

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía Patológica



TESIS DOCTORAL

**Estudio morfológico de la porfiria experimental inducida
por hexaclorobenceno**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Paz Rodríguez Zornoza

Madrid, 2015

TP
1982
067

María Paz Rodríguez Zornoza



y- 03-000005-0

ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA PORFIRIA EXPERIMENTAL INDUCIDA
POR HEXACLOROBENCENO

Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1982



© M^a Paz Rodríguez Zornoza
· Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-36686-1981

Autor:- MARIA PAZ RODRIGUEZ ZORNOZA

Título:- ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA PORFIRIA' EXPERIMENTAL
INDUCIDA POR HEXACLOROBENCENO.

Prof. Agregado Ponente: Dra. Juliana Fariña Gonzalez. Profesor
Agregado de Anatomía Patológica de la
Facultad de Medicina Complutense.

Directores:

Dr. Felipe Llanes Menendez. Prof. Adjunto Numerario
de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina Complu-
tense.

Dr. R. Enriquez de Salamanca. Jefe Clínico del Hos-
pital Clínico de San Carlos de la Facultad de Medi-
cina Complutense.

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Año, 1981



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE ANATOMIA PATOLOGICA
PROF. A. BULLON RAMIREZ

DIRECCION POSTAL
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA
HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS
MADRID-3
TFNO. 843 73 73

Felipe Llanes Menendez, Profesor Adjunto Numerario, de Anatomía Patológica y Rafael Enriquez de Salamanca Lorente, Jefe Clínico de la Cátedra de Patología y Clínica Médica I, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense,


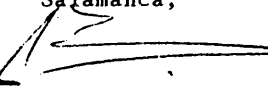

CERTIFICAN: Que Dña. Paz Rodriguez Zornoza, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado " ESTUDIO MORFOLOGICO DE LA PORFIRIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR HEXACLOROBENCENO ", que consideramos adecuado para la obtención del grado de Doctor.

Madrid, 14 de Mayo de 1981

VºBº
EL PROF. AGREGADO
PONENTE.
Dra. J. Farifia Gonzalez

Dr. F. Llanes Menendez

Dr. R. Enriquez de
Salamanca,



I N D I C E

	Pág.
- AGRADECIMIENTO.....	IV
- OBJETIVOS.....	V
I- INTRODUCCION.....	2
1- CLASIFICACION DE PORFIRINAS.....	3
2- BIOSINTESIS DEL HEM.....	3
2.1- Biosíntesis del ácido delta-amino-levulí- nico.....	3
2.2- Biosíntesis del porfobilinógeno.....	6
2.3- Biosíntesis de los uroporfirinógenos.....	6
2.4- Metabolismo de los uroporfirinógenos.....	8
2.5- Conversión del coproporfirinógeno en protoporfirina.....	11
2.6- Control de la biosíntesis del HEM.....	12
2.7- Consecuencias de los bloqueos en la biosíntesis del HEM.....	14
3- PORFIRIA EXPERIMENTAL.....	16
3.1- Introducción histórica de las porfirias experimentales.....	16
4- PORFIRIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR HIDROCAR- BUROS AROMATICOS POLIHALOGENADOS.....	19
4.1- Propiedades químicas, toxicológicas y me- tabolismo de los hidrocarburos aromáticos polihalogenados porfirogénicos.....	21
5- PORFIRIA POR HEXACLOROBENCENO EN EL HOMBRE....	23
5.1- Clínica.....	24

	Pág.
5.2- Alteraciones bioquímicas.....	26
6- PORFIRIA POR HEXACLOROBENCENO EN RATAS.....	27
6.1- Formas de intoxicación mediante hexa- clorobenceno.....	28
6.2- Factores que modifican la acción porfi- rinogénica del hexaclorobenceno.....	29
6.3- Fases de la intoxicación por hexa- clorobenceno.....	30
6.4- Determinación de porfirinas en ratas intoxicadas por hexaclorobenceno.....	31
6.5- Alteraciones enzimáticas y patogenia de la porfiria inducida por hexaclorobenceno	33
7- SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS ENTRE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HCB Y LA PORFIRIA CUTANEA TARDA HUMANA.....	37
II- MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
8- MATERIAL DE EXPERIMENTACION.....	41
9- METODO DE INDUCCION DE PORFIRIA EXPERIMENTAL.	41
10- METODOS DE DETERMINACION DE PORFIRINAS.....	42
10.1- Porfirinas urinarias.....	45
10.2- Porfirinas fecales.....	45
10.3- Determinación cuantitativa de copro y uroporfirinas urinarias.....	46
10.4- Porfirinas fecales.....	47

	Pág.
10.5- Individualización de las carboxil- porfirinas excretadas mediante cromatografía en capa fina de sus metil-esteres..	48
11- METODOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	51
11.1- Microscopía óptica.....	51
11.1.1.- Método de Perls.....	51
11.1.2.- Método de hematoxilina-eosina.....	52
11.1.3.- Reacción de P.A.S.....	53
11.1.4.- Método de F. Llanes.....	54
11.2- Método de estudio para microscopía electrónica.....	55
III- RESULTADOS.....	57
12- EXCRECIÓN NORMAL DE PORFIRINAS EN RATAS.....	58
13- DETERMINACION DE PORFIRINAS EN RATAS INTOXICADAS POR HEXACLOROBENCENO.....	67
14- RESULTADOS ANATOMOPATOLOGICOS.....	80
14.1- Resultados macroscópicos.....	80
14.2- Resultados con microscopía óptica. M. fluorescencia.....	81
14.3- Resultados ultraestructurales.....	87
IV- COMENTARIOS.....	131
V- CONCLUSIONES.....	155
VI- BIBLIOGRAFIA.....	160

AGRADECIMIENTO

Próximo el día en que éste trabajo toca a su fin, recuerdo el tiempo en que no era más que un ilusionado propósito. Al contemplar hoy los folios que concretan tantas horas de esfuerzo, amontonados sobre la mesa listos para su encuadernación y la colección de fotografías que pretenden ilustrarlo, vienen a mi memoria todas las personas sin cuya ayuda este propósito no hubiera sido más que eso.

Este trabajo es fruto de la colaboración; por ello, el que pretende alcanzar el Grado, no tiene sino que expresar su reconocimiento a todos los que la han prestado.

En primer lugar a la Profa. Fariña, que con su ponencia honra este trabajo y a todos los que en el hemos intervenido.

Al Prof. Llanes, mi agradecimiento por la cantidad de horas que le he robado y por el asesoramiento que en todo momento me prestó, sin el cual este proyecto habría sido mucho más árduo.

Al Dr. Enriquez de Salamanca por su interés y el constante apoyo que tan útiles han sido durante el desarrollo de este proyecto de Tesis. Quiero hacer extensivo mi agradecimiento al grupo de trabajo que sobre metabolismo porfirínico, dirige con tanta eficacia y dedicación en la Cátedra del Prof. Gilsanz.

A Adela Pelayo y J. Moran por la inestimable ayuda prestada.

Muy agradecida quedo también a las Srtas. Ramona Bustos y Maria Antonia Esteban, por su colaboración.

En fin, de todos ellos sientome tributaria y a todos ellos quiero de nuevo expresarles mi mas sincero agradecimiento.

OBJETIVOS

Aunque las porfirias son consideradas enfermedades relativamente poco comunes, nuestra incorporación al grupo de trabajo que sobre metabolismo porfirínico dirige el Dr. Enriquez de Salamanca en la Cátedra de Patología Médica del Prof. Gilsanz, nos permitió el adquirir cierta experiencia sobre la porfiria cutánea tarda (PCT), variedad ésta más frecuente en nuestro país. La porfiria inducida a ratas mediante intoxicación con hexaclorobenceno, constituye un variioso y aceptado modelo experimental de la PCT humana.

Recientemente el Prof. Llanes ideó un método original para demostración histológica de la fluoresceína sódica.

Basados en estos hechos y consideraciones, nos propusimos estudiar las alteraciones estructurales y ultraestructurales, así como la fluorescencia porfirínica tisular mediante el método de Llanes en la porfiria experimental inducida en ratas con hexaclorobenceno en sus diferentes estadios evolutivos.

I - I N T R O D U C C I O N

=====

Las porfirias pueden ser definidas como un grupo de enfermedades de expresión clínica polimorfa que habitualmente se producen por errores congénitos, en el proceso de biosíntesis del HEM y que bioquímicamente se caracterizan por una producción, acumulación y excreción excesiva de porfirias y sus precursores.

El HEM debido a su importancia vital y a la multitud de procesos en los que puede intervenir, está presente en la mayoría de las células del organismo, pero existen dos localizaciones primordiales donde se realiza su síntesis, ellas son: el tejido hematopoyético y el hígado, siendo precisamente en estas localizaciones donde las alteraciones del metabolismo del HEM adquieren mayor relieve, debido a que estos lugares son los de mayor actividad biosintética del HEM. El error metabólico puede acontecer a diferentes niveles y según donde ocurra se producirá una enfermedad con características clínicas y biosintéticas específicas.

En 1954, Schmid, Schwartz y Watson (1) establecieron dos grandes grupos de porfirias, teniendo en cuenta la localización preferente donde se producía el acúmulo de porfirinas y distinguieron las porfirias eritropoyéticas de las hepáticas.

1- CLASIFICACION DE PORFIRIAS

ERITROPOYETICAS
UROPORFIRIA CONGENITA DE GUNTHER PROTOPORFIRIA
HEPATICAS
PORFIRIA INTERMITENTE AGUDA (PIA) PORFIRIAS CLINICAMENTE MIXTAS: PORFIRIA VARIEGATA (PV) COPROPORFIRIA HEREDITARIA PORFIRIA CUTANEA TARDA

Esta clasificación, aunque no es perfecta y ha sido sometida a críticas (2), sigue manteniéndose por su simplicidad y por razones didácticas.

2- BIOSINTESIS DEL HEM

La biosíntesis normal del HEM, ha sido recientemente revisada por Gidari y Levedere (3).

Cronológicamente podemos distinguir las siguientes etapas:

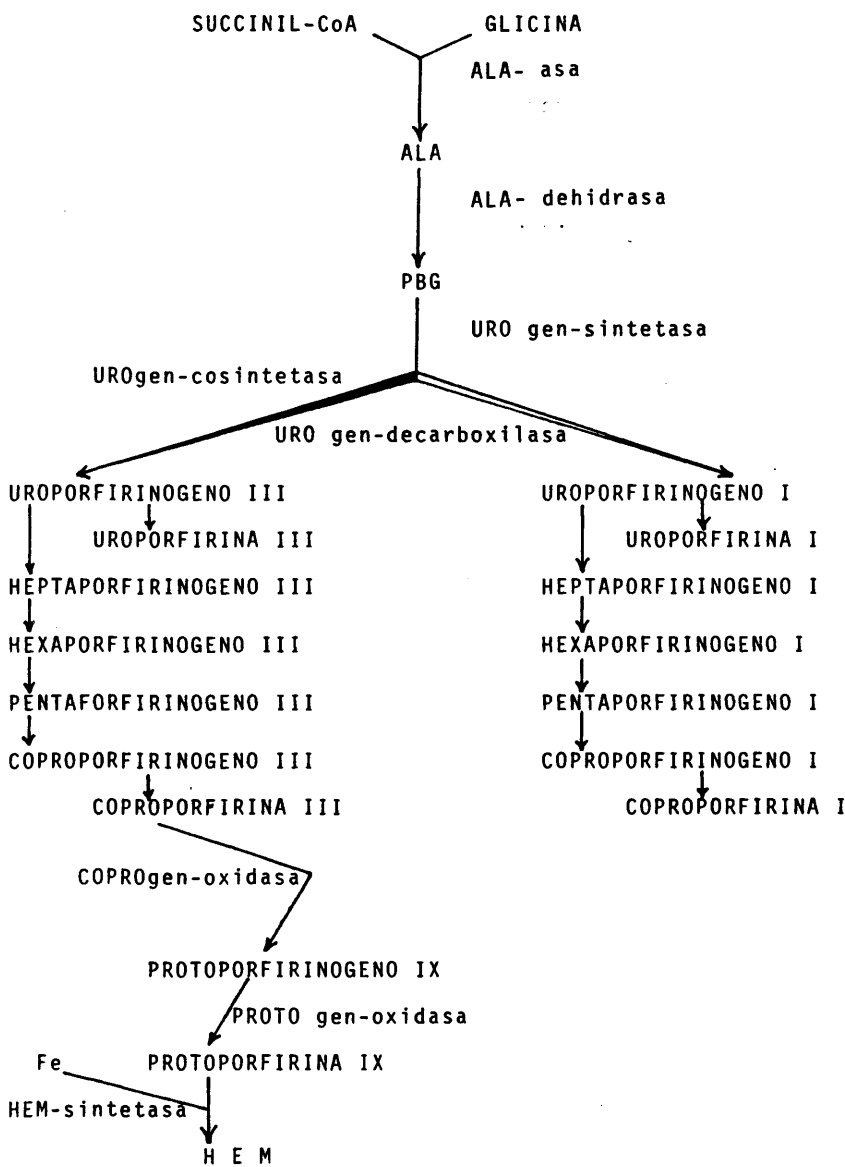
2.1.- SINTESIS DEL ACIDO DELTA AMINO-LEVULINICO (ALA)

La síntesis del ácido delta amino-levulinico (ALA) es el primer paso en la biosíntesis del HEM. Se forma a partir de la unión equimolecular de la glicina con el ácido succínico, en presencia del piridoxal fosfato, el cual es indispensable para la realización de esta unión, ya que si no se produce piridoxal-fosfato de glicina, no tiene lugar la unión con el ácido

succínico. Este último componente del ciclo de Krebs, es un ácido que procede de dicha glucólisis aerobia y por tanto se encuentra abundantemente en el interior de las mitocondrias. Dentro de las mismas se encuentra también la enzima catalizadora de la unión de la glicina y el ácido succínico: se trata de la delta amino-leonlítico-sintetasa (ALA-asa). Las variaciones en la actividad de esta enzima van a tener gran repercusión en la biosíntesis del HEM.

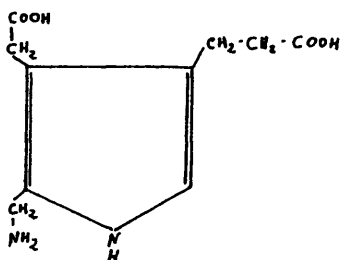
Como la ALA-sintetasa y el ácido succínico se encuentran en gran cantidad en el interior de la mitocondria, es lógico deducir que esta primera fase de la biosíntesis del HEM es mitocondrial.

ESQUEMA DE LA BIOSINTESIS DEL HEM (Fig. 1)



2.2.- BIOSINTESIS DEL PORFOBILINOGENO (PBG)

El porfobilinógeno, que tiene estructura monopirrólica, se forma tras la unión de dos moléculas de ALA en presencia de la enzima amino-levulin dehidrasa (ALA-dehidrasa) y ya extramitocondrialmente. (Fig. 2)



2.3.- BIOSINTESIS DE LOS UROPORFIRINOGENOS

En los últimos 30 años se ha llegado a un casi completo conocimiento de la vía de biosíntesis por la que se forman las porfirinas en el organismo (4). Durante los primeros estudios sobre el metabolismo de las porfirinas se supuso que el paso de porfobilinógeno (PBG) a uroporfirina era posible por una simple condensación lineal de cuatro pirroles. Desde Shemin(5) se sabe que esta forma de condensación no es posible y que el paso se realiza a través de un intermedio incoloro, el uroporfirinógeno, que es la forma reducida de la uroporfirina.

La unión de cuatro moléculas de PBG, da lugar a un compuesto tetrapirrólico que es el denominado uroporfirinógeno. Esta unión está catalizada por dos enzimas que actúan simultáneamente, la uroporfirinógeno-sintetasa (URO gen-sintetasa) y la uroporfirinógeno-cosintetasa (URO gen-cosintetasa). Primero

actuaría la UROgen-sintetasa que origina la sucesiva unión de moléculas de PBG. En este proceso se formarían varios intermedios entre ellos un dipirrol-metano. Es sobre este intermedio dipirrólico, sobre quien actuará la segunda enzima, la UROgen-cosintetasa (Frydman (6) en un completo trabajo no logró demostrar la existencia de ningún di o tripirrilmetano (sintetizados en el laboratorio) que actuase como sustrato de las enzimas).

Si solo actúa la enzima UROgen-sintetasa, la unión de las cuatro moléculas de PBG da lugar a un uroporfirinógeno perteneciente a la variedad isomérica I. Los porfirinógenos de esta variedad isomérica I, no tienen ninguna misión fisiológica en la naturaleza ni se conoce ninguna sustancia que derive de ellos, eliminándose por vía urinaria o fecal.

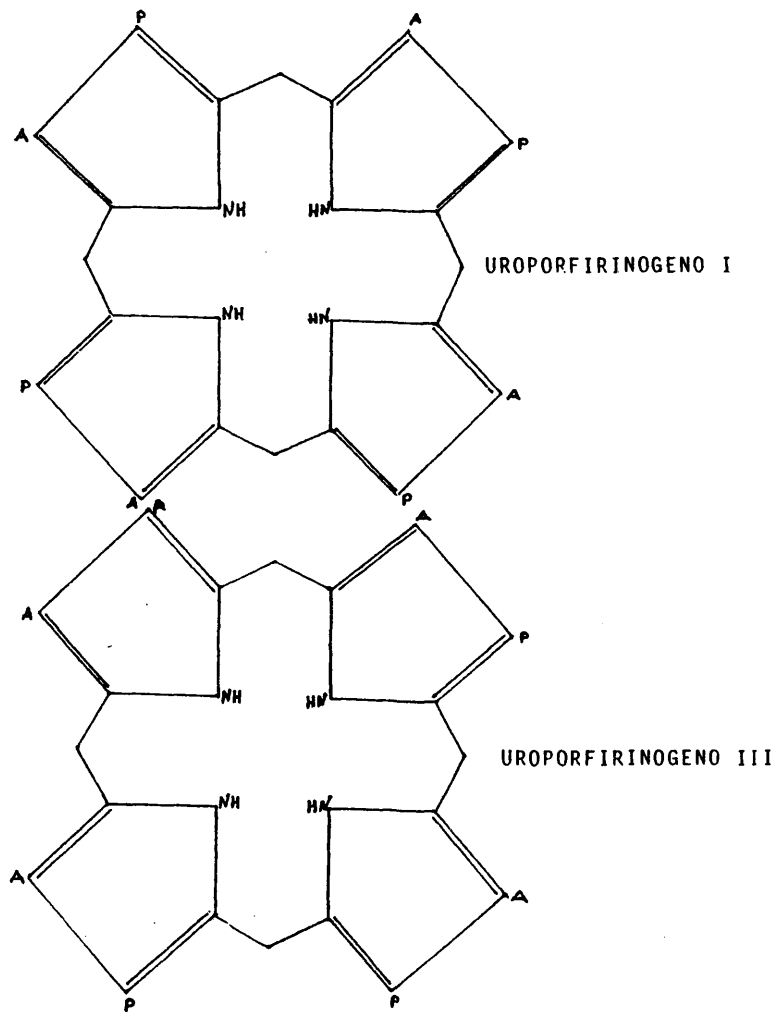
Cuando simultáneamente a la acción de la enzima UROgen-sintetasa, actúa la enzima UROgen-cosintetasa, el compuesto tetrapirrólico obtenido es un uroporfirinógeno perteneciente a la variedad isomérica III. Son estos uroporfirinógenos III los que son imprescindibles para la formación del HEM, el cual jamás se podrá formar a través de la variedad isomérica I.

La concentración de UROgen-cosintetasa es diez veces superior a la de UROgen-sintetasa, asegurando así la formación de uroporfirinógenos III que son los fisiológicamente importantes.

Este eslabón de la síntesis del HEM es intracitoplasmático.

2.4.- METABOLISMO DE LOS UROPORFIRINOGENOS

Tanto el uroporfirinógeno de la variedad isomérica I como el perteneciente a la variedad isomérica III, poseen 8 radicales ácidos. Un radical acético y un radical propiónico en cada uno de sus cuatro anillos pirrólicos (Fig. 3)



(Fig. 3)

El paso metabólico siguiente supone la conversión de los uroporfirinógenos en coproporfirinógenos, para ello ha de seguirse un proceso de decarboxilación mediante el cual se desprende de cada uroporfirinógeno cuatro radicales acéticos. Esta decarboxilación no es simultánea sino que se produce de forma escalonada y progresiva, dando lugar entre el uroporfirinógeno y el coproporfirinógeno a la formación de tres porfirinógenos intermediarios, cada uno de ellos con siete, seis y cinco carboxilos, por lo que se les denomina hepta, hexa y pentacarboxilporfirinógenos, respectivamente. En este proceso de decarboxilación toma parte un fermento, la uroporfirinógeno-decarboxilasa (UROgen-decarboxilasa). Esta enzima tiene un rápido "turnover", debido a lo cual los intermediarios arriba citados se encuentran en escasa cantidad en condiciones normales. Cada uno de dichos intermediarios puede ser utilizado como sustrato de la UROgen-decarboxilasa.

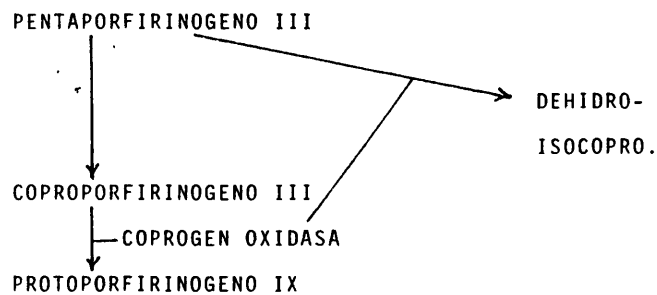
Jackson y cols. (7) han propuesto que la decarboxilación no se produce al azar, sino que tiene un lugar de origen y sigue un orden secuencial. Por aislamiento y análisis estructural de las porfirinas intermedias de siete, seis y cinco carboxilos, este autor ha demostrado que la reacción se inicia en la cadena lateral acética del anillo D del uroporfirinógeno III y avanza siguiendo el orden de las agujas del reloj, por los anillos A, B y C.

Estos porfirinógenos (uro, hepta, hexa, penta y coproporfirinógeno) pueden ser oxidados a porfirinas. Esta oxidación, que en condiciones normales no tiene cuantitativamente relevan-

cia, tiene importancia, pues las porfirinas que así se forman quedan excluidas de la cadena metabólica del HEM.

Estas porfirinas pueden seguir dos caminos, uno acumularse en el tejido donde se formaron, y otra, eliminarse a través de alguna vía natural. Esta reacción que puede realizarse de forma espontánea se ve favorecida por la presencia del hierro.

Elder (8) ha demostrado una vía alternativa de decarboxilación a partir de la porfirina de cinco carboxilos, que conduce a la formación de la serie de isocoproporfirinas que incluye a la dehidroisocoproporfirina, hidroisocoproporfirina y la isocoproporfirina. El enzima que cataliza la decarboxilación-deshidrogenación de la porfirina de cinco carboxilos para así formar la dehidroisocoproporfirina, es la coprogenoxidasa. Esta enzima es la misma, que en condiciones normales, cataliza el paso del coproporfirinógeno a protoporfirinógeno IX.



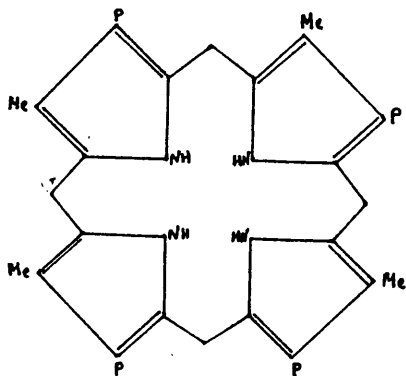
(Fig. 4)

En individuos normales se detectan mínimas cantidades de isocoproporfirinas en las heces, encontrándose característi-

camente y en cantidades importantes en las heces de los enfermos con porfiria cutánea tarda (PCT) y en ratas intoxicadas por hexaclorobenceno. En estas circunstancias, el fermento COPRO gen oxidasa, actuaría preferentemente sobre el pensaporfirinógeno III en detrimento de su acción sobre el coproporfirinógeno III, dando lugar a una coproporfirinuria, objeto de múltiples hipótesis.

2.5.- CONVERSION DEL COPROPORFIRINOGENO EN PROTOPORFIRINA.

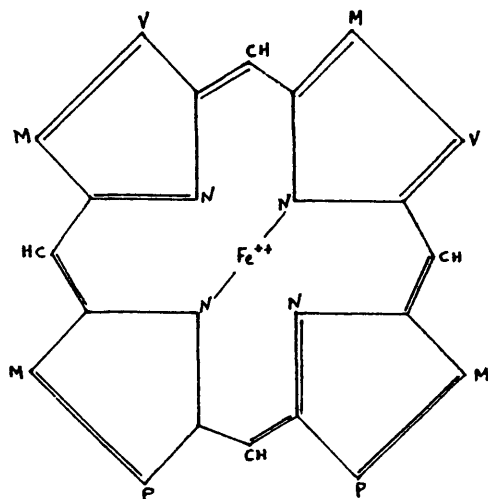
El coproporfirinógeno (Fig. 5) en condiciones normales sufre la decarboxilación y oxidación sucesiva en dos de sus cuatro radicales propiónicos. Esta reacción está catalizada por la COPRO gen oxiadasa, formandose una molécula denominada protoporfirinógeno IX. La COPRO gen oxidasa es de localización intramitocondrial.



(Fig. 5)

Por oxidación del protoporfirinógeno IX se forma la protoporfirina IX (PROTO); esta reacción es catalizada por la también enzima mitocondrial PROTO gen oxidasa.

Una vez formada la protoporfirina IX, al incorporarse a ella un átomo de hierro, incorporación facilitada por la enzima mitocondrial, ferroquelatasa o Hem-sintetasa, queda formado el HEM. (Fig. 6)



(Fig. 6)

2.6.- CONTROL DE LA BIOSINTESIS DEL HEM

Gracias a los trabajos de Gajdos (9), se sabe que la cantidad de porfirinas libres no representan más que la milésima parte de la cantidad de protoporfirina utilizada en la síntesis del HEM.

Lascelles (10) demostró que para la formación diaria de 450 micromol. de HEM, se sintetizan menos de 484 micromol.

de porfirinas por día. Esta síntesis que es de extrema complejidad se efectúa con gran rapidez como lo demostraron los trabajos de Gajdos (11).

La vía metabólica que da lugar a la formación del HEM, se inicia en el interior de la mitocondria con la síntesis del ALA, se continúa en el citoplasma donde se encuentran los diferentes enzimas que catalizan los pasos intermedios (URO gen-sintetasa, cosintetasa y decarboxilasa) y termina de nuevo en la mitocondria con la síntesis de la protoporfirina IX y el HEM. Esta proximidad de localización de los primeros estadios y de los últimos, de la síntesis del HEM, tiene gran significación funcional. El ritmo de formación de los precursores del HEM (ALA y PBG) está en función inversa a la cuantía del HEM sintetizado. Los estudios de Granick y Sassa (12), demostraron que el HEM realiza un control de tipo "feed-back" negativo sobre la síntesis del ALA. De esta forma el HEM regula la velocidad de su propia síntesis en función de las necesidades del organismo.

Se han propuesto tres medios diferentes de realizar este control que se centraría sobre el efecto directo que el HEM ejerce sobre la ALA-sintetasa:

1) Inhibición de la ALA-sintetasa por el HEM.

2) Kurashima y cols. (13) han sugerido un modelo de control que consistiría en una inhibición del transporte de ALA-sintetasa desde el citoplasma, donde se sintetiza, al interior de la mitocondria.

3) Inducción de ALA-sintetasa hepática. El fermento hepático ALA-sintetasa puede ser inducido por muchos fármacos

liposolubles esteroides y otros productos químicos. El efecto primario de la mayoría de estos compuestos, parece ser la inducción de la apoproteína del citocromo P-450, que es la oxidasa terminal del metabolismo de los fármacos. El aumento coordinado de la actividad de la ALA-sintetasa, en esas circunstancias, sería un efecto secundario al intento de formar un exceso de HEM que actuaría de sustrato en la nueva síntesis del citocromo P-450.

Existen, además, un grupo de sustancias químicas entre las que se incluyen la griseofulvina, la dicarboxidihidrocoleina (DDC) y la alilisopropilacetamida (AIA), que ocasionan una inducción masiva de la actividad de la ALA-sintetasa, y que en las ratas utilizadas para estudios experimentales producen un trastorno del metabolismo de las porfirinas.

2.7.- CONSECUENCIAS DE LOS BLOQUEOS EN LA BIOSINTESIS DEL HEM

El proceso de la biosíntesis del HEM puede bloquearse parcialmente a diferentes niveles, dando lugar a distintas situaciones clínicas.

Sabido es que en todo error congénito del metabolismo se producen las siguientes consecuencias:

- 1) Disminución del producto final.
- 2) Aumento de los productos intermediarios de la cadena metabólica que preceden al bloqueo. Existe un acúmulo de los metabolitos que se forman antes del bloqueo. Estos metabolitos al principio se acumulan en los tejidos donde se formaron, más tarde pasan a la sangre y posteriormente se eliminarán por la

orina o por la bilis.

En el caso de que el bloqueo se sitúe en los primeros eslabones de la cadena metabólica del HEM, los intermediarios, que aumentan, aún no poseen la estructura tetrapirrólica. Entre ellos figura el ALA y el PBG. Si la interrupción se sitúa en fases más avanzadas, los metabolitos que se acumulan son los porfirinógenos. Al ser acumulados en los tejidos, esto da lugar a una facilitación de su oxidación a porfirinas perdiendo su carácter precursor del HEM y siendo eliminados por orina o heces.

3) Aumento de los enzimas previos a la deficiente.

La interrupción de la cadena metabólica disminuye la síntesis del HEM. La consecuencia inmediata de ello es el estímulo automático de los fermentos previos al bloqueo. Al resultar deficiente la síntesis del HEM y dado que este producto final regula mediante un mecanismo de "feed-back" negativo la actividad de la enzima ALA-sintetasa, se produciría un aumento de la actividad de esta enzima. Esta respuesta contribuye a aumentar la cantidad de los productos intermediarios, que por mecanismo de inducción, por sustrato, estimulan las enzimas de las etapas previas al bloqueo, y así finalmente la síntesis del HEM no resulta defectuosa. Es un estímulo que pretende compensar la falta de HEM a base de acelerar su biosíntesis.

La biosíntesis también puede ser estimulada por un aumento en la demanda de HEM. Muchas drogas son metabolizadas en el hígado, merced a la actuación del citocromo P-450, lo que determina una mayor demanda de HEM. El consumo de HEM determina la disminución del freno que este ejerce sobre la ALA-

sintetasa y se estimula toda la vfa metabólica. En el caso de que exista un bloqueo en ella se producía el ya comentado aumento de los productos intermediarios.

4) Apertura de vías secundarias o derivativas, de lo cual en este caso sería representación la presencia de isocopro-porfirinas demostradas por Elder (8).

3.- PORFIRIA EXPERIMENTAL

Es un hecho demostrado que ciertos productos químicos, incluyendo entre ellos algunos fármacos y esteroides, son capaces de producir alteraciones bioquímicas en varias especies animales, que se asemejan a diferentes tipos de porfiria hepática en el hombre. Entre los agentes químicos utilizados en la producción de porfiria experimental, destacan por su importancia la alilisopropilacetamida (AIA), el dicarboxidihidrocolidina (DDC), la griseofulvina y por encima de todos ellos, el hexaclorobenceno (HCB).

Las observaciones clínicas sobre porfiria humana suministran las pautas para el desarrollo de porfiria experimental, la cual en útil correspondencia proporciona datos de importante aplicación clínica.

Clasificación de porfirias experimentales (34)

I- Animal: - Genética

- Inducida químicamente.

II- Sistemas de células aisladas: - Inducidas químicamente.

3.1.- INTRODUCCION HISTORICA DE LAS PORFIRIAS EXPERIMENTALES.

Stokvis (14) en 1889 dió los primeros pasos en el de-

sarrollo del concepto de porfiria inducida por agentes químicos, cuando publicó el caso de una mujer, la cual, tras la ingesta de sulfonal presentó orinas rojas y que murió con alteraciones psíquico-neurológicas. Fue probablemente la primera descripción de porfiria intermitente aguda.

El mismo Stokvis (15) al administrar sulfonal a conejos y perros produjo la primera porfiria experimental descrita.

Similar experimento fue llevado a cabo por Fischer y Duesberg (16), cuando administraron idéntico compuesto a conejos, encontrando porfirinas eter-insolubles en la orina de los animales.

Rimington y Hemmings (17, 18) demostraron que ciertas sulfonamidas, incluyendo la sulfanilamida, incrementaban la excreción urinaria de coproporfirinas en ratas.

Schwartz y cols. (19) trataron conejos con fenilhidrazina, plomo y luz ultravioleta, produciendo una porfiria experimental que se asemejaba a la porfiria eritropoyética congénita humana. Estos animales excretaron gran cantidad de uroporfirina I, por orina. Asimismo, las uro y coproporfirinas de la médula ósea estaban también incrementadas, sin embargo la concentración de porfirinas en el hígado estaba dentro de la normalidad. Los conejos excretaban cantidades elevadas de PBG. Este dato no ha sido constatado en la clínica humana de porfiria eritropoyética congénita humana. Pero quienes realmente sentaron las bases de la porfiria experimental fueron Schmid y Schwartz (20, 21) cuando demostraron que la administración de sedormid (alil-isopropil-acetilurea) a conejos, producía un tipo de

porfiria hepática que se caracterizaba por la excreción de cantidades elevadas de PBG y uroporfirina III por la orina. El hígado de estos animales contenía grandes cantidades de PBG, uro, copro y protoporfirina. Como la mayoría de los estudios de porfiria experimental, estos trabajos se realizaron sobre la base de observaciones clínicas, ya que Duesberg (22) había demostrado la existencia de porfiria en un paciente que había ingerido grandes cantidades de sedormid.

Existe un compuesto muy próximo a la alil-isoprofilacetamida, aunque más soluble, que es la alil-isopropilacetamida (AIA) que también es capaz de producir porfiria hepática en animales (23).

En 1959 Salomon y Figge (24), describieron una porfiria experimental en ratones y cobayos, al administrarles dicarbetoxidihidrocolidina (DDC).

Kantemir (25) y Schimd (26) en 1960, Ockner y Schmid (27), De Matteis y cols. (28) y Gajdos y Gajdos-Torök en 1961, demostraron que el hexaclorobenceno (HCB) era el causante directo de los casos de porfiria cutánea tarda que se produjeron en Turquía, entre 1955 a 1960, por la ingesta de semillas de trigo tratadas con el fungicida HCB.

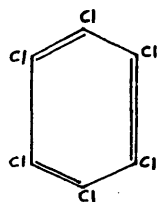
En 1963, Weston-Hurst y Paget (30) y De Matteis y Rilmington (31), publicaron unos estudios sobre el efecto de la griseofulvina en el metabolismo porfirínico de la rata. Cuando se administraba griseofulvina a 2'5% en la dieta, se producía primero un aumento de copro y protoporfirina fecales, con un acúmulo considerable de protoporfirina en el hígado, seguida a

los pocos días por una elevada excreción urinaria de ALA, PBG (los llamados "precursores de las porfirinas") y coproporfirina. Se observó también, aumento de la protoporfirina eritrocitaria y fluorescencia de las células rojas circulantes y de las células de la médula ósea. La porfirina persistió tanto tiempo como la droga fue administrada.

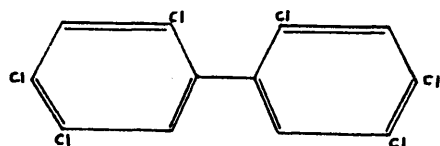
Otro compuesto, descubierto como agente porfirinogénico por observaciones clínicas, fue el 2-Alil-oxi-3-metilbenzamina. Se les administró a un paciente con artritis, por sus propiedades analgésicas y antipiréticas. Durante el tratamiento se observó un marcado aumento en la excreción de coproporfirina urinaria (32). Posteriormente se le administró a tres personas normales a dosis de 0'6 gr./día, y a otras tres, a dosis de 2'6 gr./día; en ambos grupos hubo un incremento de ALA, PBG, URO y COPROporfirinas urinarias, así como de URO, COPRO y protoporfirinas eritrocitarias. Todos estos hallazgos se lograron repetir en conejos (32) y ratas (33), a los que previamente de les administró el compuesto (34).

4.- PORFIRIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR HIDROCARBUROS AROMATICOS POLIHALOGENADOS

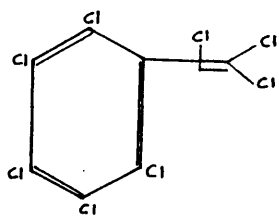
Los hidrocarburos aromáticos más importantes que dan lugar a una porfiria hepática específica son:



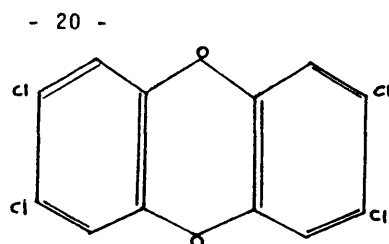
HEXAFLOROBENCENO



2,4,5,2',4',5'-HEXAFLOROBIFENILO



OCTACLOROESTIRENO



2,3,7,8- TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA

De entre los 70 compuestos químicos que han mostrado propiedades porfirinogénicas, destacan los hidrocarburos aromáticos halogenados. Son compuestos muy bien conocidos y estudiados (35), por su amplio uso en la industria y en la agricultura y por su presencia como contaminantes ambientales. Pero de todos ellos, el más estudiado como inductor de porfiria, es el hexaclorobenceno que se usa como fungicida en el tratamiento de semillas y en la manufactura de algunos clorofenoles y clorobencenos, potentes herbicidas. Su descubrimiento como agente porfirinogénico se debió a la aparición en Turquía, al final de la década de los 50, de un tipo de porfiria muy semejante a la porfiria cutánea tarda humana (26, 36, 37). El hecho fue debido a la ingestión accidental de una partida de trigo destinada a la siembra que había sido tratada con HCB.

Posteriormente se comprobó que el HCB originaba también porfiria en ratas (27), conejos (28), aves (38) y monos (39). Desde entonces la porfiria desarrollada por intoxicación con HCB constituye un valioso modelo experimental de la porfiria cutánea tarda (34, 40, 41, 42).

Con respecto a los otros hidrocarburos aromáticos polihalogenados, se ha señalado que el 2,3,7,8 tetracloro-dibenceno-p-dioxina (TCDD) es el más potente inductor de la ALA-sintetasa, en embriones de pollo (43) y causante de porfiria en ratones (44). Fue descubierto como resultado de unas investigaciones sobre la causa de la gran incidencia de porfiria en una factoría productora de herbicidas 2,4-D y 2,4,5-T (45,46).

En 1970, Vos y Koeman (47), encontraron que una mezcla comercial de bifenilo policlorado producía una acumulación de porfirinas en pollos, codornices, y ratas.

Posteriormente, Vos y Notenboom-Ram en 1972 (48) señalaron que el 2,4,5,2',4',5' hexaclorobifenilo puro era porfirogénico, así como el hexabromobifenilo (49). La porfiria por bifenilos policlorados no ha sido descrita en el hombre, aunque un envenenamiento a gran escala, 15.000 personas, se produjo debido al uso de aceite de cocina conteniendo una mezcla de bifenilopoliclorado. El hecho ocurrió en Japón en 1968, no realizándose investigaciones sobre porfiria (50).

Recientemente Strik y Koeman en 1976 (51), han demostrado que el octacloroestireno era causante de la aparición de porfiria en ratas.

4.1.- PROPIEDADES QUIMICAS, TOXICOLOGICAS Y METABOLISMO DE LOS HIDROCARBUROS AROMATICOS POLIALOGENADOS PORFIROGENICOS.

Los hidrocarburos aromáticos polihalogenados tienen todos importantes acciones tóxicas, además de su capacidad para causar porfiria.

El hexaclorobenceno, el 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina y los bifenilos polihalogenados, son de color blanco, sólidos cristalinos, insolubles en agua pero solubles en diferente grado en disolventes orgánicos, grasas y aceites vegetales.

El estudio del metabolismo del hexaclorobenceno se ha realizado dentro de los estudios experimentales encaminados a la producción de porfiria por HCB en ratas. Se ha podido demostrar que la forma más eficaz de absorción del HCB es mediante la administración oral del HCB disuelto en aceite de oliva, en dosis entre 20-180 ml./Kg. peso, aproximadamente, siendo con estas dosis la absorción intestinal del 80% (52,53). Para experimentos rápidos, el HCB disuelto en aceite de oliva, ha sido administrado por vía intraperitoneal (54).

Una vez el HCB es absorbido por el intestino, se distribuye por la mayor parte de los tejidos corporales de la rata, pero como otros compuestos liposolubles, es almacenado principalmente en el tejido adiposo, donde su concentración puede ser por lo menos diez veces superior que en el hígado (53). El HCB es lentamente eliminado del organismo, principalmente por las heces (52,53,55).

En ratas, mediante administración de HCB marcado con carbono 14, se ha determinado que la vida media del HCB oscila aproximadamente alrededor de diez días (57).

La mayor parte del HCB administrado a las ratas es convertido en metabolitos. Koss (52) mediante estudios con HCB marcado con carbono 14, ha demostrado que el 8% de las dosis totales

es excretado por la orina y el 22% por heces. Aproximadamente la mitad del total de la radiactividad excretada, era en forma de metabolitos y principalmente localizados en orina, en cambio el HCB, como tal, era el mayor componente de las heces. El metabolito hallado en mayor cantidad fue el pentaclorofenol, seguido de la tetracloroquinona y del pentaclorotiofenol. Estos metabolitos han sido encontrados también en la orina de ratas que habían sido intoxicadas durante largo tiempo con HCB (56,57).

Aunque ninguno de los diferentes metabolitos conocidos del HCB ha mostrado capacidad porfirinogénica (75,87), se ha comprobado que al menos el pentaclorofenol, principal metabolito del HCB, acelera e incrementa el desarrollo de la porfiria inducida por HCB (88).

5.- PORFIRIA POR HCB EN EL HOMBRE

El descubrimiento de que el HCB, era una de las causas del síndrome de porfiria cutánea tarda, fue debido a la aparición de un brote de porfiria producido por la intoxicación por HCB, ocurrido en Turquía entre 1955 y 1960. En ese periodo de tiempo, más de 3.000 personas presentaron un cuadro de porfiria, siendo posiblemente 5.000 personas las que desarrollaron, con mayor o menos intensidad dicho cuadro.

Cam en 1958 (58, 59), fue el primero en sospechar que el brote era debido al consumo de semillas de trigo tratadas con fungicida HCB, para atajar una plaga de un hongo denominado *Tilletia Tritici*. El trigo fue distribuido primeramente en las provincias de Urgan, Mardin, Diyarbakir, Elazig, Siirt, Bitlis y Mus, exactamente en las provincias donde posteriormente fueron detec-

tados los primeros casos de porfiria (58,59,60). Todos los pacientes con porfirina habfan consumido trigo tratado con HCB.

La etiología de la porfiria fue confirmada cuando se demostró que el HCB era porfirogénico en ratas y conejos (25,26, 27,28,29), y por la no aparición de nuevos casos después de dos años de ser retirado el trigo que anteriormente había sido distribuido.

La mayoría de los pacientes eran niños varones entre los cuatro y los catorce años de edad (36,61). Cuando la porfiria se presentaba en adultos no existía diferencia de sexos (37). La mortalidad alcanzó cifras aproximadas al 10% de los casos (62).

5.1.- CLINICA

La porfiria por HCB en el hombre, se caracteriza clínicamente por: lesiones cutáneas, consistentes en fragilidad de la piel, ampollas, hipertriosis e hiperpigmentación (niños monos); infecciones secundarias con frecuentes cambios esclerodérmicos; artritis de las articulaciones interfalángicas con hinchazón y deformación con acortamiento de los dedos. Los ataques abdominales agudos y los síntomas neuro-psiquiátricos, que son característicos de la porfiria hepática aguda (63) no se presentaron en ninguno de estos pacientes (26,61,62,64).

Algunos de estos pacientes, especialmente los niños, estaban mal nutridos y caquéticos, y aproximadamente un tercio de ellos presentaba hepatomegalia. No existen demasiados datos histológicos sobre estos enfermos: dos de ellos presentaban cirrosis; otros dos tenían degeneración hidrópica y granular del parenquima hepático con pigmento amarillo en las células parenquimatosas (37).

No se realizaron medidas de la concentración hepática de porfirinas, pero mediante estudio con luz ultravioleta de las muestras hepáticas obtenidas por biopsia, se pudo observar la típica fluorescencia roja de las porfirinas.

Las únicas alteraciones hematológicas descritas en pacientes con porfiria por HCB, eran las propias de una infección crónica (62). No existía acumulación de porfirinas en médula ósea, ni tampoco se producía fluorescencia roja celular en médula ósea al ser estudiada ésta con luz ultravioleta (37). Las manifestaciones dérmicas agudas, usualmente desaparecían a los 20-30 días después de la ingestión discontinua de HCB y su desaparición se acompañaba de una disminución de las porfirinas urinarias (36). Algunos pacientes parecían clínicamente curados, pero en otros la sintomatología permanecía, exacerbándose las lesiones en verano, estando presente estas lesiones en años posteriores.

Los niños menores de cuatro años raramente desarrollaban porfiria, pero en este grupo y particularmente en niños lactantes, se presentaba un cuadro conocido como "pembe yara" ó "pink sore", con una mortalidad del 95% aproximadamente. Las madres de estos niños o padecían porfiria o habían consumido trigo tratado con HCB. Este cuadro no solo fue descrito en niños, sino que también algunos adultos lo padecieron. No se pudo determinar si la sintomatología era causada directamente por el HCB, o por los componentes mercuriales presentes en el abono de las semillas (64).

En 1977, veinte años después de los primeros casos de intoxicación por HCB, Cripps y cols. (69) estudiaron a 32 per-

sonas porfíricas turcas, con una edad media de 29 años. Fue determinada la concentración de porfirinas en 29 porfíricos, y en 10 personas de nacionalidad turca que sirvieron de control; fueron comparadas con los resultados obtenidos de 40 personas de los EE.UU.

Diferentes alteraciones clínicas fueron encontradas en los sujetos porfíricos incluyendo: hiperpigmentación, hirsutismo, cicatrices severas, pequeña estatura, cara pálida, manos cortas, artritis indolora, debilidad y tiroides aumentado de tamaño. El nivel de porfirinas era todavía sustancialmente elevado en cinco personas. En una paciente porfírica, fue detectado HCB en la leche materna. El nivel de HCB no fue considerado suficiente para responder de la persistencia de la porfiria, pero podía ser la clave de la causa de "pembe yara" o "pink sore", por lo cual algunos niños que habían sido amamantados por madres afectas, habían muerto presentando una asociación de síntomas como debilidad, convulsiones y eritema anular.

5.2.- ALTERACIONES BIOQUIMICAS

Todos los enfermos intoxicados por la ingesta de trigo tratado con HCB presentaban una marcada porfirinuria, a menudo suficiente para que la orina fuera de color rojo, pero los tests cualitativos para la estimación de porfobilinógeno eran persistentemente negativos y las pocas estimaciones cuantitativas recogidas estaban dentro de la normalidad (67).

El aumento de la excreción urinaria de porfirinas era frecuentemente debido a la presencia de uroporfirina y heptaporfirina mayoritariamente, pero la coproporfirina y las porfirinas

con cinco y seis grupos carboxilos, también estaban presentes (36,37,62,68). Había un moderado aumento de la concentración de porfirinas en las heces de algunos pacientes (36,37,67), con aumento de las fracciones uroporfirínica y coproporfirínica.

Chu y Chu (68), usando métodos cromatográficos de determinación de isómeros demostraron en 4 pacientes que el 45-60% de la uroporfirina excretada por la orina, pertenecía a la variedad isomérica I, que el 70-75% de la coproporfirina era de la variedad isomérica III, así como el 90% de las penta, hexa y heptacarboxilporfirinas.

6.- PORFIRIA POR HEXACLOROBENCENO EN RATAS

Posteriormente a la ya mencionada aparición en Turquía de una porfiria similar a la porfiria cutánea tarda, aunque aquella con marcado predominio juvenil y masculino, causada por la ingesta de trigo tratado por HCB, Ockner y Schmid (27), lograron reproducir de forma experimental, esa forma de porfiria denominada turca, en ratas alimentándolas con una dieta que contenía HCB en proporción del 0'3%. Desde entonces la porfiria experimental inducida por HCB, ha sido aceptada como un modelo excelente de la porfiria cutánea tarda. Estudios sobre inducción de esta modalidad de porfiria en ratas, y de las alteraciones del metabolismo porfirínico de esta porfiria experimental, han sido realizados y revisados por nuestro grupo de trabajo (71,72,73).

Aunque la porfiria inducida por hexaclorobenceno en el conejo se asemeja más a la porfiria cutánea tarda humana (28), la mayoría de los autores eligen la rata por su mayor resistencia y facilidad de manejo.

6.1.- FORMAS DE INTOXICACION MEDIANTE HCB

Numerosas formas de intoxicación por HCB, para lograr la inducción de porfiria a ratas, han sido ensayadas. La adición de HCB a la dieta en proporciones oscilantes entre el 0'2% y el 0'3%, es la pauta considerada como más clásica, desde su utilización por Ockner y Schmid (27). Posteriormente ha sido utilizada por otros autores (71), entre ellos Day y cols. (74). Tiene el inconveniente que un elevado número de animales muere al mes de la intoxicación. Para intentar disminuir las tasas de mortalidad Goerz y cols. (75), emplearon una concentración de HCB del 0'05% y Day y cols. (74) del 0'07%; con estas concentraciones la mortalidad puede disminuir hasta el 5%. Con la misma intención de conseguir una inducción porfírica, pero tratando de disminuir la mortalidad San Martín de Viale y cols. (73), administró mediante sonda gástrica el HCB, a dosis de 1.000 mg/día/Kg. de peso, suspendido en agua con la ayuda de Twen 20. Con esta dosis, el índice de mortalidad es alto y precoz (71,73), obteniéndose buenos resultados si la administración de HCB se realiza a dosis más bajas y no superando un periodo mayor de tiempo de cinco semanas (71,73).

De todas las pautas utilizadas, la empleada por Doss y cols. (50) es la más útil; en ella se vehicula el HCB en aceite de oliva; de esta forma la absorción intestinal del HCB puede llegar a ser del 80% (52) mientras que en suspensión acuosa es solo del 5-6%. Las dosis de HCB que permiten un mejor estudio de todas las fases de la porfiria por HCB, oscilan entre 50-100 mg/día/Kg. de peso.

Sweney y cols. (54) demostraron que una sola dosis de HCB, aunque sea muy alta, no induce porfiria.

6.2.- FACTORES QUE MODIFICAN LA ACCION PORFIRINOGENETICA DEL HEXACLOROBENCENO

Además de las dosis y de las formas de vehiculización utilizadas en la administración del HCB, existen una serie de factores que determinan cierto grado de variabilidad en el comportamiento porfirinogenético del HCB.

Ha sido comprobado por diferentes autores (76,78,79,42, 81,51), que las ratas hembras desarrollan porfiria más rápidamente que las ratas machos. Esto es debido a su mayor susceptibilidad a la acción porfirinogenética del HCB, lo que les lleva a tener un índice de mortalidad también más elevado. Si a una rata macho se le administran estrógenos, su respuesta a la intoxicación por HCB, se iguala a la respuesta de las ratas hembras. Si por el contrario a una rata hembra se le practica una ovariectomía, la susceptibilidad de la misma al HCB disminuye.

Smith y cols. (77) demostraron que dentro de las ratas hembras, las de raza Agus son más susceptibles que las de raza Porton-Wistar, a la intoxicación por HCB. No solo existe diferencia en la respuesta al HCB dependiendo de la raza o del sexo, sino que dentro de una misma camada y un mismo sexo, la susceptibilidad a la intoxicación por HCB, y por consecuencia la respuesta a la misma, es individual para cada rata.

En el afán de conseguir un modelo experimental de porfiria lo más semejante a la porfiria cutánea tarda, se administró hierro a las ratas, bien previa o simultáneamente a la admi-

nistración de HCB, con el fin de que desarrollaran hepatosiderosis, hecho muy frecuente en la PCT humana, y que con la simple administración de HCB no se conseguía (82).

Taljaard y cols. (83) y Bach y cols. (84) comprobaron que las ratas que, previamente a la intoxicación por HCB, habían sido convertidas en sideróticas mediante la administración de hierro, desarrollaban porfiria más rápida y con mayor intensidad que las no sideróticas. No siendo imprescindible la administración de hierro para el desarrollo de la porfiria.

Por otra parte, es un hecho demostrado (85) que en animales ferropénicos no es posible producir porfiria administrando el compuesto porfirinogénico 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina. Asimismo, la sobrecarga y deplección de hierro potencian y disminuyen respectivamente, la acción porfirinogénica del HCB (86).

6.3.- FASES DE LA INTOXICACION POR HCB

Durante la intoxicación por HCB y mediante estudios seriados de las porfirinas excretadas por orina y heces, se ha logrado comprobar (17,75,89,71) que a las cuatro semanas de intoxicación, la eliminación de porfirinas está muy levemente incrementada, manteniéndose prácticamente normal o presentándose una leve coproporfirinuria y porfirinorrea (86) que contrasta con la intensa uroporfirinuria que aparece a partir de la sexta semana de intoxicación (89,83,75).

Este periodo de latencia es interpretado por Elder y cols. (89) como el intervalo de tiempo que ha de transcurrir hasta que se llegue a nivel crítico de HCB. Hay que tener en cuen-

ta que el acúmulo de HCB se realiza de forma progresiva (78), no apreciándose relación entre la cantidad de HCB hepático y el grado de porfiria o las alteraciones en la concentración de hemoproteínas (42). Algunos autores como Debets y Strick (88) opinan que el tiempo transcurrido hasta que se establece un grado de porfiria intenso, puede ser debido no a la necesidad de alcanzar un nivel crítico de HCB, sino de alcanzar una concentración crítica de algún metabolito del mismo. Tampoco está claro si la porfiria se desarrolla tan pronto como el nivel crítico se alcanza, o bien es necesario una vez llegado a este nivel algún otro cambio, como podría ser la alteración de las organelas intracelulares, a través de la cual se produciría la porfiria (8).

Por otra parte, la hepatomegalia presente comunmente en la porfiria por HCB, aparece progresivamente (90) aumentando hasta alcanzar su máximo tamaño tras un período de intoxicación de 5 a 9 semanas, para después ir, paulatinamente, disminuyendo de tamaño hasta hacerse incluso de tamaño menor al normal; aproximadamente esto ocurre alrededor de la 12^a semana de intoxicación.

6.4.- DETERMINACION DE PORFIRINAS EN RATAS INTOXICADAS POR HCB.

Los primeros estudios sobre la composición de la mezcla de porfirinas excretadas por la orina, fueron realizadas mediante técnicas de partición solvente por Ockner y Schmid (27), De Matteis y cols. (28), Simon y cols. (92), Taljaard y cols. (83) y Stonard (42). El mismo Taljaard y cols. (83), San Martin de Viale y cols. (76) y Elder (91) realizaron el estudio mediante técnicas cromatográficas.

Como ya hemos comentado anteriormente la intoxicación por HCB produce en las ratas una eliminación de porfirinas muy discreta durante las cuatro primeras semanas, disparándose la excreción porfirínica durante la 6^a semana, con una intensa uro porfirinuria.

El estudio del reparto porcentual (71,72,73) de las diferentes carboxilporfirinas demuestra que son las porfirinas con mayor número de grupos carboxilos las que se elevan predominantemente a partir de la 4^a semana, tanto en heces como en orina, pero detectándose en heces la presencia de isocoproporfirina P_1 a partir de la 2^a ó 3^a semana de intoxicación (8).

La coproporfirina auténtica (4-COOH) sufre en las fases más avanzadas de la intoxicación un descenso que la lleva incluso por debajo de su nivel normal, mientras que el resto de las porfirinas principalmente las policarboxílicas sufren un aumento progresivo.

El ácido delta-aminolevulínico (ALA) y el porfobilinógeno (PBG) son excretados en grandes cantidades en las fases en que la intoxicación es más intensa.

La protoporfirina lipofílica se elimina exclusivamente por vía bilio-fecal. Mientras que las porfirinas hidrosolubles, corresponden a las porfirinas con mayor número de grupos carboxilos (8 y 7 COOH), se eliminan lógicamente con preferencia por la orina. Sin embargo, la coproporfirina (4 COOH) que habitualmente es eliminada con ligera preferencia por las heces, en las ratas porfiricas por HCB, se elimina en cantidades mayores por orina (93).

Mediante las técnicas cromatográficas (94) se han estudiado en ratas intensamente porfíricas las cantidades de porfirinas acumuladas en los diferentes órganos. El hígado, como órgano principal de la elevada síntesis de porfirinas, es la localización donde hay mayor acúmulo de porfirinas. A continuación, le sigue el riñón, ya que por la orina son excretadas las porfirinas hidrosolubles, las cuales también se localizan a nivel del bazo y del pulmón.

Estos acúmulos han sido comprobados y demostrados por diversos autores (92,83,89,41,79,74,21). Las porfirinas se acumulan también en el tejido óseo no haciéndolo en médula ósea, ni en las células rojas. No existe duda entre los diferentes autores sobre que las porfirinas excretadas son principalmente de la serie isomérica III.

6.5.- ALTERACIONES ENZIMATICAS Y PATOGENIA DE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HCB.

Las enzimas participantes en la biosíntesis del HEM, que se ven en mayor o menor grado, alteradas por la intoxicación hexaclorobencénica son por orden cronológico las siguientes:

6.5.1.- Delta aminolevulin-sintetasa (ALA-asa). Esta enzima limitante de la porfirina síntesis, muestra un incremento de su actividad a nivel hepático en las ratas porfíricas por HCB (54,104,92,83,42,38) aunque el aumento es menor que en otros tipos de porfiria experimental.

Una gran gran dosis única de HCB (54,119) produce inmediatamente un aumento de la actividad hepática de la ALA-asa; sin embargo, la administración prolongada de unas dosis más

pequeñas de HCB, no da lugar a un aumento de ALA-asa hasta que no se produce el comienzo del cuadro porfírico (92,104,44).

6.5.2.- Amino levulin-dehidrasa y uroporfirinógeno-sintetasa. Pueden estar también aumentadas, como la anterior, en un esfuerzo compensatorio del déficit de la uroporfirinógeno-decarboxilasa.

6.5.3.- Uroporfirinógeno decarboxilasa. La enzimopatía básica de la porfiria inducida por HCB es una disminución de la actividad hepática de la uroporfirinógeno-decarboxilasa (89). Este descenso de la actividad también es demostrable en riñón (120) e incluso en colon (86). Esto ha dado lugar a una original, pero no demostrada hipótesis de la escuela sudafricana que sugieren el origen en estos órganos de la mayoría de las porfirinas excretadas, mediante una síntesis exagerada en estas localizaciones.

En el bazo y en los glóbulos rojos la actividad de la uroporfirinógeno-decarboxilasa es normal.

En 1961, De Matteis y cols. (28) sugieren la posibilidad de que la causa de la porfiria por HCB podría estar en una interferencia en el mecanismo de decarboxilación del uroporfirinógeno.

Taljaard y cols. (83) fueron los primeros en realizar mediciones de la uroporfirinógeno-decarboxilasa en ratas intoxicadas por HCB. Encontraron que la enzima se podía demostrar fácilmente en los hígados de los animales normales, pero que no podía ser detectada en los hígados de las ratas porfirínicas que previamente habían sido hechas sideróticas. Sin embargo la actividad de la uroporfirinógeno-decarboxilasa en el

hígado de las ratas porfíricas no sideróticas era igual que en los animales control.

Posteriormente San Martín de Viale y cols. (121,122) lograron demostrar la disminución de la actividad de la uroporfirinógeno-decarboxilasa, cifrándola alrededor del 76% de su valor normal, usando uroporfirinógeno como sustrato. La demostración fue realizada sobre hígados de ratas intoxicadas con HCB, pero a las que previamente no se les había administrado hierro. Asimismo, demostraron la normalidad de la actividad de la uroporfirinógeno-decarboxilasa en el bazo y en las células rojas de la sangre.

Elder y cols. (89,123) demostraron que la actividad de la UROG-D disminuía paulatinamente a medida que la porfiria se desarrollaba.

6.5.4.- Coproporfirinógeno-oxidasa. La actividad hepática de esta enzima es normal. Sin embargo la coproporfina III es excretada en cantidades mayores de lo habitual; este hecho, aparentemente, se contradice con lo anteriormente expuesto sobre la disminución de la actividad de la uroporfirinógeno-decarboxilasa que daría lugar a una disminución en la excreción de coproporfirina III. Elder (124) ha explicado esta aparente contradicción, diciendo que el pentaporfirinógeno III que se encuentra en grandes cantidades acumuladas en el hígado actuaría de forma competitiva con el coproporfirinógeno III para la coproporfirinógeno-oxidasa, de forma que aunque esta sea normal en este tipo de porfiria, al no actuar sobre su natural sustrato, el coproporfirinógeno III, este se vería incrementado en cifras

superiores a lo normal, hecho que se traduciría en un aumento del acúmulo y la excreción de coproporfirina III. Por otra parte, el pentaporfirinógeno bajo la acción de la coproporfirínogeno-oxidasa, se transformaría en isocoproporfirínogeno (124), siendo excretada por bilis y eliminada por las heces (81,87), pudiendo encontrarse también en la orina en cantidades pequeñas.

Existe todavía disparidad de opiniones sobre cual es el mecanismo mediante el cual se produce la hipofuncionalidad de la uroporfirínogeno-decarboxilasa. Simon y cols. (92), piensan que una posible alteración de las membranas celulares podría tener gran importancia en la patogénesis de la porfiria cutánea tarda y de su modelo experimental, la porfiria por HCB. El HCB que es una sustancia fuertemente lipofílica podría unirse a los fosfolípidos de las membranas lipoprotéicas dando lugar a un cambio en la orientación de sus moléculas que produciría alteraciones en la permeabilidad de la membrana.

En contra de esta opinión, la escuela holandesa defiende la hipótesis de que la alteración de la biosíntesis del HEM es debida al ataque directo sobre la uroporfirínogeno-decarboxilasa, producido o llevado a cabo por algún producto intermedio o metabólico del HCB. Este producto reactivo intermedio, que tendría una vida media corta, podría ser quizá conjugado por glutatión, el cual disminuiría, originando un aumento de la concentración de iones metálicos libres que habitualmente forman complejos con él. Los iones metálicos libres ante la escasez de glutatión podrían unirse a los grupos -SH catalíticos de la uroporfirínogeno-decarboxilasa inhibiéndola (125). Corroborando

esta hipótesis se sabe que una de las vías metabólicas de los compuestos aromáticos polihalogenados es glutatión dependiente, dando lugar a la formación de sulfometabolitos: pentaclorotiofenol, pentaclorotioanisol, tetraclorotiofenol, tetraclorotioanisol y tatracloroditioanisol (126). Pero no se ha llegado a demostrar una disminución significativa de glutatión durante el curso de la intoxicación por HCB, si bien la administración paralela de agentes depleccionantes de glutatión da lugar a un aumento en la actividad porfirinogénica del HCB (127,128).

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, actualmente no se ha demostrado que ninguno de los metabolitos conocidos del HCB tenga capacidad porfirinogénica (129,78), aunque tanto el pentaclorobenceno como el pentaclorofenol inducen al citocromo P-45 hepático (75).

Lo que se ha demostrado por Debets y cols. (88) es el aumento de la acción porfirinogénica del HCB, debida a su principal metabolito, el pentaclorofenol (73).

7.- SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS ENTRE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HCB Y LA PORFIRIA CUTANEA TARDA HUMANA.

Actualmente la porfiria inducida por HCB está totalmente aceptada como un modelo experimental válido de la porfiria cutánea tarda. Inclusive Pearson y Malkinson (95), llegaron a reproducir en las ratas, las lesiones dérmicas que aparecen en la PCT. Ello lo consiguieron mediante la exposición, durante largos periodos de tiempo a la luz ultravioleta de áreas de la piel de los animales previamente rasuradas. Al cabo del tiempo, en las zonas expuestas se producían lesiones consistentes en

ampollas, erosiones y fragilidad cutánea, idénticas a las presentes en la PCT humana.

La porfiria por HCB y la PCT poseen una serie de peculiaridades que sirven para distinguirlas netamente de los restantes tipos de porfiria (96).

1.- Existe un acúmulo hepático intenso (83,87) que se acompaña de una excreción urinaria muy elevada (98,76) de heptacarboxil porfirinas y de octocarboxil porfirinas (uroporfirinas).

2.- Alteraciones a nivel hepático que se traducen en lesiones histopatológicas demostrables mediante microscopía óptica y electrónica. Estas lesiones son poco características ya que pueden aparecer en otros tipos de hepatopatías (82). La clínica producida por las alteraciones hepáticas es muy discreta.

3.- En ambos tipos de porfiria se detecta la presencia en heces de las isocoproporfirinas estudiadas por Elder (99,100).

4.- Asimismo, existen en ambas, cantidades elevadas, a nivel hepático del citocromo P-450 (102,103); disminución de la actividad de la enzima uroporfirinógeno-decarboxilasa (89, 101) y discreta elevación de las tasas de la aminolevulinico-sintetasa hepática (103,104).

No obstante, todas las importantes semejanzas anteriormente citadas, existen diferencias entre ambos tipos de porfiria. En las ratas intoxicadas con HCB existe un marcado incremento en la eliminación urinaria de los precursores, tanto del ácido deltaaminolevulínico como del profobilinógeno (27,75). Además, las porfirinas acumuladas y excretadas por las ratas son

pertenecientes a la variedad isomérica III, en casi su totalidad (40,76). En un trabajo realizado por Enriquez de Salamanca y cols. (73) demostraron que la heptacarboxilporfirina excretada por la orina de ratas porfíricas, presentaba un escaso incremento, de forma que aunque superaba el valor de la tetracarboxilporfirina (4-COOH) se situaba en cifras inferiores al 20%; este dato ha sido confirmado por estudios realizados por otros autores (40,83,89).

El valor medio obtenido de heptacarboxilporfirina en enfermos con PCT es del 32% aproximadamente.

Por otra parte, en las ratas porfíricas, la excreción fecal de octocarboxil-porfirinas (8-COOH) es mayoritaria mientras que en enfermos con PCT solo alcanza cifras aproximadas al 2%.

En esta comparación de los patrones distributivos de las diferentes carboxil porfirinas urinarias y fecales, de la PCT y la porfiria por HCB, resulta destacable la mayor eliminación fecal porcentual en los animales de las porfirinas más policarboxílicas en detrimento de las tetracarboxílicas, aunque la relación P₁/copro aumenta en igual proporción en la porfiria por HCB que en la PCT.

Como ya comentábamos anteriormente, a pesar de que la porfiria por HCB es considerada como un modelo ideal de la PCT, De Matteis y cols. (28) han demostrado que en conejos intoxicados por HCB se desarrolla una porfiria con mayores semejanzas a la PCT que la que se desarrolla en ratas, y ello no solo por su bioquímica sino porque no aparecen los signos neurológicos tan frecuentes en las ratas.

9:

II - MATERIAL Y METODOS

8.-MATERIAL DE EXPERIMENTACION

Se ha estudiado la excreción porfirínica de 36 ratas hembras de raza Wistar, cuyo peso oscilaba entre 190 y 350 gr. Dichas ratas fueron divididas en tres grupos. El grupo I comprendía 12 ratas control. El grupo II compuesto por 18 ratas, sufrió una intoxicación por HCB que fue estudiada en grupos de tres ratas, de forma secuencial. Al grupo III con 6 ratas se le modificó la pauta de intoxicación para estudiar posibles cambios estructurales en la respuesta a dicha intoxicación.

Fue utilizado material usual de laboratorio con reactivos y aparataje citado en la sección de métodos.

9.-METODO DE INDUCCION DE PORFIRIA EXPERIMENTAL

Se dividieron las ratas en dos grupos (II y III) siguiendo en cada uno pautas de intoxicación diferentes.

A las 18 ratas componentes del grupo I se les hizo sideróticas, previamente a la intoxicación por HCB, mediante la administración de hierro-dextrano (Inferon) por vía intraperitoneal, durante dos semanas a dosis de 10 mg/día (descansando sábados y domingos). Tras 10 días de intervalo, se comenzó la intoxicación de las ratas mediante administración de hexaclorobenceno (Merck), a dosis de 50 mg/kg. de peso/día y vehiculado en aceite de oliva (disolviéndose 50 mg. de HCB en 1'5 cc. de aceite de oliva). La suspensión se administró a las ratas por medio de una sonda gástrica.

El estudio de porfirinas se comenzó a realizar a las dos semanas de iniciada la intoxicación, en esa fecha se sacrificaron tres ratas, previa recogida en jaula metálica de muestras

urinarias y de heces, para estudio anatomopatológico. El estudio se prosiguió mediante sacrificio semanal de grupos formados por tres ratas, hasta completar el total de 18 ratas, lo cual sucedió a la 7ª semana de intoxicación.

El grupo III, compuesto por 6 ratas, también fue hecho previamente siderótico. Asimismo, se dejó transcurrir diez días después de la administración del hierro, antes de comenzar la intoxicación por HCB. La pauta de intoxicación en este grupo fue la siguiente: dosis de 50 mg/kg. de peso/día en suspensión con aceite de oliva, administrado por sonda gástrica durante seis semanas. Posteriormente y durante cuatro semanas, se administró la misma dosis, pero esta vez, en días alternos. El sacrificio de las ratas se realizó a las cuatro semanas de concluir la intoxicación, realizándose previamente en jaula metálica recogida de muestras de heces y orina para estudio de excreción porfirínica.

Una vez sacrificadas las ratas fueron estudiadas gran parte de sus vísceras mediante microscopía óptica y electrónica.

10.-MÉTODOS DE DETERMINACION DE PORFIRINAS

Estos métodos están basados principalmente en las propiedades físico-químicas que poseen las porfirinas: fluorescencia, espectros de absorción, solubilidad, esterificación e hidrólisis de los ésteres.

Fluorescencia .- Las porfirinas en solución de ácidos minerales o solventes orgánicos, emiten una fluorescencia roja intensa y característica al ser estudiadas bajo luz ultravioleta. Esta propiedad se utiliza en la demostración de cantidades

pequeñas de porfirinas, permitiendo su valoración aunque exige para ello que el grado de purificación sea elevado ya que cualquier impureza o turbidez interfiere esta propiedad.

El espectro de fluorescencia de las porfirinas libres es idéntico al de sus ésteres para un mismo solvente, pero difiere según la naturaleza del solvente: solvente orgánico y soluciones alcalinas, soluciones ácidas fuertes, soluciones ácidas fuertes y complejos metálicos.

Espectroscopía:- Propiedad común a todas las porfirinas es la existencia de un espectro característico de absorción de la luz visible, y de la luz ultravioleta. Es debido a la disposición de dobles enlaces del anillo tetrapirrólico (resonancia) Esta propiedad tiene gran importancia en la identificación y determinación de las distintas porfirinas ya que cada una de ellas presenta un tipo característico de espectro de absorción. La conversión de las porfirinas libres en sus ésteres no produce cambios apreciables en el espectro de absorción lumínica. Todas las porfirinas tienen una intensa banda de absorción a una longitud de onda aproximada de 400 milimicras: banda de Soret (106, 107, 108).

Solubilidad:- Las porfirinas presentan grupos ácidos (-COOH) en sus cadenas laterales y átomos de nitrógeno (N) básicos en los vértices de los anillos pirrólicos, lo que les confiere propiedades anfotéricas y solubilidad en soluciones acuosas tanto ácidas como alcalinas.

Los ésteres de las porfirinas y sus metal-quelatos, son mucho más solubles en disolventes orgánicos, cloroformo,

tetracloruro de carbono, benceno, etc., que las porfirinas libres. Estas en estado sólido no se disuelven fácilmente en éter o acetato de etilo, en cambio en solución ácida son solubles en estos solventes. De aquí la utilidad de la mezcla acetato de etilo-ácido acético o de éter-ácido acético para la extracción de las porfirinas, o acetona - ácido clorhídrico, o de ácido oxálico-metanol.

La hidrosolubilidad de las porfirinas depende directamente del número de grupos carboxilo (-COOH) libres presentes en las cadenas laterales de sus moléculas. Así la octocarboxilporfirinas (uroporfirina) es muy hidrosoluble, siendo prácticamente insoluble en éter. Los porfirinógenos (incoloros) son convertidos en sus correspondientes porfirinas (fluorescentes) por oxidación. Esta se puede conseguir mediante oxígeno, luz o agua oxigenada. El grado excesivo de oxidación puede producir la destrucción de las porfirinas.

Esterificación:- La formación de metil-esteres de las porfirinas es sencilla. Actualmente se utilizan soluciones de metanol-ácido sulfúrico, diazometano o trifluoruro de boro. Pueden utilizarse soluciones de metanol-ácido sulfúrico en relación de volumen 95:5, 99:1 ó 90:10, que difieren en la distinta velocidad de formación de esterres. Esta es completa al cabo de 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, incluso para la URO, tras 8 horas a 20°C, o después de 10 minutos a 45°C. Cien mililitros de esta solución es suficiente para esterificar varios miligramos de porfirinas. La presencia de agua altera el proceso originando esterificaciones imparciales, debiendo

evitarse por tanto, una concentración acuosa superior al 5-10%. Los esteres de las porfirinas en solución metanol-ácido sulfúrico pasan al cloroformo tras su agitación con una cantidad suficiente de agua, necesaria para la separación de las fases.

La fase clorofórmica debe ser neutralizada con soluciones de NaOH al 2% o de NH_4OH al 5%, para evitar una acidez excesiva que pudiera hidrolizar parcialmente los esteres. El cloroformo debe también ser lavado con agua, puesto que la alcalinidad también puede saponificar los esteres (108,109).

10.1-PORFIRINAS URINARIAS

El test de Screening para las porfirinas urinarias se basa en la característica propiedad de estas de fluorecer bajo la luz ultravioleta.

Se mezclan 1 ml. de orina con una mezcla formada por éter-ácido acético glacial-alcohol amílico en proporción 1:1:1. Tras agitar y dejar reposar se separarán dos fases pudiendose detectar fluorescencia roja en la fase superior, con una tonalidad más o menos intensa según la cantidad de porfirinas presentes. De esta forma se extraen tanto la URO como la coproporfirina por lo que este test no diferencia porfirinas de porfirinurias secundarias.

10.2- PORFIRINAS FECALES

Una pequeña muestra de heces (0'5-1 gr.) se coloca en el fondo de un tubo de ensayo que contiene unos 3 ml. de la citada mezcla de éter - ácido acético glacial- alcohol amílico y tras homogeneizar y centrifugas se observa a la luz ultravioleta la presencia de fluorescencia roja-rosa.

10.3-DETERMINACION CUANTITATIVA DE COPRO Y UROPORFIRINAS

URINARIAS

Se ha utilizado el método de Gajdos y Gajdos-Torök (11).

Cinco mililitros (5 ml.) se mezclan con 0'5 ml. de ácido acético glacial y 70 ml. de éter, se agitan en un embudo de decantación. La COPRO pasa al éter que es lavado dos veces con 2 ml. de acetato sódico al 3%. La primitiva fase acuosa y estas aguas de lavado de acetato se reúnen para la determinación de URO (fracción B). Del éter se extrae la COPRO con ácido clorhídrico al 5% en sucesivas extracciones y se ajusta el pH de estas fracciones clorhídricas a pH 4, con acetato sódico cristalizado, volviendo a pasar la COPRO al éter (10 ml.), comprobándose este paso mediante el exámen de la fluorescencia bajo luz ultravioleta. Lavar el éter con una solución de iodo (1/10.000) para convertir el coproporfirinógeno en coproporfirina y posteriormente lavar con acetato sódico al 3%. Extraer la COPRO con ácido clorhídrico al 5% y leer en el espectrofotómetro en 380, 430 y 402 m.

CALCULOS

$2 D_{402} - (D_{380} + D_{430}) \times 0'817 \times \text{volumen final en ml.} \times 2 = \text{microgramos de COPRO por 10 ml. de orina.}$

La fracción denominada B, se ajusta a pH 4 con acetato sódico cristalizado y se vierte en un embudo de decantación en el que se añade el doble de su volumen de una mezcla de acetato de etilo-ácido acético glacial en proporción 3:1 que capta la URO existente. Después de un rápido lavado con agua destilada, se extrae la URO con pequeñas fracciones de HCL al 5% hasta la

desaparición completa de la fluorescencia. Leer en 380,430 y 405 m, frente a un blanco de ácido clorhídrico al 5%.

CALCULOS

$2 D_{405} - (D_{380} + D_{430}) \times 0'831 \times \text{volumen final en ml.} \times 2$
= microgramos de URO por 10 ml. de orina.

También puede obtenerse la URO a partir de esta denominada fracción B mediante la metodica de Rimington (110): Dicha fracción es llevada a pH 1'5 con ácido clorhídrico, se extrae dos veces seguidas con la mitad de su volumen con ciclohexanona, permitiendo una clara separación de las fases. A los combinados extractos de ciclohexanona se añade un volumen doble de éter agitando. La URO es extraída agitando con pequeñas fracciones de HCl al 5% , hasta desaparición de la fluorescencia. Filtrar o centrifugar y leer en el espectrómetro (111).

10.4- PORFIRINAS FECALES

Se ha utilizado el método de Holti y cols. (112). Dicho método está basado en la extracción mediante éter acidificado de las porfirinas éter-solubles (COPRO y PROTO). Es sencillo, rápido pero inexacto, pues aparte de no estimar la URO (éter insoluble) las fracciones obtenidas y denominadas CORPO y PROTO son en realidad mezcla de diferentes carboxilporfirinas.

Se toman 0'2 gr. de heces y homogeneizan con fracciones de éter acidificado con ácido acético glacial en proporción 10:1, centrifugándose y decantando el éter en un embudo de decantación. Lavar el éter con acetato sódico al 3%, solución de iodo y agua y extraer la COPRO con pequeñas y sucesivas cantidades de HCl 0'1 N hasta desaparición de la fluorescencia. La PROTO se

extrae con HCL al 5%. Las clorofilas permanecen en la fase estérrea debido a su más alto número clorhídrico.

CALCULOS

$2 \cdot D_{402} - (D_{380} + D_{430}) \times \text{volumen final en ml.} \times 0.817 \times 5 =$
microgramos de COPRO / gramo de heces frescas.

$2 \cdot D_{409} - (D_{380} + D_{430}) \times \text{columen final en ml.} \times 1.222 \times 5 =$
microgramos de PROTO/gramo de heces frescas.

Debido al diferente grado de hidratación de las heces es usual la expresión de los resultados en microgramos de porfirinas por gramos de heces desecadas, para lo cual una muestra de las heces se lleva a la estufa a 100°C. hasta peso constante.

10.5-INDIVIDUALIZACION DE LAS CARBOXIL-PORFIRINAS EXCRETADAS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE SUS METIL-ESTERES.

Esterificación.- Las porfirinas urinarias son absorbidas en talco (0.5-1 gr.por cada 10 ml.) tras ajustar el pH de la orina a 3-4 mediante ácido acético glacial. Después de filtrar y secar el talco en estufa a 37°C. y en oscuridad, este talco desecado se trata con metanol sulfúrico (95:5 vol/vol) durante al menos 24 horas para convertir las porfirinas libres en sus metil-esteres.

Las muestras de tejido hepático, los hematfies y las heces pueden ser directamente tratadas con metanol-sulfúrico para la esterificación (113).

Extracción.- Después de centrifugar, el metanol sulfúrico es llevado a un embudo de decantación en el que se añade cloroformo (10-30 ml.), agua destilada (100-150 ml.) y cantidad

suficiente de una solución al 5% de amoníaco para llevar el pH por encima de 4, evitando así la hidrólisis parcial por una acidez excesiva. Tras agitación, el cloroformo captará o extraerá los metil-esteres de las porfirinas y después de un lavado con agua destilada se filtra a través de sulfato sódico anhidro. Mediante exámen de estos extractos clorofórmicos a la luz ultravioleta se podrá apreciar de forma aproximada la cantidad de porfirinas presentes para decidir sobre la necesidad o no de concentrar dichos extractos.

Los residuos secos de los extractos clorofórmicos pueden ser guardados y almacenados en oscuridad sin perder actividad durante al menos un año (114).

Cromatografía.- Los extractos clorofórmicos son aplicados mediante microjeringas Hamilton a placas de sílica gel (20x20 cm.) sin indicador de fluorescencia, de espesor 0'25 mm. sobre soporte de cristal o aluminio (Merck) que pueden ser previamente activadas mediante calentamiento a 80-100°C durante 30-60 minutos. La aplicación puede realizarse en forma de bandas longitudinales de 1-2 mm. de ancho por 2-4 cm. de largo o en forma puntiforme si se pretenden cromatografías cuantitativas. Las placas se someten a un corto recorrido en cloroformo-metanol (130:20 vol/vol) hasta que las bandas hayan ascendido 1 ó 2 cm. y formen un nuevo frente más estrecho y purificado. Se seca mediante aire caliente. En ocasiones puede ser útil un recorrido previo de la placa en un solvente formado por éter de petróleo-dietil éter (4:1 vol/vol) con el cual los esterios del colesterol, triglicéridos y los metil-esteres de los ácidos grasos

emigran en el frente del recorrido separándose perfectamente de las porfirinas.

Hemos empleado el sistema solvente sugerido por Sears y cols. (116) que consiste en: tetracloruro de carbono-dicloro-metano-acetato de etilo-propionato de etilo (2:2:1:1). Dicho sistema es una modificación del de Elder (117).

La detección de porfirinas bajo la luz ultravioleta puede ser intensificada impregnando los cromatogramas con un spray a base de iso-octano, éter de petróleo o benceno, también volviendo a correr las placas en un nuevo solvente formado por cloroformo-Keroseno (7:3 vol/vol) como ha sido comunicado recientemente por Day, Enriquez de Salamanca y Eales (118).

Hemos utilizado un Scanner, fluorímetro marca Camag, modelo T, provisto de un fotomultiplicador sensible al rojo HTV R-136, filtro primario y filtro secundario. El Scanner está conectado a un registrador gráfico W + W 1.100 cuya velocidad de registro solemos hacer oscilar entre 2 y 4 cm/min. La amplitud de las áreas registradas puede regularse mediante mando expansor de escala (1,2,5,10,50 mv).

Las áreas registradas fueron planimetradas para calcular el reparto porcentual correspondiente a cada carboxil-porfirina.

Los índices PCT descritos por Enriquez de Salamanca y cols. (66,70) resumen los rasgos más característicos del patrón cromatográfico observados en la PCT. Básicamente consistentes en los cocientes % heptacarboxilporfirina (7-COOH) / % tetracarboxilporfirina (4-COOH) para la orina y % heptacarboxil-

porfirina (7-COOH) + % isocoprofirina (P₁) /% tetracarboxilporfirina para las heces, quedan fijados entre 0 y 100 mediante las fórmulas:

$$\text{I.PCT orina} = \frac{\% (7\text{-COOH}) \times 100}{\% (4\text{-COOH}) + \% (7\text{-COOH})}$$

$$\text{I.PCT heces} = \frac{(\% (7\text{-COOH}) + \% P_1) \times 100}{\% (4\text{-COOH}) + \% (7\text{-COOH}) + \% P_1}$$

Empleando porfirinas puras patrones (Porphyrin Products, B. Burham, Utah, USA) la cromatografía de las porfirinas hepáticas aportó datos cuantitativos.

11.-METODOS ANATOMOPATOLOGICOS

Tras anestesia profunda se procede al sacrificio de los animales experimentales, tomándose muestras de diferentes vísceras para estudio a microscopía óptica y electrónica.

11.1- MICROSCOPIA OPTICA

11.1.1-Método de Perls.- Para investigación de depósitos férricos.

La pauta seguida es:

1- Se desaparafina e hidrata. En xilol 20 minutos para desaparafinar, se hace un pase ligero por alcohol absoluto y seguidamente por alcohol de 96°. Se lava.

2- En un borrel se echan 40 cc. de ácido clorhídrico al 2% y 40 cc. de agua destilada. Teniéndose en esta mezcla durante 20 minutos.

3- Se lava con agua destilada.

4- Se coloca la muestra en un porta con rojo neutro o picrofuchina durante un minuto,

5- Se lava con agua destilada.

6- Se deshidrata con alcohol de 96° , seguidamente con alcohol absoluto y por último con xilol.

7- Se monta según técnicas habituales.

11.1.2- Método de hematoxilina-eosina.- Según la técnica de Heidenhain (80) para teñir un tejido general.

Soluciones:

A- Solución Heidenhain n° 1 (hierro)

B- Solución Heidenhain n° 2 (hematoxilina)

C- Eosina acuosa.

Técnica:

1- Mantener los cortes en solución A durante media a 24 horas. El tiempo varía con el material y el fijador.

2- Lavar con agua.

3- Pasar a solución B y mantener en esta solución el mismo tiempo que en la solución A.

4- Lavar con agua.

5- Distinguir en A. Control de la tinción bajo microscopio.

6- Lavar con agua corriente durante 5 minutos.

7- Mantener el preparado en solución C durante 1-3 minutos.

8- Lavar al grifo con agua. Deshidratar, limpiar y montar en DPX.

11.1.3-Reacción del P.A.S. - Para estructuras polisacáridas en tejidos animales y vegetales según técnica de Hotchkiss (105).

Soluciones:

A- Acido periódico- 0'4 gr.

- Agua destilada- 45 ml.

- Acetato sódico M/5 - 5 ml.

B- Agua adestilada - 10 ml.

- Acido periódico - 0'4 gr.

- Acetato sódico M/5 - 5 ml.

- Etanol absoluto- 35 ml.

C- Iodato potásico- 1 gr.

- Tiosulfato sódico pentahidratado - 1 gr.

- Agua destilada- 20 ml.

- Disolver: mezclar filtrando.

- Etanol absoluto - 30 ml.

- Acido clorhídrico 2N - 0'5 ml.

D- Reactivo de Schiff.

E- Agua destilada- 45'5 ml.

- Acido clorhídrico concentrado -0'5 ml.

- Metabisulfito de potasio - 0'2 ml.

Técnica:

1- Las secciones son pasadas por alcohol. Una vez hecho esto, se introduce en solución A o B durante 5 minutos (si el fijador utilizado es el alcohol, entonces se emplea la solución B en lugar de la A).

2- Se vierte la solución. Inundar en alcohol de 70°

3- Inmersión durante 5 minutos en solución C.

4- Inundar con alcohol 70%. Verter entonces con inmersión en solución D durante 15 a 45 minutos.

5- Lavar dos o tres veces en solución E, deshidratar y montar según técnicas habituales.

11.1.4-Método de F. Llanes.- Para demostración histológica de la fluoresceína sódica (132).

Se aporta por vía oral, parenteral o instalación en mucosas fluoresceína sódica acuosa al 30% en pequeñas cantidades que a títulos orientativos pueden ser 10 mm³ por kg. de peso corporal en inyección endovenosa o una gota instalada en conjuntiva. Los bloques de tamaño adecuado de los tejidos que van a ser estudiados se coloran en la platina de un criostato junto con Embedding Matrix M-1 (Lipshaw) y se someten a congelación en nitrógeno líquido durante 30 segundos. Se realizan cortes de 5-7 micras, que recibidos sobre un posta-objetos se tratan de la siguiente forma:

1- Acetona absoluta mediante inmersión rápida.

2- Deshidratación insistente con tres pases por acetonas absolutas.

3- Eliminación de la acetona y aclaramiento con xileno. Montaje en Eukitt.

Las preparaciones son permanentes.

En nuestro experimento no fue preciso la administración de fluoresceína sódica para obtener fluorescencia, debido a la propiedad característica de las porfirinas de ser fluorescentes cuando se les observa con luz ultravioleta. Por todo lo demás el método fue seguido literalmente.

11.2- Método de estudio para microscopía electrónica

El material tallado en bloques prismáticos de 1 mm. de lado destinado al estudio ultraestructural, fue fijado en glutaraldehído con buffer Millonig (pH 7'4) en nevera a 4°C. Se contrastaron y postfijaron en ácido ósmico y se lavaron en buffer Palade 15 minutos. Se procedió a continuación a la deshidratación según la siguiente marcha:

- 1- Acetona 35%, 3 pasos de 10 minutos.
- 2- Acetona 50%, 3 pasos de 10 minutos.
- 3- Acetona 70%, 3 pasos de 10 minutos.

A continuación de mantuvieron los microbloques en nevera con acetona al 70% y acetato de uranilo al 2%. Se pasaron a una solución de acetona de 90% por tres baños de 20 m. Acetona del 100% , 2 pasos de 20 m. y finalmente acetona deshidratada, 3 pasos de 20 m. Habiendose así conseguido una adecuada deshidratación se procedió a la inclusión en araldita según la siguiente pauta:

- 1- Araldita I más óxido de propileno, durante dos horas en estufa a 50°C.
- 2- Araldita I ,24 horas en estufa a 50°C.
- 3- Araldita II, 2 horas en estufa a 50°C.
- 4- Araldita II, para bloques, preparada en el momento del uso, con la que se forman los bloques que se mantienen en estufa de 70°C durante dos días.

El buffer de Palade se utiliza a pH 7'2 y se prepara según la siguiente fórmula:

Solución A...Acetato sódico.....1'904%

Solución B...Veronal sódico.....2'58%

Solución C...Acido clorhídrico..0'2 N

La solución 0'1 N de ácido clorhídrico se prepara con 2'2 cc. de ClH comercial disueltos en 250 cc. de agua destilada.

Para preparar el buffer se mezclan en el momento de su uso, solución A: 10 cc.; Solución B: 10 cc.; Solución C: 10 cc. H₂O: 20 cc. Se debe comprobar el pH final.

Los bloques se tallan en forma tronco-piramidal y se cortan con un ultramicrotomo LKB-III. Los cortes ultrafinos (650 Å aproximadamente) fueron contrastados con citraro de plomo y estudiados con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-9S operando con un potencial de aceleración de 60 kv.

III - RESULTADOS
=====

12. EXCRECION NORMAL DE PORFIRINAS EN RATAS

En nuestro grupo de trabajo estudiamos el metabolismo porfirínico en 19 ratas normales, hembras y de raza Wistar, los resultados obtenidos son pues los mismos que los que figuran en la tesis doctoral de Mas. La elección de las ratas fue realizada al azar dentro de un amplio grupo de ratas de características semejantes.

En la Tabla I , se indican las porfirinas presentes en heces, expresadas en microgramo/24 horas. La porfirina dominante es la protoporfirina. En la Tabla II, se presentan las porfirinas urinarias, siendo la coproporfirina, la porfirina presente en mayor cantidad.

En la Tabla III quedan reflejadas las fracciones porfirínicas analizadas en tejido hepático por técnicas de partición y extracción solvente. El análisis de las diversas carboxil porfirinas hepáticas, mediante técnicas cromatográficas, unicamente nos permitió apreciar la existencia de mínimas trazas de porfirinas tetracarboxílicas (4-COOH) y dicarboxílicas (2-COOH).

En la Tabla V y VI se reflejan el reparto porcentual de las carboxil porfirinas urinarias y fecales.

En la Tabla VII se realiza un estudio comparativo entre el peso corporal de las ratas y el de sus visceras hepáticas.

TABLA - I

PORFIRINAS EN HECES EN RATAS NORMALES

Expresadas en microgramos / 24 horas.

<u>Nº</u>	<u>COPRO</u>	<u>PROTO</u>	
1	35	89	
2	39	76	
3	33	93	
4	43	105	
5	57	88	
6	50	101	
7	27	38	
8	60	98	
9	45	67	
10	35	67	
11	39	64	
12	37	69	
13	35	73	
14	41	76	
15	40	66	
16	45	93	
17	39	100	
18	40	106	
19	<u>30</u>	<u>85</u>	
	\bar{X} =	40'53	81'79
	D.S. =	8'11	17'00

TABLA - II

PORFIRINAS URINARIAS EN RATAS NORMALES

Expresadas en microgramos / 24 horas.

<u>Nº</u>	<u>COPRO</u>	<u>URO</u>
1	6'9	0'11
2	6'8	0'15
3	7'3	0'17
4	6'0	0'25
5	7'2	0'30
6	7'3	0'28
7	7'3	0'23
8	7'7	0'30
9	5'6	0'36
10	5'5	0'30
11	5'2	0'32
12	5'6	0'37
13	7'0	0'34
14	7'3	0'16
15	5'5	0'14
16	6'8	0'18
17	6'8	0'16
18	7'7	0'22
19	6'0	0'15
	<hr/>	<hr/>
\bar{X} =	6'61	0'24
D.S.=	0'80	0'08

TABLA - III

PORFIRINAS HEPATICAS EN RATAS NORMALES.

Expresadas en microgrado / 100 gr.

<u>N°</u>	<u>URO</u>	<u>COPRO</u>	<u>PROTO</u>
1	2'0	14'0	27'4
2	2'7	10.3	29'0
3	2'3	10'0	15'4
4	2'4	16'6	22'0
5	2'0	17'3	20'6
6	2'0	15'4	20'9
7	2'0	15'4	20.8
8	1'7	18'6	21'7
9	2'2	19.6	22'5
10	1'7	18'6	21'7
11	0'0	20'6	23'2
12	0'0	16'7	20'3
13	2'3	17'6	22'7
14	1'7	19'1	30'0
15	0'0	18'1	22'0
16	1'3	19'6	24'2
17	1'7	16'1	13'3
18	0'0	17'2	24'2
19	0'7	13'7	18'3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
\bar{X} =	1'51	16'55	22'12
D.S. =	0'88	2'85	3'94

TABLA - IV

Valores medios del metabolismo porfirinico en el grupo I de ratas normales (serie I).

	<u>\bar{x}</u>	<u>D.S</u>
<u>HIGADO</u> (mcgr./100 gr)		
URO	1'51	0'88
COPRO	16'55	2'85
PROTO	22'12	3'94
 <u>ORINA</u> (mcgr./24 h.)		
URO	0'24	0'08
COPRO	6'61	0'80
 <u>HECES</u> (mcgr./24 h.)		
COPRO	40'53	8'11
PROTO	81'79	17'00

TABLA - V

Reparto porcentual de las carboxil-porifrinas urina-
rias en la Serie I (ratas normales).

N°	COOH					IPCT
	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	
1	27'75	6'45	---	---	65'80	8'93
2	16'65	3'07	Tr.	2'29	77'99	3'78
3	13'53	3'96	Tr.	Tr.	82'51	4'58
4	18'15	5'56	2'22	Tr.	74'07	6'98
5	18'79	10'53	3'84	Tr.	66'94	13'48
6	21'69	6'02	Tr.	---	72'29	7'69
7	16'76	5'74	1'03	2'94	73'53	7'24
8	21'89	8'50	2'05	1'42	66'14	11'39
9	24'02	4'34	Tr.	2'19	69'45	5'88
10	16'35	8'01	0'65	1'02	73'97	9'77
11	20'27	2'80	0'70	2'10	74'13	3'64
12	16'40	7'07	1'74	2'72	72'07	8'93
13	18'11	5'61	1'31	0'98	73'99	7'05
14	15'94	4'69	0'78	4'30	74'29	5'94
15	18'66	7'18	1'10	4'07	68'99	9'43
16	9'98	4'32	1'31	2'58	81'81	5'02
17	15'78	5'95	1'09	2'51	74'67	7'68
18	24'26	6'26	0'77	1'37	67'34	8'51
19	<u>20'76</u>	<u>4'03</u>	<u>0'85</u>	<u>1'27</u>	<u>73'09</u>	<u>5'23</u>
\bar{x} =	18'72	5'79	1'03	1'67	72'79	7'43
D.S. =	4'12	1'92	0'96	1'35	4'71	2'57

TABLA-VI

Reparto porcentual de las carboxil-porfirinas fecales en ratas normales (Serie I).

N°	COOH						IPCT
	8	7	6	5	4	2	
1	0'54	0'37	0'23	3'10	20'07	75'34	1'81
2	0'37	0'49	0'00	5'78	17'11	76'25	2'78
3	0'49	0'61	0'39	3'42	21'55	73'54	2'75
4	0'73	0'32	Tr.	5'37	21'17	72'41	1'49
5	0'15	0'56	0'00	3'07	24'74	71'48	2'21
6	0'00	0'00	0'34	4'49	19'96	75'21	0.00
7	3'93	1'34	0'47	3'57	22'46	68'23	5'63
8	0'00	0'00	0'25	4'22	17'63	77'90	0'00
9	Tr.	1'12	0'60	1'94	22'42	73'92	4'76
10	1'27	0'19	0'56	4'02	15'69	78'27	1'20
11	0'37	0'21	0'13	1'48	25'62	72'19	0'81
12	1'65	0'15	0'09	1'47	8'42	88'22	1'75
13	0'20	0'08	0'10	1'04	6'40	92'18	1'23
14	1'09	0'15	Tr.	1'16	6'03	91'18	2'43
15	0'71	0'00	0'30	0'68	7'13	01'57	0'00
16	0'24	0'00	0'00	0'66	7'12	91'98	0'00
17	0'58	0'21	0'32	1'02	7'91	89'95	2'58
18	0'27	0'13	Tr.	0'72	6'62	02'26	1'93
19	0'42	0'11	0'13	1'46	6'68	91'02	1'38
\bar{X}	= 0'69	0'32	0'21	2'56	15'00	81'22	1'84
D.S. =	0'90	0'37	0'20	1'67	7'34	8'93	1'51

TABLA - VII

Relación entre peso hepático (PH) y peso corporal (PC)
en ratas normales (Serie I).

<u>Nº</u>	<u>Peso corporal</u>	<u>Peso hfgado</u>	<u>% PH/PC</u>
1	325	17	5'20
2	320	15	4'60
3	305	12	3'90
4	430	14	3'20
5	450	15	3'30
6	250	13	5'20
7	435	16	3'60
8	360	16	4'40
9	380	15	3'90
10	390	15	3'80
11	330	13	3'90
12	300	13	4'30
13	390	14	3'50
14	330	13	3'30
15	390	14	3'60
16	390	15	3'80
17	490	17	3'40
18	515	20	3'80
19	560	16	2'80
\bar{X} =	386	15	3'87
D.S. =	77'37	1'83	0'62

TABLA - VIII

Reparto porcentual de las carboxil-porfirinas en
orina y heces hallado en ratas normales (Serie I).

COOH

<u>ORINA</u>	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>IPCT</u>
\bar{x}	= 18'72	5'79	1'03	1'67	72'79		7'43
D.S.	= 4'12	1'92	0'96	1'35	4'71		2'57

HECES

\bar{x}	= 0'69	0'32	0'21	2'56	15'00	81'22	1'84
D.S.	= 0'90	0'37	0'20	1'67	7'34	8'93	1'51

13. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN RATAS INTOXICADAS POR HEXACLO-
ROBENCENO

El estudio se realizó sobre 24 ratas hembras, de raza Wistar de peso comprendido entre los 190 gr. y los 350 gr., las cuales se dividieron en dos grupos II y III de 18 y 6 animales respectivamente.

La Tabla IX muestra el estudio de las porfirinas hepáticas realizado tras cromatografía en capa fina de sus metil-esteres, sobre las 18 ratas de la serie II. En las ratas 1,2,3,4,10,11,12,13 y 14, solo constatamos la presencia de mínimas semejanzas de lo que sucede con los hígados de ratas normales. En la rata 8, se detectaron también trazos de octocarboxil-porfirina (8-COOH). En el resto de los hígados de las ratas de esta serie la cromatografía no cuantitativa demostró la existencia del característico patrón acumulativo de las porfirinas más policarboxílicas (8 y 7 COOH).

La eliminación urinaria de las fracciones COPRO y URO en las ratas de esta serie II, queda reflejada en la Tabla X, como puede apreciarse las ratas números 5 y 6 evidenciaban una patológica uroporfirinuria, hecho este que era más ostensible en las últimas ratas de dicha serie.

El patrón cromatográfico de las porfirinas urinarias queda expuesto en la Tabla XI, mientras que en la XII, se indica el patrón fecal.

La eliminación cuantitativa de las fracciones COPRO y PROTO fecales no fueron estudiadas en las ratas de esta serie II,

debido a la escasa fiabilidad de una exacta recogida de las heces.

La Tabla XIII indica los cocientes PH/PC (peso hepático/peso corporal) en los animales de la serie II.

En la serie III se pretendió alcanzar una intoxicación más intensa, la situación porfirica quedó plenamente establecida en el momento del sacrificio como se comprueba en la Tabla XIV, en la que se refleja la cuantía y el reparto porcentual de las diferentes carboxil-porfirinas hepáticas. Las porfirinas más policarboxílicas son tan predominantes que impiden la detección de las menos policarboxílicas.

La masiva uroporfirinuria y la más moderada coproporfirinuria, Tablas XV y XVI, constituyen rasgos característicos de la porfiria experimental. Por cromatografía, Tablas XVII y XVIII, pudimos apreciar el típico patrón excretorio con aumento de la eliminación de las porfirinas más policarboxílicas y con la patognomónica presencia de heces de isocoproporfirina o portifina P_1 , como reflejo de estas alteraciones los índices PCT urinario y fecal se incrementan notablemente.

En la Tabla XIX quedan expresados los cocientes peso hepático/peso corporal de la serie III.

TABLA - IX

RATAS PORFIRICAS POR HCB . SERIE II. PORFIRINAS HEPATICAS.

Valores expresados en microgramos/gramo de tejido fresco y en % del total de porfirinas.

SEMANA	N°	COOH					
		8	7	6	5	4	2
2	1 mcgr/g	--	--	--	--	--	Tr.
	2 mcgr/g	--	--	--	--	--	--
	3 mcgr/g	--	--	--	--	--	--
	4 mcgr/g	--	--	--	--	Tr.	Tr.
3	5 mcgr/g	61'97	38'03	--	--	--	--
	6 mcgr/g	73'09	26'90	--	--	--	--
	7 mcgr/g	42'93	21'05	4'77	Tr.	18'09	13'16
4	8 mcgr/g	--	--	--	--	--	--
	9 mcgr/g	38'13	25'08	Tr.	--	16'72	20'07
	10 mcgr/g	--	--	--	--	--	Tr.
5	11 mcgr/g	--	--	--	--	--	--
	12 mcgr/g	--	--	--	--	Tr.	Tr.
	13 mcgr/g	--	--	--	--	--	--
6	14 mcgr/g	--	--	--	--	--	Tr.
	15 mcgr/g	62'97	32'26	2'82	--	0'61	1'34
	16 mcgr/g	68'25	31'75	Tr.	--	Tr.	--
7	17 mcgr/g	71'08	28'92	Tr.	--	--	--
	18 mcgr/g	84'85	15'15	--	--	--	--
	\bar{X} =	27'96	12'17	0'42			
	D.S. =	33'68	14'73	1'27			

TABLA - X

RATAS INTOXICADAS POR HCB. SERIE II.

ANALISIS DE PORFIRINAS URINARIAS.

Expresados en microgramos / 24 horas.

SEMANA	N°	<u>COPRO</u>	<u>URO</u>
3	1	2'16	0'60
	2	9'20	1'70
	3	3'85	0'93
3	4	6'10	1'60
	5	12'80	3'19
	6	26'50	7'88
4	7	4'10	0'61
	8	1'82	0'24
	9	2'65	0'31
5	10	10'09	1'21
	11	11'00	1'73
	12	5'65	0'93
6	13	3'03	0'34
	14	8'02	1'04
	15	79'67	38'76
7	16	9'84	14'83
	17	12'58	5'05
	18	50'34	146'59
	\bar{X} =	14'41	12'64
	D.S. =	19'44	34'68

TABLA - XI

RATAS PORFIRICAS POR HCB. SERIE II.

Distribución porcentual de las porfirias excretadas por orina.

SEMANA	N°	COOH					IPCT
		8	7	6	5	4	
2	1	5'58	Tr.	0'67	4'46	89'29	Tr.
	2	4'14	0'88	--	Tr.	87'98	0'99
	3	9'02	1'50	0'92	4'22	84'34	1'75
3	4	12'69	5'18	0'52	9'07	72'54	6'66
	5	53'54	13'27	1'14	2'02	30'03	30'65
	6	26'26	10'43	6'98	15'26	41'07	20'25
4	7	11'40	3'59	Tr.	6'88	78'13	4'39
	8	18'48	3'80	Tr.	1'77	75'95	4'76
	9	18'36	9'24	3'41	3'02	65'97	12'29
5	10	28'40	17'07	Tr.	2'26	52'27	24'62
	11	24'51	12'90	0'86	1'51	60'22	17.64
	12	26'37	14.91	9.33	4'85	44'54	25'08
6	13	18'53	10.49	0'35	0'70	69'93	13'04
	14	36'73	11'24	1'35	2'70	47'98	18'98
	15	54'51	14'52	5'15	5'58	20'24	41'77
7	16	39'08	10'06	0'96	2'01	47'89	17'36
	17	30'70	8'90	3'26	3'25	53'88	14'18
	18	49'07	18'00	2'26	4'67	26'00	40'91
	\bar{X} =	25'96	9'22	2'03	4'12	58'24	16'40
	D.S. =	15'65	5'57	2'56	3'57	21'24	12'70

TABLA - XII

RATAS INTOXICADAS POR HCB. SERIE II.

Distribución porcentual de las porfirinas excretadas por heces.

SEMANA	N°	COOH							
		8	7	6	5	P ₁	4	2	IPCT
2	1	0'50	0'83	Tr.	5'15	0'50	19'80	73'22	6'29
	2	1'41	0'70	0'18	3'34	1'29	17'60	75'48	10'15
	3	2'03	0'17	Tr.	4'84	--	24'21	68'75	0'70
3	4	4'06	0'89	0'40	4'02	0'99	13'38	76'26	12'32
	5	2'65	0'80	0'54	4'65	--	14'86	76'50	5'11
	6	1'95	12'66	15'61	13'73	2'11	15'90	38'04	48'15
4	7	--	0'15	0'77	3'55	--	17'78	77'75	0'84
	8	0'67	1'08	0'61	4'00	1'03	18'48	74'13	10'15
	9	0'66	1'08	0'83	2'86	0'62	15'55	78'40	9'86
5	10	2'12	2'23	1'71	3'64	3'08	14'88	72'34	26'30
	11	2'64	1'63	0'83	4'15	Tr.	18'05	72'70	8'28
	12	3'03	2'13	1'18	5'16	Tr.	18'52	69'98	10'31
6	13	5'50	1'02	0'48	4'15	Tr.	16'42	72'43	5'85
	14	6'30	2'49	1'00	4'75	Tr.	18'79	66'67	11'70
	15	13'49	22'49	18'46	6'35	3'94	2'45	32'82	90'14
7	16	5'94	8'02	4'87	9'84	0'53	12'30	58'50	41'01
	17	12'80	17'04	11'04	8'30	1'24	11'10	37'88	62'98
	18	28'27	31'21	18'04	4'79	1'73	1'91	14'05	94'51
	\bar{X} =	5'22	5'92	4'25	5'40	0'95	15'11	63'11	25'26
	D.S. =	6'92	9'03	6'59	2'70	1'15	5'57	19'00	29'80

TABLA - XIII

RELACION ENTRE PESO HEPATICO (PH) Y PESO CORPORAL (PC)
EN LAS RATAS DE LA SERIE II.

N°	<u>PESO CORPORAL</u>	<u>PESO HIGADO</u>	<u>% PH/PC</u>
1	290	11	3'70
2	250	10	4'00
3	310	13	4'20
4	190	7	3.60
5	250	12	4'80
6	290	13	4'48
7	220	10	4'50
8	340	11	3'20
9	300	11	3'60
10	310	9	2'90
11	230	9	3'00
12	350	12	3'40
13	300	13	4'33
14	320	14	4'37
15	350	20	6'28
16	300	18	6'00
17	330	25	7'57
18	310	24	7'74
\bar{X} =	<u>291</u>	<u>13</u>	<u>4'44</u>

TABLA - XIV

RATAS PORFIRICAS POR HCB. SERIE III.

TASA DE PORFIRINAS HEPATICAS.

Valores expresados en microgramos/gramo de tejido fresco y % del total de porfirinas.

N°	COOH						
	8	7	6	5	P ₁	4	2
19 mcgr/g	170'42	119'06	1'63	--	--	Tr.	--
%	58'54	40'90	0'56				
20 mcgr/g	171'88	106'22	1'23	--	--	--	--
%	61'53	38'03	0'44				
21 mcgr/g	194'14	133'94	1'31	--	--	--	--
%	68'50	31'19	0'31				
22 mcgr/g	425'56	136'18	Tr.	--	--	--	--
%	75'76	24'24					
23 mcgr/g	262'99	109'58	8'77	--	--	--	--
%	68'96	28'74	2'30				
24 mcgr/g	646'84	306'40	Tr.	--	--	--	--
%	67'86	32'14					
\bar{X} =	66'86	32'54	0'60				
D.S. =	6'08	6'08	0'16				

TABLA - XV

RATAS INTOXICADAS POR HCB. SERIE III.

ANALISIS DE PORFIRINAS URINARIAS.

Valores expresados en microgramo/24 horas.

N°	<u>D</u>	<u>CORPO</u>	<u>URO</u>
19	1'5	19'95	95'32
20	5	31'60	122'90
21	4	32'60	142'40
22	2'6	10'47	80'75
23	4'5	19'30	104'13
24	6'5	28'01	82'03
	\bar{X} =	23'65	104'59
	D.S. =	8'58	24'20

TABLA - XVI

RATAS INTOXICADAS POR HCB. SERIE III.

ANALISIS DE PORFIRINAS FECALES.

Valores expresados en microgramo/24 horas.

N°	<u>P</u>	<u>COPRO</u>	<u>URO</u>
19	1'8	123'31	152'42
20	2'5	38'30	65'52
21	2	19'60	48'74
22	2'5	33'10	178'72
23	1'2	22'94	79'18
24	1'7	25'00	106'57
	\bar{X} =	43'71	105'19
	D.S. =	39'60	51'14

TABLA - XVII

RATAS PORFIRICAS POR HCB. SERIE III.

Distribución porcentual de porfirinas urinarias.

N°	COOH					IPCT
	8	7	6	5	4	
19	19'05	20'38	9'74	6'25	12'68	61'65
20	46'75	23'08	14'09	5'24	10'84	68'04
21	58'07	18'05	5'01	4'43	14'44	55'56
22	61'59	17'29	7'94	2'94	10'24	62'80
23	55'22	16'94	6'61	4'86	16'37	50'86
24	50'40	18'33	8'41	4'17	18'69	49'51
\bar{X}	= 53'83	19'01	8'63	4'65	13'88	58'07
D.S.	= 5'48	2'32	3'12	1'11	3'27	7'29

TABLA -XVIII

RATAS PORFIRICAS POR HCB. SERIE III.

Distribución porcentual de porfirinas fecales.

N°	P_{\perp}					4	2	IPCT
	8	7	6	5	P_{\perp}			
19	15'18	17'34	16'01	7'38	9'85	3'00	31'24	90'06
20	15'09	16'96	16'04	7'40	8'74	2'57	33'20	90'91
21	19'50	22'60	17'29	6'12	6'21	2'22	26'06	92'85
22	8'07	16'34	14'40	5'94	5'94	1'98	47'33	91'84
23	10'75	16'75	13'07	6'50	6'28	2'04	44'61	91'86
\bar{X}	=13'49	17'94	15'06	6'40	6'84	2'23	38'05	91'83
D.S.	= 3'99	2'32	1'64	0'91	2'10	0'51	8'98	1'25

TABLA - XIX

REPARTO PORCENTUAL DE LAS PORFIRINAS MAS POLICARBOXI-
LICAS (\bar{X} , D.S.)

<u>HIGADO</u>	<u>8 COOH</u>	<u>7 COOH</u>	<u>6 COOH</u>
CONTROLES (n°19)	Tr.	--	--
SERIE II (n°18)	\bar{X} = 27'96 D.S. = 33'68	12'17 14'73	0'42 1'27
SERIE III (N°6)	\bar{X} = 66'86 D.S. = 6'08	32'54 6'08	0'60 0'86

TABLA XX

EXCRECION CUANTITATIVA DE FRACCIONES.

Microgramos/24 horas (\bar{X} , D.S.)

<u>ORINA</u>	<u>COPRO</u>	<u>URO</u>	<u>PROTO</u>
CONTROLES (n°19)	\bar{X} = 6'61 D.S. = 0'80	0'24 0'08	
SERIE II (n°18)	\bar{X} = 14'41 D.S. = 19'44	12'64 34'68	
SERIE III (n°6)	\bar{X} = 23'65 D.S. = 8'58	104'59 24'20	

HECES

CONTROLES (n°19)	\bar{X} = 40'53 D.S. = 8'11	-- --	81'79 17'00
SERIE II (n°18)	<hr/>		
SERIE III (n°6)	\bar{X} = 43'71 D.S. = 39'60	-- --	105'19 51'14

TABLA-XXI

REPARTO PORCENTUAL DE LAS CARBOXIL-PORFIRINAS URINARIAS
(\bar{x} , D.S.) .

	COOH					
	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>IPCT</u>
CONTROLES \bar{x} =18'72 (n°19) DS.= 4'12	5'79	1'03	1'67	72'79	7'43	
	1'92	0'96	1'35	4'71	2'57	
SERIE II \bar{x} =25'96 (n°18) DS.=15'65	9'22	2'03	4'12	58'24	16'40	
	5'57	2'67	3'57	21'24	12'70	
SERIE III \bar{x} =53'83 (n°6) DS.= 5'48	19'01	8'63	4'65	13'88	58'07	
	2'32	3'12	1'11	3'27	7'29	

TABLA - XXII

REPARTO PORCENTUAL DE LAS CARBOXIL-PORFIRINAS FECALES
(\bar{x} . y D.S.)

	COOH							
	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>P1</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>IPCT</u>
CONTROLES \bar{x} =0'69 (n°19) D.S.=0'90	0'32	0'21	2'56	--	15'00	81'22	1'84	
	0'37	0'20	1'67	--	7'34	8'93	1'51	
SERIE II \bar{x} =5'22 (n°18) D.S.=6'92	5'92	4'25	5'40	0'95	15'11	63'11	25'26	
	9'03	6'59	2'70	1'15	5'57	19'00	29'80	
SERIE III \bar{x} =13'49 (n°6) D.S.= 3'99	17'94	15'06	6'40	6'84	2'23	38'05	91'83	
	2'32	1'64	0'91	2'10	0'51	8'98	1'25	

TABLA -XXIII

RELACION ENTRE PESO HEPATICO (PH) Y PESO CORPORAL (PC).
SERIE III.

N°	<u>PESO CORPORAL</u>	<u>PESO HIGADO</u>	<u>% PH/PC</u>
19	340	16	4'70
20	310	13	4'55
21	330	16	4'82
22	350	20	5'71
23	350	17	4'85
24	340	20	5'88
\bar{x} =	<u>336</u>	<u>17</u>	<u>5'02</u>

14.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

14.1- RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Tras anestesia profunda se procede al sacrificio y autopsia de los animales. A nivel de la cavidad cefálica se observa configuración, consistencia y coloración de los centros nerviosos no detectándose macroscópicamente ningún dato significativo.

A nivel de la cavidad torácica se encuentra en algunos animales pulmones ligeramente edematosos que son atribuidos a efecto anestésico.

El corazón y los grandes vasos no presentan hallazgos de interés.

A nivel de la cavidad abdominal se destaca en primer término la presencia de un aumento del volumen y peso del hígado. Los lóbulos hepáticos tienen una consistencia media no modificada en relación a los animales testigos. Los lóbulos hepáticos de los animales experimentales presentan una coloración violácea característica.

El estómago con contenido alimenticio variable, no presenta hallazgos, así como no los presentan el intestino delgado y grueso.

Se toman muestras de heces, en varios niveles del intestino, realizándose con ellas frotis para su posterior estudio con microscopía de fluorescencia.

Los riñones tienen un volumen y un peso dentro de la normalidad, pero destacándose una coloración violácea del parenquima

renal semejante a la presentada por el hígado. En todos los animales se marca con claridad el límite cortico-medular.

En las vías urinarias no se encontraron hallazgos de interés. Asimismo, los órganos genitales tenían un aspecto normal.

Se toma en el momento de las autopsias muestras de la orina de los animales con las cuales se realizan extensiones para posteriormente ser estudiadas con microscopía de fluorescencia. También se toman con idénticos fines, muestras hemáticas y de tejido óseo, el cual es obtenido a nivel de los cuerpos vertebrales. El hueso temporal también fue estudiado procediéndose a la disección de la columela en algunos casos, que pasó a ser estudiada con microscopía de fluorescencia directamente.

Antes de concluir la técnica autopsica se toman muestras correspondientes a riñón e hígado, para estudio con microscopía óptica y electrónica.

Finalmente se procedió al pesado de las vísceras de los animales.

14.2- RESULTADOS CON MICROSCOPIA OPTICA. M. FLUORESCENCIA

El estudio microscópico del parénquima hepático revela en todos los animales experimentales, un hígado de modificación patológica creciente, en relación al número de semanas que habfan sido intoxicados con hexaclorobenceno.

Las lesiones más significativas fueron encontradas a nivel centrolobulillar donde se observa en las fases iniciales un au-

mento del contenido hidroelectrolítico de los citoplasmas celulares, así como una moderada metamorfosis grasa (Fig. 7). Al progresar las modificaciones hepatocitarias a nivel centrolobulillar los hepatocitos inician un proceso de homogeneización citoplásmica, siendo más pronunciada la metamorfosis grasa que se extiende prácticamente a todo el lobulillo (Figs. 8 y 9). Son también visualizables en las áreas periportales algunos hepatocitos intensamente alterados con citoplasma marcadamente hialinizado, ello veremos posteriormente, se correlaciona con los mismos animales que presentan depósito porfirínico en las zonas perilobulillares (Fig. 10). Se observa también la presencia de acumulaciones pigmentarias en los hepatocitos colindantes con venas centrolobulillares (Fig. 11). Estas acumulaciones de pigmento pardo con la hematoxilina-eosina, toman una intensa coloración azul con el método de Perls para demostración de pigmentos férricos y se observa además de en las células hepáticas próximas a las venas centrolobulillares, en otras más distantes, y sobre todo, a nivel de las células de Kupffer (Fig. 12). Este pigmento férrico, se deposita de forma masiva en estas células representantes locales del sistema retículo-histiocitario, que quedan así totalmente ocupadas por la acumulación del pigmento y destacando marcadamente sobre el resto del parénquima hepático. Por otra parte, en los hepatocitos puede ser visualizable alguna pequeña cantidad de depósitos pigmentarios que lo hace en forma de grano muy fino y en áreas limitadas (Figs. 13, 14 y 15).

El estudio con microscopía de fluorescencia resultó negativo en todos los frotis estudiados del material hemático.

A nivel cutáneo se estudiaron muestras de piel de abdomen y de pabellón auricular, encontrándose en ambas depósitos de pigmentos porfirínicos, especialmente a nivel de corion.

Nunca se demostró fluorescencia secundaria en los centros y vías nerviosas, ni tampoco en la retina, aunque no obstante dentro del globo ocular se detectaron pigmentos fluorescentes a nivel de las túnicas coroides y esclero-cornea.

Dentro del aparato respiratorio, existe depósito de pigmento porfirínico a nivel de la mucosa y corion de la laringe, tráquea y bronquios principales. En el parénquima pulmonar hay un moderado depósito pigmentario fluorescente en el intersticio.

El parénquima hepático presenta fluorescencia secundaria atribuible a pigmentos porfirínicos, que se depositan en los hepatocitos, acumulándose progresivamente y en forma directamente proporcional al tiempo de intoxicación.

El depósito de inicia generalmente a nivel centrolobulillar, no obstante en algunos casos también se han observado depósitos que se inician en las áreas perilobulillares.

En los momentos iniciales los grupos hepatocitarios de las áreas centro o perilobulillares, acumulan una cierta cantidad de sustancia fluorescente que al ser estudiada bajo luz ultravioleta emite una típica fluorescencia secundaria amarillo anaranjada (Fig. 16).

Al prosperar la experiencia los depósitos se hacen mas

intensos y se extienden a todo el lobulillo, sin embargo, las zonas donde se inició el depósito siempre contienen una mayor cantidad del mismo, manteniéndose un contraste diferencial entre las diferentes áreas (Figs. 17 y 18).

En los grados máximos de porfiria, la fluorescencia que emiten los hepatocitos de forma secundaria, debida a los depósitos pigmentarios, toma una clara coloración rojiza; aun en estos casos sigue manteniéndose un moderado contraste cromático que identifica las áreas lobulillares donde se inició el depósito pigmentario, los cuales presentan una fluorescencia más intensa (Figs. 19, 20 y 21).

Los grados extremos que presentan grandes depósitos de pigmentos porfirínicos a nivel del parénquima hepático, corresponden a los animales que han sufrido mayor tiempo la intoxicación por hexaclorobenceno. En estos animales se observa a microscopía de fluorescencia, una masiva y difusa fluorescencia secundaria de todo el parénquima hepático, afectándose los hepatocitos de todos los niveles y produciéndose una imagen relativamente homogénea que corresponde a la masiva acumulación del pigmento porfirínico (Fig. 22).

Se ha comprobado también el depósito de pigmento fluorescente a nivel esofágico en el corion y en el conectivo intersticial de la túnica muscular. Análoga distribución fue observada en la pared gástrica y en intestino delgado y grueso, existiendo en todos estos niveles cantidades variables de pigmento porfirínico.

Los frotis realizados con las heces, demostraron fluorescencia secundaria en todos los animales de los grupos experimentales (Fig. 23) y en ningún caso en los frotis de las heces de los animales testigos. Estos frotis no presentaban ninguna fluorescencia, ni primaria ni secundaria.

En el parenquima esplénico se detecta fluorescencia secundaria de escasa intensidad, siendo más prominente a nivel de los corpúsculos de Malpighi (Fig. 24).

En el parenquima renal la microscopía convencional demuestra escasas lesiones en los animales experimentales, existiendo una conservación estructural adecuada, observándose una cierta retracción de las asas capilares del ovillo glomerular, con aumento del espacio de Bowman que aparece ópticamente vacío. Los túbulos contorneados presentan un aumento de sus luces por aplastamiento de sus nefrocitos, y sin aumento del diámetro total de las estructuras ducturales (Fig. 25)'

Las tinciones para demostración de pigmentos férricos a nivel renal, descubren escasos depósitos Perls positivos en nefrocitos y en los epitelios de los túbulos colectores de Bellini (Fig. 26).

El estudio con microscopía de fluorescencia demuestra, en las fases iniciales de la experiencia, un depósito de material fluorescente a nivel de los epitelios nefrocitarios, que en estos grados iniciales fluorescen con una tonalidad amarillenta (Fig. 27). Debe destacarse el hecho de la ausencia de fluorescencia secundaria en los glomérulos.

En estas fases iniciales de la experiencia, se visualizan los primeros depósitos pigmentarios en los epitelios de los túbulos contorneados, y en tanto que en los glomérulos no hay más fluorescencia que la que pueda atribuirse a un origen primario (Fig. 28).

A nivel del límite cortico-medular, existe una modificación en la concentración pigmentaria, produciéndose una fluorescencia secundaria más intensa en los tramos finales de los túbulos colectores, y más moderada es la que emiten los epitelios de los conductos de Bellini y por ello, se pueden observar en estos niveles contrastes cromáticos dependientes de las distintas concentraciones pigmentarias (Fig. 29).

Al prosperar la experiencia, los depósitos del pigmento con fluorescencia secundaria a nivel renal, se hacen más manifiestos, y los nefrocitos presentan una más intensa fluorescencia que progresivamente toma tonalidades anaranjadas (Fig. 30) y posteriormente, amarillo-rojizas, pero en todo caso permanecen libres de fluorescencia secundaria las estructuras glomerulares (Fig. 31).

Los animales más intensamente porfiricos muestra, a nivel del parenquima renal, una masiva fluorescencia secundaria de las estructuras tubulares tanto en la corteza como en la médula, en estos casos los depósitos masivos emiten una luminosidad en la longitud de onda de las tonalidades rojizas, pero aún en estos casos de máxima afectación, las estructuras glomerulares permanecen sin depósitos y solamente con la fluorescencia primaria

que les son característica (Figs. 32 y 33).

En las muestras de tejido óseo, se detectan depósitos de pigmento porfirínico en la sustancia intercelular y en los osteocitos, en todos los casos experimentalmente estudiados.

En el hueso temporal y en sus distintas partes estudiadas, escama, peñasco y en algunos casos en que fue disecada la columela, fue demostrado el depósito de pigmento porfirínico con idénticas características al tejido óseo de otras localizaciones.

Los dientes también presentan fluorescencia en observación directa.

14.3- RESULTADOS ULTRAESTRUCTURALES

El estudio con M.E. del parenquima pulmonar de los animales experimentales, demuestra una conservación citoarquitectónica y ultraestructural de los neumocitos tipo I y II, siendo la barrera aire-sangre de espesor y morfología habitual. Cabe destacar como hallazgo positivo, la presencia de algunas formaciones lamellates^R intraalveolares, tal y como pueden ser observados en la Fig. 34, en la cual también son visualizables tres macrófagos alveolares, cuyo citoplasma está cargado con pigmento antracótico, presentando asimismo alguna formaciones cristalinas.

En el parenquima hepático y correspondiendo a las zonas lobulillares más afectadas por metamorfosis grasa, ha sido confirmada ultraestructuralmente, la presencia de abundantes liposomas en el citoplasma hepatocitario (Fig. 35).

También se observaron en el citoplasma de los hepatocitos una gran cantidad de formaciones esferoideas en las que se produce la acumulación de material laminar dispuesto en capas concéntricas que en algunas ocasiones recuerdan a las llamadas "fibras de mielina" (Fig. 36). Así mismo la matriz hepatocitaria contiene abundantes granulaciones de glucógeno.

Las mitocondrias de los hepatocitos en ocasiones presentan una mayor densidad a los electrones. El retículo endoplásmico liso aparece hipertrofiado.

Las células de Kupffer presentan en su citoplasma cantidades masivas de siderosomas. Los conductillos biliares son normales y las microvellosidades hepatocitarias que se proyectan en ellos no presentan modificaciones.

En el parénquima renal no se observan lesiones ultraestructurales a nivel glomerular. Los epitelios de los túbulos contorneados proximales y distales presentan a nivel citoplasmático abundantes formaciones esferoideas de material homogéneo denso a los electrones, que se identifican como siderosomas (Fig. 37). Los núcleos de los nefrocitos presentan su carioteca con poros y cromatina pulverulenta en algunos cariosomas adosados a la carioteca como es habitual en estas células. A nivel de los polos basales de los nefrocitos y en relación con las múltiples invaginaciones de membrana de estas áreas, son identificadas abundantes mitocondrias cuya matriz está homogeneizada y muestra una mayor densidad de lo habitual a los electrones (Figs., 38,39 y 40).

- 89 -

En las células epiteliales de los conductos de Bellini,
se han demostrado también algunos acúmulos de siderosomas.

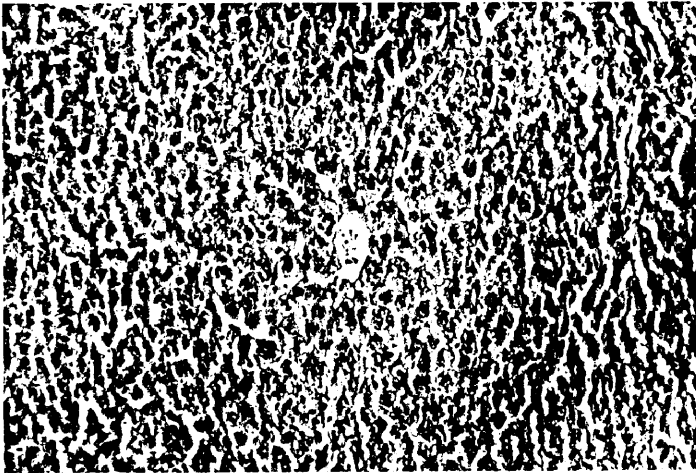


Fig. 7.- Parénquima hepático en el que se observa una menor cromaticidad de los hepatocitos centrolobulillares y algunas formaciones vacuolares (H.E. x 50).

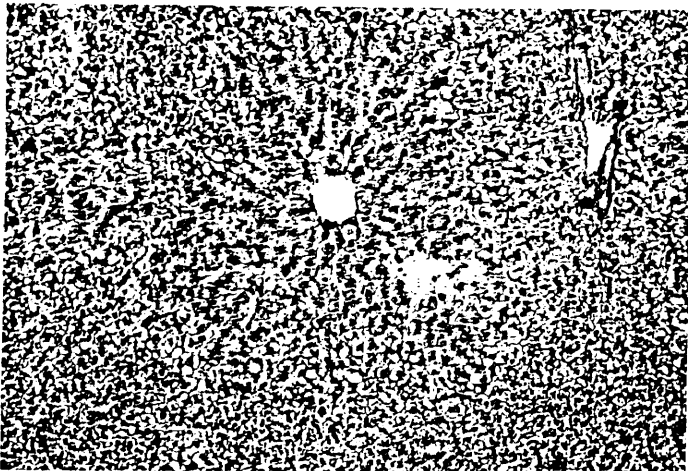


Fig. 8.- Parénquima hepático con metamorfosis grasa y alguna pérdida hepatocitaria en la proximidad de la vena centrolobulillar visible en la imagen (H.E. x 50).

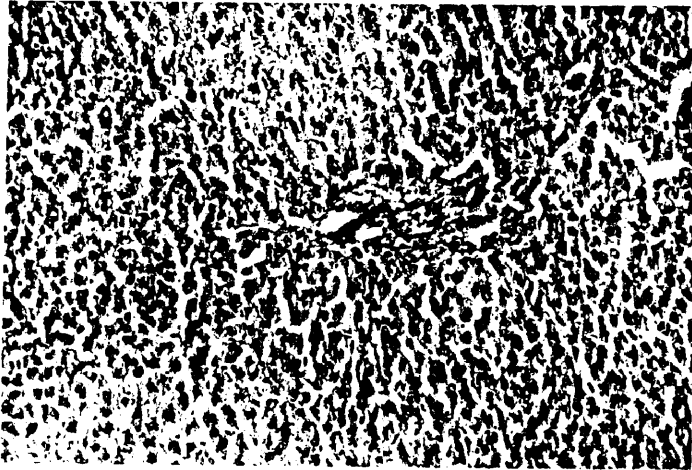


Fig. 9.- Parénquima hepático con vacuolizaciones hepatocitarias y homogeneización de algunos hepatocitos proximos a los espacios porta (H.E. x 50).

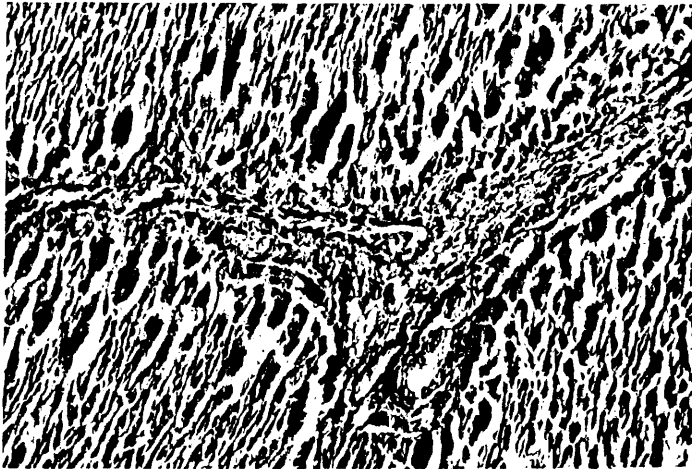


Fig. 10.- Parénquima hepático con intensas lesiones hepatocitarias observándose focos múltiples de hepatocitos hialinizados en torno a espacio porta (H.E. x 78).

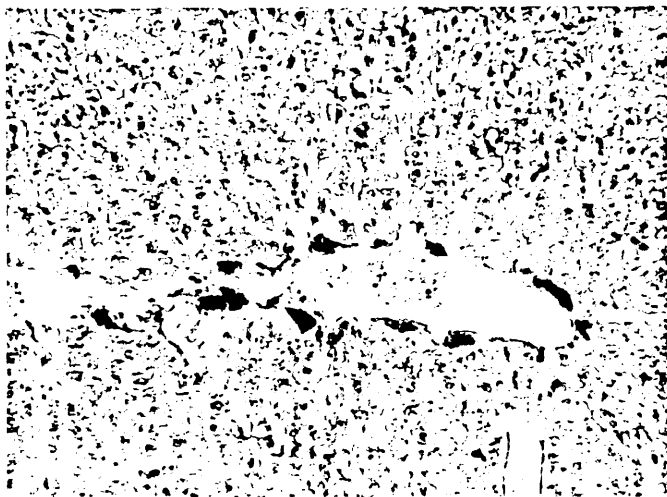


Fig. 11.- Vena centrolobulillar en torno a la cual son observados algunos hepatocitos cuyo citoplasma está cargado de pigmento pardo (H.E. x 120).

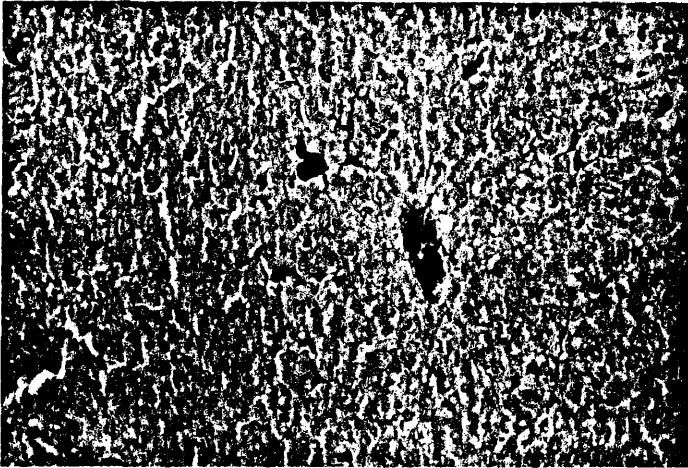


Fig. 13.- Parénquima hepático con depositos de pigmento ferrico predominantemente dispuestos en la periferia del lobulillo y acumulados en las células de Kupffer (Perls , x 50).

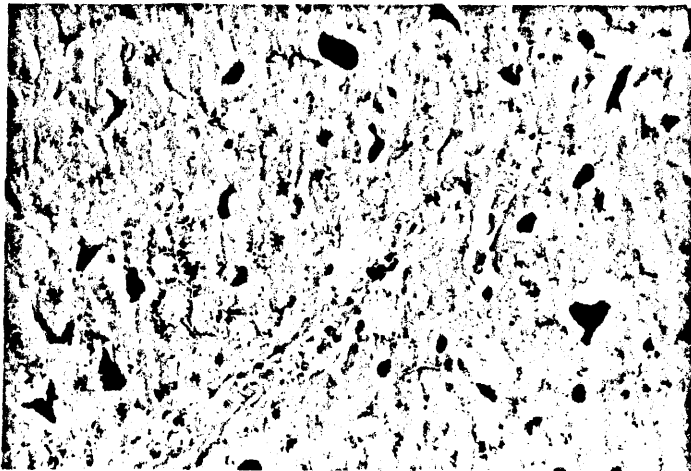


Fig. I4.- Presencia de pigmento férrico en forma masiva en algunas células de Kupffer y en forma de grano fino en el interior de los hepatocitos (Perls x 135).

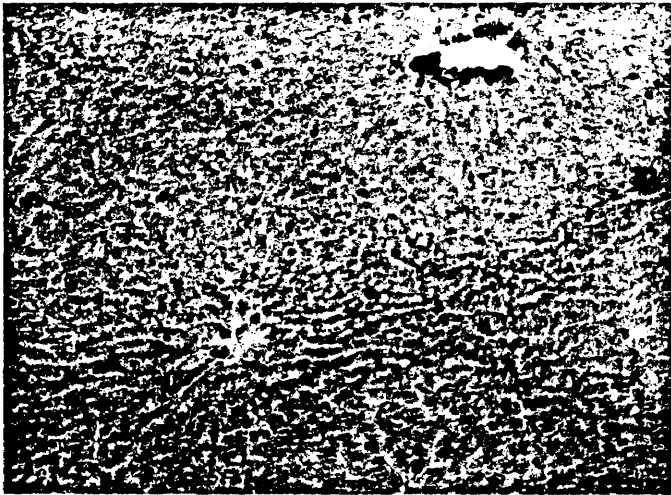


Fig. 15.- Depósito de pigmento férrico en parenquima hepático masivamente a nivel de las células de Kupffer y en forma pulverulenta a nivel de hepatocitos. Obsérvese la distribución geográfica más abundante en torno a los espacios perilobulillares y la práctica ausencia de pigmento en los hepatocitos próximos a la vena centrolobulillar visualizada en la proximidad del ángulo superior derecho (Perls, x 50).

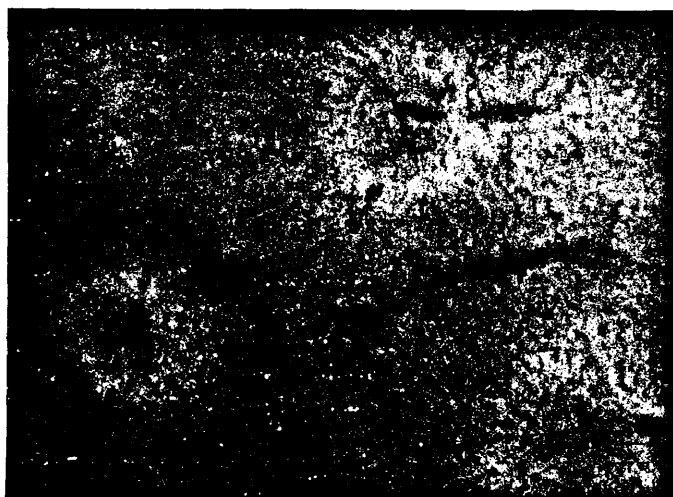


Fig. 16.- Parénquima hepático con depósitos iniciales de pigmento porfirínico en torno a las venas centrolobulillares (método F. Llanes para demostración de sustancias fluorescentes hidrosolubles, x 50).

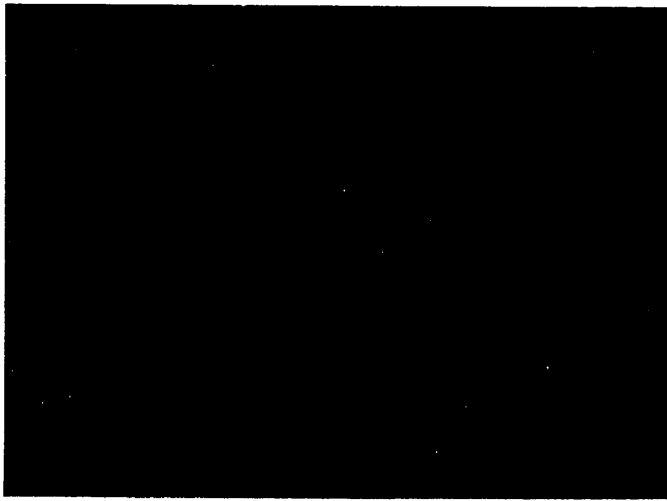


Fig. 17.- Parénquima hepático con depósitos de pigmento fluorescente en los hepatocitos de las áreas centrolobulillares y mínimo depósito en los niveles perilobulillares (Método F.Llanes,x 50).

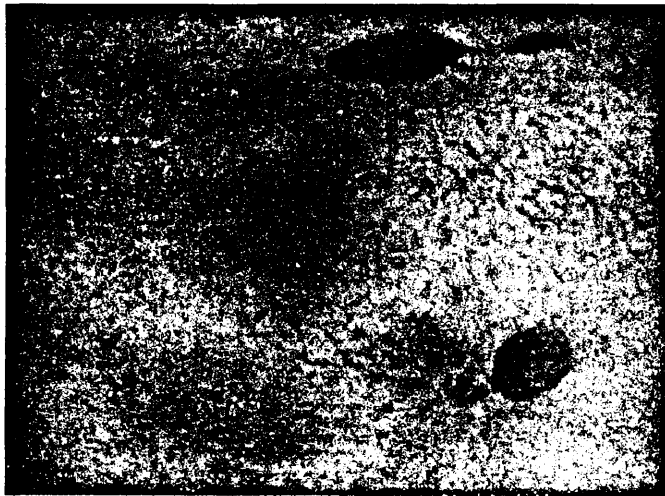


Fig. 18.- Parénquima hepático con depósitos de pigmento fluorescente de distribución geográfica afectando a los hepatocitos de las zonas centrolobulillares y con menor intensidad en las áreas perilobulillares. En ángulo inferior derecho un espacio porta (método F. Llanes, x 58).

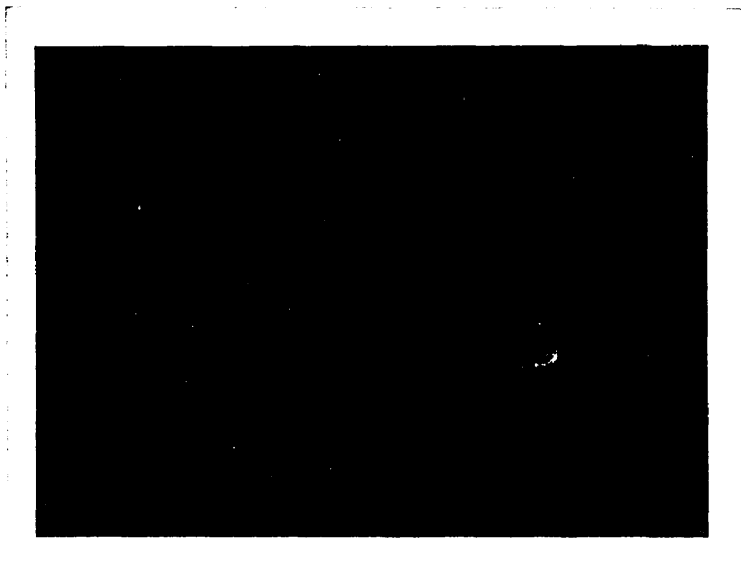


Fig. 19.- Estadio avanzado de deposito porfirínico en parenquima hepático afectando todos los hepatocitos, siendo más intensa la fluorescencia en los niveles centrolobulillares que presentan una cromaticidad rojiza (método F. Llanes, x 50).

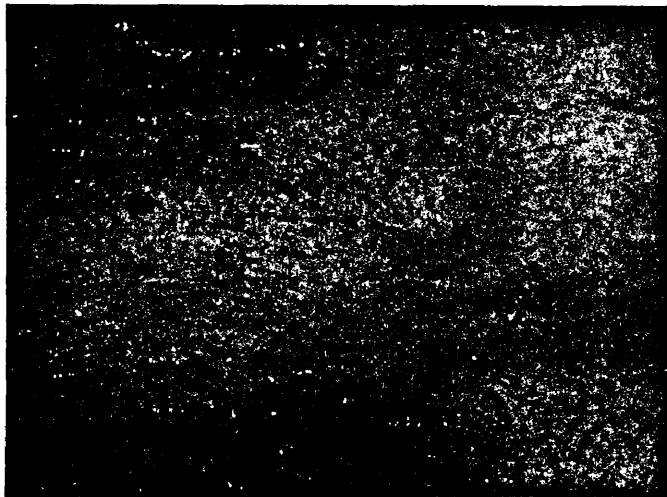


Fig. 20.- Parénquima hepático con presencia de depositos porfirínicos que acumulados en grandes cantidades emiten una fluorescencia rojiza, en tanto que en otros niveles la menor cantidad de los depósitos se manifiesta por una fluorescencia amarillenta o amarillo verdosa (método F.Llanes, x 50).

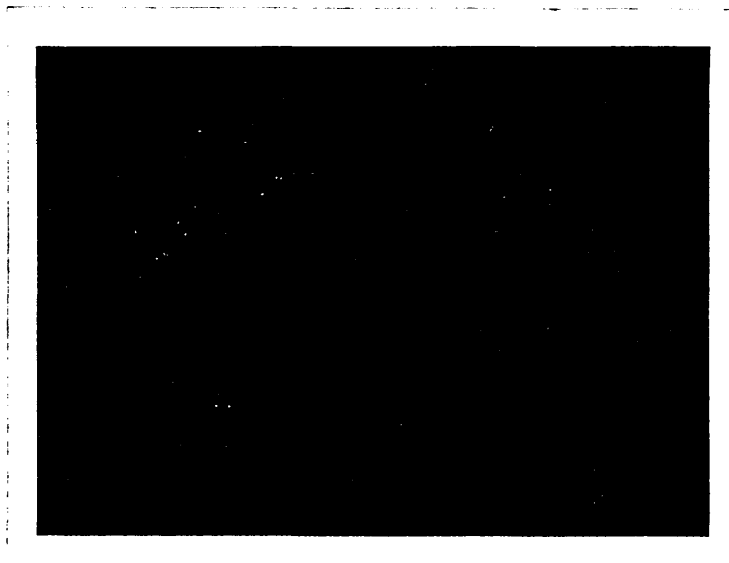


Fig. 21.- Parénquima hepático en situación porfirica avanzada presentando intensa fluorescencia (método F. Llanes, x 50).

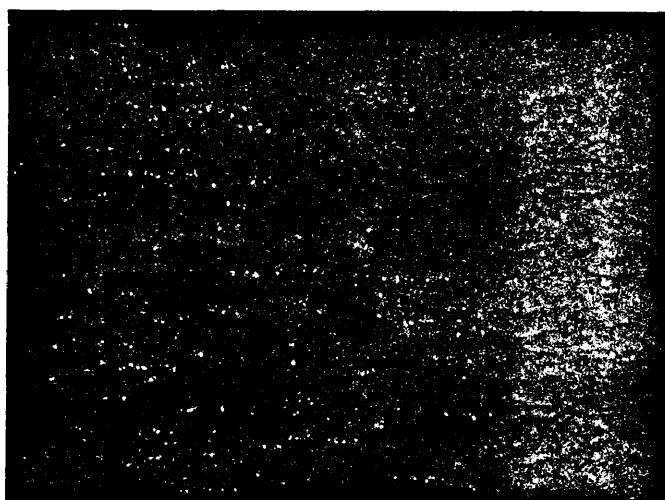


Fig. 22.- Acumulación masiva de pigmentos porfirínicos que presentan fluorescencia de tonalidad rojiza y que traduce dicha acumulación masiva en todos los niveles del lobulillo (método F.Llanes, x 50).

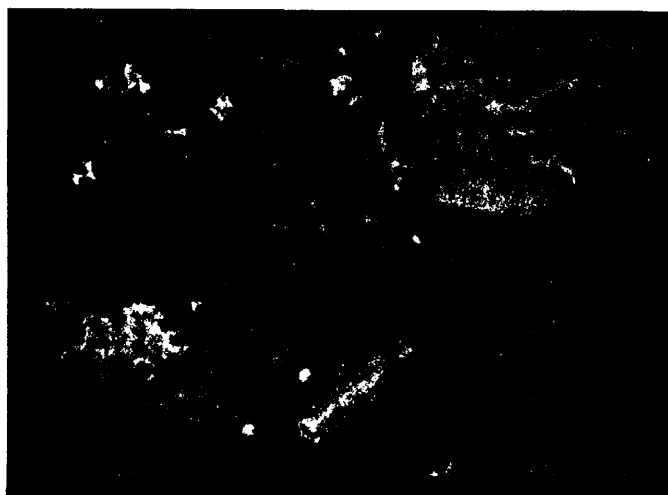


Fig. 23.- Frotis de material fecal en el que se observan restos alimenticios en grado variable de digestión y fluorescencia de diferentes tonalidades (verdosa, anaranjada, rojiza). (Observación directa en fresco, x 75).



Fig. 24.- Parénquima esplénico con presencia de pigmento fluorescente a nivel de los folículos linfoides que muestra una escasa fluorescencia que es emitida con una coloración de tonalidad verdosa (Método F. Llanes, x 58).

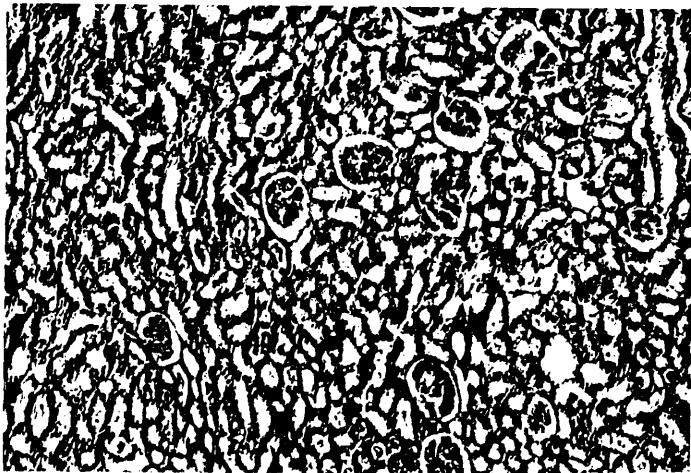


Fig. 25.- Parénquima renal en el que se observa moderada dilatación de las luces de los túbulos contorneados y mínima de los ovillos glomerulares (H.E. x 45).

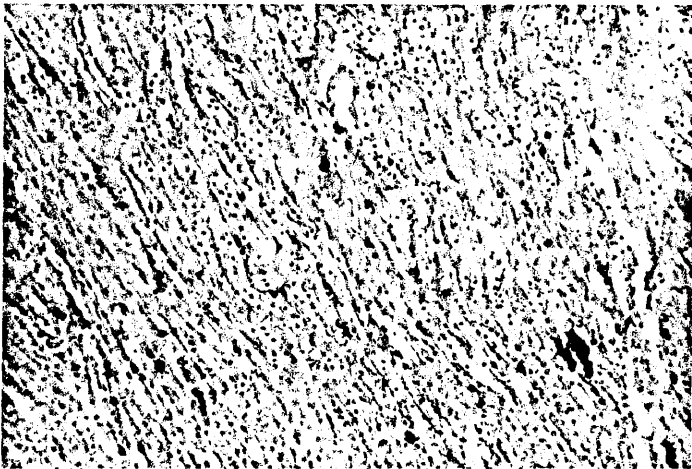


Fig. 26.- Parénquima renal a nivel de la medular, observándose acumulación de pigmentos férricos en los epitelios de los conductos colectores de Bellini (Perls, x 50).



Fig. 27.- Parénquima renal con moderada fluorescencia de los nefrocitos en todos los túbulos contorneados. La fluorescencia observable a nivel glomerular es de tipo primario (método F. Llanes, x 85).



Fig. 28.- Parénquima renal a nivel cortical en el que son visualizables cuatro formaciones glomerulares con fluorescencia primaria normal y túbulos con-
torneados con depositos porfirínicos (método F.
Llanes, x 120).



Fig. 29.- Parénquima renal a nivel cortico-medular en el cual se observa una moderada fluorescencia secundaria atribuible a depósitos porfirínicos tanto en los túbulos contorneados como en los conductos colectores (método F.Llanes, x 60).

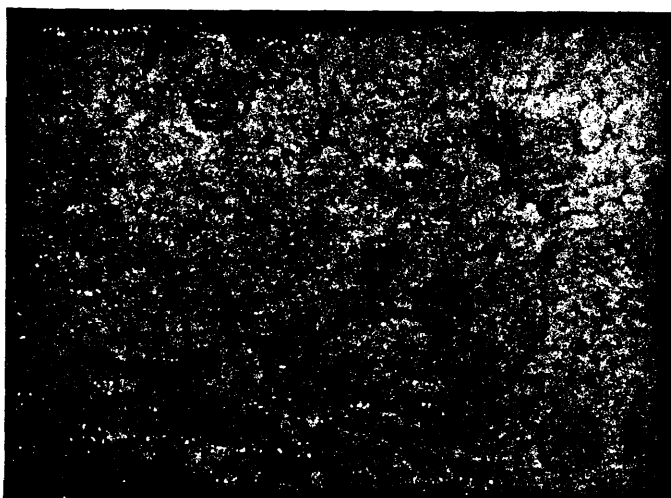


Fig. 30.- Parénquima renal con depósitos porfirínicos intensos, que se traducen por una fluorescencia de tonalidad amarillenta presente en algunos túbulos contorneados (método F. Llanes, x 85).

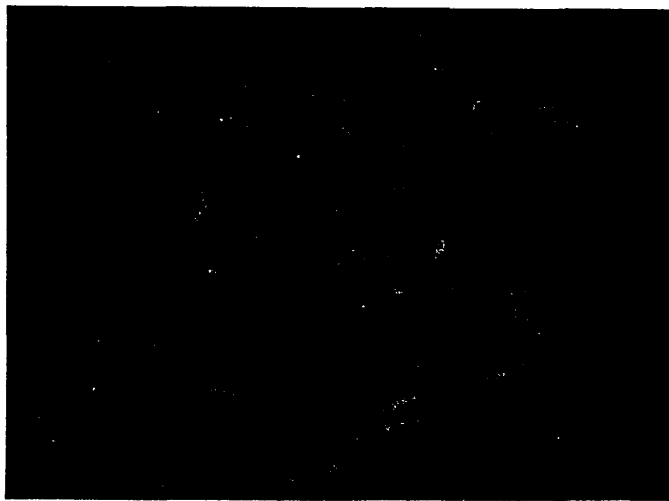


Fig. 31.- Parenquima renal con depósitos porfirínicos más intensos visualizables en los túbulos contorneados. Obsérvese la negatividad de los glomérulos (método F. Llanes, x 85)

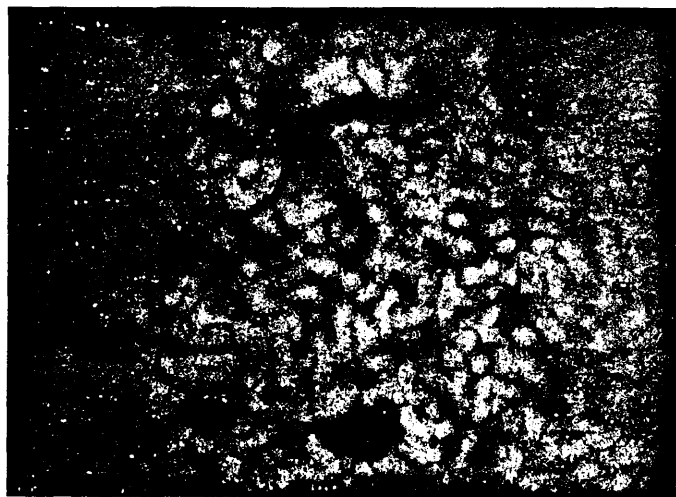


Fig. 32.- Intensos depósitos porfirínicos en la corteza renal que respetan las estructuras glomerulares (método F. Llanes, x 85).



Fig. 33.- Situación de máxima presencia de depósitos porfirínicos en las estructuras tubulares, manteniéndose la no presencia de depósitos a nivel glomerular (método F. Llanes, x 85).

Fig. 34.- Parénquima pulmonar en el que se observan tres macrófagos alveolares con citoplasma cargado de formaciones pulverulentas antracóticas, y algunas estructuras cristalinas. Neumocitos tipo I y II, de aspecto normal. Capilares conteniendo hematies. Barrera aire-sangre de espesor y características normales. Presencia de algunas formaciones lamellares intraalveolares (x 3.600).

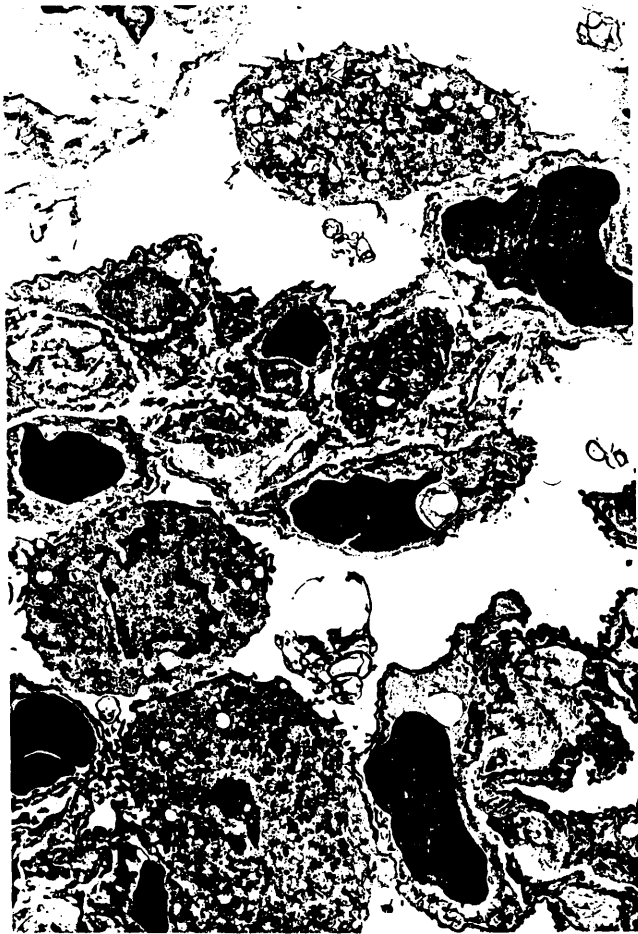


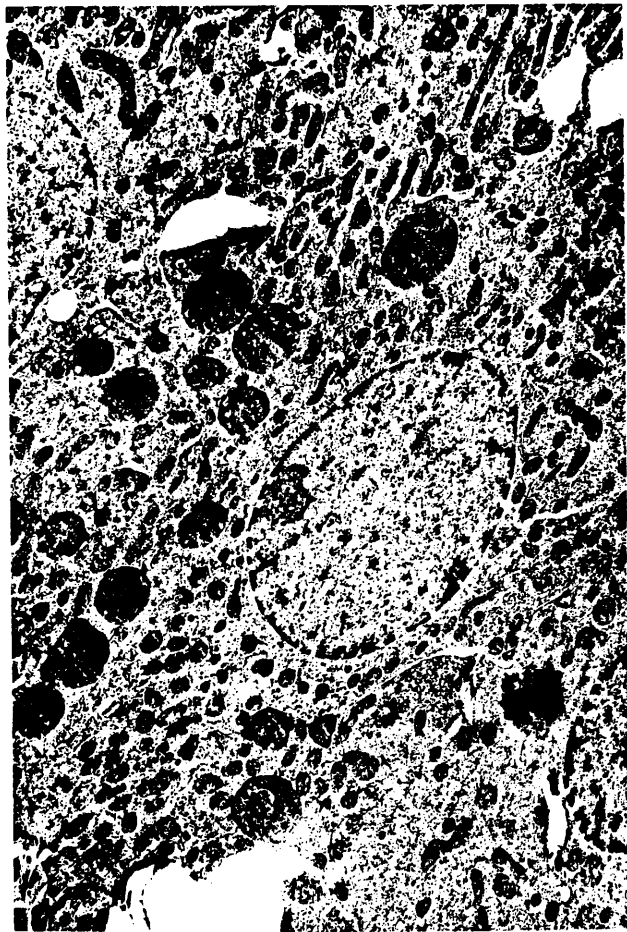
Fig. 35.- Hepatocito con múltiples liposomas a nivel
citoplasmico (x 8.000).



Fig. 36.- Citoplasma hepatocitario que contiene múltiples formaciones lamellares, algunas de las cuales simulan "figuras de mielina". Mitocondrias de aspecto habitual. Granulaciones difusas de glucógeno (x 14.500).

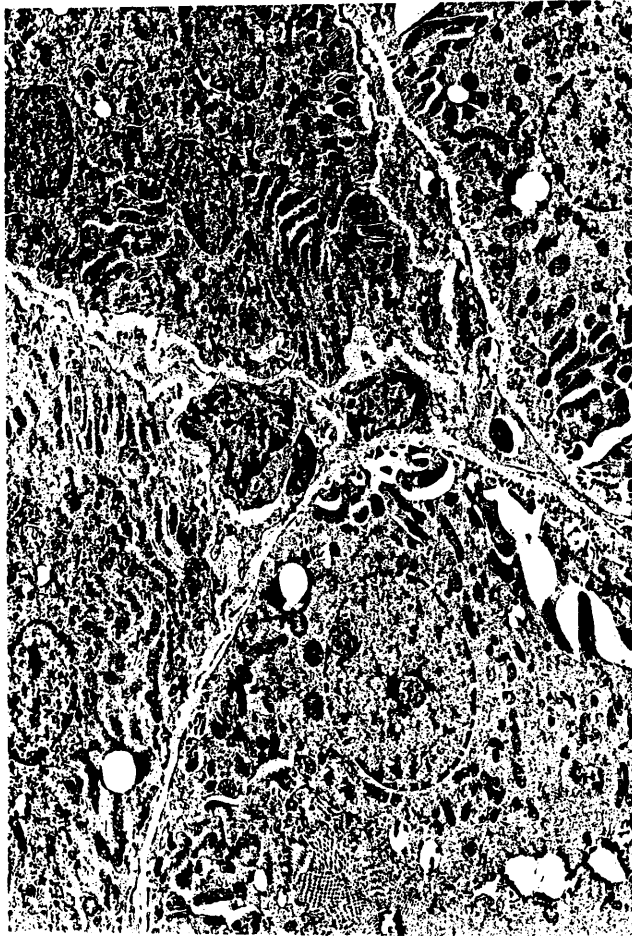


Fig. 37.- Epitelio de túbulo contorneado proximal en el que se observan abundantes siderosomas (x 3.500).



125

Fig. 38.- Area basal de varios nefrocitos con abundantes invaginaciones de membrana e innumerables mitocondrias (x 4.800).



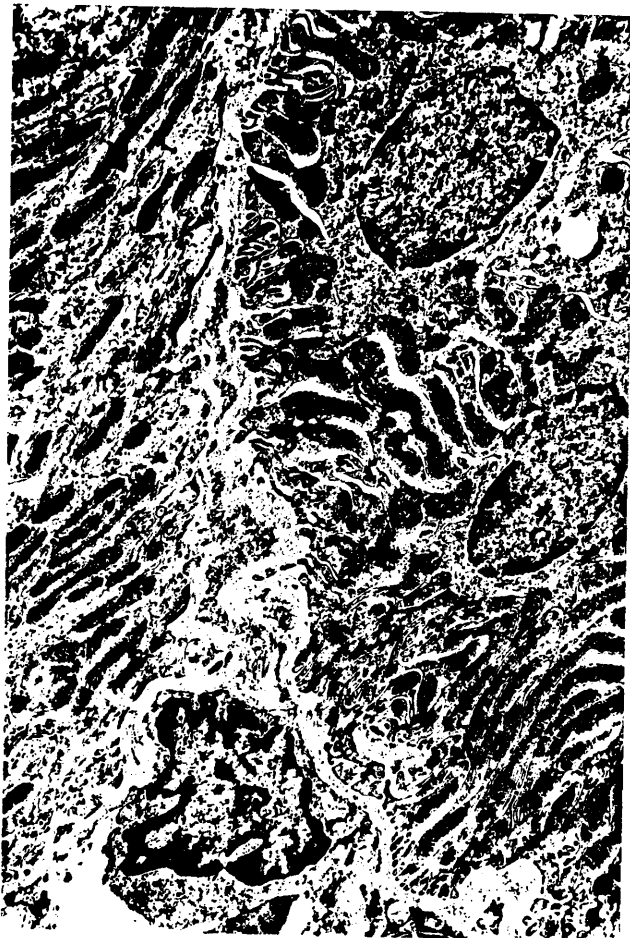
1000x

Fig. 39.- Area basal nefrocitaria con múltiples invaginaciones cuya densidad electrónica está aumentada (x 5.600).



115722

Fig. 40.- Polos basales de nefrocitos con abundantes mitocondrias de matriz homogénea y aumento de densidad ultraestructural (x 5.600).



IV - C O M E N T A R I O S

=====

Es un hecho conocido y probado que diferentes productos químicos (34,35), entre ellos algunos fármacos, son capaces de inducir en animales, alteraciones bioquímicas que asemejan cuadros de porfiria hepática humana. Entre estos productos químicos uno de los más conocidos y estudiados es el fungicida hexaclorobenceno (51), cuyo poder inductor de porfiria fue descubierto a raíz de producirse en Turquía, entre 1955 y 1960, un brote porfírico originado por una intoxicación, debida a la ingesta de una partida de trigo que había sido tratado con el fungicida HCB. Dicho descubrimiento fue realizado por Cam (58, 59) y corroborado posteriormente por numerosos autores (25,26, 27,28,29). Desde aquella fecha la porfiria experimental inducida por hexaclorobenceno ha sido considerada, debido a sus múltiples semejanzas, modelo de la porfiria cutánea tarda.

Han sido ensayadas numerosas pautas de intoxicación (73, 74,75), a partir de la ya clásica de Ockner y Schmid (27) que administraban a ratas concentraciones de HCB en la dieta, entre el 0'2 y el 0'3%. Nosotros hemos seguido la técnica empleada por Doss y cols. (40), que fueron los primeros en administrar el HCB vehiculado en aceite de oliva y aportado a las ratas mediante sonda gástrica. De esta forma se logra una absorción intestinal del HCB aproximadamente del 80%. Las dosis que hemos utilizado en nuestras series, es de 50 mg/kg. de peso/día, la cual noa permite lograr una correcta intoxicación, consiguiendose al mismo tiempo un estudio completo, secuencial, de las distintas fases por las que transcurre la intoxicación, teniendo un índice de mortalidad nulo.

Se han intoxicado en nuestra experiencia ratas hembras de raza Wistar; la razón de utilizar ratas hembras fue debido a su ya constatada por numerosos autores (51,76,78,79,80, 81), mayor susceptibilidad al HCB. A pesar de que esta mayor susceptibilidad implica en otras series una mayor mortalidad, nosotros debido a la dosis empleada y al tiempo de duración de la intoxicación, no hemos tenido ninguna baja.

Previamente a la intoxicación por HCB, se administró hierro por vía intraperitoneal, a todas las ratas de nuestras series experimentales. Se hizo con el fin de lograr que los animales desarrollaran hepatoesiderosis, hecho muy frecuente en la porfiria cutánea tarda (PCT) que con la simple administración de HCB no se consigue. De tal forma es frecuente la hepatoesiderosis en la PCT, que uno de los tratamientos de la misma se basa en realizar flebotomías frecuentes para así eliminar del organismo el hierro acumulado en exceso, no consiguiendo con ello modificar la patognomónica disminución de la urogen-decarboxilasa (98). La causa de este almacenamiento exagerado de hierro aún no está completamente dilucidado. En parte, se ha achacado, al posible abuso de bebidas alcohólicas ricas en pigmentos férricos, a las que tan adictos suelen ser estos enfermos. Los enfermos alcohólicos se ven a menudo afectados de enfermedad hepática y pancreática crónicas, las cuales aumentan la absorción intestinal de hierro, efecto que puede ser debido a la propia acción del alcohol (137,138,139). Efectivamente en los pacientes con PCT se ha demostrado un aumento en la absorción intestinal del hierro, sobre todo en los que

presentan hepatopatía cirrótica (149). Aunque el alcoholismo sea antecedente frecuente, en los enfermos con PCT (140), hay que tener en cuenta el hecho de que el alcoholismo es de una gran frecuencia, siendo la PCT una enfermedad rara (96).

Taljaard y cols. (83) fueron los primeros en demostrar que la administración de hierro a las ratas, previamente a la intoxicación con HCB, daba lugar a que las ratas desarrollaran más rápida e intensamente el cuadro porfírico. La administración exclusiva de hierro a las ratas, no da lugar a alteraciones significativas en la excreción de porfirinas (71). Por tanto, aún admitiendo el papel del hierro en la alteración del metabolismo porfírico en la PCT, por mecanismos todavía no dilucidados totalmente, no se puede aceptar más papel para el hierro que el de un simple favorecedor de la acción porfirinogénica del HCB sin ser él, por sí mismo, causa directa de la porfiria (96).

Nuestra serie II, es un palpable ejemplo de como animales de idéntica raza y sexo, con peso corporal similar, y pautas de intoxicación iguales, presentan respuestas totalmente distintas, dándose la situación paradójica que junto a ratas cuyo grado de intensidad porfírica es muy elevada, existen ratas cuya excreción porfirínica es discreta, e incluso en algunas dentro de los límites de la normalidad. Así, comprobamos, que la rata nº 5 por ejemplo, sacrificada tras solo tres semanas de intoxicación, presenta ya el característico acúmulo hepático y aumento de la excreción urinaria de porfirinas policarboxílicas, principalmente la octocarboxilporfirina y en menor cantidad

la heptacarboxilporfirina. Al lado de ella, ratas sacrificadas tras cuatro, cinco y seis semanas de intoxicación presentan una excreción porfirínica prácticamente normal.

En esta serie II es a partir de la 6^a semana de intoxicación cuando, ya de forma generalizada se detecta un incremento de la excreción de las porfirinas más policarboxílicas, así como aumento de su acúmulo a nivel hepático.

Esta serie II, debido a las pautas de intoxicación seguidas y la ya comentada dispar respuesta de los animales, es una serie muy poco homogénea, como lo demuestra la gran desviación standard que presentan los valores hechos de los diferentes parámetros.

Mucho más homogénea resultó nuestra serie III, donde la respuesta a la intoxicación de las ratas, aunque presentando notables diferencias, resultó más equilibrada. Se volvió a comprobar el masivo acúmulo hepático de octocarboxilporfirina y de heptacarboxilporfirina, junto con la intensa excreción urinaria de las mismas. Por vía fecal la excreción de las policarboxilporfirinas está también aumentada, en detrimento de la tetracarboxilporfirina, que en fases avanzadas de intoxicación alcanza cifras muy por debajo de sus valores normales. La coproporfirina (4-COOH) que en animales normales es eliminada en cantidades mayores por heces, en ratas porfíricas es excretada, sobre todo, por vía urinaria.

Todos los datos anteriormente expuestos coinciden con los hallados por diversos autores (40,41,71,72,73,76) y demuestran la semejanza de la porfiria experimental por HCB con la

porfiria cutánea tarda.

Además de todos los hallazgos anteriormente citados, detectamos, desde la segunda semana de intoxicación, la presencia en heces de isocoproporfirina o porfirina P₁ descrita por Elder (8), patognomónica de este tipo de porfiria. Para Day y cols. (74) la isocoproporfirina sería sintetizada a nivel del tracto intestinal. Blekkenhorst y cols. (86), ha demostrado que la actividad de la urogen-decarboxilasa, a nivel del colon, disminuye intensamente a partir de los diez días de iniciar la intoxicación. Para Elder (124) la presencia de isocoproporfirinas en heces es consecuencia directa de la disminución de la actividad de la urogen-decarboxilasa a nivel hepático.

Todas las ratas, en las cuales el cuadro porfirínico estaba plenamente desarrollado, evidenciaron una progresiva hepatomegalia, siendo el peso medio de la víscera en los animales experimentales superior al del grupo control. No se evidenciaron diferencias significativas en cuanto al peso corporal, dando lugar a que el cociente peso hepático/peso corporal estuviera apreciablemente incrementado, lo cual concuerda con los datos obtenidos por Ockner y Schmid (27), Taljaard y cols (83), Stonaid (80), Elder y cols. (123) y Enriquez de Salamanca y cols. (82). Campbell (90) en sus trabajos ha encontrado que si bien el hígado aumenta de tamaño progresivamente a lo largo de la intoxicación, a partir de un máximo alcanzado a la altura de la 5^a a 9^a semana, comienza a disminuir hasta hacerse inclusive menor de lo normal. Este hallazgo nosotros no lo hemos podido corroborar debido a que para los fines de nuestro trabajo

no nos interesaba grados muy intensos de intoxicación porfirica; por tanto la disminución del tamaño hepático descrito por Campbell, no ha estado presente en nuestras series.

En las Figs. 41,42,43 y 44, quedan gráficamente expuestos los datos hallados en nuestras series relativos a la excreción porfirínica. Así mismo en las Figs. 45 y 46, se presentan dos ejemplos del estudio cromatográfico de algunas de nuestras ratas.

La fig. 45 recoge los cromatogramas urinarios de las ratas (de izquierda a derecha) 10,13,12,11,14 y 15. Las orinas de las ratas 10,13,11 y 14 muestran cromatogramas poco patológicos, en contraposición con los de las ratas 12 y 15 en los que resulta evidente la notable eliminación de las porfirinas más policarboxílicas.

En la fotografía de la Fig. 46, quedan recogidos (de izquierda a derecha) los cromatogramas de heces y orina de un caso de porfiria congénita Günther, porfirinas patrones de 8, 7,6,5,4 y 2 grupos carboxílicos, heces de la rata 18, heces de un paciente con PCT y heces de la rata 17. En las heces de los animales porfirínicos es notoria la presencia de las porfirinas más policarboxílicas, mientras que en la PCT humana únicamente la heptacarboxilporfirina se encuentra incrementada. En la rata 18 resulta evidente, al igual que en el caso afecto de PCT, la presencia de isocoproporfirina o porfirina P_1 con una emigración cromatográfica intermedia entre las porfirinas penta y tetracarboxílicas.

REPARTO PORCENTUAL DE LAS PORFIRINAS
MAS POLICARBOXILICAS HEPATICAS ($\bar{x} \pm ds$)

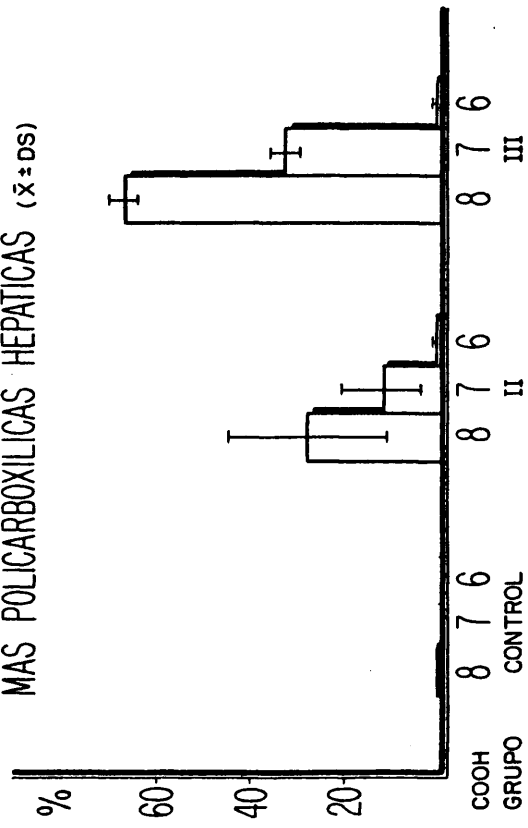


Fig. 41

F341

EXCRECION CUANTITATIVA DE
FRACCIONES URINARIAS

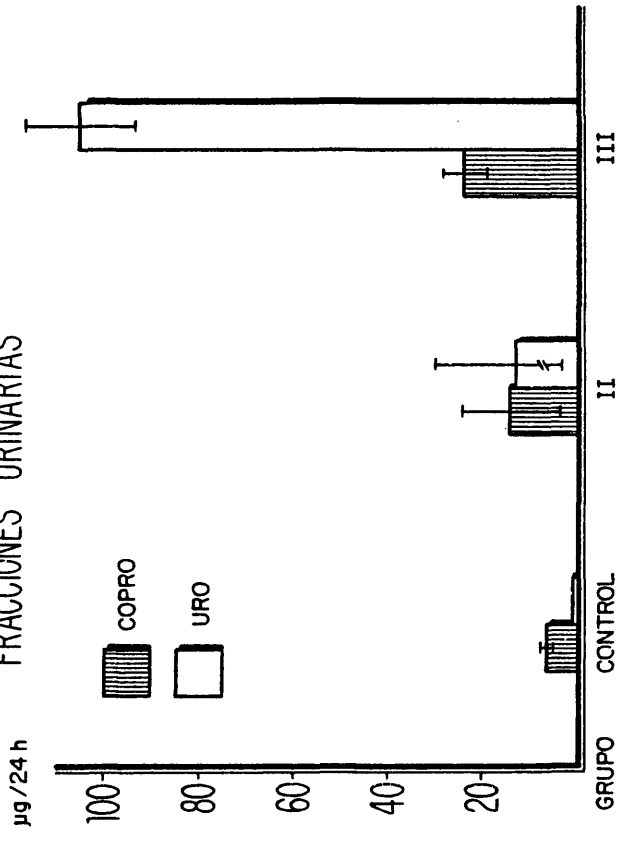


Fig. 42

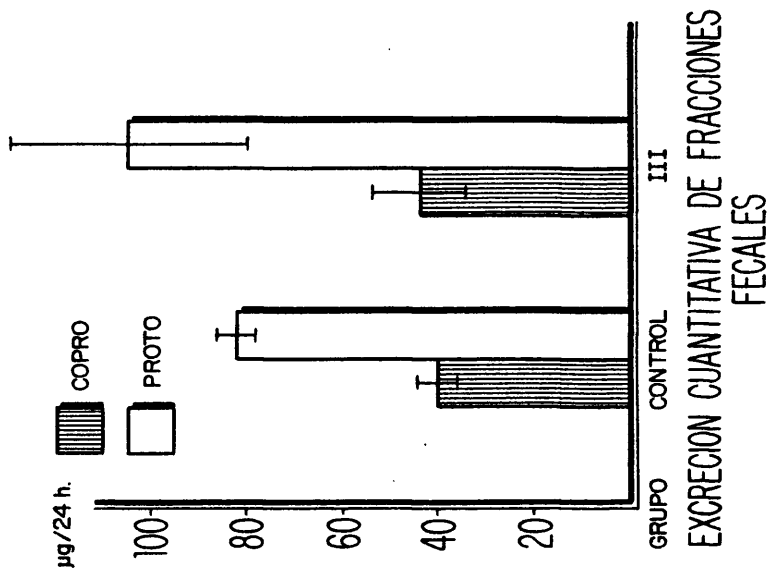


Fig. 43

EXCRECION CUANTITATIVA DE FRACCIONES
FECALES

REPARTO PORCENTUAL DE LAS CARBOXIL PORFIRINAS URINARIAS Y

FECALES (\bar{x} y DS)

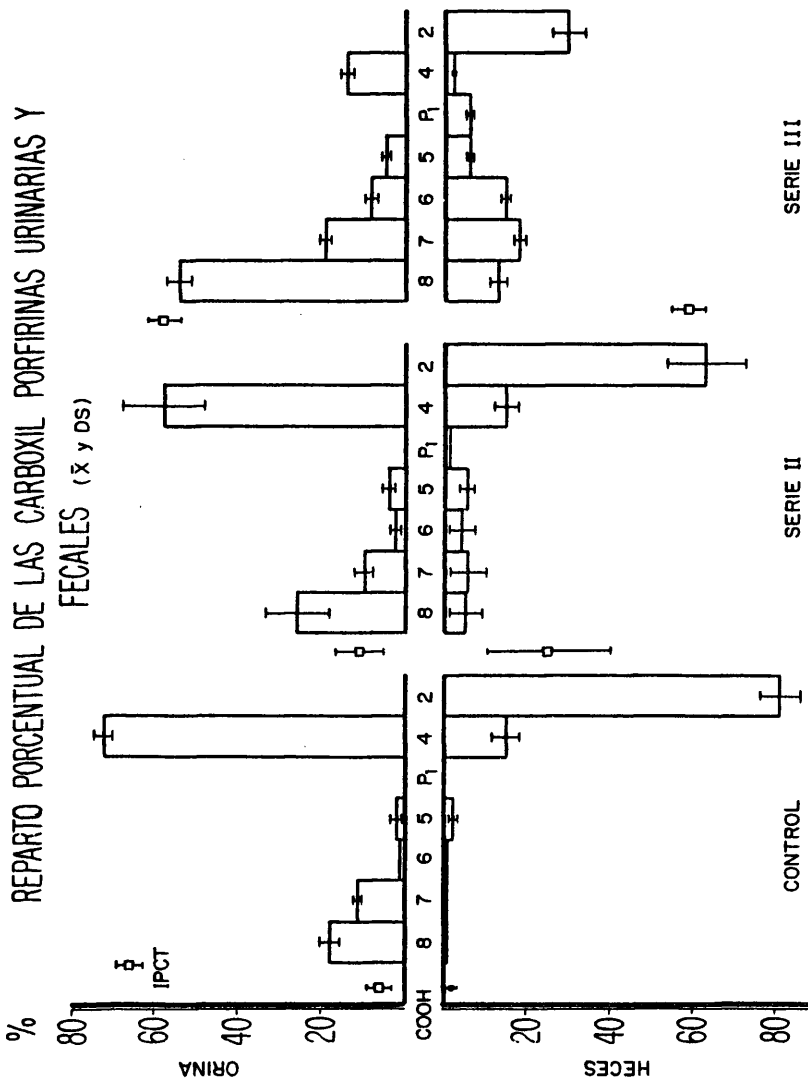


Fig. 44

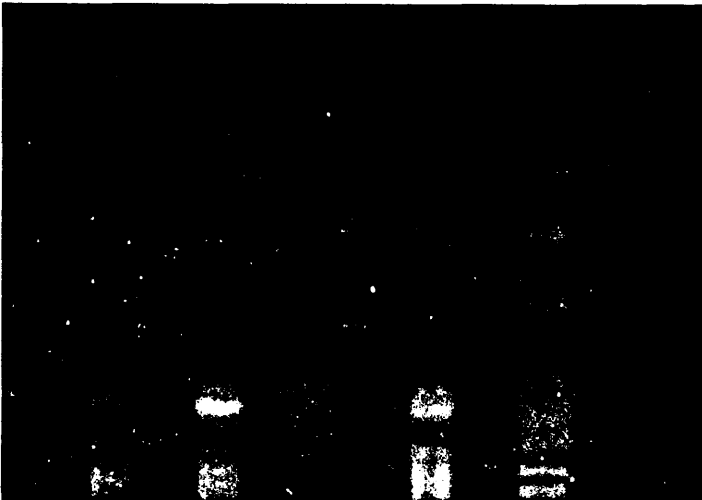


Fig. 45

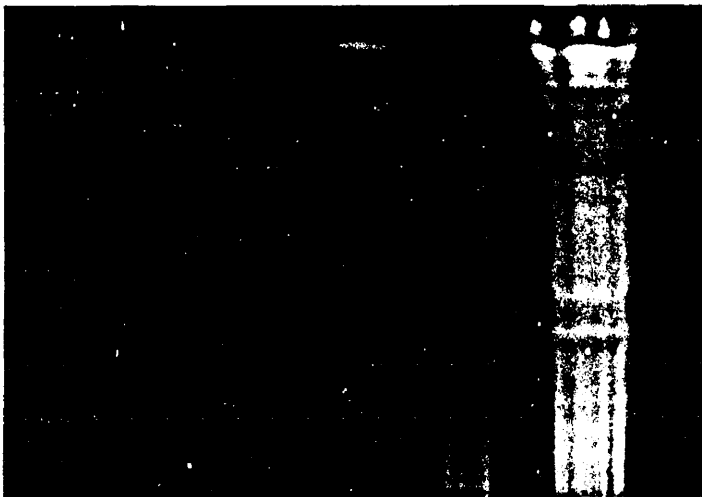


Fig. 46

Todas las ratas porfíricas estudiadas presentaban, a nivel hepático, unas lesiones histológicas observadas por microscopía reflejo de una hepatopatía variable en función del tiempo de intoxicación y de la particular respuesta de cada animal.

La porfiria cutánea tarda muestra casi constantemente una afectación hepática de mayor o menor grado. Desde la simple esteatosis a la auténtica cirrosis, todos los estadios y grados son observables. En general, la evolución de esta hepatopatía es bastante benigna, debido, sobre todo, a la larga fase inicial "prelesional o de porfirinosis" (141), en la que el único hallazgo patológico es la presencia de una fluorescencia roja bajo la luz ultravioleta en el cilindro de biopsia hepática, consecutivo al acúmulo de porfirinas.(140)

La visualización macroscópica del hígado de los animales experimentales demuestra, además del ya comentado aumento del peso y tamaño de la víscera, una coloración violácea característica de todo el parénquima hepático. Esta coloración era particularmente intensa en los hígados de las ratas de la serie III de elevado grado de intoxicación porfírica. Sin embargo, los lóbulos hepáticos no presentaban variaciones en su consistencia en relación a los de las ratas de la serie I, utilizadas como control.

Al microscopio óptico se comprueba que la hepatomegalia es debida a una hipertrofia de los hepatocitos, así como a un componente de hiperplasia de los mismos. Las lesiones más llamativas se localizan preferentemente a nivel de la vena centrolobulillar, donde son observables los hepatocitos aumenta-

dos de tamaño, cuyos citoplasmas, incluso en fases iniciales de la intoxicación presentan un aumento de su contenido hidroelectrolítico. Los citoplasmas de los hepatocitos presentan, también, signos de metamorfosis grasa, que se inicia ya en fases precoces y que abarcará la casi totalidad del lobulillo cuando la intoxicación sea más intensa.

A medida que la intoxicación progresa los hepatocitos muestran un proceso de homogeneización citoplasmática. Algunos hepatocitos pueden llegar incluso a la necrosis celular.

Las lesiones descritas anteriormente son similares con las halladas por otros autores (82,90).

Aunque la localización preferente de las lesiones hepatocelulares, es a nivel centrolobulillar, son también detectables en áreas periportales. Las lesiones perilobulillares visualizadas a microscopía óptica, coinciden con un aumento de depósitos porfirínicos en esta localización, como ya comentaremos más adelante al referirnos a los hallazgos obtenidos a microscopía de fluorescencia.

Mediante microscopía electrónica se comprueba, a nivel de las zonas lobulillares donde la metamorfosis grasa era más acusada o microscopía óptica, la existencia de numerosos liposomas en el citoplasma de los hepatocitos. Estas vesículas o vacuolas grasas han sido también descritas por Enriquez de Salamanca y cols. (82) y por Mollenhaver y cols. (143). La presencia en el citoplasma de los hepatocitos, junto a estas vacuolas grasas, de unas formaciones esferoideas en las que se produce la acumulación de un material laminar, diepuesto

en capas concéntricas, podría abogar como opinan Enriquez de Salamanca y cols. (82), a favor de la hipótesis de Simon y cols. (151) de que en la porfiria por HCB existen alteraciones de las membranas celulares, causadas por alteraciones de la estructura lipídica de las mismas.

La matriz hepatocitaria contiene abundantes granulaciones de glucógeno, dato también referido por Boger y cols.(142), lo cual podría estar a favor también, de la tesis de Simon.

Según Mollenhauer y cols. (150), las mitocondrias serían un indicador sensible del estado de las células mostrando un espectro de modificaciones morfológicas como resultado de las condiciones patológicas, impuestas por la intoxicación hexaclorobencínica. Nosotros no hemos hallado grandes alteraciones a nivel mitocondrial, a lo sumo un aumento de la densidad electrónica de su matriz. Mollenhauer y cols. (150) reconocen, sin embargo, que las alteraciones mitocondriales no son específicas de la porfiria por HCB y que, usualmente, solo una fracción de las mitocondrias de una célula presentan anomalías.

En fases iniciales de la intoxicación, los conductillos biliares presentan una configuración normal y las microvellosidades hepatocitarias que se proyectan en los mismos no presentan modificaciones. En fases más avanzadas, estos canalículos biliares aparecen dilatados y las vellosidades aplanadas, como ha sido descrito por Enriquez de Salamanca y cols. (82).

Los datos anteriormente descritos sobre microscopía electrónica coinciden además, con los obtenidos por otros

autores (54,135,136).

Waldo y Tobias (152) y Boger y cols. (142) describen en el citoplasma de los hepatocitos unos depósitos en forma de cristales porfirínicos. Nosotros no hemos evidenciado la presencia de estas inclusiones cristaloides, confirmando la falta de estos elementos en la casuística de otros autores (82 y 54).

Los núcleos de los hepatocitos no presentan ningún cambio estructural.

A diferencia de las lesiones histológicas obtenidas por microscopía óptica, que son diagnósticas, las lesiones obtenidas por microscopía electrónica no son diagnósticas, ni específicas de la porfiria por HCB, ya que también son observables en otros tipos de hepatopatía, como es el caso de la hepatopatía alcohólica, la hepatopatía por tetracloruro de carbono, o la hepatopatía por intoxicación con afeilisopropil-acetamida.

Paralelamente a los estudios realizados con microscopio óptico y electrónico, realizamos estudios de muestras de tejido hepático a microscopía de fluorescencia, utilizando la técnica de Llanes (130) para demostración histológica de la fluoresceína sódica.

Existen publicados escasos trabajos sobre estudios de los depósitos porfirínicos mediante microscopía de fluorescencia.

En 1971, Sweeney y cols. (54) estudiando los fenómenos de la porfiria experimental producidos por la administración de afeilisopropil-acetamida (AIA), dicarbetoxydihidroco-

lidina (DDC) y hexaclorobenceno (HCB) en ratas, demostraron mediante microscopía de fluorescencia, intensa fluorescencia en islas de tejido localizadas rodeando a la vena centrolobulillar.

Topi y D'Alessandro (131) describen en un trabajo, publicado en 1978, que en la porfiria cutánea tarda el exámen microscópico de las biopsias hepáticas, permite apreciar fluorescencia exclusivamente en los hepatocitos, estando, en cambio, ausente en el tejido fibroso y en los infiltrados inflamatorios.

Boger y cols. (142) también describen la emisión de fluorescencia roja por el tejido hepático de animales tratados con HCB.

Nosotros hemos encontrado que el parenquima hepático de nuestras ratas intoxicadas con HCB, presentaba fluorescencia secundaria, atribuible a la presencia de depósitos porfirínicos. La fluorescencia fue detectada ya en las ratas sacrificadas tras solo dos semanas de intoxicación. La intensidad de la fluorescencia se incrementaba en relación directamente proporcional al grado de intensidad porfirica del animal, el cual estaba relacionado, no ya sólo al tiempo de duración de la intoxicación, sino también como ya hemos comentado, a la respuesta particular de cada animal.

La localización de los depósitos porfirínicos era a nivel hepatocitario, coincidiendo en ello con los hallazgos de Topi y D'Alessandro (131). Los depósitos se iniciaban, generalmente, a nivel de la vena centrolobulillar, afectando en

los momentos iniciales de la intoxicación a grupos de hepatocitos aislados, es decir, la afectación en los primeros estadios es localizada. no difusa. En esta fase, la fluorescencia emitida por los depósitos porfirínicos es de una tonalidad amarillo-anaranjada.

Estos hallazgos coinciden con los obtenidos a microscopía óptica, mediante la cual visualizabamos que las lesiones hepatocitarias, más llamativas, eran generalmente a nivel de la vena centrolobulillar.

Asi mismo, mediante la técnica de Perls, se demostraba la presencia de pigmento férrico a nivel perilobulillar, lo cual en un primer momento podría hacer pensar, que existiera un cierto grado de competitividad entre los depósitos férricos y los depósitos porfirínicos, en cuanto a su localización a nivel hepático. Sin embargo, Sweeney y cols. (54) describieron también la presencia de depósitos porfirínicos, a nivel centrolobulillar, en ratas intoxicadas con HCB y que no habían sido hechas previamente sideróticas. Enriquez de Salamanca y cols. (82) describen idénticas lesiones a microscopía óptica, en ratas a las cuales no se les había administrado hierro.

En estadios más avanzados, la fluorescencia deja de ser tan localizada, para hacerse más difusa extendiéndose a todo el lobulillo, pero siempre es más intensa en los lugares iniciales de presentación. Al hacerse más homogénea la fluorescencia, correspondiendo a grados intensos de intoxicación, adquiere una tonalidad rojiza tanto mas fuerte, cuanto mayores son los depósitos porfirínicos. Aún en estos casos, en que

la fluorescencia abarca casi todo el lobulillo, existe un contraste cromático que nos permite identificar las áreas donde se iniciaron los depósitos.

A pesar de ser la región centrolobulillar la localización más frecuente de iniciación de los depósitos porfirínicos, hemos hallado, en ocasiones, que la localización inicial se producía también y simultáneamente en áreas perilobulillares, lo cual era visualizable no solo en los mismos animales sino, inclusive, en las mismas preparaciones. Ello se correlacionaba con los mismos casos en que a microscopía óptica veíamos lesiones hepatocitarias a nivel perilobulillar.

Smith y cols. (148) comprobaron que los hepatocitos de la región centrolobulillar contienen aproximadamente la mitad de glutatión que los de la región periportal por lo que aquellos son particularmente susceptibles a la agresión de metabolitos tóxicos. Muchos xenobióticos son metabolizados por el sistema microsomal citocromo P-450 a metabolitos tóxicos que resultan inactivados al formar conjugados hidrosolubles con el glutatión merced a la actuación del enzima glutatión-S-transferasa. Si la tasa de glutatión tisular queda deplecionada, estos metabolitos altamente reactivos son capaces de unirse a macromoléculas de vital importancia, tales como ácidos nucleicos y proteínas, iniciándose así el daño tisular. Los hepatocitos de la región centrolobulillar muestran una mayor tasa de citocromo P-450, ya que en ellos el metabolismo oxidativo de los xenobióticos discurre con mayor intensidad que en los hepatocitos periportales. Por esta razón, sumada a su menor conte-

nido en glutation resultan pues menos protegidos.

Smith y cols. (134,147), observaron que los hígados de las ratas Agus con porfiria experimental inducida por HCB, mostraban una falta de uniformidad en cuanto al colorido y a su fluorescencia bajo la luz UV . Los lóbulos posteriores (caudados) contenian una menor cantidad de porfirinas que el lóbulo medio, sobre todo cuando la porfiria no era muy intensa, ya que en los estadios finales de intoxicación la cantidad de porfirinas hepáticas acumuladas se igualaban. No apreciaron diferencias entre los diversos lóbulos en cuanto al contenido de hierro, ni en cuanto a la tasa de HCB acumulado, pero si comprobaron que dichos lóbulos posteriores mostraban una menor inhibición de la actividad de la uroporphirigogeno-decarboxilasa.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede deducir que los depósitos porfirínicos no se localizan a nivel hepático de forma homogénea, sino que, la misma se realiza de forma diferencial, tanto en el aspecto de su distinta concentración cuantitativa, como en el de su variable disposición topográfica (es decir, los depósitos porfirínicos hepáticos, son heterogéneos, tanto en su acumulación cuantitativa como en su distribución topográfica).

En ninguna de nuestras ratas, ni siquiera en las ratas de la serie III, hemos detectado la presencia de tumores benignos o malignos, a nivel de cualquier órgano. En ninguno de los animales intoxicados pudimos apreciar la existencia de hepatoma. Cabral y cols. (145) aportaron en 1977, la primera evidencia experimental de la carcinogenicidad del HCB crónicamente

administrado a "hamsters" en la dieta. Este mismo grupo de trabajo (146) comprobó posteriormente que la exposición durante 120 semanas, de ratones a dietas que contenían más de 100 partes por millón del fungicida HCB (ingesta efectiva equivalente a 12-24 ml/kg. de peso/día), daba lugar a una elevada incidencia de tumores hepáticos. Este mismo hecho fue también observado en un reducido grupo de ratas alimentadas por HCB (100 ppm = 5 mg./kg./día) durante 75 semanas. Estos resultados invitan a recomendar especiales precauciones en el manejo de este y similares compuestos de tan extendido uso industrial, que pueden contaminar alimentos y ambiente.

En cuanto a nivel renal, se observa mediante visualización directa de los riñones, una coloración violácea de los mismos, idéntica a la observada en el hígado. No se evidenciaron cambios en el volumen y peso de los riñones. En todos los animales experimentales se delimitaba perfectamente la corteza de la médula renal.

La microscopía óptica nos mostraba una moderada dilatación de las luces de los túbulos contorneados, por aplanamiento de los nefrocitos. A nivel glomerular las únicas lesiones detectables eran una mínima retracción de los ovillos glomerulares, con aumento del espacio de Bowman que aparecía ópticamente vacío.

La microscopía electrónica nos confirmó la prácticamente ausencia de lesiones glomerulares.

Los epitelios de los túbulos contorneados proximales y distales, mostraban en sus citoplasmas unas formaciones esfe-

roideas compuestas de material homogéneo denso a los electrones, que se identificó como siderosomas.

Los núcleos de los nefrocitos no presentaban ninguna alteración estructural.

Las mitocondrias tampoco presentaban alteración alguna, ocasionalmente mostraban una mayor densidad electrónica de su matriz.

Existen escasísimas publicaciones referentes a estudios mediante fluorescencia de depósitos porfirínicos renales.

Czitober y cols. (133) en 1970, estudiaron mediante microscopía de fluorescencia las biopsias renales de tres pacientes con porfiria cutánea tarda, observando fluorescencia roja a nivel de las células epiteliales de los túbulos contorneados y del asa de Henle. En contraste los túbulos uriníferos y los glomérulos no mostraban fluorescencia.

Zawirska (132) en 1978, tras alimentar con acetato de plomo a un lote de ratas, encontró además de la presencia de numerosos tumores benignos y malignos situados en diferentes órganos, un marcado acúmulo de uroporfirina en riñón. El estudio con microscopía de fluorescencia reveló la característica fluorescencia roja de las porfirinas en la corteza y en la unión cortico-medular renal, particularmente en el epitelio de los túbulos contorneados proximales. No encontraron fluorescencia a nivel de los glomérulos.

Nosotros mediante la técnica de Llanes (130), observamos a nivel renal y en las etapas iniciales de la intoxicación una fluorescencia amarillenta localizada en los epitelios

nefrocitarios de los túbulos contorneados, que según se intensificaba la intoxicación y los depósitos de porfirinas aumentaban, adquirían una tonalidad que pasaba del amarillo-rojizo intenso al rojo intenso. La localización de estos depósitos concuerda con los hallazgos obtenidos a microscopía óptica.

A nivel glomerular no se comprobó la existencia de depósitos porfirínicos. Igual le sucedió a Czitober en enfermos con PCT y a Zawirska en ratas intoxicadas por acetato de plomo.

En la unión cortico-medular existía distinto grado de concentración de depósitos porfirínicos, observándose fluorescencia más intensa en los tramos finales de los túbulos colectores y más moderada a nivel de los epitelios de los conductos de Bellini; ello permite observar en esta localización distintos contrastes cromáticos dependientes de la diferente cantidad de depósitos porfirínicos. Los animales de la serie III, presentaban una masiva fluorescencia de los túbulos, tanto a nivel cortical como medular, pero persistiendo la ausencia de fluorescencia de los glomérulos.

La localización de la fluorescencia en nuestros animales experimentales, es idéntica a la que se aprecia en la PCT. La presencia de fluorescencia a nivel de los nefrocitos de los túbulos, indicaría el lugar donde probablemente tiene lugar la reabsorción porfirínica. Para Doss (40) el acúmulo renal de porfirinas no indica que exista una síntesis local de la mismas, como defiende Day (74), sino que representaría la presencia renal de las porfirinas formadas en el hígado y

transportadas por la sangre al riñón para su excreción.

La escuela Sudafricana ha emitido la teoría de un posible origen extrahepático de las porfirinas; esta hipótesis no ha sido aceptada por la mayoría de los autores.

Además del riñón y del hígado, estudiamos a microscopía otros órganos de las ratas porfíricas.

En el parénquima pulmonar se comprobó, mediante microscopía electrónica la conservación citoarquitectónica de los neumocitos, siendo la barrera aire-sangre de espesor y morfología normal. Goldstein y cols. (144) han descrito una marcada hipertrofia y una proliferación de las células del revestimiento endotelial de los vasos pulmonares más pequeños. Este hecho nosotros no lo hemos hallado. Apreciamos presencia de fluorescencia a nivel de la mucosa y corion de laringe, tráquea y bronquios principales. En el parénquima pulmonar los depósitos de porfirinas se ubicaban en el intersticio.

En el aparato digestivo, en toda su longitud, se observaron depósitos porfirínicos en corion y en el conectivo intersticial de la muscular.

Se hallaron depósitos porfirínicos en la piel, principalmente en dermis.

En las muestras de tejido óseo la fluorescencia se detectó en la sustancia intercelular y en los osteocitos.

Nunca pudimos demostrar fluorescencia en los centros y vías nerviosas. En el globo ocular se observó la presencia de pigmentos porfirínicos que producían una moderada fluorescencia, solamente localizadas en las tónicas coroides y en la

esclerocornea; nunca fue visualizada a nivel retiniano. Esto nos demuestra que la barrera hematoencefálica y la barrera hemato-retiniana son impermeables a los pigmentos porfirínicos.

El estudio del material hemático a microscopía de fluorescencia resultó negativo en todos los casos estudiados.

La orina, como era de esperar, resultó intensamente fluorescente, en los animales experimentales, aunque la fluorescencia dependía del grado de intoxicación. También eran muy fluorescentes las heces; las heces de las ratas control nunca presentaron tan notoria fluorescencia.

Todo lo anteriormente expuesto nos confirma la presencia de depósitos de porfirinas universalmente distribuidas por todo el organismo (en el tejido conectivo) exceptuando el sistema nervioso. La ventaja del método de Llanes (130) aplicado al estudio de depósitos de porfirinas, reside en que nos permite un estudio de las mismas desde la segunda semana de intoxicación en que ya es visualizable la fluorescencia emitida por dichos depósitos. Nos permite también el estudio exacto de las localizaciones de los depósitos porfirínicos y el lugar exacto de su iniciación.

Además, presenta la gran ventaja de que las preparaciones realizadas de las muestras, siguen presentando fluorescencia meses después de procesadas.

V - C O N C L U S I O N E S
=====

1.- Es ratas controles (serie I) la coproporfirina (tetracarboxílica) fue la porfirina predominante en orina, mientras que en heces lo fue la protoporfirina (dicarboxílica).

2.- Diversos grados de porfiria experimental se indujeron a las ratas de las serie II y III mediante la administración por sonda gástrica de reiteradas dosis de HCB vehiculado en aceite de oliva. Se apreciaron considerables variaciones en la respuesta individual de los animales.

3.- La plena situación porfírica se caracterizó bioquímicamente por el acúmulo hepático y excreción urinaria y fecal masivos de las porfirinas más policarboxílicas (uro y haptacarboxilporfirinas) así como por la patognomónica presencia de isocoproporfirinas.

4.- Respecto a las controles, las ratas porfíricas evidenciaron un aumento de tamaño y peso del hígado. No se apreciaron diferencias en el peso corporal.

5.- Macroscópicamente tanto el hígado como los riñones de las series experimentales presentaron una característica coloración violácea.

6.- A microscopía óptica se visualizaron lesiones a nivel centrolobulillar, consistentes en una hipertrofia de los

hepatocitos cuyo contenido hidroeléctrico está aumentado , presentando también evidentes signos de metamorfosis grasa.

7.-Mediante microscopía electrónica se comprobó en las áreas donde la metamorfosis grasa era más evidente, la presencia de abundantes liposomas en el citoplasma de los hepatocitos , donde también se visualizaron formaciones esferoideas en las que se producía la acumulación de material laminar, dispuesto en capas concéntricas, recordando, en ocasiones a los llamados "cuerpos de mielina".

No se detectó con nuestra metódica la presencia de inclusiones cristaloides porfirínicas.

8.-Mediante técnica de Perls, se estudiaron los depósitos de pigmentos férricos, a nivel hepático, cuya localización preferente fue perilobulillar, contrastando con la prioritaria localización centrolobulillar de los depósitos porfirínicos.

9.-Mediante microscopía de fluorescencia y utilizando la técnica de Llanes, se apreció que la localización, mas frecuente, de iniciación del acúmulo de depósitos porfirínicos era el área centrolobulillar. El ocasiones, se halló que la iniciación era también y simultáneamente, perilobulillar. Esto era visible, no solamente en los mismos animales, sino también en las mismas preparaciones.

Los depósitos porfirínicos no se localizaron a nivel hepático de forma homogénea, sino que lo hacían de forma diferencial, tanto en el aspecto cuantitativo como en el de su variable disposición topográfica. Es decir, los depósitos porfirínicos hepáticos eran heterogéneos, tanto en su acumulación como en su distribución topográfica.

10.- Los riñones tanto a microscopía óptica como electrónica, no presentaron grandes alteraciones estructurales.

11.- Mediante microscopía de fluorescencia, se detectaron los depósitos porfirínicos a nivel de los túbulos contorneados principalmente, y en menor cuantía en los túbulos colectores. Los glomérulos renales estaban libres de depósitos porfirínicos.

12.- Los depósitos porfirínicos se pudieron observar distribuidos mediante microscopía de fluorescencia, de forma universal en el tejido conectivo.

13.- Nunca se detectó fluorescencia a nivel de los centros y vías nerviosas, lo cual nos indica que la barrera hematoencefálica era impermeable a los pigmentos porfirínicos.

14.- Tampoco se visualizó fluorescencia a nivel retiniano, lo que indica igualmente, que la barrera hematoretiniana

era también impermeable a las porfirinas.

15.- Los estudios del material hemático de las ratas porfíricas, no presentaron fluorescencia.

16.- El método de Llanes permitió detectar desde la segunda semana de intoxicación la presencia de los depósitos de pigmentos porfirínicos, principalmente los ubicados a nivel hepático.

VI - BIBLIOGRAFIA

- 1.-SCHMID,R.; SCHWARTZ,S. y WATSON,C.J.: Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria. Arch. Intern. Med., 93:167, 1954.
- 2.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R. y CATALAN,T.: El problema de la clasificación de las porfirias. Arch.Fac.Med.,23:195, 1973.
- 3.- GIDARI,A.S. y LEVERE,S.D.: Enzymatic formation and cellular regulation of heme synthesis. Semin.Hematol.,14:145, 1977.
- 4.- MEYER,V.A. y SCHMID,R.: The porphyrias, en: "The metabolic basis of in-herited disease ".p.166 Stanbury J.E. y cols. 1978. 4ª edición. McGraw-Hill Book Company. New York.
- 5.- SHEMIN,D.: The succinate-glicine cycle: The role of delta aminoaevulinic acid in porphyrin syntesis. En: Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. Ciba Foundation. Churchill, London, 1955.
- 6.- FRYDMAN,B.; FRYDMAN,R.B.; VALASINAS,A.; LEVY,S. y FEINSTEIN, G.: The mechanism of uroporphyrinogen byosintesis. Ann.N. Y. Acad. Sci., 244:371, 1975.
- 7.- JACKSON,A.H.; SANCOVICH,H.A.; FERRAMOLA,A.M.; EVANS,N.; GALMES,D.E.; MATLIN,S.A.; ELDER,G.N.; SMITH,S.G.: Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrius. Philos-Traus R. Soc. London. Ser. B, 273:119, 1975.
- 8.- ELDER,G.H.: Differentiation of porphyria cutanea tarda symptomatica from other typpes of porphyria by measurement of isocoproporphyrin in faeces. J. Clin. Pathol., 28:601, 1975.

- 9.- GAJDOS,A.; Sur la regulation quantitative de la biosynthese. Nouv. Rev. Franc. d'Hématol., 5:241, 1965.
- 10.- LASCELLES,J.: The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll fermentation in growing cultures of Rhodospseudomonas spheroides. J. Gen. Microbiol.,23:487,1960.
- 11.- GAJDOS,A. y GAJDOS-TOROK,M.: Porphyrines et porphiries. Biochemoc et clinique. Masson et Cie. edit. ,París,1969.
- 12.- GRANICK,S. y SASSA,S.: Delta-aminolevulinic and synthetase in the control of heme and chlorophyll synthesis. Metabolic regulation. Edit. H.J. Vogel. Academic. N.Y., 1971.
- 13.- KURASHIMA,Y.; HAYASHI,N. y KIKUCHI,G.: Mechanism on inhibition by hemin of increase of delta-aminolevulinic synthetase in liver mitochondria. J. Biochem.,67:863, 1970.
- 14.- STOKVIS,B.J. Ned. Tijdschr. Geneesk. rB 2d,25:409, 1889.
- 15.- STOKVIS,B.J. Z. Klin.Med., 28:1, 1895.
- 16.- FISCHER,H. y DUESBERG,R. Arch.Exptl. Pathol. Pharmakol., 166:95, 1932.
- 17.- RIMINGTON,C. y HEMMINGS,A.W., Lancet,1:770, 1936.
- 18.- RIMINGTON,C. y HEMMINGS,A.W.,Biochem.J.Tokyo,33:960,1939.
- 19.- SCHWARTZ,S.; KAPRIOS,M. y SCHMID,R., Proc.Soc. Exptl. Biol. Med., 79:463, 1952.
- 20.- SCHMID,R.; FIGEN,J.F. y SCHWARTZ,S., J. Biol. Chem.,217: 263, 1952.
- 21.- SCHMID,R. y SCHWARTZ,S., Proc.Soc. Exptl.Biol.Med.,81:685, 1952.
- 22.- DUESBERG,R.; Muench. Med.Woschicht, 79:1821, 1932.

- 23.- GOLDBERG,A. y RIMINGTON,C. Proc.Roy.Soc., London, Ser. B. 143:257, 1955.
- 24.- SALOMON,H.M. y FIFGE,F.H.J. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 100:583, 1959.
- 25.- KANTEMIR,I.; Porphyrin kimyasi in analiz metodlari. Turk If. Tegr. Biyol. Derg. 20, 1, 1960.
- 26.- SCHMID,R.: Cutaneous porphyria in Turkey. New. Engl.J. Med., 263:397-398, 1960.
- 27.- OCKNER,R.K. y SCHMID,R.: Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorobenzece intoxication. Nature,Lond., 189, 499, 1961.
- 28.- DE MATTEIS,F.; PRIOR,B.E. y RIMINGTON,C.: Nervous and biochemical disturbances following hexachlorobenzece intoxication. Nature, Lond., 191:363-366, 1961.
- 29.- GAJDOS,A. y GAJDOS-TOROK,M.: The therapeituc affect of adenosine-5-monophosphoric acid in porphyria. Lancet, 1961. II, pag. 175-177.
- 30.- WESTON-HURST,E. y PAGEK, G.E. Brit.J.Dermatol.,75:105, 1963.
- 31.- DE MATTEIS,F. y RIMINGTON,C. Brit.J.Dermol.,75:91, 1963.
- 32.- PRATO,V.; MAZZA,V. y RAMELLO,A., Lancet,2:1276, 1964.
- 33.- GOLDBERG,A. Biochem.Soc.Symp.,28:35, 1968.
- 34.- TSCHUDY.,D.P. y BONKOWSKY,H.L.: Experimental porphyria. Fed. Proc., 31 (1), pag. 147-159, 1972.

- 35.- STRIK,J.J.T.W.A.: Porphyrionogenic action of polyhalogenated aromatic compounds, with special reference to porphyria and enviromental impact. Diagnosis and therapy of porphyrias and lead intoxication. pag. 151-164. Ed. M. Doss. Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- 36.- CAM,C. y NIGOGOSYAN,G.: Acquired toxic porphyria cutanea tarda due to hexachlorobenzene. J. Amer.Med.Ass.,183:88, 1963.
- 37.- CENTIGIL,A.I. y OZEN,M.A.: Toxic porphyria. Blood, 16: 1002, 1960.
- 38.- STRIK,J.J.T.W.A.: Chemical porphyria in japonese quail. Enzyme, 16:211, 1973.
- 39.- IATROPOULOS,M.J.; HOBSON,W.; KNAUF,V.J.; ADAMS,H.P.: Morphological aspects of toxicity in female rhesus monkeys. Toxicol. Appl. Pharmacol., 37:443, 1976.
- 40.- DOSS,M.; SCHERMULY,E. y KOSS,G.: Hexachlorobenzece porphyria in rats as a model for human chronic hepatic porphyrias. Ann. Clin. Res., 8 Suppl. 17:171, 1976.
- 41.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; RIOS DE MOLINA,M.C.; WAINSTOCK DE GALMANOVICI,R.Y. y TOMIO,J.M.: Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. Porphyrius in Human Diseases. Ed. M. Doss. S. Karger. Baseel, pag. 445-452, 1976.
- 42.- STONARD,M.D.: Experimental hepatic porphyria induced by HCB as a model for human symptomatic porphyria. Brit. J. Haematol., 27:617, 1974.

- 43.- POLAND, A.P. y GLOVER, E.: 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-20-p-dioxin: a potent inducer of delta-aminolevulinic acid synthetase. *Science*, 179:476-477, 1973.
- 44.- GOLDSTEIN, J.A.; HICKMAN, P.; BERGMAN, H. y VOS, J.G.: Hepatic porphyria induced by 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the mouse. *Res. Commun. Chem Path. Pharmacol.*, 6:919-928, 1973.
- 45.- BLEIBERG, J.; WALLEN, M.; BRODKIN, R. y APPLEBANM, I.L.: Industrially acquired porphyria. *Arch. Derm. Clin.*, 89:793-797, 1964.
- 46.- POLAND, A.P.; SMITH, D.; METTER, G. y POSSICK, P.: A health survey of workers in a 2,4-D y 2,4,5,-T plant. *Arch. Environm. Hetl.*, 22:316-327, 1971.
- 47.- VOSS, J.G. y KOEMAN, J.H.: Comparative toxicologic study with polychlorinated biphenyls in chickens with special reference to porphyria, edema formation, liver necrosis and tissue residues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17:656-668, 1970.
- 48.- VOS, J.G. y NOTENBOOM-RAM, E.: Comparative toxicity study of 2,4,5, 2',4',5', hexachlorobiphenyl and polychlorinated biphenyl mixture in rabbits. *Toxicol. appl. Pharmacol.* 23:563-578, 1972.
- 49.- STRIK, J.J.T.W.A.: Toxicity of hexachlorobenzene and hexabromobiphenyl. *Meded. Fak. Landbouwweten-Schappen, Gent.*, 38:709, 1973.

- 50.- KIMBROUGH,R.D.: The toxicity of polychlorinated polycyclic compounds and related chemicals. GRG. Crit. Rev. toxicol., 2:445-498, 1974.
- 51.- STRIK,J.J.T.W.A.; KOEMAN,J.H.: Porphyrinogenic action of hexachlorobenzene and octachlorostyrene. En: Porphyrins in human diseases. Doss,M. (ed.), pág.423. Basel:Karger, 1976.
- 52.- KOSS,G.: Studies on the pharmacokinetics of hexachlorobenzene in rats. En : Porphyrins in human diseases. Doss,M. (ed.), pág. 414-417, Basel: Karger, 1976.
- 53.- VILLENEUVE,D.C.: The effect of food restriction on the redistribution of hexachlorobenzene in the rat. Toxicol. app. Pharmacol., 31:313-319, 1975.
- 54.- SWEENEY,G.D.; JANIGAN,D.; MAYMAN,D. y LAI,H.: The experimental porphyrias:a group of distinctive metabolic lesions. S. Afr. J.Lab.Clin.Med., 17:68-72, 1971.
- 55.- PARKE,D.V. y WILLIAMS,R.T.: Studies in detoxication 81. The metabolism of halogenobenzenes: (a) Penta and hexachlorobenzenes (b) Further observations on 1,3,5 trichlorobenzenes. Biochem.J. 74:5-9, 1960.
- 56.- LUI,H. y SWEENEY,G.D.: Hepatic metabolism of hexachlorobenzene in rats. Tebs. Lett., 51:225-226, 1975.
- 57.- LUI,H.; SAMPSON,R. y SWEENEY,G.D.: Hexachlorobenzene porphyria: purity and metabolic fate of HCB. En: Porphyrins in human diseases. Doss,M. (ed.),pag. 405-413, Basel: Karger, 1976.

- 58.- CAM,C.: Cases of skin porphyria related to HCB intoxication. *Saglik Dergisi*, 32:215-216, 1958.
- 59.- CAM,C.: Cutaneous porphyria due to intoxication. *Dirim Istambul*, 34:11, 1959.
- 60.- WRAY,J.D.; MUFTU, Y. y DOGRAMACI,I.: Hexachlorobenzene as a cause of porphyria turcica. *Turk.J.Pediat.*, 4:132-137, 1962.
- 61.- DOGRAMACI,I.; WRAY,J.D.; ERGENE,T.; SEZER,V. y MÜFTÜ,Y.: Porphyria turcica, a survey of 592 cases of cutaneous porphyria seen in sontheastern Turkey. *Turk.J.Pediatr.*, 4:138-147, 1962.
- 62.- PETERS,H.A.; JOHNSON,S.A.M.; CAM,S.; ORAL,S.; MÜFTÜ,Y. y ERGENE,T.: Hexachlorobenzene induced porphyria effect of chelation of the disease, porphyria and metal metabolic. *Amer.J.Med.Sci.*, 251:314-322, 1966.
- 63.- MARVER,H.S. y SCHMID : The porphyrias. En: "The metabolic basis of inherited". 3rd., ed. New York. Mc Graw-Hill, 1972.
- 64.- DEAN,G.: The porphyrias: A story of inheritance and environment, 2 ed. ed., London: Pirman Medical Publishing, 1971.
- 65.- DOGRAMACI,I.; TINAZTEPE,B. y GUNALP,A.: Condition of the liver in patients with toxic cutaneous porphyria. *Turk. J. Pediat.*, 4:103-106, 1962.
- 66.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; PEÑA,M.L.; OLMOS,A.; JIMENEZ, F.J. y CATALAN,T.: Indice característico de la excreción urinaria de porfirinas en la PCT. *Biometrida*,4:73-79, 1979.

- 67.- WATSON,C.J.: The problem of porphyria some facts and questions. New. Engl.J.Med., 263:1205-1215, 1960.
- 68.- CHU,T.C. y CHU,E.J.H.: Porphyrin patterns in different types of porphyria. Clin. Chem., 13:371-387, 1967.
- 69.- CRIPPS,D.J.; GOCMEN,A. y PETERS,H.A. Ach. Dermatol.,116: 46-50, 1980.
- 70.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R.; ROMERO,F.; MARTIN,A.; MAS,V.; OLMOS,A. y PEÑA,M.L.: Índice característico del patrón excretorio fecal de la PCT. Biometrica, 4:73-79, 1979.
- 71.- MAS,V.: Porfiria experimental por hexaclorobenceno. Tesis doctoral. Fac. Med. Madrid, 1978.
- 72.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R.; MAS,V.; CATALAN,T.; MOLINA,C.; CHINARRO,S. y OLMOS,A.: Estudios sobre inducción a ratas de porfiria experimental por HCB. Rev.Esp.Ap.Diges. En prensa.
- 73.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R.; MAS,V.; CATALAN,T.; OLMOS,A.; PEÑA,M.L.; MOLINA,C.; CHINARRO,S. y MUÑOZ,J.J.: Alteraciones del metabolismo porfirínico en el curso de la porfiria inducidas ratas por hexaclorobenceno. Actas dermo-sifilográficas. En prensa.
- 74.- DAY,R.S.; BLEKKENHORST,G.H. y EALES,L.: Drug induced acute porphyrie episodes in rats. Int.J. Biochem. En prensa.
- 75.- GOERZ,G.; VIZETHUM,W.; BOLSEN,K.; KRIEG,TH. y LISSNER,R.: Hexachlorobenzol (HCB)-bedingte porphyrie der ratte einmB von HCB-metaboliten anf die haembiosynthese. Arch.Dermatol. Res., 263:189-196, 1978.

- 76.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; VIALE,A.A.; NACHT,S. y GRINSTEIN, M.: Experimental porphyria induced in rats by hexachlorobenzene. Clin Chim. Acta., 28:13-23 , 1970.
- 77.- SMTIH,A.G.; DE MATTEIS,F.: The inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase in the liver of females. Agus rats poisoned with hexachlorobenzene. Int.J. Biochem. En prensa.
- 78.- KOSZÓ,F.; SIHLÓSI,C.S. y SIMON,N.: Hexachlorobenzene porphyria and hexachlorobenzene catabolism in rats. Biochem. Biophys. Res. Comm., 80:781-788.,1978.
- 79.- KUIPER- GOODMAN,T.; GRAND,D.L.; MOODIE,C.A.; KORSOND,G.O. y MUNRO,I.C.: Subacute toxicity of hexachlorobenzene in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:529-549, 1977.
- 80.- HEIDENHAIN,M.; FESTSCH,F.; KOLLIKER Englemann, Leispiz, 1892.
- 81.- ELDER,G.H.: Porphyria caused by hexachlorobenzene and other polyhalogenated aromatic hydrocarbons. En: Handbook of Experimental Pharmacology. vol. 44: Heme and hemoproteins pp. 157-200. Ed. F. De Matteis y N. Aldridge, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- 82.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R.; FARINA,J.; PERPIÑA,C.; CATALAN, T.; MERCHAN,M.; ARNALICH,F.; ARAGONCILLO,P. y MAS,V.: Porfiria experimental por hexaclorobenceno: Estudio de las alteraciones hepáticas estructurales y ultraestructurales. Arch. Fac. Med. Madrid, 34:173-185, 1978.

- 83.- TALJAARD, J.J.F.; SHANLEY, B.C.; DEPPE, W.M. y JOUBERT, S.M.:
Porphyrin metabolism in experimental hepatic siderosis
in the rat. II. Combined effect of iron overload and HCB.
Brit. J. Haematol., 23:513-519, 1972.
- 84.- BACH, P.H.; TALJAARD, J.J.F.; JOUBERT, S.M. y SHANLEY, B.C.:
The effect of iron overload on the development of hexa-
chlorobenzene porphyria. S. Afr. Med. J., 17:75-76, 1971.
- 85.- SWEENEY, G.D.; JONES, K.G.; COLE, F.M.; BASFORD, D. y KOE-
TYNSKI, F.: Iron deficiency prevents liver toxicity of 2,
3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Science, 204:332-335,
1979.
- 86.- BLEKKENHORST, G.H.; DAY, R.S. y EALES, L.: The effect of
bleeding and iron administration on the development of
hexachlorobenzene induced rat porphyria. Int. J. Biochem.
En prensa.
- 87.- KOSS, G.; SEUBERT, S.; KORANSKY, W.; IPPEN, H. y STRAB, M.: On
the effects of the metabolites of hexachlorobenzene. Che-
mical porphyria in man. pag. 175-180. Ed. Strik y Loeman,
Elsevier, Amsterdam, 1979.
- 88.- DEBETS, F.M.H.; STRIK, J.J.T.W.A. y OLIL, K.: Effects of pen-
tachlorophenol on rat liver changes induced to porphyria
and alterations in mixed function oxigenases. Toxicology,
15:181-195.
- 89.- ELDER, G.H.; EVANS, J.O. y MATLIN, S.A.: The effect of the
porphyrinogenic compound hexachlorobenzene on the acti-
vity of hepatic uroporphyrinogenic decarboxylase in the
rat. Clin. Sci. Mol. Med., 51:71-80, 1976.

- 90.- CAMPBELL, J.A.H.: Pathological aspects of hexachlorobenzene feeding in rats. *S.Afr.J.Lab.Clin.Med.*, 9:203-206, 1963.
- 91.- ELDER, G.H.; NICHOLSON, D.C. y GRAY, C.H.: The porphyrias: a review. *J.Clin.Path.*, 25:1013-1033, 1972.
- 92.- SIMON, N.; DOBOZY, A. y BERKO, G.: Porphyrias-toffwechsel und klinisch-laboratorium-mäßige untersuchngen in modellversuchen und a patienten mit porphyria cutanea tarda. *Arch.Klin.exp.Derm.*, 238:38-43, 1970.
- 93.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; ARNALICH, F. y ROMERO, F.: Fisiopatología de la excreción de las porfirinas. *Rev.Clin.Esp.*, 155:7-11, 1979.
- 94.- DAY, R.S.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. y EALES, L.: Quantitation of red cell porphyrin by fluorescence scanning after thin layer chromatography. *Clin. Chim. Acta.*, 89:25-33, 1978.
- 95.- PEARSON, R.W. y MALKINSON, F.D.: Some observation on hexachlorobenzene induced experimental porphyria. *J. Invest. Dermatol.*, 44-20, 1965.
- 96.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. y ARNALICH, R.: Conceptos actuales sobre la patogenia de la PCT. *Rev.Clin.Esp.Tomo 152*, 6:447-455, 1979.
- 97.- SWEENEY, G.D.: Patterns of porphyrin excretion in South African porphyria patients. *S.Afr.J.Lab.Clin.Med.*, 9:182, 1963.
- 98.- KUSHNER, J.P.; BARBUTO, A.J. y LEE, G.R.: An inhevited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda. Decreased uroporphyrinogen-decarboxylase activity. *J. Clin. Invest.*, 58:1089, 1976.

- 99.- ELDER,G.H.: The porphyrins patterns of simptomatic porphyria. S. Afr.J.Lab.Med., 17:45, 1971.
- 100.- ELDER,G.H.: Identification of a group of tetracarboxylate porphyrins containing one acetate and three propionate.b. substituens in faeces from patients with simptomatic cutaneous hepatic porphyria and from rats with porphyria due to HCB. Bhiochem.J. 125:887, 1972.
- 101.- KUSHNER,J.P. y BARBUTO,A.J.: Decreased acticity of hepatic uroporphyrinogen-decarboxylase in porphyria cutanea tarda. Clin. Research. Abstrat.,22:178 a, 1974.
- 102.- LUNDWALL,O.: Effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. Its relation to the phlebotomy induced reduction of iron stores. Acta Med.Scadd.,189:33, 1971.
- 103.- PIMSTONE,N.R.; BLEKKENHORST,G. y EALES,L.: Enzymatic defects in hepatic porphyria. Enzimol.,16:354, 1973.
- 104.- RAJAMANICKAM,C.; AMRUTAVELLI,J.; RAD,M.R.S. y PADMANABAN,G.: Effect of hexachlorobenzene on haem synthesis. Biochem.J., 129:381, 1972.
- 105.- HOTCHKISS,R.D. Arch.Biochem.,16:131-141, 1948.
- 106.- SCHWARTZ,S.: Porphyrins and porphyrin precursors in human and human and experimental porphyria. Fed.Proc., 14:717, 1955.
- 107.- BURHAM,B.F.: The chemistry of the porphyrins seminars in hematology, 5:296-321, 1968.
- 108.- FALK,J.E.:Porphyrins and metalloporphyrins.Ed.Rev. Ed.Smith. K.M. Elsevier Scientific Publ.Co.Amsterdam,1975.

- 109.- WITH,T.K.: Sterification of porphyrins and hydrolysis of porphyrins esters. S.Afr.J.Lab.Clin.Med.,17:218-220,1971.
- 110.- RIMINGTON,C.: Quantitative determination of porphobilinogen and porphyrins in urine and faeces. Assoc.Clin. Pathologist.Broadsheet.,36 N.S.,set., 1961.
- 111.- EDMONSON,P.; STEPHENSON,B.; SARKAR,D. y FREYHOLTZ,H.: Direct spectrofluorephotometric determination of porphyrin in diluted urina. Ann.Clin.Res.8 Suppl.,17:156-161, 1976.
- 112.- HOLTI,C.; RIMINGTON,C.; TATE,B.C. y THOMAS,G.: An investigation of porphyria cutanea tarda. Quart.J.Med.N.S.,27: 1, 1958.
- 113.- SWEENEY,G.D.: The porphyrias in South African.A study of the excreted porphyrins. Ph.D.Thesis,Cape Town, 1963.
- 114.- WITH,T.K.: Clinical use of porphyrin ester chromatografic of urine faeces. Dan.Med.Bull. 22 (2):74-80,1975.
- 115.- IVANOV,E.; TEDOROV,D.; ADJAROV,D. y DIMITROV,P.: Porphyrin metabolism in renal diseases. III. Mechanism of renal excretion of porphyrius. Nephron 17:396-401, 1976.
- 116.- SEARS,W.G.; DARACHO,T. y EALES,L.: Thin layer chromatogra-
phy behaviour of the coproporphyrin isomers in relation to porphyrin P₁. Enzyme 1, 17:69-75, 1974.
- 117.- ELDER,G.H.: Separation of porphyrin methyl-esters by two dimensional thin layer chromatography. J. Chromato, 59: 234-236, 1971.

- 118.- ENRIQUEZ DE SALAMANCA,R.; DAY,R. y EALES,L.: The use in fluorescence of porphyrin methyl esters. Comunicación personal.
- 119.- WADA,O.; YANO,Y.; URATA,G. y NAKAO,K.: Behaviour of hepatic microsomal cytochromes after treatment of mice with drugs known to disturb porphyrin metabolism in liver . Biochem. Pharmacol., 17:595-603, 1968.
- 120.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; RIOS DE MOLINA,M.C.; WAINSTOK DE CALMANOVICI,R. y TOMIO,J.M.: Porphyrins and porphyrinogen carboxylase in hexachlorobenzene induced porphyria Biochem.J. 168:393-400, 1977.
- 121.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; RIOS DE MOLINA,M.C.; WAINSTOK DE CALMANOVIC,R. y TOMIO,J.M.: Experimental porphyria produced in rats by hexachlorobenzene IV. Studies on the stepwise decarboxylation of uroporphyrinogen and phynaporphyrinogen "in vivo" and "in vitro" in several tissues. En: Porphyrins in Human Diseases. Doss, M. (ed.), pag. 445-552, Basel-Karger, 1976.
- 122.- SAN MARTIN DE VIALE,L.C.; TOMIO,J.M.; FERRAMOLA,A.M.; SANCOVICH,H.A. y TIGIER,H.A. Nat. Meeting Arg.Soc.Biochem. Invest. Abstr. 8, 1972.
- 123.- ELDER,G.H.; EVANS,J.O. y MATLIN,S.: The porphyrogenic action of polychlorinated hydrocarbons. En: Porphyrins in human diseases. Doss,M. (ed.) pag. 424-431, Basel-Karger, 1976.
- 124.- ELDER,G.H.:The metabolism of porphyrins of the isocopro-porphyrin series. Enzyme, 17:61-68, 1974.

- 125.- VIZETHUM,W.; Mechanism of HCB porphyria. Abstract of the theme-colloquium Toxicologie on mechanism of chemical Porphyria. Wageningen, Holanda, Mayo, 1980.
- 126.- DEBESTS,F.M.H. y STRIK,J.J.T.W.A.: An approach to elucidate the mechanism of hexachlorobenzene induced hepatic porphyria, as a model for the hepatotoxicity of polyhalogenated aromatic compounds . En: Chemical Porphyria in man, pag. 181-208, ed. Strik y Koeman, Elsevier, Amsterdam,1979.
- 127.- KERKLAAN,P.R.M.; STRIK,J.J.T.W.A. y KOEMAN,J.H.: Toxicity of hexachlorobenzene with special reference to hepatic glutathione levels, liver necrosis, hepatic porphyria and metabolitos of hexachlorobenzene in female rats fed hexachlorobenzene and treated with phenobarbital and diethylmaleate. En: Chemical Porphyria in man, pág. 151-160, Ed. Strik y Koeman, Elsevier, Amsterdam, 1979.
- 128.- PUZYNSKA,L.; DEBETS,F.M.H. y STRIK,J.J.T.W.A.: Toxicity of hexachlorobenzene with special reference to hepatic P-450 levels, P-450 binding affinities and D-glucuronic acid, mercapturic acid and porphyrin levels in urine female rats fed HCB and treated by phenobarbital and diethylmaleate. En: Chemical Porphyria in man, pag. 161-173, 1979.
- 129.- SIMON,N.; SIKLOSI,C.S. y KOSZO,F.: Influence of environmental factors of porphyrin metabolism. En: Diagnosis and Therapy of Porphyrias and lead intoxication, pag.145-150, 1978.

- 130.- LLANES, F.: Demostración histológica de la fluoresceína sódica. Arch.Soc.Esp. Oftalmol. Tomo 39, n°2 pag.97-101, 1979.
- 131.- TOPI, G.C. y D'ALESSANDRO GANDOLFO, L.: Clinical, observation, diagnostic and therapy for symptomatic and hereditary P.C.T. En: Diagnosis and therapy of porphyrias and lead intoxication. Ed. M. Doss, Springer-Verlag. Berlin, pág. 107-110, 1978.
- 132.- ZAWIRSKA, B.: Neoplasm and metabolic disturbances of porphyrius in rats with chromic experimental lead poisoning. En: Diagnosis and therapy of porphyrias and lead intoxication. Ed. M. Doss, Springer-Verlag. Berlin, pag. 168-171, 1978'
- ¹
~~X~~ 133.- CZITOBBER, H.; DENK, H. y SCHNACK, H.: Nachweis und lokalisation von porphyrinen im nierenbiopsiegewebe bei chronischer porphyrie, mittels fluorescenzmikroskopie. Klin. Wschr., 48:59-60, 1970.
- 134.- SMITH, A.G.; FRANCIS, J.E. y DE MATTEIS, F.: Lobes of rat liver respond at different rates to challenge by dietary hexachlorobenzene. Biochemical Pharmacology, vol. 29, pag. 3133-3137, 1980.
- 135.- BIEMPICA, L.; KOSOWER, N.; MARCUS, H. y GOLDFISCHER, S.: Hepatic porphyrias cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda. Arch. Pathol., 98:336, 1974.

- 136.- MEDLINE,A.; MENON,A.I. y HABERMAN,H.F.: Hexachlorobenzene and rat liver. Arch. Pathol., 96:61, 1973.
- 137.- CONRAD,M.E.; BERMAN,A. y CROSBY,W.H.: Iron kinetics in Laennec's cirrhosis. Gastroenterol., 43:385, 1962.
- 138.- CHARLTON,R.W.; JACOBS,P.; SEFTEL,H. y BOTHWELL,T.H.: Effect of alcohol on iron absorption. Brit. Med. J., 2:1427, 1964.
- 139.- DAVIS,A.E. y BADENOCH,J.: Iron metabolism in alcoholic cirrhosis. Lancet, 2:6, 1962.
- 140.-SCHULLER,A. y JELAVIC,D.: Porfiria hepatocutánea tardía. Edit. Toray, Barcelona, 1969.
- 141.- SCHULLER,A.: Naturaleza y dinámica lesional de la hepatopatía porfírica. " XVII Reunión de la Asociación Enriquez de Salamanca". " Cirrosis hepáticas". Edit. Abelló S.A. Madrid, pág. 111-118, 1974.
- 142.- BOGER,A.; KOSS,G.; KOSANSKY,W.; NAUMANN,R. y FRENZEL,H.: Rat liver alterations after chronic treatment with hexachlorobenzene. Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol., 382:127-137, 1979.
- 143.- MOLLENHAVER,H.; JOHNSON,J.; YOUNGER,R. y CLARK,D.: A unique intracellular aberration to hexachlorobenzene ingestion. Am.J.Vet.Res. vol. 37, n° 7, pág. 847-850, 1976.
- 144.- GOLDSTEIN,J.; FRIESEN,M.; SCOTTI,T.; HICKMAN,P.; HASS,J. y BERGMAN,H.: Assessment of the contribution of chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to hexachlorobenzene. Induced toxicity, Porphyria, Changes in mixed function oxygenases and histopathological changes. Toxi-

- cology and applied pharmacology. pag. 46:633-649, 1978.
- 145.- CABRAL, J.R.P.; SHUBIK, P.; MOLLNER, T. y RAITANO, F.: Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in hamsters. *Nature*, 269:510-511, 1977.
- 146.- CABRAL, J.R.P.; MOLLNER, T.; RAITANO, F. y SHUBIK, P.: Carcinogenesis of hexachlorobenzene in mice. *Int.J. Cancer*, 23:47-51, 1979.
- 147.- SMITH, A.G.; CABRAL, J.R.P. y DE MATTEIS, F.: A difference between two strains of rats in their liver non-haem iron content and their response to the porphyrinogenic effect of hexachlorobenzene. *Chem. Biol. Interactions*, 27:353-363, 1979.
- 148.- SMITH, M.T.; LOVERIDGE, N.; WILLS, E.D. y CHAYEN, J.: The distribution of glutathione in the rat liver lobule. *Biochem.J.*, 182:103-108, 1979.
- 149.- TURNBULL, A.; BAKER, H.; VERON-ROBERTS, B. y MAGNUS, I.A.: Iron metabolism in porphyria cutanea tarda and in erythropoietic protoporphyria. *Quart.J.Med.*, 42:341, 1973.
- 150.- MOLLENHAVER, H.H.; JOHNSON, J.; YOUNGER, R. y CLARK, D.: Ultrastructural changes in liver of the rat fed hexachlorobenzene. *Am.J. Vet. Res.*, vol.36, n° 12, pág. 1777-1781, 1975.
- 151.- SIMON, N.; SIKLOSI, CS. y KOSZO, F.: The role of damages in cellular membrane structures in the development of porphyria cutanea tarda. En: *Porphyrins in Human Diseases*. Ed. M.Doss, S.Karger, Basel, pag.432, 1976.

- 152.- WALDO, E.D. y TOBIAS, H.: Needle-like cytoplasmic inclusions in the liver of porphyria cutanea tarda. Arch. Pathol., 96:368-317, 1973.

