

Estudio cromatográfico de la porfiria cutánea tarda, saturnismo crónico e intoxicación aguda por plomo

J. Hueso^a, J. Rico, B. Suquia, D. Pérez-Sandoval, A. Juanes, C. López-Arias

Resumen

Realizamos el estudio mediante cromatografía en capa fina de las porfirinas en orina de enfermos con porfiria cutánea tarda, saturnismo crónico y en conejos a los que se provocó una intoxicación aguda experimental por plomo. En la porfiria cutánea tarda encontramos un gran aumento de las porfirinas con 8 y 7 grupos carboxilos por inhibición de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa con un índice urinario de porfiria cutánea tarda muy próximo a uno. En los enfermos con saturnismo crónico y en los conejos con intoxicación aguda por plomo encontramos resultados similares con un gran aumento de las coproporfirinas y cantidades normales de otras porfirinas incluyendo las uroporfirinas.

Summary

We have studied the urine porphyrins from human patients with porphyria cutanea tarda and chronic lead intoxication by thin-layer chromatography. The same study was carried out in rabbits with experimental acute lead intoxication. An increase in the content of porphyrins with 8 or 7 carboxylic groups was found in the porphyria cutanea tarda; this increase was produced by an inhibition of the uroporphyrinogen decarboxylase enzyme. In parallel, we have also found a porphyria cutanea tarda urinary index close to one. Similar results have been found when human patients with chronic lead intoxication and acute lead rabbits were studied. These results were accompanied by an increase in the coproporphyrin content and normal values for the other porphyrins including uroporphyrins.

Introducción

La porfiria cutánea tarda y la intoxicación por plomo o saturnismo, son dos entidades que afectan de forma muy específica la biosíntesis del hemo y por tanto alteran el metabolismo de las porfirinas.

La porfiria cutánea tarda es la porfiria más frecuente en España. El defecto enzimático característico de esta entidad es una disminución de la actividad de la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa^{1,2}, enzima que transforma los uroporfirinógenos con ocho grupos carboxilos hasta coproporfirinógenos con cuatro grupos carboxilos, pasando sucesivamente por porfirinógenos con siete, seis y cinco grupos carboxilos.

La orina de los enfermos con porfiria cutánea tarda es de color rojo oscuro intenso, con eliminación de grandes cantidades de uroporfirinas de la serie isomérica I, junto a hepta y hexa-carboxil porfirinas de la serie iso-

^aServicio Técnicas especiales, Departamento de Análisis Clínicos, Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Tabla I
Valores medios de la fracción de sustancia de los derivados carboxílicos en orina, obtenidos por cromatografía en capa fina.

Derivados Carboxílicos	8-COOH $R_f=0,19$	7-COOH $R_f=0,26$	6-COOH $R_f=0,40$	5-COOH $R_f=0,50$	4-COOH $R_f=0,61$	Total	IuPCT
Intoxicación aguda por Pb en conejos $n=13$	$\bar{x}=0,037$ $s=0,025$	$\bar{x}=0,035$ $s=0,011$	$\bar{x}=0,030$ $s=0,017$	$\bar{x}=0,076$ $s=0,049$	$\bar{x}=0,82$ $s=0,083$	1,00	$\bar{x}=0,04$ $s=0,014$
Intoxicación crónica por Pb en humanos. $n=8$	$\bar{x}=0,053$ $s=0,015$	$\bar{x}=0,033$ $s=0,015$	$\bar{x}=0,032$ $s=0,021$	$\bar{x}=0,052$ $s=0,019$	$\bar{x}=0,82$ $s=0,055$	1,00	$\bar{x}=0,043$ $s=0,022$
Porfiria cutánea Tarda en humanos $n=23$	$\bar{x}=0,39$ $s=0,011$	$\bar{x}=0,36$ $s=0,068$	$\bar{x}=0,084$ $s=0,045$	$\bar{x}=0,078$ $s=0,039$	$\bar{x}=0,078$ $s=0,049$	1,00	$\bar{x}=0,82$ $s=0,01$

8-COOH=uroporfinas
 4-COOH=coproporfinas
 IUPCT=Índice urinario de porfiria cutánea tarda

mérica I, junto a hepta y hexa-carboxil porfirinas de la serie isomérica III y cantidades menores de penta y coproporfinas de las series I y III^{3,4}.

Estas porfirinas aumentadas pueden ser determinadas mediante cromatografía en capa fina, pudiéndose establecer un aumento del índice heptaporfirinas/uroporfinas en la orina, característico de la enfermedad^{5,6}.

Los efectos del plomo sobre el metabolismo del hemo son muy variados. Se conoce bien la inhibición producida sobre dos enzimas: porfobilinógeno sintasa y ferroquelatasa^{7,8,9,10}. Analíticamente se caracteriza por un gran aumento de 5-aminolevulinato y coproporfinas en la orina y porfirinas eritrocitarias libres en sangre^{11,12,13}. La concentración de uroporfinas y de porfobilinógeno en orina suele ser la fisiológica aunque se ha descrito su elevación en algún caso aislado^{14,15}.

Material y métodos

Se realizó un estudio de cromatografía en capa fina en gel de sílice, en la orina de tres grupos: 23 enfermos con porfiria cutánea tarda, 8 personas con intoxicación crónica por plomo y en 13 conejos a los que provocamos una intoxicación aguda por plomo mediante la inyección intraperitoneal de 482 μmol por kg de masa corporal, de plomo en forma de acetato de plomo.

La separación cromatográfica de las porfirinas en orina la realizamos según el método de Pinelli y Gaspari¹⁶, que se basa en la adsorción de las porfirinas con talco y la posterior metilación. Los ésteres metílicos se extraen con cloroformo que se elimina por evaporación a vacío. Redisuelto el residuo seco se realiza la separación cromatográfica en capa fina.

La cuantificación de las diferentes fracciones de porfirinas obtenidas en la separación cromatográfica la realizamos por una aplicación del micrométodo espectrofluorimétrico de Piomelli¹⁷ para porfirinas en sangre.

Resultados

Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla I, expresados en fracción de masa del total de porfirinas

encontradas. Puede verse en la porfiria cutánea tarda el predominio de los derivados con 8 y 7 grupos carboxilos y fracciones de sustancias muy pequeñas de las porfirinas con 6,5 y 4 grupos carboxilos.

Tanto en la intoxicación crónica por plomo en humanos como en la intoxicación aguda provocada en conejos prácticamente todas las porfirinas corresponden a las coproporfinas (cuatro grupos carboxilos).

En la Figura 1 están representados los diferentes grupos de porfirinas encontradas expresadas en fracción de sustancia, en forma de diagrama.

El índice urinario de porfiria cutánea tarda (IUPCT) expresa la relación entre la fracción de sustancias de porfirinas con 7 grupos carboxilos y las porfirinas con 4 grupos carboxilos.

Discusión

En la orina de los enfermos con porfiria cutánea tarda estudiados, hemos encontrado unos resultados muy similares a los de otros estudios con un predominio de los derivados con 8 y 7 grupos carboxilos. Por disminución de la actividad de la enzima uroporfinógeno descarboxilasa y una disminución de los derivados con 4 grupos carboxilos (coproporfinas).

El IUPCT fue similar al encontrado por Pérez-Sandoval y col.⁶. El patrón cromatográfico de los derivados porfirínicos, que señala la inhibición de la uroporfinógeno descarboxilasa es similar al encontrado por Benedetto y col.¹⁸ y al encontrado por Kushner y col.¹⁹, con una fracción muy similar de porfirinas con 8 y 7 grupos carboxilos. Ríos de Molina y col.²⁰, en eritrocitos de enfermos con porfiria cutánea tarda encontraron idénticos resultados.

San Martín y col.^{21,22} y Enríquez de Salamanca y col.²³, en ratas a las que provocaba una porfiria cutánea tarda con hexaclorobenceno, encontraron aumento de las porfirinas con 8 y 7 grupos COOH, pero con un predominio total de las primeras y menos fracción de las segundas, que intentan explicar por una producción no enzimática de derivados con 8 grupos COOH por condensación in vitro a partir de porfobilinógeno.

En contraste con lo observado en la porfiria cutánea

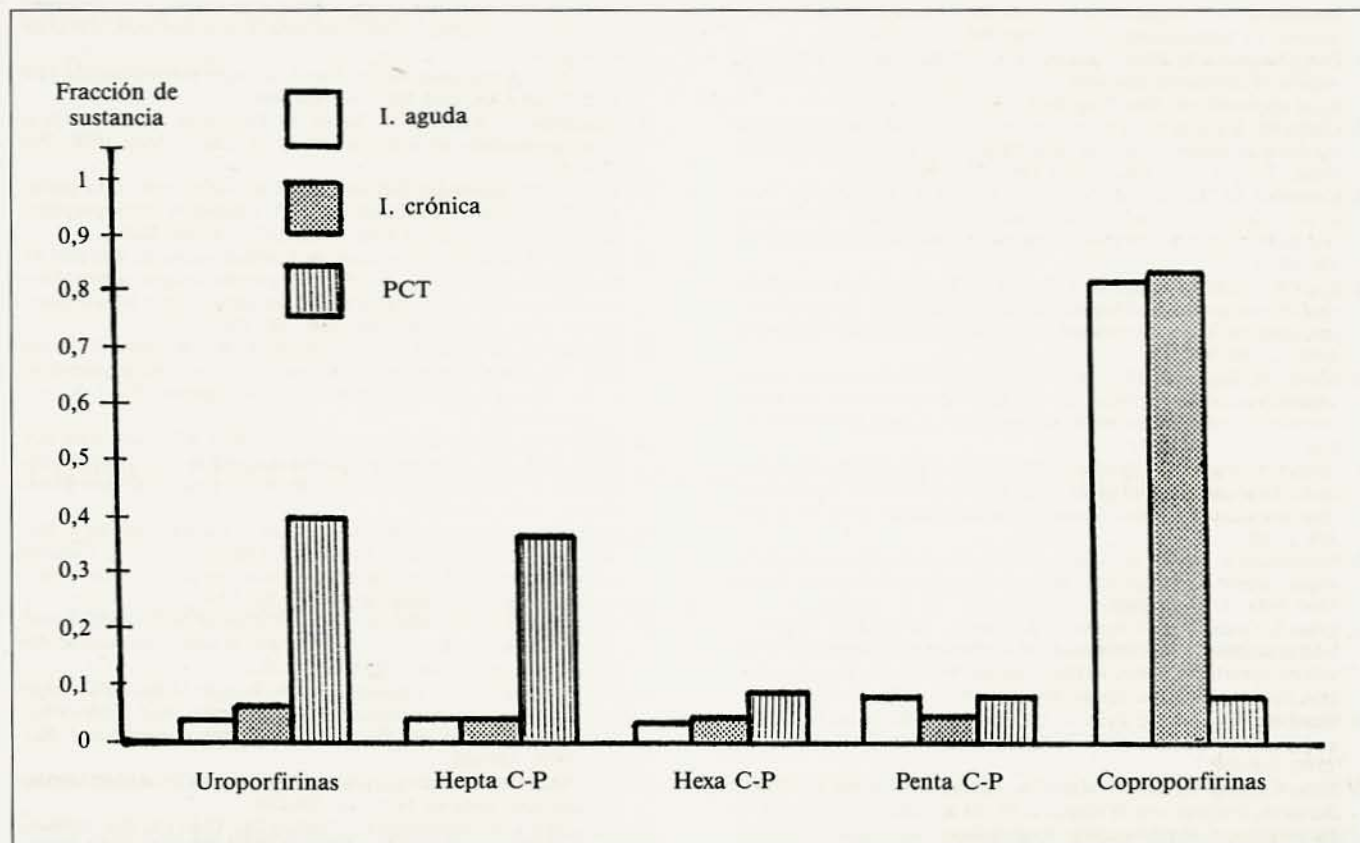


Figura 1. Porfirinas encontradas en la orina de pacientes con intoxicación crónica por plomo (I. Crónica) y porfiria cutánea tarda (PCT) y de conejos con intoxicación aguda experimental por plomo (I. Aguda), mediante cromatografía en capa fina, expresado en fracción de sustancia. Hepta-C-P = heptacarboxilporfirinas; Hexa-C-P = hexacarboxilporfirinas; Penta C-P = pentacarboxilporfirinas.

tarda, en la orina de los conejos con intoxicación aguda por plomo la fracción de sustancia mayor corresponde a las porfirinas con 4 grupos carboxilos y en menor proporción a las de 5 grupos COOH. El IUPCT es muy bajo como corresponde al predominio de las coproporfirinas sobre las hepta carboxilporfirinas. San Martín y col.^{24,25}, estudian las porfirinas de conejos con intoxicación aguda por plomo, encontrando resultados similares a los recogidos en nuestro trabajo. Los anteriores autores encuentran una mayor fracción de porfirinas con 6 grupos COOH que con 5-COOH, que según ellos y de acuerdo con Doss²⁶, podría estar producido por un efecto inhibitorio que el exceso de protoporfirina IX acumulada en las células produciría sobre la actividad enzimática, actuando como una inhibición por producto final sobre la coproporfirinógeno oxidasa y otras enzimas del metabolismo del hemo.

No hemos encontrado aumento de las uroporfirinas (8 grupos COOH) en la orina de los conejos con intoxicación aguda por plomo igual que tampoco lo encontraron otros autores^{24,25}. Sin embargo, Simo Canonge y col.¹⁵ y Piomelli²⁷, encontraron las concentraciones de uroporfirinas en orina aumentadas en humanos con intoxicación aguda por plomo.

En resumen, en la intoxicación aguda por plomo en el conejo, según lo observado en las cromatografías en capa fina realizadas en orina, existe un aumento de las coproporfirinas por inhibición de la ferroquelatasa y coproporfirinógeno oxidasa. No hay aumento de las uroporfirinas que reflejaría la inhibición de la enzima uro-

porfirinógeno descarboxilasa que nosotros no hemos encontrado.

En los enfermos con saturnismo crónico encontramos unos resultados prácticamente equivalentes en su significado bioquímico a los de los conejos con intoxicación aguda por plomo. De todas formas no hemos encontrado ningún estudio similar en la bibliografía consultada.

Se observó un predominio completo de las coproporfirinas (porfirinas con 4 grupos carboxilos) y en menor grado de las de 5 grupos COOH, como se vio en la intoxicación aguda²⁴.

El IUPCT fue asimismo muy bajo. No se encontró aumento de las uroporfirinas en orina en el estudio mediante cromatografía en capa fina de las diferentes porfirinas, de igual forma que tampoco la vieron otros autores en la intoxicación aguda^{24,25}.

Bibliografía

1. Felsher BF, Norris ME, Shin JC. Red-cell uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda and in other forms of porphyria. *N Engl J Med* 1978; 299: 1095-1098.
2. Kushner JP, Barbuto AJ, Lee GR. An inherited enzymatic defect in Porphyria cutanea tarda. *J Clin Invest* 1976; 58: 1089-1097.
3. Enríquez de Salamanca R, Peña Payero ML, Olmos Andres A, Jiménez Sánchez FJ, Catalán MT. Índice característico de la excreción urinaria de porfirinas en la porfiria cutánea tarda. *Biométrica* 1979; 4: 29-34.
4. Thomas Hindmarsh J. The Porphyrias: Recent advances. *Clin Chem* 1986; 32: 1255-1263.
5. Alleman MA, Wilson JHP, Van del Berg JWD. Familial porphyria

- cutanea tarda: The pattern of porphyrins formed from porphobilinogen by hemolysates. *Clin Chem* 1982; 28: 1114-1147.
6. Pérez-Sandoval D, Rico J, Juanes A. Contributions to the determination of carboxylic fractions in urinary porphyrins and some clinical applications. *Rev Diag Biol* 1982; 31: 165-171.
 7. Chiba M, Kikuchi M. The in vitro effects of zinc and manganese on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibited by lead ortin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 388-394.
 8. Kajimoto M, Kondo M, Miwa M, Suzuki T, Kimura H, Sasaki A, Urata G. Increase of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in rat erythrocytes in lead poisoning. *Arch Toxicol* 1983; 52: 1-11.
 9. Koga N, Hirai Y, Hasegawa T, Tomokuni K. Studies on the inhibition of erythrocyte and hepatic delta-aminolevulinic acid dehydratase activities and its restoration in mice exposed to lead. *Ind Health* 1984; 22: 83-90.
 10. Kondo M, Kajimoto M, Urata G. Alteration of activities of delta-aminolevulinic acid dehydratase and delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibitor in the bone marrow cells of lead poisoned rats. *Exp Hematol* 1983; 11: 324-331.
 11. Haeger-Aronsen B. Studies on urinary excretion of delta-aminolevulinic acid and other haem precursors in lead workers and lead-intoxicated rabbits. *Scand J Clin Lab Invest* 1960; 12 (suppl 47): 1-128.
 12. Nordmann Y, Devars du Mayne JF. Depistage du saturnisme chronique. Interet du dosage de la protoporphyrine erithrocytaire. *Presse Med* 1984; 13: 2137-2141.
 13. Sassa S, Granick JL, Granick S, Kappas A, Levere RD. Studies in lead poisoning. I. Microanalysis of erythrocyte Protoporphyrin levels by spectrofluometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range. *Biochem Med* 1973; 8: 135-148.
 14. Hernberg S. Lead. En: Zenc C. *Occupational Medicine. Principles and practical applications*. Chicago: year book medical publishers, 1975; 715-769.
 15. Simo Canonge R, Martin Ripoll S, Almirante Grajera B, Pahissa Berga A, Figuera von Wichmann M. de la. Tres nuevos casos de saturnismo. Consideraciones diagnósticas. *Med Clin* 1984; 82: 472-473.
 16. Pinelli A, Gaspari R. A new precise and sensitive method for the assay of urine porphyrins using combined thin-layer chromatography and spectrophotofluorimetric analysis. *Clin Chem Acta* 1972; 39: 135-142.
 17. Piomelli S. A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J Lab Clin Med* 1973; 81: 932-940.
 18. Benedetto AV, Kushner JP, Taylor JS. Porphyria cutanea tarda in three generations of a single family. *N Engl J Med* 1978; 298: 358-362.
 19. Kushner JP, Steimuller DP, Lee GR. The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. II. Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase. *J Clin Invest* 1975; 56: 661-667.
 20. Rios de Molina MC, Wainstok de Calmanovicini R, Gristein M, San Martin de Viale LC. Erythrocyte porphyrinogen carboxi-lyase activity in porphyria cutanea tarda and certain other human porphyrias. *Clin Chim Acta* 1980; 108: 447-456.
 21. San Martin de Viale LC, Rios de Molina MC, Wainstok R, Tomio JM. Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. I. En: Doss M, dir. *Porphyrins in human disease*. Basel: Karger, 1976: 445-452.
 22. San Martin de Viale LC, Tomio JM, Ferramola AM, Sankovich HA, Tigier HA. Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. II. En: Doss M, dir. *Porphyrins in human disease*. Basel: Karger, 1976: 453-458.
 23. Enríquez de Salamanca R, Mas Andrés V, Catalán Beltrán T, Molina Ferragut C, Chinarro Familiar S, Olmos Andrés A. Estudios sobre inducción de porfiria experimental por hexachlorobenceno a ratas. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1982; 61: 1-14.
 24. San Martin LC, De Calmanovicini RW, Rios de Molina MC, Grinstein M. Studies on porphyrin biosynthesis in lead—intoxicated rabbits. *Clin Chim Acta* 1976; 69: 375-382.
 25. San Martin LC, De Calmanovicini RW, Rios de Molina MC, Grinstein M. Porphyrin metabolism in experimental lead intoxication. Karger En: Doss M, dir. *Porphyrins in human disease*. Basel: Karger, 1976: 389-401.
 26. Doss M. Effect of protoporphyrin on porphyrin formation in avian hepatocytes. *Enzyme* 1973; 16: 231-236.
 27. Piomelli S. Lead poisoning. En: Nathan DG, Oski FA, dirs. *Hematology of infancy and childhood*. 2ª ed. Philadelphia: Saunders, 1981: 392-418.