



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Nuevos factores genéticos asociados a la  
predisposición de crisis en Porfiria Aguda  
Intermitente”

Autor:

María Barreda Sánchez

Director:

Dra. D<sup>a</sup>. Encarnación Guillén Navarro

Murcia, abril de 2018





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

“Nuevos factores genéticos asociados a la  
predisposición de crisis en Porfiria Aguda  
Intermitente”

Autor:

María Barreda Sánchez

Director:

Dra. D<sup>a</sup>. Encarnación Guillén Navarro

Murcia, abril de 2018





# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D<sup>a</sup>. Encarnación Guillén Navarro como Directora de la Tesis Doctoral titulada “Nuevos factores genéticos asociados a la predisposición de crisis en Porfiria Aguda Intermitente” realizada por D<sup>a</sup> María Barreda Sánchez en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 18 de abril de 2018.

Dra. D<sup>a</sup> Encarnación Guillén Navarro



## RESUMEN

Introducción: La porfiria aguda intermitente (PAI) es una enfermedad metabólica de base genética con herencia autosómica dominante y baja penetrancia. Se origina por la deficiencia parcial de la enzima hidroximetilbilano sintasa (HMBS), que cataliza el tercer paso de la biosíntesis de hemo, resultante de la alteración del gen *HMBS*.

La PAI se expresa clínicamente en el 10-20% de los portadores, como crisis neuroviscerales agudas que suceden de forma episódica (PAI manifiesta), a menudo asociadas a factores precipitantes como algunos fármacos, cambios endocrinos, ayuno o estrés. La PAI latente se ha asociado clásicamente a los portadores sin evidencia de crisis agudas.

Estos factores externos explican parte de la variabilidad interindividual de la expresión clínica de la enfermedad, pero los factores endógenos subyacentes a la baja penetrancia son desconocidos. La dotación genética individual podría modular la penetrancia de la enfermedad. En este sentido, se ha sugerido que otros genes distintos a *HMBS*, podrían actuar como factores de susceptibilidad influyendo en la expresión de las crisis agudas.

En situaciones de alta demanda de hemo se produce una sobrestimulación de su síntesis hepática, que en los portadores de PAI lleva a la acumulación de los precursores porfirínicos, ácido 5-aminolevulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), y al desencadenamiento clínico de la enfermedad. El gen *ALAS1* (isoforma ubicua de la aminolevulinato sintasa) codifica la enzima limitante de la síntesis de hemo y está sujeto a regulación por retroalimentación negativa de éste. Además, *ALAS1* se induce en respuesta a fármacos paralelamente a los genes de los citocromos P450 (*CYP*). Las enzimas *CYP* constituyen las principales hemoproteínas hepáticas y son altamente polimórficas. Participan en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos, así como en la síntesis de compuestos endógenos de naturaleza esteroide.

Objetivos: El objetivo de este trabajo fue describir la frecuencia de PAI manifiesta en nuestra región e identificar variantes genéticas en regiones

reguladoras del gen *ALAS1* y en los genes de los citocromos *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5* que actúen como factores de susceptibilidad para la manifestación de crisis agudas en los portadores de PAI.

Material y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo de la ocurrencia de crisis (PAI manifiesta) en 50 individuos portadores de PAI. Se obtuvieron muestras de ADN de sangre periférica para el análisis genético. Se amplificó y secuenció una extensión de 1.2 Kb del promotor proximal y dos regiones distales 5' de respuesta a fármacos (ADRES1 y ADRES2) del gen *ALAS1*. Adicionalmente, se estudió el grado de metilación de una posible isla CpG localizada a -4.67 Kb del inicio de la transcripción, mediante secuenciación específica de bisulfito. Por otro lado, se genotiparon los alelos *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3; *CYP2C19*\*2; *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5; *CYP3A4*\*1B y *CYP3A5*\*3, que determinan enzimas no funcionantes o con actividad reducida y se analizaron los niveles de ALA y PBG en orina en fase asintomática de la enfermedad.

Resultados: El 52% de los portadores presentó PAI manifiesta, con un número medio de crisis de  $2.5 \pm 2$  (rango: 1-10 crisis). La penetrancia asociada a la mutación fundadora c.669\_698del fue del 48.7%.

No se detectaron variantes genéticas en las regiones reguladoras del gen *ALAS1* analizadas. Además, todos los individuos presentaron metilación en todas las posiciones susceptibles (dinucleótidos CG) de tal modificación.

En relación a los genes *CYP*, se observó una mayor frecuencia de alelos defectuosos en *CYP2D6* (\*4 y \*5) en los individuos con PAI latente. La posibilidad de tener PAI manifiesta fue menor en portadores de alelos defectuosos en el gen *CYP2D6*. Se observó una tendencia similar en los portadores de alelos defectuosos en *CYP2C9*, sin suficiente evidencia estadística. Los niveles de PBG urinario fueron más bajos que en los portadores de alelos defectuosos en *CYP2C9*, sin embargo, este efecto estaba asociado a la ocurrencia de crisis, actuando éstas como factor explicativo intermedio. No se observó efecto del genotipo de los genes *CYP2C19*, *CYP3A4* y *CYP3A5* en la ocurrencia de crisis ni en la excreción urinaria de ALA y PBG.

#### Discusión:

En general la penetrancia descrita en la población estudiada (52%) fue muy superior a lo reportado clásicamente en PAI (10-20%) y algo más elevada a la asociada a poblaciones PAI en el norte de Europa, como es el caso Suecia (42%),



donde la mutación c.593G>A (p.W198X) es predominante. La penetrancia asociada a la mutación c.669\_698del (48.7%) fue comparable a la de la mutación p.W198X (44%), sugiriendo que estas mutaciones fundadoras tienen un mayor impacto en la funcionalidad de la enzima que otras mutaciones descritas con penetrancia inferior.

En relación al análisis del gen *ALAS1*, se observó homogeneidad genética en la región 5' reguladora (promotor proximal y regiones ADRES), de forma que ésta no interviene en la modulación de la expresión de la PAI en la población estudiada. La posible isla CpG localizada a -4.67 Kb parece que no interviene en la potenciación de la expresión de *ALAS1* en el tejido analizado, puesto que se encontraba en estado metilado en todos los individuos analizados.

Los resultados sugieren que *CYP2D6*\*4 y \*5, y posiblemente *CYP2C9*\*2 y \*3, son factores de protección para desarrollar crisis agudas en PAI. Estos *CYP* podrían constituir genes modificadores de la penetrancia. Se requieren estudios adicionales en poblaciones más extensas de PAI para validar esta asociación y obtener una visión más amplia. La confirmación de estos hallazgos permitiría predecir el perfil de riesgo de crisis para cada individuo basado en el genotipo *CYP* y conduciría al progreso en la medicina personalizada para los portadores de PAI.

**PALABRAS CLAVE:** porfiria aguda intermitente, crisis agudas, susceptibilidad, penetrancia, *ALAS1*, citocromos P450, *CYP2C9* y *CYP2D6*.



## ABSTRACT

Introduction: Acute intermittent porphyria (AIP) is a genetic metabolic disease with autosomal dominant inheritance and low penetrance. It is caused by a partial deficiency of the enzyme hydroxymethylbilane synthase (HMBS), which catalyses the third step of haem biosynthesis, resulting from the alteration of the *HMBS* gene.

AIP is clinically expressed in 10-20% of carriers as episodic acute neurovisceral attacks (manifest AIP), often associated with precipitating factors such as some drugs, endocrine changes, fasting or stress. Latent AIP has been classically associated with carriers with no evidence of acute attacks.

These exogenous factors explain part of the inter-individual variability of the clinical expression of the disease, but the endogenous factors underlying the low penetrance are unknown. Individual genetic background may modulate disease penetrance. In this regard, it has been suggested that genes other than *HMBS* could act as susceptibility factors influencing the expression of acute attacks.

In situations of high demand of haem, there is an overstimulation of its hepatic synthesis, which leads to the accumulation of porphyrinic precursors, 5-aminolevulinic acid (ALA) and porphobilinogen (PBG), in AIP carriers and to the clinical onset of the disease. *ALAS1* gene (ubiquitous isoform of the aminolevulinate synthase) encodes the enzyme limiting haem synthesis and is regulated by haem negative feedback. In addition, *ALAS1* is induced in response to drugs in parallel to the P450 cytochrome genes (*CYP*). *CYP* enzymes are the main liver haem proteins and are highly polymorphic. They participate in the metabolism of drugs and other xenobiotics, as well as in the synthesis of endogenous steroid compounds.

Objectives: The aim of this work was to describe the frequency of manifest AIP in our region and identify genetic variants in regulatory regions of the *ALAS1* gene and in the cytochrome genes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* and *CYP3A5* that act as susceptibility factors for the manifestation of acute attacks in AIP carriers.

Material and methods: A retrospective study of the occurrence of crisis (manifest AIP) in 50 AIP carriers was conducted. DNA samples from peripheral blood were obtained for genetic analysis. A 1.2 Kb of the proximal promoter and two 5' distal drug response regions (ADRES1 and ADRES2) of the *ALAS1* gene were amplified and sequenced. Additionally, the degree of methylation of a possible CpG island, located at -4.67 Kb from the beginning of the transcription, was studied by specific bisulfite sequencing. In addition, the alleles *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*; *CYP2C19\*2*; *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*; *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3*, which determine non-functional enzymes or reduced activity, were genotyped. ALA and PBG in urine levels in asymptomatic phase of the disease were also analysed.

Results: 52% of carriers had manifest AIP, with a mean of acute attacks of 2.5±2 (range: 1-10). The penetrance associated with the founding mutation c.669\_698del was 48.7%.

No genetic variants were detected in the analysed regulatory regions in the *ALAS1* gene. In addition, all individuals had methylated all CG dinucleotides in the putative CpG island.

In relation to *CYP* genes, a higher frequency of defective *CYP2D6* alleles (\*4 and \*5) was observed in individuals with latent AIP. The possibility of having manifest AIP was lower in carriers of defective alleles in *CYP2D6*. A similar trend was observed in carriers of defective *CYP2C9* alleles, without enough statistical evidence. Urinary PBG levels were lower in the carriers of defective *CYP2C9* alleles than in functional allele carriers. However, this effect was associated with the occurrence of acute attacks, being the acute attacks an intermediate explicative factor. No effect of the genotype of the *CYP2C19*, *CYP3A4* and *CYP3A5* genes was observed on acute attack occurrence neither on urinary excretion of ALA and PBG.

#### Discussion:

Overall, the penetrance in the studied population (52%) was much higher than that described classically in AIP (10-20%) and somewhat higher than that associated to populations in northern Europe, such as Sweden (42%), where the mutation c.593G>A (p.W198X) is prevalent. Penetrance associated to the c.669\_698del mutation (48.7%) was comparable to that of the p.W198X mutation (44%), suggesting that these founding mutations have a greater impact on enzyme functionality than other mutations described with lower penetrance.

In regards to the analysis of the *ALAS1* gene, there was genetic homogeneity in the 5' regulatory region (proximal promoter and ADRES), so this region does not modulate clinical manifestation of AIP in the studied population. The putative CpG island located at -4.67 Kb did not seem to be involved in the enhancement of the expression of *ALAS1* in the analysed tissue, since it was in a methylated state in all the analysed individuals.

The results suggest that *CYP2D6*\*4 and \*5, and possibly *CYP2C9*\*2 and \*3, are protective factors for developing acute attacks in AIP. These *CYP* may constitute modifier genes for penetrance. Further studies in larger AIP populations are required to validate this association and to obtain a more comprehensive overview. The confirmation of these findings would allow the acute attack risk profile for each AIP carrier to be predicted based on the *CYP* genotype and lead to progress in personalized medicine for AIP carriers.

**KEYWORDS:** acute intermittent porphyria, acute attacks, susceptibility, penetrance, *ALAS1*, cytochrome P450, *CYP2C9* and *CYP2D6*.



## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar estos años de trabajo, en los que he contado con la ayuda y el apoyo de muchas personas, llega el momento de poder agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han sido imprescindibles para completar esta etapa de mi vida.

En primer lugar, quiero hacer un reconocimiento especial a todos los pacientes de PAI de la Consulta de Genética Médica que de forma desinteresada aceptaron su participación en este estudio. Sin su colaboración y disponibilidad este trabajo no habría sido posible.

También quiero agradecer a la Universidad Católica de Murcia (UCAM) la confianza depositada en mí con la concesión de un contrato predoctoral y el soporte a nivel de financiación del proyecto de investigación que ha permitido el desarrollo de este trabajo.

Esta etapa de mi vida comenzó con la tremenda suerte de conocer a Encarna Guillén. No tengo nada más que palabras de admiración y agradecimiento hacia ti. Confiaste en mí desde el principio, sin apenas conocernos, y siempre ha habido muy buena conexión entre nosotras. Desde entonces has hecho lo posible para conseguir mi bienestar profesional e integrarme en el grupo de investigación. Me transmitiste la curiosidad científica por las porfirias y para mí ha sido un orgullo continuar la línea de investigación que en su momento constituyó tu tesis doctoral y tenerte como directora. He aprendido mucho a tu lado, trabajar para la excelencia y no dejar pasar oportunidades por difíciles que parezcan, con perseverancia se consigue las cosas.

Después he tenido la gran suerte de que todo el equipo de Genética Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, me ha acogido e integrado como un miembro más, ayudando y proporcionando el soporte necesario para la inclusión de los pacientes en el estudio, extracción de muestras, cualquier consulta de historias clínicas e infinidad de cosas. Todas, desde auxiliares, enfermera y facultativas sois excelentes personas y profesionales.

Al Centro de Bioquímica y Genética Clínica, quiero agradecer las facilidades que me han dado. A Guillermo por su ayuda con el registro de las familias con

diagnóstico molecular de PAI y a Pablo por darme soporte con el equipo de PCR cuantitativa. A M<sup>a</sup> Carmen le agradezco su incondicional ayuda en cualquier asunto que me iba surgiendo en este tiempo y la gran amistad que nos ha unido.

A Carmen Carazo, quiero agradecer su apoyo en los análisis estadísticos.

Me queda Juan. Hemos compartido nuestro trabajo y nos hemos ayudado mutuamente para que todo saliese adelante. Creo que hemos hecho buen equipo PAI y te agradezco que hayas compartido el esfuerzo a la hora de citar pacientes, elaborar bases de datos, recoger muestras, etc. Ha sido laborioso, pero lo hemos conseguido. Ánimo a ti también, que te falta poco.

Sin embargo, todo este trabajo técnico ha sido también llevadero gracias a todas aquellas personas de mi entorno que me han arropado personalmente durante estos años. A mis amigos y amigas, que inocentemente me han ido preguntando ¿qué tal la tesis? para seguidamente aguantar con una sonrisa y cara de interés la parrafada sobre las porfirias, con anécdota de vampiros incluida. A mi lote de 5, que me ha dado grandes momentos de diversión y desconexión, y que son un gran apoyo moral. A mis biólogas, que siempre están ahí, que han visto surgir mi interés por la genética y siempre están dispuestas a lo que se necesite.

A mi familia, mis queridos hermanos, mis padres, mis abuelas, mis titos y titas, primos, todos habéis prestado vuestro interés en cómo me iba con el doctorado, me habéis animado y siempre habéis pensado que hago un gran trabajo, eso me ha dado muchos ánimos. A mi hermano Juanlu, que está siempre muy pendiente de mí y me tiene muy presente, aunque esté muy ocupada. Pero en especial, a mi madre y mi padre, yo no sería nadie sin vuestro cariño y los valores que me habéis inculcado, el valor de ser responsable y del trabajo bien hecho. Tampoco hubiese llegado aquí sin todos los recursos que habéis destinado siempre a mi formación, dándoles preferencia. Es inevitable que se me salten las lágrimas sólo al pensar en vosotros.

Por último, a mi bicho, el que verdaderamente ha vivido codo con codo toda la experiencia de mi vida estos últimos 17 años, desde convertirme en bióloga, a ser residente, a entrar al doctorado y ahora defender mi tesis. Nos quedan tantas cosas por vivir juntos... Sin tu apoyo incondicional, tus ánimos, tu comprensión, tu admiración y tu cariño todo lo que he hecho no hubiese salido así de bien. Soy muy afortunada de tenerte a mi lado.



Knowing "why"(an idea) is more important than learning "what" (the fact).

James D. Watson



## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	23
ÍNDICE DE FIGURAS .....	27
ÍNDICE DE TABLAS.....	29
<b>I - INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
1.1. EL GRUPO HEMO Y SU IMPORTANCIA EN EL ORGANISMO .....	33
1.2. SÍNTESIS DEL GRUPO HEMO.....	34
1.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HEMO .....	37
<b>1.3.1. Estructura génica de las isoformas ALAS1 y ALAS2.....</b>	<b>37</b>
<b>1.3.2. Regulación de la síntesis de hemo en células precursoras eritroides</b> .....	<b>40</b>
<b>1.3.3. Regulación de la síntesis de hemo en hígado.....</b>	<b>41</b>
1.3.3.1. <i>Mecanismo represor del hemo.....</i>	<i>42</i>
1.3.3.2. <i>Inducción de ALAS1 por fármacos .....</i>	<i>42</i>
1.3.3.3. <i>Receptores nucleares en la inducción de ALAS1. ....</i>	<i>43</i>
1.3.3.4. <i>Inducción de ALAS1 en respuesta a los niveles de glucosa .....</i>	<i>45</i>
1.4. CATABOLISMO DEL HEMO.....	46
1.5. ENFERMEDADES HEREDITARIAS POR DEFECTO EN LA SÍNTESIS DE HEMO: LAS PORFIRIAS.....	47
<b>1.5.1 Clasificación de las porfirias .....</b>	<b>48</b>
<b>1.5.2 Porfirias agudas.....</b>	<b>50</b>
<b>1.5.3 Porfirias cutáneas.....</b>	<b>51</b>
1.6. PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.....	51
<b>1.6.1 Enzima HMBS .....</b>	<b>52</b>
<b>1.6.2 Base genética de la PAI .....</b>	<b>53</b>
<b>1.6.3 Bioquímica de la PAI.....</b>	<b>56</b>
<b>1.6.4 Clínica de la PAI .....</b>	<b>57</b>
<b>1.6.5 Factores precipitantes de crisis agudas .....</b>	<b>59</b>
<b>1.6.6 Fisiopatología de la PAI.....</b>	<b>62</b>

<b>1.6.7</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	65
<b>1.6.8</b>	<b>Tratamiento</b> .....	68
<b>1.6.9</b>	<b>PAI en la Región de Murcia</b> .....	73
1.7.	<i>ALAS1</i> COMO GEN CANDIDATO MODIFICADOR EN LAS PORFIRIA AGUDAS ..	74
1.8.	GENES <i>CYP</i> COMO CANDIDATOS MODIFICADORES EN LAS PORFIRIAS AGUDAS .....	77
<b>1.8.1</b>	<b>Generalidades de los <i>CYP</i></b> .....	77
<b>1.8.2</b>	<b>Porfirogenicidad de fármacos y <i>CYP</i></b> .....	78
1.8.2.1	<i>Porfirogenicidad de los inductores de los <i>CYP</i></i> .....	78
1.8.2.2	<i>Porfirogenicidad de los inhibidores de los <i>CYP</i></i> .....	79
<b>1.8.3</b>	<b>Variabilidad genética en los <i>CYP</i> y su relación con las porfirias</b> ..	80
<b>1.8.4</b>	<b>Principales <i>CYP</i> responsables del metabolismo hepático de fármacos</b> .....	82
1.8.4.1	<i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C19</i> .....	83
1.8.4.2	<i>CYP2D6</i> .....	84
1.8.4.3	<i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> .....	88
<b>II</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>93</b>
<b>III</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>97</b>
3.1	HIPÓTESIS.....	99
3.2	OBJETIVOS .....	99
<b>IV</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>101</b>
4.1	TIPO DE ESTUDIO.....	103
4.2	POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	103
4.3	RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS .....	104
4.4	RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	104
4.5	PURIFICACIÓN DE ADN Y CONSERVACIÓN.....	105
4.6	ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN <i>ALAS1</i> Y LAS REGIONES <i>ADRES1</i> Y <i>ADRES2</i> .....	105
<b>4.6.1</b>	<b>Amplificación de las regiones de interés</b> .....	106

4.6.2	<b>Electroforesis en gel de agarosa y purificación de los productos de PCR</b> .....	107
4.6.3	<b>Reacción de secuenciación, purificación y electroforesis capilar</b> .	108
4.7	ANÁLISIS DE ISLAS CpG Y GRADO DE METILACIÓN EN LA REGION 5' DEL GEN <i>ALAS 1</i> .....	109
4.7.1	<b>Predicción <i>in silico</i> de islas CpG</b> .....	109
4.7.2	<b>Análisis del estado de metilación</b> .....	112
4.7.2.1	<i>Tratamiento con bisulfito</i> .....	112
4.7.2.2	<i>Amplificación por PCR</i> .....	112
4.7.2.3	<i>Reacción de secuenciación, purificación y electroforesis capilar</i> .....	114
4.8	ANÁLISIS DE GENES <i>CYP</i> .....	114
4.8.1	<b>Genotipado de polimorfismos en los genes <i>CYP</i></b> .....	114
4.8.2	<b>Análisis de delección del gen <i>CYP2D6 (CYP2D6*5)</i></b> .....	117
4.9	DETERMINACIONES DE ALA Y PBG EN ORINA .....	118
4.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	119
<b>V - RESULTADOS</b> .....		<b>121</b>
5.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA .....	123
5.2	ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN REGULADORA 5' DEL GEN <i>ALAS1</i> Y REGIONES ADRES DISTALES.....	124
5.2.1	<b>Amplificación por PCR</b> .....	124
5.2.2	<b>Secuenciación y descripción de variantes genéticas</b> .....	126
5.3	ANÁLISIS DE VARIANTES DE METILACIÓN EN LA ISLA CpG.....	127
5.3.1	<b>Análisis del estado de metilación</b> .....	127
5.4	ANÁLISIS DE LOS GENES <i>CYP</i> .....	129
5.4.1	<b>Genotipado de polimorfismos en los genes <i>CYP</i></b> .....	129
5.4.2	<b>Análisis de delección del gen <i>CYP2D6 (CYP2D6*5)</i></b> .....	133
5.4.3	<b>Distribución genotípica y frecuencias alélicas en los genes <i>CYP</i></b>	133
5.4.5	<b>Análisis del efecto de los genotipos <i>CYP</i> en la aparición de PAI manifiesta</b> .....	136
5.4.6	<b>Análisis del efecto de los genotipos <i>CYP</i> en los niveles de excreción en orina de ALA y PBG</b> .....	140

---

<b>VI – DISCUSIÓN .....</b>	<b>145</b>
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN PAI ESTUDIADA .....	148
6.2 PAPEL DE LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN <i>ALAS1</i> EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CRISIS AGUDAS EN PAI.....	150
6.3 PAPEL DE LOS GENES <i>CYP</i> EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CRISIS AGUDAS EN PAI .....	152
6.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	156
6.5 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN .....	157
<b>VII – CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>VIII – BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>191</b>
ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL .....	193
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.....	196
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS A BIOBANCO.....	197
ANEXO 4. CUESTIONARIO CLÍNICO.....	204

**ABREVIATURAS**

5'UTR	región no traducida en posición 5'
ABCB10	casete de unión a ATP B10 (ATP-binding cassette B10)
AD	autosómica dominante
ADNg	ADN genómico
ADP	porfiria por deficiencia de ALA deshidratasa
ADRES	secuencia intensificadora de respuesta a fármacos del gen <i>ALAS1 (aminolevulinic acid synthase drug-responsive enhancer sequence)</i>
ALA	ácido 5-aminolevulínico
ALAD	ácido 5-aminolevulínico deshidratasa
ALAS	ácido 5-aminolevulínico sintetasa
ALAS1/ <i>ALAS1</i>	isoforma 1 o constitutiva de ALAS/ gen codificante de la isoforma 1 de ALAS
ALAS2/ <i>ALAS2</i>	isoforma 2 o eritroide de ALAS/ gen codificante de la isoforma 2 de ALAS
AP-1	proteína activadora 1 (activator protein-1)
apoCYP	apocitocromos P450
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
CAR	receptor constitutivo de androstanos
CHC	carcinoma hepatocelular
CO	monóxido de carbono
COPROgenio III	coproporfirinógeno III
CPH	Coproporfirina hereditaria
CPO	coproporfirinógeno oxidasa
Cr	creatinina

---

CREB	proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (cAMP responsive element binding protein)
CYP/CYP	enzimas citocromo P450/ genes citocromo P450
dNTP	deoxirribonucleótidos trifosfato
DR	repeticiones directas (direct repeats)
EKLF	factor eritroide similar a Krüppel
EM	metabolizador extensivo
EPO	eritropoyetina
ERC	enfermedad renal crónica
FECH	ferroquelatasa
FOXO1	proteína de la caja Forkhead O1 ( <i>forkhead box protein O1</i> )
GATA-1	factor de transcripción eritroide o factor de transcripción de globina 1
GCs	guanilato ciclasa soluble
GMPc	guanosin monofosfato cíclico
HMB	hidroximetilbilano
HMBS/HMBS	hidroximetilbilano sintasa (también PBGD)/ gen hidroximetilbilano sintasa
HNF3	factor nuclear hepático 3 (hepatic nuclear factor-3)
HO	hemo oxigenasa
HRM	dominio regulador de unión a hemo
IM	metabolizador intermedio
IRE	elemento de respuesta a insulina
IRP	proteínas reguladoras del hierro
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
MLPA	amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)
MFRN1	mitoferrina 1



---

NF-1	factor nuclear 1(nuclear factor-1)
NRF-1	factor respiratorio nuclear 1( <i>nuclear respiratory factor 1</i> )
NRs	receptores nucleares
PAI	porfiria aguda intermitente
pb	pares de bases
PBG	porfobilinógeno
PBGD	porfobilinógeno desaminasa (también HMBS)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCT	porfiria cutánea tarda
PEC	porfiria eritropoyética congénita
PEPT2/PEPT2	transportador de péptido humano 2/ gen del transportador de péptido humano 2
PGC-1 $\alpha$	proteína 1 $\alpha$ coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> co-activator 1 <math>\alpha</math></i> )
PM	metabolizador lento
PPE	protoporfiria eritropoyética
PPELX	protoporfiria eritropoyética ligada a X
PPOX	protoporfirinógeno oxidasa
PROTO IX	protoporfirina IX
PROTOgeno IX	protoporfirinógeno IX
PV	porfiria variegata
PXR	receptor pregnano X
Sp1	proteína de especificidad 1 ( <i>specificity protein 1</i> )
TBP	proteínas de unión a TATA
UM	ultrametabolizador
UROD	coproporfirinógeno descarboxilasa
UROgeno I	uroporfirinógeno I
UROgeno III	uroporfirinógeno III
UROS	uroporfirinógeno sintetasa



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura del grupo hemo.....	33
<b>Figura 1.2.</b> Ruta de síntesis del grupo hemo.....	35
<b>Figura 1.3.</b> Estructura de los genes <i>ALAS1</i> y <i>ALAS2</i> .....	38
<b>Figura 1.4.</b> Detalle de los elementos de respuesta a fármacos en el gen <i>ALAS1</i> .....	45
<b>Figura 1.5.</b> Clasificación clínica de las porfirias.....	50
<b>Figura 1.6.</b> Listado de compuestos porfirrogénicos que clásicamente se han asociado a la precipitación de crisis agudas y que se consideran no seguros.....	60
<b>Figura 1.7.</b> Fármacos de uso seguro en PAI.....	69
<b>Figura 4.1.</b> Vista en <i>UCSC Genome Browser</i> de la isla CpG 1 y amplicones estudiados.....	110
<b>Figura 4.2.</b> Vista en <i>UCSC Genome Browser</i> de la isla CpG 2.....	111
<b>Figura 4.3.</b> Fundamento del genotipado de SNPs por PCR a tiempo real con sondas Taqman.....	115
<b>Figura 5.1.</b> Amplicones del promotor de <i>ALAS1</i> y las dos regiones ADRES visualizadas en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ SAFE y comparados con un marcador de 100 pb.....	124
<b>Figura 5.2.</b> Contexto genómico de las regiones amplificadas en <i>UCSC Genome Browser</i> (GRCh37/hg19).....	125
<b>Figura 5.3.</b> Detalle del electroferograma correspondiente a la variante identificada en el paciente PAI-48.....	126
<b>Figura 5.4.</b> Secuencia correspondiente al amplicón de la región ADRES1.....	127
<b>Figura 5.5.</b> Amplicones de la isla CpG estudiada en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ SAFE comparados con un marcador de 100 pb.....	128
<b>Figura 5.6.</b> Secuencia de la isla CpG estudiada, hallada en todos los pacientes...129	

---

<b>Figura 5.7.</b> Gráficos de discriminación alélica para los distintos polimorfismos estudiados.....	130
<b>Figura 5.8.</b> Representación gráfica del número de copias calculado del gen <i>CYP2D6</i> .....	134
<b>Figura 5.9.</b> Distribución genotípica de los genes <i>CYP</i> .....	135
<b>Figura 5.10.</b> Ocurrencia de crisis por genotipos <i>CYP</i> .....	138
<b>Figura 5.11.</b> Distribución de la excreción de PBG urinaria por genotipo <i>CYP</i> : gráficos de cajas.....	142

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.1.</b> Tipos de porfirias.....	49
<b>Tabla 1.2.</b> Manejo de la sintomatología asociada a las crisis de PAI.....	70
<b>Tabla 1.3.</b> Principales características de CYP2C9 y CYP2C19.....	85
<b>Tabla 1.4.</b> Principales características de CYP2D6.....	87
<b>Tabla 1.5.</b> Principales características de CYP3A4 y CYP3A5.....	90
<b>Tabla 4.1.</b> Amplicones y cebadores utilizados en el análisis de la región 5' de <i>ALAS1</i> .....	106
<b>Tabla 4.2.</b> Amplicones y cebadores para el análisis de la isla CpG.....	113
<b>Tabla 4.3.</b> Detalle de los kits de discriminación alélica TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays.....	116
<b>Tabla 5.1.</b> Características demográficas y clínicas de la población.....	123
<b>Tabla 5.2.</b> Frecuencias alélicas en los genes <i>CYP</i> .....	133
<b>Tabla 5.3.</b> Comparación de las frecuencias alélicas en los genes <i>CYP</i> entre PAI latente y PAI manifiesta.....	136
<b>Tabla 5.4.</b> Análisis de ocurrencia de crisis de PAI por genotipos <i>CYP</i> .....	139
<b>Tabla 5.5.</b> Ocurrencia de crisis por combinación de genotipos <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2D6</i> .....	139
<b>Tabla 5.6.</b> Análisis de PBG en orina por genotipos <i>CYP</i> .....	140
<b>Tabla 5.7.</b> Análisis de ALA en orina por genotipos <i>CYP</i> .....	141
<b>Tabla 5.8.</b> ALA y PBG urinarios por ocurrencia de crisis .....	143



# **I - INTRODUCCIÓN**

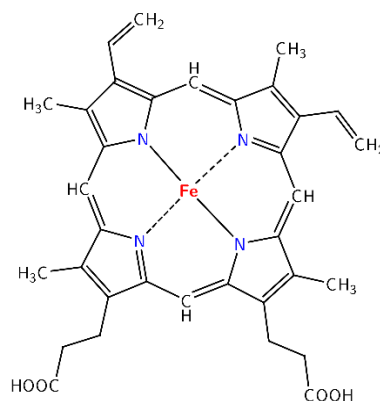




## I – INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL GRUPO HEMO Y SU IMPORTANCIA EN EL ORGANISMO

El hemo es un grupo prostético constituido por un anillo tetrapirrólico o protoporfirina IX, unido a un ión  $\text{Fe}^{2+}$  (ión ferroso) que forma parte de las hemoproteínas (Figura 1.1). Las hemoproteínas desempeñan un papel importante en diferentes funciones biológicas. Entre ellas se encuentran: la hemoglobina y mioglobina, en las que el grupo hemo es esencial para la unión y transporte de oxígeno; los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial, en los que el hemo participa en el transporte electrónico necesario para el metabolismo energético; los citocromos mitocondriales y microsomales del complejo P450, responsables de la síntesis de hormonas esteroideas y del metabolismo oxidativo de compuestos lipofílicos exógenos (por ejemplo fármacos) y endógenos; la peroxidasa y catalasa mitocondrial, que llevan a cabo la activación y degradación del peróxido de hidrógeno; la triptófano pirrolasa, necesaria para la degradación de triptófano; la guanilato ciclasa y la óxido nítrico sintetasa, necesarias para la síntesis de óxido nítrico y el funcionamiento de la vía de señalización celular mediada por éste (1).



**Figura 1.1.** Estructura del grupo hemo.

Además, el grupo hemo desarrolla un papel importante en la regulación de la síntesis de algunas proteínas como los citocromos, la mieloperoxidasa, la hemo oxigenasa-1, el receptor de transferrina y las enzimas que participan en su propia biosíntesis (2). También regula la proliferación de distintos tipos celulares (3-6).

Sin embargo, pese a su importante papel en el organismo, el hemo tiene efectos tóxicos (7). En estado libre cataliza la oxidación, formación de uniones cruzadas y agregación de las proteínas y su degradación en pequeños péptidos. También produce degradación de lípidos mediante peroxidación y daña el ADN mediante estrés oxidativo. Al presentar propiedades lipofílicas, puede insertarse en las bicapas lipídicas de las membranas celulares y organelas, como la mitocondria o el núcleo, y desorganizar el citoesqueleto. La desorganización del citoesqueleto de los eritrocitos lo convierte en un potente agente hemolítico. Por último, el hemo libre produce daño endotelial generando alteraciones vasculares.

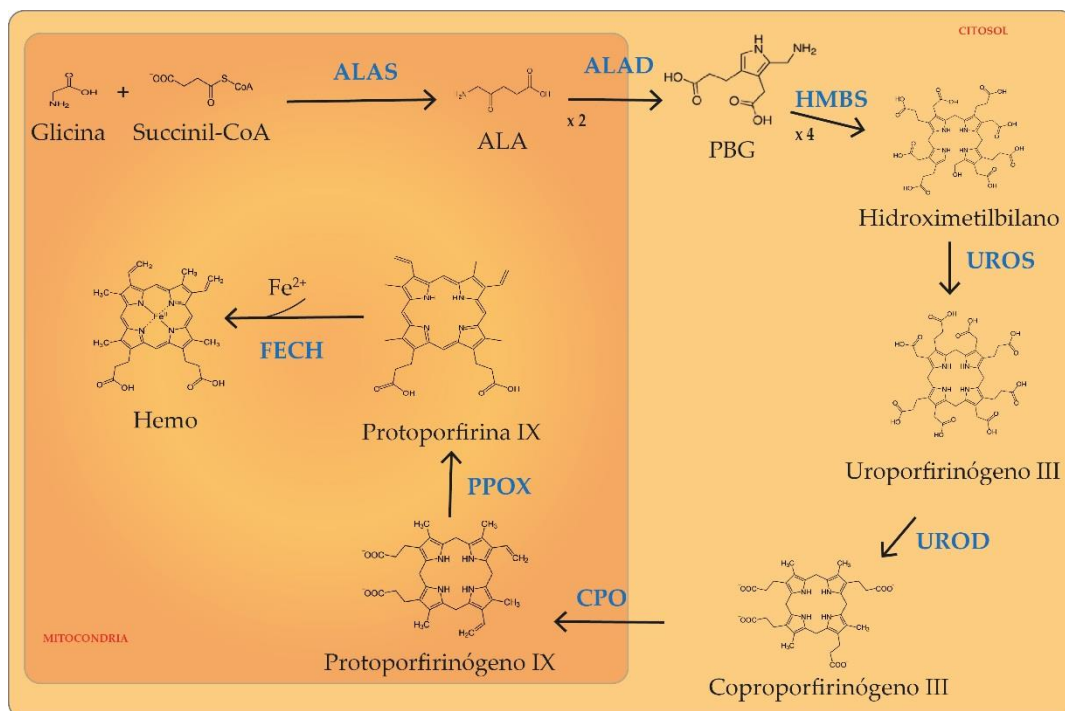
Dada las funciones y efectos del grupo hemo en el organismo, las alteraciones en su síntesis, acumulación y/o degradación pueden conducir a diversas patologías, que pueden ser de origen adquirido o hereditario. Particularmente, los defectos enzimáticos de origen genético en alguno de los pasos de la síntesis de hemo conducen a enfermedades como las porfirias, de especial interés en este trabajo de tesis doctoral, o la anemia sideroblástica. Los defectos de biosíntesis del hemo también pueden darse bajo circunstancias adquiridas como la intoxicación con plomo, el cual inhibe tres de las enzimas biosintéticas.

Por otro lado, diversas situaciones patológicas como la anemia hemolítica, la anemia falciforme, la malaria o la miolisis, entre otras, pueden alterar la homeostasis del hemo generando un aumento de su forma libre, con su consecuente citotoxicidad.

## 1.2. SÍNTESIS DEL GRUPO HEMO

La síntesis del grupo hemo se produce en todas las células del organismo, aunque la mayoría (80%) se localiza en médula ósea, en células precursoras eritroides para la síntesis de hemoglobina, y un 15% en el hígado, donde se concentra mayoritariamente la síntesis de hemoproteínas.

La vía metabólica de síntesis consta de ocho pasos que darán lugar a la producción de porfirinas intermediarias y finalmente hemo (Figura 1.2). Se inicia en la mitocondria, con la condensación de una molécula de glicina y una de succinil-CoA para formar una molécula de ácido 5-aminolevulínico (ALA), catalizada por la ALA sintetasa (ALAS) dependiente de fosfato de piridoxal. Existen dos isoformas de ALAS codificadas por dos genes distintos: la isoforma 1 (ALAS1) de expresión constitutiva en todas las células y la isoforma 2 (ALAS2) o isoforma eritroide, que se expresa exclusivamente en células precursoras eritroides y es la responsable de la síntesis de hemo para la hemoglobina. Ambas isoformas se diferencian principalmente en su mecanismo regulador. No se han descrito mutaciones patogénicas en el gen *ALAS1*. Sin embargo, mutaciones de pérdida de función en el gen *ALAS2* son responsables de anemia sideroblástica ligada a X (8, 9) y mutaciones con ganancia de función se han asociado a protoporfiria eritropoyética ligada a X (PPELX) (10).



**Figura 1.2.** Ruta de síntesis del grupo hemo.

En el siguiente paso, el ALA sale de la mitocondria y una vez en el citosol, dos moléculas se condensan por acción de ALA deshidratasa (ALAD) para formar el monopirrol porfobilinógeno (PBG).

A continuación, cuatro moléculas de PBG polimerizan mediante la acción de hidroximetilbilano sintasa (HMBS), o PBG desaminasa (PBGD), formando un tetrapirrol no cíclico, inestable, denominado hidroximetilbilano (HMB).

El HMB sirve como sustrato de la uroporfirinógeno III sintetasa (UROS) que lo transforma, cerrando el anillo pirrólico, en uroporfirinógeno III (UROgeno III). El HMB también puede ciclarse espontáneamente formando el isómero UROgeno I, sin embargo, éste no actúa de sustrato para la síntesis de hemo.

El UROgeno III se convierte en coproporfirinógeno III (COPROgeno III) por la eliminación secuencial de los cuatro grupos carboxílicos de las cadenas laterales de ácido acético, en una reacción catalizada por uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD).

La siguiente modificación de la cadena lateral es la descarboxilación oxidativa de los grupos propionato de los anillos pirrol A y B del COPROgeno III para formar protoporfirinógeno IX (PROTOgeno IX). Esta reacción es catalizada por la coproporfirinógeno oxidasa (CPO), una enzima localizada en el espacio intermembrana mitocondrial. El UROgeno I también puede ser descarboxilado generando COPROgeno I, pero sólo el COPROgeno III puede ser convertido en protoporfirina IX.

El PROTOgeno IX se oxida a protoporfirina IX (PROTO IX) por la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPOX), localizada en la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Esta oxidación de seis electrones requiere oxígeno como aceptor terminal de electrones.

El paso final en la vía biosintética ocurre en la superficie interna de la membrana mitocondrial interna, donde un ión  $\text{Fe}^{2+}$  se incorpora a la protoporfirina IX (PROTO IX) por acción de la ferroquelatasa (FECH) dando lugar a ferroprotoporfirina IX o hemo. La FECH forma parte de un complejo multienzimático compuesto por el importador de hierro mitocondrial mitoferrina 1 (MFRN1) y el transportador ABCB10 (del inglés ATP-binding cassette B10) permitiendo el acoplamiento de la importación de hierro a la mitocondria y su incorporación a la PROTO IX (11).

Un mínimo porcentaje de las hemoproteínas son de localización intramitocondrial, por lo que mayoritariamente el hemo ha de salir de la mitocondria.

### 1.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HEMO

El hemo se encuentra en continua formación y eliminación asegurando el suministro para las distintas funciones fisiológicas sin generar un exceso, debido a su potencial toxicidad (7). La regulación tanto de su síntesis como de su eliminación es crítica para mantener una concentración de hemo intracelular apropiada.

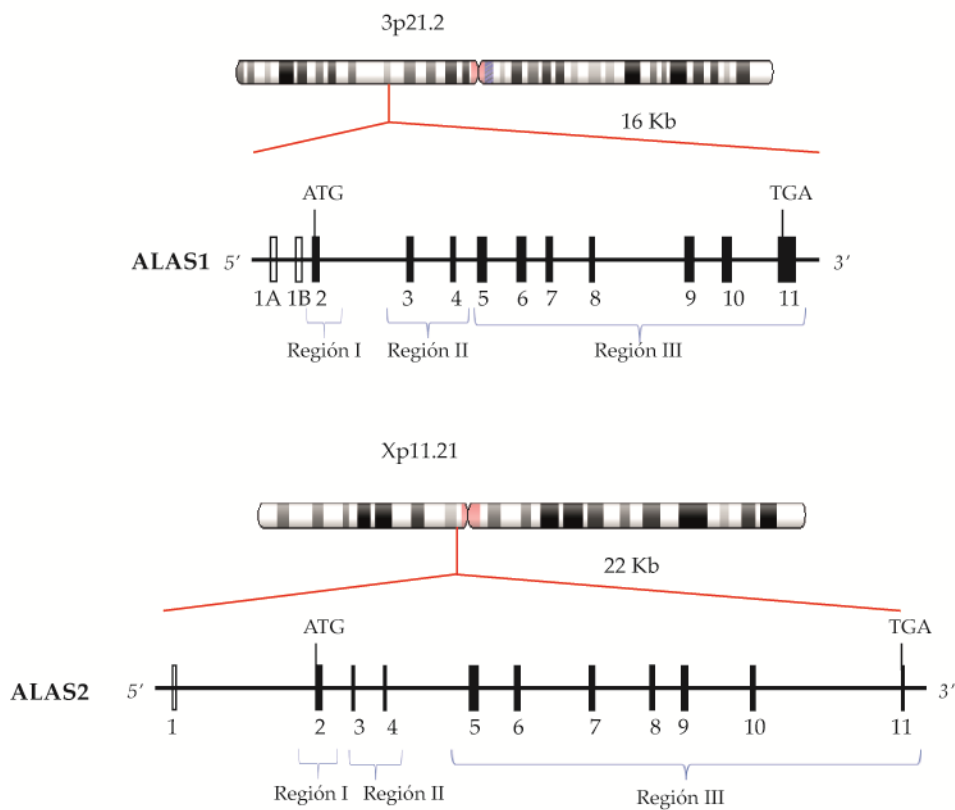
La síntesis del grupo hemo se controla a nivel de ALAS, la primera enzima de la vía. Comparado con otras enzimas de la vía de síntesis, ALAS constituye la enzima con menor actividad relativa tanto en hígado como en células eritroides. En el hígado, su vida media es de las más cortas de las enzimas mitocondriales y su síntesis es inducible por fármacos inductores de los citocromos P450 (CYP), para dar respuesta a un aumento en la síntesis de estas hemoproteínas. Sin embargo, el resto de enzimas de la síntesis de hemo no se encuentran en concentraciones consideradas limitantes y no presentan una respuesta inductiva a fármacos. Estas evidencias convierten a ALAS en la enzima limitante de la síntesis de hemo (12). Los mecanismos reguladores a nivel de esta enzima difieren entre las células precursoras eritroides y los hepatocitos o el resto de células del organismo, debido a diferencias entre las isoformas ALAS1 y ALAS2.

#### 1.3.1. Estructura génica de las isoformas ALAS1 y ALAS2

Dos genes distintos codifican las isoformas de ALAS. La isoforma 1 de expresión ubicua está codificada por el gen *ALAS1*, un gen constitutivo o *housekeeping* que se expresa en todas las células del organismo, con predominio en las células hepáticas. Además de una expresión basal, *ALAS1* presenta regulación específica de tejido y es inducible por diversos factores. La isoforma 2 o eritroide está codificada por el gen *ALAS2*, que se expresa exclusivamente en células precursoras eritroides y es crítica para la eritropoyesis. La expresión de *ALAS1* no

puede sustituir las necesidades de *ALAS2* en células eritroides, esto indica la existencia de un mecanismo regulador específico de tejido.

Los genes *ALAS1* y *ALAS2* presentan la misma organización de exones/intrones (Figura 1.3). En ambos genes se distinguen tres regiones. La región I codifica un péptido señal, de localización mitocondrial, que permite el reconocimiento del precursor de la proteína para el traslado al interior de la mitocondria. La región II se corresponde con el extremo amino-terminal de la proteína madura y la región III codifica para el dominio catalítico de la enzima. Además, contienen un dominio regulador de unión a hemo (HRM) junto a la señal de localización mitocondrial y otros dos posibles en la zona N-terminal de la región II y en la región N-terminal de la proteína madura (13).



**Figura 1.3.** Estructura de los genes *ALAS1* y *ALAS2*.

El gen *ALAS1* se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p21.2) y se expande aproximadamente 16 kilobases (Kb). Consiste en diez exones codificantes (exones 2-11) y dos exones adicionales no codificantes (exones 1A y 1B) en la región no traducida 5' (5'UTR). El corte y empalme alternativo de los exones da lugar a un transcrito mayoritario, en el cual se omite el exón 1B, y un transcrito minoritario con los exones 1A y 1B, que no parece tener un papel importante en la regulación de la síntesis del hemo ya que su tasa de producción es constante entre distintos tejidos (14).

El gen *ALAS1* en rata y humano comparten múltiples sitios de inicio de la transcripción específicos de tejido, dando lugar a transcritos de distinto tamaño en cerebro e hígado. En el hígado, el inicio de la transcripción se produce mayoritariamente en el primer sitio de inicio en posición 3' cercano al elemento TATA, este sitio ha demostrado ser responsable tanto de la transcripción basal como de origen inducida (14).

El gen *ALAS1* presenta entre un 40-90% de conservación de aminoácidos entre especies. Su organización en humanos es similar a la de sus ortólogos de rata, ratón y pollo, excepto porque el gen de rata sólo contiene un exón no codificante en la región 5'UTR y el gen de pollo no contiene ninguno.

Mediante ensayos de transfección de la región flanqueante 5' del gen *Alas1* de rata, se ha determinado que la región mínima que inicia la transcripción se expande entre los nucleótidos de las posiciones +1 y -161, respecto al inicio de la transcripción (15). Así mismo, la extensión de esta región hasta la posición -479 confiere un aumento relativo de la expresión, actuando como un elemento intensificador (*enhancer*), mientras una expansión hasta la posición -1189 genera una disminución. En la región intermedia (posición -161 a -479) se han descrito sitios de unión a los factores de transcripción HNF3 (*hepatic nuclear factor-3*), NF-1 (*nuclear factor-1*), AP-1 (*activator protein-1*) y CREB (*cAMP responsive element binding protein*), siendo éstos necesarios para la expresión basal de *Alas1* (16, 17). También se han identificado sitios de unión para otros factores de transcripción que inducen la expresión de *Alas1* en situaciones de aumento del requerimiento del grupo hemo. *Alas1* comparte sitios de unión a NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) con otras proteínas mitocondriales. NRF-1 parece tener un papel coordinador en la expresión de estos genes en respuesta a un aumento del metabolismo

energético, el cual genera un aumento en la síntesis de citocromos respiratorios (15). Además, se han identificado elementos de respuesta a insulina (IRE) en la región promotora del gen *Alas1* murino, que une el factor de transcripción FOXO1 (*forkhead box protein O1*), involucrado en la inducción del gen en situaciones de baja concentración de glucosa (18). Cabe destacar que el gen *ALAS1* humano comparte un 63% de homología en la región promotora proximal con sus ortólogos en rata y ratón (14).

El gen *ALAS2* se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.21) con una extensión de 22 Kb. Consta de diez exones codificantes (exones 2-11) y un exón no codificante (exón 1) en la región 5'UTR que contiene un elemento de respuesta a hierro. El corte y empalme alternativo del exón 4 da lugar a un segundo transcrito más corto, con una actividad similar a la forma completa cuyo significado biológico es desconocido (19).

El promotor de *ALAS2* contiene dos sitios de unión al factor de transcripción de globina 1 o factor de transcripción eritroide (GATA-1), que contribuye sustancialmente a la expresión *in vitro* del gen, así como una secuencia TATA no canónica, que une indistintamente GATA-1 y proteínas de unión a TATA (TBP) (20). Además, se han identificado dos secuencias CACCC que parecen ser importantes en la expresión de *ALAS2*, también presentes en el promotor de otros genes de expresión eritrocitaria, como las globinas. Se han descrito tres factores de transcripción de la familia Krüppel, en concreto el factor eritroide similar a Krüppel (EKLF), el factor similar a Krüppel básico y Sp1 (*specificity protein 1*), que son capaces de unirse a la secuencia CACCC. El papel de estos factores de transcripción en la expresión *in vivo* de *ALAS2* está poco definido. Sin embargo, EKLF es importante en la expresión de la  $\beta$ -globina, por lo que podría tener un papel en la coordinación de la síntesis del grupo hemo y la globina (21).

### 1.3.2. Regulación de la síntesis de hemo en células precursoras eritroides

En las células precursoras eritroides o eritroblastos, se requieren elevadas cantidades de hemo para la formación de hemoglobina. La eritropoyesis y la síntesis de hemo están controladas por la eritropoyetina (EPO), pero moduladas



por los niveles de hierro, que ejercen un mecanismo de retroalimentación positiva sobre *ALAS2*.

La expresión del gen *ALAS2* está regulada por factores de transcripción específicos de células eritroides, como GATA-1 (20). Estos factores de transcripción específicos se unen a la región promotora de *ALAS2*, de las globinas y otros genes permitiendo su síntesis en respuesta a EPO (21).

La expresión de *ALAS2* también está regulada a nivel traduccional. Las proteínas reguladoras del hierro (IRP) 1 y 2 se unen a elementos de respuesta a hierro en la región 5'UTR del ARNm de *ALAS2* (22). La actividad de las IRP está modulada por la disponibilidad de hierro. En las células con deficiencia de hierro, la unión de IRP inhibe la traducción de *ALAS2*. Sin embargo, cuando hay suministro de hierro se induce la degradación de las IRP permitiendo la traducción del ARNm. Este mecanismo asegura la producción de hemoglobina durante la diferenciación de los eritrocitos y permite que no se produzca hemo en exceso cuando los niveles de hierro son limitantes.

### 1.3.3. Regulación de la síntesis de hemo en hígado

A diferencia de las células eritroides, en los hepatocitos y resto de células del organismo, la síntesis de hemo está limitada por la disponibilidad de hemo libre, denominado "pool regulador de hemo". Éste ejerce una retroalimentación negativa sobre su propia síntesis a nivel de la primera enzima, *ALAS1*. La cantidad de hemo libre disponible viene determinada por la demanda para la formación de hemoproteínas y su tasa de catabolismo. En el hígado la demanda de hemo depende mayoritariamente de su consumo por los CYP, para el metabolismo esteroideo y la detoxificación de xenobióticos, y de la actividad de la enzima catabolizante de hemo, la hemo oxigenasa (HO).

Además del mecanismo regulador dependiente de hemo, *ALAS1* es inducible por diversos fármacos y compuestos endógenos de naturaleza esteroidea, y bajo situaciones de estrés como el ayuno.

#### 1.3.3.1. *Mecanismo represor del hemo*

Se han identificado cinco mecanismos por los cuales el hemo libre regula negativamente la expresión de *ALAS1*. El hemo inhibe la transcripción del gen *ALAS1* (23, 24), reduce la estabilidad del ARNm (25) e inhibe su traducción impidiendo la elongación de la cadena polipeptídica (26). Además, modula la entrada del precursor proteico de *ALAS1* al interior de la mitocondria, donde ejerce su actividad (27, 28). La unión de hemo al dominio HRM de *ALAS1* impide su transporte al interior de la mitocondria (29). Por último, se ha descrito un mecanismo por el cual el hemo promueve la eliminación de la proteína madura *ALAS1* a través de proteasas dependientes de ATP del sistema proteolítico mitocondrial (30, 31).

#### 1.3.3.2. *Inducción de ALAS1 por fármacos*

La actividad de *ALAS1* aumenta con la exposición a compuestos lipofílicos y fármacos como el fenobarbital, que también inducen la síntesis de varios CYP. En un principio se pensó que este aumento en la actividad de *ALAS1* se debía exclusivamente a la supresión de los mecanismos de retroalimentación negativa dependientes de hemo (32). Es decir, los fármacos inducirían la síntesis de CYP, que consumen hemo para su formación, generando un aumento secundario de la expresión de *ALAS1*. Según esta hipótesis, si se inhibía la síntesis de hemo o se estimulaba su degradación se produciría un incremento de *ALAS1*, incluso en ausencia de los fármacos o compuestos lipofílicos. Ciertamente, distintos estudios en cultivos de células animales describieron un aumento en la actividad de *ALAS1* tras el tratamiento con inhibidores de la síntesis de hemo, tales como succinilacetona (33, 34). Sin embargo, otros estudios fracasaron en demostrar un aumento en la expresión de ARNm de *ALAS1* en cultivos celulares de hepatocitos animales tratados con inhibidores de la síntesis de hemo, en ausencia de fármacos inductores (35, 36). También se demostró que la expresión de ARNm de *ALAS1* y de los distintos apocitocromos P450 (apoCYP) se producía simultáneamente en respuesta a fármacos, indicando que la depleción de hemo no es un requisito en la inducción de la enzima a nivel transcripcional. Posteriormente, otro estudio demostró que la sobreexpresión de apoCYP en cultivo celular no era suficiente para inducir un incremento de ARNm de *ALAS1* en ausencia de fármacos (37).

Por lo tanto, la estimulación de la síntesis de ALAS1, y por ende de las porfirinas y el grupo hemo, no sólo depende de mecanismos de retroalimentación negativa del hemo. También existe un efecto inductor directo mediado por fármacos y compuestos lipofílicos, conocidos como fármacos porfirrogénicos precisamente por su capacidad inductora de esta vía de síntesis.

#### 1.3.3.3. *Receptores nucleares en la inducción de ALAS1.*

El hecho de que haya una expresión simultánea de ARNm tanto de ALAS1 como de apoCYP en respuesta a determinados fármacos indica la existencia de un mecanismo de inducción compartido.

La inducción de los CYP se produce por cinco mecanismos que actúan a nivel transcripcional, a excepción de uno de ellos, que afecta directamente a la vida media de la holoenzima (38). Salvo esta excepción, el aumento de la tasa transcripcional de estas enzimas se produce por la unión de receptores nucleares (NRs).

Los receptores nucleares son una superfamilia de proteínas de unión al ADN, que tras la asociación a un ligando, actúan como factores de transcripción en múltiples genes. Distintos fármacos, xenobióticos ambientales y compuestos endógenos de naturaleza lipofílica (hormonas esteroideas, esteroides, hormonas tiroideas, retinoides y ácidos biliares) actúan como ligando de los NRs.

En humanos, de los 48 NRs que forman la superfamilia, PXR (receptor de pregnano X) y CAR (receptor constitutivo de androstanos) constituyen los principales efectores en la regulación transcripcional de los genes CYP mediada por fármacos. Más del 50% de los fármacos de prescripción se metabolizan por CYP cuyos genes son diana de estos receptores (39). Sólo algunos fármacos actúan como ligando de otros tipos de NRs como AhR (receptor de aril hidrocarburos) o los receptores de la familia PPAR (receptor activado por proliferador de peroxisoma), que juegan también un papel importante en la regulación del balance energético.

Tras la unión a su ligando, los NRs se traslocan al núcleo de la célula donde se asocian con el receptor nuclear RXR (receptor retinoide X), formando un heterodímero que se une a elementos de respuesta en el ADN. Los elementos de respuesta a NRs son sitios en el ADN que contienen una o varias secuencias

hexaméricas consenso repetidas de forma palindrómica o directa (DR; *direct repeat*) y separadas por un número variable de nucleótidos, por lo que reciben el nombre de *half sites*.

Se conocen elementos de respuesta a fármacos en los genes de distintas familias CYP (40) que contienen elementos de respuesta a NRs donde se han identificado uno o varios de los denominados *half sites* de repetición directa, por ejemplo del tipo DR-4 (41-43).

La existencia de elementos de respuesta a fármacos en los genes de los distintos CYP y la implicación de los NRs como xenosensores condujo a la búsqueda de elementos similares en el gen *ALAS1*. Diversos estudios contribuyeron a la identificación de estos elementos, tanto en humanos como en otras especies animales (44-46). Podvinec (2004) demostró que el promotor proximal del gen *ALAS1* humano, pese a ser responsable de la expresión basal, no es capaz de producir un aumento de la transcripción en respuesta a fármacos típicamente porfirrogénicos, como fenobarbital y rifampicina, entre otros. Además, identificó dos regiones que mostraron inducibilidad por fármacos a las que denominó ADRES (*aminolevulinic acid synthase drug-responsive enhancer sequence*). Estas regiones están localizadas aproximadamente a -20 Kb (ADRES1) y -16 Kb (ADRES2) en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de *ALAS1*. En estas regiones se identificaron, mediante análisis computacional, varias posiciones con secuencias consenso del tipo DR-4 y DR-5 (Figura 1.4), que posteriormente demostraron su papel en la inducción transcripcional mediada por CAR y PXR en ensayos de expresión *in vitro* (46).

Así se estableció el papel fundamental de los NRs y los elementos ADRES en la inducción simultánea de los genes *CYP* y *ALAS1*, en un mecanismo independiente de los niveles de hemo libre. En situaciones fisiológicas, la síntesis de hemo se mantiene estrechamente controlada y a bajos niveles, para evitar los efectos tóxicos de su acumulación. En situaciones de exposición a fármacos, la síntesis de hemo se incrementa mediante la inducción de *ALAS1* para dar respuesta a la síntesis de CYP. Tras la acumulación de hemo, éste ejerce su mecanismo regulador reprimiendo su síntesis y permitiendo el retorno a unos niveles basales. De esta forma la célula permite dar respuesta a un aumento en la

demanda de hemo cuando es necesario y a su vez mantener unos niveles basales no tóxicos de hemo y sus precursores.



**Figura 1.4.** Detalle de los elementos de respuesta a fármacos en el gen *ALAS1*. Arriba se muestra la secuencia de la región ADRES1, abajo se muestra la secuencia de la región ADRES2. En azul aparecen los hexámeros que constituyen cada half site, la flecha indica la dirección de la secuencia consenso. En verde se indican los nucleótidos espaciadores. Adaptado de Podvinec (2004).

#### 1.3.3.4. Inducción de *ALAS1* en respuesta a los niveles de glucosa

La síntesis de hemo es importante en el metabolismo energético para suplir la demanda de citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente en situaciones de mayor requerimiento como el ayuno donde, por falta de glucosa, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la gluconeogénesis son las principales fuentes energéticas.

Durante el ayuno o un ejercicio físico extenuante se induce el factor PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1  $\alpha$* ) en el hígado. El aumento en la oxidación de ácidos grasos y la elevación de la gluconeogénesis hepática están bajo control de PGC-1 $\alpha$  (47, 48). PGC-1 $\alpha$  es un coactivador de NRs y otros factores de transcripción, inducible por glucagón, que corregula la transcripción de enzimas gluconeogénicas y ALAS1. Experimentos en modelos animales murinos han demostrado que PGC-1 $\alpha$  activa la transcripción del gen *Alas1* mediante la coactivación de los factores de transcripción FOXO1 y NRF-1. Estos factores se unen directamente a elementos IRE y sitios de unión a NRF-1, respectivamente, localizados en el promotor del gen *Alas1* (18). FOXO1 también actúa como coactivador de la transcripción de *Alas1* mediada por CAR/PXR, así como de genes *CYP* y enzimas gluconeogénicas (49). Cuando los niveles de glucosa se normalizan o en situaciones de hiperglucemia se promueve la salida de FOXO1 del núcleo impidiendo la activación de la transcripción, por un mecanismo mediado por la insulina. FOXO1 no sólo responde a los niveles de glucosa, también promueve la transcripción de sus genes diana en respuesta a distintos factores estresores (50).

En definitiva, la expresión de *ALAS1* se induce cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos y hay secreción de glucagón que induce PGC-1 $\alpha$ , mientras que se reprime en respuesta a insulina, cuando los niveles de glucosa se normalizan.

#### 1.4. CATABOLISMO DEL HEMO

La enzima HO juega un papel importante en la protección de las células frente al estrés oxidativo inducido por hemo. Esta enzima, localizada en las membranas del retículo endoplasmático liso, cataliza la degradación de hemo formando biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe<sup>2+</sup>). Después la biliverdina se reduce a bilirrubina por acción de la biliverdina reductasa, que se excreta a través de la vía biliar.

Se conocen tres isoformas de la HO codificadas por los genes *HO-1*, *HO-2* y *HO-3* (51). La isoforma HO-1 normalmente se expresa a bajos niveles, pero tiene una alta capacidad de inducción por diversos estímulos que incluyen estrés oxidativo, hipoxia, lipopolisacáridos, metales pesados, citoquinas y el propio

hemo, que es el inductor fisiológico más potente. El aumento en la actividad de HO-1 se ha observado en muchos tejidos, principalmente hígado, riñón, glándula adrenal y ovarios, entre otros. La isoforma HO-2 tiene expresión constitutiva y no presenta capacidad inducible. Su expresión es alta en cerebro y testículos donde parece que desarrolla un papel importante en la síntesis de CO, un potente vasodilatador y molécula de señalización (52). La isoforma HO-3 tiene poca capacidad de degradación del hemo.

Dado que la actividad de la HO tiene efecto en los niveles de hemo libre en los hepatocitos, se ha sugerido que de forma indirecta podría aumentar la expresión de *ALAS1* a través del consumo de hemo. Factores como la inflamación, enfermedades infecciosas y el ayuno producen inducción hepática de HO-1 (53).

#### 1.5. ENFERMEDADES HEREDITARIAS POR DEFECTO EN LA SÍNTESIS DE HEMO: LAS PORFIRIAS

Existen diferentes alteraciones o defectos en la síntesis del grupo hemo de carácter hereditario y adquirido. Entre ellas encontramos las porfirias, la anemia sideroblástica ligada a X y la intoxicación por plomo (13).

El término porfiria procede del griego y hace referencia a unas sustancias químicas de color rojo púrpura llamadas porfirinas. Las porfirinas son compuestos intermediarios en la síntesis del grupo hemo, que se acumulan de forma característica en los enfermos con porfiria.

El primer caso de porfiria, muy posiblemente de protoporfiria, descrito en la literatura científica data del año 1874. El Dr. J. H. Schultz describió el caso de un hombre de 33 años de edad que sufría de sensibilidad cutánea, esplenomegalia y orina rojiza desde su infancia (54). Más tarde, en 1889, B.J. Stokvis publicó el primer caso y descripción clínica de una porfiria aguda (55). Desde entonces comenzaron a describirse multitud de casos y a estudiarse las bases fisiopatológicas de estas enfermedades.

Las porfirias son errores innatos del metabolismo debidos a un defecto enzimático en la biosíntesis de hemo, la mayoría de origen genético aunque algunos subtipos son de carácter adquirido (56). Cuando el defecto enzimático es fisiológicamente significativo se produce un acúmulo de los precursores de la ruta

anteriores al paso afectado, pasando a la circulación y excretándose a través de la orina y la bilis. Cada defecto enzimático produce un patrón característico de acumulación de los precursores, ALA y PBG, y/o de porfirinas, que se asocian clínicamente a la aparición de una sintomatología característica.

La sobreproducción y acúmulo de precursores (ALA y PBG) se asocia a crisis o ataques neurovisceral agudos, caracterizados por dolor abdominal y síntomas neurológicos. Por otro lado, la sobreproducción y acumulación por el hígado o médula ósea de porfirinas intermediarias produce fotosensibilidad cutánea, fragilidad de la piel y formación de ampollas.

### 1.5.1 Clasificación de las porfirias

Las porfirias pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios: por el defecto enzimático y el tipo de herencia; por el lugar donde se producen las porfirinas y/o precursores y por la clínica.

Se conocen ocho tipos principales de porfirias resultantes de variantes genéticas patogénicas o mutaciones en los distintos genes codificantes de las enzimas de la biosíntesis del hemo (57), a excepción del gen *ALAS1*, para el cual no hay mutaciones conocidas causantes de estas patologías (Tabla 1.1.). Las mutaciones causantes de porfiria generan pérdida de función, salvo en el caso de la PPELX generada por mutaciones de ganancia de función en el gen *ALAS2* (10, 58).

En función del lugar primario de sobreproducción de las porfirinas y/o de sus precursores, las porfirias se clasifican en hepáticas y eritropoyéticas, aunque algunas presentan características superpuestas. En las eritropoyéticas la sobreproducción se produce mayoritariamente en los eritrocitos y su clínica es cutánea, mientras que en las porfirias hepáticas hay predominio de acumulación en los hepatocitos y son de clínica aguda.

Clínicamente, se distingue entre porfirias agudas y cutáneas. En las porfirias agudas se produce acúmulo de ALA y PBG, que generan sintomatología en forma de crisis neurovisceral, mientras que en las porfirias cutáneas se produce acúmulo de porfirinas fotosensibilizantes de la piel (59). Sin embargo, algunas porfirias presentan características clínicas mixtas (Figura 1.5).



Tabla 1.1. Tipos de porfirias.

Porfiria	Defecto enzimático	Gen	Herencia	Síntomas neuroviscerales	Síntomas cutáneos
Protoporfiria eritropoyética ligada a X (PPELX)	ALA sintetasa 2	<i>ALAS2</i>	LXD	-	+
Porfiria por deficiencia de ALA deshidratasa (ADP)	ALA deshidratasa	<i>ALAD</i>	AR	+	-
Porfiria aguda intermitente (PAI)	Hidroximetilbilano sintasa o PBG desaminasa	<i>HMBS*</i>	AD	+	-
Porfiria eritropoyética congénita (PEC)	Uroporfirinógeno III sintetasa	<i>UROS</i>	AR	-	+
Porfiria cutánea tarda (PCT)	Uroporfirinógeno descarboxilasa	<i>UROD*</i>	AD y adquirida	-	+
Coproporfiria hereditaria (CPH)	Coproporfirinógeno oxidasa	<i>CPO*</i>	AD	+	+
Porfiria variegata (PV)	Protoporfirinógeno oxidasa	<i>PPOX*</i>	AD	+	+
Protoporfiria eritropoyética (PPE)	Ferroquelatasa	<i>FECH</i>	AD	-	+

AR: autosómica recesiva; AD: autosómica dominante; LXD: ligada a X dominante. \*Existen variantes clínicas raras de porfiria con mutaciones en ambos alelos de los genes HMBS (PAI homocigota), UROD (porfiria hepatoeritropoyética), CPO (CPH homocigota) y PPOX (PV homocigota), que presentan una sintomatología más grave que sus homólogos heterocigotos.

---

## CLASIFICACIÓN CLÍNICA

---

### Porfirias agudas

Porfiria por deficiencia de ALA deshidratasa

Porfiria aguda intermitente (PAI)

### Porfirias cutáneas

Porfiria eritropoyética congénita (PEC)

Porfiria cutanea tarda (PCT)

Protoporfiria eritropoyética (PPE)

Protoporfiria eritropoyética ligada a X  
(PPELX)

### Porfirias mixtas

Coproporfiria hereditaria (CPH)

Porfiria variegata (PV)

---

**Figura 1.5.** Clasificación clínica de las porfirias. En azul se señalan las porfirias hepáticas y en rojo las eritropoyéticas.

### 1.5.2 Porfirias agudas

Las porfirias agudas se presentan clínicamente en forma de crisis o ataques agudos caracterizados por dolor abdominal grave, síntomas neuropsiquiátricos, neuropatía autonómica y alteraciones de los niveles de electrolitos. Sin embargo, las crisis son poco comunes en los portadores heterocigotos de una mutación, aproximadamente el 80-90% de los individuos afectados nunca experimentan una crisis aguda (57, 59). Mientras que la porfiria aguda intermitente (PAI) y la deficiencia de ALAD sólo se manifiestan con crisis agudas y la piel nunca se ve afectada, la porfiria variegata (PV) y la coproporfiria hereditaria (CPH) también

pueden presentarse con lesiones cutáneas, de forma que éstas pueden ser el único signo de la enfermedad en el 60% de los pacientes con PV (57).

### 1.5.3 Porfirias cutáneas

De los ocho tipos de porfirias, seis pueden presentarse con problemas en la piel debido al acúmulo de porfirinas. Los problemas cutáneos pueden manifestarse desde la infancia temprana. Se distinguen dos categorías según el tipo de manifestación: las que producen fotosensibilidad con sensación dolorosa aguda tras la exposición al sol, debido al acúmulo de protoporfirina, y las que producen lesiones en la piel en forma de fragilidad cutánea y ampollas. La primera categoría incluye la protoporfiria eritropoyética (PPE) y la PPELX, mientras que la segunda incluye la porfiria cutánea tarda (PCT) y la porfiria eritropoyética congénita (PEC). La PV y CPH son porfirias mixtas que pueden presentar sintomatología cutánea del segundo tipo.

En ambas categorías de porfiria cutánea los problemas de la piel son generados a consecuencia de la interacción entre las porfirinas y la luz visible. Las porfirinas son fotorreactivas y absorben la luz de aproximadamente 400 a 410 nm de amplitud (pico de Soret), que puede penetrar en las capas profundas de la dermis. La absorción de energía crea una molécula de porfirina excitada que puede liberar energía en forma de luz (fluorescencia) o formando especies reactivas de oxígeno. La creación de radicales libres causa daños directos a las proteínas, lípidos y ADN, e indirectamente a los tejidos por desgranulación de mastocitos, activación del complemento, y activación de metaloproteinasas (60).

### 1.6. PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

La PAI se debe a una deficiencia parcial de la enzima HMBS (EC 2.5.1.61) generada por mutaciones en heterocigosis en el gen que la codifica, con el mismo nombre. Por lo tanto, se trata de una enfermedad que presenta herencia autosómica dominante (AD).

La PAI es una porfiria hepática aguda que no manifiesta síntomas cutáneos. Es la porfiria aguda más frecuente y afecta globalmente, independientemente de la raza y el sexo, aunque es más común su expresión clínica en mujeres. Su

incidencia anual en Europa es de 0,13 casos/millón de habitantes, calculándose una prevalencia de 5,9 casos/millón (61). Sin embargo, existen países con una incidencia muy superior. Es el caso de Suecia, que tiene una prevalencia de 23 casos/millón de habitantes debido a un efecto fundador (62). En España la prevalencia es ligeramente superior a la media europea (6,3 casos/millón).

### 1.6.1 Enzima HMBS

Existen dos isoformas principales de la enzima HMBS que difieren en aproximadamente 2 KDa (44 y 42 KDa, respectivamente). La isoforma no eritroide o constitutiva está presente en todos los tejidos y contiene 361 aminoácidos. Presenta 17 residuos adicionales en el extremo amino terminal respecto a la isoforma eritroide, de 344 aminoácidos, que se expresa sólo en eritrocitos (63).

La enzima HMBS cataliza la polimerización secuencial de cuatro moléculas de PBG para formar HMB. La catálisis comienza con el ensamblaje del cofactor dipirrometano procedente de dos moléculas de PBG. El cofactor unido covalentemente actúa como un iniciador, alrededor del cual se ensambla el tetrapirrol a partir de 5 moléculas de PBG. En el último paso de la catálisis, el producto se libera, dejando el cofactor unido a la holoenzima intacta.

Los estudios de expresión y cristalización de la enzima HMBS humana han revelado que se compone de tres dominios distintos (64). El dominio N-terminal 1, residuos 1-116 y 216-239, se compone de tres hojas plegadas antiparalelas y dos hojas paralelas, rodeadas de tres hélices. Además, el dominio 1 consta de numerosos bucles. La región de bucle formada por los residuos S57-S76 se encuentra cerca del sitio activo. Los residuos 117-215 componen el dominio 2. La disposición de los elementos estructurales secundarios en el dominio 2 es similar al dominio 1. Consta de un núcleo hidrofóbico compuesto de cinco hojas, tres de ellas antiparalelas. Las hojas están rodeadas por cinco hélices, dos de las cuales son del tipo  $3_{10}$  cortas. El sitio activo se encuentra en una región hendida entre los dominios 1 y 2. Los residuos 240-361 forman el dominio C-terminal 3, compuesto de tres largas hojas antiparalelas y tres hélices. El residuo crítico, C261, que une covalentemente el cofactor, dipirrometano, se encuentra en un bucle (residuos 248-264), que forma parte del dominio 3. Además, otros residuos forman enlaces por puente de hidrógeno con el cofactor. Las interacciones son

predominantemente con residuos de carga positiva como K98, R149, R150, R173, R195, y Q217.

Los anillos pirrol se van uniendo de forma secuencial al cofactor para el montaje del tetrapirrol. La adición secuencial requiere de cambios conformacionales en la enzima que permiten la apertura de la proteína para dar paso a cada nueva molécula de PBG y su repliegamiento para llevar a cabo la unión covalente. Los estudios de modelado han revelado que los cambios conformacionales se producen por desplazamiento de los dominios 1 y 2 sobre unas regiones bisagra. Los residuos S96, H120 y L238 han sido identificados como residuos bisagra con programas de predicción, siendo responsables del movimiento de los dominios (64). El residuo L238 está situado en el medio de la proteína cercano a la posición donde los tres dominios interaccionan. El movimiento del dominio 1 parece estar centrado en este residuo bisagra.

### 1.6.2 Base genética de la PAI

El gen *HMBS* se localiza en el cromosoma 11 (11q23.3). Está compuesto por 15 exones, expandiéndose 10 Kb (65). El gen *HMBS* se somete a corte y empalme alternativo para producir dos ARNm que dan lugar a las dos isoformas, con promotores diferentes (65). La isoforma constitutiva procede del empalme alternativo de los exones 1 y 3-15; la isoforma eritroide está codificada por los exones 2-15. Un primer promotor en el extremo 5' es activo en todos los tejidos, especialmente en hígado, y presenta características que permiten una expresión constitutiva (promotor *housekeeping*). Un segundo promotor, situado 3 Kb aguas abajo, es activo sólo en eritrocitos y muestra homología estructural con el promotor del gen de la beta-globina. Se ha evidenciado la existencia de una tercera isoforma alternativa eritroide que es minoritaria y conserva el intrón entre los exones 2 y 3, extendiendo así la región 5' en 176 pares de bases (pb) respecto a la isoforma eritroide. Se ha demostrado la expresión de la isoenzima minoritaria en cultivo de células precursoras eritroides, médula ósea y tejido hepático fetal (66).

Aunque mayoritariamente la PAI se debe a mutaciones en heterocigosis, existen casos excepcionales con mutaciones en ambos alelos del gen *HMBS*

(homocigotos o heterocigotos compuestos) que padecen una clínica más grave, predominantemente neurológica (67, 68).

La PAI se caracteriza por una alta heterogeneidad alélica. Hay 416 mutaciones causantes de PAI registradas en la base de datos *Human Gene Mutation Database* (69). Entre las mutaciones descritas hay cambios puntuales en aminoácidos, pequeñas deleciones y duplicaciones, cambios que producen truncamiento de la proteína, pérdida de transcrito, alteración del marco de lectura o desnaturalización de la enzima.

La existencia de mutaciones que alteran aminoácidos localizados lejos del sitio activo de la proteína subraya el papel de otros dominios en el funcionamiento de la enzima, ya sea interviniendo en la estabilidad y plegamiento de ésta, como en los cambios conformacionales necesarios para la reacción catalítica (64).

La mayoría de las mutaciones afectan a las dos isoformas principales, la constitutiva y la eritroide, de forma que el defecto en la actividad enzimática es detectable en todas las células. Estos casos se conocen como PAI clásica. Sin embargo, se ha estimado que un 5% de los casos de PAI se debe a mutaciones en el exón 1 y la zona de unión con el intrón adyacente, que afectan solamente a la isoforma constitutiva (70). Estos casos se conocen como PAI variante, y presentan una actividad enzimática normal en eritrocitos (71).

Gran parte de las mutaciones en el gen *HMBS* son privadas, es decir, están presentes en pocos individuos, normalmente en miembros de una misma familia. Sin embargo, hay mutaciones que son muy prevalentes en algunas poblaciones, representando un elevado porcentaje de los individuos afectos. Es el caso de la mutación NM\_000190.3:c.593G>A (p.W198X), mayoritaria en Suecia (62); la mutación NM\_000190.3:c.849G>A (p.W283X) en Suiza (72); la mutación NM\_000190.3:c.346C>T (p.R116W) en los Países Bajos (73) o la mutación NM\_000190.3:c.517C>T (p.R173W) en Nueva Escocia (74), todas ellas han demostrado tener una alta prevalencia debido a un efecto fundador en la población.

La PAI presenta baja penetrancia puesto que la mayoría de portadores heterocigotos de una mutación no desarrolla sintomatología característica de porfiria a lo largo de su vida (PAI latente). Tradicionalmente se ha descrito una

penetrancia en torno al 10-20%. Sin embargo, existen discordancias entre la alta prevalencia de mutaciones registrada en el gen *HMBS* y la prevalencia de la enfermedad. En un estudio de 3350 donantes de sangre en población francesa, hallaron una frecuencia de aparición de mutaciones en el gen *HMBS* de 1:1 675 (75). Más recientemente, un estudio de cribado *in silico* de las bases de datos genómicas y exómicas actuales, que incluyó datos de 45 955 individuos caucásicos, ha estimado una prevalencia de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *HMBS* de 1:1 782 (76). Estos datos apuntan hacia una penetrancia real inferior al 1%, si se consideran todos los portadores heterocigotos, frente al 10-20% clásicamente descrito.

Por otro lado, se han descrito diferentes grados de penetrancia asociados a distintas mutaciones (77-79). Por ejemplo, se ha descrito que el 44% de los portadores de la mutación p.W198X y el 50% de los portadores de la mutación p.R173W presentaban PAI manifiesta, mientras que sólo el 13% de los portadores de la mutación p.R167W habían desarrollado crisis (79). Esto hace que en poblaciones con una mutación prevalente o en algunas familias en concreto se hayan descrito penetrancias superiores al rango clásicamente descrito. Es el caso de Suecia, donde es prevalente la mutación p.W198X entre los portadores de PAI (89%) y se ha descrito un 42% de PAI manifiesta, al igual que en Noruega donde hay prevalencia de esta misma mutación (80, 81). Sin embargo, los miembros de una misma familia portadores de una misma mutación y expuestos a factores ambientales similares muestran gran variabilidad en la expresión clínica de la enfermedad. Las diferencias entre las distintas mutaciones causantes de PAI no dan una explicación completa a la penetrancia variable.

Es de interés destacar que, para el caso de la PPE, se ha observado la existencia de pacientes que además de ser portadores de una variante patogénica en el gen *FECH*, son portadores de otra variante genética en *trans* (variante presente en la copia del gen en el otro cromosoma) que determina una enzima funcionando, pero con una ligera reducción cuantitativa de su expresión. Estas variantes en *trans* se han asociado con la expresión clínica de la enfermedad y por tanto a su penetrancia (82, 83). Sin embargo, los autores exploraron más tarde este mismo fenómeno para otros tipos de porfirias, entre ellas la PAI, sin detectar

variantes en *trans* en el gen *HMBS* que puedan explicar la variabilidad en la expresión de la enfermedad (84).

Todo esto indica que la penetrancia puede depender de factores adicionales a la mutación específica causal. Distintos factores externos como la exposición a fármacos y alcohol, la restricción calórica y el estrés explican parte de la variabilidad interindividual, pero los factores endógenos implicados son desconocidos.

La dotación genética individual podría modular la penetrancia de la enfermedad. En este sentido, se ha sugerido que otros genes ajenos a la ruta de síntesis de hemo, podrían actuar como factores de susceptibilidad genética influyendo en la expresión de crisis agudas (78, 85). Se ha propuesto un modelo de herencia oligogénico con modificadores ambientales, que explicaría mejor la penetrancia y heredabilidad de la PAI que el modelo autosómico dominante clásico (86).

### 1.6.3 Bioquímica de la PAI

El defecto bioquímico básico en la PAI es una reducción del 50% de la actividad de la enzima *HMBS* (87) en todos los tejidos, excepto en el 5% de los casos en los que se mantiene una actividad normal en eritrocitos (PAI variante). Esto genera un bloqueo metabólico que lleva a la acumulación de los precursores *ALA* y *PBG*, y a una deficiencia a nivel hepático del producto final, el hemo. El exceso de *ALA* y *PBG* hepático pasa a la circulación y se excreta a través de la orina. El aumento de *ALA* y *PBG* se puede detectar mediante análisis de plasma y orina. En algunos casos se puede detectar también aumento de porfirinas en orina, pero este aumento es debido a la condensación no enzimática de *PBG* que genera uroporfirina (88). Igualmente el perfil de porfirinas en heces puede ser normal o ligeramente elevado a costa de uroporfirinas procedentes de la condensación espontánea del *PBG* excretado a través de la bilis (89).

No obstante, el déficit enzimático por sí sólo no es suficiente para el desencadenamiento de las crisis neuroviscerales, por ello la mayoría de pacientes permanecen asintomáticos o en periodo de latencia clínica y sólo sufren una o unas pocas crisis a lo largo de su vida. En situaciones normales la actividad enzimática de *HMBS*, aunque deficiente, es capaz de atender la demanda de



hemo, de forma que los portadores de PAI pueden presentar valores normales de excreción de los precursores. Bajo determinadas circunstancias en las que se produce un aumento de los requerimientos de hemo, como cuando se incrementa la síntesis de CYP, se produce la inducción de *ALAS1* que genera un aumento en la síntesis de precursores. El posterior bloqueo enzimático, debido al defecto genético subyacente, genera la acumulación de éstos (90).

En pacientes asintomáticos los niveles basales de ALA y PBG pueden ser normales o estar elevados temporalmente, en algunos casos hay una elevación crónica que se ha relacionado con una mayor predisposición a sufrir crisis. Durante una crisis aguda a menudo se produce un aumento de PBG en orina de al menos 10 veces por encima del límite superior de referencia, más típicamente entre 20-100 veces (91). En periodo de remisión de crisis, los valores de ALA y PBG en orina permanecen elevados durante semanas y van normalizándose poco a poco hasta alcanzar los niveles basales propios de cada individuo. Algunos estudios han determinado que los valores de estos precursores pueden mantenerse elevados por encima del nivel basal incluso años tras un episodio agudo (92, 93).

#### 1.6.4 Clínica de la PAI

La PAI se caracteriza por la ocurrencia de crisis neurovisceral que interrumpen periodos de latencia clínica. En la fase inicial de una crisis se suelen detectar cambios de comportamiento menores como ansiedad, agitación e insomnio. Las crisis casi siempre comienzan con dolor abdominal difuso, algunos pacientes refieren dolor hacia la espalda. Las náuseas, los vómitos y el estreñimiento son comunes. A menudo se acompañan de signos de aumento de la actividad simpática como taquicardia, exceso de sudoración e hipertensión. Durante las crisis, la deshidratación y el desequilibrio electrolítico ocurren con cierta frecuencia. Es habitual que se produzca un oscurecimiento de la orina, que adquiere un color rojizo característico que se potencia tras la exposición a la luz. Esto se debe a la oxidación del exceso de PBG urinario, que se transforma en uroporfirina y porfobilina que emiten fluorescencia en el rango de la luz visible. En el 40% de los pacientes en crisis se produce hiponatremia probablemente por síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH) debido a

una disfunción pituitaria del sistema nervioso central (57). Cuando es grave, puede provocar convulsiones. En ocasiones también se producen trastornos mentales como depresión, desorientación, alucinaciones, paranoia o confusión. En las crisis graves, cuando el diagnóstico se retrasa y la exposición a factores porfirinogénicos se prolonga, los síntomas pueden progresar a una neuropatía motora simétrica, que se manifiesta como debilidad de los músculos proximales de las extremidades y que en ocasiones puede derivar en parálisis completa, incontinencia, dificultades para tragar e insuficiencia respiratoria (90).

Tras el diagnóstico y tratamiento, es muy probable la recuperación completa, incluso tras una crisis grave. En escasas ocasiones las crisis pueden ser letales, asociándose a un retraso en el diagnóstico (94, 95).

Las crisis se producen más frecuentemente en mujeres, entre los 20 y los 40 años de edad (96). Son raras antes de la pubertad (97-99) y tras la menopausia.

Como se ha explicado en apartados previos, la PAI presenta baja penetrancia, por lo que la mayoría de los portadores no desarrollan crisis neuroviscerales, lo que se conoce como PAI latente. No obstante, se consideran que son igualmente susceptibles a los factores precipitantes de crisis. Cuando los portadores de PAI han sufrido al menos una crisis aguda durante su vida, se clasifican como PAI manifiesta. La mayoría de éstos sólo padecen una crisis o muy pocas a lo largo de su vida, a menudo en un periodo de pocos años, recuperándose posteriormente de forma completa (90). Tan solo un 3-5% de los pacientes, más frecuentemente mujeres, presentan una presentación grave de la PAI con crisis recurrentes (más de 4 episodios al año) que pueden ser discapacitantes (61).

La proporción de pacientes que experimentan crisis agudas ha disminuido aparentemente en las últimas décadas, probablemente debido a una mejora en el diagnóstico por cribado familiar y en el asesoramiento genético (61).

Además de la sintomatología aguda característica de la enfermedad, se ha observado una mayor incidencia de ciertas complicaciones a largo plazo en las porfirias agudas (100).

Diversos estudios han documentado un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC) en enfermos de porfiria aguda, en comparación con población general sana (61, 101-106). El riesgo de CHC parece ser más

elevado en PAI sintomática y en mujeres, y su incidencia es mayor a partir de los 50 años. Algunos autores sugieren el cribado de CHC por control ecográfico en los pacientes a partir de los 50 años (100).

Recientemente también se ha sugerido un mayor riesgo en otros tipos de cáncer no hepático, aunque se requieren más estudios sistemáticos que corroboren dichos hallazgos (106, 107).

Además del riesgo de cáncer hepático, diversos estudios en series de pacientes y cohortes con porfiria aguda han descrito también un mayor riesgo de hipertensión y enfermedad renal crónica (ERC) (108-111). Algunos autores han descrito una alta prevalencia de ERC en pacientes con PAI sintomática (59%) en comparación a la hallada en pacientes con PAI latente (11%). Los análisis histopatológicos e *in vitro* de dicho estudio apoyaron un modelo en el que ALA y PBG promueven cambios fenotípicos celulares y apoptosis en células epiteliales arteriolares y células tubulares renales, generando una nefropatía túbulointersticial (112). Adicionalmente, un estudio reciente ha descrito el posible papel de la proteína PEPT2 (transportador de péptido humano 2) en la gravedad y progresión de la ERC asociada a la PAI. PEPT2 se expresa en las células tubulares proximales y media la reabsorción renal de ALA. Diferentes variantes genéticas de *PEPT2* presentan diferencia en su afinidad por ALA, observándose que los pacientes con PAI portadores de la variante de mayor afinidad (genotipo *PEPT2\*1\*1*) presentaban un empeoramiento más rápido de la función renal, con mayor progresión a ERC que los portadores de las variantes de menor afinidad (genotipos *PEPT2\*1/\*2* y *PEPT2\*2/\*2*) (113).

### 1.6.5 Factores precipitantes de crisis agudas

El desarrollo de las crisis agudas a menudo se asocia a la exposición de determinados factores que se consideran precipitantes. Los factores que más comúnmente se han asociado a crisis incluyen distintos fármacos, cambios hormonales en el ciclo menstrual, ayuno, infecciones, estrés y alcohol (81, 93, 114-116).

En general, se considera que los factores que producen activación de la biosíntesis del grupo hemo contribuyen al inicio de las crisis y su perdurabilidad. Por lo tanto, los factores que producen consumo de hemo inhibiendo su acción

represora sobre la síntesis o los que producen inducción de *ALAS1* de forma directa o indirecta son desencadenantes potenciales de crisis.

Muchos fármacos y drogas de abuso son potentes agentes precipitantes de crisis. El primer caso de porfiria aguda precipitado por un fármaco data de 1889 (55). Desde entonces se han identificado multitud de fármacos que se han asociado al desencadenamiento de crisis o que han demostrado su porfirogenicidad en estudios *in vivo* o *in vitro*. Se considera que la potencialidad de un fármaco para precipitar crisis depende de su capacidad para inducir directamente la síntesis de *ALAS1* mediada por receptores CAR/PXR y/o su capacidad para aumentar los requerimientos de hemo (117). Muchos de los fármacos que se consideran porfirogénicos son metabolizados por enzimas CYP, principalmente las clases CYP1, 2 y 3, responsables del metabolismo xenobiótico. Algunas de estas enzimas responden al fármaco aumentando su tasa transcripcional (118), mientras que otras sufren inhibición irreversible tras la unión a su sustrato, que actúa como sustrato suicida, dando lugar a la degradación del componente hemo de la enzima (119). Ambos mecanismos, inducción de CYP e inactivación por sustrato, producirían un aumento en los requerimientos de hemo en respuesta al fármaco.

Ácido valproico	Cocaína	Metildopa
Amiodarona	Difenidramina	Minoxidil
Anticonceptivos orales	Diltiazem	Primidona
Barbitúricos (Fenobarbital)	Ergotamina y sus preparaciones	Progesterona y sus derivados
Bromocriptina	Etanol	Rifampicina
Carbamazepina	Fenitoína	Sulfonamidas
Cloranfenicol	Griseofulvina	Tamoxifeno
Clorpropamida	Imipramina	Teofilina
Cloroquina	Metotrexato	Tolbutamida
		Trimetoprim
		Verapamilo

**Figura 1.6.** Listado de compuestos porfirogénicos que clásicamente se han asociado a la precipitación de crisis agudas y que se consideran no seguros.

La existencia de fármacos con capacidad para precipitar crisis supone un reto en el manejo de pacientes con porfiria (Figura 1.6). La administración de éstos no solo puede precipitar crisis en pacientes asintomáticos sino agravarla en pacientes sin diagnóstico establecido.

Por ello se han elaborado clasificaciones de fármacos atendiendo a su porfirogenicidad y se han publicado listados de fármacos contraindicados y seguros. La base de datos en línea *The drug database for acute porphyria* (120), clasifica los fármacos según sus posibles mecanismos de porfirogenicidad atendiendo a un algoritmo diseñado por sus autores (121). Esta base de datos fue adoptada por el proyecto europeo *European Porphyria Network (EPNet)* (122) y tiene el respaldo de la mayoría de las autoridades científicas en porfiria (117).

Entre los fármacos con un alto potencial porfirogénico se encuentran antiepilépticos como el fenobarbital, fenitoína y carbamazepina. Su actividad porfirogénica deriva de su capacidad para inducir la transcripción de *ALAS1* mediada por PXR/CAR e inducir distintas subclases de *CYP* (123). Otros ejemplos son la amiodarona, la eritromicina o los bloqueantes de los canales del calcio, verapamilo y diltiazem, que tienen en común que actúan como potentes inhibidores de la enzima CYP3A4.

Las hormonas sexuales femeninas también se asocian con las crisis, lo que explicaría la mayor incidencia de crisis en mujeres, especialmente durante la edad fértil. Diversas hormonas esteroideas producen la inducción de *ALAS1*, como la progesterona, estrógenos, testosterona y los metabolitos de éstos (124). Las crisis agudas parecen ser más frecuentes en la fase premenstrual del ciclo (fase lútea) (115, 125), cuando la progesterona es la hormona predominante. Por ello se cree que la progesterona tiene mayor capacidad porfirogénica que los estrógenos. Cabe destacar que durante la síntesis de las hormonas esteroideas también se inducen algunos *CYP* (*CYP11A1*) (127), simultáneamente a *ALAS1* (126), junto a otros genes necesarios para la síntesis de progesterona.

Se han descrito casos de crisis durante el embarazo, aunque no es lo más frecuente (128). El uso de contraceptivos hormonales (125) y la estimulación ovárica en reproducción asistida también se ha asociado a crisis (129, 130).

Otros precipitantes de crisis son el ayuno y los estados que conducen a una baja disponibilidad de glucosa, como el ejercicio extenuante. Los bajos niveles de

glucosa generan la inducción de *ALAS1* mediada por el factor PGC-1 $\alpha$  y FOXO1. Además, otros mecanismos indirectos podrían contribuir a la inducción de la síntesis de hemo en situaciones de ayuno (131).

El alcohol es otro agente porfirogénico. Además de activar algunos *CYP*, se ha visto que produce un aumento en la expresión *ALAS1* (132). También se ha sugerido el consumo de tabaco como posible precipitante de crisis (133).

Las infecciones, inflamación, trauma quirúrgico y el estrés físico y psicológico se han asociado también a las crisis (81, 116). En concreto, la inflamación, las infecciones y el ayuno inducen la expresión hepática de *HO-1*, pudiendo contribuir al desarrollo de crisis (53).

Por otro lado, distintos factores como la infección, ayuno, trauma, estrés psicosocial, consumo de alcohol y cambios hormonales dan lugar a activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) conduciendo a la liberación de glucocorticoides, principalmente cortisol, por la corteza adrenal. El cortisol se une a receptores de glucocorticoides que inducen la expresión de los genes que codifican los receptores nucleares CAR y PXR, potenciando de forma indirecta la respuesta inductiva de genes *CYP* (134, 135). A juzgar por el efecto porfirogénico que se ha atribuido a los diferentes estresores que activan esta vía es posible que este mecanismo tenga un efecto sobre la inducción de *ALAS1* (131).

Son muchos los factores que pueden actuar como precipitantes de las crisis de porfiria, pero en muchas ocasiones no se identifica un precipitante. Se considera que la aparición de crisis en pacientes con déficit enzimático es un fenómeno multifactorial que combina la presencia de varios factores predisponentes, endógenos y exógenos, de manera que un solo factor precipitante no suele ser suficiente para desencadenar una crisis.

#### 1.6.6 Fisiopatología de la PAI

La hipótesis actual sobre la fisiopatología de las porfirias agudas se centra en el papel de la inducción de la enzima hepática *ALAS1*. Una potente inducción de esta enzima, a través de los mecanismos reguladores detallados en apartados anteriores, generaría una sobrecarga de precursores y una carencia del producto final en portadores de un defecto enzimático. Los mecanismos por los que esta

alteración metabólica se traduce en las alteraciones clínicas de origen neurológico características de las porfirias agudas son objeto de estudio y no están del todo aclarados. Actualmente, se consideran dos principales hipótesis, no excluyentes: una disfunción por deficiencia de hemo y la toxicidad neurológica inducida por ALA.

Una deficiencia de hemo produciría efectos en las hemoproteínas vitales en situaciones de alta demanda. Un ejemplo de ello es la disminución de la saturación de hemo de la triptófano pirrolasa durante la fase sintomática de la porfiria aguda observada en experimentos animales. El descenso de esta actividad enzimática da lugar a un aumento de triptófano en sangre y un aumento del suministro al tejido nervioso, donde por acción de la triptófano hidroxilasa se produce un incremento de serotonina (136, 137). Según esta teoría, la activación de los receptores de serotonina podría explicar muchos de los signos de la neuropatía autonómica observada en las porfirias agudas tales como las arritmias cardíacas, hipertensión, depresión y ansiedad. Sin embargo, no se dispone de estudios en humanos que lo corroboren y tampoco explicaría la neuropatía periférica observada durante las crisis.

Otra hemoproteína que podría verse afectada por la falta de hemo es la guanilato ciclasa soluble (GCs), generando una disfunción en la producción de GMPc (guanosin monofosfato cíclico) en respuesta a óxido nítrico. El GMPc media la activación de quinasas, que mediante fosforilación de diversas proteínas se cree que da lugar a distintas respuestas fisiológicas tales como una disminución de la resistencia vascular, la presión sanguínea y la actividad cardíaca; inhibición de la secreción adrenal e hipofisiaria y relajación del músculo liso gastrointestinal. La inversión de los efectos de la GCs por una activación deficiente debido a la insuficiencia de hemo podría dar lugar a una condición clínica que se ajusta a una descripción bastante completa del síndrome que caracteriza las crisis agudas de porfiria (85).

También, la alteración de las hemoproteínas que intervienen en la cadena de electrones mitocondrial podría producir un déficit energético a nivel tisular.

La segunda hipótesis se centra en el efecto tóxico de la acumulación de ALA. En las crisis agudas se produce un aumento de ALA y PBG, pero el hecho de que otras alteraciones metabólicas que conllevan un aumento de ALA pero no

de PBG, tales como la intoxicación por plomo o la tirosinemia hereditaria, también se acompañen de alteraciones neurológicas similares a las producidas en las porfirias agudas apunta hacia el ALA como el agente causal de éstas (138). Por otro lado, el trasplante de hígado es capaz de normalizar los niveles de ALA y PBG con desaparición de la sintomatología propia de la PAI (139). También se ha documentado elevación de precursores y aparición de síntomas neurovisceral en personas sanas trasplantadas con un hígado procedente de portadores de PAI (140). Estos hallazgos confirman el papel central del hígado en el proceso patológico y como principal fuente de procedencia del metabolito.

Se han descrito varios efectos de la acumulación de ALA. En primer lugar, ALA induce estrés oxidativo en el sistema nervioso (141, 142). Otros efectos del ALA son la peroxidación de los lípidos de las membranas (143) y el daño oxidativo en la ferritina (144). También se ha evidenciado daño a nivel del ADN nuclear y mitocondrial e inducción de apoptosis y necrosis en cultivos celulares tratados con ALA (145). Algunos autores sugieren que el daño en el ADN inducido por ALA podría ser el factor de riesgo carcinogénico asociado al desarrollo de CHC que desarrollan algunos enfermos de PAI (146).

Por otro lado, el acúmulo de ALA es resultado de la inducción de *ALAS1*. *ALAS1* requiere como sustrato succinil-CoA que procede del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). El consumo masivo de succinil-CoA genera depleción en el TCA y un fallo energético mitocondrial al disminuir el suministro de cofactores reducidos para la cadena respiratoria (147). La deficiencia de este intermediario del TCA produciría también un descenso de glutamato, que interviene reponiendo  $\alpha$ -cetoglutarato en el ciclo, necesario para la síntesis de succinil-CoA. El glutamato es precursor de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), neurotransmisor que ejerce un efecto inhibitor del eje HHA mediante inhibición de la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina. Por lo tanto, la síntesis de ALA compite con la del neurotransmisor, comprometiendo su producción. Es asumible que la alteración en el sistema GABAérgico podría tener un efecto desinhibidor del eje HHA contribuyendo a la sintomatología de la PAI. Además, ALA actúa como agonista de los receptores GABAérgicos en el sistema nervioso central (148). Estudios *in vitro* han descrito una disminución de receptores GABAérgicos en respuesta a tratamiento con ALA (149).



Estudios recientes han observado también que el ALA se acumula en el cerebro alterando el sistema colinérgico e induciendo una respuesta antioxidante (150). Los autores apuntan que los síntomas durante las crisis agudas de porfiria son similares a las observadas durante una crisis colinérgica.

Por último, existen hallazgos de alteración en el patrón de excitabilidad axonal de las neuronas motoras periféricas en pacientes con PAI sintomática. Estos hallazgos fueron consistentes con una despolarización de la membrana axonal (151). La despolarización de la membrana axonal puede ser inducida por el deterioro de la función de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que depende de la disponibilidad de energía para el intercambio iónico. En ensayos celulares *in vitro* la exposición a ALA produce despolarización de membranas y alteración en la función de las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (152-154). Por lo tanto, el efecto directo del precursor porfirogénico en la excitabilidad neuronal y el déficit energético generado por la falta de hemoproteínas y/o el colapso del metabolismo energético podría ser la razón que sustenta la neuropatía periférica observada en las crisis de porfiria.

Pese a los múltiples efectos adversos atribuidos a ALA, parece ser que la exposición a este metabolito por sí sólo no es capaz de producir crisis agudas. En efecto, los niveles de ALA durante las crisis no se correlacionan con la gravedad de la sintomatología (155). Tampoco se explica por qué pacientes con niveles crónicamente elevados de ALA y PBG pueden permanecer sin desarrollar sintomatología o por qué individuos sanos tratados con ALA no desarrollan sintomatología (156). Esto indica la existencia de otros factores importantes en la fisiopatología de la PAI.

### 1.6.7 Diagnóstico

Se debe considerar el diagnóstico de porfiria aguda en todo paciente con dolor abdominal intenso si no se encuentra causa que lo justifique y especialmente si se acompaña con síntomas neurológicos y oscurecimiento de la orina. La primera línea en el abordaje diagnóstico frente a una sintomatología sugestiva de crisis de porfiria es la cuantificación de PBG, preferiblemente en muestra de orina aleatoria reciente, ya que las muestras de orina de 24 horas

pueden retrasar el diagnóstico y tienen riesgo de degradación del PBG (157). Esta cuantificación debe realizarse de urgencia en menos de 24 horas. La muestra de orina debe refrigerarse y protegerse de la luz para mantener la estabilidad del PBG.

En las crisis agudas también se produce aumento de ALA y porfirinas en orina. La cuantificación de ALA es útil para distinguir una intoxicación por plomo o una porfiria por déficit de ALAD, donde no se produce aumento de PBG. Las porfirinas pueden detectarse por métodos espectrofotométricos en orina, pero su elevación es poco específica y común en otras enfermedades (enfermedades hepato biliares, abuso de alcohol, infecciones y otros trastornos comunes). Sin embargo, su análisis se recomienda para asegurar el diagnóstico de PV y CPH en las que la normalización de los niveles de ALA y PBG se puede producir en pocos días (90).

El método más ampliamente utilizado para la separación y cuantificación de PBG y ALA es la cromatografía en columna de intercambio iónico seguido de espectrofotometría (157). También pueden cuantificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y espectrometría de masas. Los resultados deben ser normalizados por la concentración de orina expresando el resultado como ratio PBG/creatinina.

Existen también métodos cualitativos para detectar la presencia de PBG y porfirinas, que a menudo se utilizan como pruebas de cribado, como el test de Hoesch o el test de Watson-Schwartz (158). Éstos consisten en mezclar unas gotas de orina del paciente con un preparado de reactivo de Ehrlich. Si el PBG está elevado se produce de inmediato un cambio de color a rojo rosado. Sin embargo, éstos métodos tienen baja sensibilidad y especificidad (159, 160) y pueden dar falsos positivos. Un positivo en un test de cribado cualitativo requiere la confirmación por un método cuantitativo.

La confirmación de una elevación significativa de PBG en un paciente con sintomatología compatible es suficiente para iniciar tratamiento. Aunque no hay una correlación entre los niveles de PBG y la aparición de las crisis (157), y la amplitud del cambio en la concentración de PBG por encima de los valores de referencia no está bien definida, a menudo se produce un incremento de 10 veces el límite de referencia superior (91).

Una elevación significativa de los niveles de PBG en un individuo con diagnóstico de PAI previo y con sintomatología aguda actual permite identificar la crisis. Sin embargo, los niveles de PBG pueden tardar semanas o años en normalizarse tras una crisis, permaneciendo elevados en ausencia de sintomatología. Este hecho puede dificultar el diagnóstico diferencial en enfermos de PAI diagnosticados, atribuyéndose a la porfiria síntomas como el dolor abdominal que pueden ser generados por otras patologías.

Si el paciente no tiene diagnóstico previo de PAI, la elevación de PBG, ALA y porfirinas en orina no permite determinar el tipo de porfiria, ya que se encuentran elevadas también en otras porfirias agudas (PV y CPH). En ese caso, la confirmación del tipo de porfiria requiere métodos de análisis sofisticados que están disponibles en laboratorios especializados. La espectroscopía en plasma para la detección de emisión de fluorescencia de las porfirinas es de utilidad, ya que un pico de 624-627nm establece el diagnóstico de PV y la ausencia de éste lo excluye. Sin embargo, no distingue entre PAI y CPH, en ambas condiciones puede haber un pico de emisión de 620 nm (161). Para el diagnóstico de PAI se requiere el fraccionamiento de porfirinas fecales mediante cromatografía líquida de alta resolución. Una concentración de coproporfirina fecal normal o ligeramente elevada con una ratio de coproporfirina III/I inferior a 2.0 es característico de PAI.

La determinación de la actividad enzimática de HMBS en eritrocitos puede ser útil en pacientes asintomáticos o en una crisis en remisión, ya que una disminución del 50% sobre la actividad normal ayuda a confirmar el diagnóstico de PAI (162, 163). Sin embargo, se pueden observar valores de actividad solapantes en individuos portadores y no portadores de PAI, por lo que una actividad dentro del rango de referencia no excluye el diagnóstico (90). El estudio enzimático no es esencial para el diagnóstico de crisis. La cuantificación de la actividad de HMBS en eritrocitos tampoco permite identificar los casos de PAI variante, que presentan sólo disminución de la actividad en células no eritroides y que pueden representar hasta un 10% de los casos. Se pueden usar distintos métodos para cuantificar la actividad enzimática (espectrofotometría, espectrofluorimetría o cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia).

Por último, el estudio del gen *HMBS* para identificar una variante patogénica en pacientes con diagnóstico bioquímico confirmado permite el estudio genético familiar para identificar portadores asintomáticos (162, 164). Sin embargo, no es útil en pacientes sintomáticos sin diagnóstico bioquímico para confirmar que los síntomas son debidos a PAI. El método de elección es la secuenciación del gen mediante electroforesis capilar, pero no permite la detección de deleciones exónicas o del gen completo, por lo que en el caso de no detectarse variante patogénica es necesario completar el estudio con otra técnica para tal fin como el MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

Una vez identificada la variante patogénica o mutación en un individuo con diagnóstico bioquímico de PAI, se puede realizar un cribado en familiares mediante el análisis dirigido de dicha variante, simplificando el estudio genético. Los individuos identificados como portadores pueden beneficiarse de la información pertinente para evitar los factores precipitantes de crisis conocidos y también de asesoramiento genético.

#### 1.6.8 Tratamiento

Actualmente, el tratamiento específico aceptado para las crisis agudas se basa en la terapia intravenosa con un preparado farmacológico a base de hemo, conocido como hemina. En Europa se comercializa en forma de arginato de hemina (Normosang®). Su administración repone el pool de hemo libre en el hepatocito regulando negativamente la expresión de *ALAS1* y consecuentemente reduciendo la producción de precursores ALA y PBG.

La dosis diaria recomendada es de 3 mg/kg/24 horas durante cuatro días, diluido en 100 ml de cloruro sódico al 0,9% en frasco de vidrio y administrados en forma de perfusión intravenosa durante al menos 30 minutos en una vena gruesa del brazo o vía central, utilizando un filtro de entrada. La dosis no debe de exceder los 250 mg (1 ampolla) por día. Los síntomas generalmente mejoran a los pocos días de haber comenzado el tratamiento, y la mayoría de los pacientes se recuperan completamente en 1-2 semanas

El tratamiento con hemina está indicado sólo en pacientes con características clínicas de crisis aguda y aumento de PBG en orina. En las crisis leves (dolor abdominal leve sin vómitos, parálisis o hiponatremia) se puede

recurrir a una dieta alta en carbohidratos y medidas de soporte hasta 48 horas. La infusión intravenosa de glucosa también se puede usar como tratamiento, pero debe limitarse si se sospecha hiponatremia. Sin embargo, si aparecen complicaciones neurológicas el tratamiento con hemina debe iniciarse de inmediato (163, 165).

Aparte del tratamiento específico, es necesaria la terapia sintomatológica (Tabla 1.2) para paliar el dolor, los vómitos, taquicardia, etc. (163). El tratamiento sintomático y de apoyo con fármacos seguros (Figura 1.7) debe iniciarse lo antes posible. El dolor suele ser intenso y en estos casos los opiáceos suelen estar indicados. Es esencial revisar la medicación del paciente para retirar cualquier fármaco porfirigénico e investigar posibles infecciones. Además, se deben establecer medidas de soporte y monitorización del equilibrio electrolítico, función cardiovascular, respiratoria y neurológica. Los pacientes con complicaciones neurológicas, hiponatremia grave o arritmias cardíacas deben ser atendidos en una unidad de cuidados intensivos. Los casos graves con crisis recurrentes cíclicas (cada 2-4 semanas) pueden requerir un tratamiento profiláctico con hemina. El manejo terapéutico en estos casos puede ser un reto y requiere la atención en centros expertos en porfiria. En estos casos se realizan infusiones regulares con hemina que reduce la frecuencia de las crisis y la gravedad.

Acetaminofeno	Bumetanida	Gentamicina
Analgésicos narcóticos	Cimetidina	Guanetidina
Acetazolamida	Corticoesteroides	Hidrato de cloral
Alopurinol	Cumarinas	Insulina
Amilorida	Eritropoyetina	Ofloxacino
Ácido acetyl salicílico	Estreptomina	Paracetamol
Atropina	Fluoxetina	Penicilinas
Betanidina	Fenotiacinas	Propanolol
Bromuros	Gabapentina	Succinilcolina
		Tetraciclinas

**Figura 1.7.** Fármacos de uso seguro en PAI.

**Tabla 1.2.** Manejo de la sintomatología asociada a las crisis de PAI.

<b>Signos y síntomas</b>	<b>Medidas y tratamiento</b>
<b>Neuropatía autonómica</b>	
Dolor abdominal	opiáceos, AAS, paracetamol, dihidrocodeína
Arritmia, taquicardia	beta bloqueantes
hipertensión arterial	beta bloqueantes, clonidina
Estreñimiento	lactulosa
Vómitos	fenotiazina, olanzapina, lorazepam, odansetrón
Retención urinaria	catéter urinario
<b>Neuropatía periférica</b>	
Paresia musculatura respiratoria	ventilación mecánica
Neumonía	antibióticos excepto sulfonamidas
Debilidad muscular	rehabilitación temprana
Neuropatía craneal	tubo nasogástrico
Dolor o entumecimiento en extremidades	opiáceos, paracetamol, antiinflamatorios
<b>Encefalopatía</b>	
Trastornos mentales, ansiedad, insomnio	benzodiazepinas*
Alucinaciones	fenotiazinas*, olanzapina, clorpromazina
Convulsiones	corrección de hiponatremia e hipertensión, diazepam, gabapentina, levetiracetam (para tratamiento prolongado)
<b>Trastornos metabólicos</b>	
Hiponatremia (SIADH)	si Na > 125 mmol/L: restricción de agua por probable SIADH si Na ≤ 125 mmol/L: infusión salina. Corrección ≤ 12 mmol/L/día. Vigilar mielinolisis central pontina.
Fallo renal agudo	fluidoterapia, hemodialisis
Rabdomiolisis	fluidoterapia
Hepatopatía	vigilancia de enzimas GOT y GPT
Oscurecimiento de orina	seguimiento de ALA y PBG en orina

\*La mayoría de este grupo son bien tolerados. Adaptado de Puy 2010 (166) y Pischik 2015 (163)

La mayoría de pacientes responden bien, pero el tratamiento a largo plazo puede producir dependencia del hemo exógeno y algunas complicaciones como tromboflebitis de las venas superficiales a causa del modo de administración y sobrecarga de hierro hepático (157, 159). Más recientemente, el tratamiento crónico con hemina se ha asociado a un incremento del estado inflamatorio hepático, a la inducción de HO-1 secundaria al tratamiento y al mantenimiento de un alto nivel de ALAS, responsable a su vez de la recurrencia de las crisis (167). En mujeres con crisis recurrentes asociadas al ciclo menstrual son también una opción terapéutica preventiva los análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que se ha documentado con éxito en algunos casos (168). En los casos de recurrencia graves que no responden al tratamiento preventivo y con seria amenaza de la calidad de vida del paciente, el trasplante hepático es la única opción curativa (165, 169, 170).

Por último, han aparecido una serie de terapias emergentes que incluyen el reemplazo enzimático y la terapia génica, que están en distintas fases de desarrollo (171).

En primer lugar, se ha desarrollado un fármaco de terapia de reemplazo enzimático basada en una proteína recombinante de la enzima humana HMBS o PBGD (rhPBGD) que se administra de forma intravenosa o subcutánea. Éste es capaz de reducir la acumulación de PBG durante una crisis aguda en un modelo en ratón de PAI (172). En 2002, un ensayo clínico en humanos mostró que la enzima recombinante disminuía los niveles de PBG en pacientes (173). Sin embargo, la proteína recombinante no alcanzaba el hígado, principal fuente de ALA y PBG, presentaba una vida media en circulación corta, y no demostró acción terapéutica durante las crisis. Algunos autores sugieren que esto podría ser debido a que la enzima recombinante incluía sólo la isoforma eritroide, junto a una falta de estrategia para dirigir el tratamiento al tejido hepático, por lo que los esfuerzos en la mejora de este producto deberían continuar en esta línea (163).

En el campo de la terapia génica se han desarrollado dos estrategias para el tratamiento de la PAI: la adición de una copia funcional del gen *HMBS* mediante el uso de vectores virales y la interrupción de la expresión de *ALAS1* con ARN de interferencia (ARNi).

La introducción de una copia funcional del gen *HMBS* en las células del hígado es una alternativa potencial para restaurar el déficit enzimático en PAI. No obstante, como otras terapias génicas presenta limitaciones técnicas a la hora de la elección de un vector eficiente y seguro que dirija la transferencia génica al órgano diana. Se desarrollaron distintos productos de terapia génica basados en vectores adenovirales que demostraron su seguridad y eficacia en ensayos animales (174-178). En 2009, la Agencia Europea del Medicamento dio la designación de medicamento huérfano para la PAI al producto usando como vector un virus adeno-asociado del serotipo 5. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo clínico de fase 1 en humanos (179). Este tratamiento presentó el inconveniente de generar anticuerpos neutralizantes frente al vector, aunque no hubo respuesta inmune celular, y no se evidenció reducción de los niveles de ALA y PBG con las dosis de fármaco utilizadas en el ensayo. Los esfuerzos en la mejora de este fármaco van encaminados al desarrollo de vectores más eficientes y al aumento de la expresión del producto génico (171).

La segunda estrategia en terapia génica de la PAI ha sido el desarrollo ARNi (180). El fármaco consiste en un conjugado de ARNi complementario a *ALAS1* (molécula de ARN de doble cadena de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud) y una molécula de N-acetilgalactosamina, que permite dirigir el tratamiento al hígado. Ésta ha resultado ser segura y efectiva en un modelo de PAI en ratón (181). Este fármaco, registrado comercialmente como Givosiran®, se encuentra actualmente bajo ensayo clínico de fase III en humanos (consultado en [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); número de registro: NCT03338816). Los resultados internos preliminares presentados por el equipo de investigación en el último congreso internacional sobre porfirias (International Congress on Porphyrins and Porphyrins 2017) apuntan hacia una alta tasa de seguridad y tolerancia, así como de efectividad clínica. No registraron efectos adversos serios ni alteraciones bioquímicas significativas y se ha documentado un descenso en los niveles de ARNm de *ALAS1*, ALA y PBG en orina y la reducción en un 75% de la tasa de crisis agudas anuales en los pacientes participantes (182). Estos resultados apuntan hacia la utilidad de esta terapia en la prevención de crisis agudas en aquellos pacientes con crisis recurrentes o mayor susceptibilidad a sufrir episodios anualmente. Los hallazgos son consistentes con el papel central de la



sobrestimulación de *ALAS1* en la fisiopatología de las crisis agudas y fortalece la hipótesis para el uso terapéutico de ARNi dirigido a *ALAS1*.

### 1.6.9 PAI en la Región de Murcia

Es complicado conocer la prevalencia exacta de la PAI en una población debido a su baja penetrancia. Las estimaciones suelen realizarse considerando principalmente los casos de PAI manifiesta, mientras que muchos de los asintomáticos quedan ocultos por su desconocimiento. En la Región de Murcia la prevalencia es desconocida, sin embargo, según datos facilitados por el Centro de Bioquímica y Genética Clínica y la Sección de Genética Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, el número de individuos con diagnóstico molecular de PAI registrado actualmente es 75. Teniendo en cuenta que la población de esta región es aproximadamente de 1465000 habitantes, la prevalencia calculada de portadores de PAI es de 51 casos/millón. Esta estimación es muy superior a la prevalencia calculada en España (6.3 casos/millón) (61). Sin embargo, no son datos comparables debido a que los últimos no recogen casos asintomáticos, por lo que pueden estar subestimando la prevalencia real de la enfermedad.

La mayoría de los casos de PAI en la región presentan una mutación fundadora descrita por E. Guillén-Navarro (2004), esto es, existe una mutación prevalente procedente de un ancestro común en la población (183). La mutación fundadora NC\_000011.9 (NM\_000190.3):c.669\_698del, consiste en una delección de 30 pb en el exón 12 del gen *HMBS*, que no altera el marco de lectura. La predicción del efecto de esta mutación en la proteína, p.(Glu223\_Leu232del), es una delección de diez aminoácidos, desde el glutámico en posición 223 hasta la leucina 232, ambos incluidos. En base a la estructura de la enzima *HMBS* en *E. coli* esta delección afecta a las cadenas  $\beta$ 51 y  $\alpha$ 41 de la proteína. La hélice  $\alpha$ 41 está involucrada en el contacto de los dominios 1 y 3 de la proteína. En humanos, la delección afecta el extremo de una hoja  $\beta$  y el inicio de una hélice  $\alpha$ , al final del dominio 1 de la proteína. Las mutaciones en esta región, aunque lejanas al sitio activo de la enzima parecen tener un efecto perjudicial en la actividad posiblemente debido a cambios conformacionales con impacto en la funcionalidad de la enzima.

Los niveles de actividad enzimática reportados en algunos de los pacientes portadores heterocigotos de la mutación fundadora se aproximan a una disminución del 50% (media: 47.5%; error estándar: 3.9).

Esta mutación es frecuente en individuos procedentes o descendientes de las poblaciones de Abarán, Blanca y Cieza, todas ellas situadas muy próximas geográficamente en la zona de la Vega Alta del Segura. La existencia de una mutación fundadora ha permitido simplificar el algoritmo de diagnóstico molecular en los casos de sospecha en la región. De forma que se puede hacer un cribado inicial dirigido a esta mutación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sólo en caso de ser negativo llevaría al análisis más costoso de secuenciación del gen completo.

#### 1.7. *ALAS1* COMO GEN CANDIDATO MODIFICADOR EN LAS PORFIRIA AGUDAS

Puesto que la inducción de *ALAS1* es un elemento importante para que se produzca una sobrecarga patológica en la síntesis de hemo en portadores de porfiria (131), este gen es un potencial candidato a influir en la expresión clínica de las porfirias agudas actuando como factor modificador de la penetrancia.

Actualmente, según *Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.org>) (69), no se han registrado mutaciones o variantes genéticas causantes de porfiria en el gen *ALAS1*. No obstante, hay descritas 358 variantes genéticas consistentes en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y pequeñas deleciones e inserciones en las regiones codificantes del gen (base de datos dbSNP versión 150: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). De todas estas variantes, el 65% son variantes *missense* (de cambio de sentido) y alrededor de un 3% son variantes del tipo *nonsense* (pérdida de sentido), *frameshift* (cambio de marco de lectura), o localizadas en sitios de *splicing* (corte y empalme). Todas ellas podrían tener un impacto potencial en la actividad de la proteína, tanto por pérdida de función como por ganancia.

Apenas existen estudios dirigidos al análisis del efecto de las variantes genéticas en el gen *ALAS1* y su posible asociación con las porfirias. En este sentido, un estudio analizó la presencia de variantes exónicas en el gen *ALAS1* en 49 individuos sudafricanos con PV y trató de buscar una posible relación con la sintomatología de la enfermedad (184). Identificaron una sola variante (4713T>C),

frecuente tanto en PV (frecuencias alélicas: T=0.49 y C=0.51) como en población control sana, aunque no hallaron correlación con la clínica de la enfermedad.

Es de interés señalar que otros autores han estudiado de forma análoga el gen *ALAS2*, regulador de la síntesis de hemo en eritrocitos, como posible gen modulador de la expresión fenotípica de PEC. Este estudio analizó la secuencia del gen *ALAS2* en 4 individuos con el mismo genotipo para el gen *UROS*. Identificaron una variante con ganancia de función, responsable de una mayor actividad enzimática, en una paciente que presentaba un fenotipo más grave de la enfermedad (185). Estos hallazgos apuntan hacia la importancia de *ALAS2* y por analogía de *ALAS1*, como genes modificadores candidatos a estudio en las porfirias.

Por otro lado, la región reguladora 5' del gen *ALAS1* juega un papel crítico en la inducibilidad de la enzima, característica relevante durante la expresión clínica de las porfirias. Como se ha detallado en secciones anteriores (apartado 1.3.) se han descrito diversos factores de transcripción coactivadores y represores, que uniéndose a sitios específicos de la región promotora son responsables tanto de la expresión basal de la enzima como de su inducción en situaciones de mayor demanda de hemo. Además, las regiones reguladoras distales, ADRES1 y ADRES2, también desempeñan un papel importante en la inducibilidad del gen. La existencia de variantes genéticas en las regiones reguladoras podría influir en el grado de inducción del gen. En la base de datos dbSNP hay registrados alrededor de un centenar de SNPs en la región promotora proximal de *ALAS1*, dos en ADRES1 y uno en ADRES2, estos últimos con bajas frecuencias del alelo minoritario. Según las predicciones basadas en los métodos *phasCons* y *PhiloP*, dos herramientas incluidas en el software de análisis de genómica comparativa y evolutiva PHAST, consultado a través del navegador genómico UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), sólo la región ADRES2 presentaba un grado de conservación interespecie destacable en dos fragmentos cortos, solapantes con los sitios DR4 descritos por Podvinec (2004) (46).

Algunos autores han investigado la existencia de variantes en la secuencia nucleotídica en las regiones reguladoras del gen *ALAS1* que pudieran influir en su tasa de transcripción (186). Partiendo de la hipótesis de que las variantes genéticas que afectan a la transcripción podrían ser determinantes en el fenotipo

de los portadores de porfirias hepáticas, estos autores analizaron la secuencia del promotor proximal y las regiones ADRES en 26 individuos con PV. De esta forma hallaron dos nuevas variantes, -853C>T y -1253T>A en el promotor proximal. El cambio -853C>T modificaba un posible sitio de unión a estrógenos, según predicciones *in silico*. Los estudios funcionales *in vitro* demostraron que esta región actúa como un *enhancer* (región que potencia la expresión génica), induciendo la transcripción de *ALAS1* en respuesta a los estrógenos. El genotipo -853T repercutía incrementando la expresión de *ALAS1* en respuesta a estrógenos con respecto a la versión de referencia. Además, los autores especularon que la variante -1253A podría reducir el efecto de la primera, dando lugar a unos niveles de expresión más bajos cuando ambas variantes estaban presentes, en comparación a los ensayos que incluían sólo la primera. Sin embargo, este estudio no consiguió establecer una correlación fenotípica de estas variantes, sugiriendo la necesidad de estudio en cohortes mayores y en otras porfirias agudas, especialmente en PAI dado que la expresión clínica de la enfermedad parece ser más frecuente que en PV.

Por último, otro aspecto hasta ahora escasamente estudiado, que podría influir en la expresión del gen *ALAS1*, es el grado de metilación de las regiones reguladoras 5'. Uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica en la célula es la introducción de un grupo metilo en las citosinas que se encuentran seguidas de guanina (dinucleótidos CG). Esta modificación química dificulta el acceso y la unión de proteínas necesarias para la expresión génica, impidiendo la transcripción de las regiones metiladas. Las regiones ricas en dinucleótidos CG que no se encuentran metiladas se conocen como islas CpG y permiten la expresión del ADN en esa región. Las islas CpG son frecuentes en los promotores y regiones reguladoras de la expresión de los genes constitutivos o *housekeeping*. Un estudio en una familia con PPE describió diferencias en el grado de metilación de las islas CpG de la región promotora del gen *FECH* entre los miembros de ésta, asociándose la hipermetilación de estas regiones con una menor expresión del gen y una mayor gravedad de la enfermedad (187). Fenómenos similares podrían estar ocurriendo en los distintos genes de la vía de síntesis del grupo hemo, entre ellos el gen *ALAS1*.

## 1.8. GENES *CYP* COMO CANDIDATOS MODIFICADORES EN LAS PORFIRIAS AGUDAS

Muchos autores respaldan el papel central de los *CYP* en la explicación de la porfirogenicidad asociada a determinados fármacos (117, 121). Teniendo en cuenta que los *CYP* son enzimas dependientes de hemo (hemoproteínas) y que su síntesis se encuentra coordinada con la de *ALAS1*, algunos autores señalan que el aumento en la síntesis de estas enzimas en respuesta a fármacos es uno de los factores que contribuyen al desencadenamiento de crisis en las porfirias agudas.

### 1.8.1 Generalidades de los *CYP*

El complejo de enzimas *CYP* constituye una superfamilia de hemoproteínas microsomales que catalizan reacciones de oxidación en el organismo, participando tanto en la síntesis de compuestos endógenos como la transformación de estos y de multitud de compuestos exógenos, incluidos los fármacos. Las enzimas *CYP* son responsables del 75-80% del metabolismo de fármacos de fase I y del 65-70% de la detoxificación de los medicamentos utilizados clínicamente (188). En el hígado, más del 50% del hemo se destina a la síntesis de *CYP*, constituyendo las hemoproteínas más importantes en este órgano (189).

Hay 57 genes *CYP* en el genoma humano, que se dividen en 18 familias y 44 subfamilias (190). Las familias se designan con un número, la subfamilia con una letra y las distintas clases de proteínas dentro de una subfamilia con otro número (ej: *CYP2D6*). Las tres primeras familias (*CYP1* a *CYP3*) están generalmente involucradas en el metabolismo de sustancias exógenas como los fármacos, mientras que las familias *CYP* con números más altos están generalmente involucradas en el metabolismo de sustancias endógenas. Los *CYP* forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial y participan en la síntesis de multitud de compuestos endógenos como hormonas esteroideas (estrógenos, testosterona, etc), vitamina D, colesterol, tromboxanos, ácidos biliares, etc.

A pesar de la amplia especificidad de sustrato de estas enzimas y de la existencia de superposición entre ellas, la mayoría de fármacos son metabolizados de forma relevante sólo por una o unas pocas enzimas.

Algunos de los genes *CYP* son altamente polimórficos, es decir, existen variantes genéticas o polimorfismos que determinan diversidad alélica. Los alelos de cada gen están definidos por un haplotipo o combinación de polimorfismos y se designan con un número precedido por un asterisco (ej: *CYP2D6*\*1, es el alelo 1 de la enzima *CYP2D6*). Muchos de los alelos de estos genes no tienen un impacto en el fenotipo de la proteína, por lo que dan lugar a enzimas con funcionalidad normal. Sin embargo, algunos alelos contienen variantes genéticas que impiden la expresión de la enzima, generan un enzima no funcional o un enzima con actividad reducida. Algunos alelos también dan lugar a una enzima con actividad incrementada. El alelo con la secuencia génica de consenso que presenta actividad normal se designa como alelo \*1. La base de datos *Human CYP Allele Nomenclature Database* (<https://www.pharmvar.org>) recoge la descripción de los alelos de los genes *CYP* (188).

Existe una marcada variabilidad interindividual y étnica en la actividad de estas enzimas, debido en parte a la diversidad alélica. La combinación de alelos da lugar a fenotipos definidos clásicamente como metabolizadores ultrarápidos (UM), extensivos (EM), intermedios (IM) y lentos (PM). Un UM generalmente lleva copias adicionales (duplicaciones) de alelos con actividad normal, mientras que los IM y PM suelen llevar uno y dos alelos defectuosos (por ejemplo, alelos con actividad reducida o carentes de actividad), respectivamente. El término EM se utiliza normalmente para los sujetos que portan dos alelos con actividad normal de la enzima *CYP*.

La variabilidad genética de los *CYP* es objeto de estudio en el campo de la farmacogenética, asociándose distintos polimorfismos y/o fenotipos a la variabilidad en la respuesta terapéutica individual a determinados fármacos.

## **1.8.2 Porfirogenicidad de fármacos y CYP**

### *1.8.2.1 Porfirogenicidad de los inductores de los CYP*

Como se ha detallado en apartados anteriores muchos fármacos producen una inducción de la expresión transcripcional de genes *CYP*, mediada por receptores nucleares, mayoritariamente PXR y CAR. Este mecanismo es compartido con el gen *ALAS1*, que se induce paralelamente a los *CYP* para

favorecer la síntesis de hemo necesario para la formación del holoenzima CYP. El resultado es una sobrestimulación de la síntesis de hemo que podría contribuir a la precipitación de crisis en los portadores de una porfiria aguda.

Muchos de los fármacos clasificados como porfirogénicos son potentes inductores de *CYP3A* y/o *CYP2C9* en solitario o junto a otros *CYP*. Entre los inductores de estos *CYP* encontramos antiepilépticos como fenobarbital, fenitoína y carbamazepina, bloqueantes del canal de calcio, antibióticos como sulfametoxazol y rifampicina u hormonas como la progesterona y la testosterona. Todos ellos han sido asociados en alguna ocasión con la precipitación de crisis porfíricas. Por otro lado, algunos fármacos que se consideran seguros para la administración en portadores de porfiria entre los que se encuentran el omeprazol o el ácido acetilsalicílico son también inductores de *CYP2E1*, *CYP2C19* y *CYP1A1/CYP1A2*. Esto podría indicar que el grado de inducción es dependiente de la clase de *CYP*, de forma que la inducción de las clases *CYP3A* y *CYP2C9* resultarían en una mayor respuesta inductiva de *ALAS1* que la de otros *CYP* (121).

#### 1.8.2.2 Porfirogenicidad de los inhibidores de los CYP

Se conocen dos mecanismos de inhibición de CYP por fármacos. El primero es un tipo de inhibición reversible que se produce por compuestos o fármacos que son capaces de interactuar con el sitio activo de la enzima o con el átomo de hierro del hemo impidiendo la interacción de la enzima con sus sustratos. En segundo lugar, la oxidación de determinados sustratos mediada por CYP puede dar lugar a especies intermediarias reactivas. Las especies reactivas en ocasiones tienen la capacidad de unirse covalentemente a la propia enzima CYP produciendo una inhibición irreversible. Este tipo de inhibición irreversible mediada por sustrato produce la inactivación permanente de la enzima, frecuentemente destruyendo el grupo hemo por modificación química de éste (191).

Muchos inhibidores irreversibles de los distintos CYP han demostrado ser porfirogénicos (192). Se han propuesto dos mecanismos por los cuales estos inhibidores influyen en la síntesis de hemo (193, 194). En primer lugar, la inhibición irreversible de los CYP que da lugar a la destrucción del hemo

produciría una depleción de hemo intracelular, a consecuencia del consumo de hemo para reponer los apoCYP, que resultaría en la inducción de *ALAS1* (117, 193). Esto podría contribuir a la precipitación de crisis en individuos portadores de porfiria. El segundo mecanismo propuesto deriva de estudios con agentes porfirogénicos como la 4-alquil-dihidropiridina. Este compuesto media la inactivación irreversible de determinados CYP por N-alquilación de la protoporfirina IX del grupo hemo del centro activo de la enzima. Esta modificación produce la disociación del grupo prostético del apoenzima y la liberación del átomo de hierro, produciéndose N-alquil-protoporfirina IX. Algunos de estos derivados alquil de la protoporfirina inhiben la FECH (195), reduciendo la síntesis de hemo y favoreciendo la acumulación de porfirinas y precursores porfirínicos. Además, al reducir la síntesis de hemo disminuye la disponibilidad de su forma libre represora de *ALAS1*, permitiendo su inducción. Este mecanismo explicaría la inducción química de protoporfiria observada en modelos animales en respuesta a compuestos como la 4-alquil-dihidropiridina. Sin embargo, este mecanismo sólo es aplicable a aquellos inhibidores irreversibles que generan N-alquilación del grupo hemo de los CYP.

El mecanismo de N-alquilación mediado por inhibidores irreversibles de los CYP ha sido observado sólo en modelos animales, aunque se ha descrito la existencia de inhibición irreversible en células linfoblastoides humanas por los mismos compuestos testados en modelos animales, observándose inhibición de los citocromos CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 y CYP3A4 (196). Más tarde, también se observó la formación de derivados N-alquil de la protoporfirina en un ensayo de expresión de un combinado de CYP humanos (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 y CYP2D6) en células de insecto transfectadas con baculovirus y tratadas con distintos inhibidores irreversibles porfirogénicos, observando una respuesta diferencial entre los distintos CYP (197).

### 1.8.3 Variabilidad genética en los CYP y su relación con las porfirias

La variabilidad interindividual en la actividad enzimática de los CYP está determinada en parte por la herencia de polimorfismos que constituyen distintos alelos en cada gen (198). Teniendo en cuenta el probable papel de los genes *CYP* en la patogenia de las porfirias, algunos autores han investigado si existe



correlación entre determinados alelos y la aparición de estas enfermedades. Estos estudios son escasos y se han centrado mayoritariamente en la PCT.

La PCT es una porfiria cutánea que se debe a una deficiencia heredada (PCT familiar) o adquirida (PCT esporádica) en la enzima UROD que genera la acumulación patológica de uroporfirina. Es una enfermedad con baja penetrancia y distintos factores como el consumo de alcohol, tabaco e infección por virus de la hepatitis C, entre otros, se han asociado con la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Distintos compuestos químicos son capaces de inducir químicamente uroporfiria por inhibición de UROD en animales de experimentación, constituyendo un buen modelo experimental para la PCT por su analogía (199). En la inducción química, se ha visto que los compuestos inductores producen una estimulación de la oxidación microsomal dependiente de NADPH que media la oxidación de uroporfirinógeno a uroporfirina (200, 201). El citocromo CYP1A2 parecía ser el responsable de la oxidación del uroporfirinógeno en ratones (201), mientras que en humanos participaban cinco citocromos (CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5). Algunos autores sugirieron que los CYP mediaban también en la formación de un compuesto, que actuaría de inhibidor de la enzima UROD, contribuyendo a la inducción de uroporfiria (202). Apoyando el papel de CYP1A2, se observó que distintos compuestos químicos inductores de uroporfiria eran incapaces de tal inducción en ratones *Knockout Cyp1a2* (*Cyp1a2<sup>-/-</sup>*) (203, 204). Más tarde se determinó que la oxidación parcial de uroporfobilinógeno daba lugar a uroporfometeno. Este compuesto actuaría como inhibidor de la UROD y sería responsable de la uroporfiria por inducción química o la generada en ratones deficientes en UROD, mediante un mecanismo dependiente de hierro probablemente con la contribución de CYP1A2 (205). Más recientemente, en un estudio en ratones *Cyp1a2<sup>-/-</sup>*, se demostró que CYP1A2 no es requisito esencial para la formación de este inhibidor ni para la inducción de uroporfiria (206).

En definitiva, parece ser que CYP1A2 desempeña un papel importante en la inducción de uroporfiria en modelos animales, y por tanto podría tener relevancia en la PCT. El hecho de que la actividad de CYP1A2 sea relevante en la inducción de uroporfiria y que existan polimorfismos que determinan diferencias en la actividad de este enzima, llevó a distintos autores a evaluar el posible impacto

clínico de algunos de estos polimorfismos en la PCT. Así, algunos estudios de casos y controles sanos han descrito una asociación del genotipo -163A/A del gen *CYP1A2* (*CYP1A2\*1F*), que presenta la característica de ser altamente inducible, con una predisposición a la PCT (207, 208). Otros autores no reprodujeron tal asociación en sus poblaciones de estudio (209-211) y algunos sugieren que es el consumo de tabaco, asociado a una inducción de *CYP1A2*, y no el genotipo *CYP1A2*, el factor relacionado con la PCT (210).

Paralelamente, otro estudio dirigido al gen *CYP1A1* describió mayor frecuencia del polimorfismo m4, pero no de los polimorfismos m1 o m2, en individuos con PCT familiar (o tipo II) frente a aquellos con PCT esporádica e individuos controles sanos, sugiriendo que m4 podría constituir un factor de mayor susceptibilidad a compuestos porfirrogénicos (212).

Los trabajos de investigación de la posible implicación de los *CYP* en otros tipos de porfiria son muy escasos. Sólo hay un estudio publicado, llevado a cabo en un grupo de portadores de distintos tipos de porfirias (PCT, PV y PAI). En este estudio analizaron la frecuencia de los alelos \*3 y \*4 del gen *CYP2D6*, que confieren actividad enzimática reducida, en el grupo de portadores de porfirias y un grupo de controles sanos. Observaron una mayor proporción del fenotipo EM (ausencia de los alelos \*3 y/o \*4) en el grupo de portadores de porfiria, y más específicamente en el subgrupo con PAI (213).

#### **1.8.4 Principales CYP responsables del metabolismo hepático de fármacos**

La mayoría del metabolismo hepático de fármacos está sujeto a la acción oxidativa de enzimas *CYP* pertenecientes a las familias 1, 2 y 3. De estas familias, las enzimas que contribuyen mayoritariamente en el metabolismo de fármacos son *CYP3A4/5*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C19* y *CYP2E1* (214-216). En un estudio que abordaba el metabolismo de 200 fármacos de prescripción común se halló la siguiente contribución de *CYP*: *CYP3A4* y *CYP3A5* conjuntamente participaron en la oxidación del 37% de los fármacos, seguidos por *CYP2C9* (17%), *CYP2D6* (15%), *CYP2C19* (10%), *CYP1A2* (9%), *CYP2C8* (6%) y *CYP2B6* (4%) (215).

A continuación, se detallan las características de algunas de estas enzimas por su relevancia en el presente trabajo.

#### 1.8.4.1 CYP2C9 y CYP2C19

La subfamilia CYP2C está formada por 4 isoenzimas codificadas por cuatro genes (*CYP2C18*, *CYP2C19*, *CYP2C9* y *CYP2C8*) agrupados en el cromosoma 10q23.3. Pese a presentar alta homología entre ellas, tienen distintas especificidades de sustrato.

La isoforma CYP2C9 se expresa primariamente en hígado y es el miembro más importante cuantitativamente de la subfamilia. Además es la isoenzima más abundante en hígado después de CYP3A4 (217). Las isoformas CYP2C8 y CYP2C19 constituyen un 26% y 16% de la subfamilia CYP2C en el hígado, respectivamente. La isoforma CYP2C18 parece no tener relevancia puesto que es indetectable en múltiples tejidos.

CYP2C9 y CYP2C19 (Tabla 1.3) parecen ser las dos isoenzimas de esta familia con mayor relevancia en el metabolismo de fármacos de uso clínico habitual. CYP2C9 participa en la transformación metabólica de algunos anticonvulsivos (fenitoína, ácido valproico y fenobarbital), anticoagulantes orales (warfarina y acenocumarol), antiinflamatorios (ibuprofeno, diclofenaco e indometacina) e inhibidores del sistema angiotensina para el control de la hipertensión arterial (irbesartán), entre muchos otros. Algunos de los compuestos inhibidores de la enzima son: fluconazol, voriconazol y amiodarona, que tienen la propiedad de inhibir también otras enzimas CYP. Entre los inductores de la enzima se encuentran los barbitúricos, la carbamazepina, dexametasona y estatinas. Por otro lado, los sustratos de CYP2C19 incluyen la mefenitoína, inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol), copidogrel, ranitidina, etc. Entre los sustratos endógenos se encuentran la progesterona y la melatonina. Son inhibidores el copidogrel, la fluoxetina, omeprazol y voriconazol, mientras que entre sus inductores se hallan el ácido acetilsalicílico, antipirina, barbitúricos, carbamazepina, dexametasona y rifampicina. Muchos de los sustratos, inhibidores e inductores de estas enzimas se engloban tanto dentro de los fármacos probablemente no porfirigénicos como dentro de los clasificados como no seguros en porfiria.

Los genes *CYP2C9* y *CYP2C19* son altamente polimórficos. Se han descrito 60 alelos en *CYP2C9*, definidos por distintos polimorfismos. El alelo con actividad

normal de referencia (*CYP2C9*\*1) es el más frecuente en población caucásica siguiéndole los alelos \*2 y \*3 que codifican para isoformas inactivas.

El alelo *CYP2C9*\*2 consiste en la sustitución NM\_000771.3:c.430C>T (rs1799853) que produce un cambio puntual de aminoácido (p.R144C). Su frecuencia en población española ha sido documentada alrededor del 14% (218, 219). El alelo *CYP2C9*\*3 consiste en el cambio NM\_000771.3:c.1075A>C (rs1057910) que genera la sustitución de un aminoácido (p.I359L) resultando también en un enzima inactivo. Alcanza una frecuencia alrededor del 8% en población española, aunque algunos estudios la describen superior, alrededor del 16% (218-220). Hasta un 14% de la población se categoriza como PM para *CYP2C9*, resultado de la alta frecuencia de estos dos alelos inactivos. Se han descrito otros alelos con actividad reducida o nula pero representan frecuencias muy bajas en población caucásica (221).

En relación a *CYP2C19*, se conocen 35 alelos en el gen. El alelo con actividad normal es el predominante en población, sin embargo, existen alelos no funcionales en la población con relativamente alta frecuencia. Así, el alelo no funcional *CYP2C19*\*2 es el más importante en población caucásica, mientras que el alelo \*3 lo es en población africana. En españoles, el alelo \*2 alcanza una frecuencia del 13%, mientras que el alelo \*3 es poco común (0.3%). *CYP2C19*\*2 consiste en el cambio NM\_000769.1:c.681G>A (rs4244285) que genera un sitio de empalme alternativo aberrante dando lugar a un ARNm con alteración del marco de lectura que contiene un codón de parada prematuro (222). Otros alelos alternativos con actividad reducida son escasos en nuestra población. No obstante, el alelo \*17 que confiere actividad incrementada alcanza un 15% de frecuencia (218).

#### 1.8.4.2 *CYP2D6*

La subfamilia *CYP2D* está formada por el gen *CYP2D6* y dos pseudogenes, *CYP2D7P* y *CYP2D8P*, localizados en el cromosoma 22q13.1. La enzima *CYP2D6* (Tabla 1.4) se expresa en hígado, aunque se ha detectado también en cerebro e intestino. Pese a representar menos del 5% del contenido en citocromos P450 del hígado, es responsable del metabolismo de aproximadamente el 25% de los fármacos de prescripción actuales (223).

Tabla 1.3. Principales características de CYP2C9 y CYP2C19.

Enzima	Relevancia	Sustratos	Inductores	Inhibidores	Alelos más comunes	Frecuencia alélica	Actividad
CYP2C9	principal CYP hepático tras CYP3A4	<b>fenitoína</b>	<b>barbitúricos (fenobarbital)</b>	<b>fluconazol</b>	CYP2C9*1	0.64-0.74	referencia
		<b>ácido valproico</b>	<b>carbamazepina</b>	<b>voriconazol</b>	CYP2C9*2	0.14	inactivo
		<b>fenobarbital</b>	dexametasona	amiodarona	CYP2C9*3	0.08-0.16	inactivo
CYP2C19	16% actividad CYP2C hepática	warfarina	estatinas				
		acenocumarol					
		ibuprofeno					
		dicoflenaco					
		indometacina					
		irbesartán					
CYP2C19	16% actividad CYP2C hepática	mefenitoína	ácido acetilsalicílico	copidogrel	CYP2C19*1	0.83-0.87	referencia
		omeprazol	antipirina	fluoxetina	CYP2C19*2	0.13	ausencia de proteína
		lanzoprazol	<b>barbitúricos</b>	omeprazol	CYP2C19*17	0.15	incrementada
		pantoprazol	<b>carbamazepina</b>	<b>voriconazol</b>			
		ranitidina	dexametasona				
		copidogrel	<b>rifampicina</b>				
		progesterona					
		melatonina					

Fármacos típicamente porfirrogénicos marcados en negrita

Entre sus sustratos se encuentran antipsicóticos (risperidona), antidepresivos tricíclicos, opioides (tramadol y codeína), antieméticos, beta-bloqueantes (timolol, metoprolol), antiarrítmicos, agentes anticancerígenos (tamoxifeno) etc. Algunos de ellos son considerados porfirógenos mientras que otros no. Actúan como inhibidores de CYP2D6 el haloperidol, paroxetina, risperidona, bupropión y metadona, entre otros (214). Curiosamente, esta enzima ha sido tradicionalmente considerado como no inducible por xenobióticos, dado que los ensayos *in vitro* han fallado en demostrar su inducción tras analizar diversos compuestos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que CYP2D6 es inducible por corticosteroides endógenos y exógenos (cortisol, corticosterona, dexametasona, prednisolona), y han sugerido que los métodos habituales para llevar a cabo ensayos *in vitro* de inducibilidad pueden haber estado interfiriendo en la inducción por los xenobióticos (224). Además, CYP2D6 se induce transcripcionalmente durante el embarazo, aumentando su actividad durante este periodo (225-227).

El gen CYP2D6 es uno de los más polimórficos del metabolismo xenobiótico de fase I, existiendo una gran variabilidad genética y fenotípica en la población. Se han descrito 113 alelos distintos, muchos de ellos nulos que no codifican un enzima funcionante, contribuyendo a la aparición de fenotipos PM e IM. Existen alelos con actividad ligera o moderadamente reducida respecto al alelo de referencia (\*1), por lo que existe una gran variabilidad interindividual en la actividad enzimática. También es relativamente frecuente la aparición de duplicaciones del gen o amplificaciones mayores, más comúnmente de los alelos \*1 y \*2. Las copias adicionales del gen dan lugar a los fenotipos UM.

Los alelos CYP2D6\*1 y \*2 son los más comunes en población con frecuencias del 36% (0.364) y 32% (0.324), respectivamente. CYP2D6\*2 presenta una actividad ligeramente menor que el de referencia, sin crear gran impacto en el fenotipo. De todos los alelos nulos, CYP2D6\*3, \*4, \*5 y \*6 contribuyen al 95% de los fenotipos PM en población caucásica (228). En población española los alelos \*1 y \*2 representan un 71.5%, mientras que los alelos nulos más frecuentes son \*4 (13.8%) y \*5 (3.3%) (229). Otros alelos nulos aparecen con frecuencias inferiores, \*3 (0.95%) y \*6 (0.95%). Los fenotipos UM son relativamente frecuentes, con una frecuencia de duplicaciones alrededor del 4%.

Tabla 1.4. Principales características de CYP2D6.

Enzima	Relevancia	Sustratos	Inductores	Inhibidores	Alelos más comunes	Frecuencia alélica	Actividad
CYP2D6	responsable del 25% del metabolismo de fármacos	<b>risperidona</b> <b>antidepresivos tricíclicos</b> opioides (tramadol y codeína) antieméticos beta-bloqueantes (timolol, metoprolol) antiarrítmicos <b>tamoxifeno</b>	corticosteroides: cortisol corticosterona dexametasona prednisolona	<b>haloperidol</b> paroxetina <b>risperidona</b> bupropión metadona	CYP2D6*1	0.36	referencia
					CYP2D6*2	0.32	normal
					CYP2D6*4	0.14	ausencia de proteína
					CYP2D6*5	0.03	ausencia de proteína

Fármacos considerados no seguros en porfiria marcados en negrita

El alelo *CYP2D6*\*4 se caracteriza por la sustitución NM\_000106.5:c.506-1G>A (rs3892097), que elimina un sitio consenso de empalme y genera la ausencia de enzima. Por otro lado, el alelo \*5 consiste en la delección completa del gen.

#### 1.8.4.3 *CYP3A4* y *CYP3A5*

En humanos la familia CYP3 consta tan sólo de una subfamilia, CYP3A. Esta familia está formada por cuatro genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* y *CYP3A43*, localizados de forma adyacente en el cromosoma 7q22.1. Es una familia que presenta gran versatilidad en la biotransformación de compuestos, se estima responsable del metabolismo de la mitad de los fármacos comercializados (230). *CYP3A4* es la isoforma mayoritaria en hígado y también en intestinos, mientras que *CYP3A5* también se expresa en hígado y es la isoforma probablemente predominante en localizaciones extrahepáticas: riñón, cerebro y pulmón. Las enzimas *CYP3A4* y *CYP3A5* (Tabla 1.5) constituyen en conjunto un 30% de los citocromos P450 hepáticos. *CYP3A7* es la principal isoforma fetal de esta familia y raramente se expresa en adultos, mientras que *CYP3A43* es muy escasa en hígado (231, 232).

*CYP3A4* comparte un 85% de aminoácidos con *CYP3A5*, la gran homología entre isoformas explica su superposición en la selectividad de sustrato (231). Los sustratos típicos son inmunosupresores como la ciclosporina A y el tacrolimus, los antibióticos macrólidos como la eritromicina y los fármacos anticancerígenos como el taxol, moléculas más pequeñas como la ifosfamida, el tamoxifeno, las benzodiazepinas, varias estatinas, antidepresivos y opiáceos, entre otros. *CYP3A4* actúa también como hidroxilasa de esteroides con un papel importante en el catabolismo de varios esteroides endógenos incluyendo testosterona, progesterona, cortisol y ácidos biliares. Entre los inhibidores irreversibles de esta enzima se encuentran una gran variedad de fármacos (claritromicina, eritromicina, isoniazida, ketoconazol, ritonavir, etc), algunos identificados como porfirógenos (120, 214). Igualmente ocurre con algunos potentes inductores de *CYP3A4/5* como la carbamazepina, fenobarbital y fenitoína.

La base de datos *Human CYP Allele Nomenclature Database* incluye alrededor de 50 variantes alélicas del gen *CYP3A4* y 26 de *CYP3A5*. La mayoría de los alelos descritos del gen *CYP3A4* no han mostrado tener efecto en la expresión o



actividad de la enzima en términos de farmacodinámica o farmacocinética, respecto al alelo de referencia *CYP3A4\*1A*. Existen algunas variantes genéticas con impacto funcional en la enzima pero que son muy poco frecuentes (<1%). Entre ellas, los alelos *CYP3A4\*6*, *CYP3A4\*20* y *CYP3A4\*26* dan lugar a proteínas truncadas resultantes de codones de parada prematuros, mientras que los alelos *CYP3A4\*8*, \*11, \*13, \*16 y \*17 presentan actividad enzimática reducida. Además, se han descrito dos polimorfismos en regiones no codificantes que se han relacionado con una expresión alterada de la enzima (*CYP3A4\*1B* y *CYP3A4\*22*) (233).

Uno de los alelos alternativos al de referencia más común en la población es *CYP3A4\*1B*, que contiene el polimorfismo NM\_001202855.2:c.-392G>A (rs2740574) consistente en la sustitución de un solo nucleótido en el promotor proximal del gen. Este SNP presenta una frecuencia alélica de 2-9% en población caucásica, pero es más abundante en población africana. En población española se ha descrito una frecuencia del 4% (234, 235). Existe controversia sobre el impacto de este polimorfismo en la funcionalidad de la enzima. Mientras que algunos autores han descrito una actividad reducida en los portadores de este alelo (233) otros no han detectado impacto del polimorfismo en la expresión enzimática (236), o han descrito un incremento de su expresión respecto al alelo de referencia (237). El alelo *CYP3A4\*1B* se ha relacionado con distintos tipos de cáncer y con un inicio más temprano de la pubertad en mujeres (238). Otros alelos alternativos con impacto en la funcionalidad de la enzima son más raros en la población, con frecuencias alélicas inferiores al 1% (0.01). Por ejemplo, se ha descrito una frecuencia alélica de 0.6 % (0.006) en población española para el alelo *CYP3A4\*20*, que determina una ausencia enzimática (239).

De las 26 variantes alélicas descritas en el gen *CYP3A5*, el único alelo que codifica una proteína completamente funcional es *CYP3A5\*1*. Sin embargo, *CYP3A5\*1* no es el alelo más frecuente en la población caucásica. En población española se ha descrito una frecuencia alélica del alelo no funcional *CYP3A5\*3* del 91% (0.91) (235). Éste se caracteriza por la sustitución NM\_000777.4:c.219-237A>G (rs776746), que genera un sitio críptico de empalme alternativo que da lugar a un ARNm aberrante con un codón de parada prematuro.

Tabla 1.5. Principales características de CYP3A4 y CYP3A5.

Enzima	Relevancia	Sustratos	Inductores	Inhibidores	Alelos más comunes	Frecuencia alélica	Actividad
CYP3A4	principal CYP hepático	ciclosporina A tacrolimus <b>eritromicina</b> taxol ifosfamida tamoxifeno <b>benzodiazepinas</b> opiáceos	<b>carbamazepina</b> <b>fenobarbital</b> <b>fenitoína</b>	claritromicina <b>eritromicina</b> <b>isoniazida</b> <b>ketoconazol</b> <b>ritonavir</b>	CYP3A4*1A	0.96-0.97	normal
					CYP3A4*1B	0.02-0.09	Controvertida (aumentada/disminuida)
CYP3A5	menos abundante (30% metabolismo de fármacos junto con CYP3A4)	testosterona progesterona cortisol ácidos biliares			CYP3A5*1	<0.10	normal
					CYP3A5*3	0.91	ausencia de proteína

Fármacos típicamente porfirrogénicos marcados en negrita.

Sólo los portadores de al menos una copia del alelo *CYP3A5\*1* producen un ARNm de longitud normal y expresan la enzima CYP3A5 (240). Por ello, la proteína CYP3A5 se expresa en sólo un 10-30 % de los adultos de raza blanca y asiática, y en un 60% de los afroamericanos. El resto de variantes alélicas son raras en población caucásica.



## **II – JUSTIFICACIÓN**



## II – JUSTIFICACIÓN

La PAI es la porfiria aguda más frecuente en nuestra población. Se trata de una enfermedad rara genética con herencia AD que, como sucede con el resto de porfirias, presenta penetrancia incompleta, de forma que no todos los individuos portadores de la enfermedad la manifiestan clínicamente. La expresión clínica de la PAI consiste en crisis neuroviscerales que aparecen tras periodos de latencia clínica. Se ha descrito que tan sólo un 10-20% desarrollan crisis neuroviscerales (PAI manifiesta). Las crisis neuroviscerales suelen ocurrir asociadas a determinados factores considerados como precipitantes: fármacos porfirógenicos, ayuno, estrés, alcohol y hormonas esteroideas, principalmente. Sin embargo, estos factores no proporcionan explicación suficiente a la baja penetrancia de la enfermedad, puesto que la susceptibilidad es variable entre los individuos portadores de PAI. Tampoco dan una explicación completa a la penetrancia las posibles diferencias en las mutaciones o variantes patogénicas del gen *HMBS*, ya que individuos dentro de una misma familia, portadores del mismo defecto genético, presentan diferencias en la expresión clínica de la enfermedad. Por ello se ha sugerido la existencia de otros genes, distintos a *HMBS*, que intervendrían posiblemente en la modulación de la demanda de hemo y por tanto tendrían un papel en la susceptibilidad a desarrollar crisis en las porfirias agudas.

Actualmente, se desconocen los posibles factores genéticos que influyen en la expresión de las porfirias agudas y son escasos los estudios dirigidos en este sentido. Sin embargo, es necesaria la identificación de genes modificadores, particularmente en la PAI, y la detección de variantes genéticas de susceptibilidad a desarrollar crisis. Esto permitiría esclarecer los mecanismos implicados en la penetrancia y elaborar perfiles de riesgo genético individual con aplicabilidad traslacional en medicina personalizada o de precisión de esta enfermedad.





## **III – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### III – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

Dada las evidencias que sugieren que *ALAS1* y los genes *CYP* intervienen en la modulación de la síntesis de hemo, se plantea la hipótesis de que las variantes genéticas en estos genes, con impacto en la actividad catalítica de las enzimas, podrían determinar una mayor o menor susceptibilidad a manifestar crisis agudas en los individuos portadores de PAI. Estas variantes genéticas contribuirían a explicar la diferencias interindividuales en la expresión de la enfermedad, y por tanto su penetrancia.

#### 3.2 OBJETIVOS

El objetivo principal es identificar variantes genéticas en las regiones reguladoras del gen *ALAS1* y en los genes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*, que actúen como factores de susceptibilidad para la manifestación de crisis agudas en individuos portadores de PAI.

Los objetivos secundarios son:

- Identificar las características demográficas básicas en nuestra población de PAI y la proporción de portadores con PAI manifiesta y latente.
- Identificar variantes en la secuencia nucleotídica en la región promotora del gen *ALAS1* y en las dos regiones distales de respuesta a fármacos, *ADRES1* y *ADRES2*.
- Analizar el grado de metilación de una isla CpG en la región 5' reguladora de *ALAS1*, detectada por predicción *in silico*, para identificar posibles variantes de metilación.
- Analizar si existe asociación entre las variantes de la secuencia o de metilación y la aparición de PAI manifiesta.
- Determinar el genotipo de los genes citocromo P450 (*CYP*) para los siguientes alelos y calcular sus frecuencias alélicas: *CYP2C9\*2* (rs1799853), *CYP2C9\*3*

(rs1057910), *CYP2C19\*2* (rs4244285), *CYP2D6\*4* (rs3892097), *CYP2D6\*5* (delección del gen), *CYP3A4\*1B* (rs2740574) y *CYP3A5\*3* (rs776746).

- Comparar las frecuencias alélicas entre portadores de PAI latente y PAI manifiesta.
- Analizar si existe asociación entre los genotipos *CYP* y la aparición de PAI manifiesta.
- Analizar el efecto de los genotipos *CYP* en la excreción urinaria de los precursores ALA y PBG.

## **IV – MATERIAL Y MÉTODOS**



## IV – MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional retrospectivo de las características demográficas y la aparición de crisis (PAI manifiesta) en individuos portadores de PAI y analítico transversal para analizar la presencia de variantes genéticas en los genes *ALAS1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5* con el fin de determinar su asociación con la manifestación clínica de la enfermedad.

### 4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron 50 individuos, mayores de 16 años, con diagnóstico molecular confirmado de PAI, procedentes de la Sección de Genética Médica del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) en El Palmar, Murcia. El HCUVA pertenece a la red pública de hospitales y es centro de referencia del área 1 de salud de la Región de Murcia. La Sección de Genética Médica del hospital es la unidad de referencia de la región en esta disciplina.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCUVA y el Comité de Ética de la Universidad Católica de Murcia (UCAM).

Los pacientes fueron citados en la consulta de Genética Médica del HCUVA donde se les informó del estudio. Los participantes accedieron voluntariamente a ser incluidos en el estudio firmando consentimiento informado (Anexos 2 y 3) autorizando la consulta y utilización de datos clínicos y la realización de los análisis incluidos en el estudio. Además, dieron su consentimiento para la utilización de material biológico excedente del proceso asistencial y su conservación en el nodo 1 del Biobanco en Red de la Región de Murcia (BIOBANC-MUR), en cumplimiento de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

#### 4.3 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Los pacientes con PAI siguen un control anual en la Sección de Genética Médica del HCUVA. Se revisaron sus historias clínicas, con el fin de determinar los antecedentes de manifestaciones clínicas propias de la PAI y además fueron entrevistados en la consulta. Los datos se recogieron según un cuestionario estandarizado que incluye además de las variables utilizadas en este estudio, otros datos de interés para el seguimiento clínico de los pacientes (Anexo 4). Los datos y las variables que se utilizaron para el presente estudio fueron:

- Datos personales: nombre, fecha de nacimiento, número de historia clínica.
- Datos clínicos: mutación o variante patogénica en el gen *HMBS* causal de PAI, antecedentes familiares de PAI (árbol genealógico).
- Variables demográficas: sexo y edad.
- Variables clínicas: se consideró la ocurrencia de crisis agudas y el número de crisis. La variable ocurrencia de crisis se obtuvo a partir de la historia previa de crisis agudas, definidas como crisis de dolor abdominal con demostración de aumento de precursores ALA y PBG en orina, que hayan requerido atención en un servicio de urgencias o ingreso hospitalario. Los individuos que habían presentado al menos una crisis aguda, se clasificaron como PAI manifiesta y los que nunca habían presentado crisis se clasificaron como PAI latente.

#### 4.4 RECOGIDA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se llevó a cabo una extracción de sangre periférica en 2 tubos con EDTA de 5 ml, por el personal de enfermería de la Sección de Genética Médica. Las muestras se remitieron inmediatamente al nodo 1 del Biobanco en Red de la Región de Murcia (BIOBANC-MUR) para la extracción de ADN y su conservación.

Los pacientes tomaron una muestra de orina de micción espontánea reciente a primera hora de la mañana y la entregaron protegida de la luz en la Sección de Genética Médica para determinación rutinaria de control de ALA y PBG urinarios. Todas las muestras de orina se recogieron en periodo asintomático o al menos tras un periodo de 6 meses libre de sintomatología sugestiva de PAI en los



casos de PAI manifiesta. Las muestras de orina se remitieron al servicio de Análisis Clínicos del hospital para su análisis.

#### 4.5 PURIFICACIÓN DE ADN Y CONSERVACIÓN

El procedimiento de extracción de ADN a partir de las muestras de sangre total se llevó a cabo en el biobanco. Los tubos de extracción primarios se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos, de los que se recuperó la capa leucocitaria. La purificación del ADN se realizó de forma automatizada en un equipo Qiacube (Qiagen, Hilden, Alemania), con el kit comercial de extracción en columna Qiamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la purificación se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría en un equipo Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suiza).

El ADN se distribuyó en alícuotas según el procedimiento habitual del biobanco y se almacenaron en un congelador de -40°C hasta su uso.

Las alícuotas requeridas para los análisis genéticos de este estudio se solicitaron a biobanco y se transportaron refrigeradas al laboratorio de la Cátedra de Genética de la Universidad Católica de Murcia (UCAM). Allí se conservaron en un congelador de -20°C durante su uso.

Tras descongelar las alícuotas, se realizó una nueva cuantificación del ADN por espectrofotometría de absorción molecular en el espectro ultravioleta utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 (DeNovix, Wilmington, EEUU) y agua destilada como calibrador. Esta cuantificación por espectrofotometría está basada en la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de ADN de absorber luz con un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. Una unidad de absorbancia de 260 nm corresponde a una concentración de ADN de 50 mg/ml.

#### 4.6 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN *ALAS1* Y LAS REGIONES ADRES1 Y ADRES2

El análisis del promotor de *ALAS1* y las regiones ADRES1 (-20 Kb) y ADRES2 (-16 Kb) consistió en una secuenciación para la identificación de variantes genéticas.

Para el análisis del promotor de *ALAS1*, se estableció como diana de estudio una región de 1.2 Kb comprendida entre el nucleótido +1 y -1200 (NC\_000003.11(NM\_199166.2)). Se consideró posición +1 el primer nucleótido del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en localización más 3', puesto que el gen *ALAS1* presenta múltiples TSS (14).

#### 4.6.1 Amplificación de las regiones de interés

Las regiones de interés se amplificaron mediante PCR convencional. Con este fin, se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos con el programa en línea de libre acceso *Primer3 versión 4.1.0*, (accesible en <http://primer3.ut.ee/>) (241). Se tomaron como referencia las regiones de interés y zonas flanqueantes (correspondientes a la versión de genoma GRCh37.p13 (NC\_000003.11)) que se descargaron de la base de datos *GeneBank* (accesible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). La secuencia de los cebadores, así como el detalle de las regiones amplificadas (amplicones) se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Amplicones y cebadores utilizados en el análisis de la región 5' de *ALAS1*.

Nombre del amplicón	Oligonucleótido cebador 5'-3'		Tamaño amplicón (pb)	Coordenadas del amplicón (GRCh37.p13)
promotor ALAS1_1	Directo	CCAAGTCCAAGTGCTGACCT	571	chr3:52230886-52231456
	Reverso	CCATCCAGGGTTGTCTGAAG		
promotor ALAS1_2	Directo	TGGAGGAGAGTACCTCTGAGC	589	chr3:52231209-52231797
	Reverso	CTTGACATGGAGGAAGAAGG		
promotor ALAS1_3	Directo	AGCCCTTGTTACAGTTTCC	539	chr3:52231696-52232234
	Reverso	GGCACTCAAGTCGAGAAGT		
ADRES1	Directo	GGCTTGTCACCCAGATTT	366	chr3:52211232-52211597
	Reverso	CCCCACCACACTTTGACTCT		
ADRES2	Directo	GAGGTTGGGGTGGAGAAGAC	232	chr3:52216182-52216413
	Reverso	TGTGCTCTGTCCTGGTTCC		

La amplificación de la región de 1.2 Kb en la zona promotora se llevó a cabo en tres amplicones solapantes, mientras que las regiones ADRES1 y ADRES2 se amplificaron en un solo amplicón cada una. Todos los cebadores se diseñaron con temperaturas de hibridación próximas 60°C para asegurar una mayor especificidad y favorecer una uniformidad en la reacción de PCR. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co (San Luis, EEUU).

La reacción de amplificación incluía: 12.5 µl de AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), que consiste en una mezcla comercial para PCR que contiene Taq polimerasa, dNTPs y tampón; 0.5 µl de cada par de cebadores (directo y reverso) a una concentración de 10 µM; 0.5 µl de tampón comercial 360 GC Enhancer (Applied Biosystems); 100 ng de ADN genómico (DNAg) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de reacción de 25 µl.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems) siguiendo las siguientes condiciones: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, 35 ciclos de amplificación (30 segundos a 95°C de desnaturalización, 1 minuto a 60°C de hibridación de cebadores, 1 minuto a 72°C de extensión) y 5 minutos a 72°C de extensión final terminando con un paso de refrigeración a 4°C.

En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo carente de ADN para controlar posibles contaminaciones.

#### **4.6.2 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de los productos de PCR**

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (UltraPure Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EEUU) preparado en tampón TBE 1x (Fisher Scientific, Hampton, EEUU). Se añadió 10 µl de SYBR™ Safe (Invitrogen) concentrado 10000x en DMSO a cada 100 ml de gel. Éste consiste en un compuesto comercial que se une al ADN y emite fluorescencia a 280 y 502 nm, permitiendo su visualización en un transiluminador ultravioleta.

Se mezclaron 5 µl de producto de PCR con 2 µl de tampón de carga y se cargaron en los distintos pocillos del gel junto con un marcador de tamaño molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen). El gel se sometió a electroforesis a 120 voltios durante 35 minutos. La visualización de los productos de PCR se llevó

a cabo con un transiluminador UV y se capturaron imágenes usando un equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania).

Se comprobó la aparición de un único amplificado del tamaño esperado para cada reacción, comparando con el marcador de tamaño molecular y la ausencia de bandas inespecíficas o de producto de amplificación en la reacción de control negativo.

Los productos de la PCR fueron purificados mediante reacción enzimática para eliminar los cebadores y dNTPs no incorporados, previamente a la reacción de secuenciación. La purificación se realizó mezclando 4  $\mu$ l de producto de la PCR con 0.5  $\mu$ l de fosfatasa alcalina (SAP) y 0.5  $\mu$ l de exonucleasa I (EXO), ambas incluidas en el kit comercial Illustra™ ExoProStar™ S (GE Healthcare, Freiburg, Alemania), y 1  $\mu$ l de agua para uso molecular. La mezcla resultante se incubó en el termociclador durante 5 minutos a 37 °C seguido de 10 minutos a 80°C, según indicaciones del fabricante.

#### **4.6.3 Reacción de secuenciación, purificación y electroforesis capilar**

La reacción de secuenciación convencional (secuenciación sanger) se realizó con el kit comercial BrightDye™ Terminator Cycle Sequencing (Nimagen, Nijmegen, Países Bajos) que contiene todos los elementos necesarios para los ciclos de secuenciación. Los amplicones se secuenciaron en sentido directo y reverso, utilizando los mismos cebadores que en la reacción de PCR de amplificación. La reacción consistió en 3  $\mu$ l del producto de amplificación purificado, 1  $\mu$ l de BrightDye premix (incluido en el kit), 1.5  $\mu$ l de 5x Sequencing Buffer (incluido en el kit), 0.5  $\mu$ l de cebador directo o reverso y 4  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, con un volumen final de 10  $\mu$ l. Los ciclos de secuenciación se realizaron en el termociclador siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante: 1 minuto de desnaturalización inicial a 96°C, 28 ciclos de síntesis (10 segundos a 96°C, 5 segundos a 57°C y 4 minutos a 60°C), refrigeración a 4°C.

Tras los ciclos de secuenciación, todo el volumen de la reacción se sometió a un paso de purificación mediante filtración por columna, en placa de 96 pocillos Optima DTR™ (EdgeBio, Gaithersburg, EEUU) siguiendo los pasos de centrifugación indicados por el fabricante (5 minutos a 850 g). Este sistema permite la eliminación de los ddNTPs marcados fluorescentemente no

incorporados, dNTPs, cebadores y sales que puedan interferir en la electroforesis posterior.

La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los electroferogramas se analizaron con el software Sequence Analysis V6.0 (Applied Biosystems). Para la detección de variantes genéticas se utilizó el programa Variant Reporter v2 (Applied Biosystems) tomando la secuencia de referencia de las regiones de interés procedentes de *GeneBank*.

#### 4.7 ANÁLISIS DE ISLAS CpG Y GRADO DE METILACIÓN EN LA REGION 5' DEL GEN *ALAS 1*

##### 4.7.1 Predicción *in silico* de islas CpG

Se analizó la secuencia que comprende desde el inicio de la transcripción (posición +1) hasta -6 Kb (en dirección 5') del gen *ALAS1*, en búsqueda de predicción de posibles islas CpG con el software *EMBOSS Cpplot* (EMBL-EBI) (accesible en [https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_cpplot/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/)) (242). Se tomaron como criterios de búsqueda los siguientes: tamaño igual o superior a 100 pb, suma del porcentaje de citosinas y guaninas superior al 50% y ratio de la frecuencia observada/esperada superior a 0.6.

El programa predijo dos posibles islas CpG con una extensión de 100 pb (isla CpG 1) y 101 pb (isla CpG 2), localizadas a -4.67 Kb y -2.64 Kb del inicio de la transcripción, respectivamente. Se estudiaron con detenimiento ambas regiones en el navegador genómico *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) (243) (Figura 4.1 y Figura 4.2). Distintas herramientas de análisis de conservación filogenética (*GERP*, *phastCons* y *phyloP*) mostraron un alto índice de conservación de la secuencia nucleotídica en la región correspondiente a la predicción de la isla CpG 1 y regiones anexas, a diferencia de la predicción de la isla CpG 2. Según datos procedentes de ensayos de metilación del proyecto ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>), esta posible isla CpG se encuentra en una región diferencialmente metilada en distintos tejidos. Así mismo, el predictor de islas CpG *Weizmann Evolutionary CpG Islands*, consultado a través de *UCSC Genome Browser*, predice una isla solapante con la definida a -4.67 Kb por el

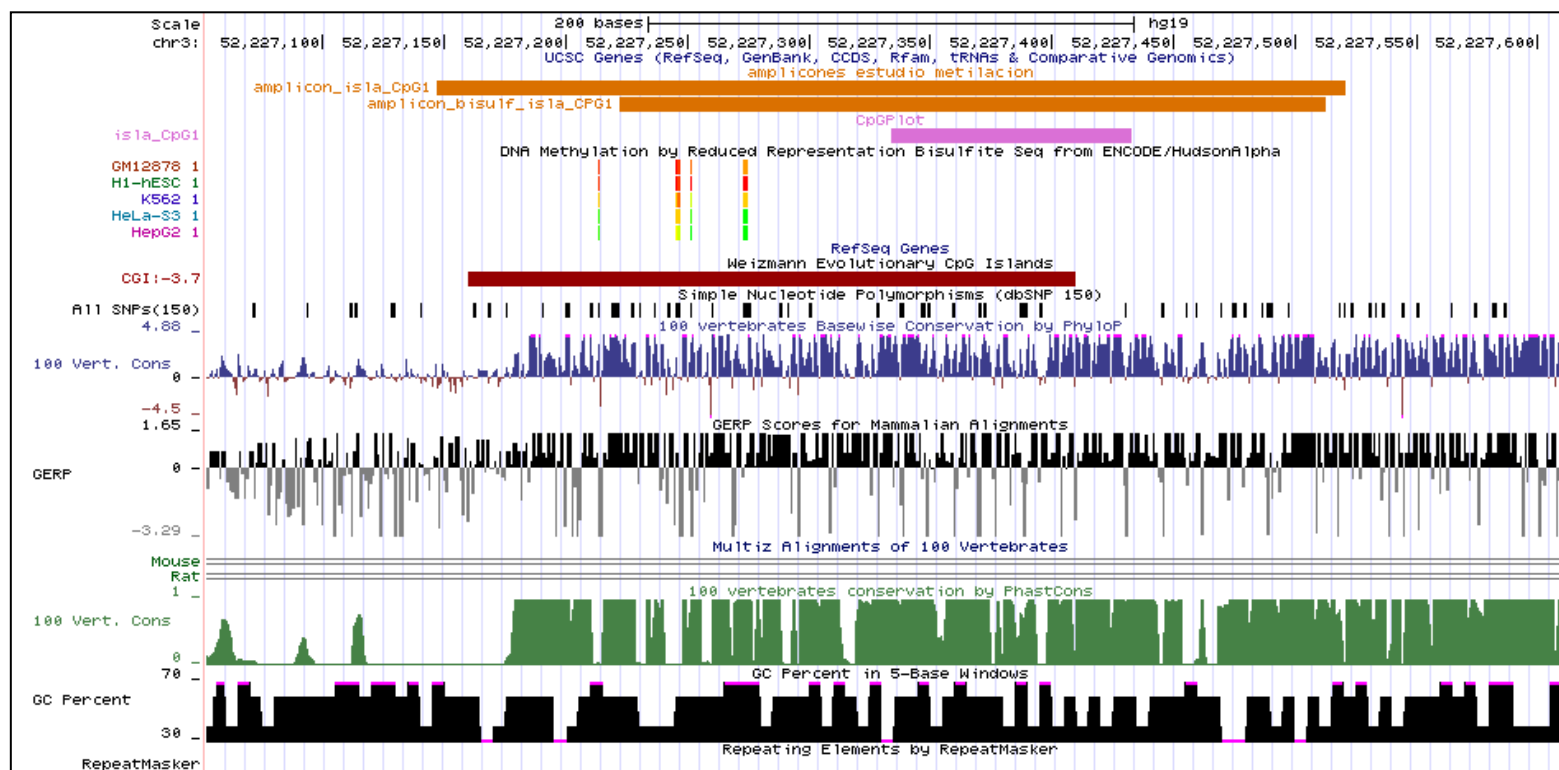


Figura 4.1. Vista en UCSC Genome Browser de la isla CpG 1 (en color púrpura) y amplicones estudiados (naranja).

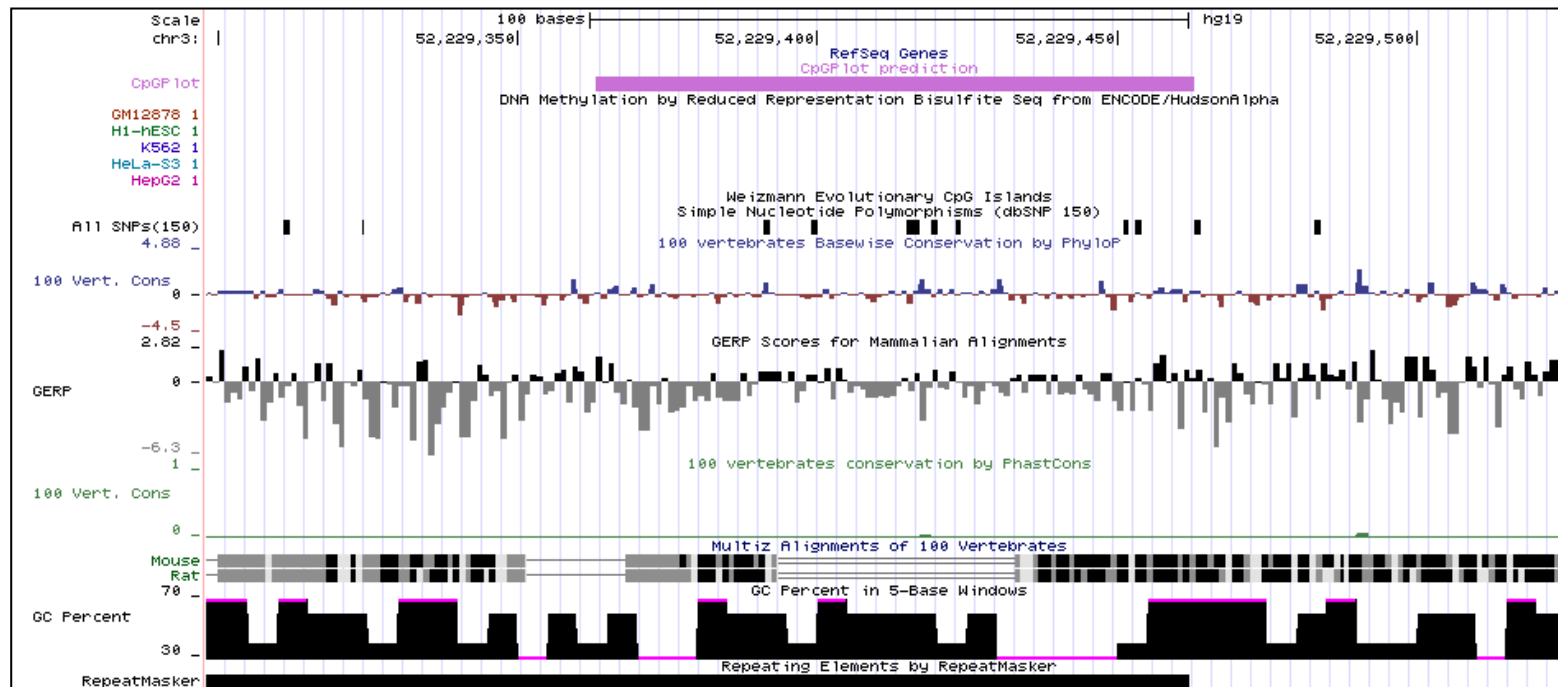


Figura 4.2. Vista en UCSC Genome Browser de la isla CpG 2 (en color púrpura).

software EMBOSS Cpgplot. Teniendo en cuenta estos hallazgos se decidió dirigir el estudio a la posible isla CpG 1, situada a -4.67 Kb del inicio de *ALAS1*. Se estableció como región diana un segmento de 250 pb, que abarca 100 pb correspondientes a la predicción *in silico* de la isla CpG 1 y 150 pb adicionales anexas en posición 5'.

#### 4.7.2 Análisis del estado de metilación

El análisis del estado de metilación de los dinucleótidos CG localizados en la región diana se llevo a cabo mediante secuenciación específica de bisulfito.

##### 4.7.2.1 Tratamiento con bisulfito

Se tomaron dos alícuotas de ADN<sub>g</sub> por individuo y una de ellas se sometió a tratamiento con bisulfito usando el kit comercial *EpiJET Bisulfite Conversion Kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El tratamiento con bisulfito del ADN<sub>g</sub> produce la desaminación de las citosinas que se encuentran sin metilar convirtiéndolas en uracilo, mientras que las citosinas metiladas no sufren modificación. Las citosinas convertidas a uracilo aparecen como timina tras una amplificación por PCR. Esta conversión permite posteriormente estudiar en paralelo el ADN tratado con bisulfito y el original sin tratamiento, mediante la comparación de la secuencia nucleotídica entre ambos. Aquellas citosinas de la secuencia original que se detectan como timina en la secuencia tratada con bisulfito corresponden a aquellas que se encuentran sin metilar, mientras que las que se detectan como citosina corresponden con las que se encuentran metiladas en la secuencia original.

##### 4.7.2.2 Amplificación por PCR

Se diseñaron cebadores para la amplificación de la región de interés a partir tanto de la secuencia original no sometida a tratamiento como de la secuencia convertida con bisulfito. Los detalles de los cebadores y amplicones resultantes se muestran en la Tabla 4.2. El diseño de cebadores para amplificar el ADN no tratado con bisulfito se realizó con el software Primer3 versión 4.1.0. El diseño de cebadores para amplificar el ADN tratado con bisulfito se realizó con el software



de libre acceso *MethPrimer* (accesible en <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), que asume la conversión de las citosinas en uracilo para el diseño (244).

**Tabla 4.2.** Amplicones y cebadores para el análisis de la isla CpG.

Nombre del amplicón	Oligonucleótido cebador 5'-3'		Tamaño (pb)	Coordenadas (GRCh37.p13)
islaCpG1	Directo	CACCCCTCTCCTGTGCTAGA	375	chr3:52227147-52227521
	Reverso	CACCCCTTGTCTACCTTGA		
islaCpG1 bisulfito	Directo	GAAGGAGTTGTTTGATATGATTAT	292	chr3:52227221-52227512
	Reverso	ATCTACCTTAATACTCACAACATTAC		

La reacción de PCR a partir de ADN<sub>g</sub> sin tratamiento con bisulfito se llevó a cabo en las condiciones detalladas en el apartado 4.6.1. La amplificación a partir de ADN<sub>g</sub> tratado con bisulfito se realizó con: 12.5 µl de *AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix* (Applied Biosystems), 0.5 µl de cada par de cebadores (directo y reverso) a una concentración de 10 µM, 100 ng de ADN<sub>g</sub> tratado con bisulfito y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de reacción de 25 µl. La PCR se llevó a cabo siguiendo las siguientes condiciones: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, 45 ciclos de amplificación (30 segundos a 95°C de desnaturalización, 1 minuto de hibridación de cebadores a 55°C, 1 minuto a 72°C de extensión) y 5 minutos a 72°C de extensión final terminando en un paso de refrigeración a 4°C. Se incluyeron controles negativos sin ADN.

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en las condiciones detalladas en el apartado 4.6.2 y se visualizaron para comprobar la aparición de un único amplificado del tamaño esperado.

Los productos de la PCR fueron purificados mediante reacción enzimática usando el kit comercial *Illustra™ ExoProStar™ S*, siguiendo las instrucciones detalladas en el apartado 4.6.2.

#### 4.7.2.3 Reacción de secuenciación, purificación y electroforesis capilar

Los amplicones se secuenciaron en sentido directo y reverso, utilizando los mismos cebadores que en la reacción de PCR de amplificación, mediante secuenciación convencional. La secuenciación del fragmento procedente de la PCR del ADN no tratado con bisulfito se realizó en las condiciones detalladas en el apartado 4.6.3. La secuenciación del fragmento resultante de la PCR procedente del ADN tratado con bisulfito se realizó siguiendo el mismo protocolo, salvo las condiciones de la PCR de secuenciación, que fueron las siguientes: 1 minuto de desnaturalización inicial a 96°C, 30 ciclos de síntesis (10 segundos a 96°C, 5 segundos a 55°C y 4 minutos a 60°C), refrigeración a 4°C.

Los productos de la PCR de secuenciación se purificaron mediante filtración en gel, en placa de 96 pocillos *Optima DTR™* (EdgeBio, Gaithersburg, EEUU) siguiendo los pasos de centrifugación indicados por el fabricante.

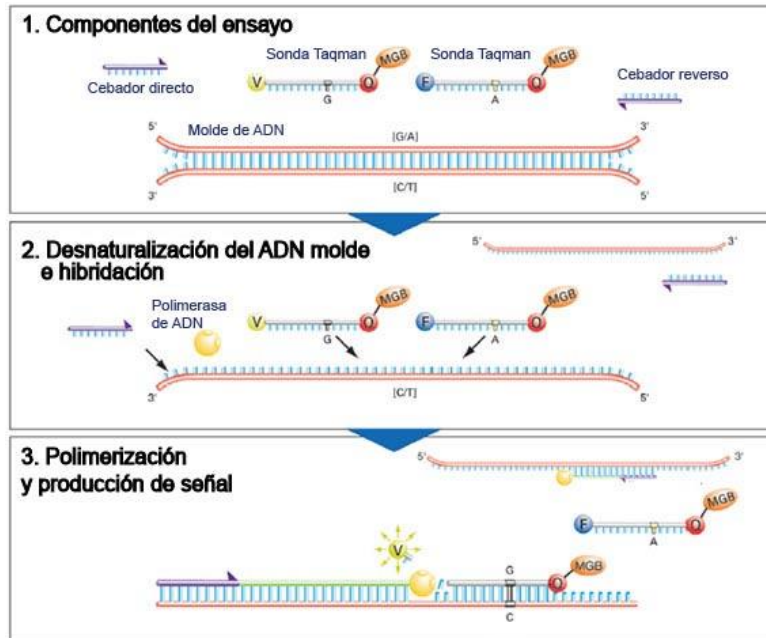
La electroforesis capilar y el análisis de secuencias se realizaron como se detalla en el apartado 4.6.3. Para la detección de variantes genéticas se utilizó el programa *Variant Reporter v2* (Applied Biosystems) tomando la secuencia de referencia de la región genómica correspondiente procedente de *GeneBank*.

### 4.8 ANÁLISIS DE GENES CYP

El análisis de genes *CYP* consistió en el genotipado de los SNPs que determinan los alelos *CYP2C9\*2* (rs1799853), *CYP2C9\*3* (rs1057910), *CYP2C19\*2* (rs4244285), *CYP2D6\*4* (rs3892097), *CYP3A4\*1B* (rs2740574) y *CYP3A5\*3* (rs776746) y en el estudio de delección del gen *CYP2D6* que corresponde al alelo\*5.

#### 4.8.1 Genotipado de polimorfismos en los genes *CYP*

El genotipado de polimorfismos se realizó por discriminación alélica con sondas Taqman® mediante PCR a tiempo real. El fundamento de la técnica basada en tecnología Taqman se detalla en la Figura 4.3. Se usaron kits comerciales *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays* de Applied Biosystems™, que incluyen los cebadores y sondas Taqman marcadas con flourocromos específicos para el genotipado de cada polimorfismo (Tabla 4.3).



**Figura 4.3.** Fundamento del genotipado de SNPs por PCR a tiempo real con sondas Taqman. Los ensayos de genotipado TaqMan® consisten en un par de cebadores específicos de la región objeto de estudio y dos sondas alelo específicas marcadas en el extremo 5' con los colorantes fluorescentes FAM (F) y VIC (V), respectivamente. Ambas sondas contienen una molécula Q (*Quencher*) en su extremo 3', que suprime la fluorescencia del colorante mientras ambos están unidos al ADN y una molécula MGB (*Minor Groove Binder*), que aumenta la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de la sonda y estabiliza los híbridos sonda-molde. En cada ciclo de amplificación, la sonda que es complementaria al alelo presente en el ADN se une a este. La polimerasa comienza la síntesis de ADN complementario a partir del cebador. Cuando llega a la sonda, con su actividad exonucleasa, libera el colorante fluorescente separándolo de Q. Esto permite la emisión de fluorescencia por el colorante, que es detectada por el equipo de PCR a tiempo real. En ausencia del alelo complementario, la sonda no se une y permanece intacta de forma que no emite fluorescencia al encontrarse en las proximidades de Q. Por lo tanto, la detección de fluorescencia indica la presencia del alelo complementario a la sonda marcada con dicha fluorescencia. Modificado de <https://www.thermofisher.com>.

La reacción de PCR, con volumen final de 25  $\mu$ l, consistió en 1.25  $\mu$ l del reactivo *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays*, 12.5  $\mu$ l de *Taqman Genotyping Master Mix* de Applied Biosystems™, que incluye la polimerasa, dNTPs y tampón para la PCR, y 11.25  $\mu$ l de ADN (20ng) diluido en agua libre de nucleasas. Se incluyeron cuatro controles negativos en cada ensayo. La amplificación y detección de fluorescencia se realizó con un termociclador a tiempo real ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™). Las condiciones fueron las siguientes: 10 minutos iniciales a 95°C para la activación de la polimerasa, 50 ciclos (95°C durante 15 segundos de desnaturalización y 60°C durante 90 segundos de hibridación y extensión), siguiendo las instrucciones del ensayo. Se configuraron lecturas de fluorescencia pre-PCR (señal de fondo), a tiempo real y post-PCR.

**Tabla 4.3.** Detalle de los kits de discriminación alélica *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays*.

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Alelo	Marcaje fluorescente	Referencia del ensayo
CYP2C9	rs1799853	C	referencia (*1)	VIC	C_25625805_10
		T	*2	FAM	
CYP2C9	rs1057910	A	referencia (*1)	FAM	C_27104892_10
		C	*3	VIC	
CYP2C19	rs4244285	G	referencia (*1)	FAM	C_25986767_10
		A	*2	VIC	
CYP2D6	rs3892097	C	referencia (*1)	VIC	C_27102431_D0
		T	*4	FAM	
CYP3A4	rs2740574	T	referencia (*1A)	FAM	C_1837671_50
		C	*1B	VIC	
CYP3A5	rs776746	C	referencia (*1)	FAM	C_26201809_30
		T	*3	VIC	

El análisis de los datos se realizó con el software controlador del equipo (7500 Software v2.0.6). Éste permite la obtención de un gráfico de dispersión (gráfico de discriminación alélica) de las intensidades de fluorescencia a punto final obtenidas en cada individuo. Este gráfico representa la fluorescencia

correspondiente a cada sonda, complementaria a cada alelo, en los ejes X e Y, respectivamente. De esta forma, los individuos analizados se agrupan visualmente en tres grupos o clústers: uno para los homocigotos para el alelo de referencia; otro para los heterocigotos con las dos señales de fluorescencia y otro para los homocigotos del alelo alternativo minoritario. En aquellos casos en los que sólo estaban presentes dos genotipos de los tres posibles se habilitó la opción de análisis para dos clústers (*2-cluster calling*), para una correcta asignación del genotipo.

#### 4.8.2 Análisis de delección del gen *CYP2D6* (*CYP2D6\*5*)

El análisis del alelo *CYP2D6\*5*, consistente en la delección del gen *CYP2D6* completo, se realizó con el ensayo comercial *Taqman Copy Number Assay* con referencia Hs00010001\_cn (Applied Biosystem). Se usó el ensayo del gen de la ARNasa P (*RPPH1*) localizado en el cromosoma 14 (14q11.2) como referencia. Este análisis consiste en una PCR a tiempo real simultánea para la amplificación del gen de interés y el gen de referencia que está presente constitutivamente con dos copias. La amplificación de ambos genes es detectada con dos sondas Taqman marcadas con colorantes fluorescentes (FAM y VIC). La cuantificación del número de copias se basa en el método de comparación de  $C_T$  (ciclo umbral) o  $\Delta C_T$ . En primer lugar, se detecta el ciclo en el cual la señal de fluorescencia de cada ensayo (gen de interés y gen de referencia) alcanza un valor umbral ( $C_T$ ) y se realiza una comparación entre ellos ( $\Delta C_T$ ) con el fin de normalizar los valores de fluorescencia obtenidos:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ ensayo del gen de interés}} - C_{T \text{ ensayo del gen de referencia}}$$

A continuación se realiza una comparación ( $\Delta \Delta C_T$ ) entre el valor  $\Delta C_T$  analizado en cada muestra analizada y el obtenido en una muestra usada como calibrador, cuyo número de copias para el gen de interés es conocido:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ muestra}} - \Delta C_{T \text{ calibrador}}$$

En ausencia de calibrador, se realiza un cálculo considerando los valores  $\Delta C_T$  obtenidos en todas las muestras analizadas estableciendo que el número de copias más frecuente es igual a 2, como valor del calibrador.

Finalmente el software de análisis realiza una predicción del número de copias en base al siguiente cálculo:

$$CN_{\text{muestra}} = RQ_{\text{muestra}} \times CN_{\text{calibrador}}$$

donde CN es el número de copias y RQ es la cuantificación relativa ( $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ )

La reacción de PCR consistió en: 10  $\mu\text{l}$  de *Taqman Genotyping Master Mix*, 1  $\mu\text{l}$  de *Taqman Copy Number Assay* (ensayo específico de la región de interés, que contiene dos cebadores y una sonda Taqman marcada con el colorante FAM), 1  $\mu\text{l}$  de *Taqman Copy Number Reference Assay RNase P* (ensayo de referencia para la detección de ARNasa P, que contiene dos cebadores y una sonda Taqman marcada con VIC), 4  $\mu\text{l}$  de ADNg a una concentración de 5 ng/  $\mu\text{l}$  y 4  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas. Se realizaron dos replicados por muestra salvo en aquellos casos con resultado dudoso en los que se repitió el ensayo con cuatro replicados. Se incluyeron 6 controles negativos en cada placa analizada. No se incluyó ensayo con muestra calibrador. Las condiciones de termociclado fueron: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos (15 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C). La reacción y detección de fluorescencia se realizó con un termociclador ABI 7500 Fast. Se establecieron los parámetros indicados por el fabricante en el termociclador para la lectura de fluorescencia ("Manual Ct threshold"=0.2 y "Autobaseline"=On).

Los resultados se exportaron al programa CopyCaller Software v2.0 (Applied Biosystems) para el análisis y cálculo del número de copias.

#### 4.9 DETERMINACIONES DE ALA Y PBG EN ORINA

Las muestras de orina de micción espontánea protegidas de la luz se mantuvieron congeladas a -20° hasta su análisis en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Los niveles de ALA y PBG se determinaron mediante cromatografía en columna, usando el kit comercial con referencia 11017 de BioSystems S.A. (Barcelona, Spain), y posterior cuantificación mediante espectrofotometría a 553 nm.

Los valores se expresaron como ratio respecto a creatinina (Cr) en orina: ALA/Cr y PBG/Cr ( $\mu\text{mol} / \text{mmol}$ ). La determinación de creatinina en orina se realizó de forma automatizada en un sistema Cobas c (Roche, Mannheim, Alemania), mediante el método de Jaffé con el kit comercial CREJ2 (Roche).

#### 4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se consideraron las siguientes variables: edad, sexo, tipo de mutación, ocurrencia de crisis (PAI manifiesta), genotipo en cada uno de los genes *CYP* estudiados (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*) y alelos presentes (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2C19\*2*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3*), ratio PBG/creatinina en orina (U-PBG/Cr) y ratio ALA/creatinina en orina (U-ALA/Cr).

Se realizó un análisis descriptivo básico de las variables analizadas. Para las variables cualitativas, se obtuvieron las frecuencias absoluta y relativa; y para las variables cuantitativas, los valores mínimo, máximo, media y error estandar.

La comprobación del equilibrio de Hardy-Weinberg para la distribución genotípica de cada gen *CYP* está integrada en el programa Taqman Genotyper Software, empleado para el análisis de los ensayos de genotipado. Éste aplica el test de la Chi cuadrado para comparar las frecuencias genotípicas observadas y esperadas en base a las frecuencias alélicas, en la población analizada.

Se analizó el efecto del genotipo de los distintos genes *CYP* en las variables a explicar: ocurrencia de crisis (variable dicotómica que toma los valores: 1=PAI manifiesta y 0=PAI latente) y las variables continuas U-PBG/Cr y U-ALA/Cr. La variable explicativa principal era el genotipo (toma valor 0= dos alelos normales, 1= un alelo no funcional y 2= dos alelos no funcionales). Se controló por sexo y edad para estimar el efecto del genotipo descartando efectos de confusión.

Para la variable a explicar dicotómica (ocurrencia de crisis) se usó un modelo de regresión logística:

$$\text{Logit}(Y_i) = B_0 + B_1X + B_2S + B_3E$$

Donde  $Y_i$  = valor de la variable a explicar en el individuo "i",  $X$ = Genotipo,  $S$ = Sexo (0= Masculino, 1= Femenino),  $E$ = edad del paciente,  $eB_0$  = Odds de la variable a explicar si el paciente no tiene dos alelos normales,  $eB_1$  = Odds Ratio

(OR) del genotipo, eB2 = OR del sexo del paciente, eB3 = OR de la edad del paciente.

El OR representa el cociente de la Odds de la variable a explicar en dos grupos. Por ejemplo, Odds de tener ocurrencia de crisis en un grupo = N<sup>o</sup> de pacientes con PAI manifiesta / N<sup>o</sup> de pacientes con PAI latente (es decir, n<sup>o</sup> de pacientes con PAI manifiesta por cada uno con PAI latente) en el grupo.

Para las variables a explicar continuas se usó un modelo de regresión lineal:

$$Y_i = B_0 + B_1X + B_2S + B_3E + e_i$$

Donde  $Y_i$  = valor de la variable a explicar en el individuo "i",  $X$  = Genotipo,  $S$  = Sexo (0 = Masculino, 1 = Femenino),  $E$  = edad del paciente,  $B_0$  = Media de  $Y_i$  (media basal de la variable a estudiar),  $B_1$  = incremento medio en la variable a explicar por cada alelo no funcional más que tienen el paciente,  $B_2$  = incremento medio en la variable a explicar por ser mujer,  $B_3$  = incremento medio en la variable por cada año más que tiene el paciente,  $e_i$  = error aleatorio con distribución normal  $e_i \sim N(0, \sigma_e)$ .

El tratamiento de datos se hizo con el programa estadístico R (versión 3.4.1).



## **V - RESULTADOS**



## V – RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

En el estudio participaron 50 individuos con diagnóstico de PAI, confirmado molecularmente. Los individuos pertenecían a 21 familias distintas. Las características demográficas y clínicas se describen en la Tabla 5.1.

El 52% presentó PAI manifiesta, con un número medio de crisis de  $2.5 \pm 2$  (rango: 1-10 crisis). La proporción de PAI manifiesta en el grupo de portadores de la mutación prevalente en la región c.669\_698del (n=39) fue del 48.7% (19/39 individuos), siendo el porcentaje de PAI manifiesta del 62.5% en mujeres (15/24) y del 26.6% en hombres (4/15). La proporción de PAI manifiesta en el grupo de menor tamaño portador de la mutación c.76C>T fue del 50%.

**Tabla 5.1.** Características demográficas y clínicas de la población.

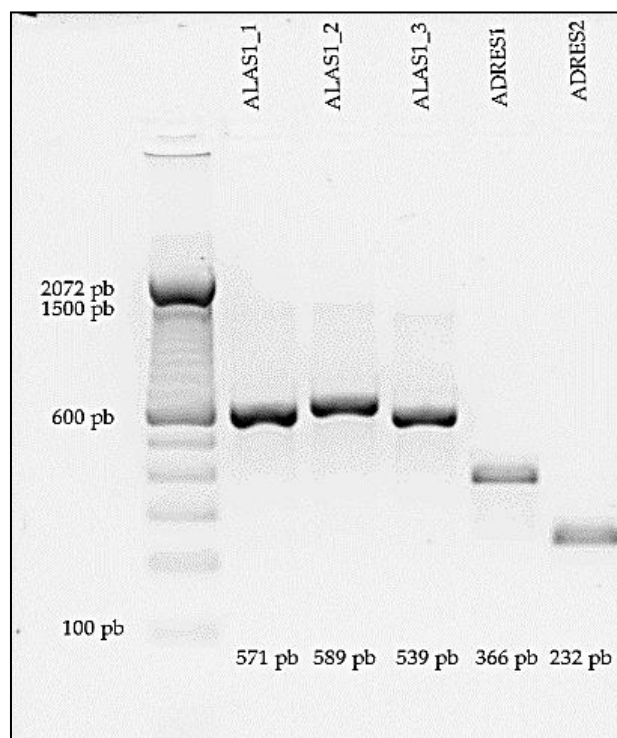
	Total de individuos (n=50)	PAI latente (n=24)	PAI manifiesta (n=26)
<b>Edad (años)</b>			
Media y DS	44.4 ± 15.6	41.7 ± 15.9	46.9 ± 14.9
Rango	16-77	16-75	22-77
<b>Sexo, n (%)</b>			
Mujer	28 (56)	10 (42)	18 (69)
Hombre	22 (44)	14 (58)	8 (31)
<b>Mutación en el gen <i>HMBS</i>, n (%)</b>			
c.669_698del, p.(Glu223_Leu232)	39 (78)	20 (83)	19 (73)
c.76C>T, p.Arg26Cys	8 (16)	4 (17)	4 (15)
c.275T>C, p.(Leu92Pro)	1 (2)	-	1 (4)
c.750delA, p.(Glu250Glu>Ter4)	2 (4)	-	2 (8)

n: número de individuos; DS: desviación estándar. Mutaciones en el gen *HMBS* expresadas tomando como referencia la secuencia NM\_000190.3 (NC\_000011.9).

## 5.2 ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN REGULADORA 5' DEL GEN *ALAS1* Y REGIONES ADRES DISTALES

### 5.2.1 Amplificación por PCR

La amplificación de las regiones de interés generó cinco amplicones distintos, tres amplicones solapantes de tamaños 571, 589 y 539 pb correspondientes a la región que se extiende 1200 pb en dirección 5' desde el inicio de la transcripción y dos amplicones de 366 y 232 pb correspondientes a las regiones ADRES1 y ADRES2, respectivamente (Figura 5.1). No se observaron bandas de amplificación inespecíficas, ni amplificación en la muestra de control negativo. En la Figura 5.2 se muestra la localización de los amplicones en el contexto genómico visualizado con el navegador *UCSC Genome Browser*.



**Figura 5.1.** Amplicones del promotor de *ALAS1* y las dos regiones ADRES visualizadas en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ SAFE y comparados con un marcador de 100 pb.

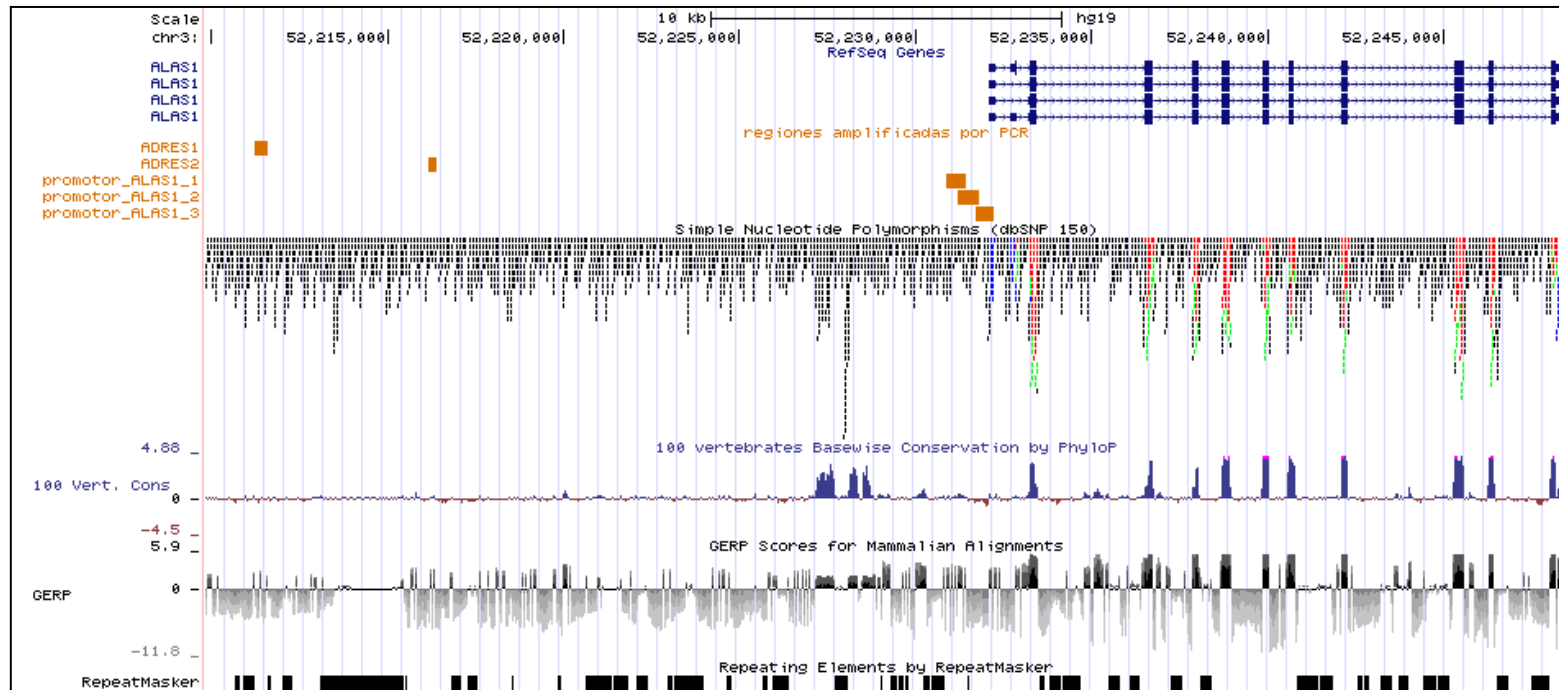
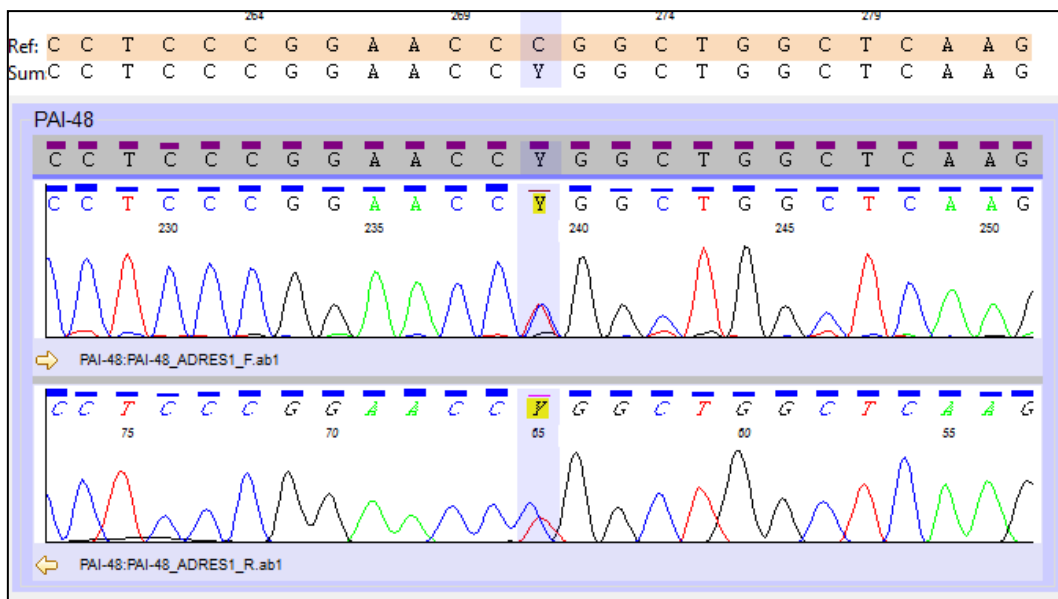


Figura 5.2. Contexto genómico de las regiones amplificadas (en naranja) en *UCSC Genome Browser* (GRCh37/hg19).

### 5.2.2 Secuenciación y descripción de variantes genéticas

Todos los amplicones se sometieron a secuenciación Sanger siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.6.3. Los electroferogramas resultantes se analizaron visualmente y con la ayuda del software *Variant Reporter*. El alineamiento con la secuencia de referencia correspondiente a las regiones de interés confirmó la correcta amplificación de las regiones diana.

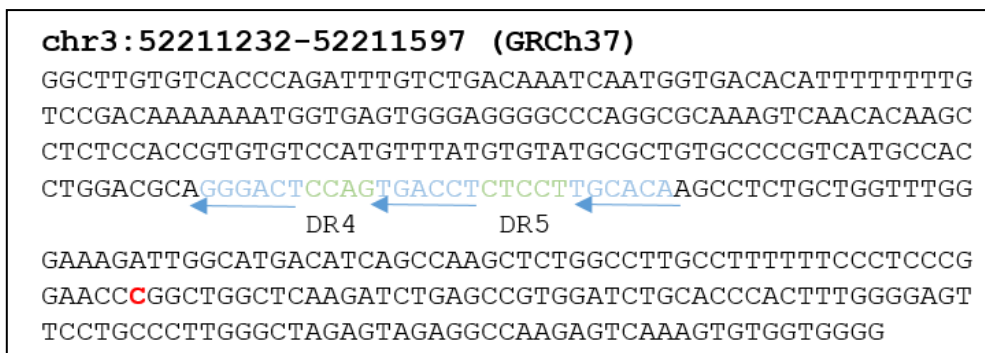
La comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia reveló la presencia de una única variante, NC\_000003.11:g.52211502C>T, localizada en el amplicón correspondiente a la región ADRES1. Esta variante sólo se halló en un paciente (PAI-48). En la Figura 5.3 se muestran los electroferogramas resultantes de la secuenciación de las cadenas directa y reversa, correspondientes al paciente portador.



**Figura 5.3.** Detalle del electroferograma correspondiente a la variante identificada en el paciente PAI-48. Arriba se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia directa y abajo a la secuencia reversa. Y: indica lectura simultánea de C y T; Ref: secuencia de referencia; Sum: secuencia consenso (cadena directa y reversa) en el paciente.

Sin embargo, la variante consiste en una sustitución de citosina por timina en una posición que no altera los sitios consenso de unión a receptores nucleares (*halfsites* con repeticiones de tipo DR4 y DR5) que caracterizan la región ADRES1 (Figura 5.4). Se trata de un polimorfismo que se encuentra en la base de datos *dbSNP* (rs115287049), que ha sido previamente descrito con una frecuencia del alelo T en población europea de 0.0119 (1000 Genomas).

A excepción de este polimorfismo detectado en un solo individuo, el resto de pacientes mostraron una secuencia idéntica a la de referencia en todos los amplicones analizados. Por lo tanto, nuestra población de estudio no presentaba variantes genéticas en las regiones diana de interés y no se pudo llevar a cabo análisis de asociación con la aparición de crisis agudas (PAI manifiesta).



**Figura 5.4.** Secuencia correspondiente al amplicón de la región ADRES1. En azul aparecen los hexámeros que constituyen cada secuencia consenso para el reconocimiento por factores nucleares, del tipo DR4 y DR5, la flecha indica la dirección de la secuencia. En verde se indica los nucleótidos espaciadores. En rojo se indica la posición de citosina sustituida en el paciente PAI-48 por timina.

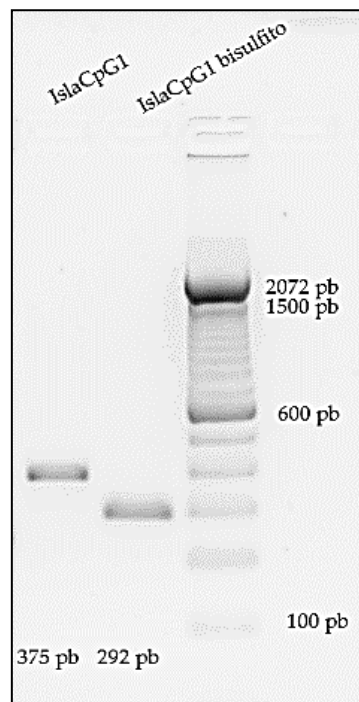
### 5.3 ANÁLISIS DE VARIANTES DE METILACIÓN EN LA ISLA CpG

#### 5.3.1 Análisis del estado de metilación

La amplificación por PCR tanto del ADN tratado con bisulfito como no tratado, generó amplicones del tamaño esperado (Figura 5.5) en todos los pacientes.

El análisis de los electroferogramas resultantes de la secuenciación del ADN no tratado con bisulfito no mostró variantes genéticas; todos los pacientes presentaron la secuencia de referencia. La secuenciación del ADN tratado con bisulfito mostró la presencia de 12 posiciones CG donde la citosina no había sido transformada a timina tras la PCR de bisulfito (Figura 5.6), por lo que se encuentran metiladas en todos los pacientes estudiados. Estas 12 posiciones coinciden con la predicción *in silico* realizada en la fase preanalítica de este estudio, sin embargo, el hecho de que se encuentren metiladas indica que esta región no se comporta como una isla CpG en el tejido estudiado (linfocitos de sangre periférica).

Así mismo, la ausencia de metilación diferencial entre los individuos estudiados indica que la región estudiada no interviene en el grado de expresión de la enzima ALAS1.



**Figura 5.5.** Amplicones de la isla CpG estudiada en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ SAFE comparados con un marcador de 100 pb.



```

SB                                     CACCCCTCTCCTGT
TB                                     -----

SB  GCTAGAACTTGCTAACACCAGTACCATGCCCTACCAATATCCATTGCTGACCCCGGAGCA
TB  -----

SB  GAAGGAGCTGTCTGACATGACTCATCGCATCGTAGCTCTGGGCAAGGGCATCCCGGCTGC
TB  GAAGGAGTTGTTTGATATGATTTATCGTATCGTAGTTTTGGGTAAGGGTATTTCGGTTGT

SB  AGATGAGTCCACTGGGAGCACTGCCAAGTGGCTGCAGTCCATTGGCACCAGAGAATACCGA
TB  AGATGAGTTTATTGGGAGTATTGTTAAGTGGTTGTAGTTTATTGGTATCGAGAATATCGA

SB  GGAGAACCGGTGCTTCTACCGCCAGCTGTGGCTGACAGCTGACAACCGCGTGAACCCCTG
TB  GGAGAATCGGTGTTTTTATCGTTAGTTGTGGTTGATAGTTGATAATCGCGTGAATTTTTG

SB  CATCAAGGGTGTCTCCTCTTCCATGAGACGCTGTACCAAAAGGCGGATGATGGGCGTCC
TB  TATTAAGGGTGTATTTTTTTTTTATGAGACGTTGTATTAAAAGGCGGATGATGGGCGTTT

SB  CTTCCCCCAAGTTATCAAATCCAAGGGCAATGTTGTGAGCATCAAGGTAGACAAGGGGGT
TB  TTTTTTTTAAGTTATTAATTTAAGGGTAATGTTGTGAGTATTAAGGTAGAT-----

SB  G
TB  -

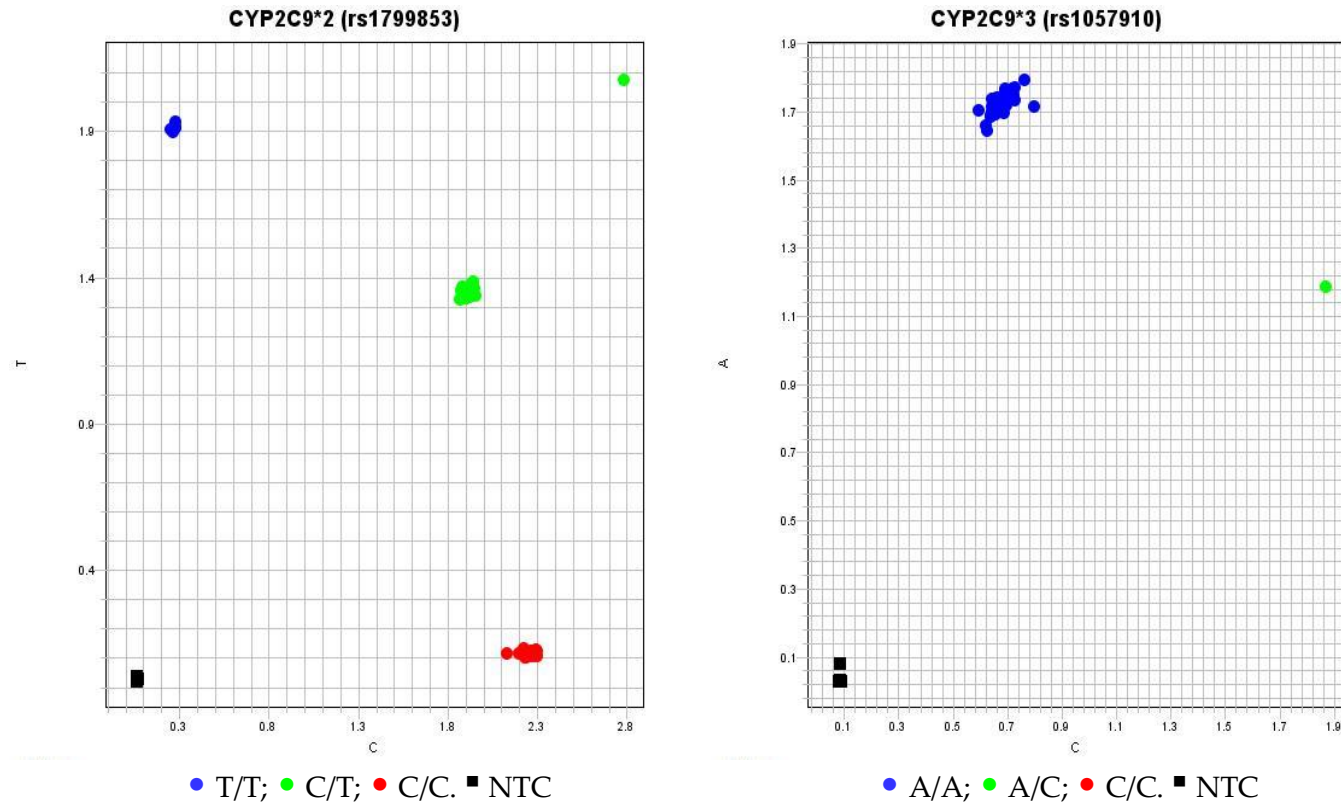
```

**Figura 5.6.** Secuencia de la isla CpG estudiada, hallada en todos los pacientes. SB: secuencia del ADN sin tratamiento con bisulfito; TB: secuencia del ADN tras tratamiento con bisulfito. Las posiciones CG donde la citosina no se ha transformado en timina tras el tratamiento con bisulfito y posterior PCR se muestran resaltadas en amarillo.

#### 5.4 ANÁLISIS DE LOS GENES *CYP*

##### 5.4.1 Genotipado de polimorfismos en los genes *CYP*

El análisis visual de las curvas de fluorescencia obtenido en cada muestra para cada ensayo de genotipado, mostró una correcta amplificación en todos los casos. En la Figura 5.7 se muestran los gráficos de discriminación alélica con la representación de los niveles de fluorescencia normalizados de FAM y VIC detectados en cada ensayo.



**Figura 5.7.** Gráficos de discriminación alélica para los distintos polimorfismos estudiados (continúa en páginas siguientes). En el eje horizontal se representa la fluorescencia (Rn) de la sonda marcada con VIC y en el eje vertical la fluorescencia (Rn) de la sonda marcada con FAM.

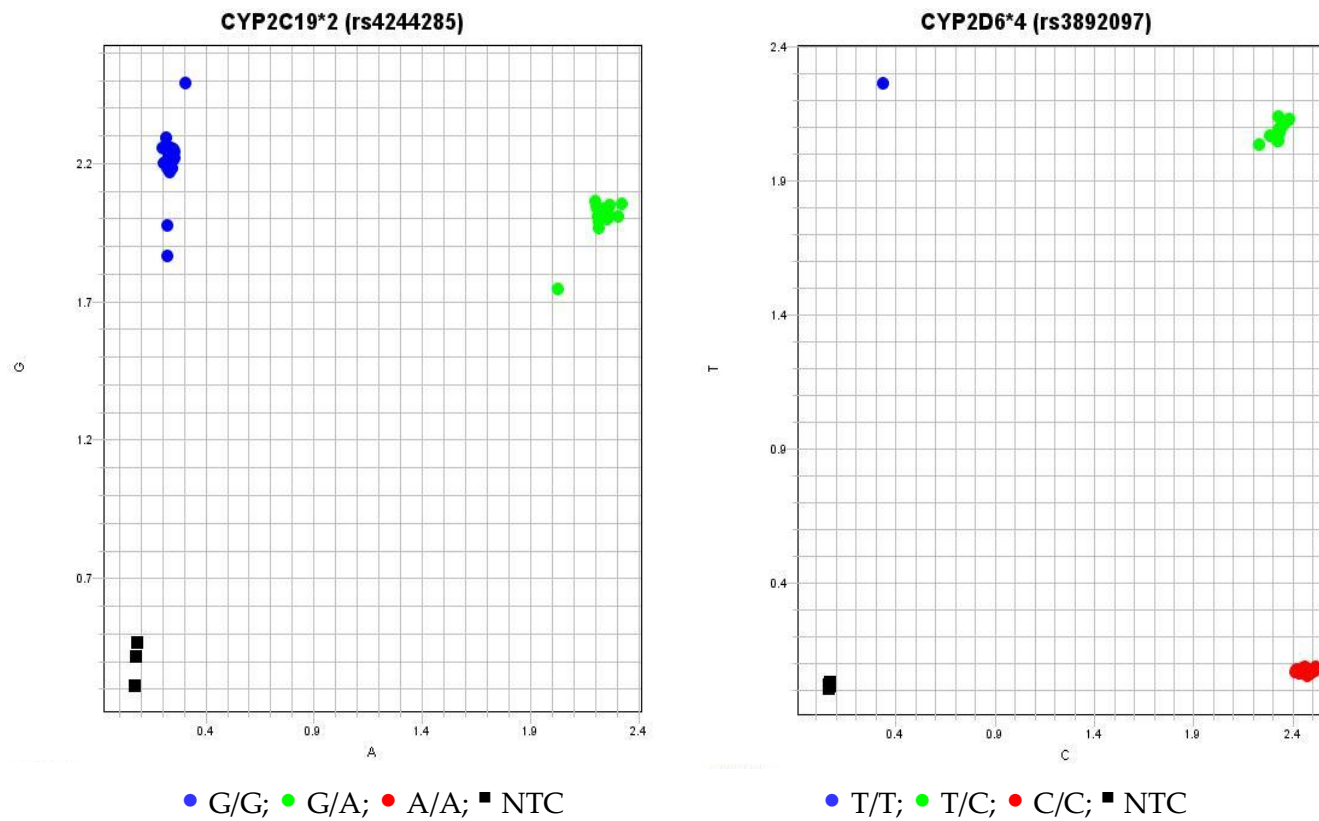


Figura 5.7 (continuación). Gráficos de discriminación alélica para los distintos polimorfismos estudiados.

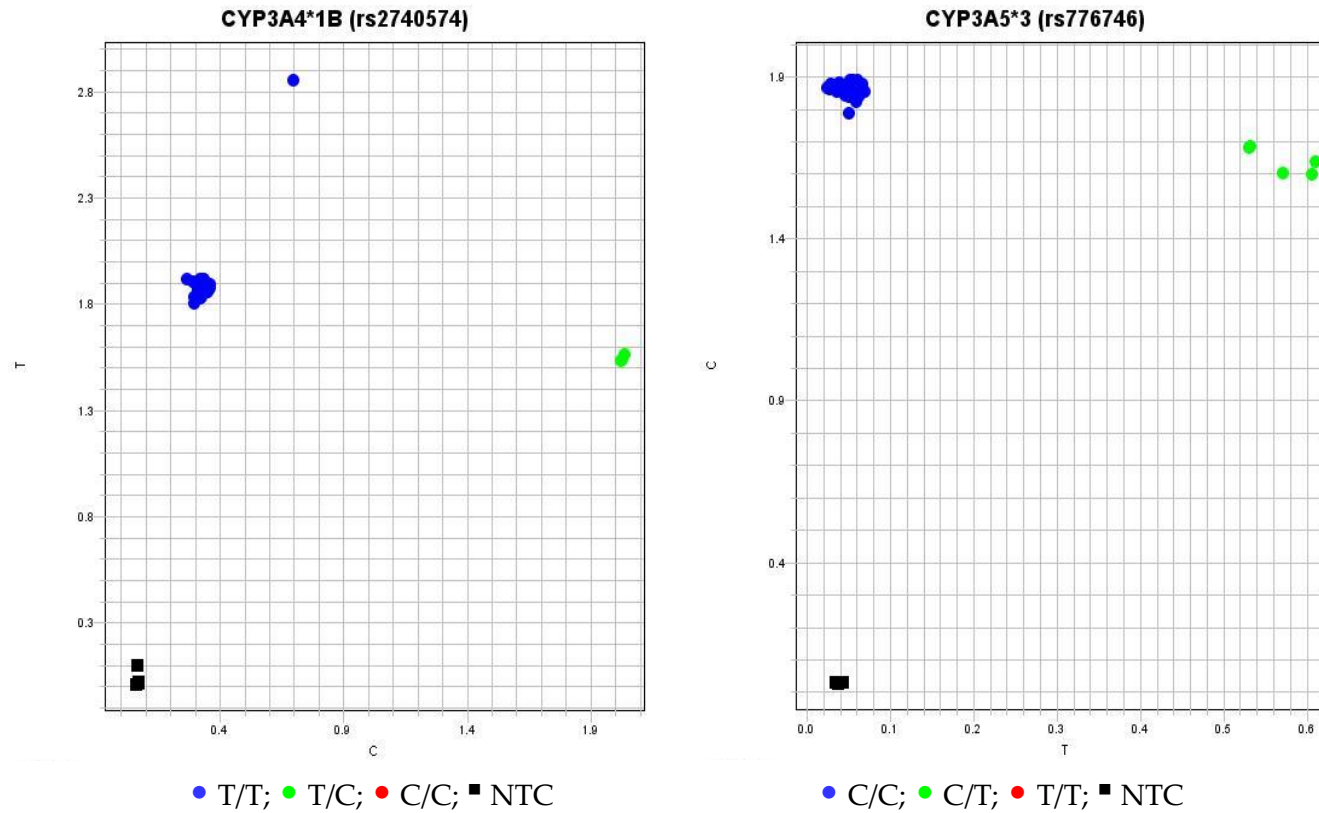


Figura 5.7 (continuación). Gráficos de discriminación alélica para los distintos polimorfismos estudiados.

#### 5.4.2 Análisis de delección del gen *CYP2D6* (*CYP2D6\*5*)

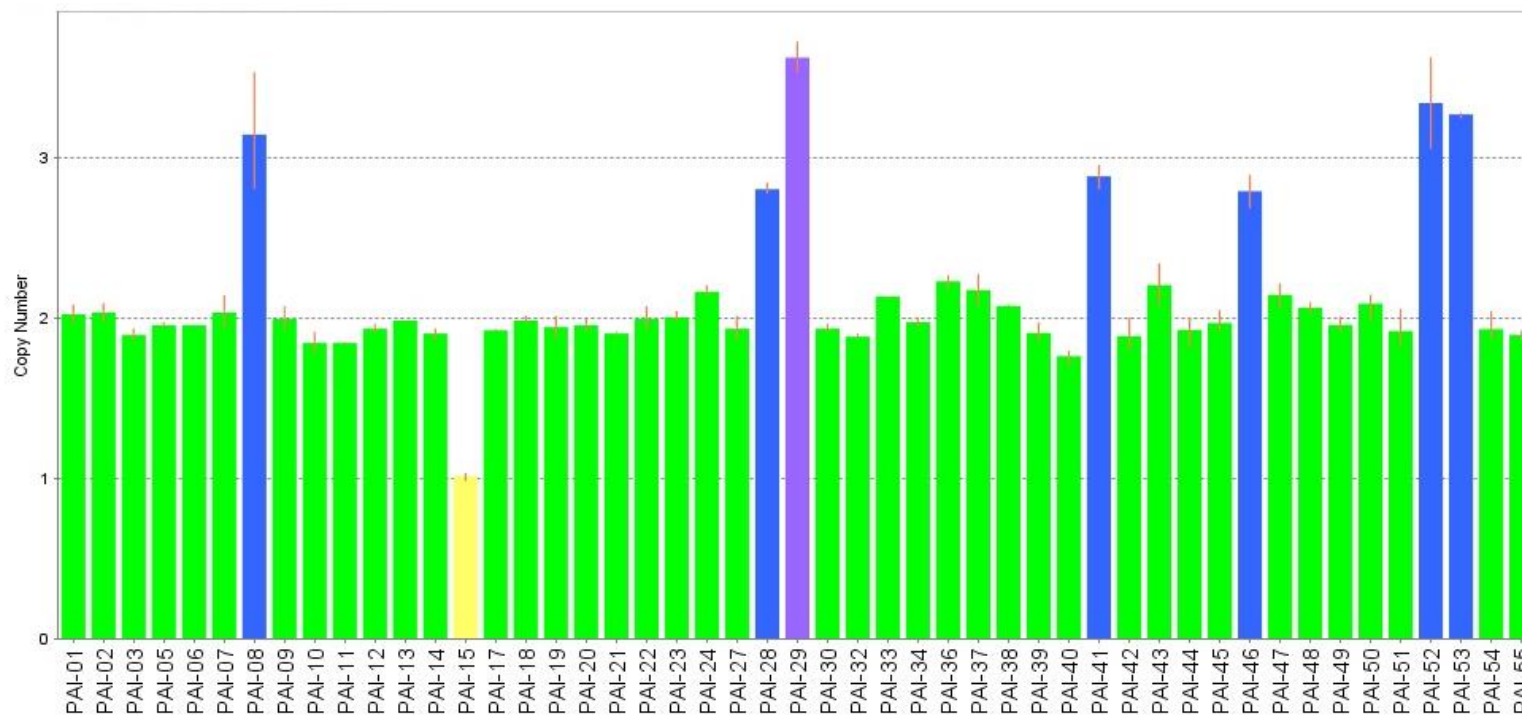
Tras realizar el ensayo Taqman de número de copias del gen *CYP2D6*, en paralelo al del gen de referencia de la RNasa P, se visualizaron las curvas de fluorescencia en cada muestra. Todas las amplificaciones fueron correctas a excepción de la muestra PAI-4 que falló en la amplificación de ambos genes (*CYP2D6* y gen de referencia) en seis replicados realizados y tras la repetición del ensayo. Los resultados de las lecturas de fluorescencia fueron analizados con el software *Copy Caller* v2.0 que calculó el número de copias del gen y realizó una predicción del número de copias en base a dicho cálculo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.8. Sólo un paciente era portador de la delección del gen (*CYP2D6\*5*).

#### 5.4.3 Distribución genotípica y frecuencias alélicas en los genes *CYP*

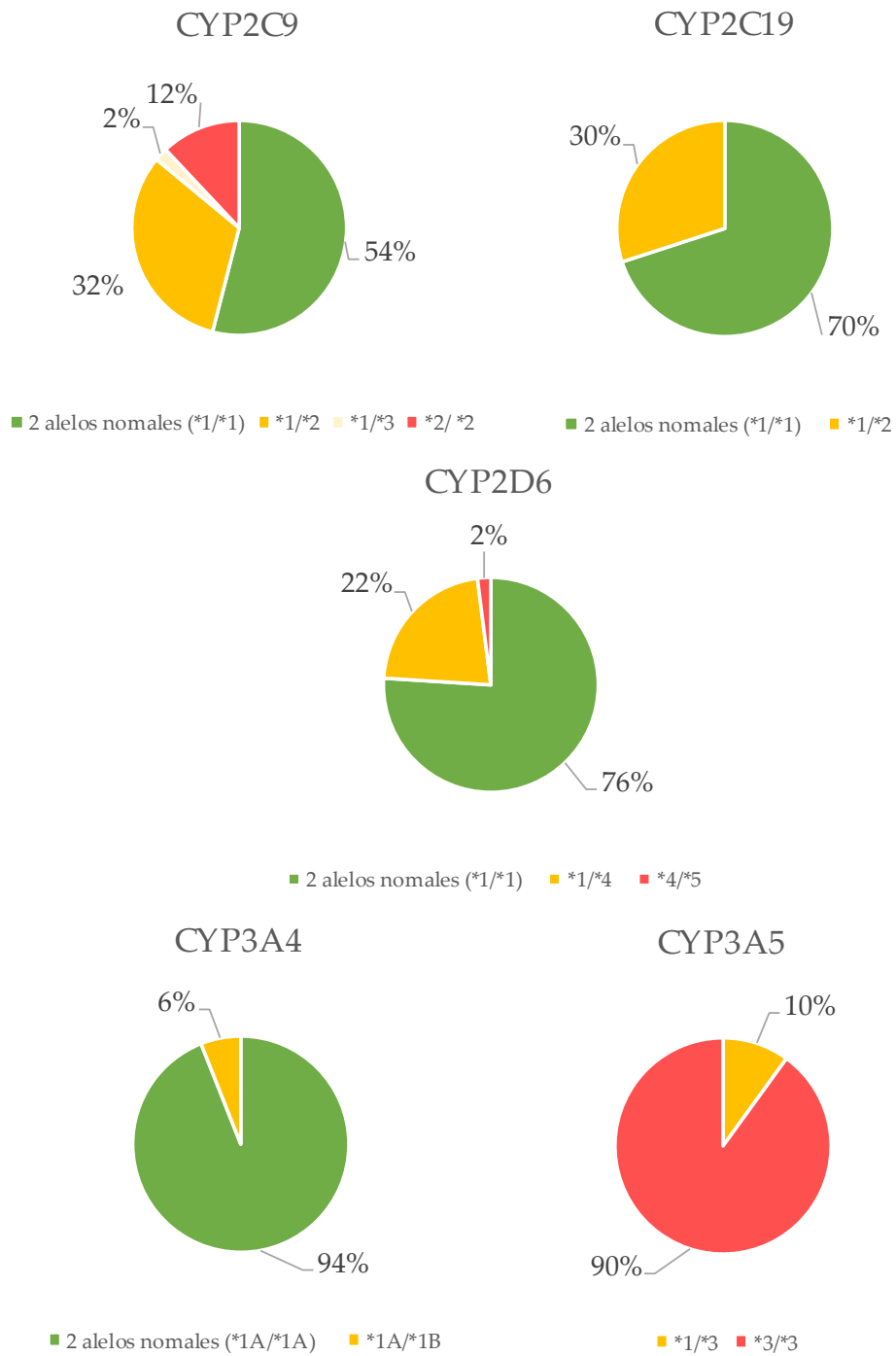
Una vez determinado el genotipo en los distintos polimorfismos de los genes *CYP* estudiados y la delección de *CYP2D6*, se designaron los alelos presentes en cada individuo. Se asumió la presencia de un alelo con actividad normal (\*1) en ausencia de los polimorfismos estudiados, puesto que la frecuencia de otros alelos nulos o con actividad reducida es baja en nuestra población. La distribución genotípica en la población estudiada se muestra en la Figura 5.9. Se calcularon las frecuencias alélicas para cada gen (Tabla 5.2), que cumplieron con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabla 5.2.** Frecuencias alélicas en los genes *CYP*.

Gen	Alelo	Frecuencia alélica
<i>CYP2C9</i>	*2	0.28
	*3	0.01
<i>CYP2C19</i>	*2	0.15
<i>CYP2D6</i>	*4	0.12
	*5	0.01
<i>CYP3A4</i>	*1B	0.03
<i>CYP3A5</i>	*3	0.95



**Figura 5.8.** Representación gráfica del número de copias calculado del gen *CYP2D6*. En el eje vertical se indica el número de copias calculado y en el eje horizontal la identificación de la muestra analizada. Las barras naranjas indican el mínimo y el máximo del número de copias entre los replicados de cada muestra. La predicción del número de copias se muestra con color en cada barra: ■ 1 copia ■ 2 copias ■ 3 copias ■ 4 copias.



**Figura 5.9.** Distribución genotípica de los genes CYP.

#### 5.4.4 Comparativa de las frecuencias alélicas de los genes *CYP* entre PAI manifiesta y PAI latente

Se comparó la distribución alélica de los genes *CYP* analizados entre el grupo de PAI manifiesta y PAI latente (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3.** Comparación de las frecuencias alélicas en los genes *CYP* entre PAI latente y PAI manifiesta.

Gen	Alelo	PAI latente	PAI manifiesta	Valor P
<i>CYP2C9</i>	*2	0.33	0.23	0.26
	*3	0.02	0	
<i>CYP2C19</i>	*2	0.13	0.17	0.70
<i>CYP2D6</i>	*4	0.19	0.06	0.05
	*5	0.02	0	
<i>CYP3A4</i>	*1B	0.02	0.04	1.00
<i>CYP3A5</i>	*3	0.96	0.94	0.91

Se observó diferencia en las distribuciones alélicas del gen *CYP2D6*, de manera que la frecuencia conjunta de los alelos defectuosos (*CYP2D6*\*4 y *CYP2D6*\*5) fue 3.5 veces superior en el grupo de PAI latente ( $P=0.05$ ). También se apreció una frecuencia de los alelos defectuosos en el gen *CYP2C9* (*CYP2C9*\*2 y *CYP2C9*\*3) ligeramente superior (1.5 veces) en PAI latente, aunque sin evidencia estadística. La distribución alélica en el resto de genes fue comparable en ambos grupos.

#### 5.4.5 Análisis del efecto de los genotipos *CYP* en la aparición de PAI manifiesta

Se analizó el efecto del genotipo en la ocurrencia de crisis (PAI manifiesta) mediante regresión logística controlando por sexo y edad, para evitar el efecto confusor de estas dos variables. Los genotipos se clasificaron en tres categorías en función de la presencia de dos alelos normales (ausencia de alelo defectuoso), la

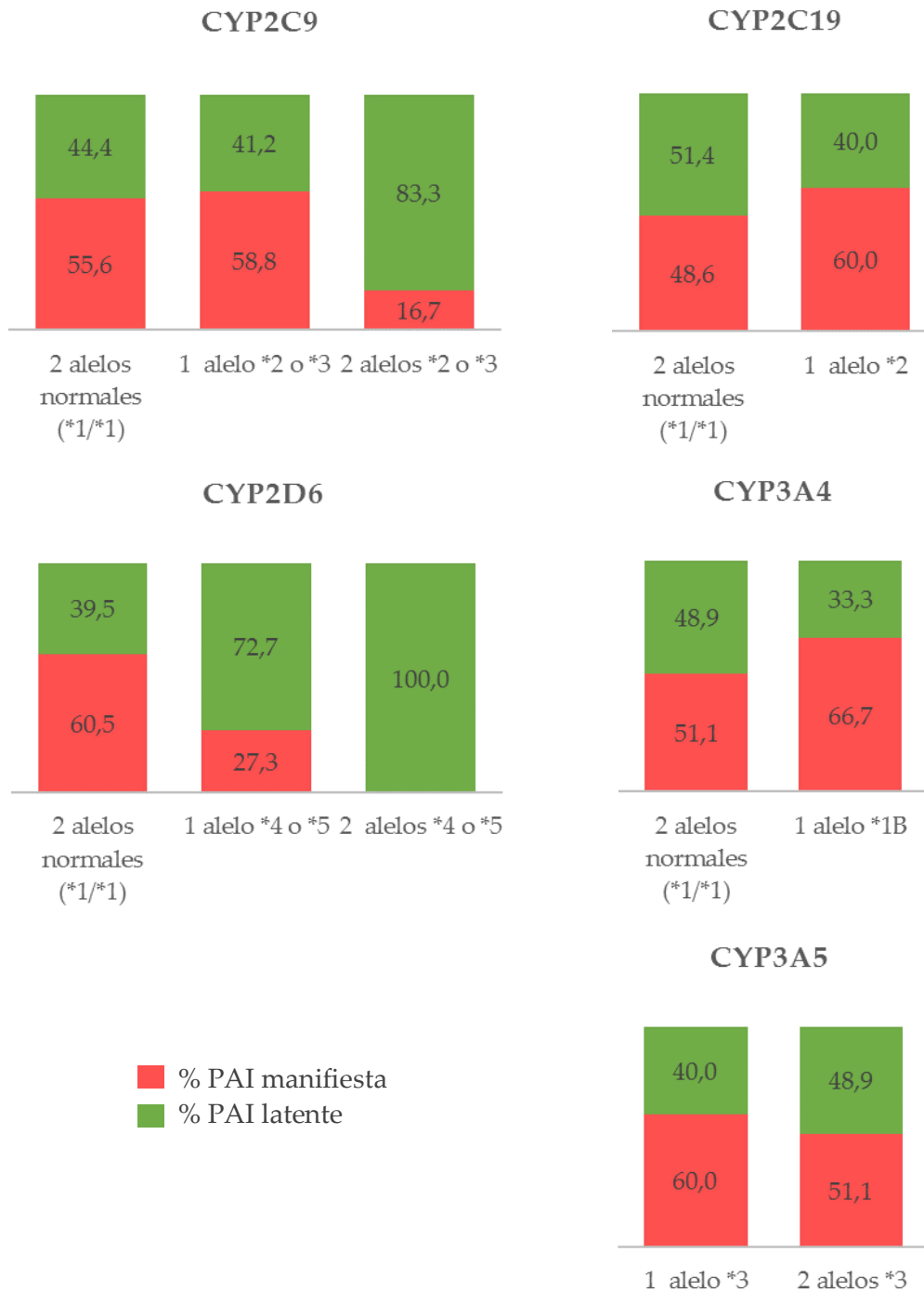


presencia de un alelo normal y uno defectuoso, y la presencia de dos alelos defectuosos.

En la Figura 5.10 se muestra la proporción de individuos con PAI manifiesta y con PAI latente por genotipo en los distintos genes *CYP*. Los valores odds ratio (OR) obtenidos tras el análisis estadístico, el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) y el nivel de significación estadística (valor P) se muestran en la Tabla 5.4.

El porcentaje de individuos con PAI manifiesta fue menor de forma estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) en los grupos de pacientes portadores de uno y dos alelos defectuosos en el gen *CYP2D6*, en comparación con los portadores de dos alelos normales. La posibilidad de encontrar individuos con PAI manifiesta se redujo por término medio en un 80% (OR 0.2; IC 95% 0.04-0.81) por cada alelo defectuoso adicional en dicho gen. También se observó, con ligera evidencia estadística (valor  $P=0.09$ ), una disminución en el porcentaje de individuos con PAI manifiesta en los grupos de portadores de uno y dos alelos defectuosos en el gen *CYP2C9* con respecto a los portadores de alelos normales. Por término medio la posibilidad de encontrar individuos con PAI manifiesta se redujo en un 55% (OR 0.45; IC 95% 0.17-1.09) por cada alelo defectuoso adicional en el gen *CYP2C9*. No se observó evidencia de que el genotipo de los genes *CYP2C19*, *CYP3A4* y *CYP3A5* tuviese efecto en la ocurrencia de crisis en la población estudiada.

Además, se analizó si existía efecto aditivo de los genotipos de los genes *CYP2C9* y *CYP2D6* en la ocurrencia de crisis. Para ello se agruparon las distintas combinaciones de genotipos en ambos genes en tres categorías: 0 (aquellos que presentaban dos alelos normales en ambos genes), 1 (aquellos que presentaban al menos un alelo defectuoso en sólo uno de los dos genes) y 2 (aquellos que presentaban al menos un alelo defectuoso en ambos genes) (Tabla 5.5). Se observó una reducción en la posibilidad de encontrar individuos con PAI manifiesta del 65% por término medio (OR 0.35; IC95% 0.12-0.89), por cada gen adicional con al menos un alelo defectuoso.



**Figura 5.10.** Ocurrencia de crisis por genotipo CYP.

**Tabla 5.4.** Análisis de ocurrencia de crisis de PAI por genotipos *CYP*.

Gen	Genotipo	PAI manifiesta			
		%	OR	IC 95%	valor P
<i>CYP2C9</i>	2 alelos normales (*1/*1)	55.6			
	1 alelo defectuoso (*2 o *3)	58.8	0.45	0.17-1.09	0.09
	2 alelos defectuosos (*2 o *3)	16.7			
<i>CYP2C19</i>	2 alelos normales (*1/*1)	48.6			
	1 alelo defectuoso *2	60.0	1.75	0.49-6.81	0.40
	2 alelos defectuosos *2	-			
<i>CYP2D6</i>	2 alelos normales (*1/*1)	60.5			
	1 alelo defectuoso (*4 o *5)	27.3	0.2	0.04-0.81	0.04*
	2 alelos defectuosos (*4 o *5)	0			
<i>CYP3A4</i>	2 alelos normales (*1/*1)	51.1			
	1 alelo defectuoso *1B	66.7	1.94	0.14-49.63	0.63
	2 alelos defectuosos *1B	-			
<i>CYP3A5</i>	2 alelos normales (*1/*1)	-			
	1 alelo defectuoso *3	60.0	0.67	0.07-5.02	0.70
	2 alelos defectuosos *3	51.1			

**Tabla 5.5.** Ocurrencia de crisis por combinación de genotipos *CYP2C9* y *CYP2D6*.

Combinación de genotipos	Categorías genotipos	n° alelos defectuosos en <i>CYP2C9</i>	n° alelos defectuosos en <i>CYP2D6</i>	Individuos con el genotipo		PAI manifiesta			
				N	%	%	OR (IC 95%)	P	
	0	0	0	21	42	61.9	61.9	0.35 (0.12-0.89)	0.04
	1	1	0	15	30	60	52.2		
		2	0	2	4	50			
		0	1	5	10	40			
		0	2	1	2	0			
	2	1	1	2	4	50	16.7		
		2	1	4	8	0			
		1	2	0	-	-			
		2	2	0	-	-			

#### 5.4.6 Análisis del efecto de los genotipos CYP en los niveles de excreción en orina de ALA y PBG

Se pudo analizar los niveles de ALA y PBG en orina en 45 de los 50 pacientes incluidos en el estudio. Se realizó un análisis de regresión lineal controlada por sexo y edad para determinar el efecto del genotipo de los distintos genes CYP en la excreción urinaria de ALA y PBG, en periodo asintomático. Los resultados del análisis se muestran en las Tablas 5.6. y 5.7. La distribución de la excreción urinaria de PBG por genotipos CYP se muestra con más detalle en la Figura 5.11.

**Tabla 5.6.** Análisis de PBG en orina por genotipos CYP.

Gen	Genotipo	U-PBG/Cr		
		media (EE)	Beta (IC 95%)	P
CYP2C9	2 alelos normales (*1/*1)	12.93 (3.36)		
	1 alelo defectuoso (*2 o *3)	5.62 (1.88)	-6.50 (-12.09;-0.91)	0.02*
	2 alelos defectuosos (*2 o *3)	1.87 (0.80)		
CYP2C19	2 alelos normales (*1/*1)	9.12 (2.34)		
	1 alelo defectuoso *2	9.32 (4.27)	0.20 (-9.11;9.50)	0.96
	2 alelos defectuosos *2	NA		
CYP2D6	2 alelos normales (*1/*1)	10.71 (2.63)		
	1 alelo defectuoso (*4 o *5)	5.34 (2.38)	-4.89 (-13.27;3.49)	0.24
	2 alelos defectuosos (*4 o *5)	0.76 (NA)		
CYP3A4	2 alelos normales (*1/*1)	9.52 (2.12)		
	1 alelo defectuoso *1B	1.88 (1.07)	-7.34 (-28.0;13.33)	0.47
	2 alelos defectuosos *1B	NA		
CYP3A5	2 alelos normales (*1/*1)	NA		
	1 alelo defectuoso *3	6.45 (5.00)	2.67 (-12.28;17.62)	0.72
	2 alelos defectuosos *3	9.45 (2.2)		

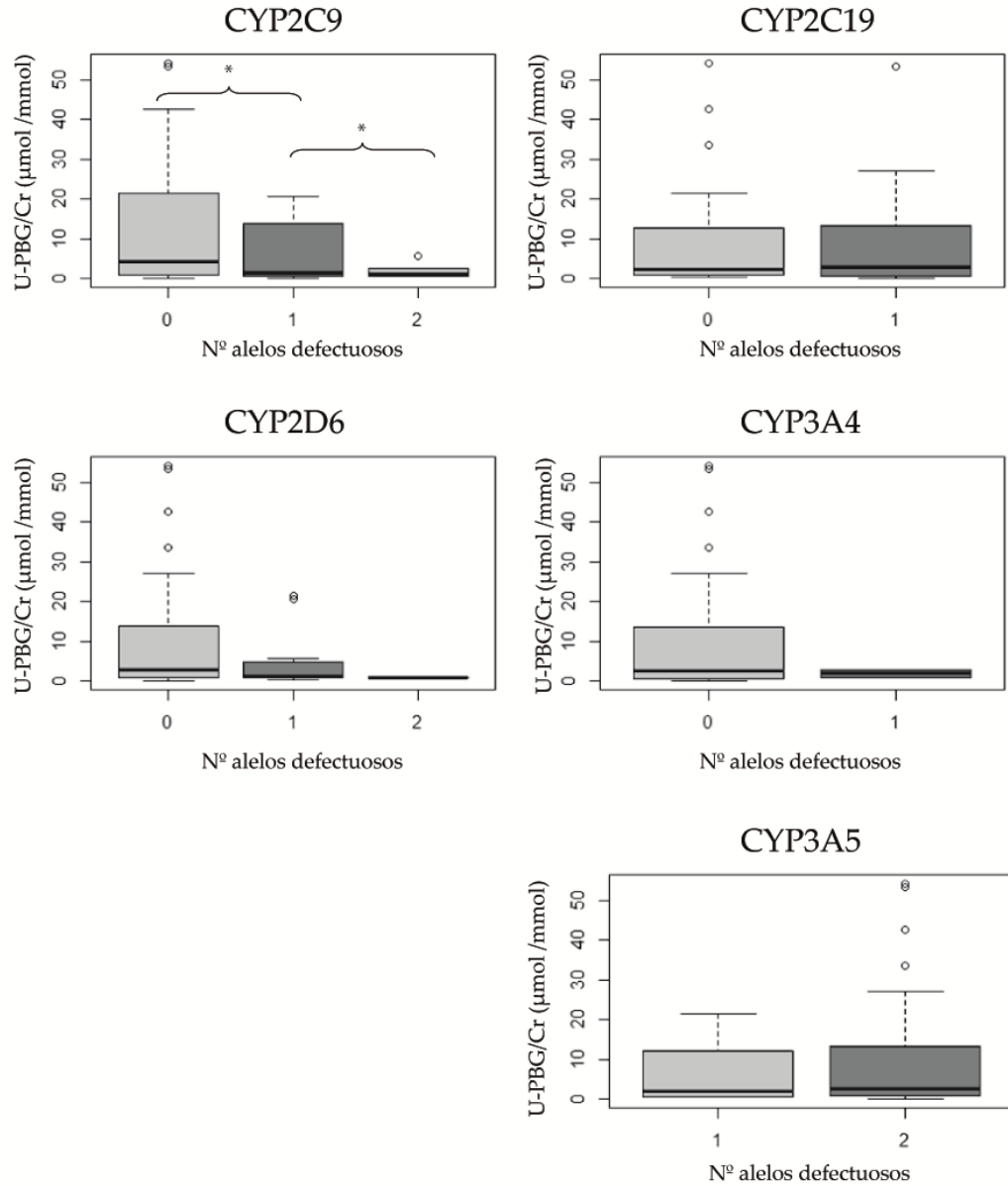
U-PBG/Cr: ratio PBG/creatinina ( $\mu\text{mol} / \text{mmol}$ ), rango de referencia  $<1.5 \mu\text{mol} / \text{mmol}$  ; EE: error estándar; Beta: coeficiente del análisis de regresión; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; NA: no aplicable; \* P  $\leq 0.05$

**Tabla 5.7.** Análisis de ALA en orina por genotipos *CYP*.

Gen	Genotipo	U-ALA/Cr		
		media (EE)	Beta (IC 95%)	P
<i>CYP2C9</i>	2 alelos normales (*1/*1)	8.48 (1.30)		
	1 alelo defectuoso (*2 o *3)	12.85 (6.67)	-0.60 (-6.97;5.77)	0.85
	2 alelos defectuosos (*2 o *3)	4.98 (0.71)		
<i>CYP2C19</i>	2 alelos normales (*1/*1)	10.58 (3.01)		
	1 alelo defectuoso *2	6.39 (1.30)	-4.22 (-15.09;5.64)	0.39
	2 alelos defectuosos *2	NA		
<i>CYP2D6</i>	2 alelos normales (*1/*1)	10.45 (2.94)		
	1 alelo defectuoso (*4 o *5)	5.93 (1.05)	-2.59 (-11.67;6.49)	0.57
	2 alelos defectuosos (*4 o *5)	11.82 (NA)		
<i>CYP3A4</i>	2 alelos normales (*1/*1)	9.67 (2.27)		
	1 alelo defectuoso *1B	2.96 (1.56)	-6.68 (-28.82;15.47)	0.55
	2 alelos defectuosos *1B	NA		
<i>CYP3A5</i>	2 alelos normales (*1/*1)	NA		
	1 alelo defectuoso *3	4.33 (1.02)	5.43 (-10.49;21.36)	0.50
	2 alelos defectuosos *3	9.86 (2.38)		

U-ALA/Cr: ratio ALA/creatinina( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ), rango de referencia  $<3.8 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ; EE: error estándar; Beta: coeficiente del análisis de regresión; IC 95%: intervalo de confianza al 95%; NA: no aplicable.

Se observó una reducción significativa de la excreción de PBG en función del genotipo *CYP2C9*. Por término medio los valores se redujeron 6.50 unidades por cada alelo defectuoso adicional en el gen, en comparación con los portadores de alelos normales (Beta -6.50; IC 95% -12.09 a -0.91). Este efecto no se observó en la excreción de ALA. Así mismo, se apreció una tendencia a reducir la excreción de PBG en función del genotipo *CYP2D6*, aunque sin evidencia estadística. No se observó efecto del genotipo *CYP* en la excreción de ALA y PBG en el resto de genes en la población analizada.



**Figura 5.11.** Distribución de la excreción de PBG urinaria por genotipo *CYP*: gráficos de cajas. La línea gruesa horizontal en la caja representa la mediana mientras que los bordes inferior y superior de la caja se corresponden con los cuartiles 1 y 3, respectivamente. Los brazos verticales de la caja indican los límites superior e inferior (calculados como rango intercuartílico  $\times 1,5$ ) y aquellos valores atípicos que exceden los límites se representan con un círculo. U-PBG/Cr: ratio PBG/creatinina en orina.

Sin embargo, puesto que los niveles de ALA y PBG pueden mantenerse elevados durante años tras una crisis aguda también se consideró en el análisis de regresión el efecto de la PAI manifiesta en los niveles de ALA y PBG urinarios (Tabla 5.8). Los individuos con PAI manifiesta presentaron valores de U-PBG/Cr superiores a los individuos con PAI latente (13.82 unidades por término medio; IC 95%: 6.65-20.99; P=0.0003). No se observaron diferencias en la excreción de ALA.

**Tabla 5.8.** ALA y PBG urinarios por ocurrencia de crisis

Precusores en orina	PAI manifiesta	PAI latente	Beta (IC 95%)	P-valor
	Media (EE)	Media (EE)		
U-PBG/Cr	15.94 (3.39)	2.12 (0.80)	13.82 (6.65; 20.99)	0.0003
U-ALA/Cr	9.08 (1.39)	9.68 (4.28)	-0.61 (-9.51; 8.29)	0.891

U-PBG/Cr: ratio PBG/creatinina ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ), rango de referencia  $<1.5 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ;  
 U-ALA/Cr: ratio ALA/creatinina( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ), rango de referencia  $<3.8 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ;  
 EE: error estándar; Beta: coeficiente del análisis de regresión; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Como se tenía evidencia de diferencias en la frecuencia de PAI manifiesta en determinados genotipos de *CYP2D6* y *CYP2C9*, se decidió analizar el efecto del genotipo en la excreción de precursores controlando por la ocurrencia de crisis. Este nuevo análisis de regresión lineal, ajustado por sexo, edad y ocurrencia de crisis (PAI manifiesta), mostró que la reducción de PBG atribuible al genotipo *CYP* fue de 3.82 unidades por término medio por cada alelo defectuoso adicional en el gen *CYP2C9* en comparación con los portadores de alelos normales, pero sin suficiente evidencia estadística (Beta -3.82, IC 95% -9.25 a 1.62, valor P= 0.16). En el caso del gen *CYP2D6* se determinó una reducción por término medio de 0.67 unidades (Beta -0.67, IC 95% -8.60 a 7.27, valor P=0.87), sin evidencia estadística. Además, se evidenció que el efecto de disminución de PBG observado en los genotipos *CYP2C9* y *CYP2D6* era atribuible a la ocurrencia de crisis, es decir, a la menor frecuencia de PAI manifiesta en los individuos portadores de alelos defectuosos en dichos *CYP* (P<0.05).





## **VI – DISCUSIÓN**



## VI-DISCUSIÓN

Las porfirias son enfermedades metabólicas raras de origen genético. Entre ellas, la PAI, con herencia AD y baja penetrancia, es la porfiria hepática aguda más común. Es producida por variantes patogénicas en el gen *HMBS* que provoca la deficiencia parcial de la enzima correspondiente en la vía de síntesis del grupo hemo. Los factores que contribuyen a la baja penetrancia de la PAI todavía no han sido caracterizados. Distintas mutaciones o variantes patogénicas en el gen *HMBS* contribuyen a las diferencias observadas en la penetrancia en distintas poblaciones (77, 79). Se conocen multitud de factores precipitantes de la expresión clínica aguda de la enfermedad, tales como fármacos, hormonas esteroideas, restricción calórica, estrés, alcohol o drogas de abuso. Sin embargo, la exposición a estos factores precipitantes no explican por sí solos la penetrancia incompleta de la enfermedad puesto que se ha observado diferencias en la tolerancia a fármacos (114), incluso dentro de una misma familia. Por ello se cree que la dotación genética individual también influye en la expresión de la PAI, así como en otras porfirias. Se ha propuesto un modelo multifactorial en el cual los individuos portadores de mutaciones causantes de porfiria estarían sujetos a la influencia tanto de factores externos precipitantes de crisis como de distintos factores de susceptibilidad genéticos (78, 85, 86). Los genes de susceptibilidad involucrados en la manifestación de crisis agudas en la PAI son desconocidos.

Tanto el gen *ALAS1* como los genes *CYP*, intervienen en la modulación del grado de síntesis del grupo hemo, por tanto son candidatos idóneos a desempeñar un papel importante en la manifestación clínica de la PAI, influyendo en su penetrancia.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el posible papel de *ALAS1* y determinados genes *CYP* como genes modificadores en la PAI. Se propuso identificar variantes genéticas en la región reguladora del gen *ALAS1* y en los genes de los citocromos *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*, que potencialmente actuaran como factores de susceptibilidad para la aparición de crisis agudas (PAI manifiesta) en individuos portadores de PAI. Para ello fue necesario la identificación de las características demográficas básicas en nuestra

población de PAI y determinar la proporción de portadores con PAI manifiesta y latente.

#### 6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN PAI ESTUDIADA

Como se ha puntualizado en apartados anteriores en la Región de Murcia predomina la mutación fundadora c.669\_698del en el gen *HMBS*, explicativa de PAI en el 78% de los casos estudiados.

En general la penetrancia en la población PAI estudiada fue del 52%, muy superior a lo reportado clásicamente. Sin embargo, este porcentaje es sólo ligeramente superior a la proporción de PAI manifiesta publicada en poblaciones en el norte de Europa con prevalencia de otras mutaciones fundadoras, como es el caso del 42% reportado en Suecia o Noruega, donde la mutación c.593G>A (p.W198X) es predominante (80, 81). En la población PAI analizada en este estudio la penetrancia asociada a la mutación c.669\_698del (p.(Glu223\_Leu232del)) fue del 48.7%, muy similar a la penetrancia asociada a la mutación p.W198X (44%) (79). La penetrancia asociada a la mutación c.76C>T (p.Arg26Cys), la segunda más frecuente y observada en una sola familia, fue también similar (50%).

Estos datos distan mucho de la penetrancia clásicamente descrita, indicando que estas mutaciones fundadoras probablemente tengan un mayor impacto en la funcionalidad de la enzima que otras mutaciones descritas con penetrancia inferior, contribuyendo en mayor grado a explicar la alta frecuencia de PAI manifiesta observada.

Dado que no se disponen de estudios de expresión y cristalización de la enzima *HMBS* resultante de la mutación fundadora c.669\_698del (p.(Glu223\_Leu232del)) no conocemos su impacto estructural sobre la proteína. Los análisis de actividad enzimática en pacientes portadores heterocigotos de esta mutación han detectado niveles medios del 47.5% (error estándar: 3.9). Este dato es una evidencia que apoya en la interpretación del efecto patogénico de la mutación.

Basándonos en el conocimiento estructural de la enzima silvestre o *wildtype* (64), cabe pensar que la ausencia de los residuos delecionados probablemente alteran la estructura conformacional de la proteína. Puesto que se trata de una enzima que requiere del desplazamiento de sus dominios para la adición secuencial de PBG durante la formación del pirrol, y el residuo L238 es esencial en el movimiento del dominio 1, es posible que la delección fundadora que comprende desde el glutámico en posición 223 hasta la leucina en posición 232 produzca un desplazamiento de éste aminoácido esencial impidiendo su función como residuo bisagra.

En cuanto a la mutación c.76C>T (p.Arg26Cys), descrita por primera vez en Finlandia, se sabe que da lugar a ARNm y producto proteico (245). Algunos autores habían especulado que el posible efecto de este cambio en el residuo 26 afectaría a la unión al sustrato (62). Los estudios estructurales de la enzima HMBS humana más recientes apuntan que para su correcto funcionamiento, el cofactor dipirrometano se protona en la posición C2 para luego sufrir la hidrólisis de la unión carbono-carbono y generar el producto final. Los análisis del sitio activo sugieren que los residuos R26, Q34 o R195 se encuentran cerca del anillo C2 del cofactor y potencialmente pueden participar en dicha protonación (64).

Disponemos de escasos datos de los niveles de actividad de la enzima HMBS (no incluidos en este estudio) en nuestros pacientes, puesto que no se realizan de forma rutinaria en los casos con una mutación familiar ya conocida. En el caso índice portador heterocigoto de la mutación c.76C>T (p.Arg26Cys) se determinó una actividad en eritrocitos del 52%.

Todo esto explicaría el alto impacto de la mutación c.76C>T (p.Arg26Cys) lo que contribuiría también a su elevada penetrancia.

Por otro lado, es de interés destacar que la mayoría de estudios dirigidos a determinar la penetrancia de mutaciones causantes de PAI se han realizado en poblaciones con prevalencia de una mutación particular. Una vez que se identifica una mutación causante de PAI en un individuo se desencadena el estudio familiar en cascada de dicha mutación, lo que favorece la identificación de nuevos portadores. Este hecho enriquece la población afecta de PAI de individuos portadores de la mutación prevalente. Sin embargo, es difícil detectar otras mutaciones diferentes si la penetrancia general de la PAI es tan baja como un 10-

20% o incluso próxima al 1% como sugieren las estimaciones basadas en la prevalencia de variantes patogénicas en el gen *HMBS* en donantes de sangre (75) o en las bases de datos genómicas (76).

Con respecto a la distribución del sexo, como sucede en otras series de pacientes con PAI, la PAI manifiesta es más frecuente en mujeres que en hombres en nuestra población, con una ratio similar, alrededor de 2:1.

## 6.2 PAPEL DE LAS REGIONES REGULADORAS DEL GEN *ALAS1* EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CRISIS AGUDAS EN PAI

El análisis de la región reguladora del gen *ALAS1* reveló un alto grado de conservación y homogeneidad de la secuencia nucleotídica en la población estudiada, de forma que no se detectaron polimorfismos en las regiones diana (promotor proximal y regiones distales ADRES). Se obtuvieron resultados análogos en el análisis del grado de metilación en la isla CpG en la región reguladora de este gen. Todos los individuos presentaron todas las posiciones CpG metiladas de forma uniforme. Esto indica que esta región rica en GC es poco accesible a proteínas de unión al ADN, necesarias para su transcripción.

Los resultados obtenidos sugieren que las regiones reguladoras analizadas no intervienen en la susceptibilidad a las crisis agudas en la población estudiada. Por lo tanto, este estudio no ha permitido analizar el posible papel de variantes genéticas en las regiones reguladoras de la expresión de *ALAS1* en la PAI.

La inexistencia de variantes genéticas en estas regiones puede ser debido a que se trata de secuencias conservadas donde la existencia de polimorfismos es poco frecuente en la población y la probabilidad de detección en una muestra pequeña sea muy baja. Puesto que la región promotora del gen *ALAS1* contiene sitios de unión a factores de transcripción y RNs imprescindibles para la inducción del gen, es lógico pensar que estas secuencias presenten un alto grado de conservación para preservar su funcionalidad. Por otro lado la homogeneidad genética en estas regiones podría deberse a las características propias de la población PAI estudiada, procedente de un área geográfica próxima y con un alto grado de parentesco, puesto que los 50 individuos analizados procedían de 21 familias.

Como este trabajo es el único existente hasta la fecha en PAI con este tipo de abordaje, no podemos descartar el posible papel que desempeñaría la presencia de variantes genéticas en estas regiones. Es de interés señalar que este tipo de estudio ha sido de utilidad en PV. Un estudio realizado en 26 individuos de población sudafricana con PV detectó dos variantes genéticas en el promotor proximal de *ALAS1* (186). Estas variantes se asociaron a una inducción diferencial del gen en respuesta a estrógenos, tras la realización de estudios de expresión *in vitro*. Los resultados del estudio en PV sugieren que las porfirias agudas, en general, podrían verse influidas por variantes genéticas en el promotor de *ALAS1*. Pese a que en nuestra población no se haya observado tal evidencia no se puede descartar la utilidad de este tipo de estudio en otras poblaciones PAI o en otro tipo de porfirias agudas.

En relación a las regiones ADRES1 y ADRES2, no se han identificado variantes de la secuencia que alteren los sitios consenso de unión a NRs en el presente estudio. Estos resultados son análogos a los hallados en el estudio sudafricano de PV (186). Probablemente estas dos regiones presentan una alta conservación al constituir elementos funcionales del ADN.

Por otro lado, los estudios de metilación del gen *ALAS1* en porfirias son inexistentes. De forma análoga, sólo hay una publicación que ha descrito una asociación entre la hipermetilación del gen *FECH* y una mayor gravedad de la PPE (187). La metilación es un conocido mecanismo regulador de la expresión génica por lo que muy probablemente el gen *ALAS1* esté sujeto a regulación de este tipo.

Los resultados del análisis de la isla CpG indican que ésta se encuentra silenciada en el tejido estudiado (linfocitos de sangre periférica). Es posible que esta región CpG se encuentre metilada de forma constitutiva en linfocitos. Dado que esta línea celular no requiere de alta inducibilidad de la síntesis de hemo, podría presentar expresión basal exclusivamente. Este estudio tampoco permite descartar que esta isla CpG intervenga en la modulación de la expresión de *ALAS1* en otros tejidos con alta inducibilidad del gen, como es el tejido hepático. Sería necesario el estudio de metilación en hepatocitos procedentes de portadores de porfiria, pero este tipo de estudios son difícilmente realizables dada la dificultad en la accesibilidad de este tejido. En este sentido, los estudios en

modelos animales de porfiria serían de gran utilidad. Cabe añadir que también sería de interés el análisis del grado de metilación de la isla CpG característica del promotor core o proximal, aunque esta región probablemente tenga tendencia a conservar el estado no metilado de los dinucleótidos GC para permitir la unión de los factores de transcripción necesarios para la expresión basal del gen *ALAS1*, de expresión constitutiva en todos los tejidos.

### 6.3 PAPEL DE LOS GENES *CYP* EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LAS CRISIS AGUDAS EN PAI

En relación al efecto del genotipo de los *CYP* en la expresión clínica de las porfirias, algunos estudios ya habían sugerido la asociación de algunos polimorfismos con PCT principalmente (207, 208), pero también con PAI (213). En estos estudios observaron diferencias de la distribución alélica o genotípica entre individuos con porfiria y población control sana. Pero éstos no permitieron establecer una clara evidencia de que los genes *CYP* actuaran como un factor modificador en la penetrancia de la enfermedad.

En el presente estudio se ha evidenciado que las frecuencias alélicas de los genes *CYP* analizados en portadores de PAI son similares a las descritas en nuestra población de referencia (218, 229, 234, 235). Sin embargo, al comparar entre individuos con PAI manifiesta y PAI latente se observa una distribución diferencial de los alelos *CYP2D6*, de manera que los alelos defectuosos se encuentran con más frecuencia en el grupo de PAI latente. También hay indicios de un hallazgo similar en el gen *CYP2C9*. Este resultado concuerda con lo descrito por Lavandera y colaboradores en un estudio que incluyó 20 individuos con PAI en población argentina (213). En dicho estudio la frecuencia alélica de *CYP2D6*\*4 fue inferior en individuos con PAI en comparación a población control sana, y ningún individuo sintomático era portador de este alelo. Las diferencias en la distribución alélica, unidas al efecto detectado del genotipo *CYP2D6* y *CYP2C9* en la aparición de PAI manifiesta, aportan una mayor evidencia del posible papel de los *CYP* como modificadores de la penetrancia en PAI, pudiendo explicar parte de la variabilidad interindividual en la ocurrencia de crisis agudas.

De forma adicional, en el caso de *CYP2C9* se ha observado también un efecto en la expresión metabólica de la PAI, al existir diferencias en la excreción de PBG por genotipo. Sin embargo, este resultado se ha de interpretar con cautela,



puesto que los niveles de PBG en orina pueden permanecer elevados durante años tras una crisis aguda (92, 93). Por ello, tras comprobar que existían diferencias en la excreción de PBG entre los individuos con PAI manifiesta y PAI latente, se realizó un análisis controlado por esta última variable para valorar los efectos en la excreción de PBG del genotipo y de la ocurrencia de crisis de forma independiente. El efecto atribuido exclusivamente a los alelos defectuosos en el gen *CYP2C9* (disminución de 3.82 unidades de PBG) fue inferior al inicialmente descrito sin tener en cuenta la ocurrencia de crisis (disminución de 6.5 unidades de PBG), y estadísticamente no significativo. De hecho, se evidenció que las diferencias observadas en los niveles de PBG en orina estaban asociados a la historia previa de ocurrencia de crisis en cada paciente. Es probable que los alelos defectuosos determinen por sí solos una menor excreción de PBG, pero es necesario reproducir estos hallazgos en otras poblaciones más extensas para analizar este efecto. Los resultados en el análisis del gen *CYP2D6* no permiten extraer conclusiones a favor de un efecto de este gen en la excreción de PBG. Lo que se puede deducir en este estudio es que los alelos defectuosos en los genes *CYP2D6* y *CYP2C9* se asocian a una disminución en la excreción de PBG, siendo la ocurrencia de crisis el factor intermedio explicativo.

El hecho de que sean aquellos genotipos o alelos asociados a una menor actividad enzimática de los CYP los que determinan una menor posibilidad de aparición de PAI manifiesta indica que los alelos nulos o defectuosos actuarían como factores protectores, o lo que es lo mismo, los alelos funcionales podrían constituir factores de susceptibilidad.

Una posible explicación es que los individuos portadores de alelos o genotipos *CYP* con menor actividad enzimática podrían ser menos susceptibles a los metabolitos porfirrogénicos resultantes del metabolismo de fármacos mediado por estas enzimas. Otra posibilidad es que los portadores de estos alelos sean menos susceptibles a la inhibición irreversible por sustrato, de forma que estén menos sujetos a la destrucción del grupo hemo requiriendo menor nivel de síntesis de éste. Estas razones explicarían sólo la variabilidad en la susceptibilidad individual a desarrollar crisis frente a la exposición de fármacos. Por último, otra hipótesis es que los portadores de alelos menos funcionales o nulos podrían requerir menor volumen de hemo para su síntesis. De esta forma mantendrían

una demanda de hemo más baja que los portadores de alelos funcionales, evitándose la sobrecarga de la vía biosintética y previniendo hasta cierto punto la acumulación de precursores. Así, estos individuos requerirían señales porfirogénicas más potentes para el desencadenamiento de las crisis agudas. Esta última hipótesis es consistente con la evidencia de que los alelos *CYP2D6\*4* y *CYP2D6\*5*, que no generan producto proteico que consume hemo, son los que muestran un efecto protector en la ocurrencia de crisis. También concuerda con los indicios hallados de una menor excreción de PBG en orina en los individuos portadores de genotipos menos funcionales en el gen *CYP2C9*. Las tres explicaciones sugeridas podrían coexistir sin ser excluyentes, aunque se requiere investigar en profundidad estos hallazgos para su confirmación.

Además, el efecto del genotipo de varios genes *CYP* podría ser aditivo, puesto que se ha evidenciado menor ocurrencia de crisis en portadores de alelos defectuosos en ambos genes *CYP2C9* y *CYP2D6*, frente a los portadores de alelos defectuosos en uno sólo de éstos. Esto sugiere que el genotipado conjunto de aquellos genes *CYP* que se vean involucrados en la susceptibilidad de las crisis agudas podría proporcionar una herramienta para la estratificación del riesgo en los pacientes con porfiria.

En definitiva, se ha determinado que los genes *CYP2D6* y *CYP2C9* podrían constituir genes modificadores en la PAI, actuando los alelos defectuosos como factores de protección frente a las crisis agudas. Con los resultados obtenidos se puede afirmar que aquellos portadores de PAI con alelos defectuosos en los genes *CYP2D6* y *CYP2C9* presentan menos probabilidad de ocurrencia de crisis que los que presentan alelos normales. Otros genes *CYP* podrían estar desempeñando el mismo papel, aunque en este estudio no se haya logrado evidencia. Del mismo modo, los genes *CYP* podrían constituir genes modificadores en otros tipos de porfirias agudas.

La caracterización de genes modificadores de la penetrancia permite tener un mejor conocimiento del mecanismo patogénico de las porfirias agudas y determinar nuevas dianas terapéuticas. A nivel traslacional, destaca su potencial aplicación en la medicina de precisión, ya que sería posible una estratificación personalizada del riesgo para la manifestación de crisis agudas, a partir del perfil alélico individual de los genes *CYP*, y la planificación de un seguimiento más

personalizado. La manifestación clínica de la PAI es el resultado de la concurrencia de diversos factores tanto exógenos o ambientales, como endógenos que conllevan la sobreactivación de la biosíntesis de hemo. En la medida que un individuo presenta factores genéticos de susceptibilidad, que no son modificables, presentará menor tolerancia a la adición de los factores externos desencadenantes de crisis. Por ello, los individuos con genotipos *CYP* más susceptibles presentarán un mayor riesgo basal que aquellos que no son portadores de éstos.

Esta estratificación del riesgo podría ser de gran utilidad para la identificación de pacientes candidatos para la administración de terapias génicas basadas en ARNi para el gen *ALAS1*. Si estas terapias demuestran en el futuro alta tolerancia y efectividad frente al tratamiento profiláctico convencional con hemina para la prevención de crisis agudas, podría ser también potencialmente de utilidad en los pacientes, que sin cumplir criterios estrictos de recurrencia, presentan más riesgo de sufrir crisis agudas. En definitiva, la evaluación del genotipo *CYP* junto con la valoración de otros factores exógenos y endógenos permitiría establecer una estrategia de medicina personalizada en la PAI, para un manejo, prevención y seguimiento más eficiente de los individuos más susceptibles.

Por último, cabe destacar que los estudios centrados en los pacientes con PAI en nuestra región han sido de gran interés traslacional. En su momento permitieron una simplificación de la estrategia en el diagnóstico genético, tras la identificación de la mutación fundadora prevalente, de la que se han beneficiado los pacientes y familias murcianas afectadas (183). Ahora, la identificación de variantes genéticas de susceptibilidad en los genes *CYP* permite dar un paso más allá en la caracterización individual de nuestros pacientes para incorporar la medicina personalizada al cuidado de los portadores PAI. Además, estos hallazgos podrían ser aplicables no solo a este grupo de pacientes sino a toda la población PAI y posiblemente a otros tipos de porfirias agudas. Aunque se requieren estudios más extensos para confirmar los resultados, esta vía es muy prometedora y merece seguir siendo explorada.

#### 6.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es necesario puntualizar que este estudio presenta limitaciones que han dificultado la consecución de todos los objetivos propuestos.

La principal limitación es el número de pacientes analizados, como ocurre en la mayoría de enfermedades raras. Aunque consideramos un éxito haber incluido casi la totalidad de los pacientes con PAI registrados en la Región de Murcia, la cifra de 50 individuos no es la más óptima para conseguir estudios de asociación con alta significancia estadística. Pero permite identificar tendencias y evidencias moderadas que justifiquen estudios de verificación en poblaciones de mayor tamaño que requieren esfuerzos de colaboración y sinergias, dada la baja prevalencia de la PAI.

Además, el número reducido de la población de estudio y la homogeneidad genética innata a la población estudiada, procedente de una misma región geográfica y con vínculos familiares en algunos casos, ha sido un factor que puede influir en la detección de variantes genéticas en las regiones reguladoras del gen *ALAS1*. Sin embargo, esta homogeneidad genética también se consideró una ventaja durante el diseño del estudio puesto que podría facilitar la detección de diferencias interindividuales atribuibles a los distintos genotipos *CYP*, al eliminar parte de la variabilidad debida a las diferencias entre las mutaciones u otros factores genéticos no considerados.

Por otro lado, aunque la alta variabilidad genética en los genes *CYP* haya permitido analizar el efecto de estos genes en la ocurrencia de crisis, este estudio se limitó a los alelos defectuosos más frecuentemente hallados en nuestra población. Para un análisis del genotipo más riguroso sería necesario evaluar la presencia de otros alelos alternativos que, pese a encontrarse en baja proporción en población, podrían constituir un porcentaje apreciable en conjunto.

Finalmente, para llevar a cabo un análisis más riguroso del impacto del genotipo *CYP* en la excreción urinaria de ALA y PBG hubiese sido necesario recoger varias muestras de orina seriadas en un periodo de tiempo, para caracterizar la variación intraindividual y obtener unos valores basales medios más fiables. Sin embargo, esta aproximación no era muy práctica, considerando que se trata de una muestra sensible (luz y temperatura) que ha de analizarse en el laboratorio de referencia regional (Hospital Clínico Universitario Virgen de la

Arrixaca) y que se tenía constancia de incidencias preanalíticas cuando la muestra era entregada en puntos de extracción diferentes del centro de referencia. Para evitar fallos en la recepción y conservación de las muestras de orina se decidió tomar una sola muestra como referencia basal, recogida el día en el que el paciente acudía a la consulta.

#### 6.5 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Los hallazgos de este estudio abren una prometedora línea de investigación enfocada al posible papel de los genes *CYP* en la modulación de la expresión de la PAI en particular y las porfirias agudas en general. La relevancia de los *CYP* en la magnitud de la biosíntesis del grupo hemo ha sido sugerida por muchos estudios. Sin embargo, su papel no se ha explorado en profundidad en las porfirias. Los resultados de este estudio animan al estudio de otros alelos y genes *CYP* en poblaciones con porfirias agudas con el fin de confirmar su efecto y perfilar aquellos genes con mayor relevancia en la modulación de estas enfermedades. El estudio sistematizado de los genes *CYP* y la confirmación de su papel en la expresión de la PAI permitiría establecer un perfil de estudio de riesgo basado en el genotipo, como se ha sugerido anteriormente.

Adicionalmente, la principal hipótesis que explicaría el papel de los *CYP* en la PAI se basa en el hecho de que los genes *CYP* tienen un efecto en los niveles de demanda de síntesis de hemo, por consumo de éste. Esto hace pensar en que otros genes codificantes de proteínas que consumen hemo o que reducen su disponibilidad también podrían verse involucrados en la modulación de la demanda biosintética. Un ejemplo son los genes de las enzimas HO que intervienen en el catabolismo del hemo, reduciendo su disponibilidad. Junto a estos existen una multitud de genes que intervienen en la inducción del gen *ALAS1* en respuesta a fármacos (genes de NRs) o en situaciones de bajos niveles de glucosa, por ejemplo. Todos estos genes podrían ser también candidatos a modular la sobrestimulación de la síntesis de hemo y por tanto desempeñar un papel en la expresión de las porfirias agudas. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías de análisis genético, como la secuenciación masiva o las plataformas de array de genotipado de SNPs, sería posible el abordaje a gran escala que

incluyese de forma simultánea el estudio de todos los genes candidatos de forma coste-efectiva.

Por último, los recientes hallazgos de asociación de ciertos genotipos del gen *PEPT2* con un empeoramiento de la función renal más pronunciada en pacientes con PAI (113) apoyan la hipótesis de que distintos factores genéticos actúan modulando la expresión clínica de la enfermedad, no sólo a nivel agudo sino en sus manifestaciones crónicas. En este sentido sería de interés la evaluación de la función renal en los pacientes con PAI y el análisis del efecto del genotipo *CYP*, puesto que éstos podrían determinar un impacto en los niveles de PBG, así como de otros genes involucrados en el metabolismo del hemo.

Estas nuevas líneas de investigación se ven favorecidas por la disposición de una colección de muestras biológicas de la población PAI estudiada en el Biobanco en Red de la Región de Murcia (BIOBANC-MUR), creada durante el desarrollo de este trabajo. Sin duda, la creación de esta colección de muestras cedidas por los pacientes para investigación biomédica, previo consentimiento informado, ha sido un objetivo secundario que permitirá la continuidad de la investigación traslacional en nuestra población PAI de forma inmediata.

## **VII – CONCLUSIONES**





## VII-CONCLUSIONES

- 1-La penetrancia de la PAI en nuestra población, con una mutación fundadora prevalente, es superior a la descrita clásicamente y similar a la de otras poblaciones del norte de Europa con una mutación fundadora como el caso de Suecia.
- 2-Existe una alta homogeneidad genética en la región promotora proximal del gen *ALAS1* y las regiones reguladoras distales ADRES1 y 2, en la población PAI estudiada.
- 3-La isla CpG localizada a -4.67 Kb del inicio del gen *ALAS1* se encuentra homogéneamente metilada, no interviniendo en la potenciación de la expresión del gen *ALAS1*, en el tejido analizado (linfocitos de sangre periférica).
- 4-Las diferencias interindividuales en la ocurrencia de crisis en esta población no son atribuibles a diferencias genéticas o epigenéticas en las regiones reguladoras 5' analizadas del gen *ALAS1*, dada la homogeneidad genética hallada.
- 5-Los alelos defectuosos *CYP2D6\*4* y *CYP2D6\*5* son más frecuentes en individuos con PAI latente que en individuos con PAI manifiesta.
- 6-Los genotipos *CYP2D6*, y en menor medida *CYP2C9*, que determinan fenotipos menos funcionales se relacionan con una menor posibilidad de aparición de PAI manifiesta. Los alelos defectuosos en estos genes constituirían factores protectores.
- 7-Los genotipos *CYP2C9* que determinan fenotipos menos funcionales se relacionan con una menor excreción urinaria de PBG, aunque la ocurrencia de crisis es un factor intermedio explicativo de dicho efecto.
- 8-No existen diferencias en la distribución alélica de los genes *CYP2C19*, *CYP3A4* y *CYP3A5* en la población analizada, no observándose efecto del genotipo en la ocurrencia de crisis agudas.
- 9-El genotipado de genes *CYP* podría tener aplicación como estrategia en la medicina personalizada si se confirma su papel modificador en la PAI y se identifican aquellos alelos que confieren susceptibilidad a las crisis agudas.



## **VIII – BIBLIOGRAFÍA**



**VIII – BIBLIOGRAFÍA**

1. Kuhl T, Imhof D. Regulatory Fe(II/III) heme: the reconstruction of a molecule's biography. *Chembiochem*. 2014;15(14):2024-35.
2. Gidari AS, Levere RD. Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. *Semin Hematol*. 1977;14(2):145-68.
3. Abraham NG. Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis. *Blood Rev*. 1991;5(1):19-28.
4. Chen JJ, London IM. Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell*. 1981;26(1 Pt 1):117-22.
5. Benz EJ, Jr., Murnane MJ, Tonkonow BL, Berman BW, Mazur EM, Cavallesco C, et al. Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(6):3509-13.
6. Verger C, Sassa S, Kappas A. Growth-promoting effects of iron- and cobalt-protoporphyrins on cultured embryonic cells. *J Cell Physiol*. 1983;116(2):135-41.
7. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 2005;157(3):175-88.
8. Cotter PD, Baumann M, Bishop DF. Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinate synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(9):4028-32.
9. Bergmann AK, Campagna DR, McLoughlin EM, Agarwal S, Fleming MD, Bottomley SS, et al. Systematic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(2):273-8.
10. Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, Grandchamp B, Beaumont C, Badminton MN, et al. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am J Hum Genet*. 2008;83(3):408-14.

11. Chen W, Dailey HA, Paw BH. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*. 2010;116(4):628-30.
12. May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, Bottomley SS. Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1995;51:1-51.
13. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):723-36.
14. Roberts AG, Elder GH. Alternative splicing and tissue-specific transcription of human and rodent ubiquitous 5-aminolevulinate synthase (ALAS1) genes. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1518(1-2):95-105.
15. Braidotti G, Borthwick IA, May BK. Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat. *J Biol Chem*. 1993;268(2):1109-17.
16. Giono LE, Varone CL, Canepa ET. 5-Aminolaevulinate synthase gene promoter contains two cAMP-response element (CRE)-like sites that confer positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB). *Biochem J*. 2001;353(Pt 2):307-16.
17. Scassa ME, Guberman AS, Ceruti JM, Canepa ET. Hepatic nuclear factor 3 and nuclear factor 1 regulate 5-aminolevulinate synthase gene expression and are involved in insulin repression. *J Biol Chem*. 2004;279(27):28082-92.
18. Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, et al. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell*. 2005;122(4):505-15.
19. Conboy JG, Cox TC, Bottomley SS, Bawden MJ, May BK. Human erythroid 5-aminolevulinate synthase. Gene structure and species-specific differences in alternative RNA splicing. *J Biol Chem*. 1992;267(26):18753-8.
20. Surinya KH, Cox TC, May BK. Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinate synthase gene. Identification of promoter elements and role of regulatory proteins. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26585-94.

21. Sadlon TJ, Dell'Oso T, Surinya KH, May BK. Regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase expression during erythropoiesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(10):1153-67.
22. Sanchez M, Galy B, Schwanhaeusser B, Blake J, Bahr-Ivacevic T, Benes V, et al. Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. *Blood.* 2011;118(22):e168-79.
23. Yamamoto M, Hayashi N, Kikuchi G. Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta-aminolevulinate synthase in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;105(3):985-90.
24. Srivastava G, Borthwick IA, Maguire DJ, Elferink CJ, Bawden MJ, Mercer JF, et al. Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues. *J Biol Chem.* 1988;263(11):5202-9.
25. Hamilton JW, Bement WJ, Sinclair PR, Sinclair JF, Alcedo JA, Wetterhahn KE. Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch Biochem Biophys.* 1991;289(2):387-92.
26. Yamamoto M, Hayashi N, Kikuchi G. Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinate synthase in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;115(1):225-31.
27. Hayashi N, Watanabe N, Kikuchi G. Inhibition by hemin of in vitro translocation of chicken liver delta-aminolevulinate synthase into mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;115(2):700-6.
28. Yamauchi K, Hayashi N, Kikuchi G. Translocation of delta-aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver. *J Biol Chem.* 1980;255(4):1746-51.
29. Lathrop JT, Timko MP. Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science.* 1993;259(5094):522-5.
30. Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL. Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid

- synthase protein by heme in human liver cells. *J Biol Chem.* 2011;286(30):26424-30.
31. Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J Biol Chem.* 2016;291(39):20516-29.
  32. May BK, Borthwick IA, Srivastava G, Pirola BA, Elliott WH. Control of 5-aminolevulinate synthase in animals. *Curr Top Cell Regul.* 1986;28:233-62.
  33. De Matteis F, Ray DE. Studied on cerebellar haem metabolism in the rat in vivo. *J Neurochem.* 1982;39(2):551-6.
  34. De Matteis F, Marks GS. The effect of N-methylprotoporphyrin and succinyl-acetone on the regulation of heme biosynthesis in chicken hepatocytes in culture. *FEBS Lett.* 1983;159(1-2):127-31.
  35. Hamilton JW, Bement WJ, Sinclair PR, Sinclair JF, Wetterhahn KE. Expression of 5-aminolaevulinate synthase and cytochrome P-450 mRNAs in chicken embryo hepatocytes in vivo and in culture. Effect of porphyrinogenic drugs and haem. *Biochem J.* 1988;255(1):267-75.
  36. Ryan G, Ades IZ. Coordinate elevations of liver delta-aminolevulinate synthase and cytochrome P-450 RNA by phenobarbital in chicken embryos: the effects of heme. *Int J Biochem.* 1989;21(9):1025-31.
  37. Jover R, Hoffmann K, Meyer UA. Induction of 5-aminolevulinate synthase by drugs is independent of increased apocytochrome P450 synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1996;226(1):152-7.
  38. Fuhr U. Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet.* 2000;38(6):493-504.
  39. Prakash C, Zuniga B, Song CS, Jiang S, Cropper J, Park S, et al. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. *Nucl Receptor Res.* 2015;2.
  40. Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:123-43.



41. Honkakoski P, Moore R, Washburn KA, Negishi M. Activation by diverse xenochemicals of the 51-base pair phenobarbital-responsive enhancer module in the CYP2B10 gene. *Mol Pharmacol*. 1998;53(4):597-601.
42. Handschin C, Meyer UA. A conserved nuclear receptor consensus sequence (DR-4) mediates transcriptional activation of the chicken CYP2H1 gene by phenobarbital in a hepatoma cell line. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13362-9.
43. Baader M, Gnerre C, Stegeman JJ, Meyer UA. Transcriptional activation of cytochrome P450 CYP2C45 by drugs is mediated by the chicken xenobiotic receptor (CXR) interacting with a phenobarbital response enhancer unit. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15647-53.
44. Fraser DJ, Podvinec M, Kaufmann MR, Meyer UA. Drugs mediate the transcriptional activation of the 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS1) gene via the chicken xenobiotic-sensing nuclear receptor (CXR). *J Biol Chem*. 2002;277(38):34717-26.
45. Fraser DJ, Zumsteg A, Meyer UA. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor activate a drug-responsive enhancer of the murine 5-aminolevulinic acid synthase gene. *J Biol Chem*. 2003;278(41):39392-401.
46. Podvinec M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinic acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):9127-32.
47. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):179-83.
48. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):131-8.
49. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):7931-40.

50. Tikhanovich I, Cox J, Weinman SA. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 1:125-31.
51. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol.* 2014;5:61.
52. Besur S, Hou W, Schmeltzer P, Bonkovsky HL. Clinically important features of porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. *Metabolites.* 2014;4(4):977-1006.
53. Manceau H, Gouya L, Puy H. Acute hepatic and erythropoietic porphyrias: from ALA synthases 1 and 2 to new molecular bases and treatments. *Current Opinion in Hematology.* 2017;24(3):198-207.
54. Schultz J. Ein Fall von Pemphigus Leprosus, kompliziert durch lepra visceralis. Germany: University of Greifswald; 1874.
55. Stokvis B. Over Twee Zeldsamen Kleurstoffen in Urine van Zicken. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1889;13:409-17.
56. Anderson K, Sassa S, Bishop D, Desnick R. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, editor. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 2961-3062.
57. Karim Z, Lyoumi S, Nicolas G, Deybach JC, Gouya L, Puy H. Porphyrias: A 2015 update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39(4):412-25.
58. Seager MJ, Whatley SD, Anstey AV, Millard TP. X-linked dominant protoporphyria: a new porphyria. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(1):35-7.
59. Bissell DM, Anderson KE, Bonkovsky HL. Porphyria. *N Engl J Med.* 2017;377(9):862-72.
60. Schulenburg-Brand D, Katugampola R, Anstey AV, Badminton MN. The cutaneous porphyrias. *Dermatol Clin.* 2014;32(3):369-84, ix.
61. Elder G, Harper P, Badminton M, Sandberg S, Deybach JC. The incidence of inherited porphyrias in Europe. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(5):849-57.
62. Floderus Y, Shoolingin-Jordan PM, Harper P. Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new

- mutations found in the porphobilinogen deaminase gene. *Clin Genet.* 2002;62(4):288-97.
63. Grandchamp B, De Verneuil H, Beaumont C, Chretien S, Walter O, Nordmann Y. Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. *Eur J Biochem.* 1987;162(1):105-10.
  64. Song G, Li Y, Cheng C, Zhao Y, Gao A, Zhang R, et al. Structural insight into acute intermittent porphyria. *Faseb J.* 2009;23(2):396-404.
  65. Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, et al. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(1):6-10.
  66. Gubin AN, Miller JL. Human erythroid porphobilinogen deaminase exists in 2 splice variants. *Blood.* 2001;97(3):815-7.
  67. Solis C, Martinez-Bermejo A, Naidich TP, Kaufmann WE, Astrin KH, Bishop DF, et al. Acute intermittent porphyria: studies of the severe homozygous dominant disease provides insights into the neurologic attacks in acute porphyrias. *Arch Neurol.* 2004;61(11):1764-70.
  68. Pineiro Pauwels MB, Gerez EN, Martinez MC, Melito VA, Parera VE, Batlle A, et al. An odd case of heteroallelic acute intermittent porphyria in the Argentinean population. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2013;59 Suppl:O11855-60.
  69. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665-77. [fecha de acceso 19 de Abril de 2018]. URL disponible en: [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk).
  70. Gross U, Honcamp M, Doss MO. Heterogeneity of acute intermittent porphyria: a subtype with normal erythrocyte porphobilinogen deaminase activity in Germany. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996;34(8):613-8.
  71. Mustajoki P. Normal erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in a kindred with acute intermittent porphyria. *Ann Intern Med.* 1981;95(2):162-6.

72. Schneider-Yin X, Harms J, Minder EI. Porphyria in Switzerland, 15 years experience. *Swiss Med Wkly*. 2009;139(13-14):198-206.
73. de Rooij FW, Kavelaars FG, Koole-Lesuis H, Wilson JH. Evidence for an ancestral founder of the common R116W mutation in the hydroxymethylbilane synthase gene in acute intermittent porphyria in The Netherlands. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009;55(2):64-9.
74. Greene-Davis ST, Neumann PE, Mann OE, Moss MA, Schreiber WE, Welch JP, et al. Detection of a R173W mutation in the porphobilinogen deaminase gene in the Nova Scotian "foreign Protestant" population with acute intermittent porphyria: a founder effect. *Clin Biochem*. 1997;30(8):607-12.
75. Nordmann Y, Puy H, Da Silva V, Simonin S, Robreau AM, Bonaiti C, et al. Acute intermittent porphyria: prevalence of mutations in the porphobilinogen deaminase gene in blood donors in France. *J Intern Med*. 1997;242(3):213-7.
76. Chen B, Solis-Villa C, Hakenberg J, Qiao W, Srinivasan RR, Yasuda M, et al. Acute Intermittent Porphyria: Predicted Pathogenicity of HMBS Variants Indicates Extremely Low Penetrance of the Autosomal Dominant Disease. *Hum Mutat*. 2016;37(11):1215-22.
77. von und zu Fraunberg M, Pischik E, Udd L, Kauppinen R. Clinical and biochemical characteristics and genotype-phenotype correlation in 143 Finnish and Russian patients with acute intermittent porphyria. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):35-47.
78. Badminton MN, Elder GH. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(3):277-86.
79. Andersson C, Floderus Y, Wikberg A, Lithner F. The W198X and R173W mutations in the porphobilinogen deaminase gene in acute intermittent porphyria have higher clinical penetrance than R167W. A population-based study. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60(7):643-8.
80. Mykletun M, Aarsand AK, Stole E, Villanger JH, Tollanes MC, Baravelli C, et al. Porphyrias in Norway. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny rakke*. 2014;134(8):831-6.

81. Bylesjo I, Wikberg A, Andersson C. Clinical aspects of acute intermittent porphyria in northern Sweden: a population-based study. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(5):612-8.
82. Gouya L, Deybach JC, Lamoril J, Da Silva V, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. *Am J Hum Genet.* 1996;58(2):292-9.
83. Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, et al. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet.* 2002;30(1):27-8.
84. Gouya L, Puy H, Robreau AM, Lyoumi S, Lamoril J, Da Silva V, et al. Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. *Hum Genet.* 2004;114(3):256-62.
85. Thunell S. Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. I. Update. *Scand J Clin Lab Invest.* 2000;60(7):509-40.
86. Lenglet H, Schmitt C, Grange T, Manceau H, Karboul N, Bouchet-Crivat F, et al. From a dominant to an oligogenic model of inheritance with environmental modifiers in acute intermittent porphyria. *Hum Mol Genet.* 2018;27(7):1164-73.
87. Meyer UA, Strand LJ, Doss M, Rees AC, Marver HS. Intermittent acute porphyria--demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism. *N Engl J Med.* 1972;286(24):1277-82.
88. Whatley S, Badminton M. Acute Intermittent Porphyria. 2005. In: GeneReviews [Internet] [Internet]. Seattle: University of Washington, Seattle. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1193/>.
89. Rossi E. Increased fecal porphyrins in acute intermittent porphyria. *Clin Chem.* 1999;45(2):281-3.
90. Stein PE, Badminton MN, Rees DC. Update review of the acute porphyrias. *Br J Haematol.* 2017;176(4):527-38.
91. Bissell DM, Wang B. Acute Hepatic Porphyria. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(1):17-26.

92. Marsden JT, Rees DC. Urinary excretion of porphyrins, porphobilinogen and delta-aminolaevulinic acid following an attack of acute intermittent porphyria. *J Clin Pathol*. 2014;67(1):60-5.
93. Herrero C, Badenas C, Aguilera P, To-Figueras J. [Acute intermittent porphyria: Long-term follow up of 35 patients.]. *Med Clin (Barc)*. 2015;145(8):332-7.
94. Kauppinen R. Porphyrias. *Lancet*. 2005;365(9455):241-52.
95. Stein PE, Badminton MN, Barth JH, Rees DC, Sarkany R, Stewart MF, et al. Acute intermittent porphyria: fatal complications of treatment. *Clin Med (Lond)*. 2012;12(3):293-4.
96. Bonkovsky HL, Maddukuri VC, Yazici C, Anderson KE, Bissell DM, Bloomer JR, et al. Acute Porphyrias in the USA: Features of 108 Subjects from Porphyrias Consortium. *American Journal of Medicine*. 2014;127(12):1233-41.
97. Balwani M, Singh P, Seth A, Debnath EM, Naik H, Doheny D, et al. Acute Intermittent Porphyria in children: A case report and review of the literature. *Mol Genet Metab*. 2016;119(4):295-9.
98. Hultdin J, Schmauch A, Wikberg A, Dahlquist G, Andersson C. Acute intermittent porphyria in childhood: a population-based study. *Acta Paediatr*. 2003;92(5):562-8.
99. Sánchez-Soler MJ, Barreda-Sánchez M, Ballesta-Martínez MJ, Glóver G, Guillén-Navarro E. Acute intermittent porphyria in a paediatric population in the region of Murcia: Phenotype and prevalence. *An Pediatr (Barc)*. 2016;84(2):114-5.
100. Stewart MF. Review of hepatocellular cancer, hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient follow-up. *J Clin Pathol*. 2012;65(11):976-80.
101. Lithner F, Wetterberg L. Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med Scand*. 1984;215(3):271-4.
102. Kauppinen R, Mustajoki P. Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 1988;57(1):117-20.

103. Andant C, Puy H, Bogard C, Faivre J, Soule JC, Nordmann Y, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with acute hepatic porphyria: frequency of occurrence and related factors. *J Hepatol.* 2000;32(6):933-9.
104. Innala E, Andersson C. Screening for hepatocellular carcinoma in acute intermittent porphyria: a 15-year follow-up in northern Sweden. *J Intern Med.* 2011;269(5):538-45.
105. Sardh E, Wahlin S, Bjornstedt M, Harper P, Andersson DE. High risk of primary liver cancer in a cohort of 179 patients with Acute Hepatic Porphyria. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(6):1063-71.
106. Baravelli CM, Sandberg S, Aarsand AK, Nilsen RM, Tollanes MC. Acute hepatic porphyria and cancer risk: a nationwide cohort study. *J Intern Med.* 2017;282(3):229-40.
107. Lang E, Schafer M, Schwender H, Neumann NJ, Frank J. Occurrence of Malignant Tumours in the Acute Hepatic Porphyrias. *JIMD Rep.* 2015;22:17-22.
108. Laiwah AA, Mactier R, McColl KE, Moore MR, Goldberg A. Early-onset chronic renal failure as a complication of acute intermittent porphyria. *Q J Med.* 1983;52(205):92-8.
109. Church SE, McColl KE, Moore MR, Youngs GR. Hypertension and renal impairment as complications of acute porphyria. *Nephrol Dial Transplant.* 1992;7(10):986-90.
110. Andersson C, Wikberg A, Stegmayr B, Lithner F. Renal symptomatology in patients with acute intermittent porphyria. A population-based study. *J Intern Med.* 2000;248(4):319-25.
111. Marsden JT, Chowdhury P, Wang J, Deacon A, Dutt N, Peters TJ, et al. Acute intermittent porphyria and chronic renal failure. *Clin Nephrol.* 2008;69(5):339-46.
112. Pallet N, Mami I, Schmitt C, Karim Z, Francois A, Rabant M, et al. High prevalence of and potential mechanisms for chronic kidney disease in patients with acute intermittent porphyria. *Kidney Int.* 2015;88(2):386-95.

113. Tchernitchko D, Tavernier Q, Lamoril J, Schmitt C, Talbi N, Lyoumi S, et al. A Variant of Peptide Transporter 2 Predicts the Severity of Porphyria-Associated Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1924-32.
114. Kauppinen R, Mustajoki P. Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases. *Medicine (Baltimore)*. 1992;71(1):1-13.
115. 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. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(1):48-60.
116. De Siervi A, Rossetti MV, Parera VE, Mendez M, Varela LS, del CBAM. Acute intermittent porphyria: biochemical and clinical analysis in the Argentinean population. *Clin Chim Acta*. 1999;288(1-2):63-71.
117. Hift RJ, Thunell S, Brun A. Drugs in porphyria: From observation to a modern algorithm-based system for the prediction of porphyrogenicity. *Pharmacol Ther*. 2011;132(2):158-69.
118. Dickins M. Induction of cytochromes P450. *Curr Top Med Chem*. 2004;4(16):1745-66.
119. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(3):279-304.
120. Brun A. The drug database for acute porphyria 2003.[fecha de acceso 9 de Abril de 2018]. URL disponible en: <http://www.drugs-porphyria.org/>.
121. Thunell S, Pomp E, Brun A. Guide to drug porphyrogenicity prediction and drug prescription in the acute porphyrias. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;64(5):668-79.
122. Deybach JC, Badminton M, Puy H, Sandberg S, Frank J, Harper P, et al. European porphyria initiative (EPI): a platform to develop a common approach to the management of porphyrias and to promote research in the field. *Physiol Res*. 2006;55 Suppl 2:S67-73.
123. Roveri G, Nascimbeni F, Rocchi E, Ventura P. Drugs and acute porphyrias: reasons for a hazardous relationship. *Postgrad Med*. 2014;126(7):108-20.



124. Granick S. The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J Biol Chem.* 1966;241(6):1359-75.
125. 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. *J Intern Med.* 2003;254(2):176-83.
126. Ju Y, Mizutani T, Imamichi Y, Yazawa T, Matsumura T, Kawabe S, et al. Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology.* 2012;153(11):5522-34.
127. Mizutani T, Ishikane S, Kawabe S, Umezawa A, Miyamoto K. Transcriptional regulation of genes related to progesterone production. *Endocr J.* 2015;62(9):757-63.
128. Marsden JT, Rees DC. A retrospective analysis of outcome of pregnancy in patients with acute porphyria. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(5):591-6.
129. Seiden WB, Kelly LP, Ali R. Acute intermittent porphyria associated with ovarian stimulation. A case report. *J Reprod Med.* 2003;48(3):201-3.
130. Wang JG, Guarnaccia M, Weiss SF, Sauer MV, Choi JM. Initial presentation of undiagnosed acute intermittent porphyria as a rare complication of ovulation induction. *Fertil Steril.* 2006;86(2):462.e1-3.
131. Thunell S. (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria. *Physiol Res.* 2006;55 Suppl 2:S43-66.
132. Doss MO, Kuhnel A, Gross U. Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol Alcohol.* 2000;35(2):109-25.
133. Lip GY, McColl KE, Goldberg A, Moore MR. Smoking and recurrent attacks of acute intermittent porphyria. *Bmj.* 1991;302(6775):507.
134. Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol.* 2000;58(2):361-72.

135. Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem.* 2001;268(24):6346-58.
136. Litman DA, Correia MA. L-tryptophan: a common denominator of biochemical and neurological events of acute hepatic porphyria? *Science.* 1983;222(4627):1031-3.
137. Litman DA, Correia MA. Elevated brain tryptophan and enhanced 5-hydroxytryptamine turnover in acute hepatic heme deficiency: clinical implications. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;232(2):337-45.
138. Bissell DM, Lai JC, Meister RK, Blanc PD. Role of delta-aminolevulinic acid in the symptoms of acute porphyria. *Am J Med.* 2015;128(3):313-7.
139. Soonawalla ZF, Orug T, Badminton MN, Elder GH, Rhodes JM, Bramhall SR, et al. Liver transplantation as a cure for acute intermittent porphyria. *Lancet.* 2004;363(9410):705-6.
140. Dowman JK, Gunson BK, Bramhall S, Badminton MN, Newsome PN. Liver transplantation from donors with acute intermittent porphyria. *Ann Intern Med.* 2011;571-2.
141. Princ FG, Juknat AA, Amitrano AA, Battle A. Effect of reactive oxygen species promoted by delta-aminolevulinic acid on porphyrin biosynthesis and glucose uptake in rat cerebellum. *Gen Pharmacol.* 1998;31(1):143-8.
142. Demasi M, Penatti CA, DeLucia R, Bechara EJ. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):291-9.
143. Oteiza PI, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch Biochem Biophys.* 1993;305(2):282-7.
144. Rocha ME, Dutra F, Bandy B, Baldini RL, Gomes SL, Faljoni-Alario A, et al. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys.* 2003;409(2):349-56.

145. Onuki J, Chen Y, Teixeira PC, Schumacher RI, Medeiros MH, Van Houten B, et al. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys*. 2004;432(2):178-87.
146. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MH, Dornemann D, Douki T, Cadet J, et al. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002;48(1):17-26.
147. Homedan C, Laafi J, Schmitt C, Gueguen N, Lefebvre T, Karim Z, et al. Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;51:93-101.
148. Brennan MJ, Cantrill RC. Delta-Aminolaevulinic acid and amino acid neurotransmitters. *Mol Cell Biochem*. 1981;38 Spec No(Pt 1):49-58.
149. Adhikari A, Penatti CA, Resende RR, Ulrich H, Britto LR, Bechara EJ. 5-Aminolevulinate and 4, 5-dioxoalate ions decrease GABA(A) receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Res*. 2006;1093(1):95-104.
150. Lavandera J, Rodriguez J, Ruspini S, Meiss R, Zuccoli JR, Martinez Mdel C, et al. Pleiotropic effects of 5-aminolevulinic acid in mouse brain. *Biochem Cell Biol*. 2016;94(4):297-305.
151. Lin CS, Krishnan AV, Lee MJ, Zagami AS, You HL, Yang CC, et al. Nerve function and dysfunction in acute intermittent porphyria. *Brain*. 2008;131(Pt 9):2510-9.
152. Russell VA, Lamm MC, Taljaard JJ. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by delta-aminolevulinic acid. *Neurochem Res*. 1983;8(11):1407-15.
153. Becker D, Viljoen D, Kramer S. The inhibition of red cell and brain ATPase by delta-aminolaevulinic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1971;225(1):26-34.
154. Becker DM, Goldstuck N, Kramer S. Effect of delta-aminolaevulinic acid on the resting membrane potential of frog sartorius muscle. *S Afr Med J*. 1975;49(43):1790-2.
155. Gorchein A, Webber R. delta-Aminolaevulinic acid in plasma, cerebrospinal fluid, saliva and erythrocytes: studies in normal, uraemic and porphyric subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1987;72(1):103-12.

156. Mustajoki P, Timonen K, Gorchein A, Seppalainen AM, Matikainen E, Tenhunen R. Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a volunteer: no porphyric symptoms. *Eur J Clin Invest.* 1992;22(6):407-11.
157. Woolf J, Marsden JT, Degg T, Whatley S, Reed P, Brazil N, et al. Best practice guidelines on first-line laboratory testing for porphyria. *Ann Clin Biochem.* 2017;54(2):188-98.
158. Lamon JM, Frykholm BC, Tschudy DP. Screening tests in acute porphyria. *Arch Neurol.* 1977;34(11):709-12.
159. BATTERY JE, Carrera AM, Pannall PR. Analytical sensitivity and specificity of two screening methods for urinary porphobilinogen. *Ann Clin Biochem.* 1990;27 ( Pt 2):165-6.
160. BATTERY JE, Carrera AM, Pannall PR. Reliability of the porphobilinogen screening assay. *Pathology.* 1990;22(4):197-8.
161. Deacon AC, Elder GH. ACP Best Practice No 165: front line tests for the investigation of suspected porphyria. *J Clin Pathol.* 2001;54(7):500-7.
162. Anderson KE, Bloomer JR, Bonkovsky HL, Kushner JP, Pierach CA, Pimstone NR, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann Intern Med.* 2005;142(6):439-50.
163. Pischik E, Kauppinen R. An update of clinical management of acute intermittent porphyria. *Appl Clin Genet.* 2015;8:201-14.
164. Kauppinen R. Molecular diagnostics of acute intermittent porphyria. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4(2):243-9.
165. Stein P, Badminton M, Barth J, Rees D, Stewart MF. Best practice guidelines on clinical management of acute attacks of porphyria and their complications. *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 3):217-23.
166. Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet.* 2010;375(9718):924-37.
167. Schmitt C, Lenglet H, Yu A, Delaby C, Benecke A, Lefebvre T, et al. Recurrent attacks of acute hepatic porphyria: major role of the chronic inflammatory response in the liver. *J Intern Med.* 2018. [Epub ahead of print].

168. Innala E, Backstrom T, Bixo M, Andersson C. Evaluation of gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for prevention of menstrual-related attacks in acute porphyria. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(1):95-100.
169. Singal AK, Parker C, Bowden C, Thapar M, Liu L, McGuire BM. Liver transplantation in the management of porphyria. *Hepatology.* 2014;60(3):1082-9.
170. Dowman JK, Gunson BK, Mirza DF, Bramhall SR, Badminton MN, Newsome PN. Liver transplantation for acute intermittent porphyria is complicated by a high rate of hepatic artery thrombosis. *Liver Transpl.* 2012;18(2):195-200.
171. Fontanellas A, Avila MA, Berraondo P. Emerging therapies for acute intermittent porphyria. *Expert Rev Mol Med.* 2016;18:e17.
172. Johansson A, Moller C, Fogh J, Harper P. Biochemical characterization of porphobilinogen deaminase-deficient mice during phenobarbital induction of heme synthesis and the effect of enzyme replacement. *Mol Med.* 2003;9(9-12):193-9.
173. Sardh E, Rejkaer L, Andersson DE, Harper P. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human porphobilinogen deaminase in healthy subjects and asymptomatic carriers of the acute intermittent porphyria gene who have increased porphyrin precursor excretion. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(4):335-49.
174. Yasuda M, Bishop DF, Fowkes M, Cheng SH, Gan L, Desnick RJ. AAV8-mediated gene therapy prevents induced biochemical attacks of acute intermittent porphyria and improves neuromotor function. *Mol Ther.* 2010;18(1):17-22.
175. Unzu C, Sampedro A, Mauleon I, Alegre M, Beattie SG, de Salamanca RE, et al. Sustained enzymatic correction by rAAV-mediated liver gene therapy protects against induced motor neuropathy in acute porphyria mice. *Mol Ther.* 2011;19(2):243-50.
176. Unzu C, Melero I, Hervas-Stubbs S, Sampedro A, Mancheno U, Morales-Kastresana A, et al. Helper-dependent adenovirus achieve more efficient

- and persistent liver transgene expression in non-human primates under immunosuppression. *Gene Ther.* 2015;22(11):856-65.
177. Unzu C, Sampedro A, Mauleon I, Gonzalez-Aparicio M, Enriquez de Salamanca R, Prieto J, et al. Helper-dependent adenoviral liver gene therapy protects against induced attacks and corrects protein folding stress in acute intermittent porphyria mice. *Hum Mol Genet.* 2013;22(14):2929-40.
  178. Paneda A, Lopez-Franco E, Kaepfel C, Unzu C, Gil-Royo AG, D'Avola D, et al. Safety and liver transduction efficacy of rAAV5-cohPBGD in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria. *Hum Gene Ther.* 2013;24(12):1007-17.
  179. D'Avola D, Lopez-Franco E, Sangro B, Paneda A, Grossios N, Gil-Farina I, et al. Phase I open label liver-directed gene therapy clinical trial for acute intermittent porphyria. *J Hepatol.* 2016;65(4):776-83.
  180. Chan A, Liebow A, Yasuda M, Gan L, Racie T, Maier M, et al. Preclinical Development of a Subcutaneous ALAS1 RNAi Therapeutic for Treatment of Hepatic Porphyrrias Using Circulating RNA Quantification. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e263.
  181. Yasuda M, Gan L, Chen B, Kadirvel S, Yu C, Phillips JD, et al. RNAi-mediated silencing of hepatic *Alas1* effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(21):7777-82.
  182. Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bloomer J, et al. Phase 1, Randomized, Placebo Controlled Study of Givosiran, an investigational RNA interference (RNAi) herapeutic, in patients with Acute Intermittent Porphyria: interim study results. En: *International Congress on porphyrins and porphyrias 2017*; 25-28 June; Bordeaux, Francia 2017.
  183. Guillen-Navarro E, Carbonell P, Glover G, Sanchez-Solis M, Fernandez-Barreiro A. Novel HMBS founder mutation and significant intronic polymorphism in Spanish patients with acute intermittent porphyria. *Annals of Human Genetics.* 2004;68:509-14.

184. Steyn I. Investigation of the possible influences of candidate modifier genes on the clinical expression of variegate porphyria (VP) Stellenbosch: University of Stellenbosch; 2002.
185. To-Figueras J, Ducamp S, Clayton J, Badenas C, Delaby C, Ged C, et al. ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. *Blood*. 2011;118(6):1443-51.
186. du Plessis N, Kimberg M, Zaahl MG, Sadie A, Venter M, van der Merwe L, et al. Functional analysis of the 5' regulatory region of the 5-aminolevulinate synthase (ALAS1) gene in response to estrogen. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009;55(2):20-30.
187. Onaga Y, Ido A, Uto H, Hasuike S, Kusumoto K, Moriuchi A, et al. Hypermethylation of the wild-type ferrochelatase allele is closely associated with severe liver complication in a family with erythropoietic protoporphyria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321(4):851-8.
188. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics*. 2010;4(4):278-81.[fecha de acceso 1 de Abril de 2018]. URL disponible en: <https://www.pharmvar.org/>
189. Meyer UA. Endo-xenobiotic crosstalk and the regulation of cytochromes P450. *Drug Metab Rev*. 2007;39(2-3):639-46.
190. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 2004;14(1):1-18.
191. Correia M, Hollenberg P. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Fourth Edition ed: Springer International Publishing; 2015. p. 177-259.
192. Halpert JR, Guengerich FP, Bend JR, Correia MA. Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;125(2):163-75.

193. Oritz de Montellano PR, Correia MA. Suicidal destruction of cytochrome P-450 during oxidative drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1983;23:481-503.
194. Masubuchi Y, Horie T. Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol.* 2007;37(5):389-412.
195. Marks GS, Allen DT, Johnston CT, Sutherland EP, Nakatsu K, Whitney RA. Suicidal destruction of cytochrome P-450 and reduction of ferrochelatase activity by 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine and its analogues in chick embryo liver cells. *Mol Pharmacol.* 1985;27(4):459-65.
196. McNamee JP, Jurima-Romet M, Kobus SM, Marks GS. cDNA-expressed human cytochrome P450 isozymes. Inactivation by porphyrinogenic xenobiotics. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(4):437-41.
197. Lavigne JA, Nakatsu K, Marks GS. Identification of human hepatic cytochrome P450 sources of N-alkylprotoporphyrin IX after interaction with porphyrinogenic xenobiotics, implications for detection of xenobiotic-induced porphyria in humans. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(7):788-94.
198. Zhang G, Nebert DW. Personalized medicine: Genetic risk prediction of drug response. *Pharmacol Ther.* 2017;175:75-90.
199. Elder GH, Roberts AG. Uroporphyrinogen decarboxylase. *J Bioenerg Biomembr.* 1995;27(2):207-14.
200. De Matteis F, Harvey C, Reed C, Hempenius R. Increased oxidation of uroporphyrinogen by an inducible liver microsomal system. Possible relevance to drug-induced uroporphyrin. *Biochem J.* 1988;250(1):161-9.
201. Jacobs JM, Sinclair PR, Bement WJ, Lambrecht RW, Sinclair JF, Goldstein JA. Oxidation of uroporphyrinogen by methylcholanthrene-induced cytochrome P-450. Essential role of cytochrome P-450d. *Biochem J.* 1989;258(1):247-53.
202. Lambrecht RW, Jacobs JM, Sinclair PR, Sinclair JF. Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase activity. The role of cytochrome P-450-mediated uroporphyrinogen oxidation. *Biochem J.* 1990;269(2):437-41.



203. Sinclair PR, Gorman N, Walton HS, Bement WJ, Dalton TP, Sinclair JF, et al. CYP1A2 is essential in murine uroporphyrinemia caused by hexachlorobenzene and iron. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;162(1):60-7.
204. Sinclair PR, Gorman N, Dalton T, Walton HS, Bement WJ, Sinclair JF, et al. Uroporphyrinemia produced in mice by iron and 5-aminolaevulinic acid does not occur in Cyp1a2(-/-) null mutant mice. *Biochem J*. 1998;330 ( Pt 1):149-53.
205. Phillips JD, Bergonia HA, Reilly CA, Franklin MR, Kushner JP. A porphomethene inhibitor of uroporphyrinogen decarboxylase causes porphyria cutanea tarda. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5079-84.
206. Phillips JD, Kushner JP, Bergonia HA, Franklin MR. Uroporphyrinemia in the Cyp1a2-/- mouse. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;47(4):249-54.
207. Christiansen L, Bygum A, Jensen A, Thomsen K, Brandrup F, Horder M, et al. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Human Genetics*. 2000;107(6):612-4.
208. Wickliffe JK, Abdel-Rahman SZ, Lee C, Kormos-Hallberg C, Sood G, Rondelli CM, et al. CYP1A2\*1F and GSTM1 alleles are associated with susceptibility to porphyria cutanea tarda. *Mol Med*. 2011;17(3-4):241-7.
209. Dereure O, Aguilar-Martinez P, Bessis D, Blanc F, Larrey D, Guillot B, et al. No significant association between CYP1A2 polymorphism and porphyria cutanea tarda. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(3):254-5.
210. Fontanellas A, Martinez-Fresno M, Garrido-Astray MC, Perucho T, Moran-Jimenez MJ, Garcia-Bravo M, et al. Smoking but not homozygosity for CYP1A2 g-163A allelic variant leads to earlier disease onset in patients with sporadic porphyria cutanea tarda. *Exp Dermatol*. 19. Denmark2010. p. e326-8.
211. Tchernitchko D, Robreau AM, Lefebvre T, Lamoril J, Deybach JC, Puy H. Comprehensive cytochrome P450 CYP1A2 gene analysis in French caucasian patients with familial and sporadic porphyria cutanea tarda. *Br J Dermatol*. 2012;166(2):425-9.
212. Gardlo K, Selimovic D, Bolsen K, Ruzicka T, Abel J, Fritsch C. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in a Caucasian population with porphyria cutanea tarda. *Experimental Dermatology*. 2003;12(6):843-8.

213. Lavandera JV, Parera VE, Batlle A, Buzaleh AM. CYP2D6 polymorphisms in patients with porphyrias. *Mol Med*. 2006;12(9-10):259-63.
214. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-41.
215. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392(6):1093-108.
216. Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol*. 1997;43:7-35.
217. Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:477-94.
218. Vicente J, Gonzalez-Andrade F, Soriano A, Fanlo A, Martinez-Jarreta B, Sinues B. Genetic polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 in Ecuadorian Mestizo and Spaniard populations: a comparative study. *Mol Biol Rep*. 2014;41(3):1267-72.
219. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJ, Agundez JA. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57(1):47-9.
220. Dorado P, Sosa-Macias MG, Penas-Lledo EM, Alanis-Banuelos RE, Wong ML, Licinio J, et al. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J*. 2011;11(2):108-12.
221. Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17(1):27-41.
222. de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*. 1994;269(22):15419-22.
223. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(11):689-723.

224. Farooq M, Kelly EJ, Unadkat JD. CYP2D6 Is Inducible by Endogenous and Exogenous Corticosteroids. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(5):750-7.
225. Koh KH, Pan X, Zhang W, McLachlan A, Urrutia R, Jeong H. Kruppel-like factor 9 promotes hepatic cytochrome P450 2D6 expression during pregnancy in CYP2D6-humanized mice. *Mol Pharmacol.* 2014;86(6):727-35.
226. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(4):400-7.
227. Tracy TS, Venkataramanan R, Glover DD, Caritis SN. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(2):633-9.
228. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):284-95.
229. Menoyo A, del Rio E, Baiget M. Characterization of variant alleles of cytochrome CYP2D6 in a Spanish population. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(5):381-5.
230. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002;34(1-2):83-448.
231. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(8):883-91.
232. Westlind A, Malmebo S, Johansson I, Otter C, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(5):1349-55.
233. Rodriguez-Antona C, Sayi JG, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Phenotype-genotype variability in the human CYP3A locus as assessed by the probe drug quinine and analyses of variant CYP3A4 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):299-305.
234. Sinues B, Vicente J, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Mayayo E, et al. CYP3A5\*3 and CYP3A4\*1B allele distribution and genotype combinations:

- differences between Spaniards and Central Americans. *Ther Drug Monit.* 2007;29(4):412-6.
235. Gervasini G, Vizcaino S, Gasiba C, Carrillo JA, Benitez J. Differences in CYP3A5\*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Ther Drug Monit.* 2005;27(6):819-21.
  236. Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, Hopper JL, Chen X, Purdie DM, et al. The CYP3A4\*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics.* 2002;12(5):355-66.
  237. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4\* 1B promoter variant. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2003;42(4):299-305.
  238. Kadlubar FF, Berkowitz GS, Delongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, et al. The CYP3A4\*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(4):327-31.
  239. Apellaniz-Ruiz M, Inglada-Perez L, Naranjo ME, Sanchez L, Mancikova V, Curras-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the CYP3A4\*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(3):288-92.
  240. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27(4):383-91.
  241. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289-91.
  242. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, et al. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W580-4.
  243. Casper J, Zweig AS, Villarreal C, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, et al. The UCSC Genome Browser database: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D762-d9. URL disponible en: <https://genome.ucsc.edu/>

- 
244. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002;18(11):1427-31.
  245. Kauppinen R, Mustajoki S, Pihlaja H, Peltonen L, Mustajoki P. Acute intermittent porphyria in Finland: 19 mutations in the porphobilinogen deaminase gene. *Hum Mol Genet*. 1995;4(2):215-22.



# **ANEXOS**





ANEXO 1. DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS CON LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.

### **Publicaciones**

- MJ Sánchez-Soler, **María Barreda-Sánchez**, María Juliana Ballesta Martínez, Guillermo Glóver, Encarnación Guillén Navarro. Acute intermittent porphyria in a paediatric population in the region of Murcia: Phenotype and prevalence. *An Pediatr (Barc)*. 2016 Feb,84(2):114-5.

### **Ponencias en congresos**

- M. Barreda-Sánchez. Actualización de la investigación en Porfiria aguda intermitente. VIII Congreso Nacional de Enfermedades Raras. Totana 15 al 18 de Octubre de 2015. Ponencia invitada.
- M. Barreda-Sánchez. Perspectivas de investigación en PAI. VII Congreso Nacional de Enfermedades Raras. Totana, 24-26 de Octubre de 2014. Ponencia invitada.

### **Comunicaciones a congresos**

- María Barreda-Sánchez, Juan Buendía, M<sup>a</sup> Carmen Martínez-Romero, Guillermo Glover López, Encarna Guillén Navarro. Citocromos P450 como factores de susceptibilidad en porfiria aguda intermitente. X Congreso Internacional de Enfermedades Raras. Murcia, 24-25 de Noviembre de 2017. Comunicación póster.
- María Barreda Sánchez, J. Buendía, G. Glóver López, MC. Martínez-Romero, P. Carbonell, V. López-González, M.J. Ballesta-Martínez, E. Guillén-Navarro. Cytochrome P450 genes in Spaniards with acute intermittent porphyria. International Congress on Porphyrins and Porphyrins 2017. Burdeos, 25-28 de Junio de 2017. Comunicación póster.
- María Barreda Sánchez, Guillermo Glóver López, M<sup>a</sup> Carmen Martínez Romero, Pablo Carbonell Meseguer, Vanesa López González, María Juliana Ballesta Martínez, Encarna Guillén Navarro. Caracterización de genes citocromo P450 en porfiria aguda intermitente en población española. I Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Madrid, 25-27 de Abril 2017. Comunicación póster.

- Buendia Martínez J, Fuentes Ramirez, F, Lopez Sanchez, J, Sánchez Ortuño I, Cruz Huertas,MJ, **Barreda-Sánchez, M**, Glover López, G, Guillén Navarro E. La Porfiria Aguda intermitente en la Región de Murcia. LXVIII Reunión Anual Sociedad Española Neurología. Valencia, 15-19 de Noviembre de 2016. Comunicación póster.
- M. Barreda Sánchez, J. Buendía, M. José Sanchez Soler, MJ Ballesta Martínez, V. López González, L. Rodriguez, M. Martínez Romero, G. Glover López, E. Guillén Navarro. Chronic clinical findings in Acute Intermittent Porphyria in Spanish population. International Congress on Porphirins and Porphyria 2015. Düsseldorf, 16 de Septiembre de 2015. Comunicación póster.
- M. Barreda Sánchez, M. José Sanchez Soler, J. Buendía, MJ Ballesta Martínez, V. López González, L. Rodriguez, G. Glover López, E. Guillén Navarro. Clinical findings during pregnancy in Acute Intermittent Porphyria in Spain. International Congress on Porphirins and Porphyria 2015. Düsseldorf, 16 de Septiembre de 2015. Comunicación póster.
- M. José Sanchez Soler, **M. Barreda Sánchez**, V. López González, MJ Ballesta Martínez, G. Glover López, E. Guillén Navarro. Porfiria aguda intermitente en nuestra población pediátrica: prevalencia y características clínicas. XLII Reunión de Sociedad de pediatría del sureste de España. Lorca, 24-25 de Abril de 2015. Comunicación póster.
- M. Barreda-Sánchez, V. López-González, MJ Ballesta-Martínez, M.J. Sánchez-Soler, J. Buendía, M. Marínez-Romero, G. Glover-López, E. Guillén-Navarro. Características clínicas de la Porfiria aguda intermitente en la Región de Murcia. XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Murcia, 19-21 de Noviembre de 2014. Comunicación póster.
- M. Barreda-Sánchez, V. López-González, M.J. Sánchez-Soler, L Rodríguez, MR Gil-Ferrer, E. Guillén-Navarro. Porfiria aguda intermitente y embarazo. VII Congreso Nacional de Enfermedades Raras. Totana, 24-26 de Octubre de 2014. Comunicación póster.
- M. Barreda-Sánchez, M.J. Ballesta-Martínez, J Buendía, MC Martínez-Romero, G. Glóver-López, E. Guillén-Navarro. Situación actual de la Porfiria aguda intermitente en la Región de Murcia. VII Congreso

Nacional de Enfermedades Raras. Totana, 24-26 de Octubre de 2014. Comunicación póster.

–MJ. Sánchez-Soler, **M. Barreda-Sánchez**, V. López-González, M.J. Ballesta-Martínez, MC Martínez-Romero, G. Glóver-López, E. Guillén-Navarro. Acute intermittent porphyria in Spanish pediatric population: prevalence and phenotype. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of metabolism. Innsbruck, 2-5 de Septiembre de 2014. Comunicación póster.

–M. Barreda-Sánchez, MJ. Sánchez-Soler, M.J. Ballesta-Martínez, V. López-González, MC Martínez-Romero, JL Delgado, G. Glóver-López, E. Guillén-Navarro. Pregnancy outcomes and complications in Acute Intermittent Porphyria Spanish women. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of metabolism. Innsbruck, 2-5 de Septiembre de 2014. Comunicación póster.

–M Barreda, J Buendía, MJ Ballesta-Martínez, V López-González, G Glover-López, E Guillén-Navarro. Chronic manifestations and incidence of acute attacks in Spanish patients with acute intermittent porphyria. 12th International Congress of Inborn Errors of metabolism. Barcelona, 3-6 de Septiembre de 2013. Comunicación póster.

### **Premios**

#### **A la mejor comunicación en la categoría sanitaria:**

–María Barreda-Sánchez, Juan Buendía, M<sup>a</sup> Carmen Martínez-Romero, Guillermo Glover López, Encarna Guillén Navarro. Citocromos P450 como factores de susceptibilidad en porfiria aguda intermitente. X Congreso Internacional de Enfermedades Raras. Murcia, 24-25 de Noviembre de 2017. Comunicación póster.

### **Proyectos**

–Referencia: PMAFI/09/14. “Porfiria aguda intermitente: fenotipo, calidad de vida y variantes genéticas asociadas a la penetrancia”. Entidad financiadora: UCAM Plan Propio de Investigación 2014. Duración: 01/09/2014-30/06/2017.

## ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, ....., con DNI:.....

DECLARO:

Haber sido informado/a del estudio y procedimientos de la investigación. Los investigadores que van a acceder a mis datos personales y a los resultados de las pruebas son:

Dra. Encarnación Guillén Navarro

Dña. María Barreda Sánchez

Asimismo, he podido hacer preguntas del estudio, comprendiendo que me presto de forma voluntaria al mismo y que en cualquier momento puedo abandonarlo sin que me suponga perjuicio de ningún tipo.

CONSIENTO:

1.-) Someterme a las siguientes exploraciones:

- Extracción de sangre.
- Complimentación de un cuestionario clínico con datos personales acerca de mis hábitos de vida, historial médico y resultados de pruebas diagnósticas recogidos en mi historia clínica.
- Complimentación de encuesta de calidad de vida.
- Análisis molecular y bioquímico de las muestras biológicas cedidas, previo consentimiento, a BIOBANC-MUR , biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

2.-) El uso de los datos obtenidos según lo indicado en el párrafo siguiente:

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones a las que se va a someter pasará a formar parte del fichero automatizado INVESALUD, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO CIENCIAS EXPERIMENTALES Y CIENCIAS DE LA SALUD. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

En Guadalupe (Murcia) a ..... de ..... de.....

El investigador,

Fdo:.....

Fdo:.....

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS A BIOBANCO.



**BIOBANC-MUR**  
Biobanco en Red de la Región de Murcia



#### DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)

#### **UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

En el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios

**Solicitamos su autorización para incorporar al *Biobanc-Mur Nodo Área I* del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.**

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta

¿Qué es un biobanco?: *Institución para favorecer la investigación y la salud.*

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se cederán generalmente sin información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

**Muestras biológicas e información asociada:** *En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.*

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco *Biobanc-Mur Nodo Área I* del *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* hasta su extinción. Este Biobanco forma parte como nodo de la Red Temática de Investigación Cooperativa (RETIC) de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III con la referencia **RD09/0076/00065**, y está en proceso de Registro con el desarrollo de la normativa regional de Biobancos que aplica la normativa nacional.

Este biobanco acoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



**BIOBANC-MUR**  
**Biobanco en Red de la Región de Murcia**



Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el comité científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

**Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.**

Los datos personales que se recojan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizadas, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

*Responsable del fichero : Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.  
 Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia*

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia  
 Responsable del nodo Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia  
 Tel.: 968359757 E-mail: [juanp.serna@carm.es](mailto:juanp.serna@carm.es)

**Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.**

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
 Red Nacional de Biobancos – ISCIII. Versión julio 2012



**BIOBANC-MUR**  
**Biobanco en Red de la Región de Murcia**



**Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura**

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

**Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.**

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si deseara anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Director del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

**Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla**

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

**Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede comentar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.**

*Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.*



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012



**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO**

Nombre y Apellidos (donante).....  Etiqueta Identificativa Paciente  Edad:          Sexo:          DNI:.....	Persona del centro que informa .....  DNI:.....
--	--

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1* en los términos antes explicados, por favor, lea, complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

**Confirmo que:**

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

SI       NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia       SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales  
 SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto: .....

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:  
 .....  
 .....

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.... de..... de.....





**CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

Nombre y Apellidos (donante).....  Etiqueta Identificativa Paciente  Edad:      Sexo:      DNI:.....	Persona del centro que informa .....  DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del testigo que firma..... DNI.....

Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo 1* en los términos antes explicados, por favor, lea complete y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante confirma que el donante:

1. Autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanc-Mur Nodo 1*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.  
 SI       NO

2. Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia       SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto.....

3. Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales  
 SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto: .....

4. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:  
 .....  
 .....

5. Me autoriza a firmar en su nombre.

TESTIGO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a.... de..... de.....



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

Nombre y Apellidos (donante).....  Etiqueta Identificativa Paciente  Edad:      Sexo:      DNI:.....	Persona del centro que informa .....  DNI:.....
--	--

Nombre y apellidos del tutor legal que firma..... DNI.....  
 Relación con el donante:.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con *Biobanc-Mur Nodo Área I* en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja

El abajo firmante autoriza al *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca* a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el *Biobanco Biobanc-Mur Nodo Área I*, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

El abajo firmante confirma que:

- Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento de consentimiento informado sigue vigente.  
 SI       NO
- Desea que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia       SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto:.....
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales  
 SI       NO      Teléfono o E-mail de contacto: .....
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:  
 .....  
 .....  
 .....
- Me autoriza a firmar en su nombre.

TUTOR	ASENTIMIENTO DEL MENOR CAPACITADO	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma	Firma





**BIOBANC-MUR**  
**Biobanco en Red de la Región de Murcia**



En.....a.....de.....de.....

**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

**POR EL DONANTE:**

Yo, D./Dña. .... con DNI ..... anulo el consentimiento  
 prestado en fecha..... de.....de 20..... y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco *Biobanc-  
 Mur Nodo Área I*, que doy por finalizada al día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

**POR EL TUTOR/REPRESENTANTE LEGAL DEL DONANTE:**

Yo, D./Dña. .... con DNI ..... Como representante legal de  
 D/Dña..... con DNI....., anulo el consentimiento prestado en  
 fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria al biobanco *Biobanc-Mur Nodo Área I*,  
 que doy por finalizada al día de hoy.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LA MUESTRA.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO LOS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



*Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia*  
 Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión julio 2012

## ANEXO 4. CUESTIONARIO CLÍNICO.

**ESTUDIO POBLACIONAL DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE EN  
MURCIA**

Datos del paciente (pegatina)

Fecha cumplimentación:

Sexo: 2 M 1 V

fecha nacimiento : Edad diagnóstico: Crisis: 1 Si 0 No

Mutación 669\_698del: si no (especificar):

**ANTECEDENTES (PAI-M Y PAI-L).**

FUMADOR 1 Si 0 No 2 Si exfumador años:

Numero cigarros día: Edad inicio:

ALCOHOL 2 Si (cronico) 1 Si (finde semana) 0 No Cantidad: Edad inicio:

FÁRMACOS 1 Si 0 No (*fármacos potencialmente perjudiciales no desencadenantes de crisis*).

Tipo:

ACHO: Si No

THS: Si No

HTA: 1 Si (*en tratamiento*) 0 No

Edad del diagnóstico:

Control HTA: 1 Bien 2 regular 3 mal

Crisis hipertensivas: 1 Si 0 No

Número de crisis:

Número de fármacos para control: 1 2 3 &gt;3

DISLIPEMIA: 1 Si 0 No

Edad diagnóstico:

Hipercolesterolemia: 1 Si 0 No

Hipertrigliceridemia: 1 Si 0 No

DIABETES: 1 Si 0 No

Tipo 1 Tipo 2

Edad diagnóstico:

Insulina: 1 Si 0 No

CRISIS EPILÉPTICAS: 1 Si (*en ataques PAI*) 2 Si (*independiente de PAI*) 0 No

Tipo de epilepsia:

Número de crisis:

Tratamiento: si no

Número de fármacos para control: 1 2 3 >3

Fármacos crónicos usados antes no útiles:

Fármacos útiles:

ENFERMEDAD RENAL: 1Si 0No

Tipo enfermedad renal:

IRC: 1Si 0No

Diálisis: 1Si 0No

Edad diagnóstico:

Edad diálisis:

GINECOLÓGICO:

Numero Embarazos

Numero abortos

Trimestre abortos 1 2 3

Reproducción asistida 1Si 0No

Sd. HELLP 1Si 0No

Otras complicaciones embarazo (crisis,..):

Crisis epilépticas en embarazo 1Si 0No

ANTECEDENTES PSIQUIATRICOS: 1Si 0No

Depresión: 1 Si 2 Si en crisis 0No

Ansiedad: 1 Si 2 Si en crisis 0No

Alucinaciones: 1 Si 2 Si en crisis 0No

Brotos psicóticos: 1 Si 2 Si en crisis 0No

Numero de brotes psicóticos:

Edad de inicio antecedentes.

Edad inicio depresión

Edad inicio ansiedad

Edad inicio alucinaciones

Edad inicio brotes psicóticos

DEMENCIAS 1Si 0No

Tipo:

Edad de inicio:

ENFERMEDAD HEPÁTICA: 1Si 0No

Hipertransaminemia 1Si 0No

Cirrosis: 1Si 0No

Carcinoma hepatocelular: 1Si 0No

Edad diagnóstico:

Estadaje al diagnóstico:

BV Otro tipo:

OTRAS NEOPLASIAS 1Si 0No Tipo:

VIH1Si 0No

Tratamiento QT

Antirretroviral recibido: 1Si 0NoTipo (QT o antiretro):

### **BROTOS (PAI-M)**

*(Manifestaciones clínicas agudas con periodo de latencia intercalado, sin otra causa aparente y con niveles de precursores porfirínicos documentados y elevados)*

Número de brotes:

Edad del primer brote:

Edad del brote con mayor morbilidad:

Número de ingresos hospitalarios atribuidos a PAI:

Años desde el último brote:

### **SÍNTOMAS CRÓNICOS** *(PAI-M y PAI-L con cifras altas de ALA/PBG):*

Cansancio: 1Si 0No

Mialgias: 1Si 0No

Insomnio: 1Si 0No *(en ausencia de otras causas)*

Dolor abdominal/dispepsia 1Si dolor 2Si dispepsia 0No

Frecuencia (1 sem):

Hiperémesis gravídica: 1Si 0No

Incapacidad: 1: leve 2:grave 3: leve tras brote 4: grave tras brote

Polineuropatía 1Si 0No

Prox Distal

Axn Desm

Otros:







