurodegenerativos que resultan en enfermedades como el Alzheimer (Atamna et al, 2002), y que en los individuos con porfirias hepáticas agudas se genera un estado de estrés oxidativo debido a la acción del ALA y a la deficiencia de hemo, estos últimos constituirían factores de alto riesgo para la evolución hacia una enfermedad neurodegenerativa grave en estos pacientes (Dwyer et al, 2006). De ser así, resultaría posible, sería posible establecer una interrelación entre los mecanismos neuropatogénicos que ocurren en pacientes con porfirias agudas y con Alzheimer.

IV.3: Referencias

Afonso SG, Polo CF, Enriquez de Salamanca R, Batlle A. Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes (1996). Int J Biochem Cell Biol. 28:415-420.

Anderson KE, Alvares AP, Sassa S, Kappas A. Studies in porphyria. V. Drug oxidation rates in hereditary hepatic porphyria (1976).Clin Pharmacol Ther. 19:47–54.

Atamna H, Frey WH II. A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid beta and has altered metabolism (2004). PNAS. 101(30):11153-8.

Atamna H, Killilea DW, Killilea AN, Ames M. Heme deficiency may be a factor in the mitocondrial and neuronal decay of aging (2002). PNAS. 99(23):14807-14812.

Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular (2006). Rev Ciencia Ahora nº 17, año 9.

Bendich A. Antioxidant vitamins and their function in immune response (1990). En Bendich A, Phillips M, Tengerdy RB (Eds.) Antioxidant nutrients and immune functions-introduction. Plenum New York, EEUU. pp. 1-11.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense (2012). World Allergy Organ J. 5(1):9-19. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Demasi M, Costa C, Pascual C, Llesuy S, Bechara E. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity (1997). Free Rad Res. 26:235-243.

Demasi M, Penatti CAA, DeLucia R, Bechara EJH. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations of porphyrias (1996). Free Rad Biol Med 20(3):291-299.

Di Mascio P, Teixeira PC, Onuki J, Medeiros MHG, Dornemann D, Douki T, Cadet J. DNA damage by 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin (2000). Arch Biochem Biophys. 373:368-374.

Doss M, Martini GA. Porphyrin metabolism and liver tumors (1978). En: Remmer H, Bolt HM, Bammasch P, Popper H, eds. Primary Liver Tumor. Baltimore: University Park Press, pp 409-1420.

Dowdle E, Mustard P, Spong N, Eales L. The metabolism of (5-14c) delta-aminolaevulic acid in normal and porphyric human subjects (1968). Clin Sci. 34:233–251.

Dwyer BE, Raina AK, Perry G, Smith MA. Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk? (2004). Free Radic Biol Med. 36(11):1471-1475.

Dwyer BE, Smith MA, Richardson SL, Perry G, Zhu X. Down-regulation of aminolevulinate synthase, the rate-limiting enzyme for heme biosynthesis in Alzheimer's disease (2009). Neurosci Lett. 460(2):180-184. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.05.058.

Dwyer BE, Stone ML, Zhu X, Perry G, Smith MA. Heme deficiency in Alzheimer's Disease: a possible connection to porphyria (2006). J Biomed Biotechnol. (3):24038.

Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stumer W, Smith DE, Keep RF. Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain (2003). Brain Res. 959:226-234.

Ferrer MD, Sureda A, Tauler P, Palacín C, Tur JA, Pons A. Impaired lymphocyte mitochondrial antioxidant defences in Variegate Porphyria are accompanied by more inducible reactive oxygen species production and DNA damage (2010). Br J Haematol. 149:759–767.

Glushchenko AV, Jacobsen DW. Molecular targeting of proteins by L-homocysteine: Mechanistic implications for vascular disease (2007). Antioxid Redox Signal. 9:1183–1898.

Gorchein A, Webber R. Delta-aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: Studies in normal, uraemic and porphyric subjects (1987). Clin Sci. 72:103–112.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine (1999). 3rd ed. Oxford University Press. Oxford, RU. pp 936.

Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space (2001). Biochem J. 353:411-416.

Hermes-Lima M, Valle VG, Vercesi AE, Bechara EJ. Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning (1991). Biochim Biophys Acta. 1056(1):57-63.

Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabiscol E (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochim Biophys Acta. 1780:1217-1235.

Junkat AA, Kotle ML, Batlle AMC. High delta-aminolevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: efect on porphyrin biosynthesis (1995). Comp Biochem Physiol. 111:143-150.

Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity (2000). Toxicology 149 (2000) 43–50.

Lavandera J, Batlle A, Buzale A. Metabolization of porphyrinogenic agents in brain: involvement of the phase I drug metabolizing system. A comparative study in liver and kidney (2007). Cell Mol Neurobiol. 27:717–729.

Meyer RP, Lindberg RLP, Hoffmann F, Meyer UA. Cytosolic persistence of mouse brain CYP1A1 in chronic heme deficiency (2005). Biol Chem. 386:1157–1164.

Meyer UA, Schuurmans MM, Lindberg RL. Acute porphyrias: pathogenesis of neurological manifestations (1998).Semin Liver Dis. 18:43–52.

Mustajoki P, Timonen K, Gorchein A, Seppălăinen AM, Matikainen E, Tenhunen R. Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a volunteer: no porphyric symptoms (1992). Eur J Clin Invest. 22:407–411.

Onuki J, Chen Y, Teixeira PC, Schumacher RI, Medeiros MH, Van Houten B, Di Mascio P. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid (2004). Arch Biochem Biophys 432(2):178-187.

Oteiza PI, Kleinman CG, Demasi M, Bechara EJH. 5-aminolevulinic acid induces iron release from ferritin (1995). Arch. Biochem. Biophys. 316:314-317.

Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo (2000). Rev Cubana Med Milit 29(3):192-198.

Princ FG, Juknat AA, Amitrano AA, Batlle A. Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum (1998). Gen Pharmacol. 31(1):143-148.

Princ FG, Juknat AA, Batlle AM. Porphyrinogenesis in rat cerebellum. Effect of high delta-aminolevulinic acid concentration (1994). Gen Pharmacol. 25(4):761-766.

Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and aging (2000). Trends Biochem. Sci. 25:502-508.

Rocha MEM, Bandy B, Costa CA, de Barros MP, Pinto AMP, Bechara EJH. Iron movilization by succinylacetone and methyl ester in rats. A model for hereditary tyrosinemia and porphyrias characterized by 5-aminolevulinica acid overload (2000). Free Rad. Res. 32:343-353.

Ross S, Findlay V, Malakasi O, Morgan B. Thioóxido-reducciónin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast (2000). Mol Biol Cell. 11:2631-2642.

Sachdev PS. Homocysteine and brain atrophy (2005). Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 29:1152–1161.

Sayar N, Terzi S, Bilsel T, Yilmaz HY, Orhan L, Cakmak N, Erdem I, Tangurek B, Ciloglu F, Peker I, Yesilcimen K. Plasma homocysteine concentration in patients with poor or good coronary collaterals (2007). Circ J. 71(2):266-270.

Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samoei GK, Strongin RM. Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins (2010). Proc Natl Acad Sci USA. 107(2):551-554.

Siedlak SL, Casadesus G, Webber KM, Pappolla MA, Atwood CS, Smith MA, Perry G. Chronic antioxidant therapy reduces oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease (2009). Free Radic Res. 43(2):156-64. DOI: 10.1080/10715760802644694.

Smirnova GV, Música NG, Glukhovchenko MN, Oktyabrsky UN. Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing Escherichia coli (2000). Free Radic Biol. Med. 28:1009-1016.

Thunell S, Harper P, Brock A, Petersen NE. Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. II. Diagnosis and monitoring in the acute porphyrias (2000). Scand J Clin Lab Invest. 60:541–560.

To-Figueras J, Lopez RM, Deulofeu R, Herrero C. Preliminary report: hyperhomocysteinemia in patients with acute intermittent porphyria (2010). Metabolism. 59(12)1809-1810. DOI: 10.1016/j.metabol.2010.05.016.

Zorrilla A, Fernández A (1999). Diabetes mellitus y estrés oxidativo. Bioquimia 24(3):75-79.

Zorrilla García AE (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev Cubana Invest Biomed 21(3):178-185.

Capítulo V: Objetivos

V.1: Objetivo general

El objetivo general del trabajo es realizar un amplio estudio clínico, bioquímico y molecular de las PHAs prevalentes en nuestra población, fundamentalmente de la Porfiria Variegata, estudiando su relación con el estrés oxidativo.

V.2: Objetivos específicos

Los siguientes objetivos específicos serán abordados en esta Tesis:

Identificación y caracterización de la mutación responsable de la Porfiria en el propósito y sus familiares, cuando sea posible, con el objetivo de detectar portadores asintomáticos y asesorarlos acerca del riesgo del contacto con los agentes desencadenantes de la enfermedad.

La caracterización funcional de las nuevas mutaciones halladas mediante ensayos de expresión procariótica y de minigenes.

Realizar un análisis de haplotipos en función de dilucidar el origen de la prevalente mutación c.1.042_1.043insT en nuestra población, empleando repeticiones en tándem como marcadores moleculares.

Identificar biomarcadores de la disfunción neurológica hacia una enfermedad neurodegenerativa, estudiando en forma comparativa diferentes parámetros de estrés oxidativo en pacientes con PHAs y controles sanos.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Capítulo I: Análisis genético de pacientes PV

I.1: Pacientes

En este trabajo se incluyeron 36 familias con diagnóstico clínico y bioquímico de PV, conformándose un total de 139 individuos. Se respetaron los principios establecidos en el acuerdo de la 18º Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia, 1964, revisado por la 52º Asamblea Médica Mundial de Edimburgo, Escocia, 2000. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias. Asimismo se dispone del consentimiento informado de los pacientes. La falta de relación entre familias se obtuvo a partir del interrogatorio oral.

Todos los pacientes se diagnosticaron como PV en base a su historia clínica de al menos un ataque agudo y/o lesiones cutáneas asociadas con una excreción aumentada de porfirinas en orina y materia fecal. El diagnóstico bioquímico se realizó siguiendo la metodología descripta por Batlle (1997). El diagnóstico diferencial se completó con los estudios genéticos.

Para el análisis de la relación genotipo-fenotipo, se los clasificó como PV cutáneos, agudos o mixtos en base a su historia clínica de al menos una manifestación cutánea, aguda o ambas, respectivamente.

Para el análisis de mutaciones por categorías, éstas fueron definidas empleando el siguiente criterio. Mutaciones missense: cambio de nucleótido que conlleva a cambio de aminoácido; mutaciones de splicing: cambio de nucleótido que afecta el procesamiento del ARNm; deleciones: deleción de nucleótido/s que genera un codón finalización prematuro en la proteína; inserciones: inserción de nucleótido/s que genera un codón finalización prematuro en la proteína.

I.2: Extracción y cuantificación de ADN genómico

A partir de muestras de sangre periférica se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando un kit comercial (GE Healthcare). Se siguieron las especificaciones del producto, el cual tiene como principio, luego de la lisis

celular, la adsorción del ADN a la matriz de sílica de una columna, el cual luego de las etapas de lavado es eluído empleando H_2O desionizada.

Luego, se cuantificó la muestra de ADN obtenida empleando al fluorometro Qubit ® (Invitrogen). Esta técnica se basa en el uso de colorantes fluorescentes para determinar la concentración de las moléculas de interés, en este caso, ADN genómico. Se siguieron las especificaciones del producto, el cual incluye sus propios reactivos para el armado de una solución de trabajo que contiene colorante (dilución 1:200). A ésta finalmente se le adiciona entre 1 – 10 µl de la muestra incógnita. Variando los reactivos, el mismo dispositivo puede utilizarse para la cuantificación de ARN, ADN doble y simple cadena, y proteínas.

I.3: Amplificación del gen de la PPOX

Para la detección de mutaciones los exones junto con 50-100pb de sus regiones flanqueantes, regiones intrónicas, promotor del gen de la PPOX o el gen completo se amplificaron empleando los primers y condiciones descriptas en las Tablas I.1 y I.2. Cada tubo de amplificación contenía, en concentración final, buffer de amplificación 1X, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada primer, entre 50 y 100 ng de templado (ADN) y 0,05 U/µl de Taq polimerasa (Taq Polymerase, Recombinant-Invitrogen o Platinum High Fidelity-Invitrogen), y se llevó a un volumen final de 50µl con H_2O desionizada.

Para comprobar que la reacción de PCR fue exitosa, se armaron geles de agarosa 1% en buffer TBE 1X. Se corrieron las muestras correspondientes a los fragmentos de cada individuo junto con un marcador de peso molecular (100 pb-Invitrogen) durante 30 min. a 400 mA y 90 V y se revelaron con bromuro de etidio.

PCR	SECUENCIA PRIMERS	REGIÓN	TAMAÑO	$[Mg^{2+}]$ (mM)
E1	F: ccccagcagtgaaggttatgt	Promotor – exón 1	861 pb	1,5
	R: tccgtgcacacttagtttccc			
FI	F: gcttctggagcgcaggttgtcc	Exón 2 - exón 4	758 pb	1,6
	R: aaggcatatgaggatgagggca			
FII	F: aggtatgtcaggagcttcccc	Exón 5 - exón 6	680 pb	1,6
	R: ccctcactttggcagtacttaa			
FIII	F: tgctgggattacaggtgt	Exón 7 - exón8	852 pb	2,5
	R: agcttttgcttctcactggtagg			
FIV	F: cctaccagtgagaagcaaaagct	Exón 9	321 pb	2
	R: gattacaggtgtgagccacca			
FV	F: gccctttccttctgacgcatg	Exón 10 - exón 13	1062 pb	2,5
	R: ttgtttggtgaaggaagccc			
Gen Completo	F: tacccttccacctggaggc	Promotor – poli A	5,8 kb	2
	R: ttgtttggtgaaggaagccc			

Tabla I.1: Condiciones de amplificación del gen de la PPOX. La secuencia de los primers se muestra en sentido 5'→3'. Los primers fueron diseñados por De Siervi et al, 2000a y b, Rossetti et al, 2008 y Granata, 2008.

ETAPA	PCR						
	E1	FI	FII	FIII	FIV	FV	Gen completo
Desnaturalización inicial	95 ºC 5 min	95 º C 5 min	95 ºC 5 min	95 ºC 5 min	95 ºC 5 min	95 ºC5 min	94 °C 2 min
Desnaturalización	95 ºC 30 seg	95 º C 30 seg	95 ºC 30 seg	95 ºC 30 seg	95 ºC 30 seg	95 ºC 30 seg	94 °C 30 seg
Annealing	60 ºC 20 seg	60 º C 30 seg	60 ºC 30 seg	62 ºC 20 seg	60 ºC 20 seg	62 ºC 20 seg	60 °C 30 seg
Extensión	72 ºC 1 min	72 º C 30 seg	72 ºC 30 seg	72 ºC 30 seg	72 ºC 30 seg	72 ºC 30 seg	68 °C 6 min
Extensión final	72 ºC 5 min	72 º C 5 min	72 ºC 5 min	72 ºC 5 min	72 ºC 5 min	72 ºC 5 min	68 °C 10 min
# ciclos	30	30	30	35	30	35	30

Tabla I.2: Programas de PCR empleados en la detección de mutaciones de familias PV.

I.4: Purificación de los productos de PCR

El producto de PCR se purificó y se secuenció. De acuerdo a lo observado en el gel de agarosa, se procedió a una purificación directa o a partir del taco de agarosa que contenía la banda de interés. En ambos casos se

emplearon kits comerciales (Bioneer), siguiendo las especificaciones del fabricante. Ambos tienen como principio la adsorción del ADN en la matriz de silica de una columna, que será eluido con H_2O desionizada.

I.5: Secuenciación de los productos de PCR

Cada fragmento amplificado y purificado se secuenció de forma automática (ABI3730XL ADN analyzer - Macrogen) empleando los primers utilizados en las reacciones de PCR correspondientes (Tabla I.2). Todas las variantes genéticas halladas se confirmaron por secuenciación en ambos sentidos de al menos dos productos de PCR diferentes. Las mutaciones nuevas se validaron como tales, y no como polimorfismos o variantes de secuencia, comprobando su ausencia en por lo menos 50 individuos controles (100 alelos normales) y posterior análisis funcional (Método Experimental, Capítulo II; Resultados y Discusión, Capítulo II).

I.6: Sistema de numeración y nomenclatura de mutaciones

Los nucleótidos exónicos se nombraron a partir del primer nucleótido del codón de iniciación de la traducción de acuerdo a la secuencia del ADNc derivado de la secuencia genómica mientras que los nucleótidos del promotor e intrones se nombraron según la secuencia genómica completa (N° acceso Genebank X99450).

La correcta nomenclatura de las mutaciones se realizó de acuerdo a den Dunnen & Antonarakis, 2001; den Dunnen & Paalman, 2003 y Laros et al, 2011 (guía de nomenclatura disponible en: http://www.hgvs.org/mutnomen/). Finalmente, la correcta denominación de la variante hallada se corroboró empleando el Mutalyzer 2 Name Checker y Syntax Checker (https://mutalyzer.nl/).

I.7: Referencias

Batlle AM del C. El laboratorio de las Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos, bioquímicos y biología molecular (1997). Actualizaciones médico-bioquímicas. Acta Bioquím Clín Latinoam. 145-170.

De Siervi A, Parera VE, Batlle A, Rossetti MV. Two new mutations (H106P and L178V) in the protoporphyrinogen oxidase gene in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2000a). Hum Mut. 16:532-534.

De Siervi A, Parera VE, Varela LS, Batlle A y Rossetti MV: A novel mutation (1320InsT) identified in two Argentine families with Variegate Porphyria (2000b). Hum Mut. 16:96-98.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations (2001). Hum Genet. 109:121-124.

den Dunnen JT, Paalman MH. Standardizing mutation nomenclature: why bother? (2003). Hum Mutat. 22(3):181-182.

Granata, BX. Caracterización molecular de la Porfiria Variegata en la población Argentina (2008). Tesina de grado presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para optar por el título Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Laros JF, Blavier A, den Dunnen JT, Taschner PE. A formalized description of the standard human variant nomenclature in Extended Backus-Naur Form (2011). BMC Bioinformatics. 12 Suppl 4:S5. DOI: 10.1186/1471-2105-12-S4-S5.

Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, Parera VE, Batlle A. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2008). BMC Med Genet. 9:54. DOI: 10.1186/1471-2350-9-54.

Capítulo II: Caracterización de mutaciones nuevas en el gen de la PPOX

II.1.1: Análisis bioinformático de las nuevas mutaciones missense

Para predecir el posible efecto de las nuevas mutaciones missense halladas en pacientes PV Argentinos, empleamos tres herramientas bioinformáticas: SIFT (http://sift.jcvi.org/; Ng & Henikoff, 2001), PROVEAN (http://provean.jcvi.org/; Choi et al, 2012; Choi 2012) y PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/; Adzhubei et al, 2010). Estas predicen, a partir de un alineamiento múltiple, el posible efecto biológico de la sustitución de un aminoácido por otro en la proteína en estudio (PPOX, NP_001116236.1). Cada uno de estos programas calculará un score, el cual nos brinda una idea del efecto del cambio de residuo en una dada posición; dicho score es obtenido a partir del alineamiento. En comparación con un dado valor umbral (SIFT: <0.05; PROVEAN: <-2.5; PolyPhen-2: >0.5), el score para cada secuencia se considera significativo, es decir, el efecto de un cambio es deletéreo.

II.1.2: Expresión de mutaciones missense

Para el ensayo funcional de expresión de mutaciones empleamos al vector pHPPO-X (cortesía del Dr Peter Meissner, Groote Schuur Hospital, Ciudad del Cabo, Sudáfrica). Éste se obtuvo mediante la inserción del ADNc normal de la PPOX en el vector pTrcHis B (Invitrogen) que contiene un gen de resistencia a ampicilina y es inducible por IPTG, metodología descripta por Dailey & Dailey (1996). El vector normal, es decir, pHPPO-X, se mantiene en bacterias E. coli JM109 y se designa pTrc-PPOX-wt.

II.1.2.1: Preparación de los constructos mutantes

Para generar los constructos mutantes, que contengan la mutación deseada en la posición correspondiente del ADNc, utilizamos la estrategia de mutagénesis sitio dirigida. En la Figura II.1 se muestra en forma esquemática la metodología empleada. En el caso de las mutaciones p.E34V, p.S76F, p.A159V, p.G332A y p.Y422C (Fig. II.1 a) la estrategia comprende tres reacciones de PCR.

Las dos primeras reacciones de amplificación introducen la mutación con el primer reverse en PCR 1 y forward en PCR 2, y además aprovechan los sitios de restricción propios de la secuencia del ADNc de la PPOX presentes hacia 5' de PCR 1 y 3' de PCR 2. En la PCR 3 se utilizan los productos anteriores como templado y los primers forward de PCR 1 y reverse de PCR 2 para obtener un fragmento de mayor tamaño que contiene la mutación en su parte media y los dos sitios de restricción hacia los extremos. La mutación p.W224G, en cambio, se obtuvo mediante una única PCR donde el primer forward contiene un sitio de restricción y el reverse contiene la mutación y el sitio de restricción restante (Fig. II.1 b).

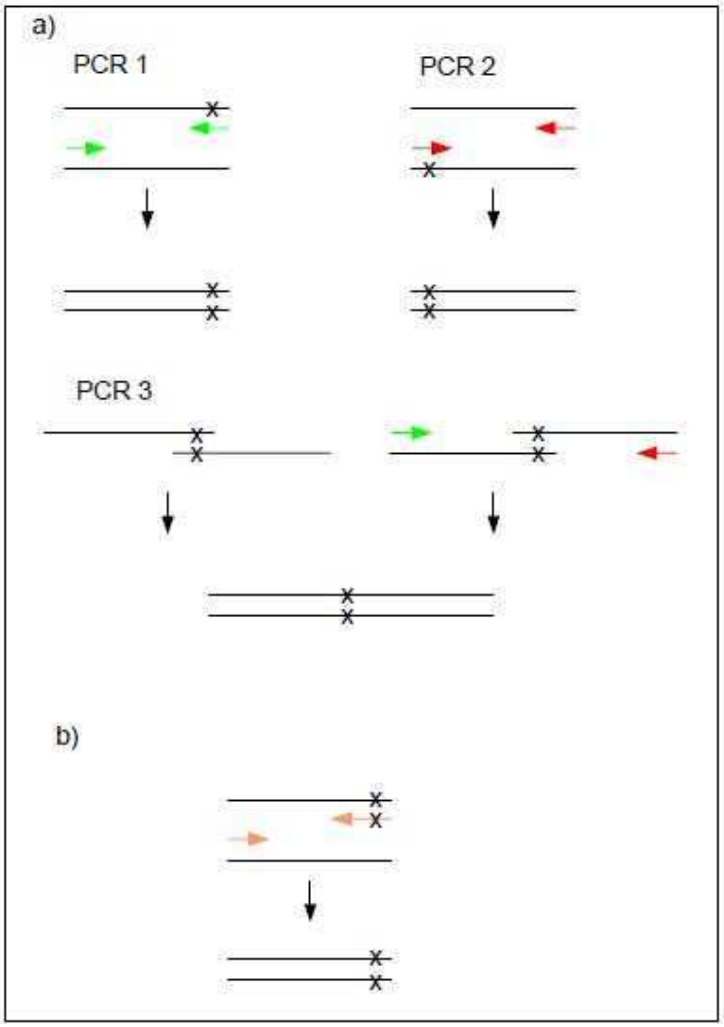


Figura II.1: Esquema de estrategia de mutagénesis sitio dirigida. a) Estrategia empleada con las mutaciones p. p.E34V, p.S76F, p.A159V, p.G332A y p.Y422C. b) Estrategia utilizada con la mutación p.W224G.

Para realizar los constructos correspondientes a las mutaciones p.E43V y p.S76F se emplearon las enzimas de restricción CpoI y SacI; en el caso de p.Y422C y p.G332A, XbaI y HindIII; para p.A159V, CpoI y XbaI, y finalmente para p.W224G se emplearon las enzimas SacI y XbaI. En la Tabla II.1 se muestran las secuencias de todos los primers usados. Todos los protocolos de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl en presencia de 1,5 mM de Mg^{2+}; 0,2 mM de cada primer; 200 µM de cada dNTP y 0,05 U/µl de Taq polimerasa (Taq Polymerase, Recombinant-Invitrogen). Los programas de amplificación contaron con una temperatura de annealing de 60 °C y entre 30 y 35 ciclos. Como templado se utilizaron entre 10 y 20 ng de pTrc-PPOX-wt para la PCR1 y PCR2. Para aquellas mutagénesis que se realizaron en 3 reacciones, los productos obtenidos en PCR 1 y PCR 2 se purificaron (según protocolo descripto en Método Experimental I.4) y se mezclaron en igual proporción, para ser utilizados como nuevo templado en la PCR 3 (entre 10 y 20 ng de esta mezcla).

	PCR1		PCR2	
MUTACIÓN	*Primer Forward*	*Primer Reverse*	*Primer Forward*	*Primer Reverse*
p.E34V	atgggccggaccgtggt	tcccagacgctcactgctcAccactagga	tcctagtggTgagcagtgagcgtctg	atgctgagctcacggctgttgcct
p.S76F	atgggccggaccgtggt	ccaagctcaAaaaccaggagca	tgctcctggtttTtgagcttgg	atgctgagctcacggctgttgcct
p.A159V	atgggccggaccgtggt	ggctagagacAccacctcagg	cctgaggtggTgtctctagcc	ggcaacatctctagacctcc
p.W224G	tggagtgtttgcaggcaacagc	aacatctctagacctccacgaagtgaccactggctcc	-	-
p.G332A	agtggtcacttcgtggaggt	ggcaccaaatgtGcaaatccctgga	ccagggatttgCacatttggtgccatct	atccgccaaaacagccaagctttca
p.Y422C	agtggtcacttcgtggaggt	ccagtgacctagtgtaCactggggaat	attccccagtGtacactaggtcactgg	atccgccaaaacagccaagctttca

Tabla II.1: Primers utilizados en la estrategia de mutagénesis sitio dirigida. Las secuencias se muestran en sentido 5' – 3', las regiones subrayadas corresponden a los sitios de restricción y las mayúsculas a los cambios nucleotídicos. Los últimos tres primers forward de PCR1 que no presentan en su secuencia sitios de restricción se debe a que el sitio se encuentra unas bases río abajo en el ADNc.

Una vez obtenidos los amplicones con la mutación de interés, estos se digirieron con las enzimas de restricción mencionadas más arriba según especificaciones del fabricante (New England Biolabs). Se llevó a cabo, en todos los casos, la digestión doble de vector (pTrc-PPOX-wt) e inserto (amplicón mutado correspondiente) a 37 °C, O.N., en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de incubación fueron: 0,5 - 1 µg de vector, 250 - 500 ng de inserto,

10 – 20 U de enzima y, en el caso de ser necesario BSA 1X; la reacción se detuvo con calor: 65 °C durante 20 min. Posteriormente a la digestión de vector, éste se desfosforiló empleando 20 U de fosfatasa alcalina (CIP - New England Biolabs) en un volumen final de 60 µl e incubando 1hr a 37 °C. Como paso siguiente, tanto inserto como vector, se purificaron y cuantificaron (Método Experimental I.4 y I.2, respectivamente).

A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación vector-inserto, utilizando una relación molar entre 1:3 a 1:6 de vector:inserto. En un volumen final de 20 µl se emplearon 100 ng de vector, la masa correspondiente de inserto para cumplir con la relación molar y 400 U de T4 ADN Ligasa (New England Biolabs), y se incubó a 16 °C O.N.

Luego de la ligación, bacterias E. coli JM109 competentes (JM109 Competent Cells, >108cfu/µg; Promega), se transformaron de acuerdo al siguiente protocolo: se mezclan 100 ml de bacterias competentes con 10 µl del producto de ligación en un tubo eppendorf estéril, se homogeniza suavemente y se incuba por 20 min. en frío (4 °C). Luego, se incuban los tubos a 42 °C por 50 segundos y finalmente en frío por 2 min. Al cabo del shock térmico, se agregan 450 µl de medio LB estéril y se mantiene en agitación (150 rpm aproximadamente) durante 90 min. Al finalizar dicha incubación, se centrifugan los tubos (6000 rpm, 2 min.) para disminuir el volumen a plaquear. Posteriormente, las bacterias obtenidas se sembraron en placas de Petri con LB + Ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron en estufa de incubación a 37 °C, O.N.. También se realizaron los controles correspondientes: de viabilidad, donde una alícuota de bacterias competentes se somete al proceso de transformación sin la adición de ADN, y de crecimiento, donde una alícuota de bacterias competentes se plaquea directamente.

Como primer screening realizamos una colony PCR, analizando de 5 a 10 colonias por placa de transformación, con los primers específicos utilizados anteriormente en el protocolo de mutagénesis sitio dirigida. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl con 1,5 mM de Mg^{2+}, 0,2 mM de cada primer, 200 µM de cada dNTP, 0,05 U/µl de Taq polimerasa (Taq

Polymerase, Recombinant-Invitrogen) y una pequeña muestra (punta de tip) de cada colonia. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 8 min., la temperatura de annealing fue de 55 °C y se emplearon 30 ciclos.

Las colonias positivas en esta primera etapa, se crecieron en suspensión (3 ml de LB liquido + ampicilina 100 μg/ml) O.N. y al día siguiente se extrajo el ADN plasmídico con el kit miniprep Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual tiene como principio la unión del ADN a la matriz de sílica de una columna en presencia de una elevada concentración de sal caotrópica y la recuperación selectiva durante la elución del ADN plasmídico. Las muestras se secuenciaron en forma automática (ABI3730XL ADN analyzer - Macrogen) con primers ubicados en el vector, de modo de determinar no sólo la presencia de la mutación sino también el correcto ensamble del inserto en el vector.

II.1.2.2: Expresión de las proteínas mutantes

Una vez identificado el clon que contiene la mutación en la posición buscada, proseguimos con la inducción de la expresión de la proteína defectuosa. Cada colonia positiva se inoculó en 2 ml de LB líquido, en presencia de ampicilina (100 μg/ml) para mantener la presión de selección y se incubó a 37 °C O.N, con agitación. Se tomaron luego 200 μl de bacterias para inocular 10 ml de LB fresco con ampicilina (100 μg/ml). Se incubó a 37 ºC hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, es decir una densidad óptica del cultivo a 600 nm de 0,5 aproximadamente. Al alcanzar la fase exponencial, 3 ml de cada cultivo se indujo con 5 mM de IPTG, durante 3hs. A continuación se centrifugaron a máxima velocidad y lavaron dos veces con PBS, y finalmente se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min. en frío (4 °C). Los pellets se resuspendieron en 0,02 M de buffer Tris-Hcl (pH 8,7) conteniendo 2% de Tween 20 (v/v), esta suspensión se sonicó tres veces a 50 W/seg durante 10 segundos cada vez, en hielo. Luego los lisados se centrifugan y el sobrenadante se emplea como fuente enzimática. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976).

II.1.2.3: Sistema de incubación in vitro

El sistema de incubación se conforma de 1 mM de EDTA, 2 mM de GSH, 20 µl de Tween 20, 560 µl de una solución de sustrato (protogen IX) de concentración 100 µg/ml y 820 µl de lisado de bacterias (0,5-3mg de proteína). La solución de sustrato se preparó a partir de una solución de proto IX en KOH 0,5 M y etanol (1:1) reducida, en oscuridad y anaerobiosis, empleando amalgama de sodio 3%, en el momento de la experiencia. También se preparó un estándar para cada determinación (dilución 1:1.000 de solución 100 µg/ml de proto) a partir de la solución de porfirina a reducir. Los blancos de reacción se realizaron con 820 µl de buffer Tris-HCl 50 mM y los blancos de enzima con suspensión de lisado calentados a 75 ºC durante 10 min. Se incubó a 37 ºC con agitación durante 1 hr en estrictas condiciones de anaerobiosis y oscuridad, que se lograron empleando un sistema original especialmente diseñado para tal fin (Granata, 2008).

II.1.2.4: Determinación de la actividad enzimática

Luego de la hora de incubación en estricta anaerobiosis y oscuridad, se determinó la formación de producto espectrofluorométricamente, según Brenner & Bloomer (1980).

Se tomaron 30 µl de la mezcla incubada y se llevó a volumen final 3 ml con una solución de fluorescencia compuesta por Tris-HCl 50 mM (pH 8,7), EDTA y GSH. Lego se determinó el espectro de fluorescencia con los siguientes parámetros: $\lambda_{excitación}$ = 400 nm; $\lambda_{emisión}$ entre 500 y 700 nm.

Los resultados se expresaron como nmoles de protoporfirina formada por hora por mg de proteína según la siguiente ecuación:

$$AE\ (nmoles/mg*h) = \frac{F_M * C_{ST} * Vol_F * Vol_{Inc} *}{F_{ST} * Vol_{alicuota} * PM_{Proto} * mg\ prot}$$

$$F_M = F_{medida} - F_{bcoR} - F_{bcoE}$$

F_M: fluorescencia de la muestra, F_{medida}: fluorescencia medida, F_{bcoR}: fluorescencia del blanco de reactivos, F_{bcoE}: fluorescencia del blanco de enzima, C_{ST}: concentración del estándar, Vol_F: volumen de la fracción, Vol_{Inc}: volumen incubado, F_{ST}: fluorescencia del estándar, $Vol_{alicuota}$: volumen de la alícuota, PM_{Proto}: peso molecular de proto.

II.2.1: Análisis bioinformático de mutaciones de splicing

De la misma forma que con las mutaciones missense, las mutaciones que podrían afectar el splicing del ARNm de la PPOX se analizaron en una primera instancia mediante herramientas bioinformáticas. El posible efecto sobre la "fuerza" de los sitios donor (5' ss) y aceptor (3' ss) de splicing se estudiaron con el programa NN Splice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; Reese MG et al, 1997). Este programa, se basa en el reconocimiento de los sitios consenso de splicing (GT y AG, para los sitios donor y aceptor, respectivamente) a partir de un set de secuencias, generando así un score de 0 a 1 sobre el potencial sitio de splicing que se desea analizar. Este score se compara con un valor umbral de 0,1 para sitio donor y 0,4 para sitio aceptor de splicing.

Además, se analizaron los posibles efectos sobre los enhancers exónicos de splicing (ESE, de su sigla en inglés exonic splicing enhancer) con los programas ESE Finder (http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home; Smith et al, 2006; Cartegni et al, 2003) y Rescue ESE (http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/; Fairbrother et al, 2002). Ambos programas identifican posibles ESEs, elementos estimulatorios exónicos en cis importantes para la correcta identificación de un sitio de splicing, mediante dos estrategias distintas. ESE Finder examina secuencias en busca de posibles elementos de respuesta a proteínas SR (Proteína rica en serina-arginina; familia de factores de splicing), por tanto, el efecto de una mutación se predice en función de la alteración o no de los sitios de unión a estas proteínas. Para cada proteína SR se genera un score el cual se considera significativo en comparación a un valor umbral dado para cada una de estas proteínas (SF2/ASF: 1.956; SC35: 2.383; SRp40: 2.670; SRp55: 2.676).

Por otra parte, Rescue ESE, busca secuencias con actividad ESE mediante el análisis estadístico de la frecuencia de hexanucleótidos identificados previamente como dichos elementos. Así identifica motivos ESE putativos por comparación entre la frecuencia de dichos hexanucleótidos presentes en exones con sitios de splicing fuertes (consenso) y débiles (no consenso).

II.2.2: Expresión de mutaciones de splicing

Para llevar a cabo el ensayo funcional de expresión de mutaciones de splicing en células eucariotas empleamos el vector pTB Minigene (cortesía del Dr. Francisco Baralle, ICGEB, Trieste, Italia). Este vector híbrido se contruyó utilizando el plásmido pBlueScritp, en el cual se insertaron exones de α-globina y fibronectina bajo el control del promotor de α-globina. El sitio de clonado, conformado por un sitio único para la enzima NdeI, está presente en el intrón que separa los dos exones de fibronectina (Vibe-Pedersen et al, 1884; Baralle & Baralle, 2005).

II.2.2.1: Preparación de los constructos

Para generar los vectores a transfectar en células eucariotas, es necesario diseñar una construcción WT y otra que contenga la mutación en estudio. Dicha construcción debe contar con el exón afectado por la mutación y sus dos intrones flanqueantes. De esta manera, diseñamos 3 PCRs para amplificar la región de interés a clonar en el vector pTB Minigene (Fig. II.2).

Para cada reacción diseñamos primers específicos (Tabla II.2) para amplificar la región que contiene al exón 4 (para la mutación c.338+3insT), al exón 7 (para la mutación c.807 G>A) y al exón 8 (para la mutación c.808-1 G>C). Estos primers cuentan además con un sitio NdeI, de modo que puedan insertarse en el sitio de clonado del vector de expresión pTB Minigene.

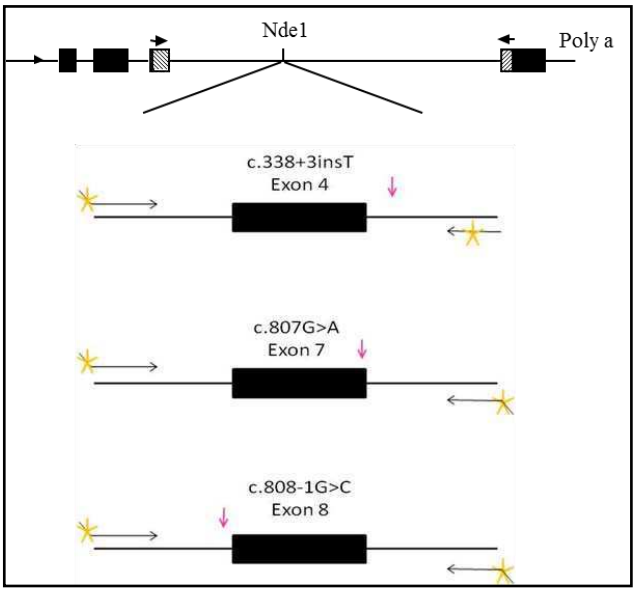


Figura II.2: Diseño de PCRs para generar los constructos WT y mutante para cada región en estudio, a insertar en el vector de expresión pTB Minigene. Se muestra el exón a amplificar y sus intrones flanqueantes, con la posición de cada mutación en estudio y el lugar de inserción del fragmento en el vector pTB Minigene. Flechas negras sobre intrones: primers usados en las PCR de diseño de los constructos; flechas negras sobre vector: primers de amplificación por RT-PCR; flechas rosas: mutación y estrellas naranjas: sitios NdeI.

MUTACIÓN	Constructo	*Primer Forward*	*Primer Reverse*	Peso del fragmento amplificado
c.338+3 insT	pTB-E4	ggaattccCATATGgtgggatgtctaggagag	tggaaggCATATGaggatgag	310 pb
c.807 G>A	pTB-E7	ggaattcCATATGttcaagcaattctcctgcct	ggaattcCATATGggcctaggattctggggtag	612 pb
c.808-1 G>C	pTB-E8	ggaattcCATATGgcctgggaaactgagagt	ggaattcCATATGcttctcactggtaggggttgg	226 pb

Tabla II.2: Primers específicos diseñados para amplificar cada región a clonar. En mayúscula se muestra el sitio NdeI introducido en cada primer, excepto en el primer forward para la mutación c.338+3insT, en el cual se aprovecha la secuencia de restricción existente en el intrón 4 del gen de la PPOX.

Todos los protocolos de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl en presencia de 1,5 mM de Mg^{2+} para las mutaciones c.338+3insT y c.808-1G>C y 0 8 mM para la mutación c.807G>A; 0,2 mM de cada primer; 200 µM de cada dNTP y 0,05 U/µl de Taq polimerasa (Taq Polymerase, Recombinant-Invitrogen). Los programas de amplificación contaron con una temperatura de annealing de 60 °C para las mutaciones c.338+3insT y c.808-1G>C y 61 °C para la mutación c.807G>A y 30 ciclos. Como templado se utilizaron entre 50 y 100 ng de ADN de un paciente portador en heterocigosis de cada mutación, de modo de obtener un 50% de moléculas con la mutación y el restante 50% WT. El éxito de las reacciones de amplificación se chequeó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente las muestras se purificaron empleando un

kit comercial y finalmente se cuantificaron (Método Experimental I.4 y I.2, respectivamente).

Los fragmentos de PCR así obtenidos se insertaron en el vector de clonado pGEM T-easy (Promega), aprovechando las A-overhang que la polimerasa deja en los extremos de los amplicones. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl que cuenta con buffer de ligación 2X, 3 U de T4 ADN Ligasa, 50 ng de vector y una masa de producto de PCR tal para mantener una relación molar vector:inserto 1:3. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora. De esta forma, obtuvimos los vectores recombinantes pTB-E4, pTB-E7 y pTB-E8, WT y mutante, correspondientes a las mutaciones c.338+3 insT, c.807 G>A y c.808-1 G>C, respectivamente.

A continuación se transformaron las bacterias competentes E. coli JM109 con los vectores recombinantes, según el protocolo ya descripto en Método Experimental II.1.2.1, realizando además los controles de viabilidad y crecimiento correspondientes.

El primer screening sobre las colonias transformantes se realizó mediante colony PCR, empleando los primers de amplificación de cada constructo (ver Tabla II.2.2.1) y las condiciones descriptas en Método Experimental II.1.2.1. Se obtuvieron los plásmidos de las colonias positivas, luego de crecer O.N. dichas colonias en presencia de ampicilina (100 µg/ml), mediante minipreps (Método Experimental II.1.2.1). La integridad de éstos se corroboró mediante secuenciación automática empleando los primers universales T7 y SP6.

Una vez identificados los clones WT y mutante para cada región de interés, las bacterias transformadas con estos plásmidos se sembraron nuevamente en placa y luego en suspensión, siempre en presencia de ampicilina, para realizar la extracción del ADN plasmídico mediante un kit midiprep (Axygen), de modo de mejorar el rendimiento, para contar con más masa a la hora de transfectar las células eucariotas. Este kit se basa en la lisis alcalina en presencia de SDS de las bacterias en combinación con la unión selectiva del ADN plasmídico a una columna de purificación.

Para la mutación c.338+3insT se construyó un minigen más amplio. En este caso los exones 3, 4 y 5 y los intrones intermedios se insertaron en el vector de expresión eucariota pcDNA 3. La PCR diseñada para tal fin se realizó con los primers listados en la Tabla II.3, con las condiciones de amplificación antes descriptas (Método Experimental II.1.2.1) pero con una temperatura de annealing de 62 °C. Como templado se utilizó ADN genómico normal. Este fragmento, luego de ser purificado, se digirió simultáneamente con las enzimas KpnI (20 U) y XhoI (50 U) en los sitios introducidos con los primers de amplificación. La reacción se realizó en un volumen final de 100 µl, en presencia de BSA y se incubó a 37 °C O.N. Una alícuota de vector pcDNA 3 (6 µg) se digirió bajo las mismas condiciones. A continuación se ligaron ambas moléculas en una relación molar vector:inserto 1:3 con 50 ng de vector y el producto de ligación se empleó para transformar bacterias E. coli JM109 competentes (Método Experimental II.1.2.1). Como se describió anteriormente, el primer screening se realizó por colony PCR con un primer sobre el fragmento y otro sobre el vector. Las colonias positivas se secuenciaron para corroborar la integridad de la secuencia del inserto. De esta manera se obtuvo el constructo pcDNA E4 WT.

MUTACIÓN	Constructo	*Primer Forward*	*Primer Reverse*
c.338+3 insT	pcDNA E4 WT	cggGGTACCgtggtcctagtggagagcag	ccgCTCGAGctcaggtccaaggcggcgct
c.338+3 insT	pcDNA E4 M	ctggcctcaggt*t*aacaccagca	tgctggtgtt*a*acctgaggccag
c.807 G>A	snARN U1 E7	atggtatctcccctgc*aaagtaggggga*gagatcttgggcctctg	tcggggcagaggcccaagatctc*tcccctactttt*gcagggga

Tabla II.3: Primers específicos diseñados para amplificar la región comprendida entre el exón 3 y 5 del gen de la PPOX. En mayúscula se muestran los sitios de restricción KpnI (F) y XhoI (R) y en cursiva el cambio nucleotidico a introducir.

El constructo mutante correspondiente (pcDNA E4 M) se obtuvo por mutagénesis sitio dirigida mediante el kit Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realiza una reacción de PCR utilizando como templado al vector pcDNA E4 WT y los primers listados en la Tabla II.3 (pcDNA E4 M), los cuales son

exactamente complementarios, de forma tal que la amplificación genera moléculas completas de vector, con cortes escalonados. Las condiciones de amplificación cuentan con un tiempo de extensión de 5 min. 20 segundos, una temperatura de annealing de 55 °C y de extensión de 68 °C, por 18 ciclos; 2,5 U de Pfu Turbo ADN Polymerasa (Promega), 50 ng de pADNc E4 WT, 150 ng de cada primer y 200 μM de cada dNTP en un volumen final de 50 μl. Luego de la amplificación el producto se digirió con la enzima de restricción DpnI, la cual digiere selectivamente moléculas de ADN metilado y hemimetilado, de modo que el ADN parental será digerido mientras que el recientemente amplificado no. La reacción se llevó a cabo agregando directamente al tubo amplificado 10 U de DpnI e incubando 1 hora a 37 °C. Con 1, 2 y 5 μl de este producto transformamos 50 μl de bacterias competentes, de acuerdo al protocolo ya descripto (Método Experimental II.1.2.1). Colonias de las tres placas se secuenciaron, previa extracción plasmidica por miniprep, para corroborar la presencia de la mutación.

Por último, diseñamos un constructo para expresar U1 snRNA perfectamente complementario a la mutación c.807G>A y de esta manera poner en evidencia si el efecto de la mutación es a nivel del sitio de unión de este factor en el sitio donor de splicing. Utilizamos nuevamente el método Quickchange Site-Directed Mutagenesis con los primers listados en la Tabla II.3. En éste el tiempo de extensión fue de 4 min. y como templado se utilizaron 20 ng de un vector con la secuencia canónica de U1 ya insertada (Pagani et al, 2002). Una vez obtenido esto, se procedió a la digestión con DpnI ya descripta y posteriormente 5 μl de dicha reacción se emplearon para transformar 50 μl de bacterias competentes. Los plásmidos de las colonias resultantes se secuenciaron para corroborar la presencia del cambio de nucleótidos introducido. En este caso también fue necesario realizar la extracción plasmídica mediante un kit de midiprep para aumentar la concentración de vector recombinante.

II.2.2.2: Expresión de los minigenes

Una vez obtenidos todos los vectores recombinantes se procedió a transfectar células HeLa en forma transiente. Éstas se sembraron en medio completo (DMEM + glutamina) con 10% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Sigma). Los ensayos de transfección se realizaron en placas de 6 pocillos

Se utilizaron 0,5 μg de cada constructo para transfectar 2,5 x 10^5 células HeLa, con "Effectene Transfection Reagent" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Éste se basa en la formación de complejos effectene-ADN, donde el ADN se encuentra altamente condensando y recubierto por dicho reactivo formando así micelas de igual tamaño, que permiten lograr una transfección efectiva.

En el caso del ensayo en presencia de U1 snRNA, se realizó una co-transfección con el vector U1 con la secuencia canónica o mutada y el constructo pTB E4 WT o mutado, en las mismas condiciones descriptas anteriormente.

A las 24 hs posteriores a la transfección se extrajo el ARN de las células empleando Eurogold Trifast. Este protocolo se basa en una extracción fenol-cloroformo, donde el ARN se obtiene a partir de la fase acuosa.

II.2.2.3: Análisis del perfil de expresión de ARNm

Con las muestras de ARN obtenidas se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR. La retrotranscripción (RT) se realizó en un volumen final de 25μl en presencia de 400 μM de dNTPs, 8 μg/μl de random primers (Promega), 10 mM de DTT y 10 U/μl de MMLV-RT (Invitrogen); se incubó por 1 hora a 37 ºC.

Posteriormente se realizó la amplificación por PCR, empleando primers específicos de cada vector utilizado en la transfección (Tabla II.4). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl, con 400 μM de dNTPs, 3 ng/μl de cada primer específico, 3 μl de ADNc obtenido en la reacción anterior y 1 U de Taq ADN Polimerase (New England Biolabs). El programa de amplificación consta de 35 ciclos y una temperatura de annealing de 58 °C.

Vector	*Primer Forward*	*Primer Reverse*
pTB Minigene	caacttcaagctcctaagccactgc	ggtcaccaggaagttggttaaatca
pcDNA 3	taatacgactcactataggg	atttaggtgacactatag

Tabla II.4: Primers específicos utilizados en las reacciones de RT-PCR posteriores a los ensayos de transfección. Estos oligos son complementarios al vector correspondiente. Los primers empleados para amplificar el vector pcDNA 3 son los pirmers universales T7 promoter y SP6.

Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

Se realizaron 3 transfecciones independientes para cada ensayo. Los perfiles de expresión se analizaron con el programa Scion Image (Scion Corporation, USA) y los resultados se expresaron como media ± desvío estándar.

II.3: Referencias

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations (2010). Nat Methods. 7(4):248-249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes (2005). J Med Genet. 42(10):737-48.

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

Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers (2003). Nucleic Acids Res. 31(13):3568-3571.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels (2012). PLoS ONE 7(10): e46688. DOI: 10.1371/jouARNl.pone.0046688.

Choi Y. A Fast Computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein (2012). In Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB '12). ACM, New York, NY, USA, 414-417.

Dailey TA, Dailey HA. Human protoporphyrinogen oxidase: expression, purification and characterization of the cloned enzyme (1996). Protein Sci. 5:98-105.

Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes (2002). Science. 297(5583):1007-1013.

Granata, BX. Caracterización molecular de la Porfiria Variegata en la población Argentina (2008). Tesina de grado presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para optar por el título Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions (2001). Genome Res. 11(5):863-874.

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dörk T, Baralle FE. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM (2002). Nat Genet. 30(4):426-429.

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved Splice Site Detection in Genie (1997).J Comp Biol. 4(3):311-323.

Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers (2006). Hum Mol Genet. 15(16):2490-2508.

Vibe-Pedersen K, Kornblihtt AR, Baralle FE. Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mARNs by alteARNtive splicing (1984). EMBO J. 3(11):2511-2516.

Capítulo III: Análisis de haplotipos

III.1: Selección de marcadores moleculares: STRs

Con el fin de elucidar el origen de la mutación c.1.042_1.043insT se realizó un estudio de haplotipos. Para esto se seleccionaron como marcadores moleculares las secuencias repetitivas en tándem, o STRs de su sigla en inglés short tandem repeats.

Estudiamos un total de 5 STRs flanqueantes al gen de la PPOX, presentes en el cromosoma 1. Estos abarcan una distancia genética de 7,1 cM o una física de 3,5 Mb (Tabla III.1). Se seleccionaron en función de su utilización en estudios previos, en los cuales se describió que se encuentran en desequilibrio de ligamiento respecto del gen de la PPOX (Groenewald et al, 1998) y se los empleó en el análisis de haplotipos en pacientes PV en otras poblaciones (Frank et al, 2001; de Villiers et al, 2005; van Tuyll van Serooskerke et al, 2009; van Tuyll van Serooskerken et al, 2012).

La secuencia de nucleótidos de cada marcador molecular se obtuvo del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore).

Locus	Ubicación física en el cromosoma 1 (pb)[1]	Ubicación mapa genético (cM)[2]	Unidad de repetición[3, 4]	PM fragmento (pb)[5]	Heterocigosis[4, 6]
D1S2707	160.072.222-160.072.611	168,52	CA	135-159	0.82
D1S484	160.767.311-160.767.708	169,68	CA	136-142	0.63
D1S2705	160.857.819-160.858.149	170,84	CA	130-162	0.75
PPOX	*161.136.181-161.141.010*	—	—	—	—
D1S1679	162.361.764-162.362.074	170,84	TTCC / TC	144-172	0.8
D1S104	163.636.907-163.637.064	175,62	CA	152-162	0.7

Tabla III.1: Ubicación de los STRs seleccionados y del gen de la PPOX (en cursiva) y otras características. [1] UCSC Genome Bioninformatics (http://www.genome.ucsc.edu/index.html); [2] Marshfield Genetic Map (http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp); [3] GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore); [4] The ALlele FREquency Database (http://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp); [5] UniSTS (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists); [6] Genethon Genetic Maps (http://www.bli.uzh.ch/BLI/Projects/genetics/maps/gthon.html).

III.2: Pacientes y controles

Se emplearon muestras de ADN genómico de pacientes PV y controles, previa obtención de su consentimiento informado. Además, se respetaron todas las consideraciones éticas antes establecidas (Método experimental, I.1).

Los pacientes PV se dividieron en dos grupos para el análisis de haplotipos: pacientes PV portadores de la mutación c.1.042_1.043insT (ins; N= 26) y pacientes PV portadores de otras mutaciones (otras; N= 51). Al analizar la segregación de alelos se incluyeron además los miembros disponibles de cada familia no portadores de la mutación, llegando a un N= 31 en el grupo ins y N= 78 en el grupo otras.

Respecto de los controles, se incluyeron 40 individuos provenientes del banco de ADN control del CIPYP.

III.3: Genotipificación de STRs y análisis de los datos obtenidos

La genotipificación de los STRs seleccionados se realizó mediante PCR fluorescente seguida de análisis del tamaño de los fragmentos por electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI3730XL, Macogen Genescan Service).

La secuencia de todos los primers empleados en este ensayo se obtuvo de UCSC Genome Bioninformatics (http://www.genome.ucsc.edu/index.html) y GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore).

La estrategia de PCR de los marcadores D1S2707, D1S2705 y D1S104 se realizó utilizando primers específicos para amplificar la región de interés, donde el primer forward está marcado en el extremo 5' con el fluoroforo 6-FAM (Tabla III.2). El programa de amplificación se detalla en la Tabla III.3.

STR	D1S2707	D1S2705	D1S104
Primer Forward	CCCCTTGGCATAGGGTT	GGGCGTTTACCTCTACAC	ATCCTGCCCTTATGGAGTGC
Primer Reverse	AGCCAGGCATCTGCAC	AAACAGGCCACACTCAATA	CCCACTCCTCTGTCATTGTA

Tabla III.2: Primers específicos de amplificación de 3 de los STRs estudiados. El extremo 5' de cada primer forward se encuentra marcado con 6-FAM.

ETAPA	Temperatura - tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	94 ºC - 5 min	
Desnaturalización	94 ºC - 30 seg	10
Annealing	60 ºC/ 57 °C - 30 seg	
Desnaturalización	94 ºC - 30 seg	40
Annealing	55 °C - 30 seg	
Extensión final	68 ºC - 10 min	

Tabla III.3: Programa de amplificación empleado para los STRs D1S2707, D1S2705 y D1S104. La temperatura de annealing de 57 °C corresponde únicamente al marcador D1S2707.

El protocolo de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, con 1,5 mM de Mg^{2+}; 1,5X de BSA o enhancer (Platinum Pfx DNA Polymerase, Invitrogen); 200 µM de dNTPs; 0,16 µM de cada primer; 0,5 U de Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) y entre 100 y 150 ng de templado.

En el caso de los STRs D1S484 y D1S1679, la estrategia de amplificación se realizó empleando la técnica del primer universal M13 marcado (Oetting et al, 1995; Schelke, 2000; Boutin-Ganache et al, 2001; Hayden et al, 2008). Cada marcador molecular cuenta con sus primers forward y reverse específicos, sin embargo el primer forward posee una secuencia extra en su extremo 5' perfectamente complementaria a la del primer universal M13 (TGTAAAACGACGGCCAGT), el cual también es utilizado en la reacción de PCR dado que se encuentra marcado con el fluoroforo 6-FAM. De esta manera el único primer fluorescente necesario es el M13 y los amplicones incorporan la marca al tener una secuencia complementaria a éste en el primer forward. Teniendo esto en cuenta, el PM del fragmento obtenido por PCR es 18 nucleótidos mayor que el informado en la Tabla III.1. En las Tablas III.4 y III.5 se muestran los primers y condiciones de amplificación empleadas, respectivamente.

STR	D1S484	D1S1679
Primer Forward	*TGTAAAACGACGGCCAGT* AGTGATGAGGGCCTCTATTT	*TGTAAAACGACGGCCAGT* GCCATCAAGAAAACTAGTACTG
Primer Reverse	AGCTTCTGCCAACTATGTGC	ACCATGGTACTCAGCAGTG

Tabla III.4: Primers específicos de amplificación de 3 de los STRs estudiados. En cursiva se muestran los nucleótidos complementarios al primer universal marcado M13.

ETAPA	Temperatura - tiempo	# Ciclos
Desnaturalización inicial	95 ºC - 5 min	
Desnaturalización	95 ºC - 30 seg	10
Annealing	68 ºC a 63 °C - 30 seg	
Extensión	68 °C – 30 seg	
Desnaturalización	95 ºC - 30 seg	15
Annealing	63 °C - 30 seg	
Extensión	68 °C – 30 seg	
Desnaturalización	95 ºC - 30 seg	10
Annealing	59 °C a 54 °C - 30 seg	
Extensión	68 °C – 30 seg	
Desnaturalización	95 ºC - 30 seg	15
Annealing	53 °C - 30 seg	
Extensión	68 °C – 30 seg	
Extensión final	68 ºC - 10 min	

Tabla III.5: Programa de amplificación empleado para los STRs D1S484 y D1S1679. En la primer y tercer etapa del programa se empleó PCR touchdown y se puede observar el rango de temperaturas de annealing en cada caso. La PCR de D1S484 se realizó eliminando el paso de extensión durante los ciclos. Optimizado a partir de Henegariu et al, 1997; Schelke, 2000; Hayden et al, 2008.

En este caso, el protocolo de amplificación también se realizó en un volumen final de 25 µl, con 1,5 mM de Mg^{2+}; entre 1 y 1,5X de enhancer (Platinum Pfx DNA Polymerase, Invitrogen); 200 µM de dNTPs; 0,5 U de Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) y entre 100 y 150 ng de templado. En cuanto a la concentración de primers, ésta mantiene en los 3 casos la relación primer reverse > primer M13 > primer forward: D1S484= 200 µM (R), 125 µM (M13), 75 µM (F); D1S1677= 125 µM (R), 75 µM (M13), 50 µM (F); D1S1679= 125 µM (R), 75 µM (M13), 50 µM (F).

La reacción de PCR correspondiente a cada STR se visualizó posteriormente en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Las muestras positivas se emplearon para la determinación de tamaño de los alelos (Genescan Service, Macrogen) por electroforesis capilar. Se empleó 500 LIZ como estándar interno de peso molecular.

Los resultados del ensayo de determinación del tamaño del fragmento se analizaron con el programa PeakScanner (Applied Biosystems). Se consideraron

los picos cuyas unidades relativas de fluorescencia se encuentran entre 1.000 y 20.000 (Hayden et al, 2008) y se analizaron sólo los picos presentes en el rango de peso molecular de la región de interés (Tabla III.1).

Los resultados obtenidos se registraron en una tabla donde se asocian el grupo de individuos (ins, otras o controles), el individuo particular y los alelos que éste porta en peso molecular.

Las frecuencias alélicas y genotípicas, el número total de alelos y genotipos y la heterocigosis esperada y observada se calcularon a partir de la tabla mencionada arriba utilizando el software R (The R Project for Statistical Computing, http://www.r-project.org/). También se utilizó este software para comparar las frecuencias alélicas entre los grupos de individuos, mediante pruebas estándar χ^2 de contingencia y se consideró como diferencia significativa cuando $p<0,05$.

Además, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg para los controles, como representantes de la población general. Para esto se llevó a cabo un test χ^2 para cada STR dentro de este grupo de individuos, empleando nuevamente el programa R. Se consideró ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg cuando $p>0,05$.

Los haplotipos se construyeron en función de la segregación de los alelos dentro de cada familia, sobre los pedigrees de éstas. Complementariamente, se utilizó el programa PHASE (http://stephenslab.uchicago.edu/software.html) para determinar el haplotipo más probable de cada individuo y para comparar los haplotipos de cada grupo de individuos (prueba caso-control, diferencia significativa cuando $p<0,05$).

III.4 Referencias

Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M, Deschepper CF. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods (2001). Biotechniques. 31(1):24-6, 28.

de Villiers JN, Kotze MJ, van Heerden CJ, Sadie A, Gardner HF, Liebenberg J, van Zyl R, du Plessis L, Kimberg M, Frank J, Warnich L. Overrepresentation of the founder PPOX gene mutation R59W in a South African patient with severe clinical manifestation of porphyria (2005). Exp Dermatol. 14(1):50-55.

Frank J, Aita VM, Ahmad W, Lam H, Wolff C, Christiano AM. Identification of a founder mutation in the protoporphyrinogen oxidase gene in Variegate Porphyria patients from chile (2001). Hum Hered. 51(3):160-168.

Groenewald JZ, Liebenberg J, Groenewald IM, Warnich L. Linkage disequilibrium analysis in a recently founded population: evaluation of the Variegate Porphyria founder in South African Afrikaners (1998). Am J Hum Genet. 62(5):1254-1258.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol (1997). Biotechniques. 23(3):504-511.

van Tuyll Van Serooskerke AM, Schneider-Yin X, Schimmel RJ, Bladergroen RS, Poblete-Gutiérrez P, Barman J, van Geel M, Frank J, Minder EI. Identification of a recurrent mutation in the protoporphyrinogen oxidase gene in Swiss patients with Variegate Porphyria: clinical and genetic implications (2009). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 55(2):96-101.

van Tuyll van Serooskerken AM, Drögemöller BI, Te Velde K, Bladergroen RS, Steijlen PM, Poblete-Gutiérrez P, van Geel M, van Heerden CJ, Warnich L, Frank J. Extended haplotype studies in South African and Dutch Variegate Porphyria families carrying the recurrent p.R59W mutation confirm a common ancestry (2012). Br J Dermatol. 166(2):261-265. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10606.x.

Capitulo IV: Determinaciones bioquímicas de estrés oxidativo

IV.1: Pacientes y controles

Se emplearon muestras de sangre anticoaguladas con EDTA o heparina, obtenidas de acuerdo a los principios éticos previamente descriptos (Método Experimental I.1). Todos los individuos incluidos en este estudio dieron su consentimiento escrito. Además fueron sometidos al siguiente interrogatorio: edad, sexo, horas de ayuno, uso de medicación, consumo de alcohol y/o cigarrillo e intervenciones quirúrgicas.

Se obtuvo plasma partir de las muestras de sangre anticoagulada mediante centrifugación a 1.500g por 10 min. Posteriormente se las almacenó a -80°C hasta su utilización.

Los grupos empleados corresponden a individuos con PAI (N= 22) y PV (N= 12), y por último, voluntarios sanos (N= 20).

IV.2: Estado Oxidante Total

La determinación del estado oxidante total se realizó de acuerdo al método de Erel (2005). Para obtener el blanco de reacción se mezclaron 225 µl del reactivo 1 (naranja de xilenol 150 µM, NaCl 140 mM y glicerol 1,35 M en H_2SO_4 25 mM, pH 1.75) y 35 µl de muestra y se leyó la absorbancia a 560 nm. Luego se colocaron 11 µl de reactivo 2 (sulfato de amonio ferroso -5 mM de ión ferroso- y o-dianisidina 10 mM en 25 mM H_2SO_4). La mezcla anterior se agitó y a los 4 min. se determinó nuevamente la absorbancia a 560 nm. Para cuantificar el estado oxidante total se realizó una curva de calibración utilizando H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como µmoles de H_2O_2/l.

IV.3: Peroxidación lipídica: determinación de malóndialdehido

La determinación de malóndialdehído (MDA) se realizó según el método de Grotto et al (2007). A 75 µl de plasma se le adicionaron 25 µl de agua o

estándar y 25 µl de NaOH 3N. Esta mezcla se incubó 30 min. a 60 ºC en baño de agua con agitación. Luego se agregaron 125 µl de H_3PO_4 6% y 125 µl de una solución 0,8% de ácido tiobarbitúrico. La solución se calentó 45 min. a 90 ºC. Luego se enfrió y se agregó 50 µl de dodecil sulfato de sodio y se realizó una extracción con 300 µl de n-butanol. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3000g durante 10 min. La cuantificación de MDA se realizó por HPLC en fase reversa. La separación se llevó a cabo en una columna Merck Lichospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm. El volumen de inyección fue 25 µl. La fase móvil fue una mezcla agua: metanol (50:50) el flujo se mantuvo isocráticamente a 0,6 ml/min. El eluído se monitoreó por absorbancia a 532 nm. Como estándar de referencia se utilizó bis malóndialdehído (dimetilacetal). Los resultados se expresan como nmoles de MDA/l.

IV.4: Daño oxidativo a proteínas: determinación de grupos carbonilos

La determinación del daño oxidativo a proteínas se realizó según el método de Reznick &Packer (1994). En dos tubos se colocaron 200 µl de plasma, a uno de ellos se le añadió 800 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM en HCl 2,5 M mientras que en el segundo se agregó solamente 800 µl de HCl 2,5M (control). Se incubaron ambos tubos 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad, agitando las muestras cada 15 min. Se centrifugaron a 10000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20%, se colocó en hielo por 5 min. y se centrifugó 10.000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de TCA 10%, se colocó en hielo 5 min. y se centrifugó a 10.000 g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1), se centrifugó a 10.000 g por 10 min.. Este último paso se repitió 2 veces más. El precipitado obtenido luego de los lavados se resuspendió en Guanidina HCl 6 M en buffer 20 mM pH 2,3; se incubó 15 min. a 37 °C con agitación. Se centrifugó a 10.000 g por 10 min. para eliminar el

material insoluble. Finalmente se midió absorbancia a 370 nm y se determinó el contenido de carbonilos según la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/ml} = \frac{(A_m^{370} - A_b^{370}) \times V_f \times 10^9}{V_m \times \varepsilon}$$

A_m^{370}: absorbancia de la muestra a 370 nm; A_b^{370}: absorbancia del blanco de reactivos a 370 nm; V_f: volumen final; V_m: volumen de la muestra; ε: coeficiente de extinción 22.000 M^{-1} cm^{-1}.

IV.5: Determinación de glutatión reducido

Los niveles de GSH se determinaron según el método de Rossi et al (1995). A una alícuota de plasma se le agregó EDTA hasta concentración final de 5 mM. Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA, concentración final de 5%), se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 min. En el sobrenadante se midieron los niveles de GSH usando el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB), a la muestra se adicionó EDTA y DTNB disueltos en BFS 80 mM pH 8 en concentración final de 1,24 mM y 0,56 mM, respectivamente, y en un volumen final de 1,8 ml. Luego de 15 min se midió la absorbancia a 410 nm. El contenido de GSH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{moles/ml} = \frac{(A_m^{410} - A_b^{410}) \times V_f \times 10^{-3} \times \text{dil}}{V_m \times \varepsilon}$$

A_m^{410}: absorbancia de la muestra a 410 nm; A_b^{410}: absorbancia del blanco de reactivos a 410 nm; V_f: volumen final; V_m: volumen de la muestra; ε: coeficiente de extinción (obtenido por una curva de calibración)= 1.971.64 x 10^{-6} μM^{-1} cm^{-1}; dil: dilución de la muestra.

IV.6: Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante total se determinó a partir del método de Erel (2004). El blanco de reacción se obtuvo mezclando 200 µl del reactivo 1 (buffer acetato 0,4 mol/l pH 5,8) y 5 µl de muestra para leer la absorbancia a 660nm. Luego, a la mezcla anterior, se le añadió 20 µl de reactivo 2 (2,2´-azinobis -3-etilbenzotiazolina- 6-sulfonato- en buffer acetato 30 mM pH 3,6) y se incubó 5 min. antes de determinar nuevamente la absorbancia a 660nm. Para cuantificar la capacidad antioxidante total se realizó una curva de calibración utilizando Trolox como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como µmoles de Trolox/l.

IV.7: Actividad de Catalasa

La actividad de Catalasa se determinó según el método cinético de Chance & Maehly (1965). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 3 ml y se la realizó de forma tal como para obtener una lectura inicial de absorbancia a 240 nm de 0,500 aproximadamente. A 2,9 ml de BFS 0,05M pH 7,4 conteniendo H_2O_2 30% se le agregaron 0.1 ml de solución enzimática H6. La actividad de la Catalasa se determinó midiendo el tiempo requerido para conseguir una disminución en la absorbancia del H_2O_2 desde 0,450 a 0,400. Se definió una UE (unidad enzimática) como la cantidad de enzima que cataliza el consumo de 1 nmol de H_2O_2 en condiciones estándar de incubación y la AE (actividad específica) se expresó como UE/mg de proteína, a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles de } H_2O_2 \text{ consumidos/min.ml} = \frac{\text{Pend x 60 x } V_f \text{ x } 10^4 \text{ x dil}}{V_{enz} \text{ x } \varepsilon}$$

Pend: valor de la pendiente obtenida con la caída de la absorbancia a 240nm; V_f: volumen final; V_{enz}: volumen de solución enzimática incubada; ε: coeficiente de extinción = 39,44 mM^{-1} cm^{-1}; 60: factor de conversión de segundos a min.

IV.8: Determinación de homocisteína

La determinación de los niveles plasmáticos de homocisteína se realizó según el método de Krijt et al (2001). A 100 µl de plasma se agregaron 75 µl de agua, 25 µl de estándar interno (N-(2-mercaptopropionil)-glicina, 16 mg/l) y 25 µl de tris (2-carboxietil) phosfina (TCEP: 120 g/L en PBS, pH 7,4). La mezcla se incubó 30 min. a temperatura ambiente. Luego se agregó 100 µl de una solución 10% de ácido tricloroacético/1mM de EDTA. Se centrifugó 3 min. a 15.000 g. A 25 µl de sobrenadante se le adicionó 100 µl de mezcla de derivatización conteniendo 70 µl de buffer borato 0.125M-EDTA 4mM (pH 9,5) y 30 µl de 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato de amonio (SBD-F: 1g/l en buffer borato EDTA). La muestra se incubó 30 min. a 60 °C en oscuridad. Luego de la derivatización, las muestras se mantuvieron en frío y protegidas de la luz. Se analizaron por HPLC en fase reversa con las siguientes condiciones cromatográficas: columna Merck Lichospher 100-RP-18 de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm. El volumen de inyección fue 25 µl. La elución se realizó con un gradiente lineal desde 80% de solvente A (buffer fosfato 50mM, pH ajustado a 2,0 con H_3PO_4 a 70% de solvente B (buffer fosfato 50mM, pH 2,0 conteniendo 300 ml/l acetonitrilo) durante 5 min. a flujo 0,7 ml/min. Se mantuvo 2 min. a 70% de B y luego se reconstituyeron las condiciones iniciales con un gradiente lineal por 5 min. El análisis se realizó a temperatura ambiente y se monitoreó por fluorescencia: longitud de onda de excitación 385 nm y de emisión 515 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración utilizando homocisteína estándar. Los resultados se expresan como mmol/l.

IV.9: Análisis de los resultados

Las experiencias se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como el promedio ± el desvío estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía para determinar la diferencia de los grupos

involucrados. Se consideró que la diferencia entre el grupo de pacientes y el grupo control fue significativa cuando $p < 0,05$.

IV.10: Referencias

Chance, B., & Moehly, A. Assay of catalases and peroxidasesperoxidaseas (1965). Methods Enzymol Vol. II. 2::, pp 764-768. ed. Colowick SP and Kaplan NO. New York: ademic Press.

Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status (2005). Clinical Biochem.istry 38(12):1103-1111.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation (2004). Clinical Biochemistry. 37(4):277-285.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by highperformance liquid chromatography–visible detection (2007). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43(2):619-624.

Krijt J, Vackova M, Kožich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine (2001). Clin Chem. 47(10):1821-1828.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay (1994). Methods Enzymol. 233:357-363.

Rossi R, Cardaioli E, Scaloni A, Amiconi G, Di Simplicio P. Thiol groups in protein as endogenous reductants to determine glutathione protein mixed disulphides in biological systems (1995). Biochim. Biophys. Acta. 1243(2):230-238.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Capítulo I: Análisis genético de pacientes PV

I.1: Detección de mutaciones en pacientes PV Argentinos

Hasta el momento, en el CIPYP, se diagnosticaron a nivel molecular 36 familias como PV, llegando a un total de 139 individuos.

El 33% de los individuos hasta ahora estudiados resultaron normales para la alteración familiar, el 64,85% portan la mutación correspondiente y el restante 2,15% aún comprende el porcentaje de individuos analizados a los que no se les ha podido encontrar la alteración genética responsable (Tabla A.1, Apéndice). Dentro de los individuos portadores de una mutación responsable de PV, el 41,1% son asintomáticos y el 58,9% son sintomáticos (26,6% y 38% considerando el total de individuos analizados, respectivamente). En la Figura I.1 podemos observar los diversos tipos de mutaciones halladas en nuestra población. Respecto de su representación, la mayor parte de las alteraciones encontradas son privativas de una o a lo sumo dos familias. También podemos apreciar la alta prevalencia de la mutación c.1.042_1.043insT (39% de las familias), la cual será abordada en el Capítulo III (Resultados y Discusión).

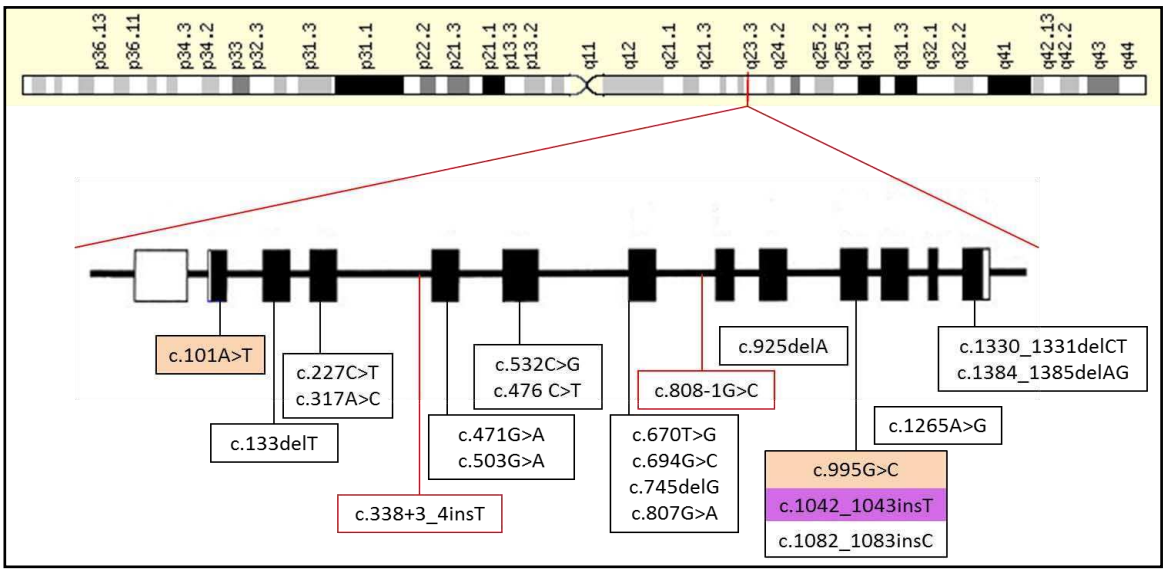


Figura I. 1: Distribución de mutaciones en pacientes Argentinos PV. Se muestra la ubicación en el cromosoma 1 del gen de la PPOX, con sus intrones y exones (regiones codificantes en negro y no codificantes en blanco) y la ubicación de cada mutación hallada. Los recuadros negros muestran mutaciones exónicas, los rojos mutaciones intrónicas. El fondo blanco indica mutaciones privativas de una familia, fondo rosa presente en dos familias y fondo violeta en 14 familias.

Por otra parte, en nuestra población podemos distinguir 4 tipos de mutaciones: deleciones, inserciones, mutaciones missense y mutaciones de splicing. En la Figura I.2 se muestra la distribución de cada una de estas en los 139 individuos PV estudiados, encontrándose un porcentaje elevado de mutaciones de tipo inserción de 1 o 2 bases (39%), seguida por alteraciones missense (35,5%). Del total de las inserciones, la mayoría corresponden a la mutación altamente prevalente c.1.042_1.043insT (88,7%), reportada únicamente en Argentina por el CIPYP (De Siervi et al, 2000).

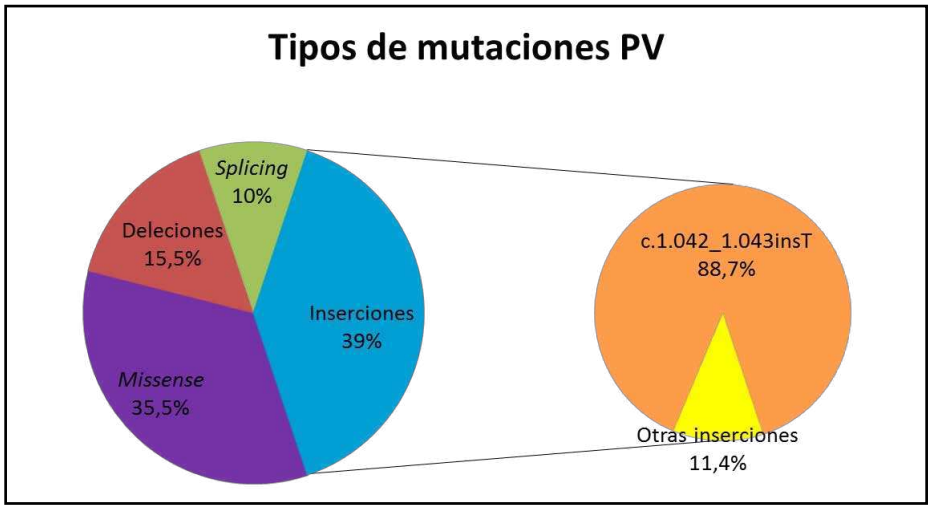


Figura I.2: Porcentajes de los 4 tipos de mutaciones halladas en los individuos PV de la población Argentina. En el subgráfico, se muestran los porcentajes de las categorías de inserciones, tomando al 40% anterior como el total.

I.2: Detección de nuevas mutaciones en pacientes PV Argentinos

De los 139 individuos estudiados a nivel molecular, 61 fueron diagnosticados genéticamente en el marco del trabajo de esta Tesis.

Este total de individuos incluye 10 familias nuevas, entre las cuales 5 portan mutaciones descriptas con anterioridad en Argentina (c.995G>C y c.1.042_1.043insT). Las 5 familias restantes portan mutaciones nuevas en nuestra población. La mutación c.1.330_1.331delCT fue descripta previamente en Suecia (Wiman et al, 2003), al igual que la alteración c.1.384_1.385delAG que ha sido reportada en la población francesa (Whatley et al, 1999). Por otra parte, las mutaciones c.227C>T, c.1.265A>G y c.476C>T fueron descriptas únicamente en

nuestra población, por nuestro laboratorio (Méndez et al, 2012) y se trata de mutaciones missense (Tabla I.1).

FAMILIA	INDIVIDUO	MUTACIÓN	DEFECTO	SINTOMATOLOGÍA	REFERENCIA
I	propósito	c.227C>T	p.S76F	aguda	Méndez et al, 2012
II	propósito	c.1.265A>G	p.Y422C	no	
	hermana	normal	-	no	
	hermana	normal	-	no	
	hermana	c.1.265A>G	p.Y422C	no	
III	propósito	c.1.330_1.331delCT	p.L444fsX451	mixta	Wiman et al, 2003
	hijo	normal	-	no	
	hijo	c.1.330_1.331delCT	p.L444fsX451	no	
IV	propósito	c.476 C>T	p.A159V	cutánea	Este trabajo
	madre	c.476 C>T	p.A159V	no	
	padre	normal	-	no	
V	propósito	c.1.384_1.385delAG	p.S462fsX475	cutánea	Whatley et al, 1999
VI	propósito	c.995G>C	p.G332A	no	Rossetti et al, 2008
	hijo	c.995G>C	p.G332A	no	
VII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fs349X	mixta	De Siervi et al, 2000
	hijo	c.1.042_1.043insT	p.Y348fs349X	no	
	hijo	normal	-	no	
VIII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea	De Siervi et al, 2000
IX	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fs349X	mixta	De Siervi et al, 2000
X	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	aguda	De Siervi et al, 2000
	hermano	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	aguda	
	hijo	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no	
	hija	normal	-	no	
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea	

Tabla I.1: Diagnóstico genético realizado en las 10 familias nuevas estudiadas en esta Tesis. Se muestra la mutación encontrada, el defecto provocado por ésta, la sintomatología del paciente (no: no presenta síntomas) y la cita bibliográfica correspondiente.

I.3: Relación genotipo-fenotipo

La Porfiria Variegata, como vimos en la introducción, puede presentarse con sintomatología mixta o bien con síntomas agudos ó cutáneos en forma

aislada, dependiendo del individuo. En las Tablas I.1 y A.1 (Anexo) y en la Figura I.3, se observan los distintos síntomas que presentaron los pacientes PV.

En la Figura I.3 A se muestra la sintomatología de los pacientes portadores de la mutación c.1.042_1.043insT comparado con otras mutaciones. De acuerdo a este gráfico, la mayoría de los pacientes no presenta ningún tipo de síntoma, ya sean portadores de la alteración más recurrente en la población (36,6%) como portadores de otras variantes genéticas (53%), o sea que se trataría de individuos PV latentes. En cuanto a los individuos que sí presentan sintomatología, la mayoría padecen afecciones de tipo cutáneas, sin haber diferencias apreciables entre los que portan la mutación más frecuente (30%) y el resto de las mutaciones (26,5%).

En la Figura I.3 B y C se muestra la distribución de individuos que presentan síntomas divididos según el tipo de mutación que portan: missense, deleciones, inserciones y de splicing. En la parte B se consideraron todos los tipos de inserciones y en la C se separó la c.1.042_1.043insT de otras inserciones.

Respecto de las mutaciones missense, que afectan directamente la actividad enzimática de la PPOX, vemos que tienen una distribución similar entre los 3 tipos de síntomas: 19,23% agudo; 21,3% cutáneo; 15,4% mixto (Fig. I.3 B y C).

Las deleciones de 1 o 2 bases no se asocian nunca a síntomas agudos (0%); en un 20% de los casos presentan signos mixtos y en la mayoría de los individuos se relacionan con sintomatología cutánea (50%).

Las variantes genéticas que afectan al proceso de splicing del ARNm de la PPOX se relacionan predominantemente con síntomas mixtos (44,4%), mientras que un 22,2% se asocian a signos cutáneos.

En cuanto a las inserciones, las analizamos en conjunto (Fig. I.3 B) y separando la mutación c.1.042_1.043insT de otras inserciones (Fig. I.3C). El grupo que incluye todas las inserciones se asocian, con un porcentaje levemente mayor que en los otros casos, a las afecciones cutáneas (26,5%), mientras que las agudas y mixtas presentan la misma proporción (17,7% respectivamente). Al

desglosar las inserciones, vemos que el perfil de distribución de la mutación c.1.42_1.043insT es similar al visto en la Figura I.3B (30% cutáneo; 13,3% agudo; 20% mixto) mientras que el resto de este tipo de variantes genéticas se asocian exclusivamente a sintomatología aguda (50%).

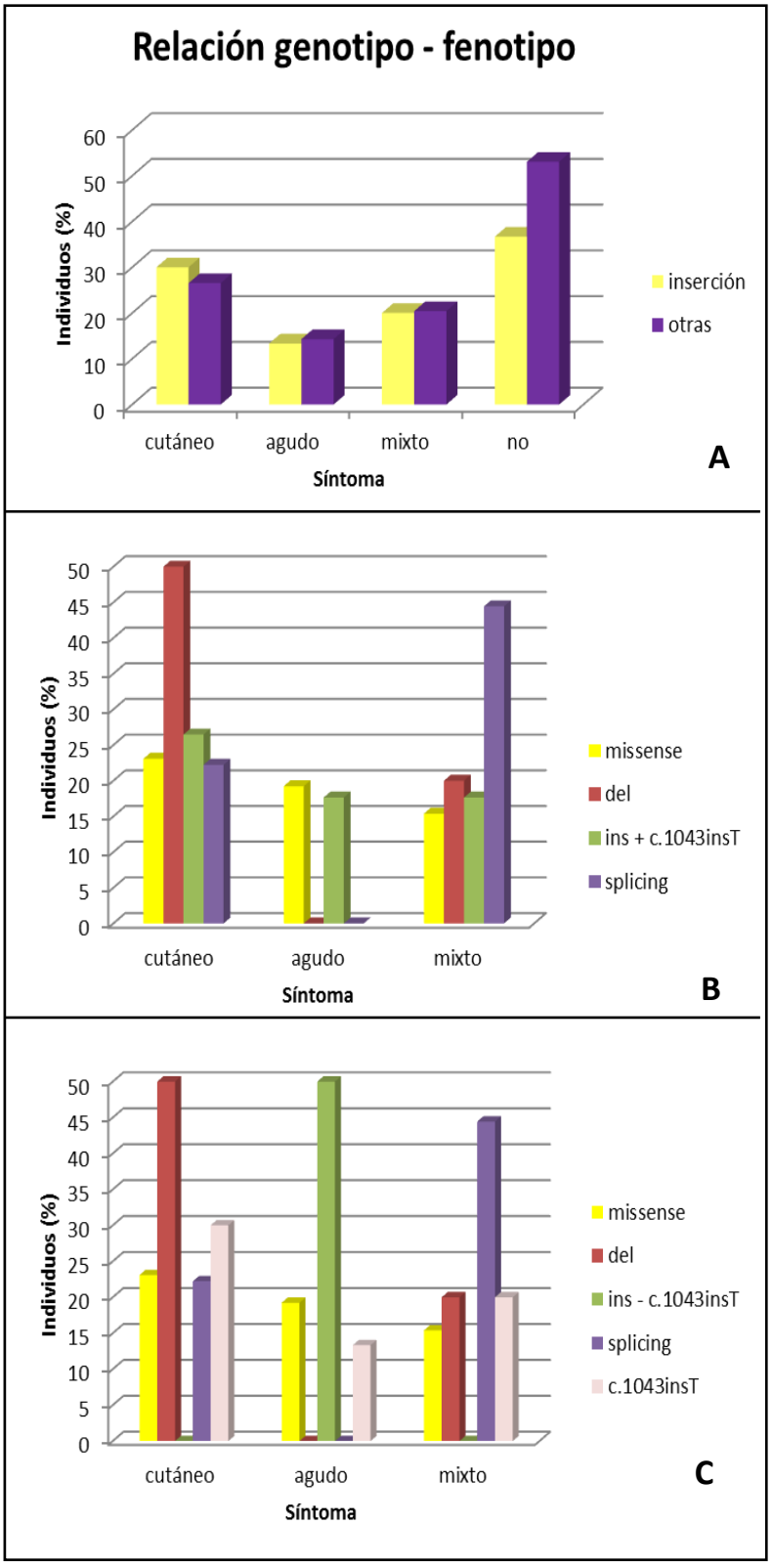


Figura I.3: Relación genotipo-fenotipo, comparando tipos de mutaciones en función de la sintomatología. A) Comparación entre individuos portadores de la mutación c.1.042_1.043insT (inserción, barras amarillas) e individuos portadores de otras mutaciones (otras, barras violetas). B) Comparación utilizando las siguientes categorias de mutaciones: missense, deleciones (del), inserciones (ins + c.1043insT) y splicing. C) Ídem B, excepto para la categoría inserciones, que fueron separadas en la inserción más común (c.1043insT) y otras inserciones (ins – c.1043insT)

I.4: Discusión

Hasta la fecha, en el CIPYP, diagnosticamos a nivel molecular 36 familias Argentinas como PV. Entre los individuos que presentan alguna mutación podemos distinguir a los portadores asintomáticos o latentes (41,1%) de los portadores sintomáticos (58,9%).

De la cantidad de portadores sanos detectados a partir del análisis genético surge la importancia de realizar dichos estudios en familiares asintomáticos de propósitos ya diagnosticados. De esta forma, es posible aconsejar a estas personas acerca de drogas porfirinogénicas y otras conductas (ayuno, dietas, tratamientos hormonales, etc) que pueden llevar al desencadenamiento de la porfiria, para así poder evitarlas incluso antes de la manifestación de cualquier síntoma.

Además, aproximadamente en un 2% de los individuos diagnosticados bioquímicamente como PV y estudiados genéticamente no ha sido posible hallar la presencia o no de una mutación en el gen de la PPOX. En algunos de ellos, esto se debe a que no nos fue posible, aún, secuenciar correctamente ciertas regiones del gen de "difícil secuenciación" como las regiones con un alto contenido de di-nucleótidos CG que complican la tarea de secuenciación directa. En otros pacientes si bien logramos secuenciar con éxito el gen completo nos fue imposible detectar la alteración genética. Este último caso correspondería a un escenario donde, pese a emplear un método de detección de mutaciones tan confiable como la PCR seguida de secuenciación automática, estos individuos formarían parte del <1% de los casos no detectables mediante esta técnica (Grompe, 1993) debido a artefactos de la misma (Bevan et al, 1992).

Cómo vimos en la Fig. I.1, la mayor proporción de las mutaciones detectadas en el gen de la PPOX son privativas de 1 o a lo sumo 2 familias, hecho que pone de manifiesto el alto grado de heterogeneidad molecular que caracteriza a las porfirias. Como excepción a esto, encontramos a la mutación c.1.042_1.043insT en una elevada prevalencia en nuestra población (39% de nuestras familias PV).

De esta Figura podemos concluir también que la mayoría de las mutaciones están presentes en exones del gen de la PPOX, a excepción de las alteraciones c.338+3insT y c.808-1G>C. Estas dos alteraciones intrónicas, junto con la c.807G>A, que afecta a la última base del exón 7 son mutaciones de splicing.

Al agrupar las mutaciones halladas en 4 categorías (Fig. I.2) podemos observar que, como es de esperarse, las mutaciones por inserción incluida la c.1.042_1.043insT son las de mayor representación en nuestra población (39%). Sin embargo, al desglosar los distintos tipos de inserciones podemos ver que sólo un 11,4% de éstas se corresponden a inserciones diferentes a la altamente prevalente c.1.042_1.043insT. Todas las inserciones alteran la normal expresión del gen en estudio al generar un codón finalización prematuro río abajo.

A continuación, las mutaciones missense, que provocan defectos a nivel proteico, afectan al 35,5% de los pacientes. Cómo se estudiará más adelante, estás mutaciones tienen efectos sobre la actividad enzimática en linfocitos de los pacientes así como también en un sistema procariótico de expresión de la proteína mutante.

En términos de prevalencia, a continuación se ubican las mutaciones por deleción de 1 o 2 nucleótidos, con un 15,5%; las cuales, al igual que las mutaciones por inserción, generan un codón finalización prematuro que altera el correcto funcionamiento de la enzima. En cuanto al último grupo de mutaciones, las de splicing, éstas están representadas en un 10% de los pacientes y, como veremos más adelante, afectan el correcto procesamiento del ARNm de la PPOX al delecionar el exón afectado por la presencia de la alteración.

En el marco de este trabajo se diagnosticaron a nivel genético 61 individuos, 17 nuevos y 44 familiares de pacientes con diagnóstico previo. Los 17 nuevos pacientes conforman 10 familias PV Argentinas, de las cuales 5 portan mutaciones ya descriptas y 5 mutaciones nuevas en el país. De estas 5 mutaciones nuevas, como vimos en la Tabla I.1, 2 de ellas son mutaciones por deleción de 2 nucleótidos (c.1.330_1.331delCT y c.1.384_1.385delAG) ya reportadas en Europa (Wiman et al, 2003; Whatley et al, 1999) pero no en

nuestro país. Las 3 restantes, corresponden a mutaciones de tipo missense las cuales fueron descriptas por nuestro instituto por primera vez y fueron expresadas en el desarrollo de esta tesis (Méndez et al, 2012).

Como mencionamos previamente, la importancia de hallar estas alteraciones nuevas radica en la posibilidad de alertar a familiares de los pacientes con anticipación a la aparición de síntomas con el fin de evitar en ellos el desencadenamiento de la enfermedad. Además, hallar nuevas mutaciones a nivel mundial pone de manifiesto, nuevamente, la heterogeneidad molecular que representa a este tipo de enfermedades.

De acuerdo a los resultados expresados en la Fig. I.3, la mayoría de los pacientes son portadores asintomáticos, lo cual demuestra, nuevamente, la importancia de la detección temprana de mutaciones dentro de una familia. No obstante, no fue posible extraer de estos gráficos de barras una posible relación entre un tipo de mutación, ya sea ésta missense, de splicing, por deleción o inserción (Fig. I.) o incluso la inserción más prevalente en nuestra población (Fig. I.3 C) y la sintomatología de los pacientes. Si bien observamos algunas tendencias, como por ejemplo, que las inserciones sin incluir c.1.042_1.043insT se relacionan exclusivamente con síntomas agudos o que las deleciones se relacionan en mayor porcentaje con manifestaciones cutáneas, no podemos aseverar que se trate de una relación genotipo-fenotipo dado que, en el primer caso, el número de individuos es muy pequeño para tener significancia estadística y en el segundo, también encontramos un 20% de pacientes que exhiben signos mixtos.

A pesar de que una correlación genotipo-fenotipo pudo ser establecida en la población finlandesa (von und zu Fraunberg et al, 2002), no nos es posible establecerla en nuestro caso. Esta ausencia de relación genotipo-fenotipo, fue previamente reportada por el CIPYP (Rossetti et al, 2008), así como también en otras poblaciones (Whatley et al, 1999; Schneider-Yin & Minder, 2006; Di Pierro et al, 2009). En líneas generales podemos decir que, aparentemente, un dado genotipo no es el único determinante de la presentación clínica de la porfiria

(Schneider-Yin & Minder, 2006), hecho consistente con la naturaleza multifactorial de esta patología.

I.5: Referencias

Bevan IS, Rapley R, Walker MR. Sequencing of PCR-amplified DNA (1992). PCR Meth Appl. 1(4):222-228.

De Siervi A, Parera VE, Varela LS, Batlle A, Rossetti MV. A novel mutation (1320InsT) identified in two Argentine families with Variegate Porphyria (2000). Hum Mut. 16:96-98.

Di Pierro E, Ventura P, Brancaleoni V, Moriondo V, Marchini S, Tavazzi D, Nascimbeni F, Ferrari MC, Rocchi E, Cappellini MD. Clinical, biochemical and genetic characteristics of Variegate Porphyria in Italy (2009). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 55(2):79-88.

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids (1993). Nat Genet. 5(2):111-117.

Méndez M*, Granata BX*, Moran Jiménez MJ, Parera VE, Batlle A, Enriquez de Salamanca R, Rossetti MV. Fuctional chractererization of five protoporphyrinogen oxidase missense mutations found in Argentinean Variegate patients (2012). JIMD Rep. 4:91-97. DOI: 10.1007/8904_2011_77. MM* y BXG* contribuyeron igualmente a la realización del trabajo.

Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, Parera VE, Batlle A. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2008). BMC Med Genet. 9:54. DOI: 10.1186/1471-2350-9-54.

Schneider-Yin X, Minder EI. Swiss patients with Variegate Porphyria have unique mutations (2006). Swiss Med Wkly. 136(31-32):515-519.

von und zu Fraunberg M, Timonen K, Mustajoki P, Kauppinen R. Clinical and biochemical characteristics and genotype-phenotype correlation in Finnish Variegate Porphyria patients (2002). Eur J Hum Genet. 10(10):649-657.

Whatley SD, Puy H, Morgan RR, Robreau AM, Roberts AG, Nordmann Y, Elder GH, Deybach JC. Variegate porphyria in Western Europe: identification of PPOX gene mutations in 104 families, extent of allelic heterogeneity, and absence of correlation between phenotype and type of mutation (1999). Am J Hum Genet. 65(4):984-994.

Wiman A, Harper P, Floderus Y. Nine novel mutations in the protoporphyrinogen oxidase gene in Swedish families with Variegate Porphyria (2003). Clin Genet. 64(2):122-130.

Capítulo II: Caracterización de mutaciones nuevas en el gen de la PPOX

II.1.1: Análisis bioinformático de mutaciones missense

En el marco de este trabajo, se describieron 3 mutaciones puntuales no halladas previamente en la población Argentina, las cuales generan un cambio de aminoácido a nivel proteico: c.227C>T, p.S76F; c.1265A>G, p.Y422C (Méndez et al, 2012) y c.476C>T, p.A159V. Al tratarse de mutaciones missense, es necesario realizar un estudio funcional para determinar su efecto sobre la proteína.

Por otra parte, otras 3 alteraciones de tipo missense previamente reportadas en nuestro laboratorio (Rossetti et al, 2008), también requieren de estudios funcionales para su caracterización. Éstas son: c.101A>T, p.E34V; c.670T>G, p.w2224G; c.995G>C, p.G332A.

Como paso previo a la caracterización funcional, realizamos el análisis de las mutaciones mediante herramientas bioinformáticas.

En la Tabla II.1 se muestran los resultados obtenidos con los programas SIFT, PROVEAN y PolyPhen-2. Como se puede apreciar, las tres herramientas empleadas predicen para todas las mutaciones analizadas un efecto deletéreo sobre la función de la proteína, excepto en el caso c.995G>C, p.G332A, que resulta tolerable para SIFT mientras que sería deletérea para las otras dos herramientas.

	HERRAMIENTA					
	SIFT		PROVEAN		PolyPhen-2	
MUTACIÓN	PREDICCIÓN	*SCORE*	PREDICCIÓN	*SCORE*	PREDICCIÓN	*SCORE*
p.E34V	Función afectada	0.00	Deletéreo	-6.707	Probablemente dañina	1.00
p.S76F	Función afectada	0.02	Deletéreo	-3.546	Probablemente dañina	0.99
p.A159V	Función afectada	0.03	Deletéreo	-3.566	Probablemente dañina	1.00
p.W224G	Función afectada	0.00	Deletéreo	-12.477	Probablemente dañina	1.00
p.G332A	Tolerable	0.15	Deletéreo	-5.823	Probablemente dañina	0.99
p.Y422C	Función afectada	0.00	Deletéreo	-8.776	Probablemente dañina	1.00

Tabla II.1: Predicciones bionformáticas para cada una de las mutaciones missense en estudio. Para cada herramienta se muestra la predicción realizada para cada sustitución y el score correspondiente.

II.1.2: Expresión de mutaciones missense

A continuación, realizamos el ensayo funcional de caracterización de las 6 mutaciones missense en estudio, mediante la expresión en bacterias de la enzima mutante, purificación de ésta y la determinación de su actividad en un sistema in vitro.

En la Tabla II.2 se muestran los resultados de actividad enzimática de los 6 constructos expresados. Además de la actividad específica y la actividad residual de las proteínas mutantes, a la derecha tenemos una columna extra con la información de la actividad enzimática específica y residual de los pacientes, para poder comparar los resultados del ensayo funcional con el efecto fisiológico en los individuos portadores de las fallas.

Constructo	Actividad específica (nmol PROTO/mg/h)	Actividad residual (%)	Actividad específica pacientes (nmol PROTO/mg/h)	Actividad residual pacientes (%)
pTrcHisB	0.21 ± 0.03	0	—	—
pTrc – PPOX-wt	13.27 ± 1.20	100	—	—
pTrc – PPOX- E34V	0.51 ± 0.02	2.29	18.48	55,58
pTrc – PPOX – S76F	0.66 ± 0.03	3.44	16.67	47,13
pTrc – PPOX – A159V	0.52±0.05	3.92	ND	ND
pTrc – PPOX – W224G	0.76 ± 0.03	4.21	16.95	50.98
pTrc – PPOX – G332A	0.20 ± 0.02	0	15.84	47,64
pTrc – PPOX – Y422C	0.62 ± 0.02	3.14	11.22	33,74

Tabla II.2: Valores de actividad enzimática (± desvío estándar) correspondientes a la expresión de cada mutación estudiada. La actividad específica (AE) fue determinada en cuatro experimentos independientes. La actividad residual se calculó de la siguiente manera: 100 x (AE- AE pTRC) / (AE pTRC- wt - AE pTRC). Las 2 últimas columnas a la derecha corresponden a la actividad enzimática específica y residual obtenida a partir de linfocitos de los pacientes portadores de las mutaciones. Méndez et al, 2012 y resultados no publicados. ND: no determinado.

II.2.1: Análisis bioinformático de mutaciones de splicing

Del total de la mutaciones nuevas halladas, tres de ellas, descriptas en 2008 (Rossetti et al, 2008), no generan alteraciones a nivel proteico dado que dos son intrónicas (c.338+3insT; c.808-1G>C) y la última, a pesar de ser exónica, genera un cambio sinónimo (c.807G>A). Por otra parte, la mutación c.808-1G>C

afecta directamente al dinucleótido 100% conservado AG presente en el sitio aceptor de splicing y la mutación c.338+3insT podría afectar al sitio donor de splicing correspondiente. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se analizó el posible efecto de estas tres alteraciones sobre el proceso de splicing del gen de la PPOX.

Previo al ensayo funcional, realizamos algunas predicciones empleando herramientas bioinformáticas. En la Tabla II.3 se muestran los score asignados para cada secuencia en ausencia y presencia de la mutación, para el caso del programa NN Splice y si afecta o no a algún elemento ESE, en el caso de los programas ESE Finder y Rescue ESE. Nótese que estos dos últimos sólo se empleados para el estudio de la mutación c.807G>A, dado que es la única exónica, lugar donde se ubican estos elementos ESE.

	HERRAMIENTA		
Mutación	NN Splice	ESE Finder	Rescue ESE
c.338+3insT	5'SS de 0.96 a 0.25	—	—
c.807 G>A	5'SS de 0.85 a 0	No afecta	No afecta
c.808-1 G>C	3'SS de 0.93 a 0	—	—

Tabla II.3: Análisis bioinformático de las mutaciones de splicing en estudio. Se muestran los score para la secuencia WT y a continuación para la secuencia mutada. No afecta implica que ningún elemento ESE es afectado por la presencia de la mutación. 5' ss: sitio donor de splicing; 3' ss: sitio aceptor de splicing.

Como se observa en la Tabla II.3, los sitios donor, en el caso c.338+3insT y c.807G>A, y aceptor de splicing, en el caso c. 808-1G>C, pierden su fuerza, afectando así al proceso de splicing. Además, para la mutación c.807G>A no hay efecto sobre los elementos ESE presentes, por tanto, si existe algún efecto sobre el correcto procesamiento del ARNm de la PPOX, no sería a través de la alteración de uno de estos elementos exónicos.

II.2.2: Expresión de mutaciones de splicing

El ensayo de caracterización de las 3 mutaciones de splicing halladas se comenzó transfectando células HeLa con los constructos pTB. El resultado de

dicho ensayo se muestra en la Figura II.1. Observando los perfiles correspondientes a los constructos mutantes para los 3 casos en estudio, es claro que el efecto de cada mutación es excluir al exón del ARNm (exon skipping). Por otra parte, las construcciones WT correspondientes a las mutaciones c.807G>A y c.808-1G>C muestran una fuerte inclusión del exón afectado.

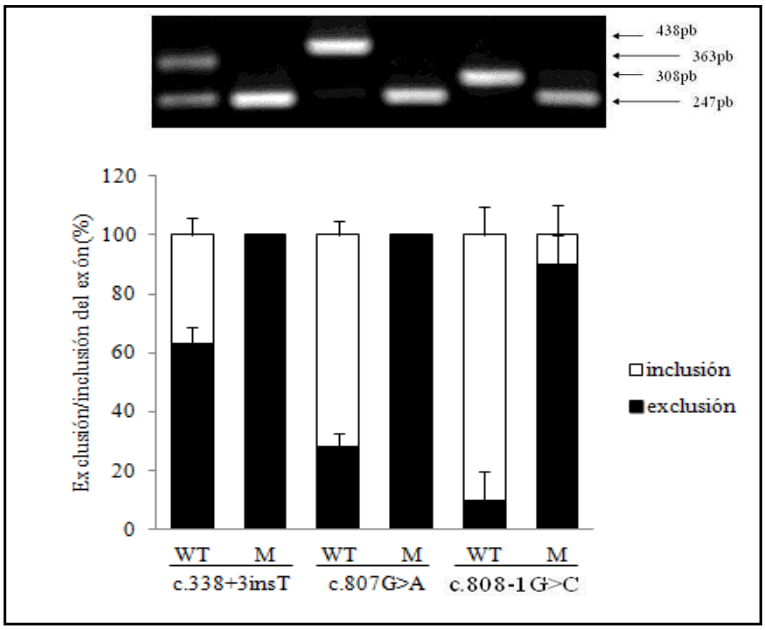


Figura II.1: Transfección con los constructos pTB. WT= constructo wild type, M= constructo mutante, 247 pb= exclusión exón correspondiente, 308 pb= inclusión exón 8, 363 pb= inclusión exón 4, 438 pb= inclusión exón 7.

En el caso de la mutación c.338+3insT, la construcción WT sólo alcanza un 37±5,8% de inclusión del exón 4. No obstante esto, el efecto de la mutación en el procesamiento de dicho exón es evidente dado que, como ya se mencionó, se obtiene un 100±0% de skipping. Con el objeto de investigar si el efecto de esta mutación sigue siendo igual de severo en un contexto homólogo más amplio, dónde quizás la secuencia WT alcance valores de inclusión más semejantes a los esperados, diseñamos un minigen (pcDNA E4) que cuenta con una mejor definición de exón. En la Fig. II.2 se muestran los resultados de dicho ensayo.

En este escenario, nuevamente, obtuvimos una fuerte exclusión del exón 4 (98,5±1,5%) en presencia de la mutación. Sin embargo, a pesar de haber ampliado el contexto homólogo, la situación del constructo WT sigue siendo similar a la anterior ya que obtuvimos una inclusión del exón del 43,5±6,5%. Además se visualizaron otras bandas no esperadas en el gel de agarosa. Al

secuenciarlas hallamos que la más pesada corresponde al fragmento clonado completo (exón 3, 4 y 5 y los intrones correspondientes) y la más liviana a los 3 exones más el intrón 3. A pesar de que dichas bandas se secuenciaron, aún desconocemos su origen; sólo podemos especular que se trataría de contaminación con ADN durante la extracción de ARN en el caso de banda pesada y en el caso de la banda liviana que la secuencia WT necesitaría un contexto homólogo aún mayor que éste para que el splicing proceda correctamente.

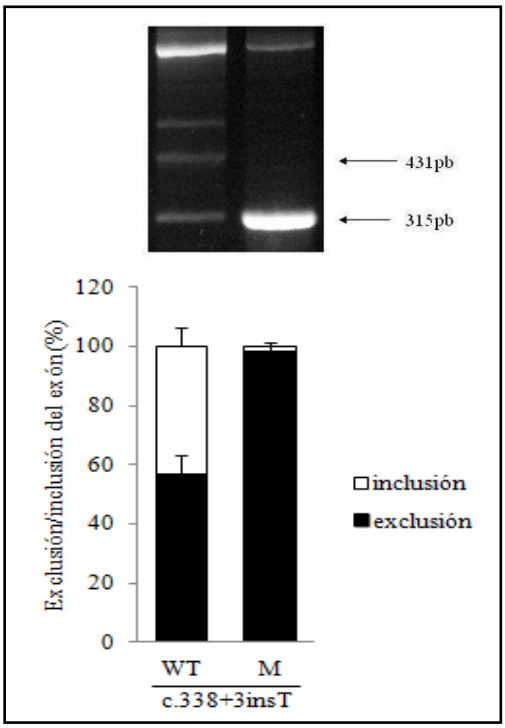


Figura II.2: Transfección con constructo pcDNA E4. WT= wild type, M= mutado. 431bp= inclusión exón 4, 315 bp= exclusión exón 4.

Por último, nos propusimos investigar si el efecto de la mutación c.807G>A es sobre el sitio de unión al factor U1 snRNA, la primer pequeña ribonucleotproteína nuclear en unirse al sitio donor de splicing, disparando así la formación del spliceosoma. Para poner a prueba esta hipótesis co-transfectamos las células con el constructo pTB E7 mutante, junto a un vector conteniendo ya sea la secuencia canónica de U1 (WT) o una secuencia perfectamente complementaria al sitio 5' de splicing del exón 7 en presencia de la mutación en

estudio. En la Fig. II.3 podemos observar que la co-transfección del constructo pTB E7 mutante y U1 complementario resulta en un rescate parcial del splicing del exón, dado que la inclusión alcanzada en este ensayo fue del 22±2%. Este no fue el caso al emplear U1 WT y pTB E7 mutado, donde la inclusión del exón fue de 3±2%.

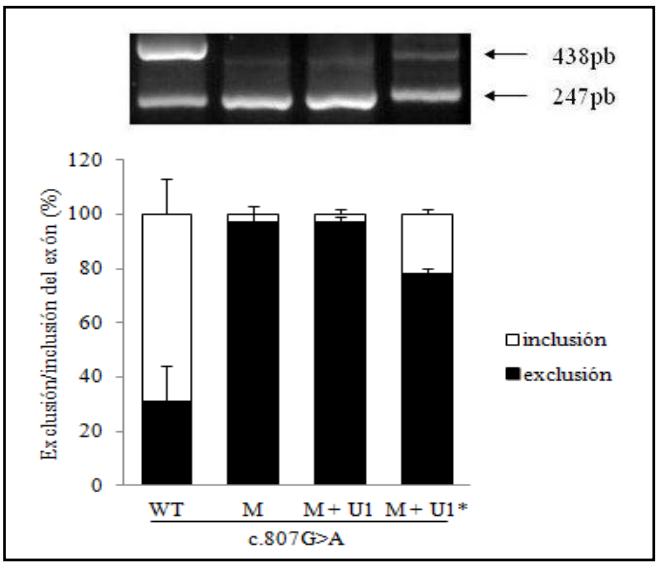


Figura II.3: Co-transfección U1 snRNA + pTB E7 (c.807 G>A). WT= pTB E7 wild type, M= pTB E7 mutante, M+U1= pTB E7 mutante y U1 snRNA, M+U1*= pTB E7 mutante y U1 snRNA complementario a la mutación, 247 pb= exclusión exón 7, 438 pb= inclusión exón 7.

II.3: Discusión

De las 6 mutaciones missense que afectan a la proteína PPOX, 3 fueron descriptas con anterioridad, p.E34V, p.W224G, p.G332A (Rossetti et al, 2008); y las últimas 3 fueron descriptas durante la realización de este trabajo, p.S76F, p.A159V, p.Y422C (Méndez et al, 2012; Granata 2013 no publicado). Todas ellas se estudiaron a nivel bioinformático y a nivel funcional, resultados que demuestran el efecto deletéreo en la estructura y/o la función de la enzima (Méndez et al, 2012). Además, contamos con los valores de actividad enzimática de los pacientes portadores de cada una de las alteraciones aquí estudiadas, encontrándose que en todos los casos, los resultados de actividad enzimática del sistema procariótico son comparables con los valores presentados por los

pacientes, teniendo en cuenta que en el caso de estos siempre está presente el alelo normal que aporta enzima funcional.

La mutación p.E34V, como vimos, lleva a un importante descenso de la actividad enzimática, tanto en el sistema de expresión procariota como en los linfocitos de pacientes portadores de dicha alteración (TablaII.2). El análisis bioinformático, por su parte, revela un efecto deletéreo sobre la función de la enzima (Tabla II.1). Además sabemos que el aminoácido E34 se encuentra altamente conservado a través de la evolución y que forma parte del dominio de unión al cofactor FAD (Qin et al, 2011). De hecho este glutamato interactúa directamente con el FAD, por lo que su reemplazo por un aminoácido hidrofóbico como la valina reduce esta interacción y afecta de forma severa la unión al cofactor (Méndez et al, 2012).

En cuanto a la mutación p.S76F, la predicción bioinformática nos alerta sobre un efecto deletéreo (Tabla II.1), dato que fue corroborado con el ensayo funcional de expresión en bacterias de la enzima mutante (Tabla II.2). Este aminoácido no es tan conservado como el E34, pero sí está presente en algunas especies de mamíferos como Macaca fascicularis (mono), Bos Taurus (bovino), Mus musculus (ratón) y Rattus novergicus (rata) (Méndez et al, 2012), y al igual que el residuo E34, S76 se encuentra en el dominio de unión a FAD (Qin et al, 2011). Este residuo está dentro de una de las α-hélices del dominio, donde probablemente afecte la estructura secundaria y la estabilidad de la proteína (Méndez et al, 2012).

Continuando con la mutación p.A159V, las predicciones alertan sobre un efecto deletéreo confirmado por los resultados experimentales. Este aminoácido presenta el mismo nivel de conservación que el último analizado y se ubica dentro del dominio de unión a membrana (Qin et al, 2011). Aunque el reemplazo de una alanina por una valina no es tan drástico, pudimos observar un importante descenso de la actividad enzimática en presencia de esta mutación.

El residuo W224 no es altamente conservado en la evolución y se ubica, también, en el dominio de unión a FAD (Qin et al, 2011). Se localiza, más precisamente, en el núcleo hidrofóbico del dominio, núcleo esencial para el

correcto plegamiento y estabilidad de la enzima. Su reemplazo por una glicina confiere una cadena lateral hidrofílica que probablemente desestabilice al núcleo afectando la estabilidad conformacional del dominio (Méndez et al, 2012), por ende de la proteína, generando así un importante descenso de la actividad catalítica. Esta información fue corroborada, primero, por herramientas bioinformáticas que predicen un efecto perjudicial (Tabla II.1) y luego mediante los valores disminuidos de actividad enzimática obtenidos en el sistema de expresión y en los linfocitos de pacientes (Tabla II.2), los cuales se condicen con la mínima actividad catalítica de la proteína mutante hallada por Qin et al (2011). Es probable también que este residuo se ubique en el péptido de señalización mitocondrial (Morgan et al, 2004; Davids et al, 2006), con lo cual una alteración en esta posición podría afectar el correcto transporte hacia mitocondrias. Otra mutación missense en esta misma posición (p.W224R) fue descripta previamente como responsable de PV (Lecha et al, 2006), hecho que nos lleva a concluir que dicho aminoácido es esencial para el correcto funcionamiento de la PPOX.

El aminoácido G332 sí es un residuo altamente conservado a través de la evolución (Méndez et al, 2012). Se encuentra ubicado en el dominio de unión a sustrato e interactúa directamente con éste y su reemplazo por alanina cambia la conformación de la cadena principal de la glicina, antes unida al sustrato, irrumpiendo la interacción sustrato-residuo (Qin et al, 2011). La enzima mutante en esta posición descripta por Qin et al (2011) no muestra actividad enzimática dado que la unión a sustrato se ve completamente impedida. Esto fue corroborado por nuestros estudios, dado que también obtuvimos una actividad enzimática nula de la proteína mutante y una actividad residual en pacientes de alrededor del 50% (tabla II.2). En cuanto a las predicciones bioinformáticas, una de ellas describe al cambio como tolerable aunque las otras dos empleadas lo describen como deletéreo o dañino (Tabla II.1); esto nos indica la importancia de utilizar más de una herramienta predictiva y de realizar los ensayos funcionales correspondientes de modo de determinar sin lugar a dudas el efecto de cada variante genética.

La mutación p.Y422C afecta a un aminoácido altamente conservado a través de la evolución (Méndez et al, 2012) y este residuo se localiza en el dominio de unión al cofactor FAD, específicamente en una de las hojas plegadas β de éste (Qin et al, 2011). El cambio de esta tirosina por un aminoácido como la cisteína, provoca un descenso de la actividad enzimática tanto en el sistema de expresión procariótico como en pacientes (Tabla II.2), además de ser predicho como un cambio no tolerable por las herramientas bioinformáticas (Tabla II.1). Una posible explicación sería que el cambio de un aminoácido aromático, como la tirosina, por otro también polar pero conformado por un grupo sulfhidrilo como la cisteína, provocaría un cambio conformacional en la estructura del dominio de unión al cofactor FAD. Aun cuando éste no es el aminoácido que se une directamente al FAD, el posible cambio conformacional llevaría a una interacción incorrecta del cofactor con el residuo correspondiente, generando así un descenso en la actividad enzimática de la proteína.

En cuanto a las mutaciones c.338+3insT, c.807 G>A y c.808-1 G>C, pensamos que su efecto es sobre el proceso de splicing del ARNm de la PPOX dado que la primera podría alterar la definición del sitio 5' de splicing, la segunda siendo la única exónica no lleva a un cambio de aminoácido y la última afecta directamente a uno de los dinucleótidos universalmente conservados del sitio 3' de splicing. Como una primera aproximación estudiamos a estas alteraciones mediante RT-PCR con muestras de ARNm de los pacientes adecuados, no obstante sólo obtuvimos la banda correspondiente al alelo normal o ninguna banda (Rossetti et al, 2008). Es por esto que nos propusimos estudiarlas empleando un ensayo funcional de minigenes, que al igual que en el caso de las mutaciones missense se complementó con un análisis bioinformático.

Tanto el ensayo de transfección con los constructos pTB (Fig.II.1) como el ensayo de transfección con los constructos pcDNA (Fig. II.2) mostraron que hay defectos a nivel del splicing de la región que contiene a la mutación c.338+3insT dado que observamos un 100% de skipping del exón 4 de la PPOX. No obstante, el constructo WT de ambos ensayos muestra una pobre inclusión del exón, en contraposición al 100% esperado. Pese a los inconvenientes que

tiene la secuencia WT para realizar correctamente el proceso de splicing, es evidente el efecto de exon skipping que produce la mutación; dato experimental que se complementa con el dato bioinformático de descenso de la fuerza del sitio 5' (Tabla II.3). De hecho, esta mutación ubicada en la tercera base del intrón 4 afecta a una purina, que en humanos se encuentra conservada en un 95% (Zhang, 1998; Baralle & Baralle, 2005) y que al ser reemplazada por una pirimidina como la timina este porcentaje baja drásticamente a 3% (Zhang 1998). Perder este exón genera la aparición de un codón finalización prematuro en el exón 4, con la consecuente degradación del transcripto anómalo por el mecanismo de "non-sense mediated decay" (NMD), que detecta y degrada selectivamente a estos ARNm defectuosos (Maquat, 2004).

En cuanto a la mutación c.807G>A, los resultados muestran en forma clara que su efecto es provocar el skipping del exón 7 (Fig. II.1). Considerando también que ningún enhancer exónico de splicing (ESE) es afectado por esta alteración (Tabla II.3), hipotetizamos que ésta podría estar afectando al sitio de unión de U1snRNA. Esta pequeña ribonucleoproteína nuclear es el primer factor que se une al transcripto naciente, específicamente en el sitio donor de splicing por complementariedad de bases, para comenzar con el ensamblado del spliceosoma (Wahl et al, 2009). En este aspecto, el ensayo en presencia de U1 complementario a la mutación (Fig. II.3) mostró un rescate parcial del splicing respecto de la construcción mutante en ausencia de U1 o en presencia de U1 WT. Asimismo, esta mutación afecta a la última base del exón 7, reemplazando una G, con un porcentaje de conservación del 77%, por una A, con una conservación del 12% (Zhang, 1998). Por tanto, concluimos que esta mutación tiene como consecuencia la pérdida del exón 7, lo que genera la aparición de un codón finalización prematuro en el exón siguiente y la consecuente degradación del mensajero anómalo por NMD (Maquat, 2004), mediante la irrupción del sitio de unión del factor U1snRNA.

La mutación c.808-1G>C afecta al dinucleótido AG presente en el sitio 3' de splicing que se encuentra 100% conservado en humanos (Zhang, 1998; Baralle & Baralle, 2005). En este trabajo encontramos experimentalmente que

esta alteración provoca la pérdida del exón 8 (Fig. II.1), dato soportado por la predicción bioinformática de pérdida total de la fuerza del sitio aceptor de splicing (Tabla II.3). La consecuencia de este evento de skipping genera, como en los casos anteriores, la aparición de un codón finalización prematuro que llevará al mensajero a su degradación.

II.4: Referencias

Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes (2005). J Med Genet. 42(10):737-748.

Davids LM, Corrigall AV, Meissner PN. Mitochondrial targeting of human protoporphyrinogen oxidase (2006). Cell Biol Int 30(5):416-426.

Lecha M, Badenas C, Puig S, Orfila J, Milà M, To-Figueras J, Muñoz C, Mercader P, Herrero C. Genetic studies in Variegate Porphyria in Spain. Identification of gene mutations and family study for carrier detection (2006). J Eur Acad Dermatol Venereol. 20(8):974-979.

Maquat LE. Nonsense-mediated mRNAdecay: splicing, translation and mRNP dynamics (2004). Nat Rev Mol Cell Biol. 5: 89–99.

Méndez M*, Granata BX*, Moran Jiménez MJ, Parera VE, Batlle A, Enriquez de Salamanca R, Rossetti MV. Fuctional chractererization of five protoporphyrinogen oxidase missense mutations found in Argentinean Variegate patients (2012). JIMD Rep. 4:91-97. DOI: 10.1007/8904_2011_77. MM* y BXG* contribuyeron igualmente a la realización del trabajo.

Morgan RR, Errington R, Elder GH. Identification of sequences required for the import of human protoporphyrinogen oxidase to mitochondria (2004). Biochem J 377(Pt 2):281-287.

Qin X, Tan Y, Wang L, Wang Z, Wang B, Wen X, Yang G, Xi Z, Shen Y. Structural insight into human Variegate Porphyria disease (2011). FASEB J. 25(2):653-664. DOI: 10.1096/fj.10-170811.

Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, Parera VE, Batlle A. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2008). BMC Med Genet. 9:54. DOI: 10.1186/1471-2350-9-54.

Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine (2009). Cell. 136(4):701-718. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.009.

Zhang MQ. Statistical features of human exons and their flanking regions (1998). Hum Mol Genet. 7(5):919-932.

Capítulo III: Análisis de haplotipos

III.1: Caracterización de STRs en la población normal

Como paso previo al análisis de haplotipos en nuestros pacientes PV, procedimos con la caracterización de los marcadores moleculares seleccionados en la población normal Argentina. En la Tabla III.1 podemos observar las principales características de los 5 STRs estudiados. Asimismo, en la Figura III.1 se muestran en forma gráfica las frecuencias alélicas para cada marcador molecular.

Todos los alelos hallados se condicen con los PM encontrados en las bases de datos (ver Método Experimental, III.1), considerando, en el caso que corresponda, los 18 nucleótidos extra que aporta el primer M13.

También se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg, encontrándose que en la población normal Argentina, todos estos STRs se ajustan a dicho equilibrio. En la Tabla III.1 se observan los valores p hallados.

STR	# alelos	# genotipos	Heterocigosis observada	Heterocigosis esperada	p
D1S2707	7	18	0,617	0,805	0,1017
D1S484	4	9	0,735	0,704	0,769
D1S2705	9	21	0,725	0,828	0,5705
D1S1679	8	21	0,875	0,833	0,724
D1S104	9	17	0,875	0,785	0,8626

Tabla III.1: Características de los STRs en la población normal Argentina.

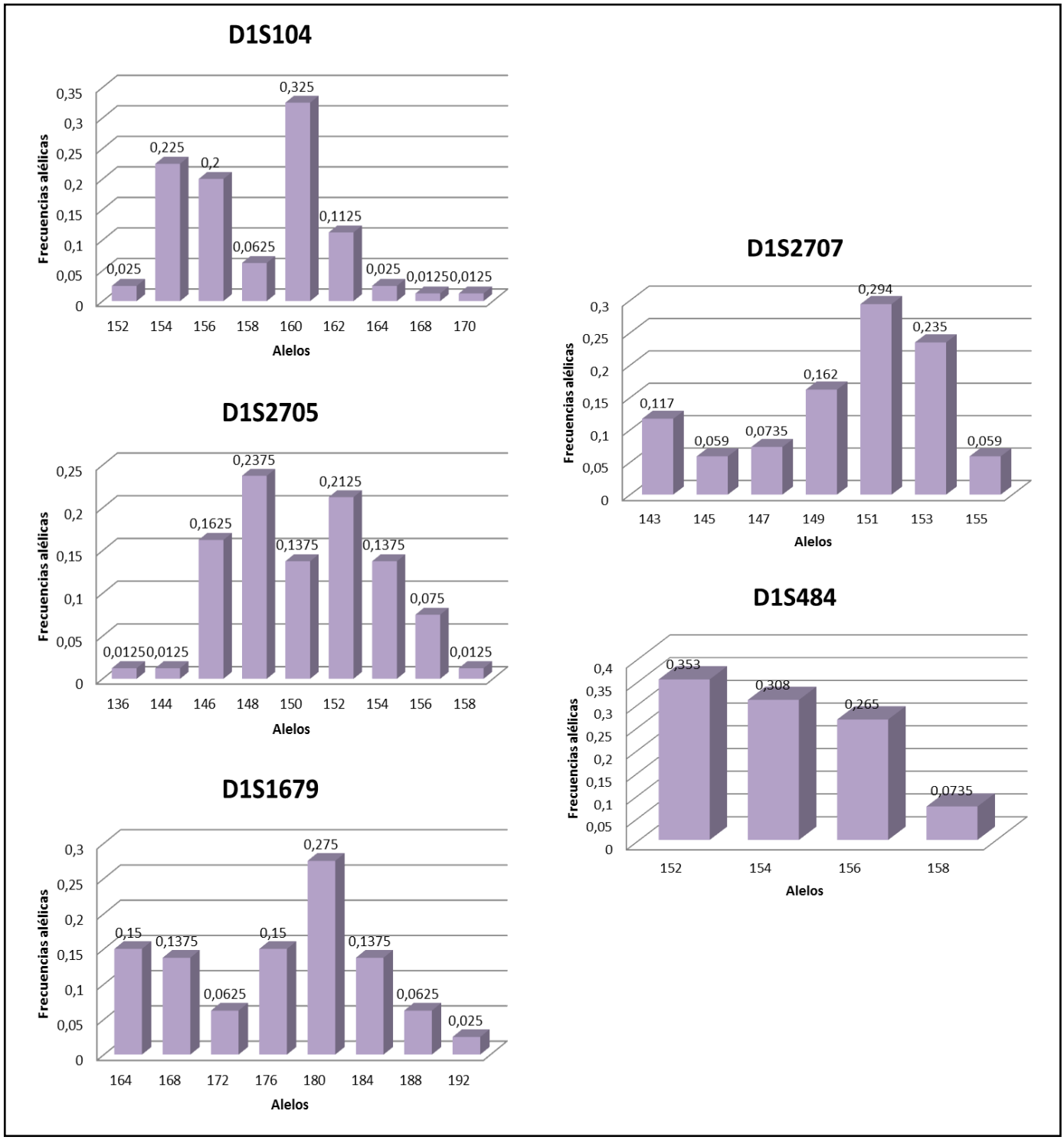


Figura III.1: Frecuencias alélicas de los STRs en la población normal Argentina.

III.2: Caracterización de STRs en pacientes PV

Los pacientes PV Argentinos se dividieron en 2 grupos: portadores de la mutación c.1.042_1.043insT (ins) y pacientes PV portadores de otras mutaciones (otras). En estos 2 grupos, también analizamos las características de los 5 STRs seleccionados. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla III.2 y los gráficos correspondientes a las frecuencias alélicas en las Figuras III.2 y III.3.

Grupo	STR	# alelos	# genotipos	Heterocigosis observada	Heterocigosis esperada
ins	D1S2707	6	8	0,7	0,725
	D1S484	4	5	0,92	0,653
	D1S2705	5	5	0,538	0,441
	D1S1679	7	7	0,769	0,589
	D1S104	6	9	0,961	0,753
otras	D1S2707	7	16	0,91	0,8
	D1S484	4	7	0,538	0,653
	D1S2705	6	14	0,47	0,687
	D1S1679	8	14	0,902	0,748
	D1S104	8	19	0,843	0,792

Tabla III.2: Características de los STRs en pacientes PV Argentinos portadores de la mutación c.1.042_1.043insT (ins) y portadores de otras mutaciones (otras).

Por otra parte, las frecuencias alélicas de cada STR se compararon entre los 3 grupos de individuos y no encontramos diferencias significativas en ningún caso. Sin embargo, analizando los gráficos de frecuencias observamos que los alelos D1S2707-153, D1S484-158, D1S2705-146, D1S1679-180, y D1S104-154 tienen una frecuencia mayor en el grupo de portadores de la mutación c.1.042_1.043insT que en los otros 2 grupos de individuos, por tanto inferimos que estos alelos se asocian de manera preferencial a la mutación más abundante en nuestra población PV.

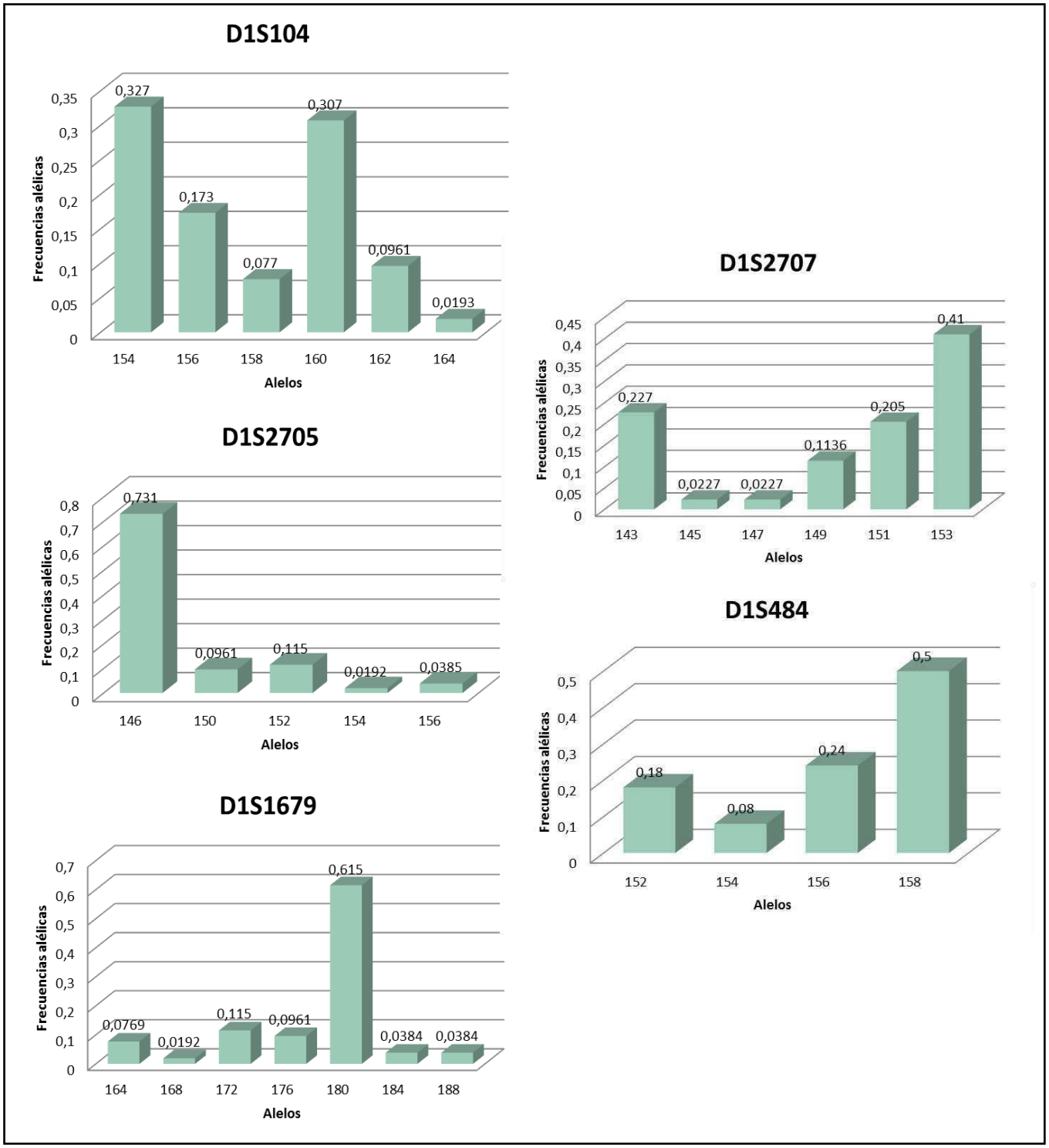


Figura III.2: Frecuencias alélicas de los STRs en el grupo de individuos PV con la mutación c.1.042_1.043insT (ins).

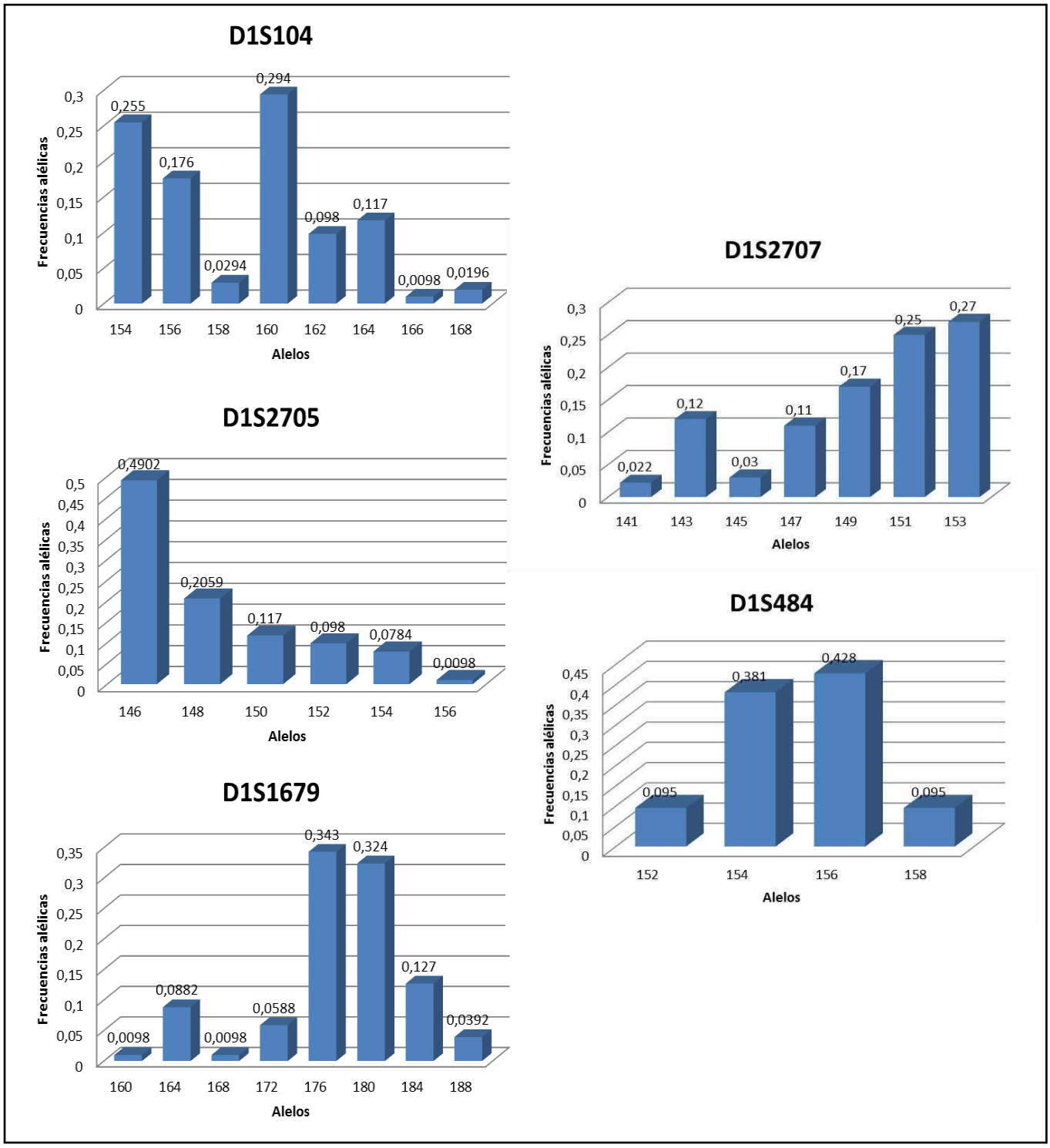


Figura III.3: Frecuencias alélicas de los STRs en el grupo de individuos PV con otras mutaciones (otras).

De las Figuras III.1, III.2 y III.3 también se desprende que hay diferencias entre la cantidad de alelos entre los 3 grupos de individuos analizados. De esta forma, considerando a todos los individuos genotipificados,

encontramos que el STR D1S2707 presenta un total de 8 alelos (141-143-145-147-149-151-153-155), D1S484 con 4 alelos (152-154-156-158), D1S2705 9 alelos (136-144-146-148-150-152-154-156-158), D1S1679 9 alelos (160-164-168-172-176-180-184-188-192) y finalmente D1S104 10 alelos (152-154-156-158-160-162-164-166-168-170).

Por último, al analizar las distribuciones de frecuencias alélicas en los 3 grupos de individuos, observamos que ésta es similar entre el grupo ins y otras pero que es diferente de la del grupo control para todos los STRs estudiados, excepto para D1S484. En este caso, la distribución de frecuencias alélicas es diferente en los 3 grupos de individuos.

III.3: Haplotipos

A continuación se detallan los datos obtenidos de la segregación de alelos en cada familia PV y del programa PHASE, que fue utilizado principalmente para determinar el haplotipo más probable en aquellos individuos sin familiares disponibles para analizar y/o en aquellos casos donde no fue posible obtener los alelos empíricamente. En la Tabla III.3 se observan los haplotipos de los individuos con la mutación c.1.042_1.043insT, mientras que en la Tabla III.4 se muestran los haplotipos de los PV portadores de otras mutaciones.

El haplotipo central D1S484-158, D1S2705-146, D1S1679-180 cosegrega con la mutación c.1.042_1.043insT en el 100% de las familias PV, mientras que ese haplotipo en las familias con otras mutaciones aparece solamente en el 10,5% de los casos. Asimismo, el programa PHASE encuentra una diferencia significativa mayor para el haplotipo central definido en la Tabla III.3 ($p=0,01$) respecto del más probable definido con los 5 STRs ($p=0,02$), entre los controles y los individuos con la mutación recurrente y entre los PV con otras mutaciones y con la inserción ($p=0,01$ en ambos casos). Por otra parte, 10 familias portadoras de la mutación recurrente extienden el haplotipo compartido al alelo D1S2707-153 (71,4% de las familias), mientras que sólo 1 familia portadora de otra mutación cuenta con éste (5,2% de las familias).

Familia / STR	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
D1S2707	143	143	153	153	153	153	153	153	153	151	153	153	153	143
D1S484	158	158	158	158	158	158	158	158	158	158	158	158	158	158
D1S2705	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146	146
PPOX c.1.042_1.043insT														
D1S1679	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
D1S104	160	154	154	156	154	158	154	154	160	154	162	154	156	154

Tabla III.3: Haplotipos de pacientes PV con la mutación más frecuente (familias VII a XX). En rojo se muestra el haplotipo central compartido por los individuos de este grupo y subrayado el haplotipo extendido presente en 10 de las familias. En cursiva se observa el gen de la PPOX con la mutación en estudio.

Familia / STR	I	II	III	V	VI	XXI	XXII	XXIII	XXV	XXV	XXVI	XXVII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII	XXXIII	XXXIV	XXXV
D1S2707	151	151	145	151	151	153	151	147	153	149	153	149	149	151	143	143	141	153	151
D1S484	158	152	156	154	158	158	156	154	154	154	154	154	154	152	154	154	154	158	154
D1S2705	148	146	146	152	146	146	146	150	148	148	146	148	150	154	146	146	152	146	146
PPOX Mutación																			
D1S1679	180	176	180	180	180	176	180	172	176	164	180	180	180	180	188	180	176	180	176
D1S104	154	160	160	156	154	164	154	162	164	160	156	160	162	160	154	156	168	154	160

Tabla III.4: Haplotipos de pacientes PV con otras mutaciones (familias I a III, V, VI, XXI a XXVII, XXIX a XXXV). En rojo se muestra el haplotipo central y subrayado el haplotipo extendido. En cursiva se observa el gen de la PPOX con la mutación que corresponda a cada familia.

III.4: Discusión

Con el fin de elucidar el origen de la elevada prevalencia de la mutación c.1.042_1.043insT en nuestro país, nos propusimos realizar un estudio de haplotipos. Como marcadores moleculares seleccionamos 5 STRs flanqueantes al gen de la PPOX, cuyo desequilibrio de ligamiento respecto del gen ya se había descripto (Groenewald et al, 1998). Además, estos marcadores también se utilizaron en estudios previos de haplotipos en otras poblaciones (Frank et al, 2001; de Villiers et al, 2005; van Tuyll van Serooskerke et al, 2009; van Tuyll van Serooskerken et al, 2012).

Como primer paso, caracterizamos a estos marcadores en la población normal, hallando que presentan entre 8 y 9 alelos, con una distribución de frecuencias que nos permite decir que se trata de polimorfismos variables e informativos, a diferencia de 7 SNP (polimorfismos de nucleótido simple) analizados previamente (Granata, 2008). En ese trabajo, al no resultar informativos los marcadores moleculares seleccionados, no pudimos descartar ni corroborar la hipótesis del efecto fundador para la mutación c.1.042_1.043insT.

Todos los STRs estudiados presentan un alto número de genotipos posibles y una hetorocigosis apreciable (Tabla III.1). También observamos que todos se ajustan al equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que implica que representan polimorfismos estables en la Argentina.

En cuanto a los grupos de individuos PV, si bien también pudimos observar variabilidad entre los alelos posibles, estos son diferentes entre los grupos. Es decir, algunos alelos están representados en 1 ó 2 de los grupos y no en todos, haciendo esto que quizás en un grupo haya más alelos para un mismo STR que en el otro. Por lo tanto, si consideramos a todos los individuos que conforman los 3 grupos de estudio, la cantidad de alelos descripta es mayor a la informada sólo para la población normal.

La distribución de las frecuencias alélicas entre el grupo de controles y los otros 2 grupos en estudio es diferente, destacándose principalmente la elevada proporción del alelo D1S2707-153, D1S484-158, D1S2705-146 y D1S1679-180 en el grupo con la mutación c.1.042_1.043insT. No obstante, al realizar las pruebas de contingencia χ^2 correspondientes, no encontramos diferencias significativas entre las frecuencias de ningún grupo.

Finalmente, la segregación de alelos realizada dentro de cada familia (ver Apéndice, Pedigrees y Haplotipos) nos permitió confeccionar los haplotipos representados en las Tablas III.3 y III.4, con ayuda también del software PHASE. De esta forma pudimos observar que existe un haplotipo central compartido por el 100% de las familias PV con la mutación más común, el cual llega sólo a un 10,5% en las familias PV con otras mutaciones y que también existe un haplotipo más extenso que contiene al alelo D1S2707-153 que alcanza el 71,4% de las

familias con la inserción y sólo el 5,2% en otras familias PV. Además, existen diferencias significativas entre las frecuencias haplotípicas de los 3 grupos de individuos.

Considerando que los marcadores moleculares analizados resultaron informativos, es altamente improbable que todas las familias compartan exactamente el mismo haplotipo. De esta forma concluimos que el haplotipo central D1S484-158, D1S2705-146, D1S1679-180 estaría asociado en un 100% a la mutación responsable de PV más frecuente de la Argentina, y por tanto, que existiría un ancestro común a partir del cual esta alteración se diseminó únicamente en nuestro país.

Como dato adicional, la segregación de alelos en aquellos individuos en los cuales no se ha determinado aún el genotipo para el gen de la PPOX (ver Resultados y Discusión I.1) nos sirve como método indirecto para determinarlo. Por ejemplo, en la Familia XXX (ver Apéndice, Pedigrees y Haplotipos) el primer hombre no determinado de la segunda generación y el primer hombre no determinado de la tercera podrían de esta forma resultar portadores de la mutación familiar (c.745delG).

III.5: Referencias

de Villiers JN, Kotze MJ, van Heerden CJ, Sadie A, Gardner HF, Liebenberg J, van Zyl R, du Plessis L, Kimberg M, Frank J, Warnich L. Overrepresentation of the founder PPOX gene mutation R59W in a South African patient with severe clinical manifestation of porphyria (2005). Exp Dermatol. 14(1):50-55.

Frank J, Aita VM, Ahmad W, Lam H, Wolff C, Christiano AM. Identification of a founder mutation in the protoporphyrinogen oxidase gene in Variegate Porphyria patients from chile (2001). Hum Hered. 51(3):160-168.

Granata, BX. Caracterización molecular de la Porfiria Variegata en la población Argentina (2008). Tesina de grado presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para optar por el título de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Groenewald JZ, Liebenberg J, Groenewald IM, Warnich L. Linkage disequilibrium analysis in a recently founded population: evaluation of the Variegate Porphyria founder in South African Afrikaners (1998). Am J Hum Genet. 62(5):1254-1258.

van Tuyll Van Serooskerke AM, Schneider-Yin X, Schimmel RJ, Bladergroen RS, Poblete-Gutiérrez P, Barman J, van Geel M, Frank J, Minder EI. Identification of a recurrent mutation in the protoporphyrinogen oxidase gene in Swiss patients with Variegate Porphyria: clinical and genetic implications (2009). Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 55(2):96-101.

van Tuyll van Serooskerken AM, Drögemöller BI, Te Velde K, Bladergroen RS, Steijlen PM, Poblete-Gutiérrez P, van Geel M, van Heerden CJ, Warnich L, Frank J. Extended haplotype studies in South African and Dutch Variegate Porphyria families carrying the recurrent p.R59W mutation confirm a

common ancestry (2012). Br J Dermatol. 166(2):261-265. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10606.x.

Capítulo IV: Relación de las PHAs con el estrés oxidativo

IV.1: Evaluación de parámetros de estrés oxidativo

Se estudiaron diversos parámetros de estrés oxidativo en plasma de pacientes PAI y PV, como representantes de PHAs, en comparación con individuos control.

Se evaluó el estado oxidativo de los individuos mediante la capacidad oxidante total y marcadores de daño oxidativo como la peroxidación lipídica (niveles de MDA) y el daño oxidativo a proteínas. En ningún caso observamos diferencias significativas entre los pacientes y los controles (Tabla IV.1).

Respecto de la defensa antioxidante, se cuantificaron los niveles de GSH, capacidad antioxidante total y actividad de catalasa, encontrándose valores similares entre pacientes y controles (Tabla IV.1).

Determinamos los niveles plasmáticos de homocisteína total, como marcador de daño neurológico, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos analizados (Tabla IV.1).

MARCADOR		CONTROL	PV	PAI
Estado oxidativo	Capacidad oxidante total (μmoles/l)	15,19 ± 3,16	17,63 ± 4,05	19,22 ± 4,96
	MDA (nmles/ml)	0,68 ± 0,05	0,75 ± 0,06	0,82 ± 0,06
	Daño a proteínas (nmoles/ml)	150,13 ± 34,53	175,34 ± 45,12	193,23 ± 51,26
Defensa antioxidante	GSH (μmoles/ml)	0,39 ± 0,03	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,04
	Capacidad antioxidante total (μmoles/l)	939 ± 103	752 ± 124	735 ± 143
	Catalasa (nmoles/min.ml)	16,7 ± 4,7	20,5 ± 7,0	20,3 ± 7,2
Daño neurológico	Hcy (mmol/l)	10,7 ± 3,2	14,6 ± 4,3	15,2 ± 3,9

Tabla IV.1: Marcadores de estado oxidativo, defensa antioxidante y daño neurológico en pacientes PAI y PV. Los valores se expresan como promedio ± desvío estándar.

IV.2: Discusión

La PAI y la PV, se caracterizan por presentar acumulación de precursores de la biosíntesis del hemo en hígado fundamentalmente. Se ha demostrado que la acumulación de estos precursores constituye una fuente endógena de ROS capaz de producir daños irreversibles a los componentes celulares (Monteiro et al, 1986; Monteiro et al, 1989; Pereira et al, 1992). Además, el aumento de ROS se relaciona con la patogénesis de la disfunción neurológica en enfermedades como el Alzheimer (Vitte et al, 2004).

En trabajos previos, tampoco se detectaron alteraciones en el sistema de defensa antioxidante en plasma de pacientes PV encontrándose sólo un ligero aumento de MDA (Ferrer et al, 2009a). Sin embargo se describieron alteraciones de algunos marcadores de estrés oxidativo e inflamación en eritrocitos, neutrófilos y linfocitos de pacientes PV (Ferrer et al, 2009a; Ferrer et al, 2009b; Ferrer et al, 2010), así como una disminución del sistema de defensa antioxidante y aumento en la capacidad de producción de ROS en neutrófilos y linfocitos estimulados (Ferrer et al, 2009a; Ferrer et al, 2010). Asimismo, en pacientes PAI se han reportado niveles elevados de homocisteína en plasma, sin encontrar una relación entre éstos y los niveles de precursores del hemo excretados en orina o la presentación clínica de la enfermedad (To-Figueras et al, 2010).

Por otra parte, en modelos animales de porfirias, se observó una situación de estrés oxidativo severo en los órganos principalmente afectados por la acumulación de intermediarios del hemo (Lelli et al, 2005; Rodriguez et al, 2005; Faut et al, 2013).

En este trabajo tampoco pudimos hallar diferencias significativas en plasma de individuos porfíricos y controles, en ninguno de los parámetros estudiados. Es probable que el diagnóstico temprano de la porfiria en los pacientes incluidos en el análisis y su permanente control lleve a que los niveles de ROS y el estado del sistema de defensa antioxidante estén balanceados. De hecho, Ferrer et al (2013) reportan que la suplementación con vitaminas C y E en concentraciones adecuadas durante 6 meses, disminuyó el daño oxidativo en

plasma, aumentó las actividades de catalasa y GR en eritrocitos y las actividades de GR y SOD en linfocitos.

Además, trabajando con pacientes nos encontramos con la imposibilidad de evaluar el estado óxido-reducción y las defensas antioxidantes directamente en los órganos. Evaluar estos parámetros en muestras biológicas como suero u orina, quizás no refleje de forma irrefutable lo que ocurre en los órganos hasta que el deterioro de estos sea severo. También consideramos que la cantidad de individuos incluidos en el estudio debe aumentar así como complementar con ensayos realizados en otros tipos celulares provenientes de pacientes, en líneas celulares y en modelos animales.

IV.3: Referencias

Faut M, Paiz A, San Martín de Viale LC, Mazzetti MB. Alterations of the óxido-reducción state, pentose pathway and glutathione metabolism in an acute porphyria model. Their impact on heme pathway (2013). Exp Biol Med (Maywood). 238(2):133-143. DOI: 10.1177/1535370212473702.

Ferrer MD, Sureda A, Tauler P, Palacín C, Tur JA, Pons A. Impaired lymphocyte mitochondrial antioxidant defences in Variegate Porphyria are accompanied by more inducible reactive oxygen species production and DNA damage (2010). Br J Haematol. 149(5):759-767. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08149.x.

Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Palacín C, Tur JA, Pons A. Antioxidants restore protoporphyrinogen oxidase in Variegate Porphyria patients (2013). Eur J Clin Invest. 43(7):668-678. DOI: 10.1111/eci.12091.

Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Palacín C, Tur JA, Pons A. Variegate porphyria induces plasma and neutrophil oxidative stress: effects of dietary supplementation with vitamins E and C (2009a). Br J Nutr. 103(1):69-76. DOI: 10.1017/S0007114509991413.

Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Romaguera D, Llompart I, Palacin C, Orfila J, Tur JA, Pons A. Enzyme antioxidant defences and oxidative damage in red blood cells of Variegate Porphyria patients (2009b). Redox Rep.14(2):69-74.

Lelli SM, San Martín de Viale LC, Mazzetti MB. Response of glucose metabolism enzymes in an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species (2005).Toxicology. 216(1):49-58.

Monteiro HP, Abdalla DS, Augusto O, Bechara EJ. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by

hemoglobin and connections with porphyrinpathies (1989). Arch Biochem Biophys. 271(1):206-216.

Monteiro HP, Abdalla DS, Faljoni-Alàrio A, Bechara EJ. Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and delta-aminolevulinic acid (1986). Biochim Biophys Acta. 881(1):100-106.

Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats (1992). J Appl Physiol. 72(1):226-230.

Rodriguez JA, Martinez Mdel C, Gerez E, Batlle A, Buzaleh AM. Heme oxygenase, aminolevulinate acid synthetase and the antioxidant system in the brain of mice treated with porphyrinogenic drugs (2005).Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 51(5):487-494.

To-Figueras J, Lopez RM, Deulofeu R, Herrero C. Preliminary report: hyperhomocysteinemia in patients with acute intermittent porphyria (2010). Metabolism. 59(12):1809-1810. DOI: 10.1016/j.metabol.2010.05.016.

Vitte J, Michel BF, Bongrand P, Gastaut JL. Oxidative stress level in circulating neutrophils is linked to neurodegenerative diseases (2004). J Clin Immunol. 24(6):683-692.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo estudiamos la genética molecular de la Porfiria Variegata en nuestro país y el estado de estrés oxidativo en pacientes con Porfirias Hepáticas Agudas.

En relación al diagnóstico genético, pudimos determinar la mutación responsable de la porfiria en el paciente, llegando así al diagnostico diferencial de éste. En muchas oportunidades los parámetros bioquímicos brindan resultados que no permiten aseverar de qué porfiria se trata, volviéndose entonces imprescindible el uso de técnicas moleculares como la PCR y secuenciación en la determinación precisa del tipo de porfiria. Por otra parte, se hallaron familiares portadores asintomáticos, cuyo diagnóstico temprano permite alertarlos acerca de la exposición a agentes desencadenantes antes de la aparición de manifestaciones clínicas, hecho respaldado por la amplia proporción de individuos de esta naturaleza hallados en el transcurso de este trabajo. El diagnóstico diferencial permite no sólo aconsejar a los portadores asintomáticos acerca de los agentes precipitantes, sino también a los pacientes sintomáticos quienes pueden mejorar considerablemente su calidad de vida con el correcto cuidado y/o tratamiento.

No obstante la precisión del método de PCR y posterior secuenciación, hallamos un 2% de individuos a los cuales no se les pudo adjudicar el genotipo debido a dificultades inherentes a esta técnica (Bevan et al, 1992; Grompe, 1993).

El tipo de mutación más común en nuestro país, exceptuando las inserciones, son las mutaciones missense, donde la actividad de la enzima se ve comprometida. En cuanto a las mutaciones por inserción de una o dos bases, éstas son las más numerosas en nuestra población PV fundamentalmente por la inusual elevada prevalencia de la mutación c.1.042_1.043insT, presente en aproximadamente el 40% de las familias con diagnóstico genético. Debido a este porcentaje tan elevado, es que se incluye a la región que contiene a esta mutación en el screening inicial del gen de la PPOX en pacientes nuevos.

Aún estudiando la relación de tipos de mutaciones, en vez de genotipos específicos, con la sintomatología del paciente no nos fue posible describir una correlación genotipo-fenotipo. Este escenario, ya descripto para PV (Whatley et

al, 1999; Schneider-Yin & Minder, 2006; Rossetti et al, 2008; Di Pierro et al, 2009), es consistente con la naturaleza multifactorial de la patología dado que un genotipo, o en nuestro caso, un tipo de mutación, no es el único factor que determina la sintomatología del individuo (Anderson et al, 2001).

Como ya se mencionó, en nuestra población el tipo de mutación más importante es el missense. En este trabajo estudiamos el efecto de 6 de estas alteraciones en un sistema de expresión procariótico. Estos ensayos revelaron que las mutaciones estudiadas llevan a un descenso importante de la actividad de la enzima demostrando el efecto deletéreo que éstas tienen sobre la estructura y/o la función de la PPOX (Méndez et al, 2011). Por lo tanto, estas mutaciones son responsables del descenso de la actividad enzimática detectada en los pacientes que las portan.

También hallamos mutaciones que, en principio, parecerían no afectar directamente a la proteína, por estar presentes en intrones o por producir cambios sinónimos. Estudiando entonces su efecto en un sistema de minigenes observamos que cada una de ellas provoca la pérdida del exón correspondiente. Esto, a su vez, corre el marco de lectura abierto, haciendo que aparezca un codón finalización prematuro en el exón siguiente. Este codón finalización prematuro será detectado por una maquinaria celular, llamada "nonsense mediated decay" (NMD), la cual degradará selectivamente al mensajero proveniente del alelo mutado (Maquat, 2004). Este último evento nos permite explicar por qué nunca pudimos detectar el transcripto proveniente del alelo mutado mediante ensayos de RT-PCR empleando como templado muestras de pacientes (Granata, 2008; Rossetti et al, 2008). Entonces, mediante el uso de minigenes, demostramos que estas mutaciones son responsables de la patología en los pacientes que las portan, dado que alteran el splicing normal del ARNm de la PPOX.

La mutación c.1.042_1.043insT está presente en el 40% de las familias PV Argentinas y hasta el momento sólo ha sido descripta en nuestro país; esto nos llevó a plantear la hipótesis de efecto fundador. Previamente, analizamos polimorfismos de nucleótido simple intragénicos (Granata, 2008) pero éstos no resultaron variables en nuestra población, haciendo que la hipótesis siguiera sin

ser corroborada ni refutada. En este trabajo analizamos STRs y efectivamente encontramos que estos son marcadores muy variables e informativos en la población. De hecho, pudimos describir un haplotipo central común a todos los individuos con la mutación recurrente, el cual es significativamente diferente en los otros 2 grupos de individuos analizados. Esto nos permitiría corroborar la hipótesis de efecto fundador para esta mutación en la Argentina, es decir que existiría un ancestro común portador de esta alteración a partir del cual se diseminó exclusivamente en nuestro territorio.

Respecto a las determinaciones bioquímicas de estrés oxidativo, se realizaron con el objetivo de hallar marcadores de la disfunción neurológica. Sin embargo, muy probablemente debido a que el número de individuos incluídos fue bajo y que se trata de pacientes tratados y controlados, no nos fue posible encontrar ningún parámetro que sirva a tal fin. De todos modos, éste es un estudio preliminar que en el futuro se complementará con más individuos y con estudios in-vitro en líneas celulares e in-vivo en animales.

Las Porfirias son consideradas enfermedades raras en el mundo. Es por esto que también no son muy conocidas por médicos ni por la población general. Los resultados de este trabajo constituyen un importante aporte para ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares e inician el avance sobre los conocimientos fisiológicos de estas patologías. De esta forma los profesionales de la salud cuentan cada vez con más herramientas a la hora de arribar al diagnóstico diferencial de las mismas, asegurando así un pronto y correcto tratamiento de los pacientes, mejorando su calidad de vida.

Referencias

Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias (2001). In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill, New York, 2991-3062.

Bevan IS, Rapley R, Walker MR. Sequencing of PCR-amplified DNA (1992). PCR Meth Appl. 1(4):222-228.

Granata, BX. Caracterización molecular de la Porfiria Variegata en la población Argentina (2008). Tesina de grado presentada en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para optar por el título de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids (1993). Nat Genet. 5(2):111-117.

Maquat LE (2004) Nonsense-mediated mRNAdecay: splicing, translation and mRNP dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 5:89–99.

Méndez M*, Granata BX*, Moran Jiménez MJ, Parera VE, Batlle A, Enriquez de Salamanca R, Rossetti MV. Fuctional chractererization of five protoporphyrinogen oxidase missense mutations found in Argentinean Variegate patients (2012). JIMD Rep. 4:91-97. DOI: 10.1007/8904_2011_77. MM* y BXG* contribuyeron igualmente a la realización del trabajo.

Rossetti MV, Granata BX, Giudice J, Parera VE, Batlle A. Genetic and biochemical studies in Argentinean patients with Variegate Porphyria (2008). BMC Med Genet. 9:54. DOI: 10.1186/1471-2350-9-54.

Schneider-Yin X, Minder EI. Swiss patients with Variegate Porphyria have unique mutations (2006). Swiss Med Wkly. 136(31-32):515-519.

APÉNDICE

Pacientes PV: mutación y síntomatología

A continuación, se muestra una tabla conteniendo la información correspondiente a las familias PV Argentinas:

FAMILIA	INDIVIDUO	MUTACIÓN	DEFECTO	SINTOMATOLOGÍA
XI	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	madre	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	hija	normal	—	no
	hijo	normal	—	no
	padre	normal	—	no
XII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	hermano	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hermana	normal	—	no
	madre	normal	—	no
	padre	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
XIII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hija	normal	—	no
	hijo	normal	—	no
	hermana	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
XIV	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	mixta
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	aguda
	nieta	normal	—	no
XV	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	madre	normal	—	no
	hija	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hija	normal	—	no
	hermana	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	hermana	normal	—	no
	hermana	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
	sobrina	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	sobrina	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	no
	sobrina	normal	—	no
	prima	normal	—	no

FAMILIA	INDIVIDUO	MUTACIÓN	DEFECTO	SINTOMATOLOGÍA
XVI	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	mixta
XVII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	mixta
XVIII	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	mixta
XIX	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	cutánea
XX	propósito	c.1.042_1.043insT	p.Y348fsX349	aguda
XXI	propósito	c.101A>T	p.E34V	aguda
	padre	normal	—	no
	madre	c.101A>T	p.E34V	no
	hermano	normal	—	no
XXII	propósito	c.133delT	p.S45fsX67	cutánea
XXIII	propósito	c.694G>C	p.G232R	aguda
	hijo	c.694G>C	p.G232R	no
	hijo	normal	—	no
XXIV	propósito	c.101A>T	p.E34V	cutánea
	hermana	c.101A>T	p.E34V	cutánea
	hermano	c.101A>T	p.E34V	mixta
	hija	normal	—	no
	hija	c.101A>T	p.E34V	no
	hija	c.101A>T	p.E34V	no
	hija	c.101A>T	p.E34V	no
	hija	c.101A>T	p.E34V	no
XXV	propósito	c.925delA	p.I309fsX314	mixta
XXVI	propósito	c.808-1G>C	r.EX8del	mixta
	prima	c.808-1G>C	r.EX8del	no
	prima	c.808-1G>C	r.EX8del	no
	tio	c.808-1G>C	r.EX8del	mixta
	sobrina	normal	—	no
	prima	normal	—	no
	hermano	normal	—	no
XXVII	propósito	c.317A>C	p.H106P	cutánea
XXVIII	propósito	c.670T>G	p.W224R	mixta
	hija	normal	—	no
	hija	c.670T>G	p.W224R	no
	prima	c.670T>G	p.W224R	mixta
	hija prima	normal	—	no

FAMILIA	INDIVIDUO	MUTACIÓN	DEFECTO	SINTOMATOLOGÍA
XXIX	propósito	c.338+3_insT	r.EX4del	mixta
XXX	propósito	c.1.082_1.083insC	p.G362fsX380	aguda
	hermana	c.1.082_1.083insC	p.G362fsX380	aguda
	sobrina	c.1.082_1.083insC	p.G362fsX380	no
	hija	normal	—	no
	sobrino	normal	—	no
	hermana	c.1.082_1.083insC	p.G362fsX380	no
	hijo sobrina	normal	—	no
XXXI	propósito	c.807G>A	r.EX7del	mixta
XXXII	propósito	c.995G>C	p.G332A	aguda
	padre	c.995G>C	p.G332A	no
	hija	normal	—	no
	hermana	c.995G>C	p.G332A	no
	tia	c.995G>C	p.G332A	aguda
	prima	normal	—	no
	prima	c.995G>C	p.G332A	no
	tia	normal	—	no
	hijo	normal	—	no
	hijo	normal	—	no
	hermana	normal	—	no
XXXIII	propósito	c.532C>G	p.L178V	cutánea
	hija	c.532C>G	p.L178V	no
XXXIV	propósito	c.745delG	p.V249fsX272	cutánea
	madre	c.745delG	p.V249fsX272	cutánea
	padre	normal	—	no
	primo	normal	—	no
	tia	c.745delG	p.V249fsX272	cutánea
	prima	c.745delG	p.V249fsX272	no
	primo	c.745delG	p.V249fsX272	no
	prima	normal	—	no
	prima	c.745delG	p.V249fsX272	no
	primo	c.745delG	p.V249fsX272	no
	tio	ND	—	—
	prima	c.745delG	p.V249fsX272	
	hermano	ND	—	—

FAMILIA	INDIVIDUO	MUTACIÓN	DEFECTO	SINTOMATOLOGÍA
	abuela	c.745delG	p.V249fsX272	no
	prima	ND	—	—
XXXV	propósito	c.471G>A	r.EX5del	cutánea
	madre	c.471G>A	r.EX5del	no
	padre	normal	—	no
	hermana	c.471G>A	r.EX5del	cutánea
XXXVI	propósito	c.503G>A	p.R168H	mixta
	hijo	c.503G>A	p.R168H	no
	hijo	normal	—	no
	hermana	c.503G>A	p.R168H	cutánea
	hijo	c.503G>A	p.R168H	no
	sobrina	normal	—	no
	sobrina	normal	—	no
	nieta	normal	—	cutánea

Tabla A.1: Información de todos los pacientes PV, excepto las 10 familias reportadas en Resultados y Discusión I.2. Se muestra la mutación familiar, el defecto provocado por ésta y la sintomatología del paciente. ND: no determinado, no: no presenta síntomas.

Mutaciones nuevas en la literatura y nuevas en Argentina.

A continuación, se muestran las secuenciaciones correspondientes a las mutaciones informadas en la Tabla I.1 de Resultados y Discusión:

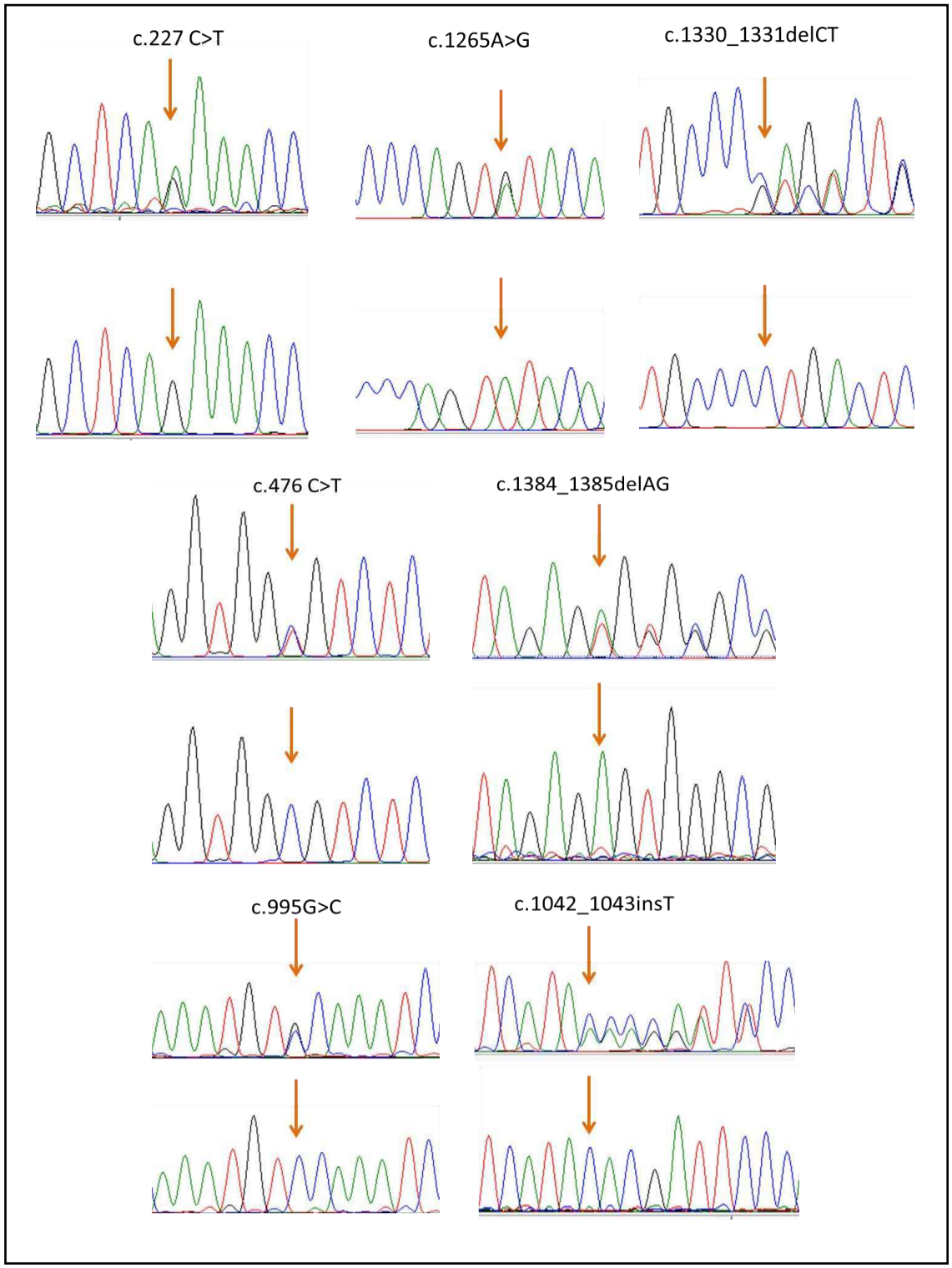
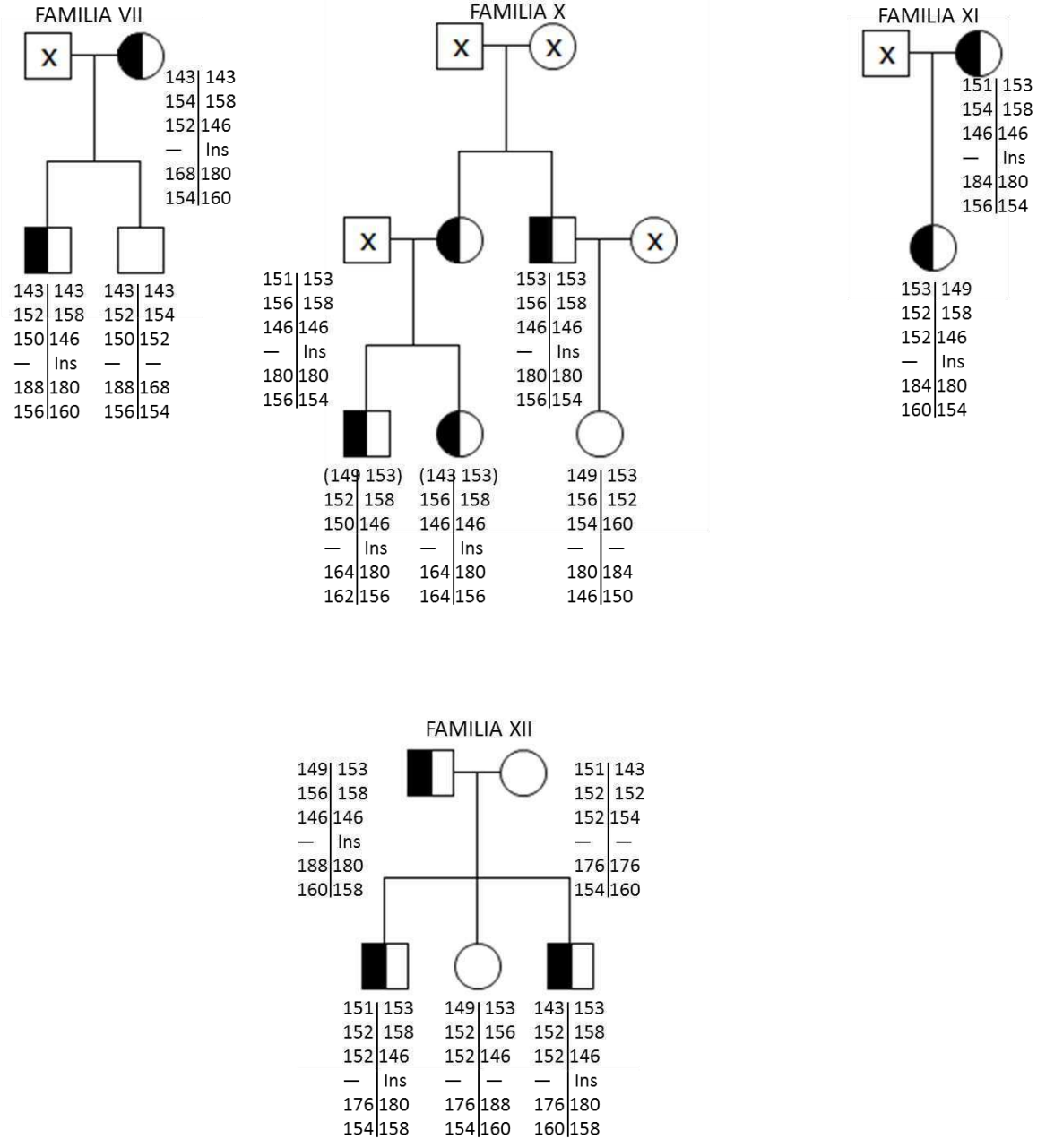
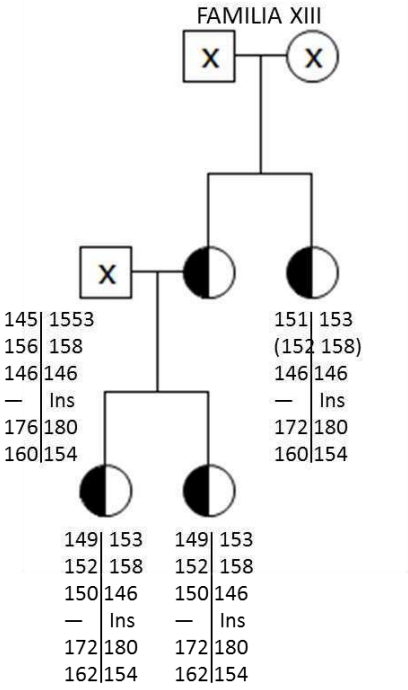


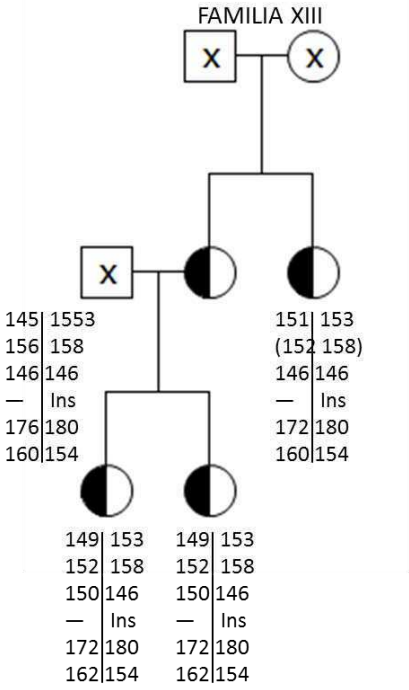
Figura A.1: Esferogramas del análisis de secuencia correspondientes a las 10 familias reportadas en Resultados y Discusión, sección I.2. Se muestra la mutación y debajo su contraparte WT. Las mutaciones c. 227C>T, c.1.042_1.043insT, c.227C>T y c.995G>C se secuenciaron en sentido antisense.

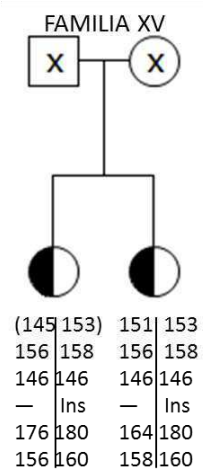
Pedigrees y haplotipos

Los pedigrees de las familias PV compuestas por al menos 2 individuos se utilizaron para estudiar la segregación de alelos en función de la confección de haplotipos. —: alelo WT; Ins: alelo con la mutación c.1.042_1.043insT; M: alelo con otra mutación responsable de PV; ◐ mujer afectada; ◧ hombre afectado; X individuo no disponible en este estudio; ?: genotipo PPOX no determinado; () genotipo y fase determinada a través del programa PHASE.



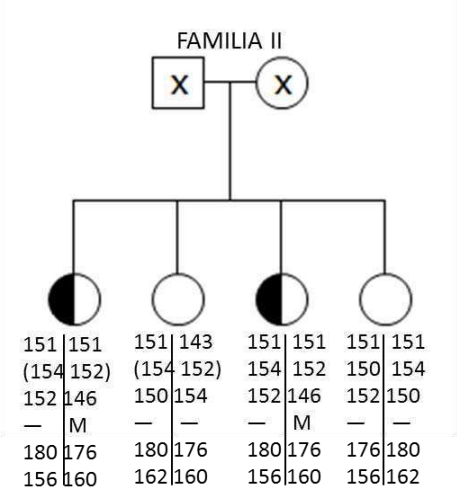


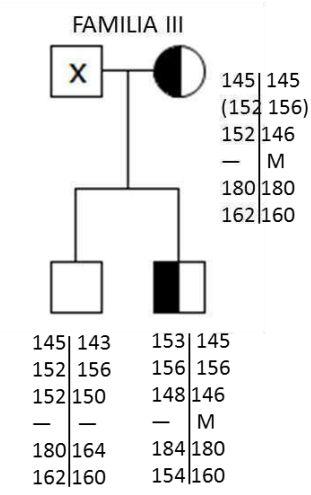




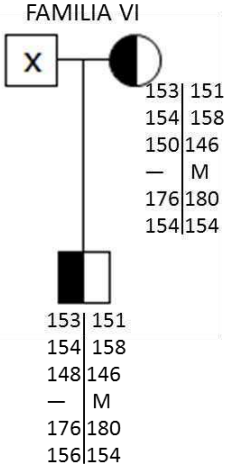
c.1.042_1.043insT

Otras mutaciones

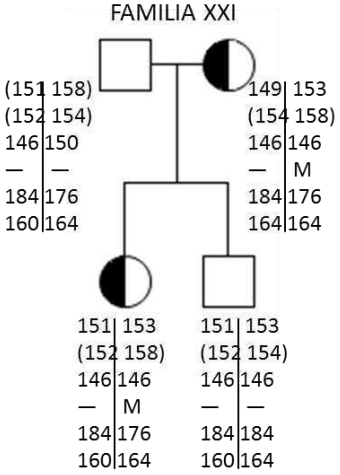




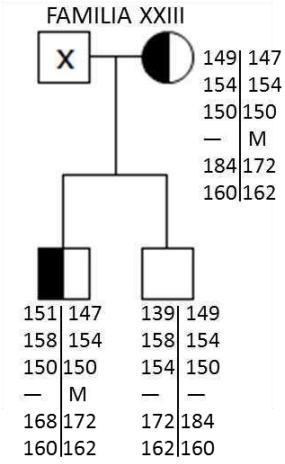
FAMILIA VI



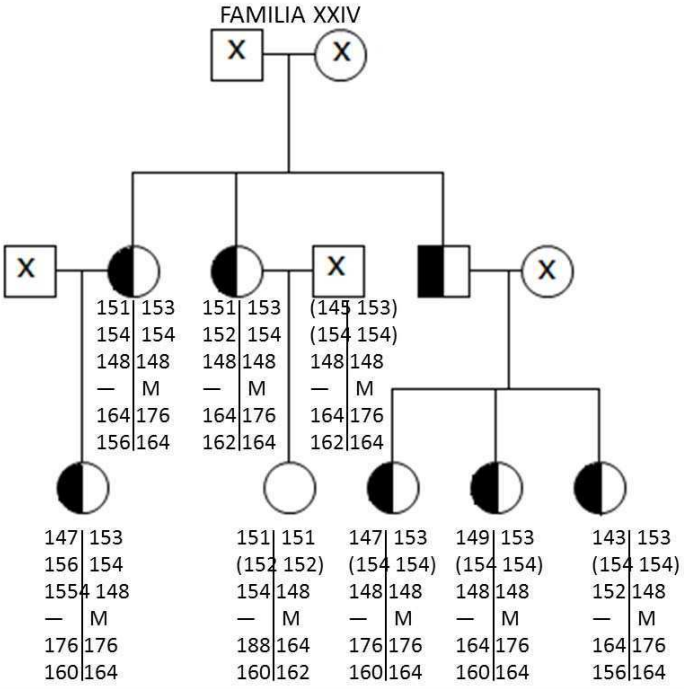
FAMILIA XXI



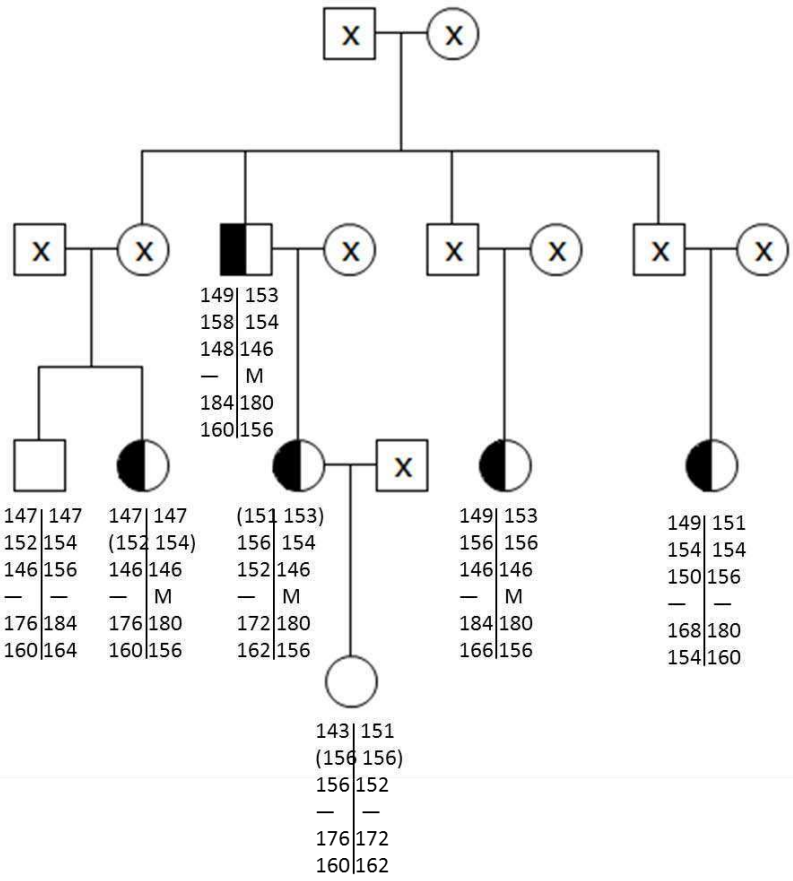
FAMILIA XXIII



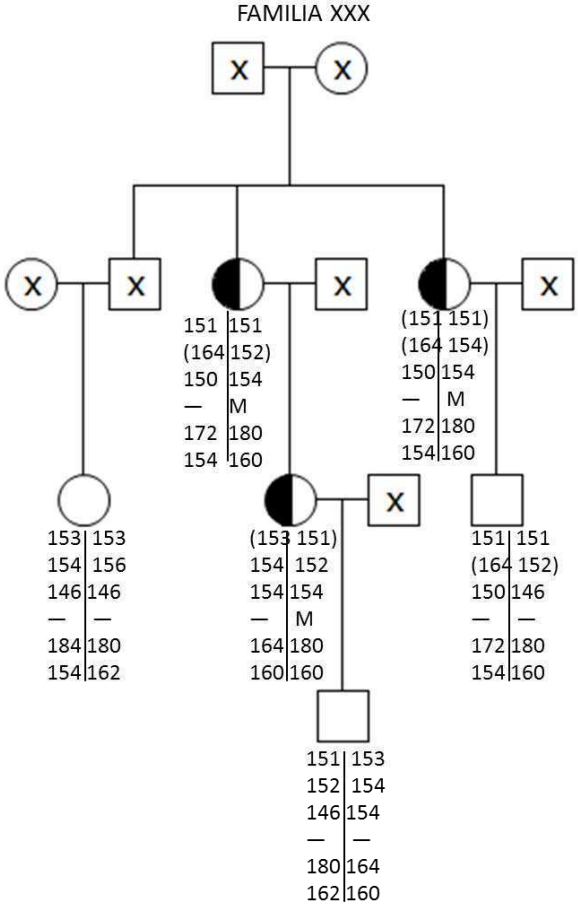
FAMILIA XXIV

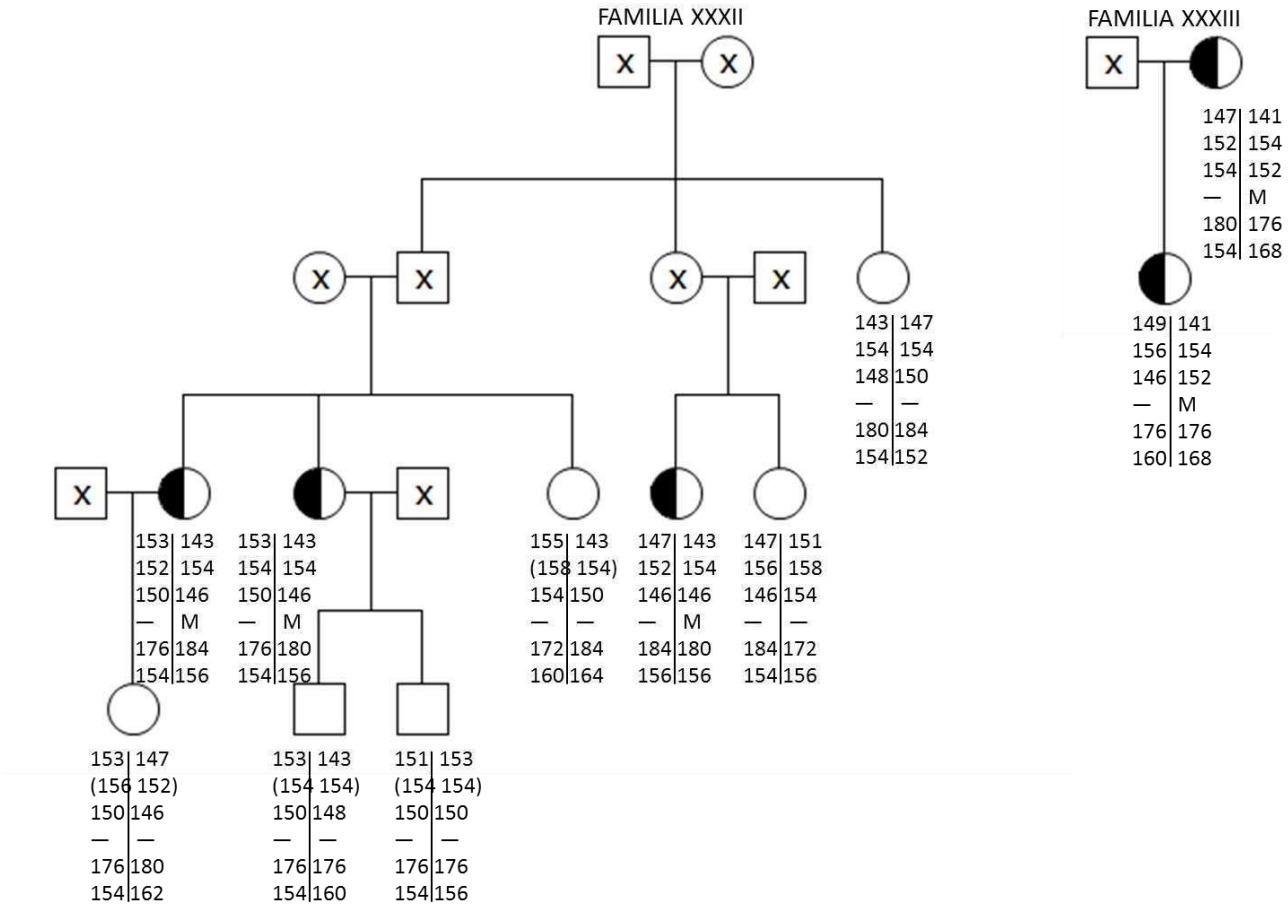


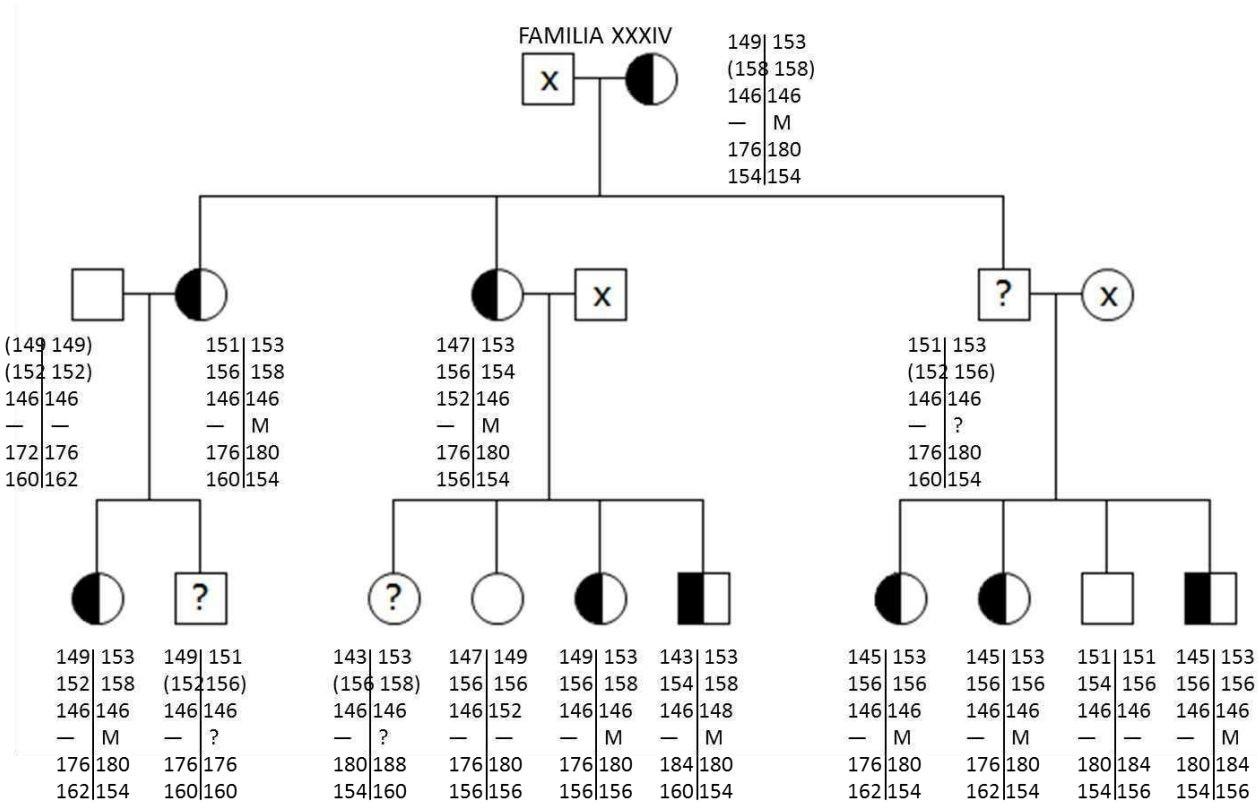
FAMILIA XXVI



FAMILIA XXX




FAMILIA XXXII
143 147
154 154
148 150
— —
180 184
154 152
153 143
152 154
150 146
— M
176 184
154 156
153 143
154 154
150 146
— M
176 180
154 156
155 143
(158 154)
154 150
— —
172 184
160 164
147 143
152 154
146 146
— M
184 180
156 156
147 151
156 158
146 154
— —
184 172
154 156
153 147
(156 152)
150 146
— —
176 180
154 162
153 143
(154 154)
150 148
— —
176 176
154 160
151 153
(154 154)
150 150
— —
176 176
154 156
FAMILIA XXXIII
147 141
152 154
154 152
— M
180 176
154 168
149 141
156 154
146 152
— M
176 176
160 168


FAMILIA XXXIV
149 153
(158 158)
146 146
— M
176 180
154 154
(149 149)
(152 152)
146 146
— —
172 176
160 162
151 153
156 158
146 146
— M
176 180
160 154
147 153
156 154
152 146
— M
176 180
156 154
151 153
(152 156)
146 146
— ?
176 180
160 154
149 153
152 158
146 146
— M
176 180
162 154
149 151
(152 156)
146 146
— ?
176 176
160 160
143 153
(156 158)
146 146
— ?
180 188
154 160
147 149
156 156
146 152
— —
176 180
156 156
149 153
156 158
146 146
— M
176 180
156 156
143 153
154 158
146 148
— M
184 180
160 154
145 153
156 156
146 146
— M
176 180
162 154
145 153
156 156
146 146
— M
176 180
162 154
151 151
154 156
146 146
— —
180 184
154 156
145 153
156 156
146 146
— M
180 184
154 156

Abreviaturas

6-FAM: 6-carboxifluoresceina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AE: actividad específica

ALA: Ácido δ-amino levulínico

ALA-D: Ácido δ-amino levulínico dehidrasa

ALA-S: Ácido δ-amino levulínico sintetasa

ARN: Ácido ribonucléico

ARNm: Ácido ribonucléico mensajero

BFS: buffer fosfato de sodio

BSA: seroalbúmina bovina

CAT: catalasa

CβS: cistationina β sintetasa

cM: centimorgan

Coprogen I: Coproporfirinógeno I

Coprogen III: Coproporfirinógeno III

CPGasa: Coproporfirinógeno oxidasa

CPH: Coproporfiria Hereditaria

dNTP: Desoxirribonulcéotido trifosfato

DOVA: ácido 4,5 dioxovalérico

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DTT: ditiotreitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESEs: Enhancers exónicos de splicing

FAD: Flavín-adenín dinucleótido

GPX: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

HMB: Hidroximetilbilano

HMB-S: Hidroximetilbilano sintetasa

HPLC: cromatografía líquida de alta performance

kb: kilobases

kDa: kiloDalton

LB: medio Luria-Bertani

Mb: megabases

MDA: malondialdehido

MMLV-RT: Retrotranscriptasa del virus moloney de leucemia murina

NPA: Nueva Porfiria Aguda

PAI: Porfiria Aguda Intermitente

pb: pares de bases

PBG: Porfobilinógeno

PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D)

PBG-S: Porfobilinógeno sintetasa

PCE: Porfiria Congénita Eritropoyética

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCT: Porfiria Cutánea Tarda

PHA: Porfiria Hepática Aguda

PHE: Porfiria Hepatoeritropoyética

PM: Peso Molecular

PPE: Protoporfiria Eritropoyética

PPOX: Protoporfirinógeno oxidasa

Proto IX: Protoporfirina IX

Protogen IX: Protoporfirinógeno IX

PV: Porfiria Variegata

ROS: especies reactivas del oxígeno

RT: Retrotranscripción

RT-PCR

SBD-F: 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato de amonio

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

SOD: superóxido dismutasa

SR: proteína rica en arginina de familia de factores de splicing

STR: short tandem repeat (marcador microsatélite)

TCA: ácido tricloroacético

TCEP: tris (2-carboxietil) fosfina

U1 snRNA: ARN nuclear pequeño U1

UE: unidad enzimática

URO-D: Uroporfirinógeno III decarboxilasa

Urogen I: Uroporfirinógeno I

UROgen III sinetatsa: Uroporfirinógeno III sintetasa (Isomerasa)

Urogen III: Uroporfirinógeno III

WT: wild type

XLP: protoporfiria ligada al cromosoma X