

Recibido: 25 de noviembre de 1986
Received: November 25th, 1986

Aceptado: 12 de enero de 1987
Accepted: January 12th, 1987

GUSTAVO MARTINEZ-ZEDILLO
PATRICIA REBOLLEDO-CAMACHO

Gustavo Martínez-Zedillo y Patricia Rebolledo-Camacho. Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México.

Solicitud de sobretiros (request for reprints): *Gustavo Martínez-Zedillo.* Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional, IMSS. Av. Cuauhtémoc No. 330, CP. 06725, México, D.F., México.

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA SEPARACION DE PORFIRINAS INTRAVESICULARES DEL METACESTODO DE TAENIA SOLIUM, CON TECNICAS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA Y ELECTROFORESIS

Martínez Zedillo Gustavo; Rebolledo Camacho Patricia
Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas, CMN, IMSS, Hospital de Oncología, Avenida Cuauhtémoc 330, 06725, México, D.F.

Resumen:

Derrien en 1927 describe la presencia de sustancias fluorescentes (protoporfirinas) en el líquido intraquistico del metacéstodo de *Taenia solium*, la literatura europea y soviética comunican su aplicación como un método práctico para el diagnóstico de la cisticercosis bovina y porcina. El presente trabajo describe y cuantifica por Espectrofotometría visible y fluorometría una mezcla de porfirinas (15 a 48 microgramos/por ml.), separadas por cromatografía en placa fina y electroforesis en acetato de celulosa, que revelan la presencia de 3 a 4 porfirinas con un máximo de 5 carboxilos libres, la demostración de esta singular porfirina requiere de un sistemático estudio de las vías biosintéticas y de su función biológica en el parásito, del papel patogénico en la relación huésped-parásito (encefalitis, retinitis, vasculitis, miositis); su cuantificación en líquidos orgánicos representa una potencial ayuda diagnóstica, y su capacidad fotoexcitable con radioisótopos y energía radiante podría ser aplicada para una selectiva destrucción del parásito.

significado biológico de la separación de porfirinas intravesiculares del metacestodo de *Taenia solium* con técnicas de cromatografía en capa fina y electroforesis

biological significance of the separation of intravesicular porphyrins of the metacestode of *Taenia solium* with fine coat chromatography techniques and electrophoresis

Abstract:

In 1927 Derrien described a fluorescent substance (protoporphyrines) in the intracystic fluid of metacestode of *Taenia Solium*. European and Soviet literature refer this as a practical method for diagnosing bovine and porcine cysticercosis. This paper describes visible spectrophotometric and fluorimetric quantification of a mixture of porphyrines (15 to 48 micrograms per ml) separated by fine coat chromatography and cellulose acetate electrophoresis. Three to four porphyrines, with a maximum of five free carboxyls are revealed. The demonstration of this unusual porphyria calls for a systematic study of the biosynthetic pathways and biological function of the parasite, as well as the pathogenic role in the host-parasite relation ship (encephalitis, retinitis, vasculitis, myositis). Porphyrine quantification in organic fluids represents a diagnostic aid; its photoexcitability to radioactive isotopes and radiant energy could be applied for selective destruction of the parasite.

DERRIEN en 1927,^{1,2} al estimular con luz ultravioleta cisticercos de *Taenia Solium* describe la fluorescencia roja del líquido intravesicular, la extracción con éter acidulado (ácido acético) y piridina le permitieron suponer la existencia de porfirinas. Este hallazgo planteó la posibilidad de que los pigmentos podrían ser productos de autólisis de músculos. La fluorescencia también fue demostrada en larvas del céstodo *Tetra thyridium* y en el contenido pleural de un puerco espín parasitado. Koller^{3,4} en 1942, observó que sólo los cisticercos vivos presentan fluorescencia y que el tejido circundante (muscular, cerebral, adiposo y óseo) no guarda ninguna relación con la intensidad emitida. Krisilov⁵ en 1950 y Von M. Leerche⁶ en 1958 inspeccionan la carne de bovinos con luz ultravioleta y reportan un mayor porcentaje de cisticercos, comparado con la exploración visual, hecho que confirman Marazza (1960-61),^{7,8} el Afifi (1963),⁹ Swatan (1963),¹⁰ Pirkil¹¹ y J.G. Franssen¹² 1964 señalando que el procedimiento podría ser útil en los rastros como método rutinario de detección. Shekhovtson,^{13,14,15,16} Kaudela,¹⁷ RUD,^{18,19} Kozakiewicz (1974),²⁰ Myakov,²¹ han preconizado el método fluorescente para diagnóstico "Post mortem". El Dr. Mazzoti²² en México añade nuevas experiencias e indica que *Cysticercus pisiformis* y *C. tenuicollis* no presenta fluorescencia, comprobando la especificidad para *C. cellulosa* y *C. bovis*. Estudios preliminares de la composición bioquímica del líquido intraquistico de *C. cellulosa* por Cañedo²³ en 1982 no mencionan la fluorescencia. Martínez Zedillo^{24,25,26} en 1983 ratifica la presencia de diversas porfirinas con diferentes polaridades y afinidad por lipoproteínas.

El presente estudio tiene por objeto identificar el número y la estructura de las porfirinas contenidas en el líquido intravesicular del metacéstodo de *Taenia solium*, utilizando técnicas de electroforesis, cromatografía y espectrometría (ultravioleta-visible y fluorometría).

Material y métodos

Obtención y conservación del líquido intravesicular

La carne parasitada proveniente de cerdos masivamente infectados con *Cysticercus cellulosa*, se obtuvo de los rastros de Naucalpan y Ferrería, las larvas

se seleccionaron de acuerdo al tamaño y color de las vesículas. Para obtener directamente el líquido (por aspiración) se utilizaron jeringas de insulina y agujas calibre 21 ó 22, aprovechando la posición fija de los parásitos en la aponeurosis o en la masa muscular. El material obtenido clasificado de acuerdo al tipo de tejido (músculo, cerebro, corazón y lengua) se transportó al laboratorio en frascos ámbar con tapón hermético y a 4°C se procesó en un liofilizador labconco y/o congeló a -20°C para análisis posteriores. La descongelación de las muestras del líquido intravesicular, permitió una separación inicial de los pigmentos de la estructura del hielo y alícuotas de esta solución concentrada, se aplicaron a los procedimientos de separación por cromatografía y electroforesis de zona.

Caracterización y cuantificación de porfirinas

El análisis espectral con luz ultravioleta del líquido intravesicular se realizó en soluciones acuosas o acidificadas con ácido acético al 99.8 por ciento y destilado, diluido a diferentes concentraciones molares y en HCL 3 N, solubilizando con detergentes (catiónicos, aniónicos y neutros) o extrayendo con solventes orgánicos destilados: éter etílico, acetato de etilo y cloroformo. Para el análisis espectrofotométrico, se emplearon celdas de cuarzo con 1 cm. de paso de luz y 3 ml., espectrofotómetro digital UV-visible Pye Unicam modelo SP8-100 y Aminco Chance de doble rayo modelo DW2. En las mediciones fluorométricas se usó un Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer MPF - 3 K con un termómetro Krejo modelo WK5 y registrador adaptado, Espectrofluorómetro Aminco Chance tipo clínico y un Aminco Bowman J4-8960 de American Instruments Co.

Análisis y separación de porfirinas en cromatografía en capa fina.

La aplicación de las muestras (líquido intravesicular y soluciones de referencia) requirió una microjeringa Hamilton, colocando de 5 - 90 microlitros a 2.5 cm. del borde inferior de la cromatoplaque de sílica Merck del GOF 254 de 20 × 20 con espesos de capa de 0.25 mm., cámaras de vidrio contapa hermética de 30 × 30 cm. y forradas con papel filtro Whatman No. 1 para asegurar la saturación, los solventes permanecieron 24 Hrs. dentro de la cámara. La separación de porfirinas por los diferentes métodos empleó de 45 min a 2 Hrs.

- A) Método de Doss²⁷ para porfirinas esterificadas: benceno, acetato de etilo y metanol 85/13/2 V/V/V. Para la esterificación de las muestras liofilizadas se empleó ácido sulfúrico y metanol (1/20), diluyendo los esteres en cloroformo.
- B) Método acetato de etilo-acético. 4/1. V.V.
- C) Método Ellkfold²⁸ para cromatografía de porfirinas libres (no esterificadas) Benceno/metano/ácido acético 8.5/1.5/0.3 M.

Las soluciones de referencia (protoporfirina IX y coproporfirina I) se diluyeron en ácido acético y el fluido vesicular se aplicó directamente o después de una extracción con acetato de etilo y ácido acético en relación 4 a 1.

- D) Método Friedman²⁹ para cromatografía de porfirinas libres: N, N dimetilformamida, metanol, etilenglicol, ácido acético glacial, clorobutano y cloroformo 4/35/6/0.4/18/20 V/V. La muestra de referencia conteniendo 2,4,5,6,7 y 8 grupos carboxílicos fue obtenida de Porphyrin products (Logan, Utah) se disolvió en 0.5 ml de amortiguador de barbituratos pH 6.8 (Beckman) para obtener una concentración final de 20 nm/ml, se aplicaron de 10 - 30 microlitros de muestra y la evaporación del solvente se favoreció con un secador de aire caliente, para el líquido intravesicular total fueron necesarios de 10 a 40 microlitros y 90 microlitros de extracto etéreo. La fluorescencia se visualizó en cuarto oscuro con la ayuda de lámparas manuales de luz ultravioleta (Camag, lámpara universal UV) determinando el tamaño, la separación y características de color, la exposición continua por más de 5 min favorece la fotólisis progresiva de las diferentes bandas fluorescentes, la conservación de las placas en cámara de congelación y en atmósfera libre de oxígeno, evita o minimiza el efecto de descomposición de porfirinas.

La separación de porfirinas por electroforesis de zona³⁰ utilizó membranas de acetato de celulosa, amortiguador barbituratos pH 8.6, fuente de poder Beckman Duostat, 4,5 miliamperios (250 V) por 15 ó 20 minutos y cámara Beckman modelo R-101, la identificación de los componentes se realizó en cuarto oscuro con lámpara manual de luz UV, determinando el número de bandas, color y forma.

Efecto del pH sobre la fluorescencia del líquido intravesicular.

2 ml. del líquido intravesicular se aplicaron con una jeringa, en el extremo superior de una columna de Sephadex G25 (estabilizada durante 48 Hrs. a temperatura ambiente) y se eluyó con amortiguador tris, las fracciones de 3 ml (del No. 19 al 25) obtenidas con un colector de fracciones Ultrac 7000 (2l ml) se separaron en tubos, para ajustarlos a los valores de pH de 4,5,6,7,8,9 y 10 con soluciones 0.001 N de NaOH y HCL. La fluorescencia con excitación a 416 nm y emisión 628 fue determinada y corregida a un volumen constante con el amortiguador de elución. En la prueba se empleó un potenciómetro digital automático Beckman modelo 3550 con microelectrodo de combinación.

Alteraciones fotoquímicas del líquido intravesicular.

Una solución de líquido intraquístico en HCl 3 N (aproximadamente 0.3 microgramos por ml, se excitó por 15 min a 406 nm y se registraron las alteraciones en el número de bandas, intensidad o desplazamiento.

Procedimiento y equipo para la fotografía de porfirinas.

La técnica fotográfica para la detección de la fluorescencia a cromatoplasmas, membranas y tubos de ensayo se realizó en cuarto oscuro empleando filtro amarillo 0G1, aparato Reprovit Ila. cámara Leica con película agfa color y doble lámpara Desa Uvis (longitud de onda de 366 nm), el tiempo de exposición fue de 1 a 2 minutos.

Determinación de ácido delta aminolevulínico (Delta ALA)

Se empleó el método de Granick³¹ con resinas de intercambio catiónico Ag 50 WX2 y resinas de intercambio aniónico AG IX 2 de 200 a 400 mesh de Biorad, reactivo de Erlich modificado, acetato de sodio 1 M amortiguador de ácido acético - acetato de sodio 1 m pH 4.7, acetyl acetona y solución patrón de ácido delta ALA).

Las columnas preparadas en jeringas desechables de 10 ml. con algodón de vidrio y 1.5 gr de resina, se lavan con 10 ml de agua destilada y se ordenan acopladas en secuencia, colocando en primer término la aniónica. La muestra se coloca en la primera colum-

na, se lava 4 veces con 10 ml de agua destilada y finalmente se eluye con 5 ml de acetato de sodio 1 M. El eluido colectado se reacciona con 0.2 ml de acetil acetona y ajustado hasta un volumen final de 10 ml con amortiguador pH 4.7, se calienta en agua hirviendo por 10 minutos y se enfría a temperatura ambiente, 2 ml de esta mezcla se añaden a 2 ml de reactivo de Erlich modificado, cuantificando la aparición del cromogeno a 553 nm.

Resultados

El cuadro (1) resume los resultados de la absorción en el espectro visible de porfirinas de referencia en soluciones ácidas y detergentes, se destaca la banda de Soret (400-408 nm) clásica de porfirinas y se observa que la protoporfirina IX incorporada a las micelas del detergente catiónico CTAB conserva las bandas características de imágenes que no se reproducen cuando el compuesto se solubiliza en detergentes neutros y aniónicos. Los valores de las concentraciones fueron calculados de acuerdo con el procedi-

miento de Rimington.³² El perfil espectral del líquido intravascular diluido en HCl 3N reveló un perfil con un máximo a 408 nm y bandas accesorias entre 500 a 620 nm que configuran un espectro tipo aetio (fig. 1). El material fluorescente del cisticercos incorporado en detergentes aniónicos (lauril sulfato), así como catiónicos (CTAB) y neutros (Tritón x 100 y deoxicolato de sodio) presentan una imagen espectral semejante, con máximos de absorción a 416; 418 nm.

La figura 3 ilustra la curva de concentración de proto-IX en HCl 3 N analizada a la longitud de onda de 408 nm.

El cuadro 2 resume los resultados de diferentes concentraciones y solventes, destaca la persistencia de la banda Soret en solución acuosa y detergentes entre 416-418 nm y un efecto hipsocrómico a 406-408 nm en soluciones ácidas. Espectros de compuestos fluorescentes del cascarón de huevo y glándula de Harder, extraídos en acetato de etilo -ácido acético (4/1) se incluyen con el objeto de compararlos y utilizarlos como referencias biológicas.

Cuadro No. 1

MAXIMOS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA VISIBLE DE PORFIRINAS DE REFERENCIA EN SOLUCIONES ACIDAS Y DETERGENTES

Solución	Patrón	Solvente	Concentración*	
			Microgramos	Máximos de absorción en NM
			Por ML.	
Protoporfirina	IX	HCl 3N	4.0	600 556 408
Protoporfirina	IX	Ac. acético (99.8%)	0.68	586 550 406
Coproporfirina	I	Ac. acético (99.8%)	1.18	588 548 400
Copro y protoporfirina		Ac. acético destilado	0.31	500 560 400
Protoporfirina	IX	C T A B	1.76	632 578 540 504 398 280 236
Protoporfirina	IX	Deoxicolato de sodio	1.76	Perfil con meseta de 340 a 480
Protoporfirina	IX	Tritón X 100	1.76	Perfil con meseta de 340 a 480
Protoporfirina	IX	Lauril sulfato	1.76	Perfil con meseta de 360 a 480

* Valores calculados de acuerdo al procedimiento de Rimington (26)

$$\text{Porfirina (microgramos por ml)} = \frac{2 D_{\text{max}} - (D_{430} + D_{380})}{K}$$

** Promedio de K_c de uro, copro- y protoporfirinas.

K_{coproporfirinas} = 1.835

K_{protoporfirinas} = 1.668

**K_{líquido intraquístico} = 1.782

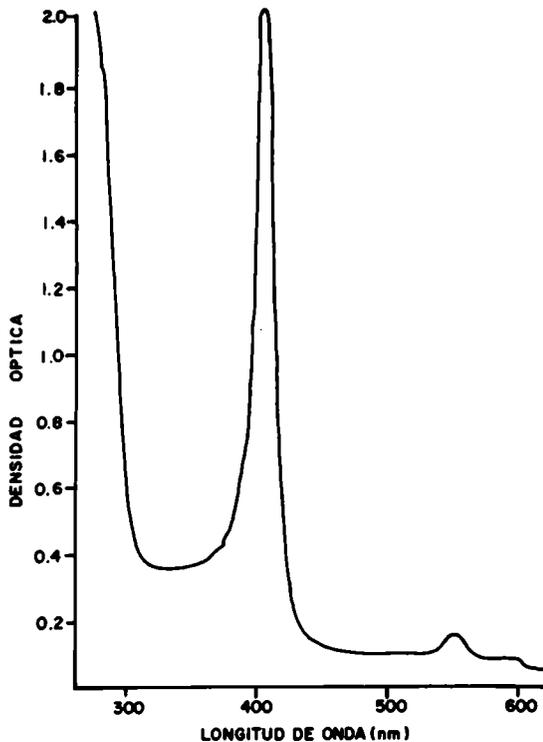


Figura 1. Perfil del espectro visible de líquido intravesicular (9.32 microgramos por ML) diluido a 5 en HCl 3N banda de Soret a 408 nm

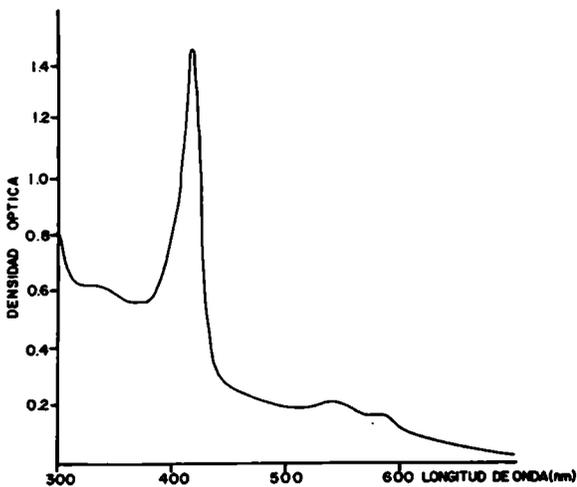


Figura 2. Perfil del espectro visible de líquido intravesicular (5.3 microgramos por ML) solubilizado en lauril sulfato 0.1 M amortiguado en tris 100 mM pH 7.4 banda de Soret a 418 nm.

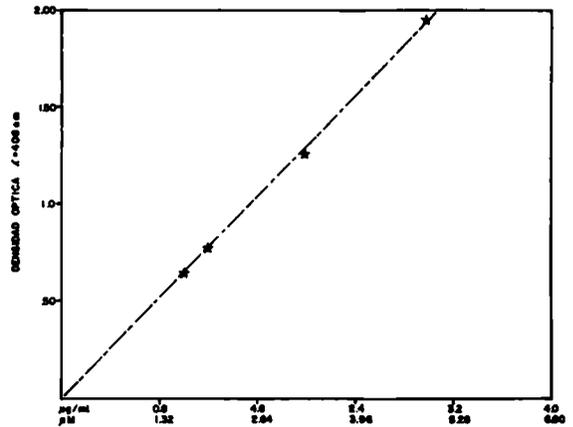


Figura 3. Curva de concentración de protoporfirina IX en HCl 3N expresada en microgramos por ML y micromolas, utilizando la banda de Soret a 408 nm.

En el cuadro 3 se describen las bandas de excitación y emisión del líquido intravesicular en diferentes solventes, se repite el comportamiento hipsocrómico (402-405 nm) en solventes ácidos (acetato de etilo, ácido clorhídrico y butanol). Es importante señalar que en la solución amortiguadora las bandas de emisión a 588 y 628 nm aparecen sin modificación en varios experimentos. En el cuadro 4 se indican las bandas de excitación y emisión de Proto-IX en HCl 3N y CTAB, destacando la presencia de dobles bandas de excitación y emisión para la solución ácida y una banda para el detergente.

La figura 4 describe la curva de concentración de Proto-IX en HCl 3N cuantificada por técnica fluorométrica excitando a 406 nm graficando las bandas de emisión a 610 - 667 nm.

En la figura 5 se muestra el perfil de excitación y emisión de una solución de líquido intravesicular en amortiguador Tris 20 mM pH 7.4 en la que aparece una sola banda de excitación a 416 nm, y dos de emisión a 588 y 628 nm.

La figura 6 analiza el efecto del pH sobre la intensidad de emisión (628 nm) del líquido intraquístico, excitando a 416 nm, se observa que a pHs alcalinos se incrementa la fluorescencia 60 - 80% en comparación con las soluciones ácidas.

En la figura 7 el líquido intravesicular en HCl 3N excitado a 406 nm durante 15 min. no modifica la intensidad y máximos de emisión a 608 - 664 nm.

CUADRO No. 2

MAXIMOS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA VISIBLE DEL LIQUIDO INTRAQUISTICO

Solvente	Dilución	Concentración* Microgramos/ML	Máximos de absorción
1. Agua	1/5	9.76	620 580 540 500 416 220
2. Agua	1/5	0.46	620 580 540 500 416 220
3. HCl 3N	1/5	9.32	596 552 408
4. HCl 3N	1/20	10.40	580 550 406
5. Deoxicolato Na	1/5	5.68	580 540 500 416 328
6. Tritón × 100	1/5	5.28	584 542 500 416 328
7. Lauril sulfato	1/5	5.33	620 584 540 500 418 328
8. C T A B	1/5	5.33	584 544 500 416 328
9. Ac. acético (99.8%)	1/10	3.82	632 576 540 508 406
10. Ac. acético (99.8%)	1/5	5.21	630 580 540 500 402

2. Líquido intraquístico con cambios de coloración (amarillo); preparación almacenada a 4°C.

9 y 10. Extractos en acetato de etilo-ácido acético 4 a 1 de Glándula de Harder y cascarón de huevo

* Cuantificación de acuerdo al procedimiento de Rimington

CUADRO No. 3

BANDAS DE EXCITACION - EMISION DE LIQUIDO
INTRAVESICULAR (9.32 MICROGRAMOS POR ML) EN
DIFERENTES SOLVENTES

	Excitación (nm)	Emisión	(nm)
Acetato de etilo	402	628	692
Buffer 20 m0sm Tris pH 7.4	416	588	628
n - butanol	405	608	658
HCl 3N	405	608	664

CUADRO No. 4

BANDAS DE EXCITACION Y EMISION DE
 PROTOPORFIRINA IX EN HCl 3N Y CTAB (5.6
 MICROGRAMOS POR MILILITRO)

	Excitación (nm)		Emisión (nm)	
HCl 3N	406	426	610	667
CTAB	410		679	

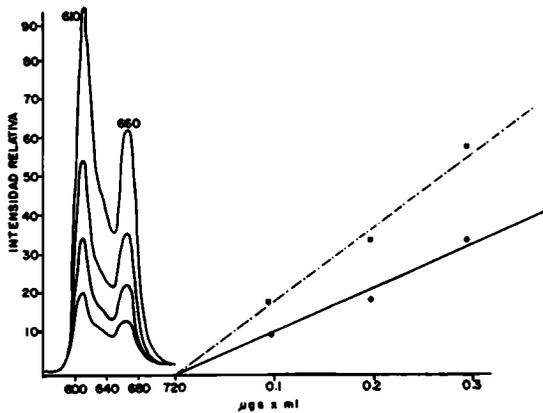


Figura 4. Espectro de emisión de protoporfirina IX en solución de HCl 3N y la curva de concentración a dos longitudes de onda de emisión 610 y 667 nm excitado a 406

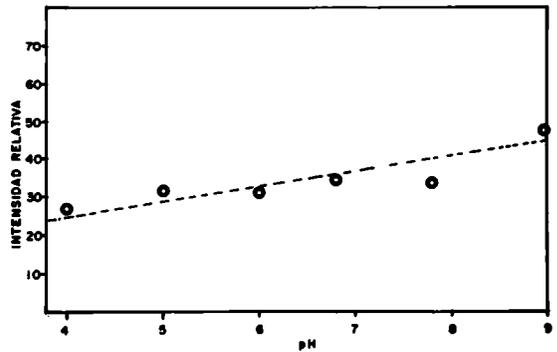


Figura 6. Efecto del pH en la banda de emisión del líquido intravesicular

Fraciones de líquido equivalentes a 0.32 microgramos por mililitro de porfirina, se ajustaron al pH indicado con NaCl y HCl 0.001 N en un potenciómetro automático digital Beckman con microelectrodo

Banda de excitación a 416 nm y de emisión a 628 nm

En la figura 8 la separación de porfirinas esterificadas en cromatografía en capa fina por el método de Doss señaló que la Proto-IX utilizada como estándar, se fracciona en 5 bandas fluorescentes, del líquido intraquístico se separan 4 bandas.

El procedimiento cromatográfico más simple no ilustrado en el presente trabajo utilizando acetato de etilo-ácido acético confirmó que Proto-IX está formada por la mezcla de cuando menos 3 componentes y que la Copro-I presenta dos bandas fluorescentes. El líquido intraquístico presenta (3-4) bandas.

El método Ellkford, fig. 9 repitió los resultados anteriores para la Proto-IX 3 bandas que indican la pre-

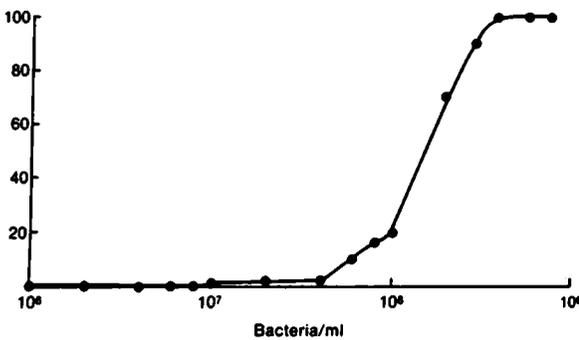


Figura 5. Espectro de excitación (416 nm) y emisión (588-628 nm) de una solución de líquido intravesicular (9.2 microgramos de porfirina por ML) en amortiguador tris 20 nM y pH 7.4.

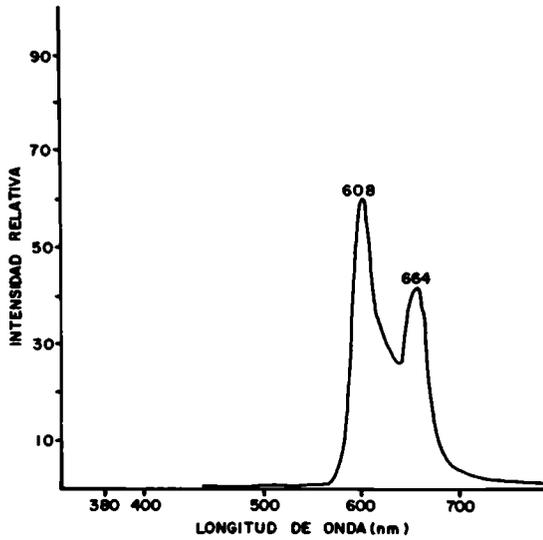


Figura 7. Espectro de emisión (608 - 664 nm) de una solución de líquido intravesicular (9.32 microgramos de porfirina por mililitro) en HCl 3N excitando a 406 nm durante quince minutos

Los espectros del tiempo cero y quince minutos se superponen

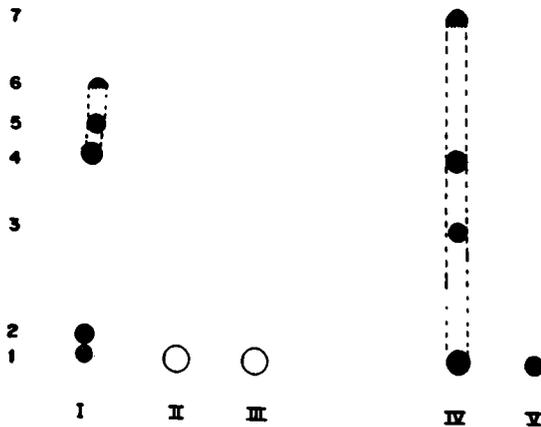


Figura 8. Separación cromatográfica preparativa de porfirinas esterificadas (Método Doss)

Números romanos indican diferentes soluciones aplicadas
 Números arábigos señalan el número de bandas fluorescentes identificadas por exposición a luz ultravioleta 366 nm.

- I. Protoporfirina IX esterificada en cloroformo
- II, III. Coproporfirina I esterificada
- IV. Fracción clorofórmica del líquido intravesicular
- V. Fracción acuosa del líquido intravesicular

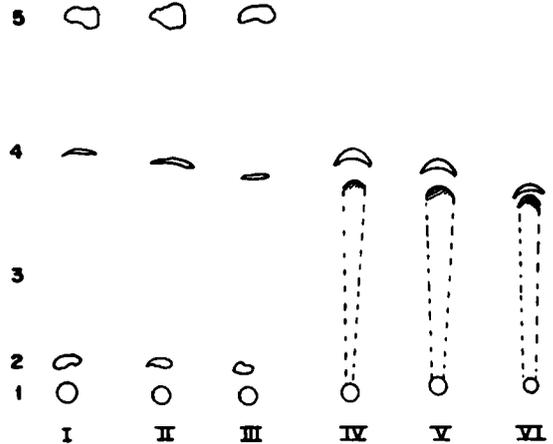


Figura 9. Separación cromatográfica de porfirinas con carboxilos libres (Método Ellkfold)

- I, II, III. 40, 60, 80 microlitros de líquido intravesicular en Acetato de Etilo - Acido acético.
- IV, V, VI. 10, 20, 30 microlitros de Protoporfirina IX en Acido Acético 1.6 microgramos/ml.

sencia de porfirinas contaminantes. El líquido intravesicular obtenido de diferentes animales presenta 4 bandas fluorescentes.

Finalmente, el método Friedman (figura 10) fracciona la solución de referencia (2,4,5,6 y 8 grupos carboxílicos) en bandas de acuerdo a la polaridad de los compuestos. El líquido intravesicular presenta 3 componentes fluorescentes con un comportamiento cromatográfico, que corresponde a porfirinas inmovilmente con 2 y 4 carboxilos y una banda inmóvil en el punto de aplicación. El análisis electroforético del líquido intraquistico concentrado (6-8 microlitros) comparado con la solución de porfirinas con grupos carboxílicos libres en acetato de celulosa, (fig. 11) reveló en repetidas ocasiones la presencia de 3-5 bandas fluorescentes, 2 de las cuales migran a velocidades similares a las fracciones del sistema de referencia, otra banda migra hacia el ánodo y una cuarta fracción no se corresponde a ninguna.

El cuadro 5 compara las concentraciones totales de porfirinas identificadas en el líquido intravesicular (15 - 48 microgramos por ml) en coproporfirinas urinarías (40-200 mg/ml) y protoporfirinas de glóbulos rojos humanos (0.25-0.50 mg/ml) y de cerdo, comunicadas en la literatura, además se incluye la con-

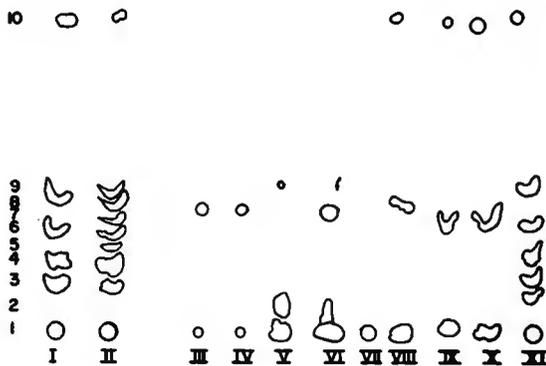


Figura 10. Separación cromatográfica de porfirinas libres (método Friedman)

- I, II, XI. Soluciones de referencia (Porfirinas: 2, 4, 5, 6, 7, 8. Carboxilos libres) Se aplicaron 20 nanomolas/ml; 10, 20, 30 microlitros.
- III, IV. Fracción soluble del líquido intravesicular en éter acidulado.
- V, VI. Fracción insoluble del éter acidulado 20, 30 microlitros del líquido intravesicular.
- VII, VIII, IX, X. Aplicación directa de 10, 20, 30, 40 microlitros del líquido intravesicular.

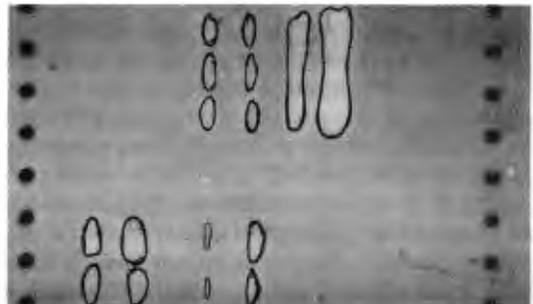


Figura 11. Análisis por electroforesis de zona en membrana de acetato de celulosa de porfirinas del líquido intravesicular.

La sección superior correspondiente a la separación de la muestra comercial por triplicado (4 microlitros)

La sección inferior representa la distribución de 6 microlitros del líquido intravesicular concentrado, la banda cero indica el punto de aplicación de las muestras, 1, 2, 3, 4 y 5 fracciones porfirínicas de diferentes polaridades.

Nota. La muestra de referencia contiene 2, 4, 5, 6, 7, 8 grupos carboxílicos Porphyrin Products (Logan, Utah.)

centración de delta ALA en el líquido (1.18 mg/ml) intraquístico, resultado del promedio de 3 determinaciones.

CUADRO No. 5

VALORES NORMALES (MICROGRAMOS POR ML) DE PORFIRINAS Y AC. DELTA ALA EN LIQUIDOS ORGANICOS COMPARADOS CON LAS CONCENTRACIONES CUANTIFICADAS EN EL LIQUIDO INTRAQUISTICO (L.I.Q.) DE *CYSTICERCUS CELLULOSAE*^{31,33}

Protoporfirina		en orina humana	Totales en	Ala en orina	Ac. Delta
Protoporfirina IX en glóbulos Rojos humanos	Protoporfirina IX en glóbulos Rojos porcinos	Coproporfirina en orina humana	Porfirinas Totales en L.I.Q.	Ac. Delta ALA en orina	Ac. Delta ALA en L.I.Q.
0.25 - 0.50	1.18	40 - 200	15 - 48	Hasta 7	1.33 -2.31

Discusión

Derrien en 1927, describe la presencia de compuestos fluorescentes en larvas de céstodos, compatibles con sustancias de naturaleza porfirínica, desde esta época no se han realizado estudios bioquímicos para carac-

terizar la estructura molecular de estos compuestos, sin embargo diferentes autores han insistido en su utilidad como método diagnóstico en la práctica veterinaria (6-22). No existen referencias de su empleo para la localización topográfica durante intervenciones quirúrgicas en Neurocisticercosis humana.

La presencia de estas moléculas sugieren numerosas

preguntas: ¿Son realmente porfirinas?; ¿Qué estructura y cantidad representan?; ¿Están unidas covalente o electrostáticamente a macromoléculas?; ¿Son compuestos sintetizados por el parásito?; ¿Son productos de degradación de hemoglobina, mioglobina o citocromos del huésped?; ¿Son almacenados y obtenidos de las porfirinas circulantes?; ¿Son productos de secreción?; ¿Qué papel desempeñan en el proceso patogénico?; ¿Participan en la formación de los compuestos calcáreos del tegumento?; ¿Contribuyen a la calcificación del parásito?

El presente trabajo contesta parcialmente las dos primeras preguntas, de acuerdo a los datos espectrofotométricos, la banda de Soret representa una señal característica del grupo tetrapirrol, debida a la deslocalización y transición de electrones alrededor de 400 nm y bandas accesorias alfa y beta entre 500 y 600 nm.^{33,34} El espectro de absorción del líquido intravesicular señala una banda de Soret entre 416 - 418 nm y bandas adicionales a 540, 620 y 680 nm que se desplazan a valores de 406 - 408 nm y 553 - 596 nm en soluciones ácidas, condiciones que propician la separación de metales incluidos en los anillos tetrapirrólicos.³³ La elevada concentración de Zn^{++} en el líquido intravesicular (95 microgramos por ml),³⁵ y la presencia de metaloenzimas dependientes de este metal: creatinocinasa (5434 U/L) y deshidrogenasa láctica (2342 U/L) identificadas en el líquido del cisticercos,³⁵ favorecen la existencia de porfirinas asociadas a Zn^{++} , la fluorescencia anaranjada observada en cromatoplasmas, descrita como color peculiar de estos compuestos, difiere del rojo reportado para porfirinas libres y esterificadas,³⁶ las bandas de emisión del complejo porfirínico, presenta además, máximos de emisión a 588 nm reportado por diversos autores como características de las porfirinas asociadas a Zn^{++} ,^{37,38,40} la estabilidad de los compuestos fluorescentes del líquido intravesicular después de la fotoestimulación por 15 min. con longitudes de excitación de 306 nm corresponde a la descrita para la estabilidad de complejos (Zn^{++} porfirinas). Concentraciones elevadas del calcio (35 mg/100) y cantidades mínimas de hierro (2 microgramos por ml), han sido comunicadas en reciente trabajo.³⁵ La asociación de porfirinas con metales como: calcio, cobre, hierro y cobalto, forman complejos no fluorescentes. Se han descrito otras características para el complejo porfirina- Zn^{++} : débil eficiencia fotosensible,³⁷ capacidad de unirse al oxígeno y de generar oxígeno singulete,³⁹ baja afinidad por la hemooxige-

nasa, hecho que podría explicar la ausencia de bilirrubina directa y la insignificante concentración de bilirrubina indirecta (0.04 mg/100) analizada en el líquido intravesicular.³⁵

Con respecto a la cantidad total de porfirinas- Zn^{++} identificadas (15-48-microgramos por ml.),³⁸ las variaciones podrían interpretarse de acuerdo a la diferente edad, tamaño y localización tisular de los cisticercos, (no se determinó el contenido total y estructura de porfirinas ni la capacidad de biosíntesis para cada cisticercos).

Los métodos cromatográficos y electroforéticos, demostraron que las porfirinas solicitadas de laboratorios comerciales, representan una mezcla de compuestos porfirínicos, además se identificaron en el líquido intravesicular 3 a 5 porfirinas probablemente con 2, 4 y 5 carboxilos libres y en las condiciones experimentales no se detectaron porfirinas de 6, 7 y 8 carboxilos; la identificación del ácido delta amino levulínico ALA- en cantidades apreciables (1.3 - 3.2 microgramos por ml) sugiere que el parásito sintetiza tetrapirroles, hallazgo que requiere la demostración de las vías enzimáticas⁴¹ para explicar la acumulación de compuestos con menos de 5 carboxilos que aclaren esta singular porfiria. Los procesos inmunológicos involucrados en la interfase huésped-parásito, han sido motivo de gran interés en el estudio de los procesos inflamatorios^{42,48} de la cisticercosis porcina y humana, sin embargo el aislamiento y caracterización de las porfirinas del cisticercos sugieren, la participación de estas moléculas en el proceso inflamatorio, la secreción y difusión pasiva "in vivo" o la liberación de las porfirinas después de la muerte de los parásitos o durante intervenciones quirúrgicas, podrían aclarar la sugestión propuesta por Tretiskoff desde 1924⁴⁹ de que los cisticercos liberan sustancias o toxinas que expliquen la encefalitis, meningitis, vasculitis, ventriculitis y lesiones a distancia alejadas del foco cisticercosico;⁵⁰ Las lesiones retinianas irreversibles⁵¹⁻⁵² y la miositis que se presenta en la Pseudohipertrofia muscular⁵³ también representarían consecuencias tisulares de la acción directa por fotoactivación del complemento,⁵⁴ activación de la guanilciclasa,⁵⁵ formación de radicales libres y oxígeno singulete,⁵⁶⁻⁵⁸ mecanismos bioquímicos que alteran la función y estructura de las membranas biológicas, que estarían de acuerdo con la hipótesis propuesta de que las porfirinas, sus precursores y metabolitos participan en las alteraciones sinápticas⁵⁹⁻⁶¹ que expliquen los cambios electroencefalográficos⁶² y neuropsiquiátricos^{63,66} de los enfermos con cisticercosis.

Las porfirinas del cisticerco o sus derivados metabólicos, liberados a la circulación periférica (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina) podrían utilizarse como monitores de la presencia del parásito. Datos no publicados de un paciente con neurocisticercosis y de un cerdo masiva-

mente parasitado no demostraron la presencia de porfirinas, con las técnicas fluorométricas empleadas, sin embargo se requiere un mayor número de determinaciones y análisis de metabolitos para aclarar su utilidad diagnóstica.

Referencias

1. DERRIEN, E.: *Sur quelques faits nouveaux pour l'histoire naturelle des porphyrines*, C.R. Soc. 1924; 91:634.
2. DERRIEN, E.: *Porphyrines et vers parasites*. Compt. Rend. Acad. Sci. 1927; 184:480.
3. KOLLER, R.: *Knochenporphyrie, tierärztliche rundschau*. 1942; 77:81.
4. KOLLER, R.: *Die fluoreszenz einiger parasiten in feische zeitschrift fur Fleisch und milchhygiene*. 1943; 53:85.
5. KRISILOV, D.V.: *Studies of meat infected with cysticercus with filtered ultraviolet rays, Higiena-I sanitariya Moscow*. 1950; 4:52.
6. LERCHE, V.W.; ELMOSSALAMI, E.S.: *Nachweis von rinderfinnen imfiltrier UV-licht*. Berlinier und munchener Tierärztliche Wochenschrift. 1958; 71:131-143.
7. MARAZZA, V. & PERSIANI, G.: *Indagine cysticercospia in luce di woodsu carni bovine nazionali ed estere ammesse al libero consumo*. Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinaria, 14:381 - 383, 1960.
8. MURAZZA, V. & PERSIANI, G.: *Indagine cystercoscopica in luce di woodsu carni bovine nazionali ed estere ammesse al libero consumo*. Archivo Veterinario Italiano, 12:201 - 226. 1961.
9. EL AFIFI, A., ELMOSSALAMI, E. & YOUSSEF, L. B.: *The distribution of cysticercus bovis in imported sudanese cattle with special reference to the viability of cysticerci*. Arab Vet. y Med. Assoc. 1963; 23:301.
10. SWETMAN, G.K. & WILLIAMS, R. J.: *The significance of the distribution and fluorescence of Taenia ovis in sheep in meat inspection procedures*. Res. Vet. Sci. 1963; 4:359.
11. PIRKL, J.: *Ultrafialové svetlo pri zjstovani cysticercokozu hovezinhho masa*. Sbornik Vysoke Skoly Zemeledske y Brne, Rada B, 1964; 12:439.
12. FRANSSSEN, J.H.: *Onderzoek naar let voorkomen van Cysticercus bovis in slachtrunderen, medemet behulp van ultraviolet light*. Tijdschrift voor Diergeneeskunde. 1964; 89:776.
13. SHEKHOVTSON, V.S.: *Results of extensive trials of the fluorescent method for - post-mortem diagnosis of cysticerciasis of cattle problème Parazytol. 1:305-307*. 1965.
14. SHEKHOVTSOV, V.S.: *Comparative evolution of diagnostic method for bovine cysticerciasis*. Veterinariya Kiev 1967; 3:8.
15. SHEKHOVTSOV, V.S.: *Detection of Cysticerci by means of in miniature - Ultraviolet lamp*. Problemy Parazitol. 1967; 589.
16. SHEKHOVTSOV, V.S.: *Diagnosis of cysticerciasis of cattle*. Veterinariya Kiev. 1967; 11: 36 - 40.
17. KOUDELA, K.: *Diagnostica uhuru hovezich (Cysticercus bovis) ve fiv trovamen UV*. Svetle. Veterinarstvi. 1966; 16:71.
18. RUD, V.N.; RUD, I.A. et SHEKHOVTSOV, V.S.: *Diagnosis of cysticerciasis by fluorescent microscopy*. Veterinariya mosk. 1967; 44:104.
19. RUD, V.N. & RUD, I.A. Citado por by MYACKOV, A.S. y MATVEY CHUCK, V.M.: *The role of veterinary and sanitary expertise of the products of animal origin in prevention of helminthic zoonoses*. In: Lysenko, A. (Ed) Zoonosis Control. Collection of Teaching Aids for International Training Course. Centre of International Projects GKNT, Moscow, Volume, 1967; 2:229.
20. KOZAKIEWICZ, B.: *Evaluation of the fluorescent technique and of cyst evagination for determining the viability of Cysticercus bovis*. Medycyna. Weterynaryjma. 1974. 30:287-287.
21. MYAGKOV, A.S. MATVEYCHUCK, V.M.: *The role veterinary and sanitary expertise of the products of animal origin in prevention of helminthic zoonoses*. IN: Lysenko, A. (ed) Zoonosis Control. Collection of Teaching Aids for International training course. Centre of International Projects GKNT, Moscow, Volume 2:229-334. 1982.
22. MAZZITIM L.; VALENCIA, J.M.; ALVARADO, J.C.: *Observaciones hechas con luz ultravioleta filtra-*

- da en *Cisticercos* y otros helmintos. Rev. Invest. Salud Públ. (Méx.), 1966; 2:99.
23. CAÑEDO, L.: *Biology of cysticerci in cysticercosis in present state of knowledge and perspectives*. Edited by Flisser, A. and Col. Academic Press, N.Y. 1982.
 24. MARTINEZ, Z. G.; GONZALEZ, B.D.; PEREZ, G.M.; LARA, N.M. y GONZALEZ, A.A.: *Aislamiento y caracterización de porfirinas obtenidas del líquido intravascular de Cysticercus cellulosae*. Memoria de las Jornadas Científicas de las Unidades de Investigación del Valle de México. CMN/IMSS p. 37. 1983.
 25. MARTINEZ, Z.G.; GONZALEZ, B.D.; PEREZ, G.M.; LARA, N.M. y GONZALEZ, A.A.: *VII Congreso de Sociedade Brasileira de Parasitologia*. Aislamiento y caracterización de porfirinas obtenidas de *Cysticercus cellulosae*. San Paulo, Brasil. 1983.
 26. GONZALEZ-ANGULO, A.: *La cisticercosis en México*. Gac. Méd. Méx., 1984; 120:309.
 27. DOSS, M.: *Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters*. Z. Klin Chem u. Klin Biochem. 1970. 8 Jahrg Hef 3.
 28. ELLKFOLD, N. and SIEVERS G.: *Thin layer chromatography of free porphyrins*. J. Chromatog. 1966; 25:373.
 29. FRIEDMAN, H.C. and BALDWIN E.T.: *Reverse: Phase purification and silica gel thin layer chromatography of porphyrin carboxylic acids*. Analytical Biochemistry. 137:473-480. 1984.
 30. CLOTTEN, R.: *Porphyrias*. Separation and identification by high-voltage electrophoresis. Chromatog. 1974; 63: 185-191. 1971.
 31. MANZERRALL, D. and GRANICK, S.: *The occurrence and determination of D-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine*. J. Bio. Chem., 1956; 219:435.
 32. RIMINGTON, C.: *Spectral absorption coefficients of some porphyrins in the Soret band region*. Biochem. J., 1960., 75:620.
 33. SCHWARTZ, S.; BERG, M.H.; BOSSENMAIER, I.; DINSMORE, H.: *Determination of porphyrins in biological materials*. Methods of Biochemical analysis. Vol. VIII 193-221. 1960.
 34. BROW, S. V.: *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Academic Press. London. 1980.
 35. REBOLLEDO, C.P.: *Separación y caracterización bioquímica de las porfirinas solubles del líquido intraquístico de Cysticercus cellulosae*. Tesis licenciatura. Facultad de Química. Universidad Veracruzana. 1985.
 36. DOSS, M.: *Formation of Zinc chelates from porphyrin methyl esters for spectrophotometric analysis*. Z. klin. Chem. u. Klin. Biochem. 1970.
 37. SOMMER, S.; RIMINGTON, C. and MOAN, J.: *Formation of complexes of tumor localizing porphyrins*. Febs. 1984; 172:2. 267-271.
 38. LAMOLA, A.A.; SOSELOW, M. and YAMANE, T.: *Zinc protoporphyrin (zpp) A simple, sensitive, fluorometric screening test for lead poisoning*. Clin. Chem., 1975; 21:93.
 39. SPIKES, J.D.: *Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975; 244:496.
 40. QATO, M.K. and MAIRES, M.D.: *Prevention of neonatal X hiperbilirubinaemia in non-human primates by Zb-protoporphyrin*. Biochem J. 226:51-57. 1985.
 41. BLOOMER, J.R.: *Enzyme defects in the Porphyrias and their relevance to the biochemical abnormalities in these disorders*. Invest. Dermat. 1981; 77:102-106.
 42. MOLINARI, J.L.; MEZA, R.; SUAREZ, B.; PALACIOS, S. and TATO, P.: *Taenia solium: Immunity in Hogs to the Cysticercus*. Exp. Parasitol., 1983; 55:340-357.
 43. MOLINARI, J.L.; MEZA, R. and TATO, P.: *Taenia solium: Cell Reactions to the Larva (Cysticercus cellulosae) in Naturally Parasitized, Immunized Hogs*. Ezp. Parasitol., 1983; 56:327-338.
 44. MAHMOOD, A.S. and THOMAS, A.J.: *Host-parasite relationship in human cysticercosis*. Indian J. Med. Res., 1984; 80:532-540.
 45. CAÑEDO, L.; GARRIDO, F.; GONZALEZ, M.: *Host-parasite relationship of cysticerciasis in man*. In: Biochemistry of parasites and host-parasite relationships. H. Van den Bossche ed. Publisher Elsevier North-Holland Biomédi-Press Hamsterdan. 385-392, 1976.
 46. SEALEY, M.; RAMOR, C.; WILLMS, K. and ORTIZ, O.L.: *Taenia solium; mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes*. Parasite Immunology, 3:299-307, 1981.
 47. WILLMS, K.; MERCHANT, M.T.; ARCOS, L.; SEALEY, M.; DIAZ, S. and DIAZ de L. L.: *Immunopathology of cysticercosis*. Molecules, Cells and Parasite in Immunology, pág. 145-162, Academic Press. 1980.
 48. WILLMS, K.; MERCHANT, M.T.; DIAZ, S. and ARCOS, L.: *Host-parasite interface in the metacystode of Taenia solium*. In: Cysticercosis. Present state of

- Knowledge and Perspectives. by Flisser, A. et. al. Academic Press. New York London, 1982, pág.: 397-411.
49. TRETIAKOFF, C. e PACHECO, A.C. e SILVA.: *Controbuicao para o estudo da cisticercose cerebral e em particular das lesoes cerebraes toxicas á distancia n' esta affeccion*. Mem. Hosp. Juquery. Brasil. 1 (1) 37-66, 1924.
 50. MADRAZO, I. GARCIA RENTERIA J.A., SANDOVAL, M. LOPEZ VEGA F.F.J.: *Intraventricular cisticercosis*. *Neurosurgery*. 12:148-152. 1983.
 51. MEESER, K. and KAMMERER, W.S.: *Intraocular Cisticercosis*. *Arch. Ophthalmol* 97:1103-1105, 1979.
 52. MARTINEZ, S.A.: *Cisticercosis ocular*. Tesis Licenciatura, Escuela de Medicina de León, Universidad de Guanajuato. 1969.
 53. JOLLY, S.S. and PALLIS, C.: *Muscular Pseudohypertrophy due to cisticercosis*. *Journal of the Neurological Sciences* 12: 155-162. 1971.
 54. LIM, H.W., POH-FITZPATRICK M.B. and GIGLI, I.: *Activation of the Complement System in Patients with Porphyrins after irradiation in vivo*. *J. Clin. Invest.* 74:1961-1965. 1984.
 55. IGNARRO, L.J.; WOOD, K.S. and WOLIN, M.S.: *Activation of purified soluble guanylate cyclase by Protoporphyrin IX*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2870-2873. 1982.
 56. SANDBERG, S. AND ROMSLO, I.: *Porphyrin induced photodamage at the cellular and the subcellular level as related to the solubility of the porphyrin*. *Clinica Chimica Acta*. 109:193-201. 1981.
 57. ITO, T: *Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action*. The O₂ hypothesis as a driving force in recent research. *Photochemistry and photobiology*, 28:493-508. 1978.
 58. BLUM, A; GROSSWEINER, L.I.: *Singlet oxygen generation by hematoporphyrin IX. Uroporphyrin I and hematoporphyrin derivate at 546 nm in phosphate buffer and in the presence of egg phosphatidilcholine liposomes*. *Photochemistry and Photobiology*. 41:27-32. 1985.
 59. RIOPELLE, R.J. and KENNEDY, J.C.: *Some aspects of porphyrin in neurotoxicity in vitro*. *Can J Physiol Pharmacol* 60:707-712. 1982.
 60. IRVINE, D.G.; BAYNE, W; MIYASHITA, H and MAJER, J.R.: *Identification of Kripto pyrrole human urine and its relation to psychosis*. *Nature* 224:811-813. 1969.
 61. IRVINE, G.D.; WILSON, D.L.: *Oxidized monopyrroles in porphyric disorders and related conditions*. *Porphyryns in human diseases*. Ist Int Porphyrin Meet. Freiburg/Br. 1975, pp. 217-224 (Karger, Basel 1976).
 62. YINGKUN, F.; SHAN, O.; XIUZHEN, Z. and SHULIAN, Y.: *Clinicoelectro-encephalographic studies of cerebral cisticercosis 158 cases*. *Chinese Medical Journal*. 92 11:770-786. 1979.
 63. VIJAYAN, G.P.; VENKATARAM, S.; SURI, M.L.; SETH, H.N. and HOON R.S.: *Neurological and related manifestations of Cisticercosis*. *Trop. geogr. Med.*, 29:271-278. 1977.
 64. FUENTES, M.: *El estado mental de los Cisticercosis cerebral*. *Ga. Méd. Mex.* Tomo XCI No. 8. 693-701. 1961.
 65. GOMEZ, I.I.: *Locura por cisticercosis del cerebro*. *Revista Médica Tomo XIII, No. 12:265-267*. 1901.
 66. ARRIAGADA, C y CORBALAN, V.: *Manifestaciones neuropsiquiátricas de la cisticercosis encefálica*. *Neurocirugia*. Vol. XIX No. 2-4. Chile 232-267. 1961.