

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



67

DESPLAZAMIENTO DE LA BILIRRUBINA UNIDA
A ALBUMINA POR SALICILATOS EN RECIEN
NACIDOS

T E S I S

Que Para Obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

JOSE ANTONIO LOPEZ NUÑEZ

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS 1979

DO M. E. A
PÁG. 200
PROG



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL	Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO
SECRETARIO	M.en C. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO
1er. SUPLENTE	Q.F.B. GPE LETICIA CARRASCO RIVERA
2do. SUPLENTE	Q.F.B. ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO CLINICO DEL HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA.

SUSTENTANTE: JOSE ANTONIO LOPEZ NUÑEZ.

ASESOR DEL TEMA: DEA CORONADO PERDOMO.

A MIS QUERIDOS PADRES:

Josefina Núñez de López

Antonio López de Dios.

Con mi más profundo agradecimiento por su inagotable apoyo y comprensión y -- por conducirme al camino de la rectitud, honestidad y trabajo.

Gracias.

Con profundo cariño a mis hermanos:

Silvia del Carmen López de Pedrero.

Alfredo López Núñez.

Veronica López Núñez.

Al Sr. CPT Silviano A. Pedrero Falcón.

A mis sobrinas.

Silvia Mercedes y Susana Valeria

A Julie Ann Ottolini

Con profundo amor de Compañero.

AL H. JURADO

Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

M.en C. ESTHER GUTIERREZ HIDALGO

Q.F.B. GPE LETICIA CARRASCO RIVERA

Q.F.B. ROSA BEATRIZ MARTINEZ GOMEZ

Quiero expresar de manera especial
mi agradecimiento a la Srita:

Q.F.B. Dea Coronado Perdomo por su
ayuda inagotable.

Mi más sinceras gracias para todo el personal del Lab. clínico del C.M. - La Raza por haber hecho posible la realización de éste trabajo.

A mis Maestros, compañeros y amistades.

Gracias.

I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	
A) El ciclo metabólico normal de la bilirrubina...	3
B) Metabolismo de la bilirrubina en el recién nacido.....	12
C) Metabolismo fetal de la bilirrubina.....	13
D) Propiedades fisicoquímicas de la bilirrubina..	15
E) Toxicidad de la bilirrubina.....	19
F) Difusibilidad de la bilirrubina.....	22
G) La barrera hematoencefálica y el pasaje de bilirrubina.....	24
III. MATERIAL Y METODOS	
A) Determinación de bilirrubina por el método de Malloy-Evelyn.....	29
B) Determinación del desplazamiento de bilirrubina por salicilatos.	
Método de: Gerard B. Odell.....	32
IV. RESULTADOS	
A) Determinación del desplazamiento de bilirrubina por salicilatos.	
Método de: Gerard B. Odell.....	36
V. DISCUSION.....	41
CONCLUSION.....	45
RESUMEN.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	48

I INTRODUCCION

El recién nacido puede presentar elevadas cantidades de bilirrubina (Bb) en padecimientos como la incompatibilidad de grupo ABO y Rh.

Se ha establecido que la Bb circulante se une a la albúmina del suero y que el kernicterus resultante de la neurotoxicidad de aquella en el infante hiperbilirrubinémico, no tiene correlación directa con la cantidad de Bb no conjugada (indirecta), pero si depende de la presencia de la Bb libre, difusible, la cual no está unida a las proteínas del suero. (1)

Sin embargo, la presencia de esta Bb libre puede ser el resultado de deficiencia de albúmina, modificaciones en sus sitios de fijación o por alteraciones del equilibrio ácido-básico, ya que la reducción en el pH produce un incremento en la concentración de Bb libre. (2)

En el presente estudio se pretende correlacionar la concentración de Bb libre con el porcentaje de saturación, ya que se sabe que aniones orgánicos como las fenolsulfotaleinas,

ácido sulfanílico, salicilato de sodio, (2) oleato de sodio, -
diuréticos (3) y antibióticos, (4) producen un desplazamiento
de la Bb previamente unida a la albúmina.

En base a este tipo de desplazamiento, se ha utilizado
una cantidad estandarizada de solución de salicilato de -
sodio que ha sido añadida a sueros de neonatos ictericos-
para conocer en forma indirecta el grado de saturación de la-
albúmina con la Bb, (2) con la finalidad de proporcionar al -
neonatólogo una información más que le facilite tomar medidas
que mejoren el estado del infante y permita un control adecuado
en el transcurso de estas hiperbilirrubinemias.

II. GENERALIDADES

A) EL CICLO METABOLICO NORMAL DE LA BILIRRUBINA. - -
Involucra tres pasos fundamentales: a) Formación, b) Circulación y c) Conjugación.

a) Formación.

El eritrocito del recién nacido es de mayor tamaño - que el del adulto normal y posee mayor fragilidad osmótica como consecuencia de su forma esferocítica, lo cual disminuye - su vida media a 60-80 días; es decir, 2/3 de la del eritrocito adulto normal. (5)

Consecuentemente, existe una mayor oferta de Hemoglobina (Hb) al metabolismo, la Hb es transportada por via plasmática mediante un transportador específico, la alfa-2-haptoglobina, al sistema retículoendotelial, (SRE) donde el hierro y la globina son liberados y reaprovechados, pero el grupo --hem es metabolizado a Bb luego de varias etapas.

Se ha demostrado que solamente la Hb unida a hapto--globina se transforma a Bb; el resto permanece circulando en-

el plasma como pigmentos no plenamente identificados aún, conocidos como hemina hematina, cuyo acarreador plasmático es la "albúmina". Este complejo albúmina-hematina puede identificarse en el plasma por la absorción espectrofotométrica a 415 nm.

Considerando que un gramo de Hb produce 35 mg de Bb, se producen al día 23 mg de Bb que, para la volemia del recién nacido de 85 ml/kg, representa una concentración de .9 mg/l (5).

A esta producción normal debemos añadir que el neonato posee otras fuentes de producción de Bb, llamadas de "cortocircuito", provenientes del metabolismo de proteínas que poseen también grupos hem, cuyo retorno neonatal es mayor que el del adulto. Ejemplos de ellos son la mioglobina, el citocromo C, las catalasas, (6) etc.

Se ha calculado que el aporte de Bb por esta vía constituye alrededor del 20% de la bilirrubina total.

b) Circulación.

La Bb es casi insoluble en medio acuoso y con tendencias a producir soluciones sobresaturadas y/o coloidales.

Como tal, debe ser disuelta para ser transportada. De allí -- que se una a la albúmina sérica y forme con ella un complejo -- macromolecular hidrosoluble reversible que en ciertas condi-- ciones puede disociarse. La Bb libre puede difundir fuera -- del espacio vascular y ejercer su acción tóxica sobre las es-- tructuras nerviosas (5).

c) Conjugación.

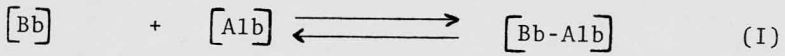
Para su defensa, el organismo dispone de un sistema -- destoxicante cuyo objetivo final es la eliminación de la -- Bb mediante su hidrosolubilización, reducción y posterior ex-- creción, que para su mejor estudio puede dividirse en tres -- etapas:

1. Captación
2. Conjugación
3. Excreción

c.1 Captación

Según Odell (2), basado en los estudios de Martin, -- existe una relación estequiométrica entre la Bb libre, la al-- búmina, y el complejo Bb-Alb, y por medio de dicha relación -- se conoce la concentración de la Bb libre (tóxica).

Del mismo Martín son las sig. ecuaciones:



$$\frac{[Bb-Alb]}{[Bb][Alb]} = K \quad (II)$$

Donde Bb es igual a la Bb libre, potencialmente difusible, cuya molécula es ultrafiltrable.

El complejo Bb-Alb es igual a un complejo anión-proteína que, además, es una molécula no ultrafiltrable. La - - constante de asociación de la Bb unida a la proteína es alta- y sus cifras son 5.6×10^7 mol/litro ⁽⁷⁾.

La Bb circulante en el plasma es conducida al hígado y captada por dos proteínas del citosol interno del hepatocito. Estas proteínas, denominadas "Y" (principal) y "Z" (accesoria), captan selectivamente todos los aniones de cierto tamaño que atraviesan la circulación hepática, tales como colorantes, medicamentos (salicilatos) y aniones tóxicos como la-
Bb (5).

Estas proteínas no son específicas del hígado pero - sí se encuentran en mayor abundancia en el hepatocito. El -- neonato posee un contenido más bajo de lo normal, que fácil- mente puede aumentarse con tratamiento a base de fenobarbital (5).

Pueden interferir con la capacidad de la albúmina para unir Bb en el plasma, factores como aniones orgánicos (hematina), ácidos biliares, incrementadas concentraciones de --iones hidrógeno, drogas aniónicas y ácidos grasos (2). Se ha demostrado que la albúmina en los niños puede tomar una configuración cuaternaria y que la albúmina humana cristalizada tiene una configuración terciaria que es más adecuada para unir la primera mol de Bb (8).

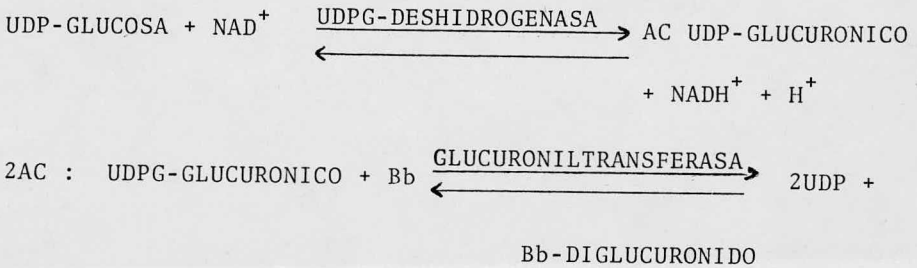
Athanassiadis y colaboradores (9) han demostrado por una técnica electroforética que la Bb es captada por alfa₁ --globulina, alfa₂-globulina, y beta₂-globulina; la única globulina que no captó Bb, aún a niveles elevados, fué la gamma-globulina. Cuando ya se han saturado todos los sitios de la molécula de albúmina, entonces aparecen las fracciones globulínicas fijando Bb.

Neesby y colaboradores (7) desarrollaron la técnica de la capacidad residual de fijación de la Bb dando a un paciente alimentos grasos y observaron que la interferencia que existía entre la Albúmina y los ácidos grasos no esterificados no era tan grande, es decir, que la albúmina tiene mayor afinidad por la Bb que por los ácidos grasos y que, además, la capacidad residual de fijación de la Bb no varía dando este tipo de alimentación.

c.2 Conjugación.

Una vez dentro del hepatocito, una serie de enzimas del sistema reticuloendotelial cataliza una cadena de reacciones entre la Bb, uridindifosfoglucosa (UDG), adenosíntrifosfato (ATP) y nicotinadeninucleotido (NAD).

Figura No. 1



De este complejo enzimático se destacan la UDP-glucosa-deshidrogenasa y la glucuroniltransferasa (GT) ⁽⁶⁾. Los prematuros sufren kernicterus con más frecuencia que los niños a término por un retraso en la actividad de la GT del hígado inmaduro de todos los recién nacidos, por lo que aparece la Bb libre no conjugada.

La Bb libre normalmente está en una concentración de 1/20 000 de la Bb total del suero, y en la concentración de 20 nanomoles/litro o .117 microgramos/litro de Bb libre. ⁽⁷⁾

Mas, según la adaptación del neonato a su nueva vida y a medida que aparecen, la proteína hepática "Y" y la GT, se incrementa el grado de conjugación de la Bb con el ácido glucurónico.

Este sistema, cuya actividad comienza perceptiblemente a partir del primer día de vida, se encuentra casi inactivo en la vida intrauterina.

Sin embargo, en los mamíferos este mecanismo se activa prematuramente ante una oferta también prematura de Bb, como ocurre por ejemplo, en la ictericia materna.

La Bb conjugada por esta vía corresponde a un 90% de la captada por el hígado, y el resto es conjugada con sulfato y otros aniones (5).

c.3 Excreción

El producto formado, hidrosoluble, es segregado por el hepatocito dentro de los sinusoides mediante el mecanismo usual: sistema vascular citoplasmático, aparato de Golgi y exocitosis.

Cuando este sistema falla, las vesículas de producto se acumulan en el citoplasma del hepatocito y el hígado adquiere

re un tinte amarillo-verdoso; microscópicamente el lobulillo hepático se ve invadido de depósitos característicos, conocidos como gránulos de lipofuscina (5).

c.3.1 Excreción extrahepática

Conjugada y excretada dentro de los sinusoides, la Bb se encuentra en forma de complejo macromolecular de composición no definida y naturaleza coloidal, solubilizada en la bilis junto con sales biliares, fosfolípidos, y colesterol.

El contenido biliar es descargado en el duodeno por medio de las vías biliares extrahepáticas, donde la flora bacteriana intestinal reduce la Bb conjugada a urobilinógeno, el cual se excreta finalmente como urobilinógeno fecal.

Parte del urobilinógeno se reabsorbe en el intestino y pasa a la circulación, de la cual es depurado por medio del riñón y excretado en la orina como urobilina urinaria. Figura No. 2

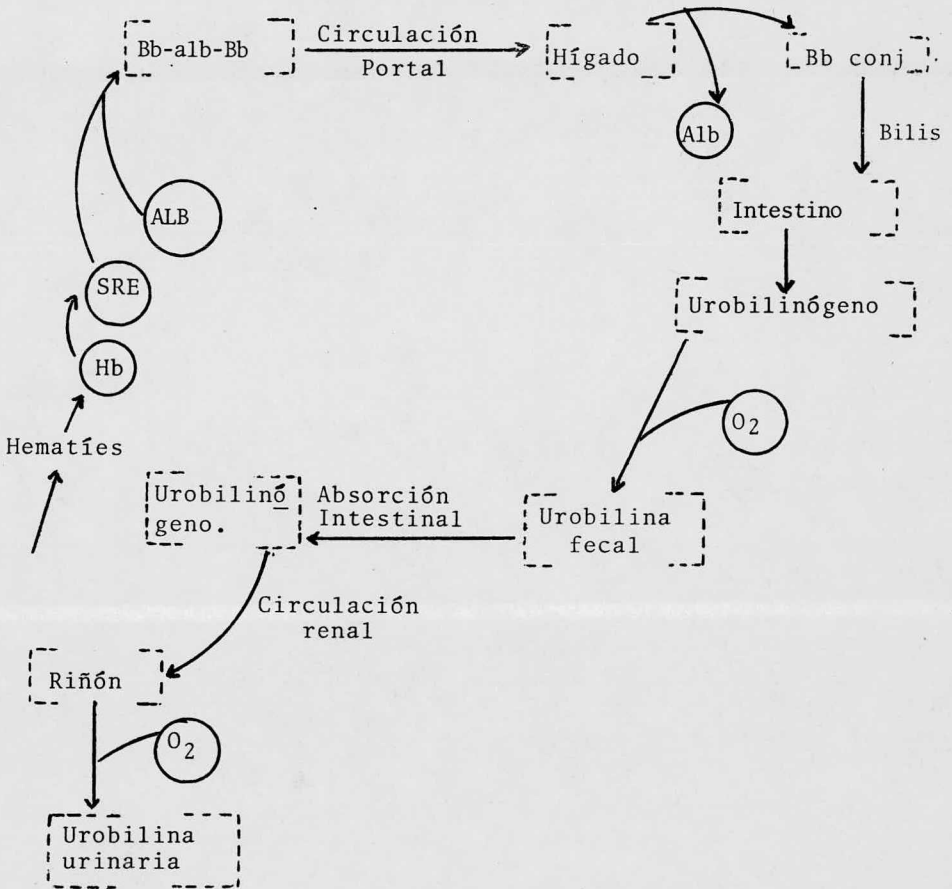


Figura No. 2.- Metabolismo normal de la Bilirrubina.

B) METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA EN EL RECIEN NACIDO.

Presenta una variante respecto a lo anteriormente expresado por la esterilidad del intestino neonatal y su mayor-actividad beta-glucuronidásica, por lo que en lugar de urubilinógeno se obtiene Bb libre por hidrólisis del diglucurónido y, dada la liposolubilidad de aquella, se reabsorbe en el in--testino y regresa al hígado por medio de la circulación por--tal.

Se cierra así un circuito conocido como "recircula--ción enterohepática", que disminuye la eficiencia en la excre--ción del pigmento ⁽⁵⁾. Figura No. 3.

Una porción menor de la Bb escapa a la reabsorción,--se oxida al aire y se elimina como biliverdina en las heces --neonatales, dándoles a éstas su color verdoso característico (6).

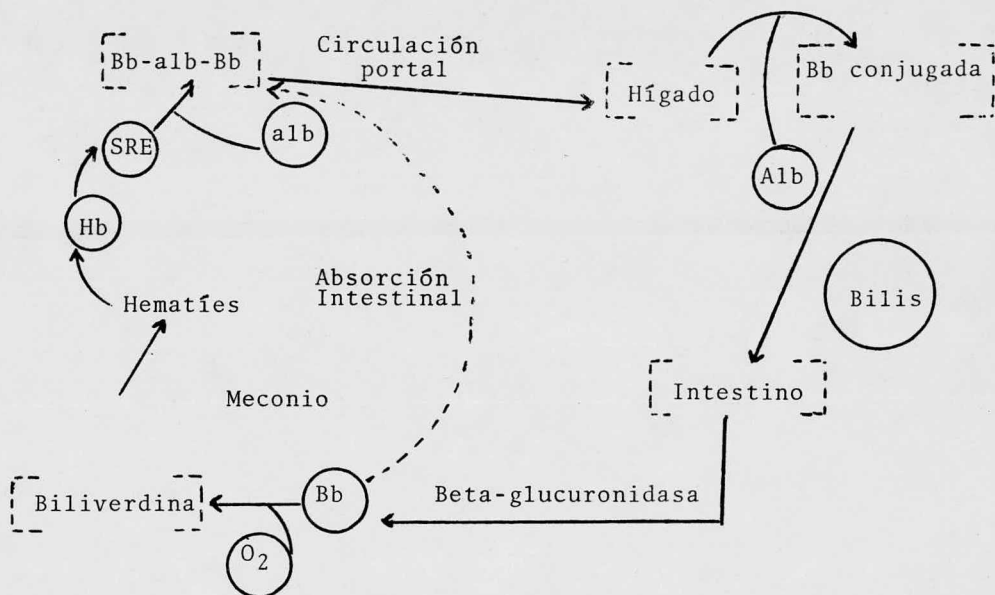


Figura No. 3.- Metabolismo de la Bilirrubina en el recién nacido.

C) METABOLISMO FETAL DE LA BILIRRUBINA.

El sistema de conjugación fetal casi no posee actividad en la vida intrauterina, pero puede activarse ante una oferta anormal de Bb, ya sea por ictericia materna o por hemólisis propia acelerada (incompatibilidad ABO y Rh).

Por lo tanto, hay dos formas de excreción del exceso de Bb: 1) La circulación placentaria puede captar Bb fetal - debido a su mayor concentración de albúmina, proceso poco eficiente por que requiere mucha energía. 2) La excreción fetal hacia el líquido amniótico. De aquí la utilidad de la amnio-

centesis en los casos de incompatibilidad de Rh y ABO, particularmente la de Rh, pues la ictericia del líquido amniótico da una medida bastante exacta del estado de gravedad de la --afección (5).

La presencia de ambos tipos de Bb (libre y conjugada) sugiere no sólo que existe excreción del pigmento por el hígado, sino que es también un reflejo de la capacidad hepática de conjugación. Figura No. 4

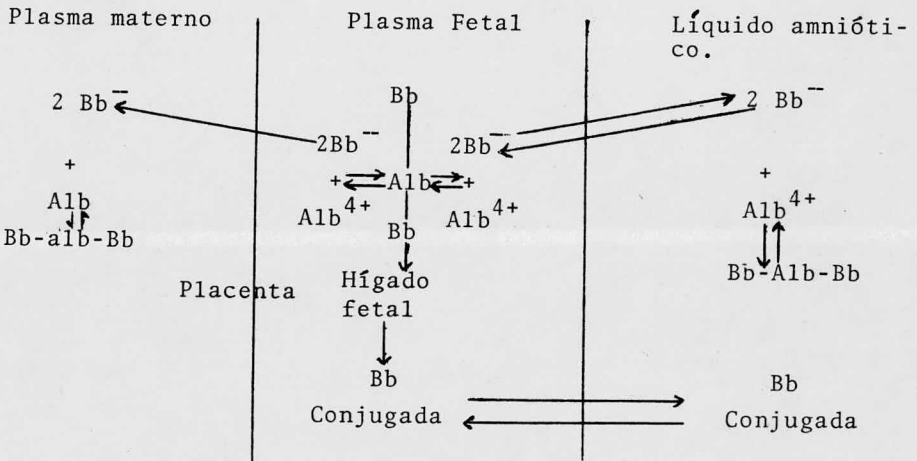
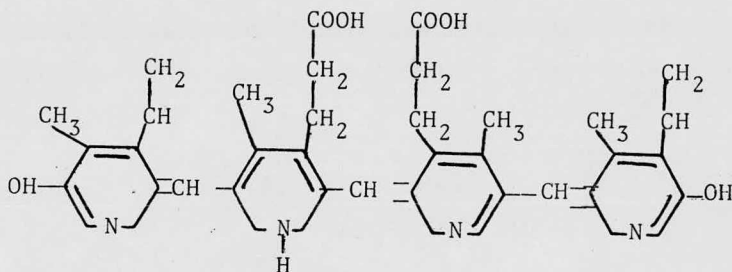


Figura No. 4. Metabolismo Fetal de la Bilirrubina.

D) PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA BILIRRUBINA.

Molécula de bilirrubina



La Bb posee una cadena tetrapirrólica abierta, con varios dobles enlaces conjugados que explican su hidrofobicidad y su caracter cromógeno. En condiciones fisiológicas (pH = 7.4 y 300 mOsm) y en ausencia de proteínas, se disuelven 6.10^{-5} g/litro de Bb; en presencia de ellas la solubilidad es de alrededor de 0.1 g/litro.

Sin embargo, los datos obtenidos son bastantes contradictorios dada la tendencia de la Bb a formar soluciones sobresaturadas y a la disparidad de los procedimientos empleados.

La solubilidad de la Bb aumenta en presencia de álcalis, pues es un ácido débil. También es soluble en cloroformo y éter, pero poco soluble en metanol. Además, puede disociarse o disolverse en soluciones acuosas de urea, benzoato de sodio + cafeína, ⁽¹⁰⁾ acetamida etc.

Posee también propiedades espectrofotométricas, con un máximo de absorción a 453 nm en cloroformo, con una absortividad molar de 60 100. En solución acuosa alcalina presenta un pico de absorción entre 420 y 440 nm, que sufre un desplazamiento hacia 460 nm en presencia de seroalbúmina humana (2).

La diferencia de las densidades ópticas entre Bb conjugada y Bb libre se interpreta como la cantidad de Bb desplazada de la albúmina. Los aniones orgánicos como el salicilato de sodio, oleato de sodio, ácido sulfanílico, sulfisoxazole y fenolsulfoftaleína producen este desplazamiento de la Bb, pero el mejor en este aspecto es el salicilato de sodio.

La naturaleza del complejo Bb-Alb se ha discutido ampliamente y, por la ecuación de la ley de acción de masas, -- existen acuerdos generales sobre los siguientes puntos:

El complejo posee, a pH fisiológico e in vitro, dos moles de Bb por mol de albúmina.

La unión sería de tipo electrostático, uniéndose los carboxilos de la Bb a los grupos amino libres de la albúmina.- Esto explicaría su pH dependencia.

La formación de este complejo, o su disociación, si-

que la ley de acción de masas. Figura No. 5

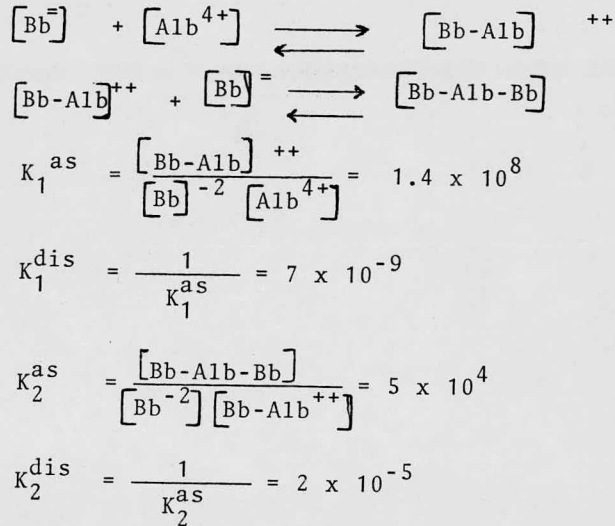


Figura No. 5. Disociación del Complejo Bb-Alb (Ley de Acción de masas).

En soluciones acuosas la Bb se oxida fácilmente a bi liverdina, más rápidamente la conjugada que la libre, aunque ésta lo hace fácilmente en medio alcalino y en presencia de trazas de metales bivalentes; esta oxidación puede evitarse con ácido ascórbico, EDTA y albúmina humana.

Por debajo de pH = 7.8, la solubilidad de la Bb libre, así como su unión a la proteína, se reducen (11).

La Bb no unida es un anión orgánico débil que migra en un campo eléctrico en forma diferente a la Bb unida ⁽⁹⁾.

Trevin y Cols ⁽¹²⁾ efectuaron estudios de la acción del ditiotreitól en soluciones de Bb, encontrando que este -- producto protege a la Bb de la oxidación por lo menos durante 6 días.

Además, el ditiotreitól no modifica la unión de la albúmina con la Bb en concentraciones de 194 mmol/litro, pero sí la formación de azobilirrubina.

El mismo Trevin y Cols ⁽¹³⁾ efectuaron un estudio sobre la acción que pueden tener los diferentes anticoagulantes en caso de emplearse para la determinación de la Bb.

Con las sales de sodio del anticoagulante probado, la formación de la azobilirrubina fué igual a la producida en suero.

La cinética fué independiente de la clase de acelerador; en cambio, con la sal de potasio de todos los anticoagulantes probados, especialmente con EDTA, se observó una cinética de diazoreacción más baja. El máximo fué alcanzado después de 16 minutos y el efecto fué dependiente de la concentración de potasio. Se ha observado el mismo efecto con el -

amortiguador de fosfato de potasio, por lo que deben usarse, - en el caso de emplear algun anticoagulante, aquellos que contengan sales de sodio.

Neesby y Cols (7) determinaron que en una muestra -- tratada por fototerapia la Bb determinada en forma fotométrica puede declinar más que la determinada químicamente a tanto como .3 mg/l.

E) TOXICIDAD DE LA BILIRRUBINA.

La Bb no conjugada posee efectos tóxicos manifestándose como inhibidor de la fosforilación oxidativa y, por lo - tanto, de la respiración celular (5).

Estructuras biológicas como los mitocondrias captan in vitro Bb libre (14), con evidente alteración estructural - caracterizada por hinchazón y aumento de tamaño, hialinización de sus crestas y pérdida del contenido de su matriz lo - cual la incapacita para cumplir su función endocelular.

Los hechos experimentales inducen a creer que el mecanismo de acción tóxica se produce en dos etapas:

- a) A bajas concentraciones la Bb debe completar algún catión esencial para el control respiratorio (supuestamente Mg^{++}),

sito en la membrana mitocondrial, creando un complejo no disociado. El control de la respiración se pierde y su velocidad aumenta.

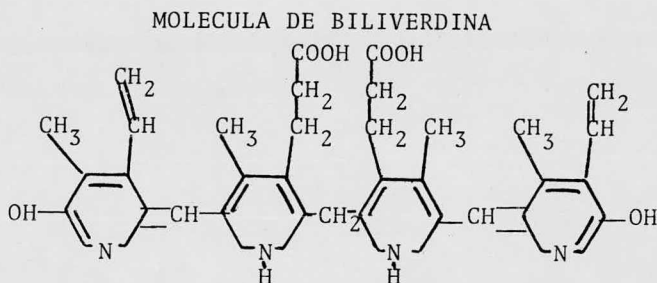
- b) A altas concentraciones la Bb, puede inhibir enzimas respiratorias unidas a la membrana mitocondrial, tales como la NADH-oxidasa, succinato-Oxidasa, citocromo C-oxidasa, etc.

Además, la liposolubilidad de la Bb favorece su fijación sobre la membrana y la fijación de Mg^{++} , que está involucrado en el control de la permeabilidad de la misma, distorsionando así la selectividad osmótica, con lo que se produce una absorción inespecífica de electrolitos, seguido de un transporte pasivo de agua al interior de la mitocondria (5).

El poder tóxico se pierde por oxidación, ya que, según se demostró, la biliverdina no es tóxica (10). En cambio, poseen efecto depresor sobre la respiración tisular la hematina y la mesobilirrubina.

La liposolubilidad de la Bb determina su distribución, ya que es captada preferentemente por los tejidos con abundante contenido lipídico, como el celular subcutáneo (causando la ictericia clínicamente visible) y el nervioso, cuyos oligodendrocitos y células de Schwann elaboran la mielina, -- fosfolípido que cumple importantes funciones de sostén, aisla

miento, y conducción del impulso nervioso (5).



Ya que la mielina determina la división del tejido nervioso en la sustancia gris y blanca, siendo la primera la que posee mayor abundancia de sustancia intercelular lipídica, se comprende que la Bb se fijará con preferencia sobre la sustancia gris.

Al afectar la Bb los núcleos grises del sistema nervioso central (SNC), se produce la enfermedad conocida como "kernicterus", caracterizada por daños neurológicos irreversibles de diversos matices de gravedad que, inclusive, pueden causar la muerte (2).

Athanassiadis proporciona como límites peligrosos y de alto riesgo de aparición de kernicterus, los niveles de Bb libre de 2.0-2.5 mg/l y Neesby de 20 nanomol/l ó 0.17 microgramos/l de Bb libre. La Bb directa no tiene importancia para la producción de éste padecimiento.

F) DIFUSIBILIDAD DE LA BILIRRUBINA.

La toxicidad de la Bb está condicionada a sus posibilidades de difundir fuera del espacio vascular.

Analizaremos ahora una serie de conceptos básicos para entender el problema. Son de uso común Bb total (BT), directa o conjugada (BD) e indirecta (BI), mal llamada libre, - clasificación basada en la diferente reactividad frente al -- ácido p-diazobencensulfónico (reacción de Van den Bergh).

Sabemos que la BD es el diglucurónido de Bb, hidrosoluble, transportada en el plasma por la albúmina y las alfa₂-globulinas (no es tóxica y, en caso de sobreproducción, puede ser eliminada fácilmente por el riñón y aparecer en la orina). Reacciona con el ácido p-diazobencensulfónico directamente en medio acuoso (15).

Se conocen como BI a todos los pigmentos que reaccionan con el ácido p-diazobencensulfónico en medio hidroalcohólico, comprendiendo así a la Bb no conjugada transportada por la albúmina plasmática, y la no conjugada y ni unida a la albúmina, es decir, realmente libre, potencialmente difusible, -- que estaría en forma iónica, con sus dos carboxilos no protonados (5).

Una comunicación reciente señala los valores de las constantes de asociación para los sitios activos de la albúmina (figura No. 5).

De los valores K_1 y K_2 pueden extraerse sus recíprocos, es decir, las constantes de disociación del complejo: que serían: $K_1 = 2 \times 10^5$ M para el primer locus, y $K_2 = 7 \times 10^{-9}$ M para el segundo, lo que demuestra la gran afinidad existente entre la Bb y la albúmina (5).

Estudios de este complejo mediante espectros de absorción señalan que la albúmina envuelve a la Bb, que se uniría mediante sus carboxilos a los restos básicos hidrofóbicos de lisina, histidina, arginina y tiroxina; evidencias de que estos grupos están envueltos en los sitios activos pueden obtenerse midiendo la pérdida de afinidad ante modificaciones químicas de los mismos.

Queremos insistir sobre la pH-dependencia del complejo, ya que es común que el recién nacido presente acidemias, ya sea de tipo metabólico o respiratorio. Eso explicaría la menor capacidad de transporte del suero neonatal frente al suero del adulto normal. Además, debe recordarse que el recién nacido prematuro presenta frecuentemente hipoproteinemia con hipoalbuminemia, que evoluciona de acuerdo a la alimentación.

G) LA BARRERA HEMATOENCEFALICA Y EL PASAJE DE BILIRRUBINA.

El concepto de barrera hematoencefálica, antes atribuido a los "pies chupadores" de los astrocitos, es ahora concebido de una manera funcional (5).

Se sabe actualmente que los capilares que irrigan el SNC presentan fenestraciones o perforaciones de pequeños tamaños, que dejarían pasar pequeñas moléculas pero no células ni macromoléculas, lo que podría explicar la formación de líquido intersticial a este nivel.

Adquiere así gran validez el modelo de Odell (11) -- (Figura No. 6), según el cual la Bb difusible existiría en -- equilibrio entre el plasma endovascular e intersticial, de -- acuerdo a las respectivas concentraciones de albúmina, y podría ser captada desde el plasma intersticial por alguna proteína endocelular citoplasmática que tuviera alta afinidad -- por ella.

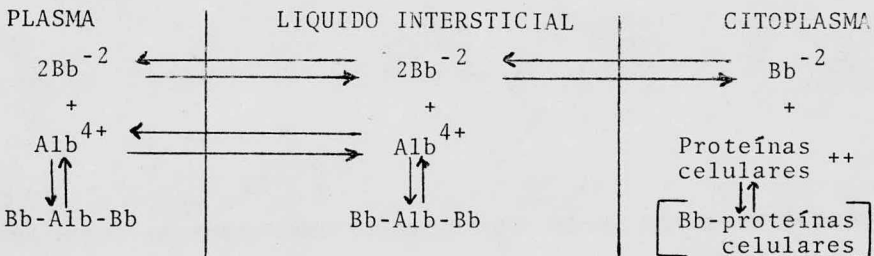


Figura No. 6. Modelo de Odell sobre difusión de la bilirrubina.

Los hechos experimentales de algunos autores afirman esta hipótesis y conducen a las siguientes conclusiones:

- En ratas Gunn (ratas Wistar con ictericia idiopática transmitida genéticamente por un gen recesivo) no se pudieron demostrar diferencias significativas de permeabilidad a la Bb entre animales adultos y recién nacidos. (Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se emplearon concentraciones séricas de Bb entre 3.0 y 5.0 mg/1, mucho más altas que las que normalmente se encuentran en una ictericia neonatal). Esto desafía el concepto de inmadurez neonatal de la barrera hematoencefálica.

- Se sabe que el desarrollo de la barrera hematoencefálica y hematocefalorraquídea (hem-LCR) guarda un estrecho paralelismo. De allí el uso que han hecho de la última los investigadores para establecer algunas conclusiones sobre pasaje de Bb al SNC. Se ha encontrado que la concentración de Bb en el líquido cefalorraquídeo (LCR) guarda una correlación directa con su concentración proteica, pero no con la Bb en el plasma. El hecho de que el LCR neonatal normal posea mayor concentración proteica que lo normal y que en presencia de daños neurológicos la concentración proteica del LCR aumente, ha servido de base, junto con otros experimentos, a fortificar la creencia en la inmadurez neonatal de la barrera hematoencefálica. Otra --

evidencia puede encontrarse en el paralelismo entre -
los proteinogramas del suero y el LCR de neonatos que
no posean enfermedades inflamatorias del SNC.

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO.

El material biológico utilizado en éste estudio estuvo constituido por 115 muestras divididas en dos grupos.

GRUPO #1.

48 muestras obtenidas por punción venosa de adultos del servicio de Gastroenterología del hospital general -- del Centro Médico la Raza del I M S S, sin problemas hemolíticos y con ictericia de origen hepático y posthepático.

GRUPO #2.

60 muestras obtenidas por punción capilar del talón de niños de entre 1 y 7 días de nacidos, internados en el servicio de Neonatología del mismo hospital, los cuales presentaban ictericia por incompatibilidad ABO y Rh.

Los sueros fueron separados por centrifugación dentro de la primera hora después de haber obtenido las muestras.

Las determinaciones se llevaron a cabo en un tiempo no mayor de una hora, protegiéndolas de la luz.

En todas las muestras se determinaron bilirrubinas - por el método de Malloy-Evelyn ⁽¹⁵⁾ y el desplazamiento de la - Bb por salicilatos empleando el método de Odell ⁽²⁾.

El objetivo de la determinación de las bilirrubinas, conjuntamente con la prueba del desplazamiento, fué tratar de correlacionar el desplazamiento con la cantidad de Bb libre - existente.

MATERIAL Y REACTIVOS.

1. Material común de laboratorio
2. Espectrofotómetro modelo PM2DL
3. Reloj marcador de tiempo
4. Centrifuga clínica.

1. Metanol absoluto, grado reactivo
2. Solución de ácido sulfanílico.- Disolver 100 mg de ácido sulfanílico en 1.5 ml de ácido clorhídrico y añadir agua hasta un volumen final de 100 ml.
3. Solución de nitrito de sodio.- Al 25% guardar en el refrigerador.
4. Nitrito de sodio al 0.5%. - Disolver la solución de nitri

to de sodio en una proporción de 1:50 con agua. Preparar justo antes de usar.

5. Diazo reactivo.- Mezclar 0.3 ml de nitrito de sodio al 0.5 % con 10 ml de ácido sulfanílico (solución de ácido sulfanílico) al instante antes de usar.
6. Solución de Diazo blanco.- Diluir 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado a 100 ml con agua.

EQUIPOS COMERCIALES EMPLEADOS.-

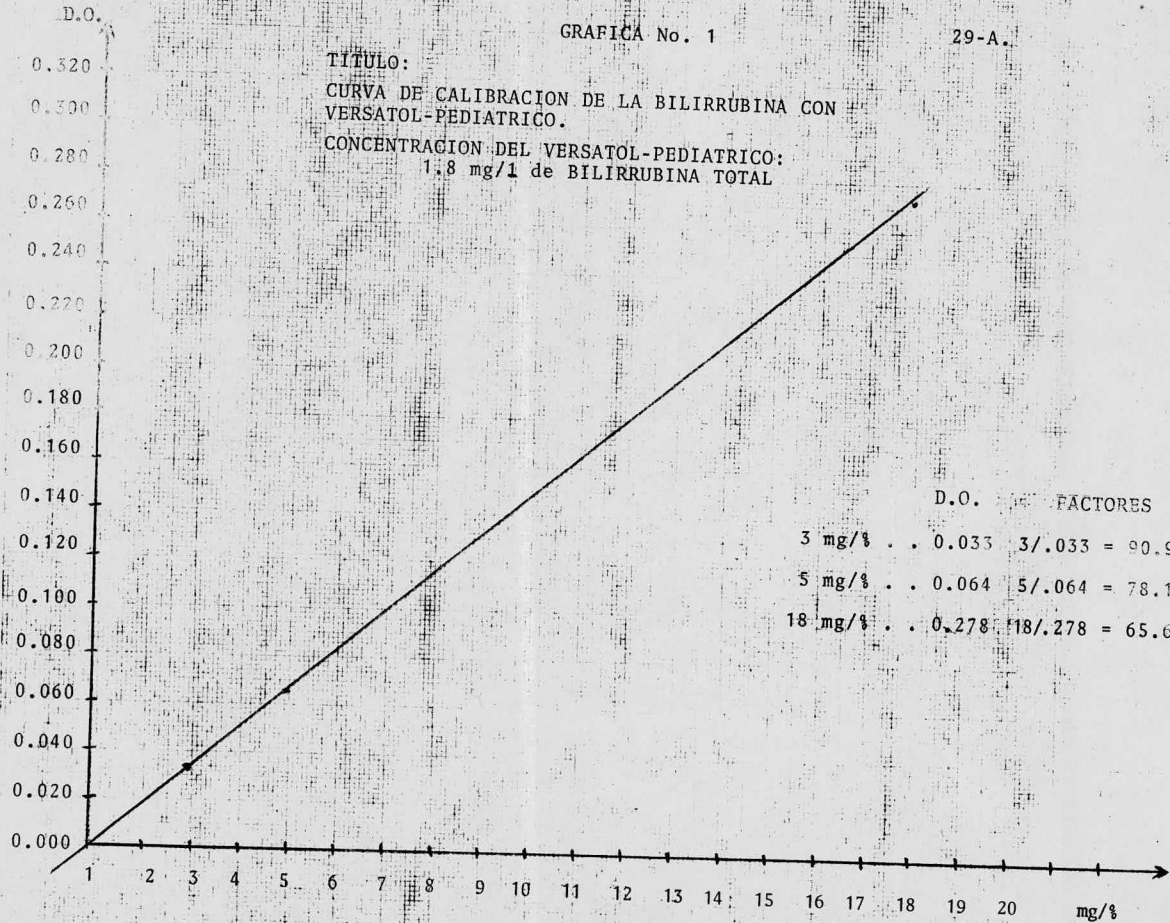
1. Versatol-Pediátrico de 1.8 mg/1 de Bb total.
Usado como control diario. Gráfica No. 1
2. Bilirrubina cristalizada marca Sigma
3. Albúmina humana cristalizada

A) Determinación de bilirrubina por el método de Malloy-Evelyn.

Fundamento.

La Bb copula con el sulfonato de p-bencendiazonio para formar azobilirrubina. La Bb directa se determina por medición fotométrica del color púrpura desarrollado después de la diazoación con el ácido sulfanílico en solución acuosa, y la Bb total después de agregar metanol ⁽¹⁵⁾. Fig. No. 7.

TITULO:
 CURVA DE CALIBRACION DE LA BILIRRUBINA CON
 VERSATOL-PEDIATRICO.
 CONCENTRACION DEL VERSATOL-PEDIATRICO:
 1.8 mg/1 de BILIRRUBINA TOTAL



PROCEDIMIENTO.

TUBO	Bb Directa		Bb Total	
	BD		BT	
	B	P	B	P
	1	2	3	4
AGUA DESTILADA	.4 ml	.4 ml	.4 ml	.4 ml
SUERO	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
DIAZO REACTIVO	-	.2 ml	-	.2 ml
DIAZO BLANCO	.2 ml	-	.2 ml	-
AGUA DESTILADA	.5 ml	.5 ml	-	-
METANOL	-	-	.5 ml	.5 ml

Esperar 15 minutos y leer a 550 nm
contra su blanco respectivo.

CALCULOS.

$$BT - BD = BI$$

Cálculo de la absortividad molar de la bilirrubina empleada.

Muestra pesada: 20 mg, disuelta en 100 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al .20%, en ausencia de la luz, usado a los 10 minutos.

Lectura a: 545 nm.

Lectura de la absorbencia: 0.208

CALCULOS. Absortividad = $A_{545} \times \frac{584}{0.00002 \times 100} \times 0.97$

Absortividad = 0.208 X 283 240

Absortividad = 58913

B) Determinación del desplazamiento de Bb por salicilatos.
Método de Gerard B. Odell (2).

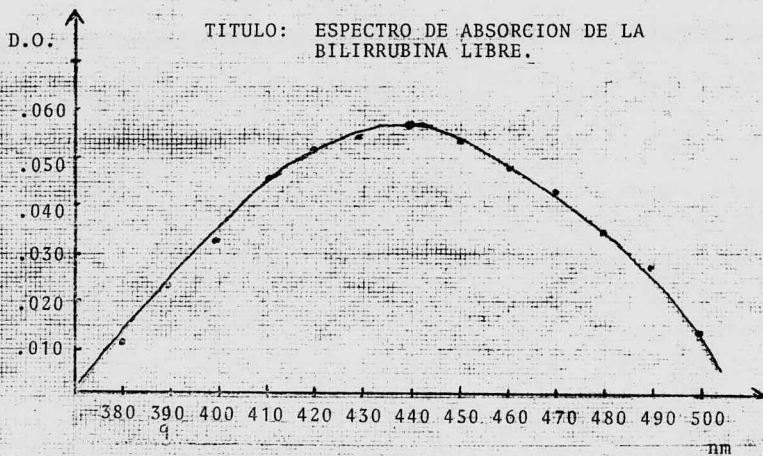
Fundamento.

El salicilato desplaza a la Bb unida previamente a la albúmina; la cantidad de Bb liberada por el salicilato es directamente proporcional al grado de saturación de la albúmina con la Bb.

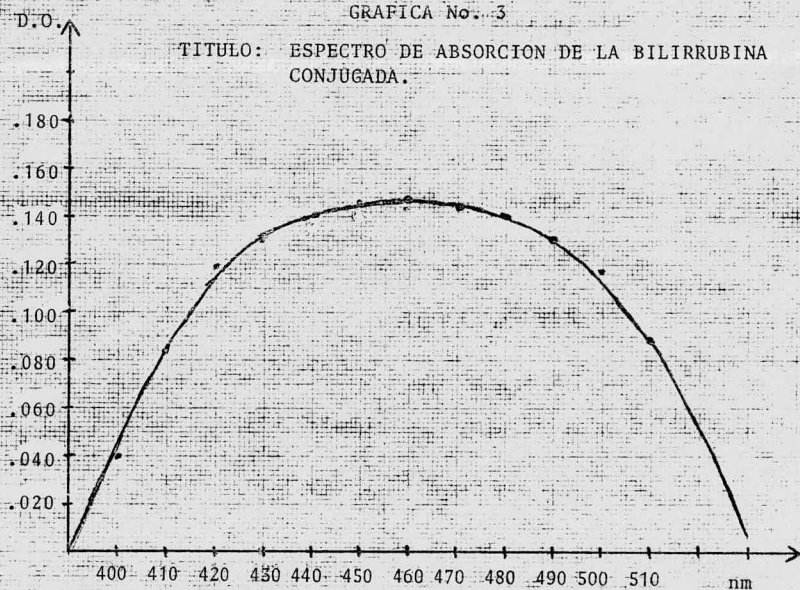
La técnica se basa en la diferencia de absorción espectral de la Bb libre y la Bb unida a la proteína en soluciones acuosas.

El pico de absorción máxima de Bb libre es de 440 nm mientras que el de la Bb unida a la albúmina es a 460 nm, como se muestra en las graficas 2 y 3.

GRAFICA No. 2



GRAFICA No. 3

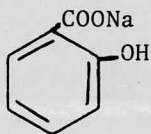
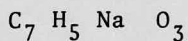


REACTIVOS.-

1. Amortiguador de fosfato 0.1 M, pH = 7.37
2. Solución de salicilato .7 M diluido con el mismo amortiguador. Gráfica No. 4

Características fisicoquímicas del salicilato de sodio (16).

FORMULA



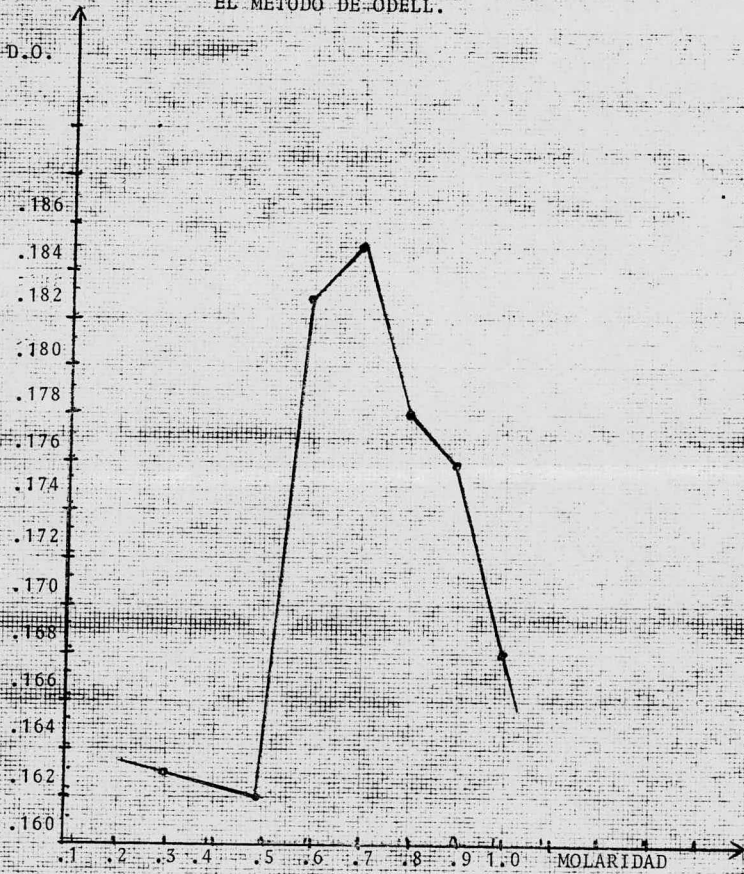
Acido salicílico 86.26 %. Es al menos 99.5 % puro

Protegerlo de la luz .

Peso molecular: 160.11

GRAFICA No. 4

TITULO: GRAFICA QUE DEMUESTRA LA CONCENTRACION MAXIMA DE SALICILATO DE SODIO USADA EN EL METODO DE ODELL.



CONCENTRACION DEL SALICILATO

PROCEDIMIENTO.

Microtécnica

	CONTROL	PROBLEMA
SUERO SIN DILUIR	20 μ l	20 μ l
AMORTIGUADOR	1 ml	1 ml
SOL: DE SALICILATO	-	50 μ l
AMORTIGUADOR	50 μ l	-

Mezclar por inversión suave .

Leer contra el blanco de agua destilada a 460 nm.

CALCULOS.

$$D.O. \text{ control} - D.O. \text{ problema} = \Delta D.O.$$

Δ D.O. equivale a la Bb desplazada de la albúmina.

$$I.S. = \frac{\Delta D.O.}{D.O. \text{ control}} \times 100$$

EJEMPLO.

$$D.O. \text{ control} = .153$$

$$D.O. \text{ problema} = .150$$

$$\Delta D.O. = 0.003$$

$$I.S. = \frac{0.003}{0.153} \times 100 = 1.96$$

$$I.S. = 1.96 \%$$

IV RESULTADOS

TABLA I

Primer grupo.- Constituido por sueros de 48 pacientes adultos sin problemas hemolíticos, con ictericia de origen hepático y posthepático.

Unidades dadas en mg/l

Muestra No.	BD	BT	BI	%de Saturación
1	.218	.318	.10	0.0
2	.176	.315	.139	0.0
3	.31	.57	.26	0.0
4	.080	.16	.080	0.0
5	.161	.214	.053	0.0
6	.115	.161	.046	0.0
7	.35	.49	.14	0.0
8	.35	.52	.17	0.0
9	.16	.24	.080	0.0
10	.22	.33	.11	0.0
11	.932	1.30	.368	0.24
12	.302	.466	.164	0.50
13	.336	.53	.194	0.50
14	.78	1.10	.32	0.52
15	.44	.67	.23	0.62
16	.236	.623	.387	0.96
17	.73	1.00	.27	1.0
18	.42	1.06	.640	1.0
19	.73	1.06	.33	1.0
20	.28	.40	.12	1.1
21	.90	1.59	.690	1.14
22	.62	.93	.31	1.15
23	1.50	2.54	1.04	1.26

CONTINUACION

Muestra No.	BD	BT	BI	%de Saturación
24	.491	.827	.336	1.30
25	.40	.73	.33	1.66
26	.464	.79	.326	1.70
27	.52	1.10	.58	1.70
28	.44	.81	.36	1.70
29	.73	1.27	.54	1.87
30	.41	.835	.425	2.25
31	.336	.932	.596	2.40
32	.82	1.463	.643	2.50
33	.96	1.38	.42	2.70
34	1.16	1.82	.66	2.90
35	.571	1.202	.631	3.00
36	.62	1.46	.84	3.10
37	.70	1.26	.667	3.12
38	1.27	2.26	.99	3.14
39	.713	1.55	.837	3.21
40	1.24	2.26	1.02	3.86
41	1.34	2.40	1.06	3.87
42	2.30	3.55	1.85	4.10
43	.557	1.50	.943	4.30
44	.73	1.70	.97	4.30
45	1.79	3.08	1.29	4.70
46	2.03	3.46	1.43	4.75
47	1.87	3.05	1.182	4.83
48	1.87	2.46	.69	5.10

TABLA II

Segundo grupo.- Constituido por sueros de 60 pacientes recién nacidos con problemas de incompatibilidad ABO y Rh.

Unidades dadas en mg/1

Muestra No.	BD	BT	BI	%de Saturación
1	.02	.18	.16	1.12
2	.06	.70	.64	1.30
3	.06	.38	.32	1.60
4	.06	.73	.67	1.61
5	.14	.36	.22	1.70
6	.060	.49	.430	1.90
7	.10	.55	.45	2.10
8	.06	.46	.40	2.10
9	.06	1.35	1.29	2.25
10	.06	.42	.36	2.40
11	.06	.93	.87	2.40
12	.04	1.10	1.06	2.50
13	.12	.48	.36	2.50
14	.08	.584	.504	2.52
15	.06	.564	.504	2.71
16	.06	.98	.92	2.80
17	.15	.81	.66	2.90
18	.06	.48	.42	3.20
19	.08	.70	.62	3.30
20	.08	.95	.87	3.40
21	.06	1.40	1.34	3.63
22	.10	1.06	.96	3.70
23	.09	.72	.63	3.77
24	.06	.735	.675	3.89
25	.06	.84	.78	3.97



CONTINUACION

Muestra No.	BD	BT	BI	%de Saturación
26	.16	1.14	.98	4.00
27	.06	.62	.56	4.00
28	.11	.89	.78	4.46
29	.086	1.00	.914	4.50
30	.10	1.15	1.05	4.59
31	.164	1.123	.95	4.60
32	.110	1.353	1.243	4.80
33	.08	1.70	1.62	4.90
34	.120	1.172	1.072	4.96
35	.109	1.122	1.013	4.99
36	.060	1.240	1.180	5.00
37	.040	.90	.86	5.10
38	.080	1.353	1.273	5.45
39	.107	1.156	1.049	5.60
40	.696	2.653	1.957	5.60
41	.076	1.037	.961	5.76
42	.12	1.60	1.48	6.20
43	.10	.84	.74	6.40
44	.14	1.20	1.06	6.90
45	.12	1.14	1.02	7.00
46	.060	1.36	1.30	7.00
47	.13	1.556	1.426	7.00
48	.080	2.10	2.020	7.26
49	.06	1.34	1.28	7.80
50	.050	1.00	.95	8.20
51	.09	1.95	1.86	8.80
52	.06	1.13	1.07	8.90
53	.06	1.14	1.08	9.00
54	.12	2.207	2.087	9.39
55	.08	2.12	2.04	9.75
56	.12	2.23	2.11	9.80
57	.08	1.86	1.78	10.00

CONTINUACION

Muestra No.	BD	BT	BI	%de Saturación
58	.12	3.30	3.18	11.20
59	.08	2.05	1.97	12.00
60	.12	2.68	2.560	13.80

DISCUSION

Odell y Cols.⁽²⁾ sugieren que el salicilato de sodio produce un mejor desplazamiento de la Bb unida a la albúmina. Al efectuar esta técnica, encontramos que la concentración reportada en la literatura de 25 mM de salicilato no fué suficiente para causar tal desplazamiento, por lo que se buscó la adecuada, encontrándose que era de 0.7 M, como se muestra en la gráfica No. 4.

Esta concentración elevada pudo requerirse por la presencia de impurezas o al envejecimiento del reactivo.

La curva espectral de la muestra de Bb que contenía el salicilato presentó un decremento en la densidad óptica a 460 nm.

Odell reporta que a 460 nm está el pico de absorción de la Bb conjugada (gráfica No. 3) y a 440 nm el de Bb libre (gráfica No. 2).

Conociendo la molaridad se procedió a determinar el porcentaje de saturación en las 108 muestras y, al mismo tiempo, se hizo la determinación de la BD, BT, calculandose por -

diferencia la BI. Se empleó la técnica de Malloy-Evelyn, que se adaptó a otras condiciones, usando como patron diario Versatol-Pediátrico (gráfica No. 1).

En los resultados obtenidos del 1er. grupo (tabla I), formado de 48 sueros de pacientes adultos con ictericia hepática y posthepática, observamos que valores altos de 3.55 - - mg/1 de BT (paciente No. 42), con una BI de 1.85 mg/1 presentaron un % de saturación de 4.1 y valores de BT de .57 mg/1 y BI .26 mg/1, (paciente No. 3) el índice de saturación fué "cerro".

En estos pacientes Odell utiliza una macrotécnica; - nosotros la utilizamos también y observamos que la cantidad de BT es menor y por lo tanto, el índice de saturación también.

Athanassiadis y Cols. ⁽⁹⁾ indican que otras moléculas proteicas captan también Bb, por lo que el adulto tiene - más posibilidad de conjugación y eliminación de ésta lo que - evitaria por elevada que fuese la BT, un kernicterus, lo que - está de acuerdo con nuestros resultados del 1er. grupo, cuyo - máximo índice de saturación fue de 5.1%.

Según Trivin y Cols; ⁽¹²⁾ la capacidad residual de - fijación de la Bb no se encuentra excedida. Podemos explicar

la disminución del índice de saturación, a pesar de la elevada cantidad de BT, por la presencia de las proteínas "Y" y -- proteínas "Z" más abundantes en el adulto que en el niño. En este grupo de adultos el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.85.

En el segundo grupo estudiado (tabla II), donde se presentan los datos de recién nacidos con problemas de incompatibilidad ABO y Rh, encontramos valores del porcentaje de saturación de 1.12% hasta 13.8% con cantidades variables de BI.

Odell encontró que en pacientes con problemas hemolíticos (niños) son, frecuentemente, menos efectivo en unir Bb con la albúmina. La razón por la que en este grupo los porcentos de saturación sean elevados es que según, Bennhold y Cols; ⁽⁸⁾ hay sustancias como la hematina, que se unen a la albúmina in vivo, que pueden alterar la estructura terciaria de la albúmina y, consecuentemente, la Bb unida a esta albúmina sería más susceptible de ser desplazada por aniones como el salicilato de sodio, por lo que se tendría un porcentaje de saturación más elevado y habría más Bb libre circulante, ocasionando en los pacientes el Kernicterus.

El coeficiente de correlación encontrado en nuestro grupo entre la BI y el % de saturación fue de 0.82, lo que no manifiesta un factor de seguridad en cuanto a que pudiera de-

terminarse tan sólo uno de los dos indicadores, es decir, BI-
o el % de saturación.

Sí admitimos que, de acuerdo a lo establecido por --
Odell en cuanto al % de saturación, el factor de seguridad de
que el recién nacido no presentará una encefalopatía tóxica -
por Bb tiene valores menores de 6.9 %, tendremos que concluir
que pacientes con valores sobre 7% hasta 14% deberán tratarse
con exsanguino-transfusión y sobrevigilancia por el peligro -
de dicha afección.

CONCLUSION

Por los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el que se trató de correlacionar la Bb libre con el % de saturación y en el cual se encontró una correlación de Pearson de 0.82 (grupo No. 2), concluimos que sí ésta correlación no es completamente satisfactoria, si se puede utilizar este % de saturación como una llamada de atención al médico tratante, como un índice de seguridad en aquellos niños que presentan incompatibilidad de grupo y Rh pudiendo aparecer el Kernicterus cuando dichos valores excedan de 7 %.

En este trabajo se propone dar un campo abierto al problema en cuestión, así como establecer otros estudios que complementen el factor de seguridad, tales como la capacidad residual de fijación de la bilirrubina ⁽⁷⁾ y la capacidad residual de fijación de la albúmina ⁽¹¹⁾.

RESUMEN

El aumento de la Bb en la corriente sanguínea se ha llamado hiperbilirrubinemia y cursa con ictericia.

La Bb se transporta unida a diferentes tipos de moléculas proteicas, especialmente: albúmina, alfa₁-globulinas, alfa₂-globulinas y beta₂-globulinas ⁽⁹⁾.

En el recién nacido la eliminación de la Bb es más tardía, que en el adulto debido al inicio del funcionamiento de muchos de sus sistemas enzimáticos hepáticos; por ésto, la hiperbilirrubinemia en el neonato puede ser más grave que en el adulto. En casos de ictericia hemolítica del recién nacido, sí ésta es elevada y sostenida produce alteraciones del SNC, llegando en ocasiones hasta el kernicterus cuyas secuelas son irreversibles ⁽⁵⁾.

La valoración de la cantidad de la Bb libre es importante, ya que, según se sabe, es la que ocasiona mayor toxicidad.

En el presente estudio se llevó a cabo la determina-

ción de bilirrubina por el método de Odell del desplazamiento de Bb por salicilatos en 48 casos con ictericia hepática y posthepática de pacientes adultos, y 60 casos con problemas de incompatibilidad ABO y Rh de recién nacidos.

En los 48 pacientes adultos el coeficiente de correlación encontrado entre la BI y el % de saturación fué de 0.85- en el grupo de 60 niños recién nacidos el coeficiente de correlación fué de 0.82.

Por lo que concluimos que la técnica de Odell es con fiable, rápida, económica y útil en los casos de hiperbilirru binemias.

BIBLIOGRAFIA

1. Pays. M. y Beljean, M. 1975. Application to the prevention of kernicterus by estimating the bilirubin-binding capacity of serum albumin. *Clinica Chimica Acta*. 59, 121-128.
2. Odell. G.B., Cohen, S.N. y Kelly, P.C. 1969. Studies in kernicterus II. The determination of the saturation of serum albumin with bilirubin. *The journal of Pediatrics*. 74, 214-230.
3. Wennberg. R.P., Rasmussen, L.F. y Ahlfords, Ch.E. 1977.- Displacement of bilirubin from human albumin by three diuretics. *The journal of Pediatrics*. 90, 647-650.
4. Shankaran. S. y Poland, R.L. 1977. The displacement of bilirubin from albumin by furosemide. *The journal of Pediatrics*. 90, 642-646.
5. Vernengo, M.L. y Neyro, G.G. (Rec.). 1977 Hiperbilirubinemia perinatal. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 11, 113-127.
6. Harper. H.A., Rodwell, V.W. y Mayes, P.A. 1978. *Manual de Química Fisiológica*. (6a. ed.) México D.F. El manual Moderno S.A.
7. Neesby. T.E. y Sobenes, J.R. 1978. Experiences with the Jacobsen and Wennberg method for estimating bilirubin

bin binding capacities of serum from neonates. (Trabajo leído en el X Congreso Internacional de Química Clínica, México D.F., febrero 1978).

8. Bennhold. H. y Ott, H. 1961. Handbuch der allgemeinen Pathologie. Vol 5, parte 1. Berlin : Letterer, E; and Roulet, F.
9. Athanassiadis. S., Chopra, D.R., Fisher, M.A. y McKenna, J. 1974. An electrophoretic method for detection of unbound bilirubin and reserve bilirubin binding capacity in serum of newborns. Journal Laboratory of Clinical Medicine. 83, 968-976.
10. Doumas. B.T., Perry, B.W., Sasse, E.A. y Straumfjord, -- J.V. 1973. Standardization in bilirubin assays: Evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. Clinical Chemistry. 19, 984-993.
11. Odell, G.B. 1959. The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. The journal of Pediatrics. 55, 268-279.
12. Trivin. F., Odièvre, M. y Lemonnier, A. 1977. Faster estimation of reserve bilirubin binding capacity of serum the neonate by thin-layer chromatography on sephadex. Clinical Chemistry. 23, 541-545.
13. Trivin. F.A. y Dallay, A.M. 1978. Effects of various anticoagulant on kinetic of diazoreaction of bilirubin. (Trabajo leído en el X Congreso Internacional de Química Clínica, México D.F., febrero 1978).
14. Odell, G.B. 1966. The distribution of bilirubin between-

albumin and mitochondria. The journal of Pediatrics.
68, 164-179.

15. Henry, R.J., Cannon, D.C. y Winkelman, J.W. 1974. Clinical Chemistry, Principles and Techniques. (2a. ed.)- Nueva York: Harper and Row.
16. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals and drugs. 1968. Rahway, N.J. Merck and Co; Inc.

TESIS

TESIS POR
COMPUTADORA
UNICO SISTEMA
EN MEXICO

MEDICINA 25 LOCAL 3

550-72-57

CIUDAD UNIVERSITARIA

MEXICO