

LA HERENCIA Y LA TOXICIDAD INTERACCIONAN EN LAS PORFIRIAS

Palabras clave: porfirias, camino metabólico del hemo, porfirinogenicidad, modelos experimentales.
Key words: porphyrin, heme metabolic pathway, porphyria, porphyrinogenicity experimental models.

Las porfirinas están compuestas por un anillo tetrapirrólico y son conservadas en los seres vivos. Están presentes en la clorofila y el hemo. El camino de síntesis del hemo involucra ocho enzimas. Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas, principalmente hereditarias, en las que hay fallas en la síntesis de hemo. Pueden clasificarse en hepáticas o eritropoyéticas; agudas o crónicas. Las agudas son susceptibles al desencadenamiento y exacerbación por drogas. La capacidad de una droga para precipitar la enfermedad, esto es, su porfirinogenicidad, depende principalmente de su capacidad para aumentar la actividad de la primera enzima del camino de biosíntesis del hemo, al inhibir su control fisiológico por retroalimentación negativa, por reducción del pool de hemo regulatorio. El citocromo P450 es importante tanto en la metabolización de drogas prescritas, como de xenobióticos tóxicos. Se describen propiedades químicas y mecanismo de acción de estas drogas: hidrofobicidad, capacidad de inducir o destruir al citocromo P450 y capacidad de unirse a receptores nucleares que median la inducción de la transcripción del gen de la 5-aminolevulínico sintasa. Respecto a las porfirias experimentales, se reseñan cinco grupos de drogas que modelan en animales, porfirias humanas y se describen sus mecanismos de toxicidad. El primero comprende aquellas drogas que inactivan al citocromo P450; el segundo, sustancias que son potentes inductores multifuncionales; el tercero, drogas que inhiben a la uroporfirinógeno descarboxilasa; el cuarto, inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa y el quinto, metales pesados que inhiben metaloenzimas. Las porfirias experimentales permiten el estudio de estas enfermedades y el desarrollo de tratamientos más efectivos.

Porphyrins are conserved tetrapyrroles in living organisms. They are present in chlorophyll and heme. The metabolic heme synthesis pathway involves eight enzymes. The porphyrias are a group of mainly inherited metabolic diseases in which there are alterations on the heme synthesis pathway. They can be classified as hepatic or erythropoietic; acute or chronic. Acute porphyrias are susceptible to acute onset and exacerbation by drugs. The ability of a drug to precipitate the disease, that is, its porphyrinogenicity, depends primarily on its ability to increase 5-aminolevulinic acid synthase activity, the first enzyme of the heme biosynthetic pathway by inhibition of their physiological negative feedback control by reducing the pool of regulatory heme. The cytochrome P450 is important in the metabolism of prescription drugs, as toxic xenobiotics. Chemical properties and mechanism of action of these drugs are described: hydrophobicity, ability to induce or destroy the cytochrome P450 and ability to bind to nuclear receptors that mediate the induction of gene transcription of 5-aminolevulinic acid synthase. About the animal models for human porphyrias, five groups of drugs and their mechanisms of toxicity are reported. The first includes those drugs that inactivate cytochrome P450; second, substances that are potent multifunctional inducers; third, uroporphyrinogen decarboxylase inhibitors; fourth, protoporphyrinogen oxidase inducers, and fifth, heavy metals that are metalloenzymes inhibitors. The experimental porphyrias permit the study of these diseases, allowing the development of more effective treatments.

■ ¿QUÉ SON LAS PORFIRINAS?

Las porfirinas son tetrapirroles, macrociclos que consisten en cua-

tro anillos pirrólicos, unidos a su vez por cuatro puentes meteno (Figura 1), que se clasifican químicamente según la naturaleza y ordenamiento

de sus cadenas laterales. Estos compuestos reúnen ciertas propiedades físicas, químicas y biológicas que les conceden una gran importancia

María Florencia D'Andrea y Marta Blanca Mazzetti*

*Laboratorio de Disturbios Metabólicos por Xenobióticos, Salud Humana y Medio Ambiente, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pab. II, 4to Piso, C1428EGA Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Fax: +54 11 4576 3342.

mazzetti@qb.fcen.uba.ar

en el funcionamiento de los seres vivos. Son precursores del hemo en el reino animal y de la clorofila en el reino vegetal (Nordmann y Puy, 2002, Bonkovsky et al., 2013), por lo que son metabolitos clave en los procesos de respiración y fotosíntesis, respectivamente. Como moléculas, se caracterizan por ser conjugadas, cíclicas, aromáticas, poseer alta estabilidad y características fotofísicas particulares. (Mauzerall, 1998).

El nombre particular que recibe la porfirina depende de los distintos tipos de sustituyentes que la conforman. Por ejemplo si la molécula posee ocho sustituyentes de dos clases diferentes, como cuatro ácidos acéticos y cuatro grupos propiónicos, se llama a dicha conformación uroporfirina. Estas cadenas laterales pueden encontrarse en cuatro combinaciones posibles, alrededor de la periferia de la molécula, que se denotan para este ejemplo utilizando

los números romanos del I-IV.

Las porfirinas forman complejos con átomos metálicos como el hierro o el magnesio que influyen en la actividad biológica de los mismos, que se denominan metaloporfirinas. Las propiedades catalíticas inherentes a los metales de transición, debido a sus orbitales parcialmente llenos, se ven potenciadas cuando son quelados por las porfirinas o sus derivados (Mauzerall, 1998). De esta manera se generan pequeñas variaciones en la estructura básica del tetrapirrol que conforma la molécula, así como cambios en las cadenas sustituyentes, permitiendo gran diversidad de reacciones bioquímicas esenciales, en las que intervienen.

Dentro de las metaloporfirinas, el hemo o ferroprotoporfirina IX (Figura 2) es estructuralmente un compuesto formado por un átomo de hierro coordinado al anillo tetrapirrólico de la protoporfirina IX. Ésta molécula forma parte de la hemoglobina, permitiendo la unión reversible de oxígeno con sus grupos hemo, logrando así suministrar el O_2 necesario a los diferentes tejidos y órganos alrededor del cuerpo. La estructura proteica alrededor de los grupos hemo genera un ambiente particular que permite que se lleve a cabo la reacción que cataliza.

Otras metaloporfirinas de relevancia biológica se encuentran en los organismos fotosintetizadores. La molécula de clorofila posee magnesio como especie metálica unida a la estructura de la porfirina. La función que cumple la molécula en este caso es la de capturar protones de luz en el UV cercano (400 nm) y la región roja del espectro visible (650-700 nm). Para la cobalamina o coenzima de la vitamina B_{12} , la unión de la porfirina precursora se da con cobalto, el cual facilita la reducción de especies orgánicas en reacciones

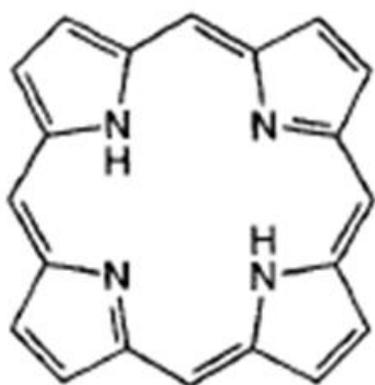


Figura 1. Macro ciclo no sustituido de la molécula de porfirina. Se observan los cuatro anillos pirrólicos en los vértices de la estructura.

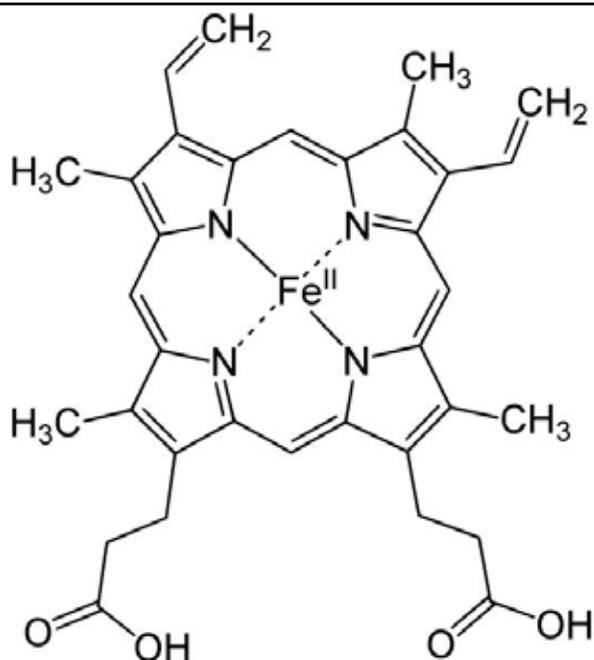


Figura 2. Estructura de la molécula de hemo.

que involucran la transferencia de átomos de hidrógeno.

El camino biosintético de las porfirinas es probablemente el camino metabólico más conservado. Con excepción de la síntesis del intermediario ácido 5-aminolevulínico (ALA), los otros pasos son semejantes tanto en bacterias primitivas como humanos (Mauzerall, 1998). Las metaloporfirinas clorofila, cobalamina y el hemo, tienen como precursor biosintético común a uroporfirinógeno III (Uro'gen III) (Figura

3), diferenciándose recién posteriormente los caminos de sus síntesis.

El alto grado de conservación de las porfirinas refleja la importancia de su ruta metabólica en los sistemas biológicos, considerándose a estas moléculas junto con la bicapa lipídica, las proteínas y los ácidos nucleicos como componentes clave de los seres vivos.

■ EL GRUPO HEMO

El hemo es una molécula esen-

cial para la función de todas las células aeróbicas. Ésta sirve de grupo prostético de varias hemoproteínas que juegan un papel fundamental en funciones biológicas vitales como ser unión de oxígeno (hemoglobina, mioglobina), transferencia de electrones (citocromos) y metabolismo del oxígeno (catalasas, peroxidasas y oxidasas); siendo también grupo prostético de enzimas que intervienen en la producción de moléculas señal tales como GMP cíclico (guanilato ciclasa), hormonas esteroideas (hidroxilasas) y óxido nítrico (óxido

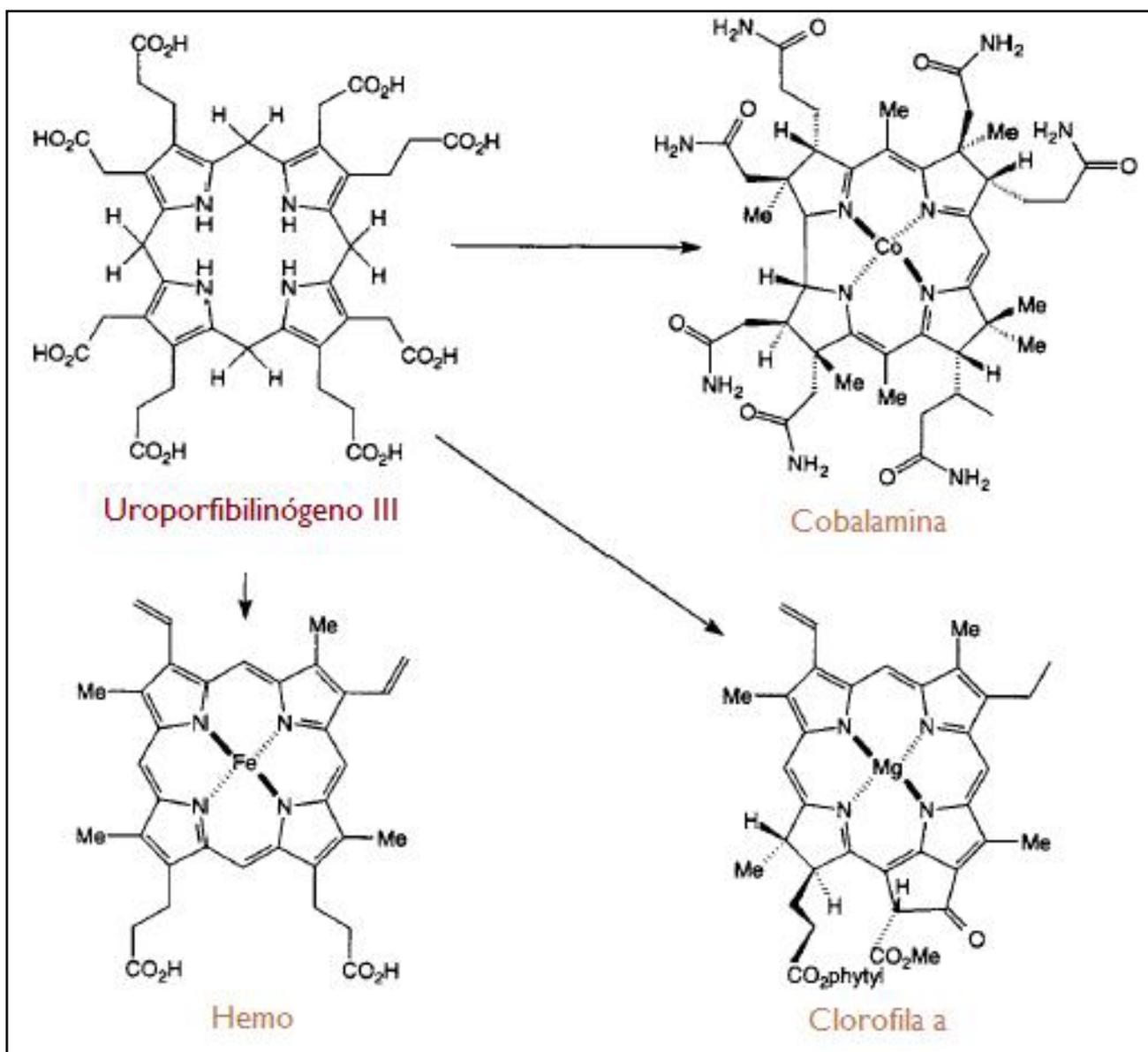


Figura 3. Relación entre la clorofila a, la amida cobirínica que conforma la vitamina B12, y el hemo. Todas estas moléculas comparten en sus rutas de síntesis el precursor biosintético Uro'gen III.

nítrico sintasa); así como controla la expresión de numerosas proteínas (globina, enzimas de la ruta metabólica del hemo, mieloperoxidasa, hemo oxigenasa-1 y receptor de transferrina) (Tsifsoglou et al., 2006).

Las propiedades únicas del hemo le permiten actuar tanto como transportador de electrones y catalizador de reacciones redox. Si bien el Fe^{2+} se une a oxígeno, no se produce su oxidación. La combinación entre el ligando de la porfirina y el ambiente proteico cambia el potencial redox del hierro y detiene la formación de un complejo con el agua, inhibiendo la oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+} .

El hemo se oxida a hemina *in vitro* teniendo una carga positiva residual y por lo general se aísla como cloruro. Se transforma en hematina cuando al ser disuelto en solución alcalina se adiciona un radical hidroxilo, eventualmente transformándose en hemo en la célula (Figura 4) (Sassa y Nagai, 1996; Tsiftoglou et al. 2006).

■ SÍNTESIS DEL HEMO

La biosíntesis del hemo (Figura 5) puede dividirse en cuatro procesos: i) formación del pirrol, ii) ensambla-

do del tetrapirrol, iii) modificación de las cadenas laterales del tetrapirrol, iv) oxidación del protoporfirinógeno (Proto'gen) IX a protoporfirina IX e inserción del hierro.

La síntesis de hemo involucra ocho enzimas, cuatro de las cuales son citoplasmáticas y cuatro mitocondriales. El primer paso ocurre en la mitocondria e involucra la condensación de los metabolitos succinil-CoA y el aminoácido hidrofílico glicina para formar ALA, reacción catalizada por la enzima ALA-sintasa (ALA-S). La enzima citosólica 5-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) convierte a continuación, dos moléculas de ALA en el monopirrol porfobilinógeno (PBG).

Las enzimas de los dos pasos siguientes se encargan de transformar cuatro moléculas de PBG en el tetrapirrol cíclico Uro'gen III, el cual es posteriormente descarboxilado de sus cuatro grupos acetato de las cadenas laterales permitiendo la formación de coproporfirinógeno (Copro'gen) III, menos soluble que sus precursores .

Las siguientes dos descarboxilaciones hacia grupos metilo ocurren en la mitocondria por acción de

la Copro'gen III oxidasa, siendo el Proto'gen producido posteriormente oxidado a protoporfirina debido a la remoción de átomos de hidrógeno gracias a la actividad de la enzima proto'gen III oxidasa. La inserción de un catión de hierro en la protoporfirina IX, se realiza por la acción de la enzima ferroquelatasa.

■ DEGRADACIÓN DEL HEMO Y METABOLISMO DEL HIERRO

Todas las células, salvo los eritrocitos maduros y tal vez otras células altamente diferenciadas, pueden degradar hemo.

El hemo se cataboliza a bilirrubina a través de la acción de las enzimas microsomales hemo oxigenasa (HO) y biliverdina reductasa. Si bien ha sido descrita la degradación no enzimática del hemo *in vivo*, no se considera que esta sea la principal vía de degradación (Wu y Wang, 2005).

La enzima HO abre el anillo del hemo permitiendo, mediante liberación de CO y hierro, la formación del pigmento biliverdina, que absorbe a las longitudes de onda correspondientes al verde. La biliverdina es luego reducida al pigmento ama-

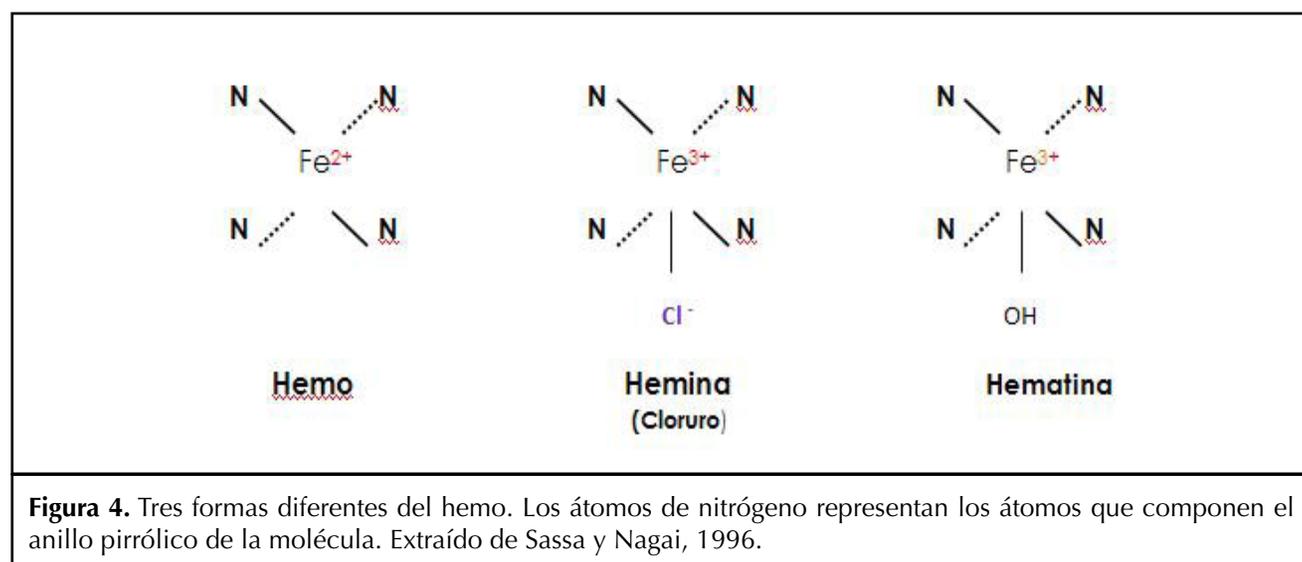


Figura 4. Tres formas diferentes del hemo. Los átomos de nitrógeno representan los átomos que componen el anillo pirrólico de la molécula. Extraído de Sassa y Nagai, 1996.

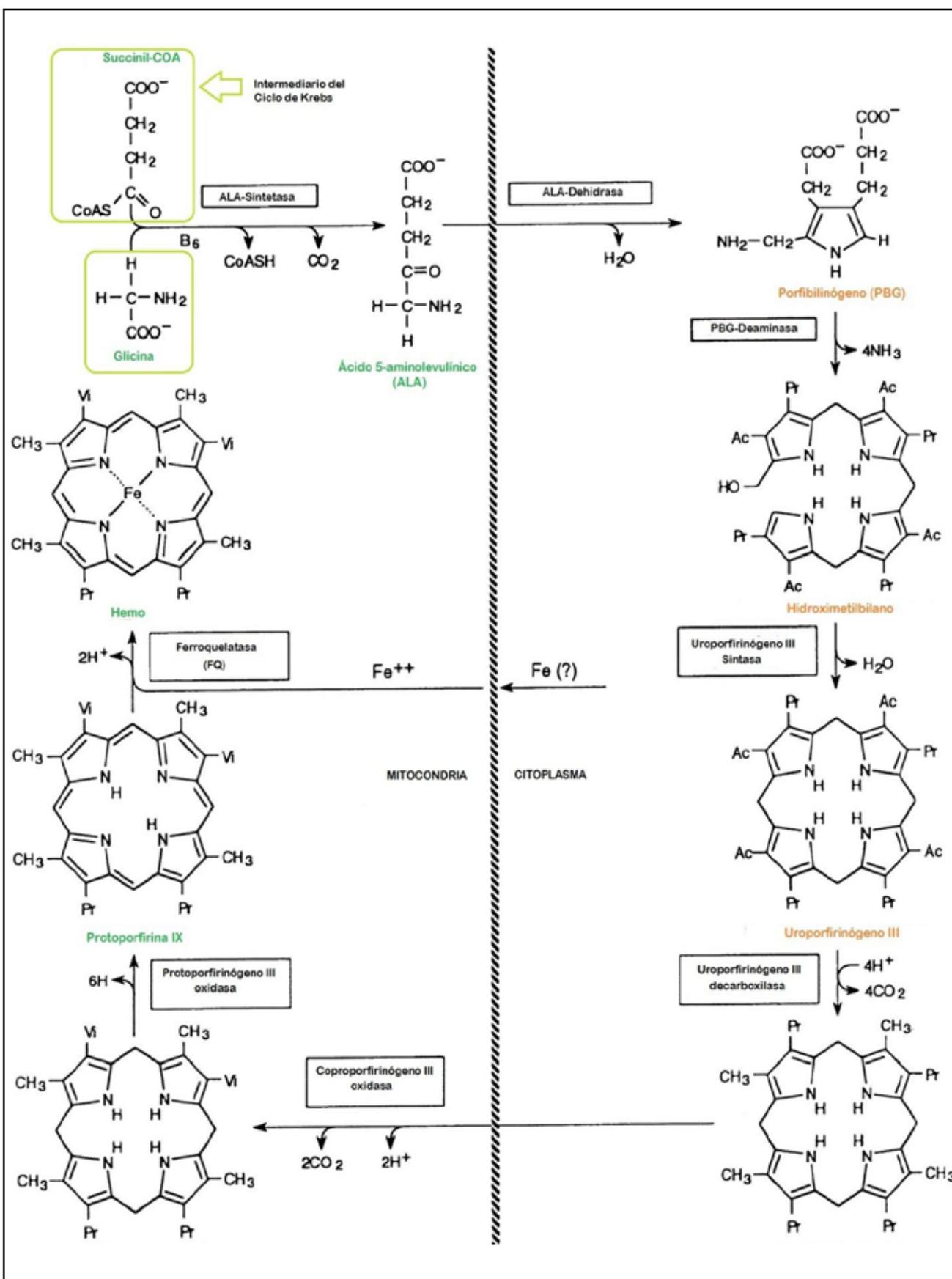
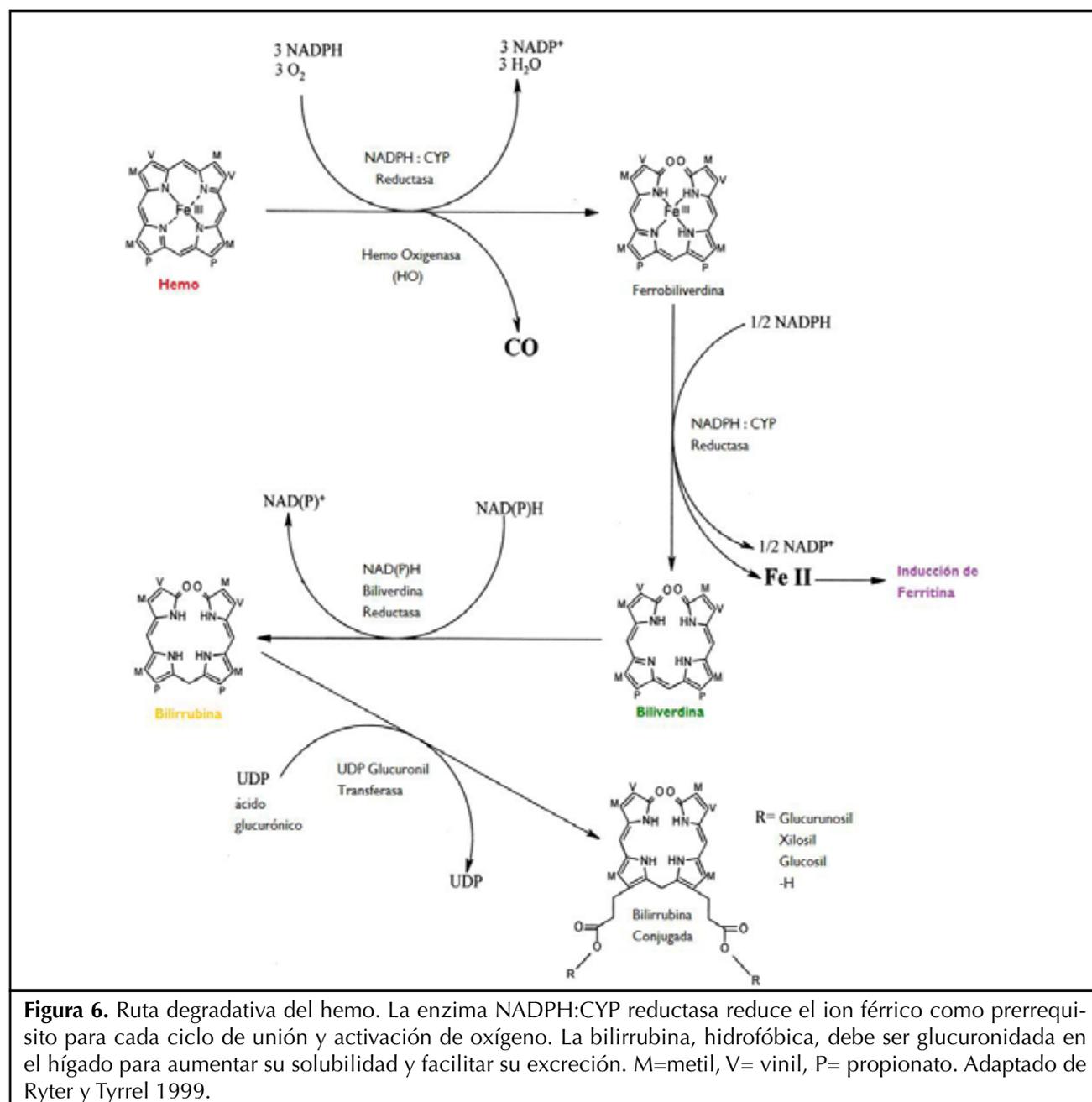


Figura 5. Ruta biosintética del hemo conformada por ocho enzimas de localización citoplasmática y mitocondrial. Modificado de Ponka et al., 1997.



rillo bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa (Figura 6).

El catabolismo del hemo produce la liberación de hierro, el cual, siendo un oxidante, estimula la síntesis de la proteína ferritina. La misma actúa a su vez como un repositorio de hierro intracelular, secuestrando el hierro libre (Wu y Wang, 2005), que es tóxico para la célula ya que actúa en la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS) a través de la reacción de Fenton.

■ LOCALIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL HEMO

En mamíferos, alrededor del 80% del hemo total producido es sintetizado en células eritroides inmaduras de la médula ósea y eventualmente incorporado a la hemoglobina (Norman y Puy, 2002). El hemo remanente es sintetizado predominantemente en el hígado en células nucleadas como el hepatocito, donde es incorporado a hemoproteínas, en particular al citocromo P450 (CYP)

(Podvinec et al., 2004; Hift et al., 2011), representando el 15% del total de hemo producido por el organismo (Sassa y Nagai, 1996; Norman y Puy, 2002). El 5% restante se sintetizaría en el riñón y otros tejidos (Puy et al., 2010).

A su vez, en el hígado de una rata adulta, cerca del 65% del hemo que se produce se utiliza para la formación de CYP en microsomas, 15% para síntesis de catalasa en los peroxisomas, 6% para la formación

de los citocromos mitocondriales y 8% para la formación del citocromo b₅ (Sassa y Nagai, 1996).

La velocidad de síntesis de hemo en las células eritroides en desarrollo supera en un orden de magnitud al hemo sintetizado en el hígado. Esto se debe a que si bien la mayor cantidad de hemo se sintetiza en los eritrocitos inmaduros, el número total de estos es considerablemente menor al de hepatocitos.

El hemo extracelular ingresa a la célula a través de transportadores de hemo (Wu y Wang, 2005). Siendo el hemo un quelante hidrófobo de bajo peso molecular, altas concentraciones de hemo libre en la célula podrían catalizar reacciones de oxidación dependientes de hierro generando EROS, peroxidación lipídica y disrupción de las membranas (Ryter y Tyrrell, 1999; Wu y Wang, 2005).

■ REGULACIÓN DE LA ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO SINTETASA (ALA-S).

La enzima **ALA-S** es un homodímero que reside en la matriz de la membrana mitocondrial interna y presenta una alta especificidad por la glicina como sustrato. El segundo sustrato, succinil-CoA, es un intermediario del ciclo de Krebs y provee la mayor fuente de energía para la ruta biosintética del hemo. La reacción requiere de piridoxal 5-fosfato como cofactor.

ALA-S presenta dos isoenzimas, la eritroide (ALA-S E o ALA-S 2) y la no específica o constitutiva (ALA-S N, también conocida como ALA-S1), que se expresa ubicuamente (Sassa y Nagai, 1996; Ponka, 1997). Éstas son sintetizadas a partir de genes diferentes, mapeados en el brazo corto del cromosoma 3 y el cromosoma X respectivamente (Puy et al., 2010). La expresión diferencial

de estas isoformas en los tejidos es la que determina que la regulación de la síntesis del hemo sea distinta entre células eritroides y no eritroides (Ponka, 1997).

En el hígado, la regulación de la ruta del hemo permite una respuesta rápida a los requerimientos metabólicos, mientras que en los progenitores de los eritrocitos, donde se sintetiza el hemo, la regulación permite un estado constante y elevado de síntesis dependiente de la disponibilidad de hierro.

En células eritroides, el hemo bloquea la captación de hierro por la célula, desde la proteína transferrina e induce la expresión de ALAS2 a través de un "elemento de respuesta al hierro" en la región 5'-UTR de su ARNm, así como disminuye la disponibilidad de glicina como sustrato de ALA-S. La regulación ocurre

durante la diferenciación a eritrocito en respuesta a la hormona eritropoyetina.

La velocidad de producción del hemo se encuentra entonces limitada por la disponibilidad del hierro aportado desde la transferrina y no es inhibida por hemo. Los macrófagos del hígado y el bazo degradan el hemo y lo reciclan luego de la eritrofagocitosis a través de la enzima inducible HO-1 (Puy et al., 2010).

Por otro lado, ha sido demostrado que ALA-S hepática está negativamente regulada por el producto final de la vía: el hemo (Sassa y Nagai, 1996; Norman y Puy, 2002). El efecto más relevante del hemo, en su síntesis hepática, ocurre a nivel de la inhibición de la síntesis de ALA-S1, la cual se propuso, ocurre en cuatro niveles diferentes (Figura 7): I) a nivel de expresión génica de

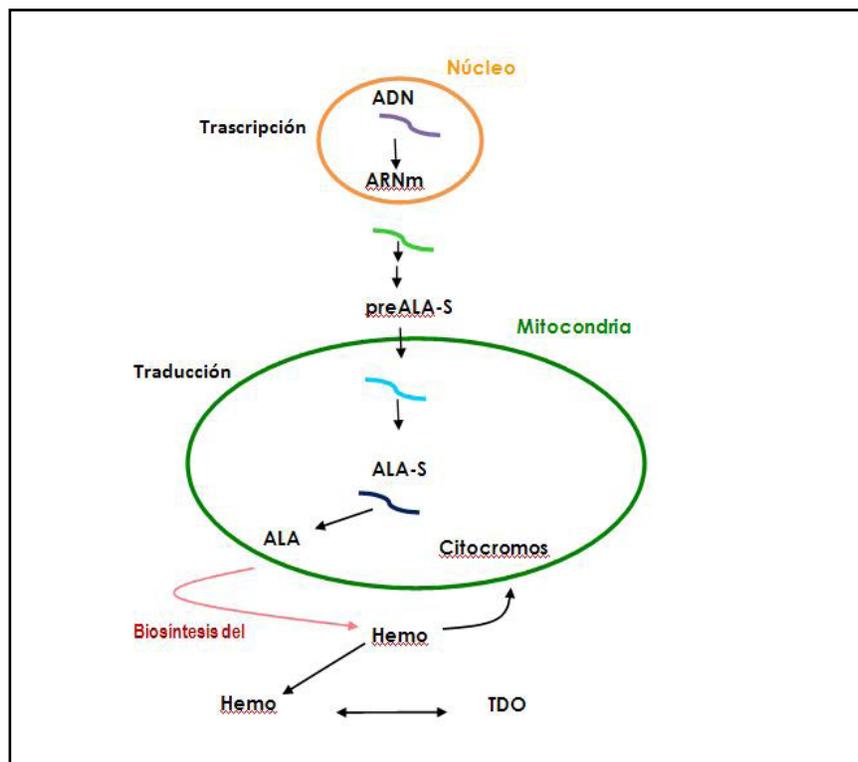


Figura 7. Niveles en los que ocurre la regulación de la enzima ALA-S. A nivel de la transcripción, mediante disminución de la vida media de su ARNm y/o evitando transferir el precursor proteico sintetizado de ALA-S a mitocondria. Triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). Adaptado de Sassa y Nagai, 1996.

ALA-S1, II) a nivel de represión post-traducciona mediante disminución de la vida media de su ARNm, III) evitando transferir el precursor proteico sintetizado a mitocondria y IV) inhibiendo la actividad catalítica de la enzima ALA-S (Sassa y Nagai, 1996). La inhibición directa de la actividad de ALA-S hepática no debería ser fisiológicamente relevante debido a que las otras clases de inhibición anteriormente mencionadas se alcanzan a concentraciones de hemo mucho menores que las necesarias para que ésta exista (Ponka, 1997), por lo cual no se considera relevante.

De hecho, la represión de ALA-S1 por hemo es responsable de que esta enzima sea la reguladora de la velocidad de síntesis en el camino biosintético del hemo hepático.

La velocidad de síntesis de hemo también responde al aumento de la demanda que ocurre frente a un cuadro de inducción de CYP por la acción deletérea de drogas sobre los CYP. En este caso los niveles del ARNm de ALAS1 son regulados positivamente para proveer de hemo a los apoCYP sintetizados *de novo*, produciendo una disminución del hemo y evitando la regulación por retroalimentación negativa sobre ALA-S1. A su vez, se ha reportado que existen *enhancers* cuya activación respondería a xenobióticos inductores e interactuarían con el receptor X de pregnano (PXR) y el receptor constitutivo androstano (CAR) teniendo un efecto inductor directamente sobre la transcripción del gen de ALA-S 1, similar al efecto observado sobre la expresión de CYP (Podvinec et al., 2004). La transcripción del gen de ALA-S 1 parece verse también regulada positivamente por el coactivador transcripcional que interactúa con los receptores llamados Activadores del Proliferador de Peroxisomas (PGC-

1 α). Este es coactivador de receptores nucleares y otros factores de transcripción, controlando la biogénesis y metabolismo oxidativo en varios tejidos, incluyendo músculo esquelético, corazón, hígado y tejido adiposo marrón (Handschin et al., 2005).

En el hígado, PGC-1 α se induce durante el ayuno, cuando éste presenta baja disponibilidad de glucosa para la obtención de energía utilizando la β -oxidación de ácidos grasos como reserva energética, bajo el control de PGC-1 α (Handschin et al., 2005). Esto explica porque la porfiria aguda intermitente (PAI) es asociada con una disminución de la energía del metabolismo hepático y desnutrición crónica (Puy et al., 2010).

Sin embargo, es de interés observar que en la inducción de ALA-S1 por drogas que ejercen un mecanismo inductor multifuncional como el fenobarbital (FB), el PGC-1 α no sería esencial para la inducción del gen de ALA-S1 (Handschin et al., 2005). Esto indicaría que el rol de PGC-1 α no podría extenderse universalmente a todos los mecanismos de inducción por drogas.

■ POOL HEPÁTICO DE HEMO LIBRE CELULAR

Se plantea hipotéticamente la existencia de un pool hepático de hemo libre, ya sea de síntesis reciente o que haya sido liberado de las hemoproteínas de las cuales formaba parte como grupo prostético. Debido a que éste se encontraría en pequeñas cantidades y sería consumido rápidamente se torna difícil de probar su existencia (Sassa y Nagai, 1996).

Este pool contiene hemo recién sintetizado y sirve como precursor de hemoproteínas y también cum-

ple funciones regulatorias. En cultivos de hepatocitos de ratas adultas, se observó que el 20% del hemo sintetizado se transformaba en pigmentos biliares directamente mientras que el 80% era empleado por la célula para la formación de las hemoproteínas. Esto parecería indicar que el hemo de los hepatocitos se forma ligeramente en exceso en relación a su requerimiento metabólico (Ponka, 1997), así como que concentraciones de hemo elevadas inducen la hemoxigenasa (HO), estimulando la ruta catabólica (Wu y Wang, 2005).

Se ha propuesto que el pool de hemo libre citosólico, en equilibrio con el hemo utilizado por la enzima de naturaleza hemoproteica triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) (Figura 7), reprimiría la formación de ALA-S e induciría a la HO-1, la enzima limitante del catabolismo del hemo (Sassa y Nagai, 1996).

■ HEMOPROTEÍNAS: CITOCROMOS P450 (CYP)

Con el término CYP se denomina a un grupo de hemoproteínas que, al combinarse en su estado reducido con monóxido de carbono (CO), forma un complejo que absorbe la luz a 450 nm. En casi todos los tejidos de mamíferos, especialmente el hígado e intestino delgado podemos encontrar CYPs, localizados en varias organelas, si bien principalmente se localizan en el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria.

Se considera a los CYPs productos de una superfamilia de genes que codifican para enzimas monooxigenasas relacionadas con el metabolismo de sustancias endógenas, drogas y otros xenobióticos. Ésta consiste en 27 familias de genes de las cuales las tres principales para el metabolismo de drogas son CYP1, CYP2, CYP3.

Los CYPs existen en diversas isoformas que exhiben polimorfismos y metabolizan la mayor parte de las drogas en humanos a diferentes tasas debido a variación genética interindividual entre ellas (Tsiftoglou et al., 2006). Un mismo sustrato puede ser metabolizado por más de una isoforma de CYP, siendo su acción sobre una amplia gama de sustratos, lo que refleja su enorme potencial detoxificante.

Muchas sustancias exógenas que ingresan al cuerpo o xenobióticos, pueden causar un marcado incremento en la cantidad de CYP en el hígado, asociado con un aumento en la síntesis del hemo en el hepatocito (Ponka et al., 1997). De esta forma, los xenobióticos deben presentar cierto grado de lipofilicidad para poder atravesar la membrana plasmática de la célula para ser metabolizados por los CYP.

El CYP presenta en su estructura un aminoácido cisteína que es clave para su coordinación con el grupo prostético hemo. El hemo interactúa de forma de alterar el estado de oxidación de ligandos específicos, como CO, NO, O₂, CN⁻ y otros que se unen directamente al hierro que conforma el complejo.

Aunque algunas de las formas de CYP muestran especificidad por un determinado sustrato, la mayoría de ellas catalizan gran número de reacciones metabólicas a la vez (Del Arco, 1997). Los CYP pueden catalizar reacciones tales como deaminación, epoxidación y desulfuración, hidroxilación y oxidación, todas necesarias para convertir los compuestos hidrofóbicos en compuestos de mayor polaridad y facilitar de esta forma su excreción.

Por su carácter de monooxigenasas, los CYPs utilizan solo una molécula de O₂, empleando un átomo

de oxígeno para la oxidación del sustrato, mientras que el otro es reducido para formar H₂O (por ello también se las denomina oxidasas mixtas), a merced de la presencia de un donante externo de electrones.

La reacción catalizada por los CYPs se caracteriza por presentar los siguientes pasos: I) adición de un sustrato a la enzima, II) donación de un electrón, III) adición de un átomo de oxígeno, y IV) donación de un segundo electrón y pérdida de agua.

Las actividades del sistema de monooxigenasas requieren de un flujo de electrones que es canalizado por la NADPH-CYP-reductasa desde el NADPH⁺ hasta un complejo formado por el sustrato o xenobiótico con CYP.

El xenobiótico en forma reducida se une, en primer lugar, al CYP oxidado (CYP-Fe³⁺). Posteriormente, el CYP es reducido por la reductasa a CYP-Fe²⁺ y el complejo CYP-Fe²⁺-xenobiótico interactúa con el O₂ para formar un complejo terciario, el oxiCYP (O₂-CYP-Fe²⁺-xenobiótico). Dicho complejo puede disociarse, dando lugar a un anión superperóxido (O₂⁻), regenerándose la hemoproteína férrica, el CYP-Fe³⁺. Además, el complejo recibe un segundo electrón para formar sucesivamente otros complejos, de modo que en definitiva un átomo de oxígeno es transferido al sustrato para oxidarlo y el otro reacciona con dos protones para formar H₂O. El sustrato oxidado queda liberado y el CYP se regenera en forma férrica.

Es importante resaltar que en este proceso de oxidación por el CYP, está involucrado también el proceso de formación de radicales libres, es decir, la liberación de productos de reducción del oxígeno que no están acoplados a sustratos de hidroxilación, como son el anión superóxido

(O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el H₂O

■ ¿QUÉ SON LAS PORFIRIAS?

Las porfirias son enfermedades metabólicas caracterizadas por un bloqueo en la síntesis del hemo y la acumulación de sus precursores (Kappas et al., 1995). Éstas son enfermedades hereditarias o adquiridas que resultan de deficiencia primaria parcial de alguna de las ocho enzimas del camino biosintético del hemo, determinando en cada caso un tipo de porfiria particular (Tabla 1) (Puy et al., 2010; Siegesmund et al., 2010). Dependiendo de los pasos deficientes en la síntesis, la acumulación de porfirinas y/o precursores se produce en los diferentes tejidos, así como su excreción en orina (Sassa, 2006).

Las porfirias se heredan con carácter autosómico dominante o autosómico recesivo. Las deficiencias enzimáticas pueden ser parciales o prácticamente totales dependiendo del tipo de mutación génica (Sassa, 2006). Existen casos documentados de herencia de mutaciones que aún encontrándose en heterocigosis pueden producir una porfiria clínicamente relevante, aunque en estos casos suelen presentarse por lo general en la vida adulta y con una severidad menor que en los casos de homocigosis (Poh-Fitzpatrick, 1998). Estudios genéticos y enzimáticos demuestran que individuos con una mutación en alguna de las enzimas de la ruta biosintética del hemo y con parientes heterocigotas con porfirias clínicamente expresadas, podrían permanecer silentes o sin síntomas asociados durante toda su vida (Sassa, 2003).

Históricamente las porfirias se han clasificado en hepáticas y eritropoyéticas, dependiendo el sitio primario de expresión de la enzima dis-

funcional prevalente (Siegesmund et al., 2010), si bien desde el punto de vista clínico, es más apropiado clasificar a las porfirias en agudas o no agudas, enfatizando de esta manera la presencia o ausencia de ataques potencialmente mortales.

Se clasificará entonces a las porfirias en: I) porfirias eritropoyéticas, II) porfirias crónicas hepáticas, ambas asociadas con fotosensibilidad cutánea como síntoma característico, y III) las porfirias hepáticas agudas que se caracterizan por sus sín-

tomas neurológicos, si bien algunas de ellas pueden presentar también fotosensibilidad (Sassa, 2006).

Las porfirias denominadas "agudas o inducibles" pueden presentar ataques agudos desencadenados por factores diversos que generan la de-represión de ALA-S (Kappas et al., 1995). Dentro de las mismas encontramos a la porfiria aguda intermitente (PAI), la porfiria variegata (PV), la coproporfiria hereditaria (CH) y la porfiria con deficiencia de ALA-dehidrasa (Hift, 2011; Puy

et al., 2010). En las PAI no se desarrollan lesiones dérmicas, las cuales aparecen en aproximadamente el 60% de los pacientes con PV (Puy et al., 2010) y raramente en pacientes con CH donde la incidencia de este síntoma ronda el 5%.

Los ataques agudos son más frecuentes en mujeres, siendo raros antes de la pubertad y después de la menopausia (Puy et al., 2010; Herrick, et al., 2005), salvo casos donde la mutación se presenta en homocigosis (Nordmann et al., 2002;

Tabla 1

Clasificación de las porfirias humanas. *En la PCT familiar ha sido reportada herencia autosómica dominante, mientras que en la PCT hepatoeritropoietica, se reportó que la herencia es autosómica recesiva. La PCT esporádica se adquiere por la exposición a xenobióticos. Extraído de Nordmann y Puy, 2002. **Recientemente se ha reportado la protoporfiria eritropoyética, ligada al cromosoma X (XLP), el defecto genético altera la actividad de ALA-S2. En la XLP se produce un aumento de la actividad de enzima ALA-S2. esto da lugar a producción de más protoporfirina para la síntesis de hemoglobina en la médula ósea (Balwani y Desnick, 2012).

Enzima deficiente	Nombre de la porfiria	Heredabilidad	Clasificación	Ataque agudo	Manifestaciones cutaneas
ALA-Dehidrasa	Porfiria por deficiencia de ALA-D (ADP)	Autosómica recesiva	Hepática	si	no
PBG deaminasa	Porfiria aguda intermitente (PAI)	Autosómica dominante	Hepática	si	no
Uroporfobilinógeno III sintasa	Porfiria Eritropoyética congénita (PEC)	Autosómica recesiva	Eritropoyética	no	Si
Uroporfobilinogeno Decarboxilasa	Porfiria cutánea tarda (PCT)	Variable*	Hepática	no	Si
Coproporfirinógeno Oxidasa	Coproporfiria hereditaria (CH)	Autosómica dominante	Hepática	si	Si
Protoporfirinógeno Oxidasa	Porfiria variegata (PV)	Autosómica dominante	Hepática	si	Si
Ferroquelatasa	Protoporfiria** Eritropoyética (PE)	Autosómica dominante	Eritropoyética	no	Si

Balwani y Desnick, 2012).

Generalmente, los síntomas de un ataque agudo pueden asociarse a la disfunción del sistema nervioso autónomo, periférico y central. Muchas personas que sufren un ataque agudo presentan severo dolor abdominal y en la zona de la espalda producto de una neuropatía autónoma con la cual se relacionan todos los síntomas iniciales. Estos se caracterizan por ser inespecíficos como náuseas, vómitos, diarrea, constipación, taquicardia, sudoración abundante, hipertensión (Puy et al., 2010; Siegesmund et al., 2010), así como fiebre, debilidad muscular y en estados más avanzados puede presentarse parálisis respiratoria y variedad de signos psiquiátricos y neurológicos (Sassa, 2006). La parálisis respiratoria puede progresar hasta el coma y la muerte, llegando la tasa de mortalidad hasta el 10%, si el paciente no se diagnostica a tiempo (Siegesmund et al., 2010).

La neuropatía porfírica es bastante menos común hoy en día, y los ataques agudos son letales en contadas ocasiones. Las manifestaciones clínicas inespecíficas indican el análisis bioquímico necesario para el correcto diagnóstico de porfiria y tratamiento.

Las porfirias que no presentan ataques agudos, dentro de su sintomatología, constituyen un grupo de enfermedades más heterogéneo. La porfiria cutánea tarda (PCT), la porfiria congénita eritropoyética (PCE) y la protoporfiria eritropoyética (PE) se caracterizan por presentar el síntoma de fotosensibilidad crónica. La PCT es el tipo de porfiria más frecuente y los pacientes que la padecen presentan manifestaciones dermatológicas y daño hepático (Puy et al., 2010), además es el único tipo de porfiria en la que se puede diferenciar una forma adquirida, que

no presenta la mutación genética característica para desarrollarse, y una forma heredada. La expresión de la forma adquirida de la enfermedad se encuentra fundamentalmente relacionada con la exposición prolongada y sostenida a diferentes sustancias. Estas, por lo general, han sido descritas como contaminantes ambientales tales como dioxinas, bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados, que pueden producir alteraciones del camino metabólico del hemo, provocando, inhibición de la uroporfirinógeno descarboxilasa (Uro-D) hepática y porfirinurias en individuos que no presentan la mutación genética característica de la enfermedad (Cochón et al. 2005).

Por otra parte, agentes terapéuticos varios como diclofenac y ketokenazole (Sassa, 2003) se clasifican como porfirinogénicos por su potencialidad de exacerbar el cuadro porfírico. Se han generado listas de seguridad para evitar la prescripción de las mismas a pacientes con predisposición a padecer la enfermedad (Sassa, 2003; Hift et al., 2011).

Para explicar los mecanismos subyacentes al desencadenamiento de un ataque agudo, varias hipótesis se han puesto en juego.

Sassa recopiló las causas que pueden llevar al desarrollo de la sintomatología del ataque porfírico (Sassa, 2006), así enumeró: (1) exceso de PBG y ALA puede causar neurotoxicidad; (2) aumento de la concentración de ALA en el cerebro que puede inhibir la liberación de ácido gamma-amino butírico (GABA), (3) la deficiencia de hemo que se genera en el cuadro porfírico puede provocar cambios degenerativos en el sistema nervioso central; (4) la disminución de síntesis en el hígado puede resultar en una disminución en la actividad de la hemoproteína, con función catalítica TDO, provo-

cando niveles elevados de triptófano y aumento del neurotransmisor serotonina; (5) como todas las porfirias asociadas con síntomas neurovisceralas muestran elevada excreción urinaria de ALA o ALA y PBG y el ALA aumentaría los valores de peroxidación lipídica, este mecanismo podría mediar una crisis aguda de porfiria y (6) la deficiencia en TDO puede causar un descenso en los niveles de melatonina plasmáticos que puede resultar en una pérdida de protección contra la peroxidación lipídica (Sassa, 2006).

También se ha propuesto una disminución en el hemo disponible que afectaría la síntesis de citocromos involucrados en cadena respiratoria, reduciendo la subsecuente capacidad de respiración oxidativa y producción de ATP, necesario para brindar energía a procesos celulares.

■ FACTORES PRECIPITANTES DE UN ATAQUE PORFÍRICO: DROGAS PORFIRINOGENICAS.

La predisposición a sufrir un ataque agudo de porfiria se encuentra ligada a factores ambientales o adquiridos, como son el estado nutricional, la exposición a drogas porfirinogénicas, la presencia de esteroides y otros químicos tanto de origen exógeno como endógeno (Herrick y McColl., 2005; Puy et al., 2010) cuya exposición genera en el individuo porfírico un aumento sustancial en la probabilidad de desencadenar el ataque agudo (Figura 8).

Esto sugiere que existe un importante efecto exógeno en la expresión clínica del defecto génico. Investigaciones han mostrado que aproximadamente el 90% de los individuos con una deficiencia en la actividad de la enzima porfobilinógeno deaminasa nunca expresan clínicamente la enfermedad (Sassa, 2003).

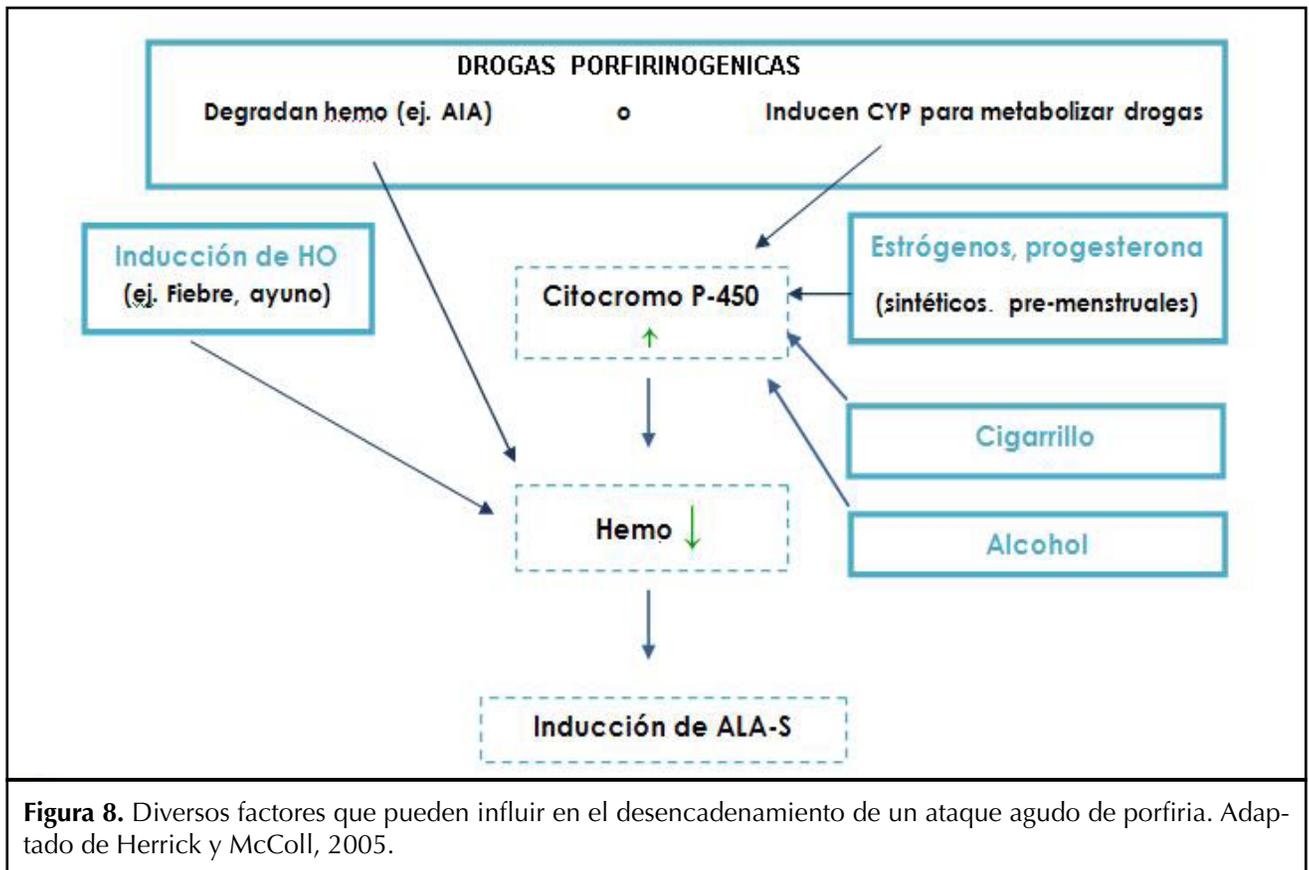


Figura 8. Diversos factores que pueden influir en el desencadenamiento de un ataque agudo de porfiria. Adaptado de Herrick y McColl, 2005.

Dentro de los factores precipitantes del ataque agudo, existe considerable evidencia de que factores endócrinos y hormonas esteroideas juegan un rol importante en desencadenar el ataque agudo de PAI (Sassa y Nagai, 1996). No es raro observar que las porfirias agudas son raramente observadas antes de la pubertad y son mayormente padecidas por mujeres, cobrando particular relevancia en la fase premenstrual.

Otro factor que se ha constatado potencia la probabilidad de sufrir un ataque de PAI, es una ingesta con bajo contenido energético que suele relacionarse con las dietas para bajar de peso. Una inadecuada ingesta de carbohidratos induce la enzima catabólica HO, que degrada el hemo e influye también en la pérdida de la represión (desrepresión) de ALA-S (Tsifoglou et al., 2006). A su vez, la transcripción de ALA-S1 también está regulada positivamente por PGC-1 α . En condiciones de baja

glucosa, PGC-1 α aumenta su producción, generando mayores niveles de ALA-S1 y generando condiciones proclives al ataque porfírico (Handschin et al., 2005).

Se ha reportado también que el alcohol inhibe algunas de las enzimas de la síntesis del hemo e induce la síntesis de CYPs, así como en pacientes fumadores se ha evidenciado una tendencia a la presencia de ataques agudos en repetidas oportunidades (Herrick y McColl, 2005; Sassa, 2006), efecto que se considera causado por la inducción de los CYPs por los hidrocarburos aromáticos policíclicos que forman parte de los componentes del tabaco (Herrick y McColl, 2005).

Entre otros factores, los ataques de porfiria suelen desencadenarse durante infecciones y aparecer de forma conjunta con otras enfermedades, al someterse a cirugías mayores y/o cuadros de estrés fisiológico.

Gran parte de estas condiciones se ha visto que afectan directamente la actividad de la enzima catabólica HO-1 (Sassa, 2006), siendo dicho mecanismo el propuesto para explicar su porfirinogenicidad.

Dentro de los desencadenantes del ataque agudo que presentan mayor variabilidad en cuanto a sus propiedades como porfirinógenos, encontramos los diversos fármacos que pueden prescribirse a los pacientes, de los que en su mayoría se carece de evidencia directa sobre su posible efecto en el paciente porfírico.

Los pacientes que presentan predisposición genética a la enfermedad pueden reaccionar de ciertas formas a la exposición a una droga porfirinogénica: con un ataque agudo, con un aumento en la excreción de porfirinas asintomático y clínicamente insignificante o no presentando ninguna reacción sintomática o bioquímicamente evidente. De he-

cho los pacientes pueden responder de forma diferente a la misma droga en distintos momentos de su administración. La variabilidad en la interacción con otras drogas así como la variación interindividual de los pacientes se vuelve algo importante a tener en cuenta para saber el efecto que va a producir la administración de la misma (Hift et al., 2011).

Más de la mitad de las drogas comúnmente prescritas son metabolizadas en el hígado por el sistema de oxidasas de función mixta, de las cuales los CYP son los miembros más importantes. Las drogas que pueden considerarse de riesgo frente a la posibilidad de desencadenar un cuadro porfírico presentan ciertas propiedades tanto químicas como mecánicas, generalmente en relación a su interacción con los CYPs. A pH fisiológico, la lipofilicidad del xenobiótico favorece el metabolismo oxidativo, por lo cual aquellas sustancias hidrofóbicas se asociarían con una afinidad mayor a las isoenzimas CYP. Dependiendo de la capacidad de la droga de inducción (o destrucción) de los CYP, que contienen hemo, muchos fármacos lipofílicos son considerados potencialmente porfirinogénicos (Thunell et al., 2007).

La exposición a drogas porfirinogénicas produce un incremento en la transcripción del gen de ALA-S1 en respuesta a un mayor requerimiento de hemo para la síntesis de CYP. En un sujeto normal, el resultado es un aumento en la producción de precursores y porfirinas que alimentan el camino biosintético de producción del hemo. En un paciente que lleva predisposición genética a una porfiria aguda, la enzima defectuosa puede volverse limitante, lo que resulta en la acumulación de porfirinas y sus precursores propiciando el ataque agudo.

Se ha reportado que el ALA-S, contiene en su gen secuencias para "xenosensores" que producen inducción de su actividad a nivel transcripcional de manera directa, a través de receptores nucleares huérfanos, que difieren en su afinidad al ligando y en los mecanismos mediante los cuales ejercen sus efectos (Podvinec et al., 2004). Paralelamente las drogas que producen este efecto inducirían los CYP para su metabolización.

En humanos, CAR y PXR median más del 50% de la mayoría de las transcripciones inducidas por xenobióticos de CYP. Algunas pocas drogas son ligando del receptor de hidrocarburos aromáticos (Ahr), el cual es prioritariamente activado por hidrocarburos policíclicos o de la familia de los receptores nucleares denominados "receptores activadores del proliferador de peroxisomas" (PPARs) (Podvinec et al., 2004; Thunell et al., 2007).

Si bien se han postulado diferentes abordajes para estimación y predicción de la capacidad porfirinogénica de drogas (Thunell et al., 2007; Hift et al., 2011) resulta imprescindible señalar su carácter predictivo. La ausencia o deficiencia en cantidad de datos básicos, para algunas drogas hace que aparezcan señaladas en las listas de indicación como "probable" y "posiblemente" segura o insegura.

■ PORFIRIAS TÓXICAS.

Las porfirias tóxicas se generan por la exposición a xenobióticos que inducen a nivel metabólico una situación de acumulación de precursores del hemo, como la que ocurre en las porfirias que presentan una base genética.

La porfiria tóxica generada en animales de experimentación con el

fin de estudiar la enfermedad se denomina porfiria experimental.

■ ANTECEDENTES DE PORFIRIAS ADQUIRIDAS.

El concepto de inducción química de la porfiria se originó a partir de 1889, cuando se comenzó a utilizar el sulfonal, trional y tetronal como sedantes, fármacos que presentan alto grado de porfirinogenicidad. Ello provocó un brote masivo de porfiria aguda, enfermedad hasta entonces desconocida. Posteriormente se desencadenaron múltiples casos semejantes y aún fatales de la enfermedad debido a la administración de barbitúricos y dosis elevadas del fármaco Sedormid, casos en los que las personas expuestas desarrollaron porfiria si bien no tenían necesariamente predisposición genética a la enfermedad.

En Turquía ocurrió un episodio masivo por el compuesto organoclorado hexaclorobenceno (HCB) que indujo cuatro mil casos de PCT por ingestión de pan realizado con harina de semillas que habían sido expuestas a este fungicida antes de ser sembradas. Más de cuatro mil individuos desarrollaron síntomas similares a los de una PCT que fueron reportados entre 1956 a 1961.

Durante los años 70 ocurrieron episodios en Estados Unidos (Michigan) y en Japón, provocados por bifenilos polihalogenados que condujeron a un cuadro porfírico de PCT en los sujetos expuestos, no siendo estas situaciones de la misma gravedad que el episodio ocurrido en Turquía con anterioridad. Cuadros semejantes se observaron en Seveso, Italia, en 1976, por la exposición a la nube tóxica de la dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD).

También se ha reportado una ex-

posición a HCB ocurrida en España, donde personas de una población en contacto con organoclorados debido a la vecindad de una fábrica de dichos compuestos, mostraron altos niveles del xenobiótico en suero, si bien no se llegó en este caso a desarrollar una PCT definida (San Martín et al., 1977; Cochón et al., 2005).

■ PORFIRIAS EXPERIMENTALES: MODELOS ANIMALES.

El empleo de drogas para generar estos modelos animales ha permitido profundizar el estudio experimental de enfermedades, tales como la diabetes y otros disturbios metabólicos. La administración de drogas puede modelar en animales, porfirias hepáticas (De Matteis, 1978; Hift et al., 2011). Así, se han modelado con diversas drogas distintos tipos de porfirias agudas y crónicas en animales utilizando agentes químicos como el HCB, 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA), 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) y la griseofulvina que mimetizan diversos tipos de porfirias agudas (Hift et al., 2011).

Los compuestos porfirinogénicos estimulan la actividad de ALA-S al disminuir la cantidad de hemo libre que puede ejercer la represión de dicha enzima. Esta disminución puede deberse a la inhibición de alguna otra enzima involucrada en la formación del hemo y/o a un aumento de los requerimientos del mismo por parte de la célula. Esta depleción del pool de hemo puede deberse a la inducción de la síntesis de hemoproteínas como, por ejemplo, de CYP en el hígado o a un aumento en la velocidad de degradación del hemo. Los químicos inductores de la síntesis del hemo en el hígado generalmente no producen aumento de la producción de hemo en células eritroides (Ponka, 1997).

La mayor parte del conocimiento

actual en porfirias proviene de estudios realizados en modelos en los que se genera un fenotipo porfírico químicamente inducido, lo que permitió testear la porfirinogenicidad de drogas tanto *in vivo* como *in vitro*. Las listas de drogas seguras para pacientes porfíricos están fuertemente influenciadas por estos resultados.

A lo largo del tiempo se han utilizado diversas drogas para modelar la porfiria. Fueron descritos modelos con diversos barbitúricos que inducían la enzima ALA-S en unas pocas horas a partir de su administración, también se sugirió que la intoxicación de ratas con DDC podía producir un modelo de porfiria adecuado y de hecho permitieron la generación de las primeras listas de seguridad de drogas (Hift et al., 2011). En estos modelos se observó acumulación de ALA y PBG en hígado y orina o aumento de ALA-S hepática como parámetros indicadores de porfiria (De Matteis, 1978).

En nuestro laboratorio se diseñó experimentalmente el modelo de HCB en ratas, bioquímicamente similar a la PCT, se estudió el mecanismo de la porfirinogenicidad *in vivo* del tóxico explicando su efecto sobre la enzima Uro-D, también se empleó este modelo para estudiar aspectos del metabolismo de lípidos y de los hidratos de carbono así como de su regulación hormonal en relación con la porfiria desarrollada (San Martín de Viale et al., 1977; Wainstok de Calmanovici et al., 1984; Mazzetti et al., 2004; Cochón et al., 2005)

Por otra parte hemos desarrollado un modelo de porfiria hepática aguda, bioquímicamente similar a las porfirias agudas humanas, por la administración conjunta de AIA y DDC a ratas, en el que se estudió el metabolismo de los hidratos de carbono y su regulación y los efec-

tos del estrés oxidativo en relación con los parámetros bioquímicos de la porfiria modelada. (Lelli et al., 2005, Matkovic et al., 2011, Faut et al., 2013).

Recientemente ha comenzado a utilizarse el oxadiazón, un herbicida que presenta una estructura de difenil éter que inhibe Proto'gen oxidasa, para probar en ese modelo la porfirinogenicidad de nuevas drogas antiepilépticas.

El uso de modelos por suministro de drogas como antihipertensivos y psicotrópicos en cultivos celulares de hígado de embriones de pollo también ha sido utilizado para medir la actividad de ALA-S, porfirinas y concentraciones de hemo libre (Hift et al. 2011).

■ ¿CUÁLES SON LOS MECANISMOS DE PORFIRINOGENICIDAD?

A continuación se describen los mecanismos por los cuales las drogas pueden desencadenar un cuadro porfírico.

Inactivación de CYP

Varios xenobióticos son metabolizadas por los CYP a intermediarios reactivos que inhiben a los mismos CYP de forma irreversible o cuasi-irreversible (Marks et al., 1988; Hift et al., 2011). Es decir, la droga es sustrato e inhibidor de la enzima que lo metaboliza.

La interacción de la droga con CYP deriva en la formación de EROS que promueven la destrucción del CYP. El hemo liberado se destruye metabolizándose como bilirrubina, hierro y CO. Esto resulta en la reducción del pool de hemo libre intracelular el cual, disminuido por la creciente demanda de hemo para la síntesis de nuevos CYP, produce una situación de depleción del pool

de hemo que desreprime el ALA-S hepática, propiciando su inducción (Thunell et al., 2007; Hift et al., 2011). La destrucción y eliminación del grupo hemo constituyente de los CYPs es acompañado así por la disminución del pool de hemo regulatorio del hepatocito, lo que produce una aceleración compensatoria de la síntesis del hemo.

Este mecanismo ha sido descrito para compuestos como secobarbital, AIA, isoniazida, progesterona, así como compuestos del tipo de las dihidropiridinas y dihidroquinolonas

Se describe en particular el mecanismo de las dihidropiridinas, dentro de las cuales se encuentra el DDC. Se ha reportado que la administración de 3,5-dietoxicarbonil-1,4 dihidro-2,4,6-trimetilpiridina o 3,5-dietoxicarbonil 1,4-dihidrocolidina (DDC) produce un aumento de la actividad de ALA-S y la acumulación de protoporfirina IX por inhibición de la enzima ferroquelatasa. Esta disminución de la actividad de la enzima no fue observada en estudios *in vitro*, debido a que la acción inhibitoria del DDC ocurría a través del metabolito N-metil protoporfirina IX. Se propuso que la interacción del DDC con el hemo del sitio activo del CYP era la responsable de la formación de este intermediario (Marks, et al., 1988).

En efecto esa misma N-metil protoporfirina es la que actúa como poderoso inhibidor a nivel de la ferroquelatasa, la enzima terminal de su síntesis (Marks et al. 1988). Como consecuencia, hay inducción de ALA-S y acumulación y excreción en exceso de protoporfirina, así como también de otros precursores (Marks et al., 1988). Se produce así, en animales expuestos a DDC, una porfiria semejante a la PV.

■ INDUCCIÓN MULTIFUNCIONAL.

Algunas sustancias son potentes inductores de enzimas hepáticas microsomales, como CYP y glucuroniltransferasas (Hift et al. 2011). Como estas actúan en más de un sistema, se los denomina inductores multifuncionales. Entre esas sustancias las drogas mejor estudiadas son las drogas antiepilépticas clásicas como el FB, fenitoína, carbamazepina y primidona. Su porfinogenicidad se explica por la transcripción masiva del gen de ALA-S1 en conjunto con la inducción de varias subclases de CYP (Thunell et al. 2007). También enzimas que forman parte de caminos metabólicos fisiológicos, como Acil-CoA oxidasa, Dopa-decarboxilasa y glutatión-S-transferasas se verían inducidas con FB (Hamadeh et al. 2002)

■ INHIBICIÓN DE UROPORFIRINÓGENO DESCARBOXILASA (URO-D)

Para explicar el mecanismo por el cual el HCB y otros polihalogenuros aromáticos (incluyendo las dioxinas) inhiben la enzima Uro-D se sugiere que estos son ligandos del receptor Ahr que se plantea tendría un rol fundamental en este mecanismo. CYP1A2 es un producto génico regulado por este receptor que parece jugar un papel central en el desarrollo de la uroporfiria en ratones (Marks et al., 1988; Hift et al., 2011). En algunos modelos en roedores, la sobrecarga de hierro es necesaria para producir uroporfiria sugiriendo su parecido al modelo humano (Smith y Elder, 2010).

■ INHIBICIÓN COMPETITIVA DE PROPORFIRINÓGENO OXIDASA (PROTO-OX).

Un numero de agentes herbicidas que incluyen el acifluorfen, oxi-

fluorfen, oxadiazón y fomesafen son inhibidores competitivos de Proto-Ox, la enzima cuya actividad se ve disminuida en la porfiria variegata (Hift et al. 2011)

■ ACCIÓN DE METALES PESADOS.

ALA-D es una enzima que contiene grupos sulfhidrilo y requiere de iones zinc para su actividad. Varios metales como el mercurio y el plomo modifican su actividad ya sea por oxidación de sus grupos sulfhidrilo o compitiendo con el zinc por su incorporación.

La ferroquelatasa, enzima que se encarga de insertar el hierro en la molécula de protoporfirina IX, puede unirse con otros metales divalentes como zinc y níquel, mientras que plomo, manganeso, mercurio y cadmio la inhiben competitivamente (Hift et al. 2011).

■ OTROS MODELOS UTILIZADOS PARA MODELAR PORFIRIAS.

Algunos investigadores han utilizado cepas genéticamente modificadas en las cuales la porfiria es reproducida por una manipulación puntual en el gen de alguna de las enzimas de la síntesis del hemo. Un modelo en ratones que mimetiza una PAI se produjo por una disrupción parcial del gen que codifica para PBG deaminasa. Estos ratones demostraron un aumento en la actividad de ALA-S1 y la excreción urinaria de ALA y PBG aumentadas, aunque para presentar un aumento en la inducción de ALA-S debieron ser además intoxicados con FB.

Si bien estos modelos mimetizan correctamente a una porfiria, resultó necesaria la estimulación con FB o alguna droga porfirinogénica para que la porfiria se exprese bioquímicamente, como suele ocurrir con los pacientes portadores de alguna mu-

tación génica sobre la ruta de síntesis del hemo. Esto demuestra que presentar propensión genética de la enfermedad no es suficiente para explicar el desencadenamiento del ataque agudo (Hift et al. 2011).

Si bien se pensó que estos modelos donde se emplean ratones knock out iban a introducir avances en lo que respecta a la evaluación de la porfirinogenicidad de fármacos, se ha considerado que los mismos no pueden brindar mayor información que los modelos por inducción química debido a que la variabilidad inter-especie e inter-individual sigue sin ser explicada en estos modelos.

Las porfirias experimentales generadas en roedores permiten el estudio de los mecanismos, la fisiopatología y rasgos tanto clínicos como bioquímicos de estas enfermedades, permitiendo dilucidar variables metabólicas que puedan alterar el desarrollo de la sintomatología y lograr tratamientos más efectivos para estas patologías.

■ **ABREVIATURAS.**

Ahr, receptor de hidrocarburos aromáticos; AIA, 2-alil-2-isopropilacetamida; ALA, ácido 5-aminolevulínico; ALA-D 5-aminolevulínico-dehidrasa; ALA-S, ácido 5-aminolevulínico sintasa; ALA-S1, ALA-S N, 5-aminolevulínico sintasa1 (*forma no específica o constitutiva*); ALA-S2, ALA-S E, ácido 5-aminolevulínico sintasa-2 (*forma eritroide*); CH, coproporfirina hereditaria; CN⁻, cianuro; CO, monóxido de carbono; Copro'gen, coproporfirinógeno; CYP, citocromo P450; DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina; EROS, especies reactivas del oxígeno; FB, fenobarbital; GABA, ácido gamma-amino butírico; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HCB, hexaclorobenceno; HO, hemo oxigenasa; NO, monóxido de nitrógeno; O₂,

oxígeno molecular; O₂^{•-}, anión superóxido; PAI, porfiria aguda intermitente; PBG, porfobilinógeno; PCE, porfiria congénita eritropoyética; PCT, porfiria cutánea tarda; PE, protoporfirina eritropoyética (PE); PGC-1 α , coactivador transcripcional que interacciona con los receptores activadores del proliferador de peroxisomas; PPARs, receptores activadores del proliferador de peroxisomas; Proto'gen, protoporfirinógeno; PV, porfiria variegata; RE, retículo endoplásmico; TCDD, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; TDO, Triptófano 2,3-dioxigenasa; Uro'gen III, uroporfirinógeno III.

■ **GLOSARIO**

autosómico dominante: uno de los patrones de herencia clásicos o mendelianos que se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética para un determinado alelo de un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los cromosomas no determinantes del sexo. Es decir, que por este mecanismo una determinada característica heredable se transmite en una forma que puede ser predicha sin tener en consideración el sexo del descendiente. Además para que esta característica heredable se exprese basta con que el descendiente reciba el gen de uno solo de sus progenitores.

autosómico recesivo: uno de los patrones de herencia clásicos o mendelianos y se caracteriza por no presentar el fenómeno de dominancia genética. En este patrón de herencia el fenotipo que caracteriza al alelo recesivo se encuentra codificado un gen cuyo locus se encuentra ubicado en alguno de los cromosomas no determinantes del sexo. Este alelo recesivo no se manifiesta si se encuentra acompañado por un alelo dominante. Es decir, que por este mecanismo una determinada característica heredable se transmite en

una forma que puede ser predicha sin tener en consideración el sexo del descendiente. Además para que esta característica heredable se exprese es necesario que el descendiente reciba el gen de ambos progenitores.

catalasa: enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua.

citocromo P450: enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, archaea y eucariotas. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas.

coactivador transcripcional que interacciona con los receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PGC-1 α): regulador de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo. Interacciona con los receptores llamados Activadores del Proliferador de Peroxisomas (PPAR).

cromosoma X: uno de los cromosomas sexuales, del ser humano y otros mamíferos, este cromosoma esta presente tanto en individuos hembras como machos. En los seres humanos está situado en el llamado par 23. Cuando en el par 23 se da XX el sexo del individuo es cromosómicamente llamado hembra. En caso de que sea XY el sexo del individuo será cromosómicamente macho.

endocitosis mediada por receptor: forma de endocitosis, que difiere de la fagocitosis o la pinocitosis en varios aspectos: 1. permite a las células tomar macromoléculas específicas llamadas ligandos, tales como proteínas que ligan la insulina (una

hormona), transferrina (una proteína que se liga al hierro) o portadores de colesterol y lipoproteínas de baja densidad y 2. requiere de receptores de membrana específicos, para reconocer un ligando particular y unirse a él.

enhancer ("potenciador") o amplificador: en genética, corta región del ADN eucariota que puede unirse con proteínas (factores de transcripción) para aumentar los niveles de transcripción de genes en un grupo de genes. Un enhancer no tiene por qué estar localizado cerca de los genes sobre los que actúa, ni siquiera en el mismo cromosoma.

eritropoyetina: hormona que estimula la formación de eritrocitos y es el principal agente estimulador de la eritropoyesis natural. En los seres humanos, es producida principalmente por el riñón en las células intersticiales peritubulares, células mesangiales (del 85 al 90 %), el resto en el hígado y glándulas salivales (del 10 al 15 %).

especies reactivas del oxígeno (EROs o ROS por reactive oxygen species): incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

grupo prostético: componente no aminoacídico que forma parte de

la estructura de algunas proteínas y que se halla fuertemente unido al resto de la molécula.

guanilato ciclasa: (también conocida como guanil ciclasa) cataliza la síntesis de GMPc desde GTP

guanosín monofosfato cíclico, GMPc o GMP cíclico: derivado cíclico del nucleótido trifosfato GTP, generado por mediación de la enzima guanilato ciclasa también conocida como guanil ciclasa e implicado como segundo mensajero en las rutas de transducción de la señal celular.

heterocigosis: condición de heterocigota. Heterocigota es, en genética, un individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo en el mismo locus (se expresa, por ej.: Aa), que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores.

homocigosis: condición de homocigota. Homocigota es, en genética un individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo en el mismo locus que posee formas iguales de un gen en particular. Para nombrarlos se utilizan letras mayúsculas y minúsculas; así se dice que AA es Homocigota Dominante y aa es Homocigota Recesivo.

hormona esteroide: es un esteroide que actúa como una hormona. Las hormonas esteroides pueden ser agrupadas en cinco grupos según el receptor al que se unen: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos.

isoenzimas o isozimas: son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química.

mieloperoxidasa: enzima presente en los neutrófilos y monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos. Cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermediarios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida ($\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$).

monooxigenasas: enzimas que incorporan un grupo hidroxilo en sustratos en muchas rutas metabólicas. En esta reacción, dos átomos de oxígeno son reducidos a un grupo hidroxilo y a una molécula H_2O por la oxidación concomitante de la NAD(P)H.

óxido nítrico sintasa: (sigla en inglés NOS): es una oxidoreductasa (ya que tiene un dominio oxidasa y un dominio reductasa) responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON, siglas en español, y NO, siglas en inglés) a partir del átomo terminal de nitrógeno de la L-arginina en presencia de NADPH (nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido) y oxígeno molecular (O_2).

peroxidación lipídica o lipoperoxidación: hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares.

ratón knockout o ratón KO: ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados mediante una técnica llamada *gene knockout*.

reacción de Fenton: (llamada así por su descubridor en 1894, H.J.H. Fenton): es la que se produce al catalizar el peróxido de hidrógeno con metales de transición, generalmente hierro, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo ($\text{OH}\cdot$).

receptor X de pregnano (PXR): también conocido como NR112 (de sus siglas en inglés "nuclear receptor subfamily 1, group 1, member 2"), factor de transcripción de la familia de los receptores nucleares codificado en humanos, cuya función primaria consiste en detectar la presencia de sustancias tóxicas o extrañas en la célula y, en respuesta, activar la expresión de proteínas encargadas de la detoxificación y eliminación de dichas sustancias.

receptor constitutivo de androstano (CAR): receptor nuclear que parece funcionar como sensor de xenobióticos que activan la expresión de las enzimas del citocromo P450 implicadas en el metabolismo de dichos xenobióticos.

retículo endoplásmico: complejo sistema de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que están interconectados entre sí compartiendo el mismo espacio interno.

retroalimentación negativa o regulación por feedback negativo: tipo de regulación enzimática a nivel de cantidad o actividad de la enzima. Esta inhibición se observa cuando el producto final inhibe la enzima del primer paso (u otro paso clave) de esa secuencia.

transferrina: proteína transportadora específica del hierro en el plasma.

UTR (del inglés untranslated region o bien untranslated trailer): regiones no traducidas de los genes. Se habla generalmente de un **5'-UTR** y de un **3'-UTR**, que son las dos partes no traducidas de cada gen, debido a que se encuentran colindando el marco abierto de lectura (u ORF).

Xenobiótico: deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química

en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

■ BIBLIOGRAFÍA.

Balwani M., Desnick R.J. (2012) The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012 120, 4496-45504.

Bonkovsky H.L., Guo J-Y., Hou W., Li T., Narang T., Thapar M. (2013) Porphyrin and Heme Metabolism and the Porphyrias. *Comprehensive Physiology* 3, 365-401.

Cochón A.C., Mazzetti M.B., San Martín de Viale L.C. (2005) Hexachlorobenzene impacts biochemistry. *Recent studies in several tissues. Trends in Cell and Molecular Biology* 1, 15-34.

De Matteis F. (1978) Drugs and hepatic porphyrias. *Clinics in Hematology* 9, 309-42.

Faut M., Paiz A., San Martín de Viale L.C., Mazzetti M.B. (2013) Alterations of the redox state, pentose pathway and glutathione metabolism in an acute porphyria model. Their impact on heme pathway. *Experimental Biology and Medicine* 258, 133-143.

Hamadeh H.K., Bushel P.R., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S., Bennett L., Tennant R., Stoll R., Barrett J.C., Blanchard K., Paules R.S., Afshari C.A. (2002) Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicological Sciences* 67, 219-231.

Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A-K., Chin S., Wu P-S., Meyer U.A., Spiegelman B.M. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α . *Cell* 122, 505-

515.

Herrick A.L., McColl K.E. (2005) Acute intermittent Porphyria. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 19: 235-249.

Hift R.J., Thunell S., Brun A. (2011). Drugs to porphyria: From observation to a modern algorithm-based system for the prediction of porphyrinogenicity. *Pharmacology and Therapeutics* 132, 158-169.

Kappas A., Sassa S., Galbraith R.A., Nordmann Y. (1995) The porphyrias. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wibgaarden JB, Fredrickson DS, editors. *Metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, 2103-2159.

Lelli S.M., San Martín de Viale L.C., Mazzetti, M.B. (2005) Response of glucose metabolism enzymes to porphyrinogenic drugs that induce an acute porphyria model. Role of reactive oxygen species. *Toxicology* 216, 49-58.

Marks, G.S., McCluskey, S.A., Mackie, J.E., Riddick, D.S., James, C.A., (1988). Disruption of hepatic heme biosynthesis after interaction of xenobiotics with cytochrome P-450. *The FASEB Journal* 2, 2774-2783.

Matkovic L.B., D'Andrea F., Fornes D., San Martín de Viale L.C., Mazzetti M.B. (2011) How porphyrinogenic drugs modeling acute porphyria impair the hormonal status that regulates glucose metabolism. Their relevance in the onset of this disease. *Toxicology* 290, 22-30.

Mauzerall D.C. (1998) Evolution of Porphyrins. *Clinics in Dermatology* 16, 195-201.

- Mazzetti, M.B., Taira, M.C., Lelli, S.M., Dascal, E., Basabe, J.C., San Martín de Viale, L.C. (2004) Hexachlorobenzene impairs glucose metabolism in a rat model of porphyria cutanea tarda: a mechanistic approach". *Archives of Toxicology* 78, 25-33.
- Nordmann Y., Puy H. (2002) Human hereditary hepatic porphyrias. *Clinica Chimica Acta.* 325, 17-37.
- Podvinec M., Handschin C., Looser R., Meyer U.A. (2004) Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinatase synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9127- 9132.
- Poh-Fitzpatrick M.B. (1998) Clinical features of the porphyrias *Clinics in Dermatology* 16, 251-264.
- Ponka P. N. (1997) Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood* 1, 1-25.
- Puy H., Gouya L., Deybach J.C. (2010) Porphyrias. *Lancet* 375, 924-937.
- Ryter S.W., Tyrrel R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro- and Antioxidant Properties. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 289 -309.
- San Martín de Viale L.C., Ríos de Molina M.C., de Calmanovici R.W., Tomio J.M. (1977) Porphyrins and porphyrinogen carboxylase in hexachlorobenzene-induced porphyria. *Biochemical Journal* 168, 393- 400.
- Sassa S. (2003) Gene-Environmental Interactions: Lessons from Porphyria. *Environmental Health and Preventive Medicine* 7, 254-263.
- Sassa S. (2006) Modern diagnosis and management of the porphyrias. *British Journal of Haematology* 135, 281-292.
- Sassa S., Nagai T. (1996) The role of heme in gene expression. *International Journal of Hematology* 63, 167-178.
- Siegesmund M., van Tuyl A.M., van Serooskerken A.M., Poblete-Gutiérrez P., Frank J. (2010) The acute hepatic porphyrias: Current status and future challenges. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 593- 605.
- Smith, A. G., Elder, G. H. (2010). Complex gene-chemical interactions: hepatic uroporphyrin as a paradigm. *Chemical Research in Toxicology* 23, 712-723.
- Thunell S., Pomp E., Brun A. (2007) Guide to drug porphyrinogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *British Journal of Clinical Pharmacology* 64, 668-679.
- Tsiftoglou A.S., Tsamadou, A.I., Papadopoulou L.C. (2006) Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 327-345
- Wainstok de Calmanovici R., Ríos de Molina M.C., Taira de Yamamoto C., Tomio M.J., San Martín de Viale, L.C. (1984) Mechanism of hexachlorobenzene-induced porphyria in rats. Effect of phenobarbitone pretreatment. *Biochemical Journal* 218, 753-763.
- Wu L., Wang R. (2005) Carbon Monoxide: Endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews* 57, 585-630.