

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

Facultad de Química

**METODO COMPARATIVO DEL VERDE DE INDOCIANINA EN
RELACION CON EL DE LA BROMOSULFALEINA COMO
PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPATICO.**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a:

ESMERALDA ILEANA RAVEN WHITFORD

México, D. F.

1968



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO QUE REVISÓ Y APROBO LA PRESENTE TESIS:

PRESIDENTE Prof.: FERNANDO VELEZ OROZCO

VOCAL Prof.: AURELIA RIVAS G.H.

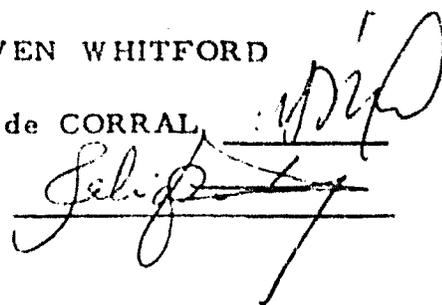
SECRETARIO Prof.: ARACELI SANCHEZ de CORRAL

SITIO DONDE DESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL
DE LA NUTRICION

SUSTENTANTE: ESMERALDA ILEANA RAVEN WHITFORD

ASESOR DEL TEMA: ARACELI SANCHEZ de CORRAL

SUPERVISOR TECNICO: CELIA G. MUÑIZ



Araceli Sanchez de Corral
Celia G. Muñoz

A MIS PADRES:

RAFAEL RAVEN TIFFER

ofreciéndole la culminación de mi carrera, como un pequeño pago a sus desvelos y como un triunfo a sus esfuerzos.

MARGOTH WHITFORD de RAVEN

ejemplo y guía de mi vida, amiga en todo momento, siempre dispuesta a impulsar mis estudios y darme ánimos en mis momentos de desaliento.

A ellos, con amor y agradecimiento, dedico este trabajo fruto de siete largos años de ausencia y separación.

A MIS HERMANOS con cariño.

A MI FAMILIA

A NICARAGUA

Quiero expresar mi agradecimiento al Instituto Nacional de la Nutrición, en cuyo laboratorio de Gastroenterología se realizó este trabajo, así como a los Dres. José de Jesús Villalobos y Jorge Ocaranza M.; a la Sra. Q. F. B. Araceli Sánchez de Corral y a la Srta. Q. F. B. Celia G. Mufiz por la ayuda desinteresada que me brindaron; a todos mis maestros que tan pacientemente me dieron sus conocimientos, especialmente a la Srta. Q. F. B. Aurelia Rivas G. H. de quien guardo, además de sus enseñanzas y consejos, el recuerdo de una amistad perdurable; al Dr. Marcelo Izaguirre con cariño y respeto por el apoyo moral que me proporcionó a lo largo de mis estudios, y a todas aquellas personas que con su amistad hicieron que mi estancia en México fuera algo que a través del tiempo, recordaré con cariño.

C A P I T U L O S .

- I. - INTRODUCCION.
- II. - GENERALIDADES.
- III. - MATERIAL Y METODO.
- IV. - RESULTADOS OBTENIDOS.
- V. - COMENTARIO.
- VI. - RESUMEN Y CONCLUSIONES.

INTRODUCCION .

Con alguna frecuencia suelen aparecer en la literatura médica, publicaciones que aumentan el número de los exámenes de laboratorio ya existentes. La tendencia es ir encontrando aquellas pruebas que reúnan la máxima precisión y exactitud y comparar resultados con las ya ensayadas.

El presente trabajo tiene como objeto llevar a cabo una prueba basada en la función excretora del hígado, con una nueva sustancia colorante llamada Verde de Indocianina, la cual además de presentar la propiedad de ser eliminada única y exclusivamente por la célula hepática, carece de toxicidad y no produce reacciones alérgicas secundarias y posteriormente, comparar los resultados obtenidos con los de la Bromosulfaleína que es actualmente el colorante usado para esta prueba en laboratorio de Gastroenterología de rutina.

Se conocen como pruebas de funcionamiento hepático, aquellas que determinan el estado fisiológico del hígado, indicando en caso de daño, el mayor o menor grado de éste.

El hígado es la glándula más voluminosa del organismo. Los disturbios metabólicos que se presentan en las enfermedades hepá-

ticas, son característicos y pueden servir como diagnóstico auxiliar. La importancia de las pruebas de funcionamiento hepático, reside en dos razones fundamentales: primera, en el gran número de funciones metabólicas desempeñadas por el hígado y segunda, en la frecuencia con que se presentan las hepatopatías.

Esta Tesis fue realizada en el laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de la Nutrición, bajo la supervisión clínica de los Sres. Dres. Jesús Villalobos Pérez y Jorge Ocaranza Melero y de la Srta. Q.F.B. Celia G. Muñiz, Jefe de dicho laboratorio; y con la acertada dirección de la Sra. Q.F.B. Araceli Sánchez de Corral.

El aporte de enfermos se obtuvo en dicha Institución, y a los pacientes se les practicaron las pruebas de funcionamiento hepático clásicas y se les añadió la que nos ocupará en este estudio.

GENERALIDADES.

Las funciones hepáticas pueden ser clasificadas en 5 grupos:

A. - Funciones Circulatorias.

B. - Funciones Excretoras y Secretoras.

C. - Funciones Metabólicas.

D. - Funciones de Protección y Desintoxicación.

E. - Funciones Hematológicas.

y en ellas se basan las Pruebas de Funcionamiento Hepático (23).

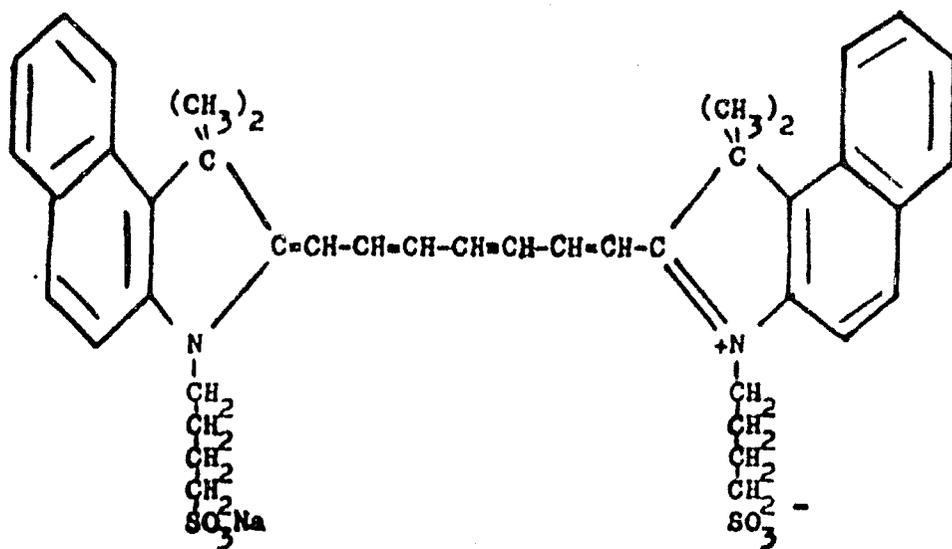
PRUEBAS DE EXCRECION DE COLORANTES.

La excreción en la bilis de sustancias endógenas y exógenas, es una función importante del hígado. Las sustancias endógenas como la Bilirrubina pueden ser inyectadas y utilizarse como una medida de la función excretora. La prueba de tolerancia a la Bilirrubina ha sido empleada, pero se usa menos que las pruebas con Bromosulfaleína, Rosa de Bengala, Verde de Indocianina y medios opacos utilizados en la visualización de los canales biliares y vesícula biliar (22), por las complicaciones inherentes que presenta, y que además afectan los resultados.

VERDE DE INDOCIANINA.

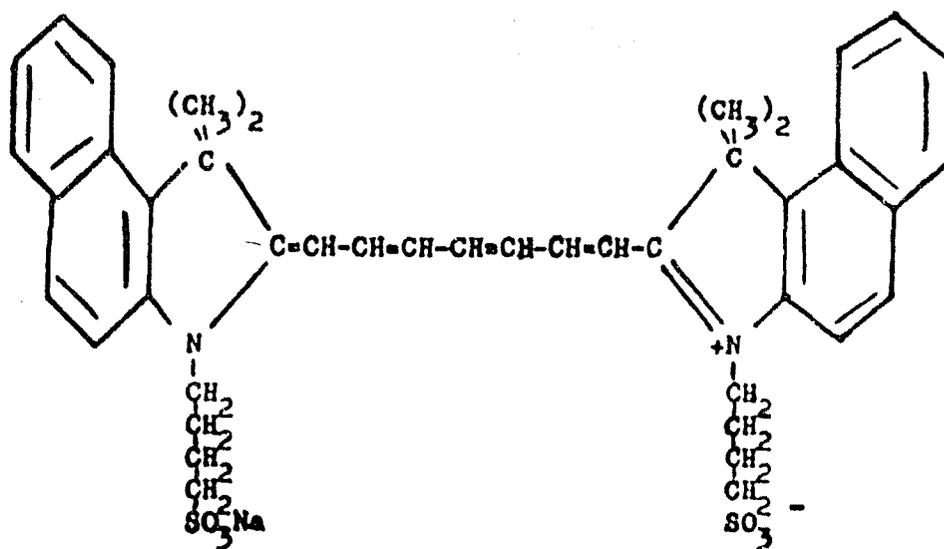
Es un colorante de color verde intenso, con peso molecular de 775 y cuya fórmula empírica es $C_{43}H_{47}N_2O_6S_2Na$; muy soluble en agua, pero inestable en solución acuosa, carece de toxicidad y su preparado comercial contiene 5% de yoduro de sodio como contaminante, factor éste que puede ser notado si subsecuentemente son realizados estudios de la función tiroidea. El uso del colorante después de preparada la solución no debe retardarse debido al peligro de deterioro y contaminación bacterial. En estado de polvo puede ser mantenido indefinidamente sin peligro de descomposición (22). Su absorción máxima de luz es de 780 mU en soluciones no proteicas y de 805 a 810 mU en el plasma.

FORMULA DESARROLLADA.



Es un colorante de color verde intenso, con peso molecular de 775 y cuya fórmula empírica es $C_{43}H_{47}N_2O_6S_2Na$; muy soluble en agua, pero inestable en solución acuosa, carece de toxicidad y su preparado comercial contiene 5% de yoduro de sodio como contaminante, factor éste que puede ser notado si subsecuentemente son realizados estudios de la función tiroidea. El uso del colorante después de preparada la solución no debe retardarse debido al peligro de deterioro y contaminación bacterial. En estado de polvo puede ser mantenido indefinidamente sin peligro de descomposición (22). Su absorción máxima de luz es de 780 mU en soluciones no proteicas y de 805 a 810 mU en el plasma.

FORMULA DESARROLLADA.



Sal sódica anhidra del 3, 3, 3', 3' - tetra-metil - 1, 1, 1' -
di - (4-sulfobutil) - 4, 5, 4', 5' - díbenzo - indotricarbocianina.

A. - ESPECIFICACIONES QUIMICAS.

1. - Materia Volátil. - La pérdida por secado al vacío a 110°
por 15 horas, no debe ser mayor de 6%.
2. - Contenido de Yodo. - Al ser determinado en una muestra
previamente secada al vacío en las condiciones menciona-
das anteriormente, no debe presentar un contenido de yo-
do mayor de 8%.
3. - Producto comercial para la Clínica. - Presenta la misma
indicación para contenido de yodo explicada anteriormente.
Cada frasco de 25 mg. deberá contener de 22.5 a 27.5
mg. de polvo seco, y los frascos de 50 mg., deberán
contener de 45 a 55 mg. de polvo seco. La pérdida por
secado del polvo en el frasco, no debe ser mayor de 15%
(3).

B. - ESPECIFICACIONES BIOLÓGICAS.

El producto debe ser estéril, libre de pirógenos y atóxico a las dosis recomendadas. Los procedimientos para las pruebas de esterilidad, pirógenos y seguridad deberán seguir los requisitos de los métodos sugeridos en la Farmacopea de los Estados Unidos.

(U.S. P.)

ANTECEDENTES HISTORICOS.

El Verde de Indocianina (tricarboianina) fue empleado por Fox y col. (6, 7, 19) en 1957 para medir el flujo sanguíneo y detectar malformaciones cardíacas. Durante sus estudios, observaron que se eliminaba casi totalmente por la bilis, particularidad que fue certificada posteriormente por varios autores (1, 2, 4, 5, 11, 14); y que en los primeros 10 minutos, se elimina aproximadamente el 50% del colorante.

En 1958, Wheeler y col. (17), por estudios efectuados en perros encontraron que el Verde de Indocianina, en los primeros 30 minutos después de su administración, presenta una concentración exponencial con respecto al tiempo a diferencia de la Bromosulfaleína cuya desaparición no ocurre en forma exponencial. Los resultados obtenidos sugieren que la distribución inicial del colorante está limitada exclusivamente al compartimiento vascular, por lo que estos autores pensaron que después de la inyección intravenosa del colorante, éste se une rápida y totalmente a las proteínas del plasma.

Esto fue corroborado en 1960 por Cherrick y col. (5), los

cuales usando como medio de comprobación albúmina marcada con I₁₃₁ encontraron bastante similitud en los espectros de absorción del colorante en el plasma y en una solución con albúmina, lo cual indica que el Verde de Indocianina se une en un porcentaje mayor (95%) a la albúmina, y en menor proporción a las demás proteínas plasmáticas. Esto impide al colorante emigrar del compartimiento intravascular, en donde se distribuye en forma uniforme, de ahí es captado rápidamente por las células hepáticas para ser excretado posteriormente a través de la vía biliar. Esta excreción se lleva a cabo en forma no conjugada, encontrándose la máxima concentración biliar a los 120 minutos, apareciendo en la biliar a los 8 minutos después de su inyección intravenosa, para desaparecer después de un lapso de 6 horas.

En el estudio efectuado por Wheeler (17), el colorante no se encontró en la orina, y no presenta reabsorción en la luz intestinal, lo que demuestra que no existe circulación entero-hepática del colorante excretado. Esto fue confirmado por otros autores (2, 5, 9, 11), demostrándose además que se elimina completamente a través de heces.

En 1959 Leevy y col. (10), experimentaron con el Verde de In

docianina para valorar la función excretora del hígado en sujetos humanos, se encontró que para los sujetos normales el porcentaje de desaparición plasmática era del 20% por minuto; en cambio, en pacientes con cirrosis hepática este porcentaje fue siempre menor.

En este mismo año, Rappaport y col. (13), demuestran que el Verde de Indocianina no se encuentra ni en orina, ni en líquido cefalorraquídeo y que las concentraciones en sangre arterial o venosa de las extremidades, riñones o pulmones son semejantes, lo que demuestra que no es captado por los tejidos periféricos y que no tiene eliminación extra-hepática. También encontraron un porcentaje de eliminación de 18.1% por minuto en perros anestesiados.

En el año de 1960 Wiegard y col. (18), observaron una pérdida exponencial del colorante en la circulación en los primeros 20 minutos posteriores a su administración; este estudio semejante al efectuado por Wheeler (17) en perros, fue llevado a cabo en seres humanos.

También en 1960 Reemtsma (14, 20), realizó investigaciones acerca del flujo de sangre hepático y de la función hepática, usando Verde de Indocianina en sujetos normales y pacientes con cirro-

sis hepática, encontrando una gran diferencia respecto al flujo sanguíneo hepático de pacientes con cirrosis el cual, es mucho más lento que el de sujetos normales; así mismo, la proporción de desaparición plasmática del Verde de Indocianina es más baja en pacientes cirróticos, que en sujetos normales en los cuales es relativamente constante.

Cherrick y col. (5), ya mencionados anteriormente, informan (y con ellos están de acuerdo todos los autores), que los resultados no difieren utilizando dosis de 0.1 mg., 0.5 mg., 1 mg. y 2 mg. de Verde de Indocianina por kilogramo de peso corporal, y que no existe evidencia alguna ni en normales ni en pacientes con insuficiencia hepática, de reacciones tóxicas o alérgicas; es más, cuando el colorante se ha extravasado accidentalmente en el sitio de la aplicación, no se presenta ningún fenómeno tisular de tipo irritativo. Esto fue confirmado por nosotros, ya que en nuestra experiencia no encontramos fenómenos apreciables de toxicidad.

En Diciembre de 1960, Hunton y col. (8, 9), demostraron que el comportamiento del Verde de Indocianina en la linfa hepática, difiere del de la Bilirrubina y de la Bromosulfaleína en la obstrucción biliar, ya que la concentración del Verde de Indocianina en la

linfa hepática en casos de obstrucción biliar, nunca excede la concentración de la del plasma y es similar a la del colorante en la linfa intestinal. Por lo que, la concentración linfática del colorante parece depender de la concentración plasmática, sin reabsorción o regurgitación de bilis, estos hechos han permitido utilizar al Verde de Indocianina en enfermos ictericos, ya que existe una aparente relación inversa entre la proporción de desaparición del plasma y la Bilirrubina directa, lo que supone que en la obstrucción biliar no existe reabsorción del colorante. Esta propiedad se fortalece si tomamos en cuenta que las determinaciones del Verde de Indocianina se efectúan a los 10 minutos de su aplicación, lapso en el cual según los informes de Wheeler, Cherrick y el mismo Hunton entre otros, la reabsorción por otras vías es mínima. También encontraron en experiencias en 155 pacientes, que la proporción de desaparición plasmática del colorante era de 18% por minuto como mínimo normal. En personas que presentaban lesión hepática, el porcentaje fue siempre menor a esta cifra. (18×10^{-2} o sea 0.18 ml. de desaparición plasmática por minuto como mínimo, al multiplicar por 100 para darlo en porcentaje, resulta la cifra mencionada anteriormente de 18% por minuto).

A. R. Cooke y col. (4) en el año de 1963, realizaron un estu

dio del Verde de Indocianina en sujetos normales y pacientes con diferentes clases de padecimientos hepáticos, administrando como dosis 0.1 mg. por kilogramo de peso corporal, y estableciendo el método a seguir para esta clase de determinaciones; obteniendo mayor por ciento de retención del colorante en todos los casos patológicos que el encontrado en los sujetos normales. Además, se observó que el colorante es rápidamente removido de la circulación; un 50% desaparece dentro de los primeros 5 minutos y después de 10 minutos, la cantidad remanente es insignificante.

Tomando en cuenta las particularidades antes enunciadas, varios autores han realizado distintos estudios con la finalidad de valorar al Verde de Indocianina como prueba de funcionamiento hepático o para medir el flujo sanguíneo hepático. Algunos (11, 16), han usado el método de Cooke y col. con ligeras modificaciones, obteniendo en todos los trabajos conclusiones satisfactorias; muchos afirman que es una prueba más sensible que la Bromosulfaleína (15), y que da un menor número de falsas positivas en los pacientes ictericos, lo que ha permitido inferir sea considerada como una prueba útil para el diagnóstico diferencial de las ictericias.

De lo expuesto anteriormente se deduce que el Verde de Indo-

clanina se estudió desde dos puntos de vista diferentes: algunos au
tores como Reemtsma, Wheeler, Leevy y Hunton, determinan el
porcentaje de desaparición plasmática del colorante; en cambio Che
rrick y Cooke lo determinan en relación con la retención del colo
rante en el plasma.

El presente trabajo pertenece a este segundo grupo ya que pa
rece ser que se obtienen resultados más exactos, además de ex
presarse éstos en la misma forma que los obtenidos con la Bromou
sulfaleína, prueba con la cual se está comparando el Verde de In-
docianina.

PRUEBA DE LA BROMOSULFALEINA.

La excreción de Bromosulfaleína es una función de las células
parenquimatosas en condiciones normales. Cambios en la excre-
ción pueden ser manifestaciones de alteración en la captación o en
el almacenamiento del colorante, o pueden indicar interferencia con
la salida de biliar. En pacientes con obstrucción del conducto bi-
liar común, se retiene principalmente el colorante conjugado.

Siguiendo la administración intravenosa de Bromosulfaleína, el

colorante se une a las proteínas del plasma. Alrededor del 80% es captado de la sangre por el hígado, mientras que el resto es tomado por fuentes extra-hepáticas. Normalmente cerca del 2% es excretado en la orina, pero en pacientes con enfermedad hepática, hasta más del 20% puede ser excretado. Cantidades variables son tomadas por el músculo, y trazas son encontradas en el tracto gastrointestinal (22).

REACCIONES QUE SIGUEN A UNA INYECCION DE BROMOSULFALEINA.

Los efectos tóxicos siguientes a la administración de Bromosulfaleína son pocos en número, pero han sido reportados en la literatura médica algunos casos de reacciones alérgicas, y en los pacientes con por ciento elevado de Bromosulfaleína suele haber reacciones de sensibilización. Las reacciones sistémicas incluyen náuseas, vómito, vértigo, síncope, reacciones pirogénicas retardadas y reacciones alérgicas moderadas como urticaria y asma. También se han reportado reacciones anafilácticas y en algunos casos hasta muerte (22).

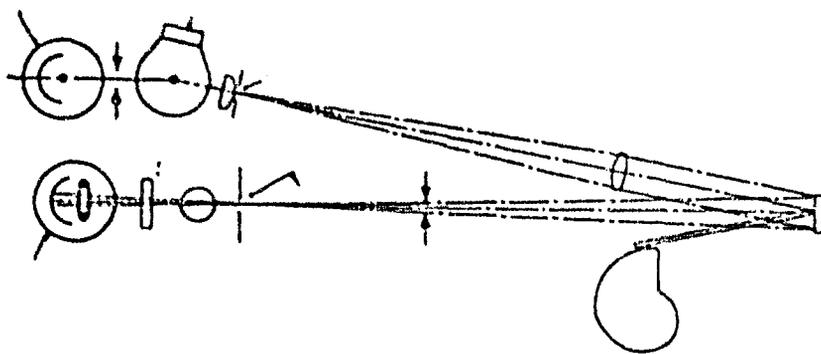
DESCRIPCION Y MANEJO DEL APARATO SPECTRONIC 20 PARA LA DETERMINACION DE VERDE DE INDOCIANINA.

El colorímetro Spectronic 20 de Bausch & Lomb requiere celdillas de bajo costo que cubren practicamente un rango de longitud de onda de 330 a 625 mU. El uso de un filtro y la substitución del fototubo tipo por un fototubo sensible infrarrojo, permite lecturas en la región de 625 a 975 mU.

El aparato está provisto de un botón control de la longitud de onda y una escala de la misma calibrada en divisiones de 5 en 5 mU; un soporte plástico para las celdillas que tiene una bisagra en la parte superior de la abertura; un indicador rojo que brilla cuando el aparato está encendido y dos escalas, la superior que da lecturas en % de transmitancia y la inferior, que las da en absorbancia. La escala ilustra la relación entre absorbancia y % de transmitancia (12).

$$A = - \log. T = \log. \left(\frac{100}{T} \right)$$

PRINCIPIOS DE OPERACION.



La luz blanca emitida por la lámpara de tungsteno es concentrada por la lente de campo a la lente objetiva, para ser enfocada sobre la rejilla de difracción en tal forma que la luz de una banda deseada de 20 mU pasa a través de la salida de la ranura después de ser reflejada por la rejilla.

La rejilla de difracción es una réplica con 600 líneas por mm. exactamente distribuidas. La luz blanca que incide en la rejilla, es dispersada en un abanico de rayos o espectro, que va de 330 a 975 mU. Este abanico de rayos es reflejado sobre una pantalla que tiene una ranura de salida cortada dentro de ella. Girando el botón que controla la leva de la longitud de onda, la rejilla se voltea de modo que la banda de luz deseada pase a través de la ranura dentro de la solución de la muestra.

Cualquier luz no absorbida por la solución de la muestra, incide en el fototubo, donde la intensidad de la luz transmitida es convertida en una señal eléctrica indicada sobre la escala.

En el Spectronic 20 Modelo Modificado, el voltaje que pasa a la lámpara está regulado por medio de un fototubo de referencia, siendo naturalmente más estable. El ventilador construido dentro del compartimiento de la muestra, estabiliza la temperatura (12).

INSTRUCCIONES DE MANEJO (12).

1. - Regulación de voltaje.
2. - Encendido del aparato.
3. - Lavado de las celdillas.
4. - Llevar a 0 % de transmitancia.
5. - Llevar a 100 % de transmitancia.
6. - Comprobación del 0 y 100 % de transmitancia.
7. - Lectura de la muestra.
8. - Comprobación del equipo:
 - a. - Regresión del amperímetro.
 - b. - Apagado del aparato.

M A T E R I A L Y M E T O D O .

MATERIAL.

Espectrofotómetro Spectronic 20 de Bausch & Lomb.

Pipeta de 6 Lambdas.

Jeringas de 10 cc. y agujas estériles.

Tubos de centrífuga y tubos de ensayo.

Centrífugas.

Gradillas.

Baño de María a 37°C.

Cronómetro.

Pipetas.

Verde de Indocianina.- Su nombre comercial es Cardio - Green. Es un colorante distribuido por HYNSON, WESTCOTT & DUNNING, INC. Baltimore, Maryland 21201. Se presenta en forma de polvo de color verde intenso brillante, en frascos ampula de 25 mg. acompañado de dos ampolletas de 10 ml. cada una, de solvente acuoso estéril. Para preparar la solución inyectable, se disuelve el contenido del frasco ampula en 12.5 ml. de solvente, resultando una concentración de 2 mg. de colorante por cada ml. de solución. La dosis inyectada es de 0.1 mg. por kilogramo de peso corporal. Una vez preparada la dilución, debe usarse el mismo día, ya que el colorante en solución es muy inestable.

METODO.

- 1.- Una vez que el paciente se encuentra en ayunas y preparada la dilución del Verde de Indocianina como se explicó anteriormente, se toman por venopunción 8 ml. de sangre, la cual se pasa inmediatamente a un tubo de centrifuga cuidando de que resbale lentamente por las paredes del tubo para evitar que se produzca hemólisis. Este tubo se titula como muestra "A".
- 2.- Sin retirar la aguja, mediante cambio de jeringa, se inyecta la cantidad de colorante previamente calculada según el peso del paciente, esto es 0.1 mg. por kilogramo de peso.
- 3.- En el momento en que se termina de inyectar el colorante se cronometran 10 minutos, y transcurridos éstos, se toma una nueva muestra de sangre (8 ml.) del brazo contrario al de la inyección; esta muestra se titula como "B".
- 4.- Se llevan las muestras al baño de agua a 37°C. para que

se retraiga el coágulo formado, y una vez logrado ésto, se centrifugan y se separa el suero completamente libre del paquete globular. Se miden 3 ml. de cada uno de los sueros, y se rotulan de la misma forma con que se hizo con las muestras de sangre.

5. - Para preparar el patrón, se miden 3 ml. de un suero normal y se le agregan 6 Lambdas de una solución de Verde de Indocianina de 1 mg. por ml. Este patrón se prepara cada vez que se usa un lote diferente de colorante.

6. - Los sueros "A" y "B", así como el patrón, son leídos de inmediato en el Espectrofotómetro a 810 mU. El suero "A" se toma como blanco y la lectura del suero "B" será debida a la cantidad de colorante retenido en la circulación; es decir, la que no fue captada por la celdilla hepática.

El método usado en nuestro trabajo es el propuesto por Cooke y col. (4) con ciertas modificaciones de las cuales hablaremos en el capítulo correspondiente a los resultados obtenidos; la fórmula

usada para calcular el porcentaje de retención del colorante en la circulación es también la usada por el mismo autor en sus trabajos sobre Verde de Indocianina.

La fórmula es la siguiente:

$$\% \text{ de retención} = \frac{B - A}{S - A} \times 100$$

En donde:

B = % de transmitancia del suero del ejemplo "B", o sea la muestra tomada 10 minutos después de la inyección del colorante.

A = % de transmitancia del suero del ejemplo "A", o sea la muestra tomada antes de inyectar el colorante.

S = % de transmitancia del patrón.

Como en nuestro caso con la muestra "A" se lleva a 100 % de transmitancia, la lectura de la muestra "B" se toma directamente puesto que la diferencia entre las dos lecturas ya está dada por el aparato.

El patrón se prepara con 6 Lambdas de una solución de colo-

rante de 1 mg. por ml. en 3 ml. de un suero normal, como se dijo en líneas anteriores, porque esto representa una dilución de 1/50), la cual es teóricamente la concentración del colorante en la sangre del paciente en un tiempo determinado, presumiendo un volumen plasmático de 50.1 kilogramo de peso.

MATERIAL HUMANO.

Se estudiaron 90 casos clínicos que fueron divididos en dos grupos:

- a) Normales: 30 casos.
- b) Patológicos: 60 casos.

Para llevar a cabo la selección de los normales se exigió la ausencia de evidencias de lesión hepática, antecedentes negativos de hepatopatías e ictericia, alcoholismo y desnutrición negativos, sin enfermedad actual y retención de Bromosulfaleína dentro de límites normales; 18 fueron del sexo masculino y 12 del femenino, sus edades fluctuaron entre los 19 y 50 años de edad y sus pesos oscilaron entre 47 y 81 kilogramos.

El diagnóstico de los casos patológicos se llevó a cabo a trau

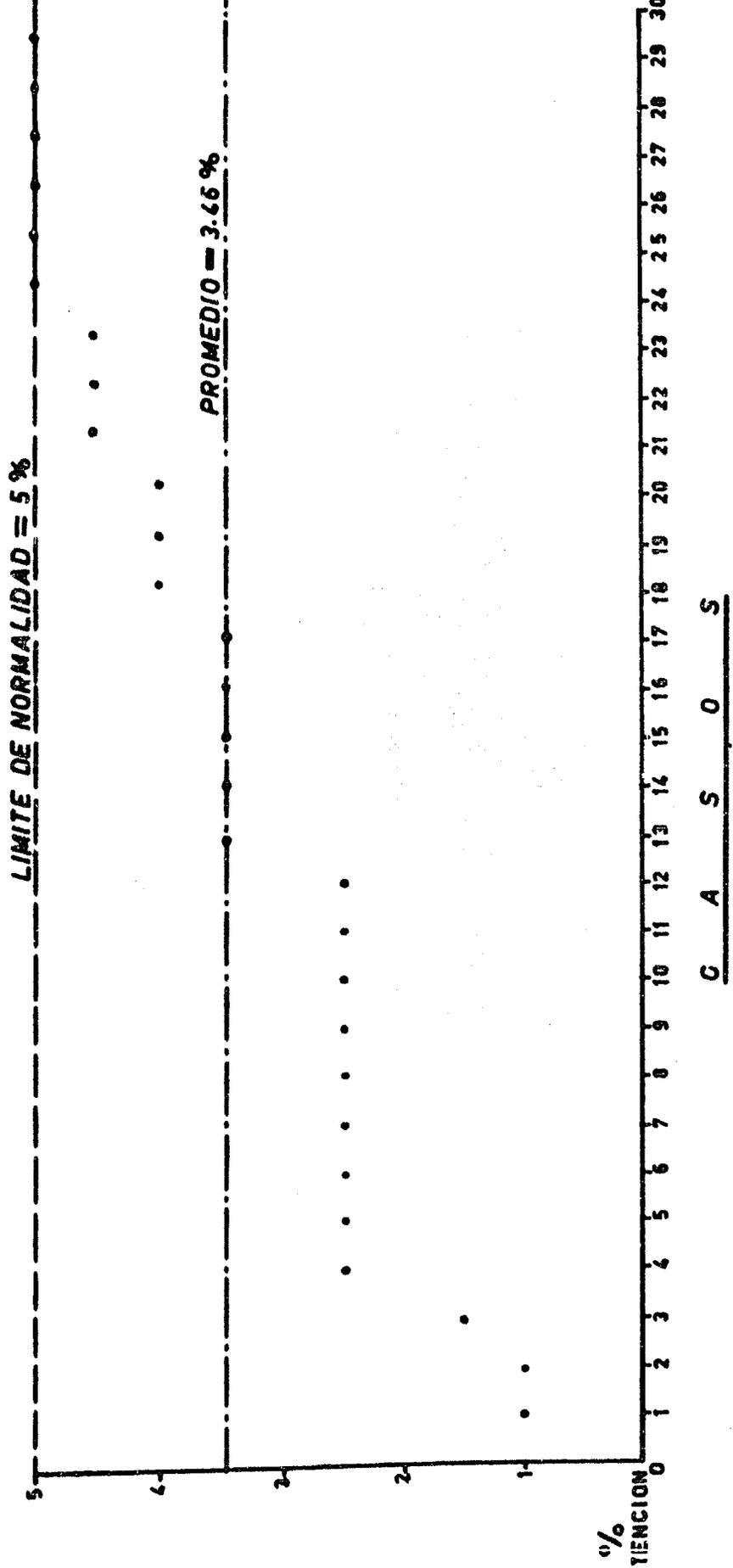
vés del estudio clínico, pruebas de funcionamiento hepático y estudios de gabinete; en la mayoría de ellos se certificó el diagnóstico por medio del estudio histopatológico, o bien por la información obtenida durante las intervenciones quirúrgicas.

Este grupo se subdividió, de acuerdo con el diagnóstico, de la siguiente manera:

1. - Cirrosis hepática	38	casos
2. - Hepatitis	6	casos
3. - Absceso hepático amibiano	5	casos
4. - Distintos padecimientos hepáticos y extra-hepáticos	11	casos
TOTAL	<u>60</u>	casos

R E S U L T A D O S O B T E N I D O S .

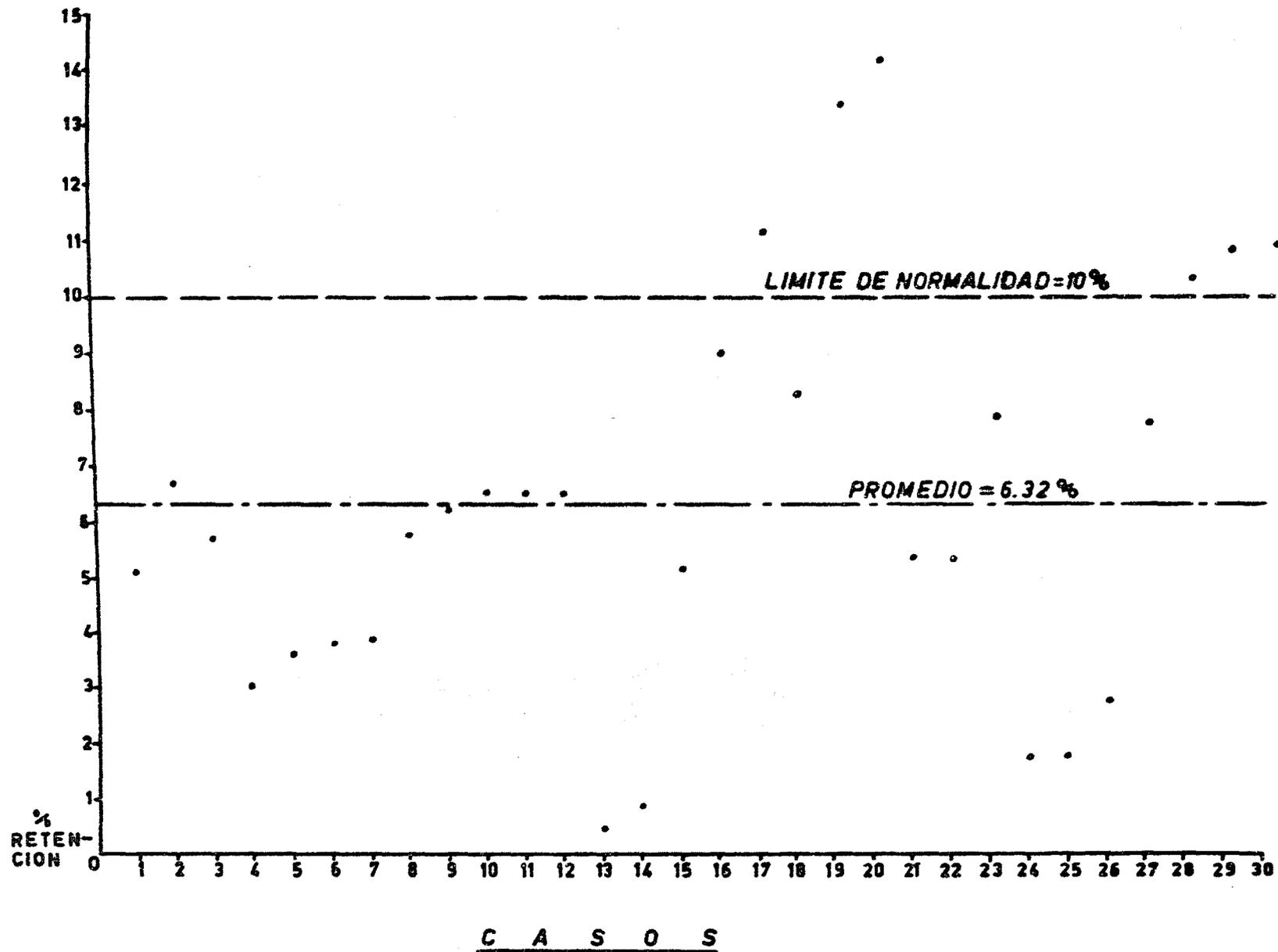
BROMOSULFALEINA NORMALES



GRUPO DE LOS NORMALES.

Caso Número	Sexo	Edad	Peso	B.S.		V.I.	
				%	Ret.	%	Ret.
1	F	21	56.5	1.0		5.07	
2	F	25	47.3	1.0		6.74	
3	M	44	68.0	1.5		5.78	
4	M	22	66.2	2.5		3.01	
5	F	22	50.6	2.5		3.46	
6	F	24	56.2	2.5		3.69	
7	F	23	48.5	2.5		3.69	
8	F	19	49.0	2.5		5.78	
9	M	27	70.0	2.5		6.26	
10	M	31	62.5	2.5		6.50	
11	F	22	57.7	2.5		6.50	
12	M	39	64.0	2.5		6.50	
13	M	26	56.5	3.5		0.42	
14	F	29	58.7	3.5		0.84	
15	F	29	50.2	3.5		5.07	
16	M	23	61.0	3.5		9.00	
17	M	29	81.0	3.5		11.10	
18	F	24	47.2	4.0		8.24	
19	M	26	75.0	4.0		13.35	
20	F	23	53.0	4.0		14.20	
21	M	27	55.5	4.5		5.30	
22	F	25	47.0	4.5		5.30	
23	M	26	58.0	4.5		7.98	
24	M	27	73.8	5.0		1.69	
25	M	38	67.0	5.0		1.69	
26	M	24	69.0	5.0		2.79	
27	M	30	75.5	5.0		7.73	
28	M	23	65.0	5.0		10.30	
29	M	37	76.0	5.0		10.80	
30	M	32	74.5	5.0		10.90	

VERDE DE INDOCIANINA NORMALES



G R U P O I .

C I R R O S I S H E P A T I C A .

Caso Número	Sexo	Edad	Peso	B.S.		V.L.	
				%	Ret.	%	Ret.
1	M	42	55.0	2.5		45.41	
2	F	53	37.2	6.0		6.74	
3	F	49	37.0	6.0		9.50	
4	M	50	72.0	11.0		12.21	
5	M	46	51.8	11.0		18.52	
6	M	41	59.0	14.5		16.31	
7	M	35	54.6	16.0		31.70	
8	F	43	57.0	17.5		19.51	
9	F	48	60.0	21.0		17.88	
10	M	46	68.0	21.5		28.77	
11	F	55	47.3	21.5		35.08	
12	F	50	57.7	22.5		17.25	
13	M	50	61.0	22.5		28.39	
14	F	25	52.7	23.0		28.73	
15	F	40	52.5	25.3		10.50	
16	M	56	60.5	28.6		30.01	
17	F	42	48.0	30.0		27.95	
18	M	50	82.3	30.0		46.61	
19	M	39	61.1	31.0		26.74	
20	M	33	57.0	31.0		30.87	
21	F	45	47.7	34.0		35.56	
22	M	16	62.2	35.0		32.21	
23	F	35	65.7	37.0		36.99	
24	M	33	71.0	37.5		38.40	

Caso				B. S.	V. I.
Número	Sexo	Edad	Peso	% Ret.	% Ret.
25	M	71	64.5	38.0	30.01
26	M	28	50.0	38.0	40.15
27	F	42	37.5	39.0	33.40
28	M	45	61.0	39.0	39.10
29	F	19	51.3	39.5	27.95
30	M	37	60.0	40.0	39.50
31	M	39	56.6	46.0	26.74
32	M	43	54.0	46.2	39.20
33	M	43	69.2	47.0	49.30
34	M	62	99.8	50.0	63.86
35	M	51	78.0	53.0	42.44
36	F	23	57.0	60.0	41.30
37	M	44	52.0	60.5	39.57
38	F	44	70.0	62.0	24.63

G R U P O I I .

H E P A T I T I S .

Caso Número	Sexo	Edad	Peso	B.S.		V.I.	
				%	Ret.	%	Ret.
1	F	68	51.8	7.0	12.63		
2	F	70	57.0	18.5	19.50		
3	M	36	54.0	20.0	24.80		
4	F	30	55.0	22.0	18.00		
5	F	24	62.0	54.5	19.10		
6	M	29	56.2	90.5	46.08		

HEPATITIS

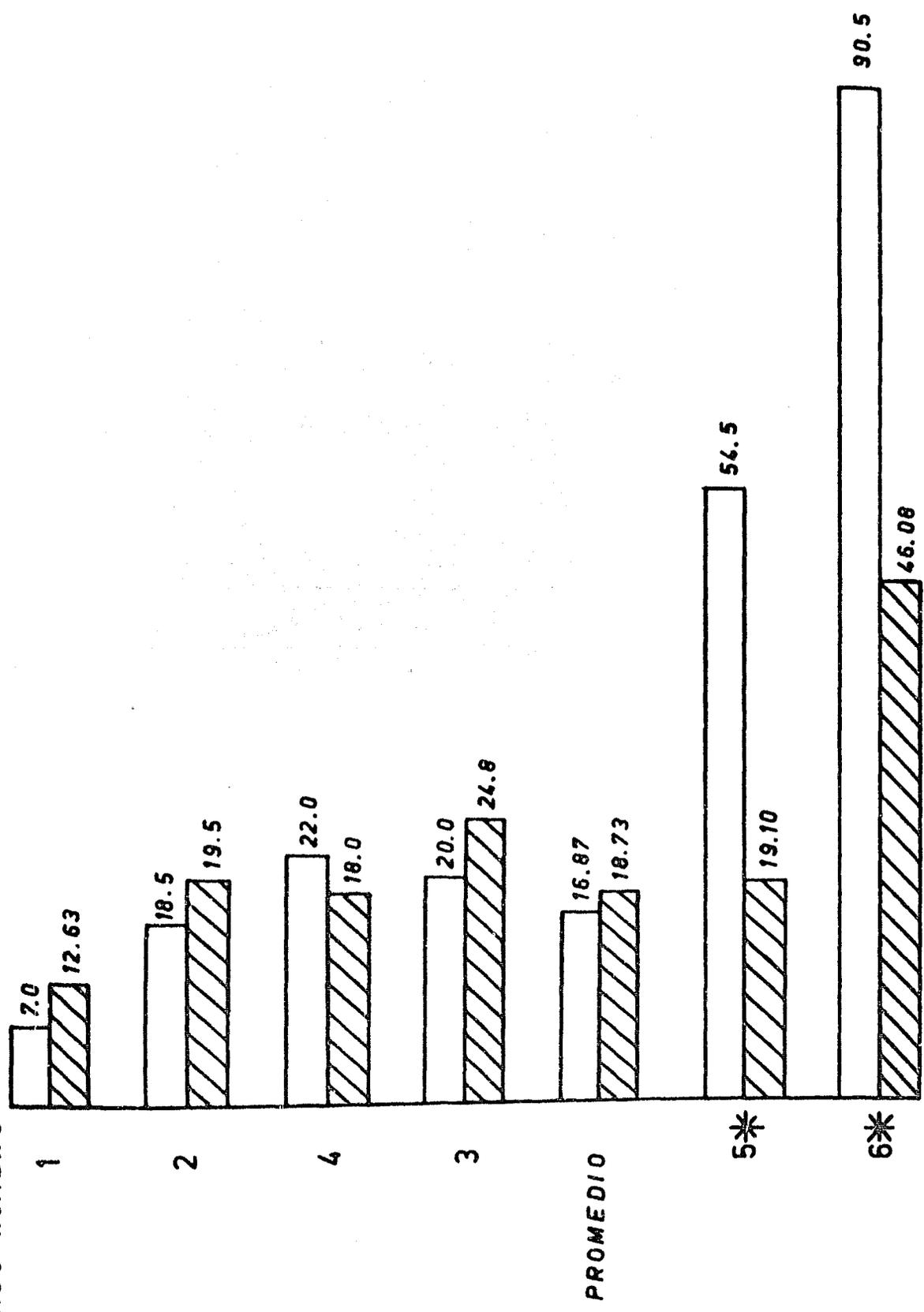


% VERDE



% BROMO

CASO NUMERO



* COLANGIOLAR

GRUPO III.

ABSCESO HEPATICO AMIBIANO.

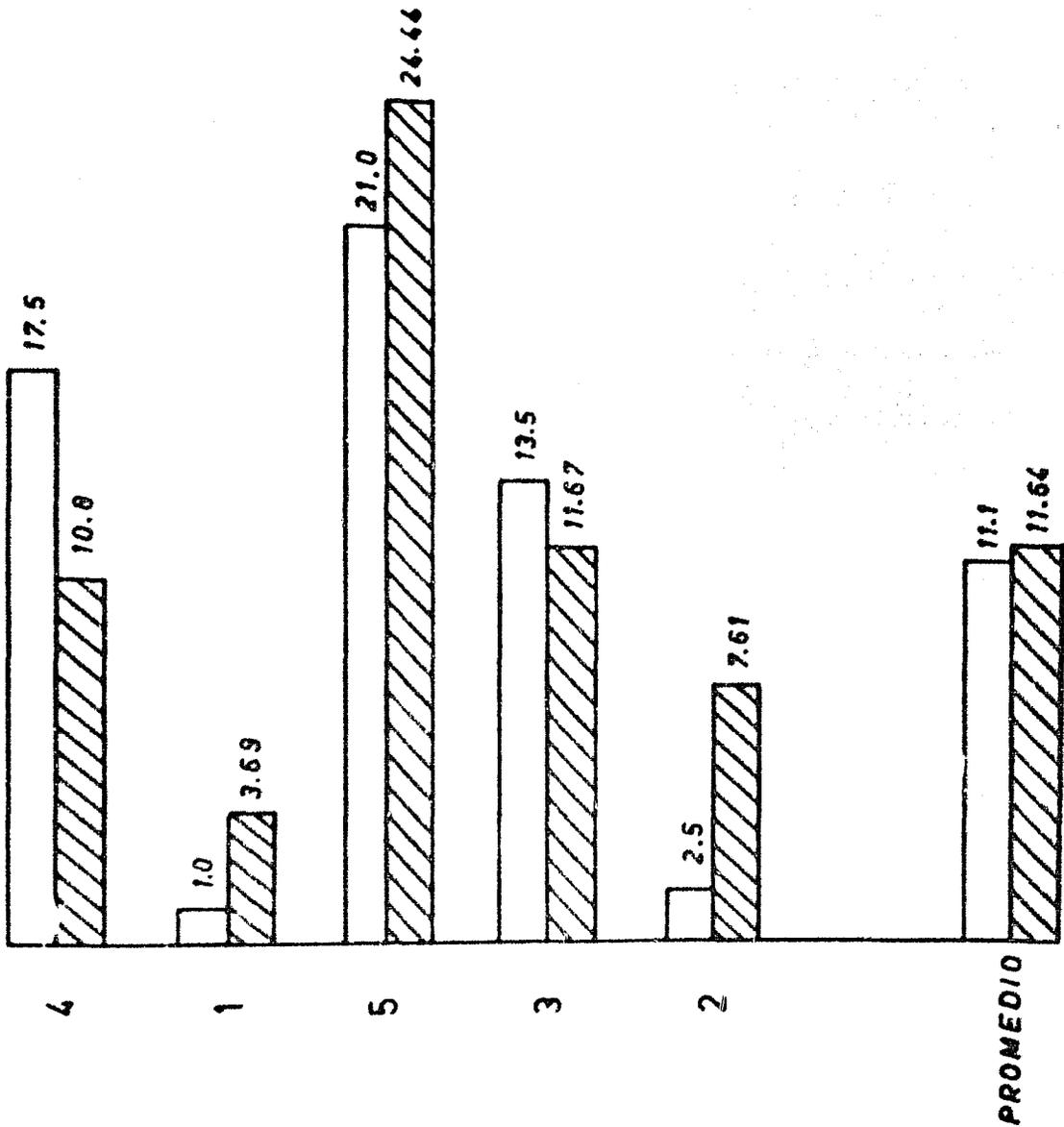
Caso Número	Sexo	Edad	Peso	B.S.		V.I.	
				%	Ret.	%	Ret.
1	M	32	55.5	1.0		3.69	
2	M	45	64.0	2.5		7.61	
3	M	51	67.5	13.5		11.67	
4	M	43	57.1	17.5		10.80	
5	M	42	42.2	21.0		24.44	

ABSCESSO HEPATICO AMIBIANO

█ VERDE

□ BRONCO

CASO NUMERO



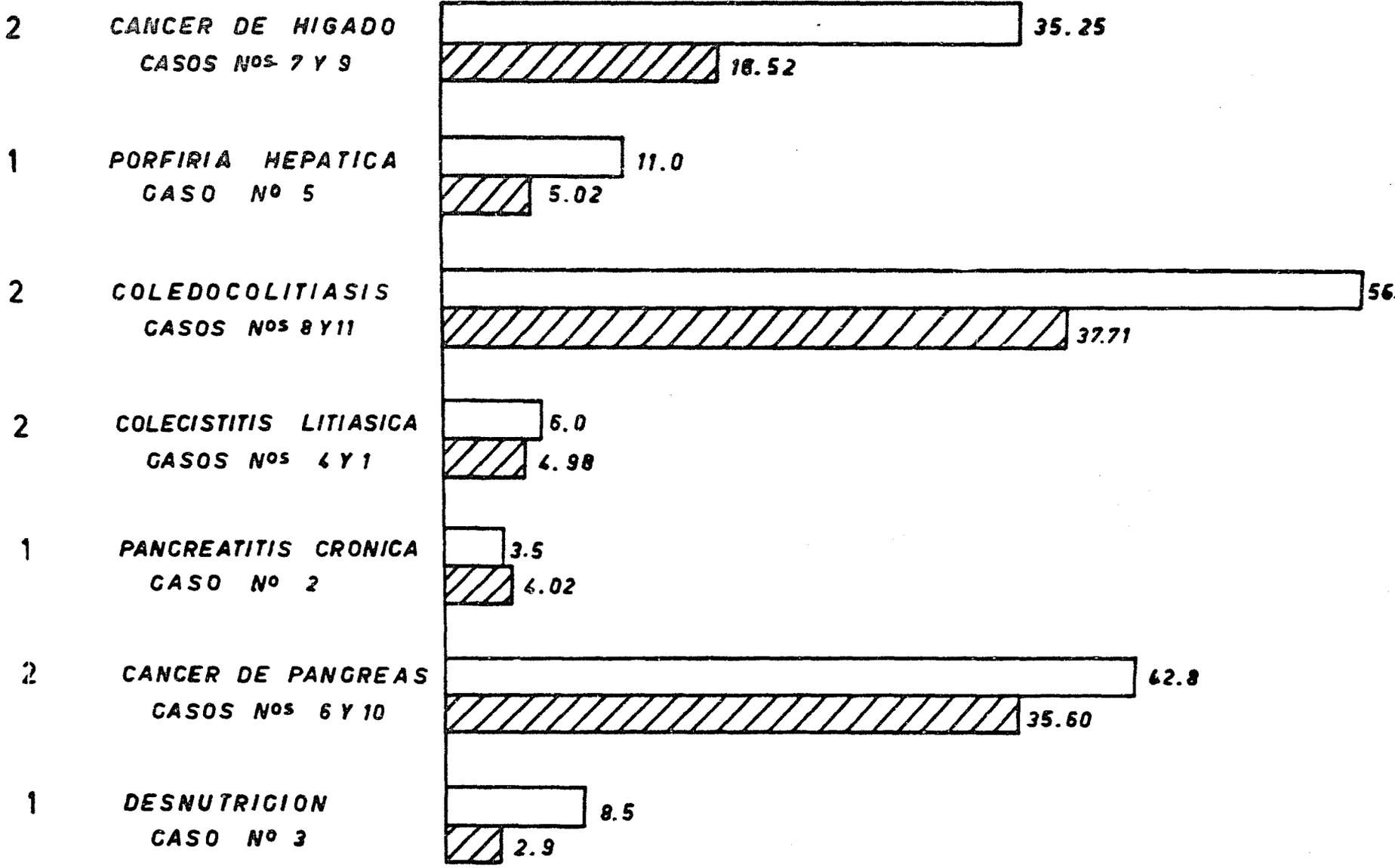
GRUPO IV.

DISTINTOS PADECIMIENTOS
HEPATICOS Y EXTRA-HEPATICOS.

Caso Número	Sexo	Edad	Peso	B.S. % Ret.	V.L. % Ret.
1	M	49	63.3	3.5	3.46
2	M	34	45.4	3.5	4.02
3	M	47	55.0	8.5	2.90
4	M	57	94.0	8.5	6.50
5	F	36	41.6	11.0	5.02
6	M	56	71.6	14.6	32.69
7	M	61	77.6	15.5	8.24
8	M	44	76.5	41.0	17.88
9	M	67	44.5	55.0	24.80
10	M	43	55.3	71.0	38.52
11	M	47	60.5	71.0	57.55

ERO DE
SOS.

DIAGNOSTICO.



% BROMO (B.S.) 

% VERDE (V.I.) 

VALORES ESTADISTICOS EN EL METODO DEL VERDE DE INDOCIANINA.

- a. - Exactitud
- b. - Precisión
- c. - Promedio
- d. - Desviación tipo
- e. - Variancia
- f. - Valores Normales

a. - EXACTITUD.

Hay varias maneras de determinar la exactitud de un método; sin embargo el más usado es el que utiliza los resultados comparativos entre el método que se trata de proponer y aquel que ya está establecido y aprobado por la práctica; en nuestro caso se comparan los resultados con la Bromosulfaleína (21).

b. - PRECISION.

La precisión se usa para designar si un método es reproduci

ble: es decir que el mismo suero por el mismo método debe dar resultados iguales o con una variación máxima de 0.2 en este caso (21).

c. - PROMEDIO.

Número de casos normales: 30

Valor promedio o media aritmética de los resultados: 6.32

En todos estos casos la Bromosulfaleína resultó normal.

d. - DESVIACION TIPO.

$$D. \text{ tipo} = \sigma = \sqrt{\frac{\sum \text{Desviaciones}^2}{(n - 1)}}$$

La fórmula especifica que cada desviación se eleva al cuadrado y la suma de éstas es el numerador.

$n - 1$ es el número de casos menos uno, ya que según las leyes de cambio estadístico se sabe que escogiendo 10 objetos, una cada vez, hay una probabilidad de equivocación, por lo que se escogen 9. El número de veces que se escogen se llaman estadisti-

camente "grados de libertad", comúnmente se habla de "probabilidad de error" (21).

Caso Número	V. L. Resultado	Promedio	Desviación	Desviación ²
1	5.07	6.32	1.25	1.56
2	6.74	6.32	0.42	0.17
3	5.78	6.32	0.54	0.29
4	3.01	6.32	3.31	10.95
5	3.46	6.32	2.86	8.17
6	3.69	6.32	2.63	6.91
7	3.69	6.32	2.63	6.91
8	5.78	6.32	0.54	0.29
9	6.26	6.32	0.06	0.0036
10	6.50	6.32	0.18	0.03
11	6.50	6.32	0.18	0.03
12	6.50	6.32	0.18	0.03
13	0.42	6.32	5.90	34.81
14	0.84	6.32	5.48	30.03
15	5.07	6.32	1.25	1.56
16	9.00	6.32	2.68	7.18
17	11.10	6.32	4.78	22.84
18	8.24	6.32	1.92	3.68
19	13.35	6.32	7.03	49.42
20	14.20	6.32	7.88	62.09
21	5.30	6.32	1.02	1.04
22	5.30	6.32	1.02	1.04
23	7.98	6.32	1.66	2.75
24	1.69	6.32	4.63	21.43
25	1.69	6.32	4.63	21.43
26	2.79	6.32	3.53	12.46
27	7.73	6.32	1.41	1.98
28	10.30	6.32	3.98	15.84
29	10.80	6.32	4.48	20.07
30	10.90	6.32	4.58	20.97

$$D. \text{ tipo} = \sigma = \sqrt{\frac{365.9636}{29}} = \sqrt{12.61} = 3.56$$

e. - VARIANCIA.

$$D. \text{ tipo} = \sigma = \sqrt{\text{Variancia}}$$

$$\sigma^2 = \text{Variancia}$$

$$12.67 = \text{Variancia}$$

La variancia nos da los valores más sutiles sin introducción de error apreciable.

f. - VALORES NORMALES.

Tomando en cuenta los resultados de los incisos anteriores, se llega a los valores siguientes:

Promedio aritmético: 6.32

Desviación tipo: \pm 3.56

Variancia: 12.67

Valores Normales: 0 a 10 % de retención

Los valores más elevados del 10% de retención los excluye la curva de Gauss, recordando que si un paciente da valores de

retención superiores a esta cifra y clínicamente está en condiciones normales, es decir objetivamente no presenta ninguna patología hepática, puede tratarse de los valores elevados que se excluyeron.

MODIFICACIONES QUE SE LE HICIERON AL METODO.

En el método propuesto por Cooke y col., se utilizó el espectofotómetro BECKMAN DU a 810 mU, mientras que en el nuestro se utiliza el SPECTRONIC 20 de Bausch & Lomb a la misma longitud de onda.

En el método original se hace un patrón para cada muestra, mientras que en el presente trabajo, teniendo en cuenta que las variaciones se presentan sólo en lotes diferentes del colorante, se hace un patrón por cada lote, comprobándolo periódicamente. De tres lotes de colorante utilizados, sólo hubo una diferencia pequeñísima entre ellos; dos resultaron sin variación y en el tercero ésta fue de (0.087) con respecto a las anteriores, previo cambio de % de transmitancia a D. O.

Cooke y col. utilizan agua para el blanco y luego, verifican las lecturas de las muestras de suero "A" y "B" obteniendo la diferencia entre las dos lecturas al aplicar la fórmula para el % de retención; en cambio nosotros utilizamos como blanco el suero de la muestra "A" y la lectura de la muestra "B" por consiguiente, se utiliza en la fórmula directamente. Lo mismo se hace con el

patrón.

Nuestras lecturas fueron realizadas en % de transmitancia y no en D. O. como en el trabajo de referencia, por considerar que esta escala es menos exacta que la primera y puede proporcionar mayores errores de cálculo.

C O M E N T A R I O .

El análisis de los resultados obtenidos nos permite concluir de acuerdo con el consenso general, que el Verde de Indocianina es una prueba de funcionamiento hepático capaz de manifestar insuficiencias hepáticas discretas y valorar en forma acertada, el grado de insuficiencia en las hepatopatías con daño acentuado. Es te razonamiento se basa en los resultados obtenidos al efectuar el estudio comparativo con la Bromosulfaleína.

En los casos "normales", nuestro porcentaje más elevado de retención quedó establecido en 10%, habiéndose eliminado los valores superiores a esta cifra. Hay que hacer notar que de la misma manera, de acuerdo con la curva de Gauss, se excluyeron los "normales" con cifras de Bromosulfaleína más elevadas de las ya conocidas como normales, en estos casos el Verde de Indocianina también se encontró elevado de acuerdo con nuestra cifra obtenida como normal. Cooke y col. mencionan como cifra normal máxima 20%, o sea una diferencia de 10% sobre la nuestra, para lo cual no encontramos explicación.

En la mayoría de los casos patológicos, se observa que los resultados con los dos colorantes empleados fueron sensiblemente iguales, tal y como lo demuestran las gráficas 3, 4 y 5 ya que

en los pacientes con cirrosis, con hepatitis sin colangitis y con absceso hepático amibiano, sólo existió una discrepancia de 0.66%, 1.86% y 0.54% respectivamente.

Los promedios de porciento de retención en los diferentes grupos de pacientes estudiados fueron: en el grupo de cirrosis (I), 31.42% para la Bromosulfaleína y 30.76% para el Verde de Indocianina; en los casos de hepatitis (Grupo II), excluyendo los dos casos de hepatitis colangiolar, se obtuvieron promedios de 16.87% para la Bromosulfaleína y 18.73% para el Verde de Indocianina; y en el grupo con absceso hepático amibiano (III), el promedio para la Bromosulfaleína fue de 11.1% y para el Verde de Indocianina de 11.64%. En el IV Grupo, no relacionamos promedios debido a que se trata de pacientes con diversos padecimientos, ya sean hepáticos o extra-hepáticos; sin embargo se observa que en el caso No. 3 con desnutrición, mientras la Bromosulfaleína se encuentra elevada, el Verde de Indocianina permanece normal; existiendo en los otros casos una correlación entre las dos pruebas.

Si se observan los datos proporcionados por los casos 5 y 6 (Grupo II) de hepatitis colangiolar, en los cuales existe una diferencia de 35.4% y 44.42% respectivamente, y 8 y 11 (Grupo IV) de

ictericia obstructiva, en los que la diferencia es de 23.12% y 13.45% respectivamente, se comprueba que estos resultados están de acuerdo con lo establecido por algunos autores entre ellos Hunton y col., de que en ictericias colostáticas y obstructivas, el Verde de Indocianina da lugar a positivas en una menor proporción que la Bromosulfaleína.

En los dos casos de cáncer de páncreas (6 y 10, Grupo IV), la diferencia fue menor, lo que se podría explicar por la presencia de múltiples metástasis a hígado e insuficiencia hepatocelular asociada, aunque por el número reducido de casos estudiados no se puede llegar a una aseveración.

Finalmente, es necesario señalar que nuestros resultados en los casos patológicos son similares a los informados en la literatura médica, por lo que creemos que la prueba del Verde de Indocianina es útil para valorar el grado de insuficiencia hepática, y cuyo estudio debe continuarse para poder concluir posteriormente, si también es de utilidad para el diagnóstico diferencial de los padecimientos que cursan con ictericia.

R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S .

Se revisan las propiedades del Verde de Indocianina, destacando su distribución uniforme en el espacio intravascular, su ausente captación por los tejidos periféricos y su selectiva eliminación hepática no conjugada.

En nuestros casos, el Verde de Indocianina dió una cifra media de 6.32% de retención, con una cifra límite de normalidad hasta del 10%.

Es una prueba útil para valorar el grado de insuficiencia hepática con resultados similares en exactitud, facilidad y sensibilidad, a los obtenidos con la Bromosulfaleína.

Con esta prueba se pueden manifestar las alteraciones hepáticas alcohol-nutricionales en sus primeros estadios de desarrollo, siendo esta característica única en lo que se refiere a las otras pruebas de funcionamiento hepático del tipo de retención de colorantes.

Parece tener utilidad en el diagnóstico diferencial de las ictericias. Sin embargo, no será sino un número mayor de casos analizados lo que permita emitir un juicio estadístico al respecto.

De acuerdo con los casos por nosotros experimentados y los informados en la literatura médica, carece de manifestaciones tóxicas o alérgicas, sistémicas y locales.

La prueba parece ser exacta y precisa, lo que permite utilizarla con facilidad en un laboratorio de rutina.

Es una prueba más rápida que la Bromosulfaleína, en lo que se refiere a la presencia del enfermo.

B I B L I O G R A F I A .

1. - Barbier F. and De Weerd G. A.
L'exploration Hépatique par L'Indocyanine Green.
Acta Gastroent. Belg. 27:153, 1964.
2. - Caesar J., Shaldon S., Chiendussi L., Guevara L. and Sherlock S.
The Use of Indocyanine Green in the Measurement of Hepatic Blood.
Clin. Science 21:43-57, Ag. 1961.
3. - Hynson, Westcott & Dunning, Inc.
Publications on Cardio-Green (CG).
Part I - Cardiac Function Studies.
Baltimore, U.S.A.
4. - Cooke A. R., Harrison D. D. and Skyring A. P.
Use of Indocyanine Green as a Test of Liver Function.
Am. J. Dig. Dis. 8:244, March, 1963.
5. - Cherrick G. R., Stein S. W., Leovy C. M. and Davidson C. S.
Indocyanine Green: Observation on its Physical Properties, Plasma Decay, and Hepatic Extraction.
J. Clin. Investig. 39:592, 1960.
6. - Fox I. J., Brooker L. G. S., Heseltine D. W. and Essex H. E.
A Tricarbocyanine Dye for Continuous Recording of Dilution Curves in Whole Blood Independent of Variations in Blood Oxygen Saturation.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 32:478, 1957.
7. - Fox I. J.
A New Dye for Continuous Recording of Dilution Curves in Whole Blood Independent of Variations in Blood Oxygen Saturation.
Paper Read at Meeting of the Scientific Sessions of The American Heart Association, Chicago, Oct. 25:28, 1957.
8. - Hunton D. B., Bollman J. L. and Hoffman H. N.

Studies of Hepatic Function with Indocyanine Green.
Gastroenterology 39:713, 1960.

9. - Hunton D. B., Bollman J. L. and Hoffman H. N.
Hepatic Removal of Indocyanine Green.
Proc. Staff. Mect. Mayo Clin. 35:752, 1960.
10. - Leevy C. M., Stein S. W., Cherrick G. R. and Davidson C. S.
Indocyanine Green Clearance. A Test of Liver Excretory
Function.
Clin. Res. 7:290, 1959.
11. - Tanaka N., M. D.
A New Liver Function Test by Indocyanine Green Retention
Rate.
Gastroent. Jap. 1:58, 1966.
12. - Fritz J. and G. Schenk.
Quantitative Analytical Chemistry.
Allyn and Bacon, Inc.
Boston, 1966.
13. - Rappaport E., Ketterer S. G. and Wiegand B. D.
Hepatic Clearance of Indocyanine Green.
Clin. Res. 7:289, 1959.
14. - Reemtsma K., Hottinger G. C., De Graff A. C. and Creech
O. Jr.
The Estimation of Hepatic Blood Flow Using Indocyanine
Green.
Surg. Gynec. & Obstet. 110:353, 1960.
15. - Reuter E. and Jorke D.
First Studies with the Indocyanine Green Test as a Liver
Function Test.
Gastroent. Abstracts 2:105, Jan. 1967.

16. - Shimada Y., Maeda T., Kizu H. and Hashimoto J. I.
A Study of Indocyanine Green Clearance Test in Liver Disease.
Gastroent. Jap. 1:58, 1966.
17. - Wheeler H. O., Cranston W. I. and Meltzer J. I.
Hepatic Uptake and Biliary Excretion of Indocyanine Green in the Dog.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99:11, 1958.
18. - Wiegand B. D., Ketterer S. G. and Rappaport E.
The Use of Indocyanine Green for the Evaluation of Hepatic Function and Blood Flow in Man.
Am. J. Digest. Dis. 5:427, 1960.
19. - Fox I. J., Brooker L. G. S., Heseltine D. W. and Essex H. E.
A Tricarbocyanine Dye for Continuous Recording of Dilution Curves in Whole Blood Independent of Variations in Blood Oxygen Saturation.
Fed. Proc. 16:39, 1957.
20. - Reemtsma K., Hottinger G. C., De Graff A. C. and Creech O. Jr.
Studies of Hepatic Function and Blood Flow Using Indocyanine Green.
Clin. Research 8:77, 1960.
21. - Hill A. B.
Principles of Medical Statistics.
Oxford Press.
New York, 1955.
22. - Bockus H. L., M. D.
Gastroenterology.
Volumen III.
2a. Edición.
W. B. Saunders Company.
Philadelphia & London, 1965.

23. - Harper H. A.
Review of Physiological Chemistry.
7a. Edición.
Lange Medical Publications.
1959.