

03.63.03

C. N. E. A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
NO 2	ANO 1963

Un nuevo compuesto radioactivo para el ensayo de la función hepática: Bilirrubina marcada con radioiodo

POR EL DOCTOR

LEOPOLDO JOSE ANGHILERI

Para el ensayo de la función hepática por medio de radioisótopos se han descrito varios métodos. De todos ellos el más utilizado en la práctica corriente es el que emplea el rosa de bengala marcado con radioiodo (1,2). Este método es una versión actualizada del método clásico (3) que utilizaba el rosa de bengala no radioactivo.

El rosa de bengala (sal sódica de la tetraiodo-tetraclorofluoresceína) es absorbido por las células poligonales del hígado y eliminado a través del tracto biliar. La capacidad del hígado para absorber este compuesto radiocativo de la sangre puede determinarse efectuando la medición de la radioactividad en el área externa del hígado por medio de un contador de centelleo. En estas condiciones es posible registrar la eliminación del colorante del flujo sanguíneo y su subsecuente excreción por los conductos biliares.

En pacientes con cirrosis de Laennec, hepatitis crónica recurrente y hepatitis aguda, la absorción del rosa de bengala es más lenta y alcanza valores menores que en los sujetos normales. En el caso de la ictericia obstructiva y en otros tipos de insuficiencia hepática, la excreción vía conducto biliar es más lenta.

Recientemente se ha empezado a utilizar la bilirrubina marcada con radioiodo (I-131) en el ensayo de la función hepática. Este método es una forma más práctica y precisa del conocido ensayo de tolerancia para la bilirrubina no radioactiva. Su principal ventaja es la de no utilizar una sustancia extraña al organismo y consecuentemente el hígado es examinado en condiciones fisiológicas normales.

La bilirrubina, normalmente se encuentra libre o unida a la proteína sanguínea. El complejo albúmina-proteína no es eliminado por la orina siendo transportado hacia el hígado. Martin (4) ha demostrado que este complejo es estable en las condiciones del pH fisiológico.

Greenfield (5) ha ensayado clínicamente la bilirrubina marcada con radioiodo (I-131). Los pacientes fueron preparados en condiciones de ayuno y suministrándoles previamente 3 gotas de Lugol. El complejo I-131-bilirrubina-albúmina se inyectó intravenosamente (10 μ c). La radioactividad en la sangre se determinó en diversos períodos: cinco minutos, veinte minutos, una hora y tres horas. Igualmente se determinó en la orina de 24 horas. Los pacientes con ictericia eliminaron de 20 a 40 %, mientras que los sujetos normales de 50 a 70 %.

La preparación de este compuesto radioactivo, realizada por primera vez en nuestros laboratorios, brinda un sinnúmero de posibilidades en el estudio de los problemas biológicos relacionados a la función hepática y a los pigmentos biliares.

MATERIALES Y MÉTODOS

1º) *Preparación de la bilirrubina marcada con radioiodo.*

Materiales:

Bilirrubina: La bilirrubina obtenida en el comercio debe ser purificada extrayéndola con etanol (dos veces) y con éter (dos veces) que separan las impurezas, y una extracción final de la bilirrubina con cloroformo.

Iodo-131: A una solución que contiene 1,178 mg de INa se le agregan 10 mc de INa (I-131) libre de portador. El volumen total no debe ser mayor que 10 ml. Se le agregan 2 gotas de nitrito de sodio al 10 % y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado. Luego se extrae el iodo elemental formado con tres porciones de 3 ml de cloroformo. El cloroformo usado debe ser previamente destilado sobre óxido de plata para eliminar todo posible agente reductor. En estas condiciones el extracto clorofórmico final contiene 1 mg de iodo elemental con la radioactividad incorporada.

Resina de intercambio Dower 1-X8 (200 mesh): Se utiliza en la forma acetato, lavando la forma cloruro con acetato de sodio 3 M y ulterior lavado con agua destilada hasta ausencia de iones cloruro (ensayo con nitrato de plata).

Método:

Se disuelven 100 mg de bilirrubina en 10 ml de cloroformo en un matraz de 50 ml. Se agrega la solución clorofórmica del iodo. Se tapa y se agita. En estas condiciones la relación molar de bilirrubina a iodo es aproximadamente 20/1. Cantidades excesivas de iodo provocan la formación de otros productos, especialmente biliverdina por oxidación de la bilirrubina.

La mezcla se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente al cabo del cual, el cloroformo se evapora calentando suavemente en un baño de agua a no más de 45°C y dirigiendo una corriente de nitrógeno seco sobre la superficie. El recipiente donde se realiza la evaporación debe arreglarse de tal manera que el iodo sin reaccionar y que es arrastrado por el nitrógeno, pueda ser retenido por una solución de hidróxido de sodio.

Luego de evaporar, el residuo se disuelve con hidróxido de sodio 0,5 N y la solución se pasa por una columna de 10 cm x 0,75 m² de resina Dowex 1-X8 en la forma acetato. La columna se eluye con 50-100 ml de agua destilada. Los pigmentos biliares pasan con el agua y el iodo inorgánico (ioduro) queda retenido en la columna. Es de suma importancia no usar un exceso de hidróxido de sodio y reducir a un mínimo el tiempo entre la disolución y el pasaje por la columna, porque la bilirrubina es muy inestable en soluciones alcalinas.

La solución acuosa de los pigmentos biliares, luego de acidificarla con 1 ml de ácido clorhídrico 1 N, se extrae con tres porciones de cloroformo. En estas condiciones la biliverdina (formada por oxidación de la bilirrubina) precipita al agregarse el ácido, y se encuentra en la interfase de las soluciones como un precipitado verde. Cuidadosamente se retira la capa clorofórmica que contiene a la bilirrubina. La biliverdina se puede extraer de la fase acuosa (en la que puede estar parcialmente disuelta) con n-butanol.

La solución clorofórmica es evaporada y purificada por extracciones (tres) con éter, el cual disuelve la biliverdina que pudo incorporarse a la solución de bilirrubina. Igualmente si se desea purificar la fracción biliverdina (que está igualmente marcada con radioiodo), se evapora el n-butanol, se disuelve en éter y se extrae del éter con ácido clorhídrico al 1 %.

Evaporando los solventes, se obtiene la bilirrubina como placas marrón-rojizas y la biliverdina como placas verde oscuras. Al evaporar la solución de bilirrubina es de suma importancia hacerlo en atmósfera de nitrógeno o de gas carbónico.

Los rendimientos, basados en la radioactividad incorporada, oscilan entre 8-14 % para la bilirrubina marcada con radioiodo y 10-20 % para la biliverdina también marcada.

La presencia de iodo inorgánico (ioduro) puede determinarse por cromatografía sobre papel en sentido ascendente. Usando papel cromatográfico S & S N° 2043b y como solvente: Metanol-acetato de amonio 0,3 M (1:2,5) con el pH ajustado a 6,1 y a 20°C, los R_f obtenidos son: Bilirrubina y biliverdina 0,00 y ioduro 0,68.

El espectro de absorción de la solución clorofórmica de bilirrubina marcada con radioiodo presenta un máximo a 450 m μ y E para 1 mg % y 1 cm es 800.

Ensayada químicamente la bilirrubina marcada con radioiodo da la reacción de Van den Bergh (⁶).

2º) Preparación del complejo I-131-bilirrubina-albúmina.

Materiales:

Sero-albúmina humana normal: Este material se prepara usando sero-albúmina de E. R. Squibb & Sons (Salt poor). 25 mg de esta sero-albúmina se transfirieron a 100 ml de solución buffer y se estabiliza con acetiltriptofanato de sodio 0,02 M y caprilato de sodio 0,02 M.

I-131-bilirrubina: Preparada de acuerdo a la técnica anterior.

Solución reguladora (buffer) de fosfato pH 7,6 conteniendo ascorbato de sodio: Su composición es la siguiente: 42,8 ml de hidróxido de sodio 0,1 N, 50,0 ml de fosfato monopotásico 0,1 M, 10 g de ascorbato de sodio y 100,0 ml de agua c.s.p.

Método:

Se usa una adaptación del método descripto por Martin (⁴).

Se disuelven 20 mg de bilirrubina marcada con radioiodo en 2 ml de hidróxido de sodio 0,01 N a 0°C y se le agregan 4 ml de la solución reguladora de fosfato. La relación final entre ascorbato y bilirrubina debe ser 20:1. A esta solución se le agregan lentamente y con agitación, manteniendo la temperatura a 4°C, 4 ml de sero-albúmina normal. Luego de 30 minutos, la solución se dializa contra 250 ml de solución reguladora de fosfato. Esta solución se cambia cada cuatro horas. No debe mostrar radioactividad luego de cuatro o cinco cambios, al ensayarla con el contador de centelleo.

Durante todo el proceso de preparación, diálisis y ensayo, el material debe conservarse a temperaturas entre 0° y 4°C y fuera de la luz directa.

Terminada la diálisis el complejo iodobilirrubina-albúmina se liofiliza y se conserva en el refrigerador.

El complejo ensayado electroforéticamente en solución reguladora (buffer) de fosfato 0,02 M (pH 6,8) con papel S & S N° 2043b, 1 mA/1 cm, gradiente de voltaje 12,5 V/cm, al cabo de dos horas muestra la radioactividad distribuida en las bandas de los componentes de la sero-albúmina y no en el origen; como ocurre en el caso de la bilirrubina sin conjugar.

CONCLUSIONES

Los productos finales resultantes de la iodinación de la bilirrubina son una mezcla de sus derivados. De esta mezcla es posible separar y purificar la bilirrubina y la biliverdina marcadas ambas con radioiodo.

La bilirrubina preparada de esta manera, actúa como la bilirrubina inactiva en lo que respecta a sus características físicas, químicas y fisiológicas.

Este método provee una manera fácil y económica de preparar pigmentos biliares marcados con radioiodo que pueden ser usados en el estudio del metabolismo de la bilirrubina y en ensayos de la función hepática.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Taplin, G. V., Meredith, O. M. y Kade, H.: The radioactive (I^{131} -tagged) rose bengal uptake-excretion test for liver function using external gamma-ray scintillation counting techniques. *J. Lab. and Clin. Med.*, 45: 665 (1955).
2. Brown, C. H. y Glasser, O.: Radioactive (I^{131} -tagged) rose bengal liver function test. *J. Lab. and Clin. Med.*, 48: 454 (1956).
3. Stowe, W. P., Delprat G. D. y Weeks, A.: The rose bengal test of liver function *Am. J. Clin. Path.*, 3: 55 (1933).
4. Martin, N. H.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXI. Interactions with bilirubin. *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 1230 (1949).
5. Greenfield, G. B.: I^{131} -tagged bilirubin tolerance test: Preliminary report, *Radiology*, pág. 318 August (1962).
6. Greenberg D. M.: *Metabolic Pathways Vol. II*, pág. 591.

Research and Development Department
Volk Radiochemical Company
Skokie, Illinois, USA

Trabajo publicado en la Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, Nº 147-148, Mayo-Agosto de 1963.