

Excreción de porfirinas en individuos normales

M.^o L. Peña-Payero, R. Enríquez de Salamanca, A. Olmos, F. Romero y M.^o J. Montes

Instituto de Medicina Experimental del C.S.I.C.
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid-3

(Recibido el 1 de marzo de 1979)

M.^o L. PEÑA-PAYERO, R. ENRIQUEZ DE SALAMANCA, A. OLMOS, F. ROMERO and M.^o J. MONTES. *Porphyrin Excretion in Normal Subjects*. Rev. esp. Fisiol., 36, 13-20. 1980.

Porphyrin excretion in normal subjects was studied by solvent extraction procedures and by thin-layer chromatography of their methyl-esters.

The mean value of the urinary coproporphyrin fraction was significantly higher in males than in females. Taking age also into account this difference was not significant in subjects under 20 years of age. Within the same sex, age did not have any influence on this coproporphyrin fraction. Neither of these two factors, i.e. sex and age modified the mean values of uroporphyrin fraction. Males and females showed similar amounts of fecal copro and protoporphyrin fractions.

The thin-layer chromatographic urinary pattern revealed a minor porcentual value of octo-carboxylic-porphyrin in males, due mainly to a lower amount of porphyrin in the 20-40 year, period, when males also showed a decreased value of hepta-carboxylic-porphyrin. Neither sex nor age modified the fecal chromatographic porphyrin pattern. Di-carboxylic porphyrins were always predominant, but their appraisal was very frequently interfered by the presence in feces of fluorescent substances with a Rf similar to tri-carboxylic-porphyrin but with a pheophytinlike spectra.

Aunque la biosíntesis del HEM puede tener lugar en cualquier célula del organismo, son la médula ósea y el hígado los lugares donde la porfirinosíntesis es más activa. En circunstancias normales, y para reemplazar a la hemoglobina eritrocitaria se ha calculado una síntesis diaria de aproximadamente 300 mg de protoporfirina (23). El hígado aprovecha la porfirinosíntesis para la formación de enzimas hemoproteínicos que si bien son cuantitativamente poco importantes poseen en cambio un rápido turnover, por lo que

son necesarios una gran cantidad de intermediarios en esta vía metabólica. MEYER y SCHMID (27) han calculado que diariamente se sintetizan unos 100 mg de HEM hepático. El riñón también participa en la porfirinosíntesis, pero su contribución cuantitativa aún no ha sido establecida.

A lo largo de esta activa cadena biosintética del HEM fisiológicamente se producen modestas pérdidas de sus diversos escalones metabólicos. Precisamente el objetivo del presente trabajo ha residido en el estudio cuanti y cualitativo de la ex-

creción porfirínica en condiciones fisiológicas.

Material y métodos

Se ha analizado la excreción urinaria de porfirinas en 109 individuos normales, 50 varones y 59 mujeres, con edades comprendidas entre 5 y 80 años. La determinación de porfirinas fecales se realizó sobre un colectivo formado por 61 individuos normales, 30 varones y 31 mujeres, con edades comprendidas entre los 4 y los 84 años.

Los criterios de presunción de normalidad de estos individuos para ser incluidos en el presente estudio se basaron en la ausencia de datos clínicos sugerentes de enfermedad actual.

La excreción porfirínica cuantitativa fue determinada por los clásicos métodos de extracción y partición solvente de GAJDOS y GAJDOS-TÖRÖK (20) para la orina y de HOLTI *et al.* (24) para las heces. Tales métodos, basados en el distinto número clorhídrico de Wilstatter de las diversas porfirinas, determinan únicamente las denominadas fracciones uro, copro y protoporfirina, constituidas en realidad por mezclas de diferentes carboxil-porfirinas. Sus resultados quedaron expresados en μg de porfirinas/l de orina, debido a la poca fiabilidad de una exacta recogida de la orina de 24 horas por parte de estos individuos no hospitalizados. Las porfirinas fecales, fracciones copro y protoporfirina, se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de heces desecadas.

El reparto porcentual de las diversas carboxil-porfirinas urinarias y fecales fue analizado por cromatografía de sus metil-ésteres sobre capa fina de sílica-gel, según técnica de DOSS (6). Para el desarrollo de los cromatogramas se utilizó el sistema solvente propuesto por SEARS *et al.* (36): tetracloruro de carbono, diclorometano, propionato de etilo, acetato de etilo (2, 2, 1, 1). Los cromatogramas fueron sometidos a scanning fluorimétrico (5) y tras planimetrar las áreas registradas se calculó

el porcentaje correspondiente a cada carboxil-porfirina.

El test de la *t* de Student se aplicó para el análisis estadístico de las diferencias entre las medias de los grupos.

Resultados

En la tabla I quedan reflejados los valores medios de la excreción porfirínica cuantitativa, es decir, aquella determinada por métodos de extracción en fase solvente. La eliminación de la fracción coproporfirina (COPRO) urinaria fue estadísticamente superior en los varones. No se apreciaron, en cambio, modificaciones de las fracciones uroporfirina (URO) urinaria ni de la COPRO ni de la protoporfirina (PROTO) fecales por razón del sexo.

Los 109 individuos normales, cuyas orinas fueron analizadas, quedaron subdivididos en tres subgrupos según la edad y comparando sexos (tabla I). Ni en varones ni en mujeres se apreciaron diferencias significativas en razón de la edad para los valores medios de las fracciones COPRO y URO. Ambos sexos mostraron siempre cifras medias similares de URO. En cambio, la fracción COPRO urinaria fue significativamente mayor en los varones que en las mujeres en el subgrupo por encima de los 41 años y sobre todo en el subgrupo que representa la época hormonalmente más fértil de la vida, es decir entre los 20 y los 40 años.

Tras subdividir la excreción porfirínica fecal de los 61 individuos normales de ambos sexos en tres grupos, numéricamente similares, en razón de la edad, únicamente se apreció que la fracción COPRO de los más jóvenes ($7,6 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$) era discretamente inferior ($p < 0,05$) a la observada en los subgrupos de mayor edad ($11 \pm 6,08 \mu\text{g/g}$ y $11,4 \pm 5,99 \mu\text{g/g}$).

La figura 1 muestra el patrón cromatográfico de las porfirinas urinarias según sexos, apreciándose la menor excreción porcentual de porfirina octo-carboxílica

Tabla I. Excreción cuantitativa de las fracciones copro, uro y protoporfirina ($\bar{x} \pm D.S.$).

SEXO	O R I N A μg/l						H E C E S μg/g seco		
	< 20 años		21-40 años		> 40 años		COPRO	PROTO	
	URO	COPRO	URO	COPRO	URO	COPRO			
Varones n = 50	4,46 ± 3,98	61,83 ± 30,13	5,83 ± 3,67	60,31 ± 21,17	3,50 ± 3,32	64,67 ± 30,76	5,17 ± 4,91	9,73 ± 5,70	32,27 ± 20,41
Mujeres n = 59	3,59 ± 3,77	43,41 ± 19,95	3,82 ± 3,97	37,48 ± 15,33	4,04 ± 3,24	38,95 ± 21,04	2,84 ± 4,06	10,29 ± 5,62	28,42 ± 19,94
Ambosexos	3,99 ± 3,89	50 ± 26,51	4,65 ± 3,98	49,59 ± 21,86	3,75 ± 3,29	49,87 ± 27,56	3,74 ± 4,55	10,02 ± 5,67	30,31 ± 20,21
p	< 0,001	N.S*	N.S	< 0,001	N.S.	< 0,002	N.S	N.S	N.S

* N.S = no significativa.

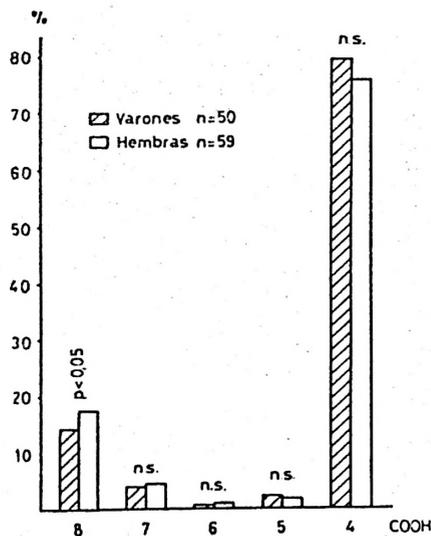


Fig. 1. Patrón cromatográfico porcentual de las porfirinas urinarias en individuos normales comparando sexos.

▨ varones (n = 50); □ hembras (n = 59) n. s. = diferencias no significativas.

(8-COOH) por parte de los varones. Las diferencias de dicho patrón según el sexo son debidas únicamente a las existentes en el periodo de edad comprendido entre los 20 y los 40 años (figura 2), época en la que los varones muestran además una menor excreción de porfirina hepta-carboxílica, con la lógica imagen especular de una mayor eliminación de porfirina tetra-carboxílica. Se ha observado una ausencia de diferencias significativas en el reparto porcentual medio de las diversas carboxil-porfirinas fecales por razón del sexo o de la edad (figura 3). Por este motivo el patrón cromatográfico fecal ha de ser considerado en el conjunto de los 61 individuos analizados (figura 4).

Discusión

En condiciones normales, la ruta de excreción de las diversas porfirinas viene

condicionada por el número de grupos carboxílicos libres presentes en las cadenas laterales de sus moléculas, ya que de este número depende la mayor o menor hidrosolubilidad. Así, la uroporfirina (octo-carboxílica) es muy hidrosoluble y es excretada casi exclusivamente por vía urinaria, mientras que la protoporfirina y demás porfirinas di-carboxílicas son excretadas por vía biliar (32, 35). La coproporfirina (tetra-carboxílica) es eliminada preferentemente por vía bilio-fecal, pero tanto ella como su porfirinógeno pueden ser excretadas también por vía renal (32, 35). En esta dualidad excretoria de la coproporfirina tendrá una influencia decisiva la integridad funcional tanto de hígado como de riñón (15, 41).

Existen marcadas diferencias entre los diversos autores al considerar la cuantía fisiológica de la excreción porfirínica urinaria y fecal. Ello es debido sin duda a diferencias metodológicas, y probablemente también raciales (8, 10, 30, 40).

El valor medio de la fracción COPRO en orina en el presente protocolo de 109 individuos normales fue de $50,15 \pm 24,96 \mu\text{g/l}$, cifra similar a la obtenida por MOORE *et al.* (28). Por tanto, el límite superior de la normalidad ($\bar{x} \pm 3 \text{ D.S.}$) queda establecido en $125 \mu\text{g/l}$. Confirmando los resultados obtenidos por diversos autores (25, 27, 42), y en oposición a los de SANCHÍS CERVERA *et al.* (34), se apreció una mayor tasa de coproporfirinuria en los varones respecto a las mujeres, sobre todo en el subgrupo de edad comprendido entre los 20 y los 40 años. Aparte de la presunta influencia de factores hormonales, es posible que esta diferencia haya de achacarse fundamentalmente a variaciones del peso corporal que, como demostraron STRAIT *et al.* (37) y GOLDBERG y RIMINGTON (21), influye directamente sobre la cuantía de la excreción de la COPRO urinaria. Así pues, ha de considerarse la coproporfirinuria fisiológica individualizada según el sexo, quedando por tanto el límite superior de la normalidad estableci-

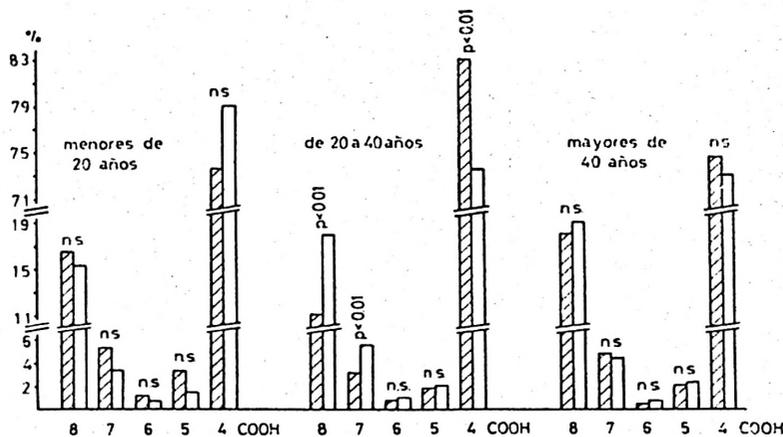


Fig. 2. Patrón cromatográfico porcentual de las porfirinas urinarias en individuos normales según sexos y edades.

[/] varones; □ hembras. n.s. = diferencias no significativas.

do en $140 \mu\text{g/l}$ para los varones y en $95 \mu\text{g/l}$ para las mujeres. No se observó en cambio diferencias en la tasa media de excreción de la fracción URO en razón del sexo ni edad. La cifra media global de esta fracción URO fue de $3,99 \pm 3,89 \mu\text{/l}$, y el límite superior de la normalidad de $15,66 \mu\text{g/l}$, valores similares a los de BRODIE *et al.* (1).

Si difícil es la recogida de muestras de orina de 24 horas, más aún lo es la obtención de la totalidad de las heces eliminadas en este mismo período de tiempo. Por ello, la mayoría de los autores expresan los datos de la porfirinorrea en μg de porfirinas eliminadas por gramo de heces desecadas, con lo que de este modo también se trata de evitar la influencia

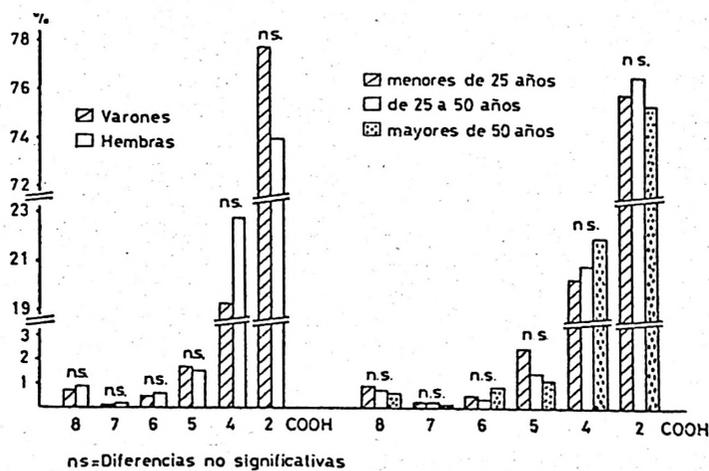


Fig. 3. Patrón cromatográfico porcentual de las porfirinas fecales en individuos normales según sexos y edades.

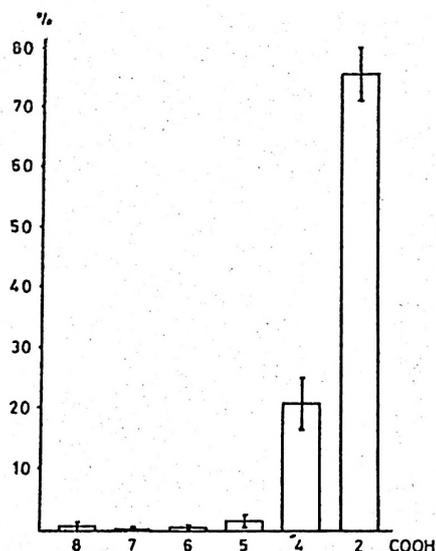


Fig. 4. Patrón cromatográfico porcentual de las porfirinas fecales en 61 individuos normales.

del distinto grado de hidratación de las heces. Esta pauta ha sido también seguida en el presente trabajo, en el que se establecen los límites superiores de la normalidad en $27 \mu\text{g/g}$ seco para la COPRO y $91 \mu\text{g/g}$ seco para la PROTO, valores bastantes similares a los obtenidos por EALES *et al.* (10) y por TADDEINI y WATSON (39).

La fracción PROTO es claramente predominante en las heces, pero es preciso reconocer que en las mismas existen derivados clorofílicos, pigmentos biliares, y porfirinas di-carboxílicas del tipo de las deuterio, meso, y pempto-porfirinas derivadas en gran parte de la descomposición bacteriana de la hemoglobina y de la mioglobina de la dieta o de hemorragia gastrointestinal. Como establecieron FRENCH y THONGER (19), en el meconio, donde no existe contaminación por dieta, bacterias, ni son probables las hemorragias gastrointestinales, la relación entre las fracciones PROTO/COPRO es, en oposición a la observada en las heces normales, y a

semejanza con la obtenida en la bilis, muy baja. Las porfirinas del meconio proceden de la excreción biliar, y son por tanto de origen puramente endógeno. Por ello, se puede deducir que la mayor parte de la fracción PROTO determinada en sujetos normales procede de fuentes no endógenas.

Pequeñas cantidades de porfirinas eter-insolubles pueden observarse en las heces normales (28, 33). En 13 individuos no porfíricos el valor medio de esta fracción eter-insoluble fue en la experiencia de los autores (14) de $9,5 \pm 11,9 \mu\text{g/g}$ seco.

Si bien la excreción fisiológica cuantitativa de las clásicas fracciones URO, COPRO y PROTO ha sido más o menos ampliamente estudiada, en cambio el patrón distributivo de las diversas carboxil-porfirinas tanto urinarias como fecales ha sido muy escasamente analizado. Diversos autores (2-4, 12, 23, 29, 31, 38, 42) han reconocido la presencia tanto en orina como en heces de porfirinas hepta, hexa, penta y tri-carboxílicas, además de las octo-carboxílica (uroporfirina), tetra-carboxílica (coproporfirina) y di-carboxílica (protoporfirina). Sin embargo, muy pocos autores aportan cifras medias del patrón porcentual urinario y fecal (7, 12, 22).

En la presente casuística de 109 casos el valor medio porcentual de la 8-COOH fue de 16 %, pero tal como se puede observar en la figura 1 existen diferencias significativas en sus valores medios por razón del sexo. Al subdividir este protocolo en tres grupos según la edad (figura 2) se observa que el reparto porcentual de las diversas carboxil-porfirinas urinarias sólo muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de las 7 y 8-COOH en el grupo de edad comprendido entre los 20 y los 40 años. KUSHNER *et al.* (26) observaron que la actividad eritrocitaria de la uroporfirínógeno-decarboxilasa, enzima que va decarboxilando las porfirinas octo-carboxílicas hasta transformarlas en tetra-carboxílicas, era inferior en las mujeres que en

los hombres, tanto en circunstancias normales como en casos de Porfiria Cutánea Tarda. Sin embargo, ni ELDER *et al.* (13) ni FELSHER *et al.* (18) han podido confirmar esta diferente actividad decarboxilativa entre ambos sexos.

Entre los 20 y los 40 años los varones presentaron un porcentaje medio de 8-COOH significativamente inferior al del grupo de menor edad y al de mayor edad. Las mujeres, en los tres grupos de edad considerados, presentaron porcentajes similares de 8-COOH y un discreto, pero significativo ($p < 0,02$), incremento en el valor medio de la 7-COOH desde la juventud hasta la época más fértil de la vida.

Al no apreciarse diferencias estadísticamente significativas por razón del sexo ni de la edad en el patrón cromatográfico de las porfirinas fecales (figura 3), se consideró el protocolo en su conjunto. Y así, (figura 4) se confirmó el marcado predominio de las porfirinas di-carboxílicas (75,9%), siendo la porfirina tetra-carboxílica el segundo mayor componente (21,01%). Se observaron también en las heces normales pequeñas cantidades de porfirinas octo (0,77%), hepta (0,07%), hexa (0,58%) y penta-carboxílicas (1,67 por ciento), mientras que las isocopro-porfirinas o porfirinas P de ELDER (11) sólo se detectaron ocasionalmente y en forma de mínimas trazas.

Quizás tenga razón ELDER (12) al no tener en cuenta las porfirinas fecales con menos de 4 grupos COOH, ya que sobre las manchas cromatográficas de las porfirinas di y tri-carboxílicas con frecuencia se depositan sustancias fluorescentes que pueden falsear los resultados. Efectivamente, en el presente trabajo se encontraron habitualmente en los cromatogramas fecales manchas fluorescentes bajo la luz Wood que emigraban con un Rf similar al de la porfirina tri-carboxílica y que, sin embargo, presentaban un aspecto de absorción similar al de las feofitinas (17). También EVANS *et al.* (16) encontraron esta falsa porfirina tri-carboxílica y espe-

cularon con la posibilidad de que se tratara de un éster de la mono-vinil-monoetil-deuteroporfirina, producto intermedio en la reducción por las bacterias intestinales de la protoporfirina a mesoporfirina.

Resumen

Por métodos de extracción y partición solvente y por cromatografía en capa fina de sus metil-ésteres se analizó la excreción porfirínica fisiológica humana.

La cifra media de la fracción coproporfirina urinaria fue en los varones analizados significativamente superior a la obtenida en el grupo de mujeres. Al tener en cuenta también la edad se evidenció que esta diferencia no era significativa en los menores de 20 años. Para un mismo sexo la edad no influyó en la tasa media de esta fracción coproporfirina. La fracción uroporfirina no se modificó ni en razón del sexo ni de la edad. Varones y mujeres mostraron cifras medias similares de las fracciones copro y protoporfirina fecales.

El análisis del patrón cromatográfico de la excreción porfirínica urinaria demostró un menor porcentaje de la porfirina octo-carboxílica en los varones, debido fundamentalmente a las menores tasas que de esta carboxil-porfirina mostró este sexo en el grupo de edad comprendido entre los 21 y los 40 años, período en el que estos mismos varones presentaron también una menor cuantía de hepta-carboxilporfirina. El reparto porcentual de las diversas carboxilporfirinas fecales no mostró variaciones respecto al sexo ni a la edad. Las porfirinas di-carboxílicas fueron siempre las predominantes, pero su valoración quedó muy frecuentemente interferida por la presencia en heces de sustancias fluorescentes con un Rf similar al de la porfirina tri-carboxílica pero con un espectro de absorción tipo feofitina.

Bibliografía

1. BRODIE, M. J., THOMPSON, G. G., MOORE, M. R., BEATTIE, A. D. y GOLDBERG, A.: *Quart. J. Med. N. S.*, 46, 2229-2241, 1977.
2. CATALÁN-BELTRÁN, M. T.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, 1978.
3. CONFORT, A., MOORE, H. y WESTHERALL, M.: *Biochem. J.*, 58, 177-183, 1954.

4. CHU, T. C. y CHU, J. H.: *Clin. Chem.*, **13**, 371-387, 1967.
5. DAY, R., E. DE SALAMANCA, R. y L. EALES: *Clin. Chim. Acta*, **89**, 25-33, 1978.
6. DOSS, M.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 207-297, 1970.
7. DOSS, M. y TIEPERMANN, R. V.: En «Diagnosis and Therapy of Porphyrins and Lead Intoxication» (M. DOSS, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1978, pp. 29-45.
8. EALES, L.: *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, **9**, 305-306, 1963.
9. EALES, L.: *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, **9**, 151-162, 1963.
10. EALES, L., LEVEY, V. J. y SWEENEY, G. D.: *S. Afr. Med. J.*, **40**, 63-71, 1966.
11. ELDER, G. H.: *Biochem. J.*, **126**, 877-891, 1972.
12. ELDER, G. H.: *Semin. Hematol.*, **14**, 227-242, 1977.
13. ELDER, G. H., LES, G. B. y TOVEY, J. A.: *N. Engl. J. Med.*, **299**, 274-278, 1978.
14. ENRÍQUEZ DE SALAMANCA, R., MAS, V. y CATALÁN, M. T.: *Arch. Fac. Med. Madrid*, **25**, 127-130, 1974.
15. ENRÍQUEZ DE SALAMANCA, R., ARNALICH FERNÁNDEZ, F. y ROMERO GARCÍA-ALIX, F.: *Rev. Clin. Esp.*, **155**, 7-11, 1979.
16. EVANS, N., JACKSON, A. H., MATLIN, S. A. y TOWILL, R.: *J. Chromatog.*, **125**, 345-355, 1976.
17. FALK, J. E.: En «Porphyrins and Metalloporphyrins» (K. M. SMITH, ed.). Elsevier, Amsterdam, 1975, pp. 872-889.
18. FELSHER, B. F., NORRIS, M. E. y SHIH, J. C.: *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1095-1098, 1978.
19. FRENCH, J. M. y THONGER, E.: *Clin. Sci.*, **31**, 337-351, 1966.
20. GAJDOS, A. y GAJDOS-TÖRÖK, M.: En «Porphyrines et porphyries». Masson, París, 1969, pp. 212-216.
21. GOLBERG, A., RIMINGTON, C.: En «Diseases of Porphyrin Metabolism». Thomas, Springfield, Ill. 1962.
22. GROSSER, Y. y EALES, L.: *S. Afr. Med. J.*, **47**, 2162-2168, 1973.
23. HERBERT, F. K.: *Clin. Chim. Acta*, **13**, 38-46, 1966.
24. HOLTI, C., RIMINGTON, C., TATE, B. C. y THOMAS, G.: *Quart. J. Med. N. S.*, **27**, 1-18, 1958.
25. HSIA, D. Y. y PAGE, M.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **85**, 86-88, 1954.
26. KUSHNER, J. P., BARBUTO, A. J., LEE, G. R.: *J. Clin. Invest.*, **58**, 1089-1097, 1976.
27. MEYER, U. A. y SCHMIDT: En «The Metabolic Basis of Inherited Disease» (J. B. STANBURY, J. B. WYNGAARDEN y D. S. FREDICKSON, eds.). Nueva York, 1978.
28. MOORE, M. R., THOMPSON, G. G. y GOLDBERG, A.: *Clin. Sci.*, **43**, 299-302, 1972.
29. NICHOLAS, R. E. H. y RIMINGTON, C.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1**, 12-19, 1949.
30. PEÑA-PAYERO, M. L.: Tesina. Facultad de Medicina, Madrid, 1979.
31. PIÑOL-AGUADÉ, J., HERRERO, C., ALMEIDA, J., SMITH, S. G. y BELCHER, R. V.: *Br. J. Dermatol.*, **93**, 277-290, 1975.
32. REESE, A. J. M. y RIMINGTON, C.: *Brit. J. Path.*, **45**, 30-38, 1964.
33. RIMINGTON, C., LOOCKWOOD, W. H. y BELCHER, R. V.: *Clin. Sci.*, **35**, 211-247, 1968.
34. SANCHÍS-CERVERA, J., LLAVADOR-SANCHÍS, J., CARMENA-RODRÍGUEZ, R. y ALIAGA-BONICHE, A.: *Med. Exp.*, **75**, 234-240, 1974.
35. SANO, S. y RIMINGTON, C.: *Biochem. J.*, **86**, 203-211, 1963.
36. SEARS, W. G., DAROCHA, T. y EALES, L.: *Enzyme*, **17**, 69-75, 1974.
37. STRAIT, L. A., BIERMAN, A. R., EDDY, B., HRENOFF, M. y EILER, J. J.: *J. Appl. Physiol.*, **9**, 699-707, 1952.
38. SWEENEY, G. D.: *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, **9**, 182-190, 1963.
39. TADDEINI, L. y WATSON, C. J.: *Semin. Hematol.*, **5**, 335-369, 1968.
40. WATSON, C. J., LYNCH, F., BOSSENMAIER, I. y CARDINAL, R.: *Arch. Derm.*, **98**, 451-468, 1968.
41. WATSON, C. J., SUTHERLAND, D. y HAWKINSON, U.: *J. Lab. Clin. Med.*, **37**, 8-28, 1951.
42. WITH, T. K.: *Dan. Med. Bull.*, **22**, 74-80, 1975.
43. ZIEVE, L., HILL, E., SCHWARTZ, S. y WATSON, C. J.: *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 663-669, 1953.