

30  
2j.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**"DETERMINACION DE LAS DISTINTAS ESPECIES  
MOLECULARES DE BILIRRUBINA EN BILIS DE  
HUMANOS Y ROEDORES POR HPLC"**

**TESIS DE LICENCIATURA  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
MIGUEL ANGEL FLORES SANCHEZ**



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

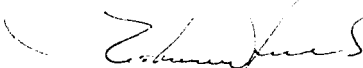
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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 asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>PROF. MENDOZA ARELLANO SILVIA</b>
<b>Vocal</b>	<b>PROF. PENICHE VILLALPANDO LAURA</b>
<b>Secretario</b>	<b>PROF. MENDEZ SANCHEZ NAHUM</b>
<b>1er. suplente</b>	<b>PROF. GARCIA OSUNA ADOLFO</b>
<b>2do. suplente</b>	<b>PROF. MORAN WHITE PATRICIA</b>

**Tema desarrollado en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.**



---

**ASESOR**  
**Dr. Nahum Méndez Sánchez**



---

**SUSTENTANTE**  
**Miguel Ángel Flores Sánchez**

## **AGRADECIMIENTO**

**Muy especial a mis padres:**

**a mi madre Elia, por infundirme ese mismo espíritu de lucha  
que le permite acompañarme en estos momentos.**

**a mi padre Miguel, por apoyarme durante toda mi vida y estudios.**

**A Julio César, simplemente por ser el mejor hermano  
que pudiera desear**

**A Carmen, mi segunda madre, por todo su cariño  
que ha atravesado el tiempo y la distancia**

**A Jorge, por brindarme su confianza y amistad  
durante tantos años**

**A todos mis amigos con los que he compartido  
tantos momentos agradables.**

**A la Universidad y todos los que la hacen posible.**

**Es propio del varón sabio, luego de haber  
dispuesto lo que está en su mano con toda la  
posible industria y diligencia, de mostrarse  
resignado con lo que se le diere la fortuna.**

**Juan Luis Vives.**

# INDICE

## 1 INTRODUCCION

1.1 Objetivos	1
1.2 Planteamiento del problema	1

## 2 GENERALIDADES

2.1 Metabolismo de la bilirrubina	
2.1.1 Propiedades químicas	2
2.1.2 Síntesis	3
2.1.3 Transporte plasmático	4
2.1.4 Captación hepática y transporte intracelular	5
2.1.5 Mecanismo de conjugación	6
2.1.6 Secreción al conducto biliar	8
2.1.7 Excreción biliar	9
2.1.8 Metabolismo intestinal y circulación enterohepática	10
2.1.9 Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina	10
2.2 Principios de cromatografía	
2.2.1 Tipos de cromatografía	14
2.2.2 Mecanismos de retención	15
2.2.3 HPLC	15
2.2.4 Componentes del equipo de HPLC	16
2.2.5 Fase móvil	19
2.2.6 Métodos en HPLC	20
2.2.7 Ventajas y limitaciones de HPLC	22
2.3 Métodos para la determinación de bilirrubina	22

<b>3. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS Y ANALISIS</b>	
5.1 Estandarización de las condiciones de operación	32
5.2 Linealidad del sistema	35
5.3 Precisión del sistema	42
5.4 Límite de cuantificación	45
5.5 Porcentaje de recobro	54
5.6 Especificidad	57
5.7 Análisis de muestras de bits de humanos y roedores	62
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUCCION.

### 1.1 OBJETIVOS.

#### Objetivo General

- **Implementar un método seguro y sensible para determinar las especies moleculares de bilirrubina en bilis por HPLC, para su empleo en investigación**

#### Objetivos Particulares

- **Estandarizar las condiciones de operación del método**
- **Demostrar la confiabilidad del método al establecer su linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad**
- **Evaluar el comportamiento del método con muestras de bilis de seres humanos y roedores.**

### 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años se ha incrementado el interés por la investigación del metabolismo de la bilirrubina, con el fin de obtener conocimientos que nos permitan una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en aquellos padecimientos propios del hígado o el tracto biliar donde sufre alteraciones, enfermedades congénitas (como el síndrome de Gilbert), formación de cálculos biliares, etc. Este es un campo donde nos falta mucho por saber.

En el Instituto Nacional de Nutrición también se realizan contribuciones al respecto, y durante el desarrollo de los estudios se ha hecho necesario contar con un método confiable para la determinación de bilirrubina y cada una de sus especies moleculares en la bilis.

Los métodos comúnmente empleados para la determinación clínica de bilirrubina en suero, permiten obtener una estimación rápida, pero no distinguen entre las especies moleculares, lo que imposibilita su uso para la determinación en bilis.

Por lo que se propone utilizar para su determinación un método por HPLC, debido a su sensibilidad y exactitud, que permite cuantificar cada especie molecular por separado.

Para obtener resultados de calidad, es necesario documentar y demostrar primero que este método es confiable y de verdad sirve para determinar y cuantificar lo que deseamos.



## 2. GENERALIDADES.

### 2.1 METABOLISMO DE LA BILIRRUBINA.

#### 2.1.1 Propiedades químicas.

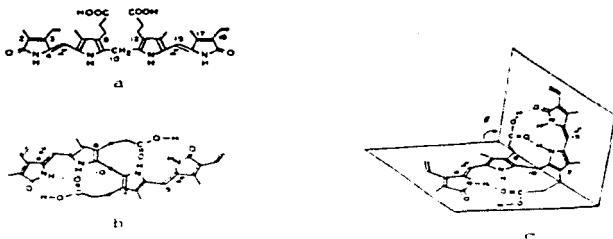
La bilirrubina es un tetrapirrol lineal, que consiste de dos dipirrometenonas asimétricas unidas por un puente metileno (10) Su fórmula condensada es  $C_{31}H_{46}N_4O_6$ , y su P.M. es 584.68 En forma cristalina se presenta como prismas romboides monoclinicos de color naranja claro o café-rojizo Se oscurece al calentamiento y no funde Presenta un máximo de absorción entre 451-453 nm, con un coeficiente de extinción molar de 60.700 L / Mol cm (16)

La bilirrubina y sus conjugados son muy lábiles sufren rápidamente de oxidación, descomposición fotoquímica e intercambio dipirrólico Además, los conjugados de bilirrubina pueden sufrir hidrólisis no enzimática y transferencia de la porción carbohidrato de la posición 1-O- a las posiciones 2-O- o 3-O- (14)

Es insoluble en agua, pero soluble en diclorometano, cloroformo y metanol Los mejores solventes son aquellos capaces de romper puentes de hidrógeno formamida, dimetilformamida y dimetilsulfóxido También es soluble en álcalis y ácidos (10)

La forma natural predominante in vivo es la bilirrubina IX $\alpha$ -Z,Z, que contiene dos grupos carbonilo en las posiciones 8 y 12, y cuyos dobles enlaces  $\Delta_{4,5}$  y  $\Delta_{15,16}$  poseen configuración Z,Z (fig 1a) La molécula es ligeramente asimétrica porque el grupo vinilo en el anillo A se encuentra en posición endo (C3), mientras que el vinilo en el anillo D se encuentra en posición exo (C18) En su forma diácida los dos grupos carboxilo forman puentes de hidrógeno intramoleculares con el oxígeno de la cetona y los dos nitrógenos del anillo dipirrometenona en la mitad opuesta de la molécula formando dos tríos de puentes de hidrógeno, plegando la estructura de la bilirrubina (fig. 1b,1c) (10)

Los valores de pKa de los dos grupos carboxílicos son muy afectados por el solvente empleado para la determinación Se han obtenido pKa de 4.3 a 5.3 para cada carboxilo en dimetilsulfóxido y de 6.2 a 6.5 en soluciones acuosas con ácidos biliares (10)



**Figura No. 1** a) estructura plana de la bilirubina b) estructura de la bilirubina con los puentes de hidrógeno c) estructura plegada

**Variaciones estructurales.** La bilirubina puede presentar isomería estructural por cambio en la posición de los grupos vinilo o carbonetil (10)

La isomería conformacional se puede presentar en uno o ambos puentes meteno, formando los isómeros Z,E, E,Z, y E,E (10)

Diferentes conformeros resultan de la rotación de los anillos pirrólicos alrededor del puente metileno central. Bajo casi todas las condiciones el anillo exo y endo de cada dipirrometenona es coplanar. Cuando se forman los enlaces intramoleculares las dos mitades planas dipirrometenona se encuentran en una conformación sin-sin con respecto al puente metileno central con un ángulo interplanar de  $100^\circ$  (fig. 1c) (10)

### **2.1.2 Síntesis.**

La bilirubina es producto de la degradación del grupo hem. El 70% de la bilirubina excretada proviene de la hemoglobina. El resto se produce a partir de diversas hemoproteínas presentes en las células de todo el cuerpo: mioglobina, catalasa, los citocromos microsomales P450 y b5, el citocromo mitocondrial b, ciclooxigenasa, guanilciclasa, peroxidasa, óxido nítrico sintetasa, etc (19). Con excepción del hígado la concentración de estas

hemoproteínas en los tejidos es tan baja o su recambio tan lento, que su contribución a la síntesis de bilirubina es prácticamente insignificante (4) Los órganos donde se sintetiza principalmente la bilirubina son el bazo, hígado, médula ósea y riñones (4)

El grupo hem es catabolizado con la participación de tres enzimas: la hemooxigenasa microsómica, la biliverdina reductasa y la NADPH-citocromo c P450 reductasa (19)

La hemooxigenasa microsómica cataliza la ruptura oxidativa del puente  $\alpha$ -meteno produciendo biliverdina IX $\alpha$  y liberando una molécula de monóxido de carbono que es eliminado, y un ión de hierro que es reutilizado. Esta reacción constituye el paso limitante en la síntesis de bilirubina (4)

La actividad de la hemooxigenasa es dependiente de oxígeno molecular y NADPH cuya oxidación es catalizada por el citocromo P450. También presenta inducción enzimática mediada por sustrato (4)

En la mayoría de los vertebrados no mamíferos la degradación del grupo hem termina con la formación de biliverdina, que es excretada en la bilis. En los mamíferos la biliverdina es reducida en el puente meteno central por la enzima citosólica biliverdina reductasa. La biliverdina reductasa es dependiente de NADPH y tiene preferencia estereoquímica por el isómero IX $\alpha$  de la biliverdina (4)

### 2.1.3 Transporte plasmático.

Se transporta en el plasma unida a la albúmina. Esta unión es reversible y se produce en un sitio de alta afinidad relativamente hidrofóbico (4)

La fracción de bilirubina circulando libre en plasma es muy baja, pero es muy importante, porque en esta forma puede atravesar la barrera hematoencefálica y causar daño en el sistema nervioso central (3)

Muchos compuestos pueden desplazar a la bilirubina unida a albúmina: ácidos grasos de cadena larga, algunas sulfonamidas (sulfafurozola), antibióticos (derivados de penicilina), agentes anti-inflamatorios y analgésicos no esteroideos (salicilatos, indometacina, fenilbutazona), aditivos de alimentos (parabenos), diuréticos (furosemida), y agentes para medio de contraste para colangiografía por rayos X (4)

La bilirrubina conjugada también puede ser transportada unida a la albúmina, aunque la afinidad de la unión es menor que para la bilirrubina no conjugada (4)

En pacientes con hiperbilirrubinemia conjugada severa se ha detectado una fracción de bilirrubina unida irreversiblemente a la albúmina. Esta fracción se denomina  $\delta$ -bilirrubina o biliproteína, y no puede ser eliminada libremente por el riñón como la bilirrubina conjugada (3)

#### 2.1.4 Captación hepática y transporte intracelular.

La bilirrubina es depurada del plasma por el hígado. Las proteínas plasmáticas llegan al espacio de Disse, en donde entran en contacto con el hepatocito (4)

Es aceptado que la bilirrubina se disocia de la albúmina antes de ser transportada al interior del hepatocito, pero aún no se sabe si el mecanismo se debe a un receptor localizado en la membrana o si es simplemente un mecanismo fisicoquímico (4)

Las investigaciones del transporte de la bilirrubina en el hígado han sido obstaculizadas por la inestabilidad y baja solubilidad del pigmento, por lo que muchos estudios se han desarrollado con aniones orgánicos que presentan propiedades de transporte similares (18)

Se han caracterizado al menos tres proteínas que son responsables del transporte de la bilirrubina al interior del hepatocito

La bilitranslocasa (BTL) es un monómero de 37 kD y un pI cercano a 9.0. Reconoce y transporta formas ionizadas de aniones orgánicos (ftaleínas) sin una compensación de carga, por lo que es electrogénica. La utilización de anticuerpos contra la BTL inhibe la captación de bromosulftoaleínas y bilirrubina pero no de ácidos biliares (3, 18)

La proteína fijadora de aniones orgánicos (OABP), con un peso molecular de 54-55 kD, transporta bilirrubina y bromosulftoaleína a bajas concentraciones. Su actividad transportadora es electroneutra y dependiente de iones cloruro. No se sabe si el efecto de iones cloruro es directamente sobre la OABP o si aumenta la liberación de bilirrubina de la albúmina al producir cambios conformacionales. Es muy probable que se dé un transporte inverso de iones hidroxilo (3, 18)

La proteína fijadora de bromosulfotaleína/bilirrubina (BBBP), con un peso molecular de 55 kD, es distinta de la OABP aunque está relacionada. Realiza un transporte electro-neutro cloruro independiente, que presenta gran afinidad a concentraciones altas de bilirrubina y bromosulfotaleína (3,18)

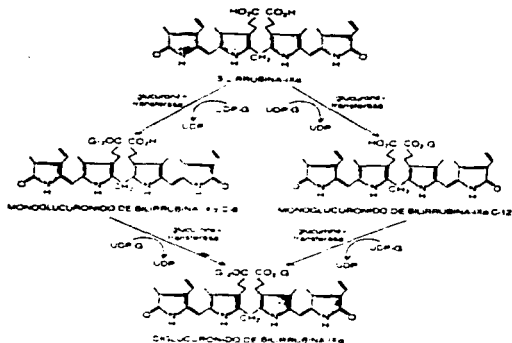
Una vez en el citoplasma, la bilirrubina se une a la proteína Y (ligandina) y la proteína Z (4). Se piensa que esta unión sirve para disminuir el reflujo de la bilirrubina hacia el plasma y la difusión inespecífica a distintos compartimentos celulares, aunque no participa directamente en el proceso de captación. La bilirrubina es transportada intracelularmente al retículo endoplásmico por las proteínas citosólicas. En casos de exceso de bilirrubina las proteínas citosólicas también pueden cumplir una función de almacenamiento. La bilirrubina también puede llegar al retículo endoplásmico aprovechando el contacto directo con membranas (4,3)

#### 2.1.5 Mecanismo de conjugación.

Antes de ser secretada en la bilis la bilirrubina debe ser conjugada con carbohidratos. La conjugación se realiza por la enzima UDP-glucuroniltransferasa (figura 2)

La esterificación de uno o ambos grupos carbonilo de la molécula de bilirrubina con ácido glucurónico u otro carbohidrato (glucosa y xilosa), da como resultado una molécula más polar e hidrosoluble, facilitando el transporte a través de la membrana canalicular (4). De esta manera se pueden formar una gran variedad de monoconjugados y diconjugados de un sólo carbohidrato o mixtos (glucosa-xilosa, glucurónico-glucosa, etc.), siendo los más importantes por su cantidad los glucurónidos. Por lo tanto en la bilis la bilirrubina se encuentra en una gran variedad de especies moleculares, ligeramente distintas entre sí

Las proporciones de los distintos conjugados en la bilis varía entre las distintas especies de mamíferos, confiriendo patrones distintos a cada especie. Los diconjugados predominan en la bilis de mono, perro, gato y caballo (13). En el hombre adulto se secreta un 65-85% de bilirrubina en forma de diconjugados, y el resto como monoconjugados (14). Los monoconjugados predominan en los roedores (ratón, hámster, cobayo) (13). En las ratas algunos autores indican que predominan los diconjugados (14), pero la controversia se debe a que la proporción de mono y diconjugados es prácticamente igual (14).



**Figura 2.** Mecanismo de conjugación de la bilirrubina.

Dada la estructura asimétrica de la bilirrubina, se pueden formar distintos isómeros de monoglucuronido (u otro), dependiendo si la esterificación se produce en C8 o C12 (figura 2) (4). La concentración de bilirrubina no afecta la formación del isómero C8 respecto a la del isómero C12 in vivo, lo que apoya la idea de que ambos isómeros se sintetizan en el mismo sitio de la enzima. Sin embargo la relación de formación diconjugados monoglucuronados decrece progresivamente con el incremento de la concentración de bilirrubina relativo a la concentración de enzima (4).

La UDP-glucuronil transferasa se encuentra en forma de múltiples isoenzimas, y sólo algunas de ellas catalizan la conjugación de la bilirrubina (4).

La bilirubina-GT (glucuroniltransferasa) es una enzima que se encuentra unida a membrana, por lo que su actividad es dependiente de la presencia de fosfolípidos (4). La acción de agentes permeabilizantes aumenta la actividad de la enzima, por lo que se han propuesto dos modelos para explicar cómo es regulada la actividad de la bilirubina-GT y las demás glucuroniltransferasas por el ambiente membranar

El modelo compartamental propone que la UDP-glucuroniltransferasa se sitúa en la región interna del retículo endoplásmico, por lo tanto, la acción de los agentes permeabilizantes aumentaría la actividad enzimática al facilitar el acceso del sustrato al interior (3)

El modelo de restricción conformacional postula que la glucuroniltransferasa en su forma nativa (estado membranar inalterado), se encuentra en estado de latencia debido a que los fosfolípidos a los que está asociada ejercen un efecto constructor. Al perturbarse o alterarse la membrana se altera el estado de construcción, produciéndose cambios conformacionales en la enzima, liberando el estado de latencia y aumentando la actividad catalítica (3) Ninguno de los dos modelos se ha aceptado como verdadero (3)

La actividad de la UDP-glucuroniltransferasa in vivo se ve disminuida por hipoxia, agentes anestésicos (éter), etanol y acetaminofén, que disminuyen los niveles de UDP- glucuronato hepático (4).

La actividad de la UDP-glucuroniltransferasa en el hígado fetal se encuentra reducida a un 1% de la actividad normal del adulto entre las 30-40 semanas de gestación. Después del nacimiento la actividad enzimática aumenta exponencialmente hasta alcanzar los niveles del adulto normal a las 14 semanas de edad (4)

En el sexo femenino la actividad de la bilirubina-GT es mayor que en sexo masculino. También se ha detectado actividad de la bilirubina-GT en corteza renal y mucosa gastrointestinal (4)

#### 2.1.6 Secreción al conducto biliar.

Los conjugados de bilirubina se secretan a los canalículos biliares por un proceso dependiente de energía (3)

Las proteínas ligantes citosólicas, como la ligandina, facilitan el transporte intracelular de los conjugados hacia los canaliculos (4)

El sistema de secreción de bilirrubina lo comparten otros aniones orgánicos (bromosulfotaleína, rosa de bengala, verde de indocianina, etc.) pero no los ácidos biliares (3)

Al parecer existe una sola proteína transportadora para todos estos compuestos. La cMOAT (canalicular MultiOrganic Anion Transporter) es una proteína integral de la membrana plasmática canalicular del hepatocito, y se piensa es la responsable de la secreción de los aniones orgánicos (3)

### 2.1.7 Excreción biliar.

Una vez secretados junto con la bilis los conjugados de bilirrubina se mantienen en solución en forma principalmente de micelas mixtas o agregados macromoleculares (4). La bilirrubina no conjugada se encuentra como monoanión en el pH fisiológico de la bilis (pH 6.0-8.0) agregándose a las micelas de sales biliares (14)

La cantidad de bilis producida por el hígado es de 800 a 1000 mL por día. La bilis pasa por el conducto biliar común y llega a la vesícula biliar donde es concentrada de 5 a 10 veces por un mecanismo de transporte acoplado de iones (sodio y bicarbonato) acompañado por difusión pasiva de agua fuera de la vesícula. Otra función de la vesícula biliar es almacenar la bilis hasta que es requerida para la digestión (7,9,8)

La bilis está compuesta en un 95% por agua. La composición de los solutos en porcentaje en peso es la siguiente:

Sales biliares	67%	Colesterol	4%
Fosfolípidos	22%	Bilirrubina	0.3%
Proteína	4.5%		

Durante la digestión, la vesícula biliar se contrae por influencia hormonal y nerviosa por acción de la colecistocinina y el nervio vago, expulsando hasta el 80% de su carga al duodeno (7,9,8)



### **2.1.8 Metabolismo intestinal y circulación enterohepática.**

Debido a su tamaño molecular y carácter polar, los conjugados de bilirrubina no pueden ser absorbidos por la mucosa biliar e intestinal (4)

Al llegar a la porción terminal del íleon y al colon son hidrolizados a bilirrubina no conjugada por acción de la  $\beta$ -glucuronidasa bacteriana (4). A diferencia de los conjugados, la bilirrubina no conjugada puede ser reabsorbida en el intestino delgado y colon (1)

La bilirrubina es reducida por acción bacteriana a una gran variedad de tetrapirroles incoloros denominados urobilinógenos (4)

Los urobilinógenos pueden sufrir también de circulación enterohepática, pero menos del 20% de la cantidad producida diariamente es reabsorbida, ya que se forma principalmente en el colon donde la absorción es baja. El 90% de los urobilinógenos absorbidos son excretados rápidamente en la bilis por el hígado, y la cantidad restante es excretada en la orina (4). Los urobilinógenos son muy inestables, y se oxidan fácilmente formando compuestos colorados llamados urobilinas.

Las urobilinas se forman por deshidrogenación del puente metileno central. Son muy hidrosolubles, y sólo ligeramente solubles en solventes no polares. La cantidad que se reabsorbe es muy baja (1)

### **2.1.9 Alteraciones del metabolismo de la bilirrubina.**

En individuos sanos la bilirrubina sérica se encuentra prácticamente toda en forma no conjugada. La concentración normal de bilirrubina sérica se encuentra entre 0.3-1.0 mg/dL (5-17  $\mu$ M) y varía dependiendo del método empleado para la cuantificación (4)

El signo clínico característico de los trastornos hiperbilirrubinémicos es la ictericia, que se hace aparente cuando la concentración sérica de bilirrubina alcanza o rebasa los 3 mg/dL (50  $\mu$ M). Se aprecia como una coloración amarilla de las escleras, mucosas y piel (4)

La hiperbilirrubinemia por sí sola raramente causa daño secundario a tejidos (encefalopatía, hemólisis, disfunción renal tubular), pero es la principal manifestación de una gran variedad de enfermedades heredadas o adquiridas en donde se altera el metabolismo de la

bilirrubina. Para su estudio estas alteraciones se dividen hiperbilirrubinemia conjugada y no conjugada (4)

#### Hiperbilirrubinemias no conjugadas.

##### - Hemólisis

En pacientes donde se presenta hemólisis o gran cantidad de hematomas, se produce una hiperbilirrubinemia de grado variable. La mayor complicación debido a la bilirrubina en episodios hemolíticos prolongados es la colelitiasis (4)

##### - Eritropoyesis ineficaz

El incremento en la destrucción temprana de eritrocitos por el sistema retículo endotelial también produce hiperbilirrubinemia. Esto se debe principalmente a desórdenes en la síntesis del grupo hem o la formación de los eritrocitos (esferocitosis hereditaria, deficiencia de piruvato cinasa, etc.) La eritropoyesis ineficaz también predispone a la colelitiasis (4)

##### - Ictencia fisiológica

Es una elevación transitoria de los niveles séricos de bilirrubina no conjugada a 6-8 mg/dL (103-137 $\mu$ M) durante la primera semana de vida. La causa de esta condición es multifactorial: cese abrupto de la depuración realizada por la placenta, incapacidad temporal para la captación, transporte intracelular y conjugación por parte del hígado, circulación entero-hepática persistente de bilirrubina (4). En casos severos, donde la bilirrubina llega a valores mayores a 25-27 mg/dL, existe el riesgo de que se produzca daño irreversible al cerebro (kernicterus) por depósito de bilirrubina en el tejido nervioso (18)

Ultimamente se ha valorado el empleo de metaloporfirinas sintéticas para prevenir los episodios de ictericia severa, inhibiendo la producción de bilirrubina a nivel de la hemooxigenasa (19). Las metaloporfirinas que más se han estudiado son las de estaño, zinc y cromo.

##### - Síndrome de Crigler-Najjar tipo I

Es un padecimiento congénito extremadamente raro y severo, frecuentemente mortal. Se hereda de forma autosómica recesiva. Se manifiesta durante los primeros tres días de

vida como una ictericia severa. Los niveles plasmáticos de bilirrubina por lo regular exceden los 20 mg/dL (340  $\mu$ M), variando entre 18-50 mg/dL (308-855  $\mu$ M) (4)

La bilis presenta un color amarillo limón, la excreción de bilirrubina se encuentra marcadamente reducida a menos de 4 mg/dL (< 68  $\mu$ M). La proporción de bilirrubina no conjugada se incrementa a un 30-57% de la cantidad total de pigmento excretada comparada con menos de un 1% encontrada en sujetos control. Sólo se llegan a encontrar trazas de monoglucurónido de bilirrubina (4)

El defecto metabólico primario se encuentra en la conjugación de bilirrubina. Los ensayos in vitro de biopsias de hígado muestran una ausencia completa de la formación de conjugados de bilirrubina (4)

- Síndrome de Crigler-Najjar tipo II

Es un padecimiento hereditario poco común cuyo único signo clínico es una ictericia asintomática. Se diagnostica en los primeros años de vida. Se hereda como un carácter autosómico dominante de penetrancia variable (4). Los niveles plasmáticos de bilirrubina se encuentran entre 6-25 mg/dL (103-428  $\mu$ M) (4)

La bilis contiene una cantidad considerable de bilirrubina, pero se encuentra principalmente en forma de monoconjugados, con sólo pequeñas cantidades de diconjugados y no conjugada. La velocidad de excreción de bilirrubina está reducida (4). El síndrome se debe a una deficiencia parcial de la actividad de UDP-glucuroniltransferasa (4)

- Síndrome de Gilbert

Es un padecimiento crónico benigno, caracterizado por una ictericia intermitente e hiperbilirrubinemia moderada en ausencia de daño hepático e hiperbilirrubinemia

Tiene una incidencia de 3-7% en la población, con una prevalencia en el sexo masculino de 4:1. La hiperbilirrubinemia se reconoce frecuentemente hasta la segunda o tercera década de vida. En un 30% de los pacientes la ictericia escleral es el único signo (4)

Por definición en el síndrome de Gilbert la hiperbilirrubinemia es menor a 6 mg/dL (103  $\mu$ M), pero la mayoría de los pacientes se encuentra por debajo de 3 mg/dL (50  $\mu$ M) (4).

La bilis presenta un color normal, con un incremento relativo de monoconjugados y una disminución de diconjugados (4) En la biopsia hepática la actividad de UDP-GT está siempre reducida ( 4)

#### Hiperbilirubinemias conjugadas

##### - Síndrome de Dubin-Johnson

Es un desorden congénito benigno poco frecuente, caracterizado por ictericia crónica o intermitente y una vasta pigmentación del hígado. Se hereda como un carácter autosómico recesivo (4)

La hiperbilirubinemia es de ligera a moderada y presenta fluctuaciones. En la mayoría de los pacientes es menor a 5 mg/dL (86  $\mu$ M). En promedio el 60% de la bilirubina total se encuentra conjugada. Se observa un patrón característico de mayor cantidad de diconjugados que monoconjugados. En el plasma también se encuentra  $\Delta$ -bilirubina (4)

El defecto primario del síndrome parece ser un transporte deficiente de aniones orgánicos a los canalículos biliares, probablemente debido a un defecto en el sistema de acarreo a nivel de la membrana (4)

##### - Síndrome de rotor

Es un desorden congénito benigno, muy raro, que se caracteriza por una ictericia crónica moderada fluctuante, que usualmente aparece antes de los 20 años. Se hereda en forma autosómica recesiva (4)

La hiperbilirubinemia se encuentra entre 2-5 mg/dL (34-86  $\mu$ M), con una mayor cantidad de conjugados (4). Tal parece que el defecto primario se encuentra en la captación o almacenaje hepático de aniones orgánicos (4)

## **2.2 PRINCIPIOS DE CROMATOGRAFIA.**

El término cromatografía comprende una familia de métodos de separación relacionados entre sí, donde la separación se logra por la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. Cada componente es retenido

selectivamente por la fase estacionaria, alcanzándose la separación por el distinto grado de retención de cada uno (6)

La cromatografía se puede emplear como un método cualitativo, cuantitativo y preparativo si el eluyente es monitoreado con un sistema apropiado de detección que responde a la masa o concentración de los componentes (15)

### 2.2.1 Tipos de cromatografía.

La cromatografía se divide en base a la forma física de las fases empleadas (fig 3) inicialmente en dos clases primarias, por el estado físico de la fase móvil cromatografía de gases y cromatografía de líquidos. Posteriormente por el estado físico de la fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida. La cromatografía líquida se divide además por la superficie en que se localiza la fase estacionaria, ya sea plana o en columna.

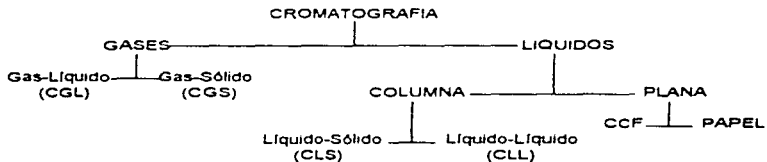


Figura 3 Tipos de cromatografía

Cada tipo de cromatografía tiene un área específica de aplicación.

La cromatografía gas-sólido (CGS) se usa exclusivamente para el análisis de gases estables: oxígeno, nitrógeno e hidrocarburos de bajo punto de ebullición.

La cromatografía gas-líquido (CGL) se usa para compuestos volátiles termoestables, cuya polaridad no sea muy elevada, como aceites esenciales, solventes clorados, ésteres de ácidos grasos, etc.

La cromatografía líquido-sólido tiene un gran campo de aplicación cubriendo un amplio intervalo de pesos moleculares y polaridades. Pero su utilidad para compuestos de elevado peso molecular, como las proteínas, es limitada.

La cromatografía líquido-líquido (CLL) se emplea para la separación de compuestos de origen biológico, idealmente aquellos que son lábiles (15).

### 2.2.2 Mecanismos de retención.

Cuando ambas fases son fluidas, la separación se da por reparto de los solutos entre ambas fases. Cuando la fase estacionaria es sólida la separación se debe a un mecanismo de adsorción de los solutos en su superficie (6).

Las interacciones moleculares entre los solutos y ambas fases pueden ser de cuatro tipos.

- **Interacciones iónicas.** Ocurren cuando las moléculas de soluto y la fase correspondiente poseen una carga neta permanente, es decir, existen como iones, produciéndose atracciones y repulsiones electrostáticas.
- **Interacciones Polares.** Resultan cuando participan moléculas neutras con una distribución asimétrica de cargas.
- **Interacciones Dispersantes.** Basadas en las fuerzas de dispersión de London, caracterizadas por las interacciones entre hidrocarburos, y que en cierta medida son función del volumen molecular.
- **Interacciones de Exclusión.** Resultan de la porosidad de la fase estacionaria. Dependen de las dimensiones de poros y moléculas de soluto. Las moléculas que pueden entrar por los poros son excluidas de las más grandes y son retenidas por más tiempo (15).

### 2.2.3 HPLC.

La cromatografía líquida se define como un método fisicoquímico de separación basado en la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases: una fase móvil líquida y una fase estacionaria que puede ser líquida o sólida (12).

A principios de los sesentas la cromatografía líquida enfrentaba dos problemas: primero, la falta de detectores con límites de detección tan bajos como los empleados en CG; segundo, la falta de columnas de alta eficiencia.

A mediados de los sesenta se introducen y desarrollan el detector de ultravioleta y el detector de índice de refracción. En 1968 Kirkland y Majors separadamente desarrollan técnicas para empacar en las columnas materiales con tamaño de partícula muy pequeño, lo cual incrementó apreciablemente la eficiencia de las columnas.

También es Kirkland quien introduce por primera vez el término High Performance Liquid Chromatography (HPLC) o cromatografía líquida de alta resolución para referirse a este sistema más avanzado, en donde, por el apoyo extraordinario de la tecnología se logran mejores condiciones de reproducibilidad y exactitud, comparables a las obtenidas en la cromatografía de gases (15.6).

#### 2.2.4 Componentes del equipo de HPLC.

Los componentes esenciales de un sistema HPLC son: reservorio, sistema de bombeo de alta presión, inyector, columna, detector y registrador. Partes opcionales son programadores de gradiente, controles de temperatura para columna, sistema recolector de fracciones, etc.

La separación se produce al bombear la fase móvil y los solutos a través de la columna. Cada compuesto que eluye de la columna es detectado, y la respuesta registrada en un cromatograma.

**RESERVORIO** Son los recipientes que contienen la fase móvil. Se fabrican de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes (12).

**SISTEMA DE BOMBEO** Al estar las columnas rellenas de materiales con tamaño de partícula muy pequeño ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo que el sistema de bombeo debe ejercer una gran presión (11).

Las características más importantes de un sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación
- Flujo continuo libre de pulsaciones
- Intervalo de flujo 0.5-10 mL/min
- Resistencia a líquidos corrosivos

-Reproducibilidad de flujo

-Facilidad para cambio de fase móvil.

-Constancia de flujo

-Facilidad de limpieza

Los tres tipos de bomba empleada y sus principales características se presentan a continuación (11)

Tabla 1. Tipos de bombas empleadas en HPLC

Bomba	Presión Máxima (PSI)	Ventajas	Desventajas
Recíproca	8820	Fácil mantenimiento Cambio fácil y rápido de fase móvil Flujo de volumen constante	Flujo en pulsos
Desplazamiento continuo	4998	Flujo uniforme y continuo	Costo elevado Tiempo de análisis limitado Dificultad para cambiar de fase móvil
Neumática	5880	Flujo libre de pulsaciones y presión constante	Capacidad limitada de volumen para bombear

**INYECTOR.** Es el medio por el cual se introduce la muestra al cromatógrafo. Debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser fácilmente barridas por la fase móvil.

En los inyectores se introduce la muestra con una microjeringa (puede ser de 25, 50 o 100  $\mu$ L). Por medio de una válvula manual se desvía el flujo mientras se aplica la muestra a la cámara de carga (loop), y luego se reanuda el flujo.

En la actualidad también se cuenta con inyectores automáticos, que poseen un control electrónico y tienen un alto grado de reproducibilidad (12,11).

**COLUMNA.** La columna es el corazón del sistema cromatográfico. Consta de un tubo de acero inoxidable de longitud variable (desde 5cm hasta 25cm o más), y un diámetro interno uniforme (de 3 a 4 mm por lo regular), capaz de resistir altas presiones, relleno con la fase estacionaria. El material de empaque tiene un tamaño de partícula de entre 3 y 10  $\mu$ m (12,11).



La fase estacionaria varía según el método cromatográfico empleado y los compuestos a separar. Las fases estacionarias más empleadas son la sílica ( $\text{SiO}_2$ ) y alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

Para lograr una mayor variedad química fase estacionaria se han elaborado fases químicamente unidas a partir de sílica. Las partículas de sílice poseen una cantidad de grupos silano ( $\text{Si-OH}$ ) en su superficie, los cuales son químicamente reactivos y se aprovechan como punto de partida para la fijación de radicales orgánicos ( $\text{Si-R}$ ) en la superficie del sílice (6).

Las fases estacionarias obtenidas de esta forma son:

#### FASES POLARES

Amino	$\text{Si-NH}_2$ (normalmente alquilpropil amina primaria)
Ciano	$\text{Si-CN}$ (alquilpropilnitrilo)
Glicol	$\text{Si-Diol}$

#### FASES NO POLARES

Octadecilsilano	$\text{Si-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$
Octilsilano	$\text{Si-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH}_3$
Trimetilsilano	$\text{Si-(CH}_3\text{)}_3$

#### FASES DE POLARIDAD INTERMEDIA

Fenil, fluoréter, alifenil

Las columnas de HPLC tienen una gran duración, a menos que se utilicen en condiciones intrínsecamente destructivas, como lo son uso de solventes extremadamente ácidos o alcalinos o inyecciones continuas de muestras biológicas crudas. Cuando una columna no se emplea se deben colocar tapones en sus extremos para evitar que se seque. Deben guardarse alejadas de fuentes de calor y vibración (12,11)

**DETECTOR:** Evalúa la composición de la fase móvil al salir de la columna durante todo el tiempo de análisis.

Un detector ideal debería reunir los siguientes requisitos:

- Alta sensibilidad.
- Respuesta a todos los componentes de la muestra.

- **Amplio intervalo de linealidad**
- **Respuesta no modificada por cambios en la velocidad de flujo o temperatura.**
- **Respuesta independiente de la fase móvil**
- **No destruir la muestra**
- **Respuesta rápida**
- **Bajo nivel de ruido**
- **Fácil operación y adquisición (12.11)**

Los detectores más empleados en HPLC son

- **Espectrofotómetro UV-Visible**
- **Detector de índice de refracción**
- **Detector de fluorescencia.**
- **Detector electroquímico**
- **Detector de arreglo de fotodiodos**
- **Detector conductimétrico (12.11)**

**REGISTRADORES** La señal transmitida por el detector es recibida por un registrador, el cual la transforma en una gráfica llamada cromatograma. También se usa un integrador que permite calcular el área bajo los picos gaussianos del cromatograma. Junto con el registrador e integrador se usa una gran variedad de graficadores, computadoras y paquetes para cromatografía para el procesamiento de datos, los cuales dependen de la marca y modelo particular del cromatógrafo (11)

### 2.2.5 Fase móvil.

Las características que debe reunir un solvente para emplearse como fase móvil son:

- **Alto grado de pureza (grado HPLC)**
- **No degradar la fase estacionaria**
- **Ser compatible con el detector empleado**
- **Disolver la muestra.**
- **Baja viscosidad**
- **Permitir fácil recuperación de la muestra**

- Estar comercialmente disponible a bajo precio
- Tener la polaridad necesaria para permitir la retención adecuada de la muestra en la columna (6,11)

Antes de emplear la fase móvil se debe filtrar por una membrana de por lo menos 2µm de porosidad para eliminar partículas. También se deben eliminar las burbujas de aire, esto se logra por sonicación aplicando vacío con un calentamiento ligero o desplazamiento con gases inertes como el helio (12)

Cuando se emplea una composición constante de la fase móvil para la separación de la muestra, se realiza una operación isocrática, cuando se cambia la composición durante el tiempo de análisis se realiza una elución por gradiente. La elución por gradiente se usa principalmente con mezclas cuyos componentes tienen polaridades distintas (6)

#### 2.2.6 Métodos en la cromatografía por HPLC:

CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL Se caracteriza por emplear una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar (12). Las muestras polares son más retenidas en la columna que las menos polares, primero eluyen los compuestos menos polares y al final los más polares (6,11)

Como fase estacionaria se emplean sílica, alúmina y fases químicamente unidas amino ciano, diol y nitró (6, 11). Como fase móvil se emplean principalmente heptano, hexano, ciclohexano, cloroformo, diclorometano y dioxano (11)

Su principal aplicación es para separar desde sustancias no iónicas apolares hasta compuestos débilmente polares (6)

CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA En este caso la fase estacionaria es de naturaleza apolar mientras que la fase móvil es polar (6). Eluyen primero los compuestos más polares y al final los menos polares

Como fase estacionaria se emplean fases químicamente unidas: trimetilsilano, octadecilsilano (C8), octadecilsilano (C18) fenilo, ciano, diol y polímeros hidrófobos (18). Como fase móvil se emplean principalmente metanol, acetonitrilo, agua y soluciones tampón (si es necesario con adición de THF o dioxano) (11)

Es muy útil en la separación de compuestos orgánicos con pequeñas diferencias en sus esqueletos de carbono o cadenas laterales (6)

**CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO** Se emplea una fase estacionaria que sea capaz de intercambiar iones con la fase móvil produciéndose un fenómeno reversible de retención por unión iónica. Como fase móvil se emplean sistemas acuosos tamponados. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será retenida por la fase estacionaria (11)

Como fase estacionaria se emplean resinas poliméricas, las cuales dependiendo de sus grupos ionizables, se clasifican en intercambiadores débiles o fuertes. Como intercambiadores catiónicos fuertes se emplean resinas con grupos ácidos sulfónico ( $R-SO_3H$ ), y como intercambiadores catiónicos débiles con grupos carboxílicos ( $R-COOH$ ). Las resinas de intercambio aniónico fuerte contienen como sitios activos grupos amino cuaternario ( $R-N^+R_4$ ), mientras que las de intercambio iónico débil tienen aminas terciarias ( $R-NH_2R_2$ ).

Se emplea para la separación de iones o compuestos ionizables: iones inorgánicos, ácidos orgánicos, bases orgánicas, proteínas y ácidos nucleicos (6,11)

**CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION** Aquí las moléculas se separan de acuerdo a su tamaño. Se emplea una fase estacionaria especialmente diseñada para contener canales rígidos o poros de aproximadamente el mismo diámetro. Las moléculas menores son retenidas al pasar por los poros, mientras que las mayores permanecen en la fase móvil y eluyen primero. Como fase estacionaria se emplean sílica, sílica modificada, polímeros orgánicos y carbohidratos poliméricos.

Como fase móvil se emplean tanto solventes acuosos como orgánicos dependiendo de la solubilidad de los compuestos a probar.

Se emplea para separar moléculas de alto peso molecular (biopolímeros y polímeros sintéticos), determinación de reparto de pesos moleculares y peso molecular medio de polímeros, etc. (6, 11)

### 2.2.7 Ventajas y limitaciones del HPLC.

Es la elección lógica para materiales termolábiles o no volátiles, complementando a la cromatografía de gases. Sobre la tradicional cromatografía líquida ofrece las siguientes ventajas

- Rapidez, alta resolución y elevada sensibilidad
- Columnas reutilizables
- Ideal para moléculas grandes y especies iónicas
- Fácil recuperación de muestra

Sus limitaciones son

- No existe un detector universal y sensible
- Elevado costo de operación
- Experiencia indispensable en su manejo e implementación

### **2.3 METODOS PARA DETERMINACIÓN DE BILIRRUBINA.**

En la clínica la determinación de rutina de bilirrubina en suero se realiza comúnmente por espectrofotometría directa o por la diazoreacción

En la espectrofotometría directa se aprovecha que la bilirrubina unida a la albúmina absorbe radiación a 460nm. Es un método rápido para obtener la estimación de la bilirrubina total, pero es interferido por hemólisis y lipemia (4)

La diazoreacción se basa en la formación de azopigmentos por la reacción de bilirrubina con sales de diazonio de aminas aromáticas (p.e. ácido sulfanílico) y la posterior determinación espectrofotométrica de éstos. Los conjugados reaccionan inmediatamente con el ac. sulfanílico diazoado (bilirrubina directa), mientras que la bilirrubina no conjugada reacciona muy lentamente, por lo que se añade un solvente para acelerar la reacción (bilirrubina indirecta). Los aceleradores más empleados son el metanol, etanol y benzoato de cafeína. La sensibilidad del método se reduce porque se requiere diluir el plasma para evitar la precipitación de proteínas, y es interferido por hemólisis y lipemia (4). La estimación de conjugados es menos exacta que la de bilirrubina no conjugada. Sin embargo la estimación obtenida es suficiente para propósitos clínicos (4)

Se han propuesto modificaciones al método que emplean p-yodoanilina o eblantranilato diazoado en lugar de ácido sulfanílico. Los pigmentos obtenidos pueden extraerse en solventes orgánicos, separarse y cuantificarse por cromatografía o espectrofotometría. Son más sensibles que la reacción clásica y permiten el análisis individual de los conjugados. No se han adoptado para el análisis de rutina (4).

Con la divulgación de los métodos de HPLC, se han desarrollado métodos para la cuantificación de bilirubina y sus conjugados en suero.

Un método muy sensible y preciso es el desarrollado por Blanckaert en el cual se realiza una transesterificación alcalina en metanol seguida de una extracción en cloroformo y la posterior separación y cuantificación de los metil ésteres por HPLC (4).

Con este método se han analizado muestras de pacientes y se ha comparado con la diazoreacción. Los valores de bilirubina total y conjugada son mayores determinados por la diazoreacción (aprox. el doble), existiendo una correlación lineal entre ambos métodos. Esto refleja la posible presencia de compuestos diazopositivos en el suero (5,4). La diazoreacción es inexacta para determinar conjugados a concentraciones menores a  $60\mu\text{M}$  (5).

Con este método se ha determinado que en sujetos sanos y pacientes con síndrome de Gilbert la cantidad de conjugados en suero es prácticamente indetectable. En una comparación hecha con sujetos sanos y pacientes con síndrome de Gilbert por el método de diazoreacción se encontró una proporción de bilirubina directa del 65%, ilustrando la limitada capacidad de la diazoreacción para determinar bilirubina conjugada a concentraciones bajas de bilirubina total (4).

También se han descrito métodos de HPLC para cuantificación en bilis.

El método descrito por Spivak y Carey (13) emplea como eluyentes un amortiguador de acetato de amonio pH 4.5 en un gradiente lineal 60-100% con metanol en una columna C-18 y un flujo de 1.0 mL/min. En este trabajo se lograron separar y cuantificar los distintos conjugados de bilirubina rápidamente (25 minutos). La muestra no requería tratamiento previo.

Posteriormente se hicieron modificaciones al método por Spivak y Yuey (14), haciéndolo más eficiente logrando la separación y cuantificación en 12 minutos. Se demostró que el método funciona en determinaciones en bilis de seres humanos. También se demostró que las curvas de calibración de bilirrubina no conjugada, monoglucurónido de bilirrubina y diglucurónido de bilirrubina son tan similares que se puede usar sólo una de ellas como referencia para la cuantificación. Este método es el que se emplea en el presente trabajo.

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se implementó el método descrito por Spivak y Yuey (14), el cual parece ser efectivo pero que carece de información acerca de su confiabilidad

#### Estandarización de las condiciones de operación

Se probaron las condiciones inyectando al menos cinco muestras de un estándar de bilirubina no conjugada, hasta obtener una línea basal estable y un tiempo de retención reproducibles para el pico del estándar

#### Linealidad del sistema

Se realizó construyendo por triplicado una curva de calibración de bilirubina no conjugada con cinco concentraciones distintas preparadas a partir de una misma solución patrón. Se determinó el coeficiente de correlación de la curva y el factor de respuesta considerando la concentración de los estándares y el área integrada

#### Precisión del sistema

Se analizó por sextuplicado una misma solución estándar de bilirubina no conjugada, cuya concentración se encontrara dentro del intervalo lineal del sistema. Se obtuvo el coeficiente de variación del área bajo cada pico

#### Límite de cuantificación

Se construyó por triplicado una curva de calibración de bilirubina no conjugada, con seis distintas concentraciones bajas preparadas a partir de una misma solución patrón. Se observó si el comportamiento lineal se conservaba a tan bajas concentraciones. También se observó si aun se podía cuantificar la concentración mas baja empleada, y en base al coeficiente señal/ruido del sistema (S/N), si se podía distinguir perfectamente o no como un pico

#### Porcentaje de recobro

Se determinó por sextuplicado una muestra de bilis humana, reforzada con una cantidad conocida de estándar de bilirubina no conjugada. Se calculó el porcentaje de recobro y coeficiente de variación



#### Especificidad.

Primero se degradó la bilirrubina presente en una muestra de bilis de hámster, someténdola a congelación por cuatro días, expuesta a la luz y aire. La muestra degradada se reforzó con una cantidad conocida de estándar de bilirrubina no conjugada, analizándose por sextuplicado. Se determinó el porcentaje de recobro y coeficiente de variación.

#### Análisis de muestras de bilis de humanos y roedores.

Se analizaron con el método muestras frescas de bilis obtenida de cuatro pacientes humanos, doce hámsters y doce ratas. Se midió la concentración total de bilirrubina, así como la fracción de bilirrubina no conjugada, monoconjugada y diconjugada presentes, comparándose con lo esperado según la bibliografía.

#### 4. MATERIAL Y METODOS.

##### Material:

- Pipetas volumétricas de 1,2,3,5,10 mL
- Matraces volumétricos de 1L
- Vasos de pp 1L
- Pipetas Pasteur c/ bombilla
- Vasos pp 50 mL
- Matraces Kitasato 500mL
- Piseta
- Propipeta
- Pipeta graduada 10mL
- Matraces volumétricos 5 ,10 50 mL
- Tubos Eppendorf 0.5 y 1.0mL
- Tubos ensaye 13x100mm
- Micropipetas P100,P200, P500
- Puntas p/micropipeta
- Espátula
- Pinzas de plástico
- Microjeringa Hamilton 25 $\mu$ L
- Membrana Millipore 0.5 $\mu$ m tipo FH
- Membrana Millipore 0.45 $\mu$ m tipo HA
- Papel aluminio
- Cánula
- Jeringas insulínicas 1mL
- Algodón
- Tabla de disección
- Instrumental p/disección
- Hilo de sutura
- Masking tape

##### Reactivos

- Bilirrubina no conjugada grado reactivo 99.9%, pureza Merck (BNC)
- Solución NaOH 0.1N, volumétrica valorada Sigma
- Acetato de sodio cristalino Baker Analyzed
- Acido acético glacial Baker Analyzed
- Hidróxido de amonio 29.4% Baker Analyzed
- Metanol grado HPLC Baxter
- Agua desionizada
- Pentobarbital sódico
- Etanol al 70%
- Hielo

Equipo:

- Equipo Millipore p/filtración
- Balanza analítica A&D Whatman  
42g x 0.01mg
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Agitador vórtex
- Microscopio p/disección con lámpara
- Computadora 486/66 con paquete  
Gold para cromatografía
- Equipo para HPLC Beckman módulo  
de solventes 125S y módulo detector  
166
- Refrigerador
- Endoscopio
- Jaulas p/animales con bebederos
- Alimento comercial p/ratas y hámsters
- Lámpara con lupa p/disección
- Cronómetros

Método cromatográfico:

Fase reversa en gradiente

*Bomba:* recíproca, presión de operación 0-6000psi.

*Inyector:* válvula de inyección rheodyne

*Detector:* ultravioleta/visible 190-700nm.

*Guardacolumna:* acero inoxidable 3.0cm de largo y 4.6mm diámetro interno.

*Columna:* acero inoxidable 8.3cm de largo y 4.6mm diámetro interno.

*Fase estacionaria:* Sílica modificada C18, tamaño de partícula 3µm.

Parámetros de operación

*Flujo:* 1mL/min.

*Presión:* Entre 2-4 kpsi.

*Temperatura:* Ambiente.

*Longitud de onda:* 450nm.

*Volúmen de inyección:* 5µL.

**Fase Móvil:** Disolvente A, acetato de amonio 1% en solución acuosa pH 4.5; disolvente B, acetato de sodio 0.04M en metanol

**Gradiente de elución:** Estado inicial 35%A 65%B disolvente B

Al inyectar comienza gradiente lineal durante 7 minutos hasta 5%A 95%B. Retorno en gradiente lineal durante 5 minutos hasta 25%A 75%B. Se mantiene por 3 minutos más a 25%A 75%B. Regresa al estado inicial 35%A 65%B.

**Tiempo de lavado:** 15 minutos

**Tratamiento previo de la muestra:** ninguno

**Tiempo de equilibrio de la columna:** 30 minutos con un flujo de 0.5 mL/min, con las condiciones iniciales del gradiente (35%A 65%B)

**Tiempo de lavado:** 45 minutos, usando metanol grado HPLC flujo de 1 mL/min, empleando ambas bombas

#### Preparación de disolventes para cromatografía.

**Disolvente A** (acetato de amonio 1% en sol. acuosa pH 4.5)

Se miden 10mL de ácido acético glacial y se diluyen con agua desionizada hasta 950mL aproximadamente

Se ajusta el pH de la solución con la cantidad necesaria de hidróxido de amonio 29.4%, hasta un pH 4.5 ± 0.02. Se afora en matraz volumétrico la solución ajustada a 1L.

**Disolvente B** (acetato de sodio 0.04M en metanol)

Se pesan aproximadamente 2.282g de acetato de sodio y se disuelven en metanol grado HPLC. Se afora en matraz volumétrico a 1L.

Los solventes ya preparados, se desgasifican y limpian de partículas filtrándolos dos veces con vacío en un equipo Millipore, usando una membrana de 0.5µm tipo FH para la disolución metanólica y una 0.45µm tipo HA para la disolución acuosa.

#### Preparación de las disoluciones estándar.

Se pesa aproximadamente la cantidad calculada de bilirrubina no conjugada para una disolución 1000µM (5.8mg) en la balanza analítica. Esta cantidad se disuelve en el menor volumen posible de una disolución acuosa de NaOH 0.1N, agitando vigorosamente en un

vórtex. Una vez solubilizada la bilirrubina, se lleva a un aforo de 10mL en matraz volumétrico con metanol grado HPLC

A partir de esta disolución, se realizaron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones correspondientes de los estándares que son empleados en cada determinación aforando siempre con metanol grado HPLC

La preparación de los patrones y estándares se realiza a temperatura ambiente y en penumbra, cubriendo los recipientes empleados con papel aluminio. Los estándares se mantienen en refrigeración, protegidos de la luz. Deben permanecer en estas condiciones por no más de 4 horas antes de emplearse e inyectarse al cromatógrafo

#### Obtención de muestras de bilis humana

Se obtuvieron de pacientes que fueron sometidos a endoscopia para realizarles una colangiografía. La muestra se obtuvo del colédoco a través del endoscopio, antes de inyectar el medio de contraste. Se conservó en refrigeración y protegida de la luz hasta emplearse e inyectarse al cromatógrafo

Los cuatro pacientes (2 masculinos y 2 femeninos), se sometieron al estudio por una probable colelitiasis, que en ninguno de los casos fue confirmada

#### Obtención de las muestras de bilis de roedores.

Se usaron doce hámsters machos de entre 9-12 semanas y ratas macho de entre 15-18 semanas. Se mantuvieron normalmente con agua y alimento comercial, sin someterlos a ninguna variable experimental.

La muestra de bilis se obtuvo practicando una canulación del colédoco. Para ello los animales fueron anestesiados con pentobarbital y sujetos en una tabla de disección

Se practicó una incisión en el abdomen, de entre 1-2cm de largo, a través de la cual se localizó el intestino y el punto de unión con la vesícula biliar. Se sujetó y aisló el colédoco y, observando a través de un microscopio de disección, se practicó una pequeña perforación con una aguja, por donde se introdujo una cánula fina, de tal forma que la bilis fluyera libremente por ella. Se aseguró la cánula con hilo, y se suturó la incisión del vientre del roedor.

Durante media hora se recolectó la bilis que flúa por la cánula en un tubo Eppendorf de 0.5 mL, el cual estaba cubierto con papel aluminio y se encontraba en un recipiente con hielo. Toda la operación se realizó en penumbra para evitar la degradación de la bilirubina.

Terminada la colecta los animales son sacrificados por sobredosis de pentobarbital y desnucación.

La bilis se mantuvo protegida de la luz y en refrigeración hasta usarse o inyectarse al cromatógrafo por no más de 4 horas.

#### Preparación de las muestras de bilis reforzadas con estándar.

Las muestras de bilis se mezclaron con volúmenes pequeños (del orden de  $\mu\text{L}$ ), de estándares de bilirubina no conjugada disueltos en metanol, midiéndose el volumen con micropipeta.

Las muestras se conservaron en un tubo Eppendorf de 0.5 o 1.5 mL, cerrado, protegido de la luz y en refrigeración por no más de 4 horas antes de inyectarse.

#### Tratamiento de las muestras de bilis.

A las muestras de roedores no se les realizó ningún tratamiento previo (excepto las muestras cargadas con estándar), y se inyectaron tal como se colectaron al cromatógrafo.

Las muestras humanas, por tener una mayor concentración de proteínas, se diluyeron previamente 1:4 o 1:6 con metanol grado HPLC, se agitaron en vórtex, y se dejaron reposar por 3-4 minutos en refrigeración. El sobrenadante es el que se empleó para inyectar al cromatógrafo.

## 5. RESULTADOS Y ANALISIS.

### 5.1 Estandarización de las condiciones de operación.

Los estándares empleados se prepararon disolviendo aproximadamente 3mg de bilirrubina no conjugada (BNC), llevando a 10mL en matraz aforado. De allí se tomó una alícuota de 1mL y se aforó a 10mL nuevamente, usando siempre metanol HPLC.

A continuación se muestran los resultados de 5 estándares distintos inyectados consecutivamente, así como sus tiempos de retención.

Tabla 2 Estandarización de las condiciones de operación.

Estándar	Tiempo de retención (minutos)
1	9.33
2	9.30
3	9.30
4	9.31
5	9.29

Promedio=9.306

D.E. = 0.015

C.V. = 0.16%

En las figuras 4 y 5 se muestran los cromatogramas obtenidos.

Como se puede observar el coeficiente de variación es pequeño, y el tiempo de retención obtenido es reproducible. Al inyectar más estándares bajo las mismas condiciones que los presentados pero en días distintos, el tiempo de retención continuó siendo reproducible.

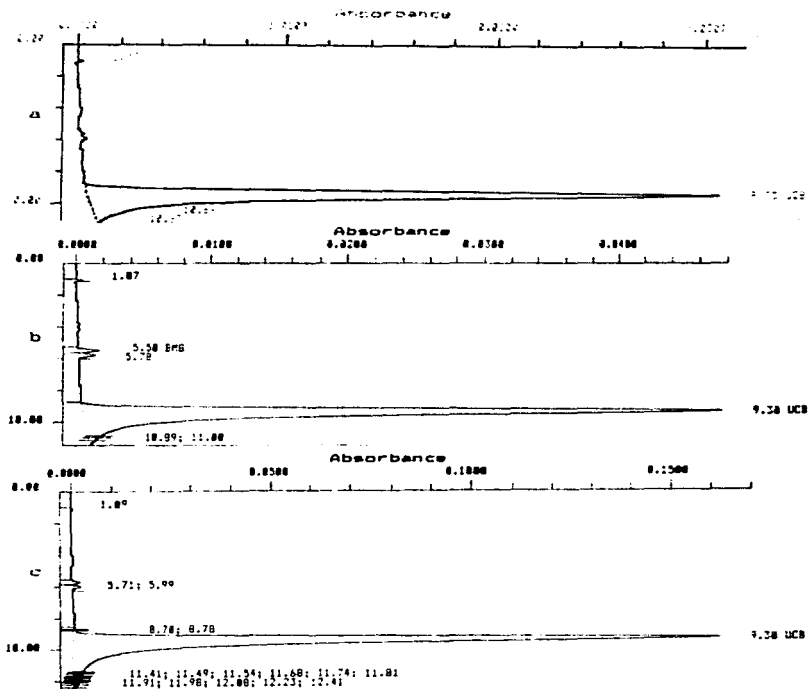
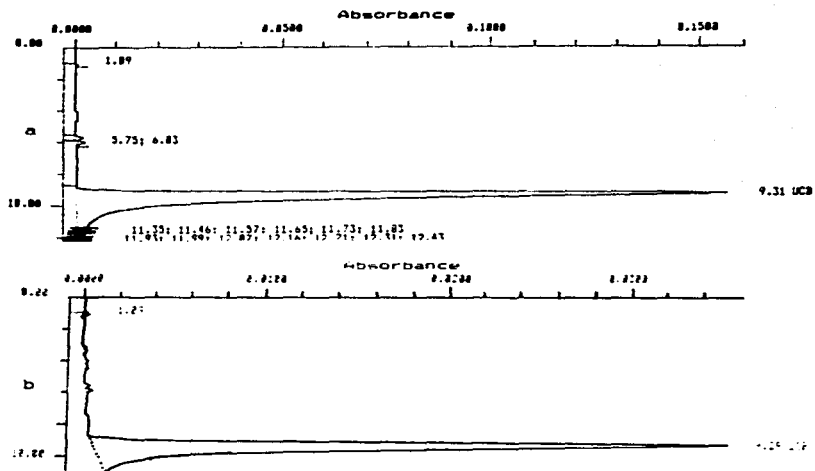


Figura 4. Cromatogramas de la estandarización de las condiciones de operación.  
 a) estándar 1. b) estándar 2. c) estándar 3.





**Figura 5.** Cromatogramas de la estandarización de las condiciones de operación.  
a) estándar 4. b) estándar 5.

### 5.2 Linealidad del sistema.

Se preparó un patrón pesando aproximadamente 29mg de bilirubina no conjugada (BNC), llevando a un aforo de 50mL en matraz volumétrico (1000 $\mu$ M) A partir de esta disolución se prepararon las tres curvas de calibración por separado, haciendo las diluciones necesarias en matraces de 10mL para preparar estándares de concentraciones 50,100,150,300 400 $\mu$ M (tabla 3)

Tabla 3 Diluciones para la curva de calibración

Concentración Inicial ( $\mu$ M)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración Final ( $\mu$ M)
1000	4	10	400
1000	3	10	300
300	5	10	150
1000	1	10	100
100	5	10	50

Las tres curvas se inyectaron en una misma sesión, comenzando desde los estándares más diluidos y terminando con los más concentrados.

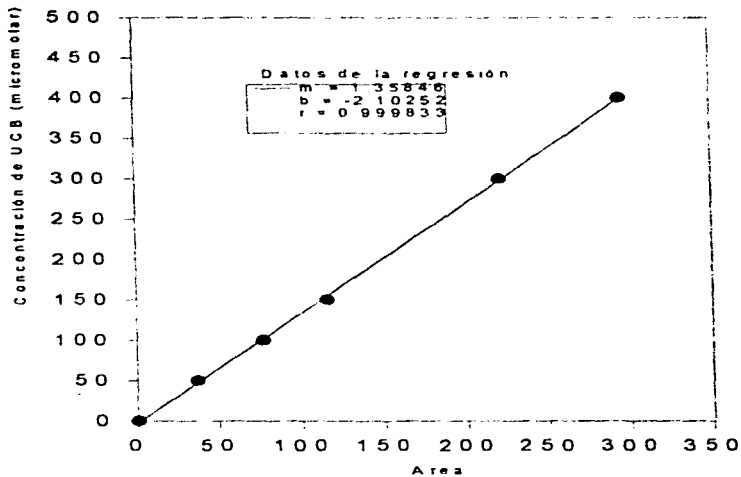
En la tabla 4 se muestran los resultados de la curva de calibración, promediando los datos de las tres repeticiones de cada concentración La curva se muestra en la gráfica 1 En las figuras 6 a 10 se presentan los cromatogramas obtenidos

Tabla 4 Curva de calibración

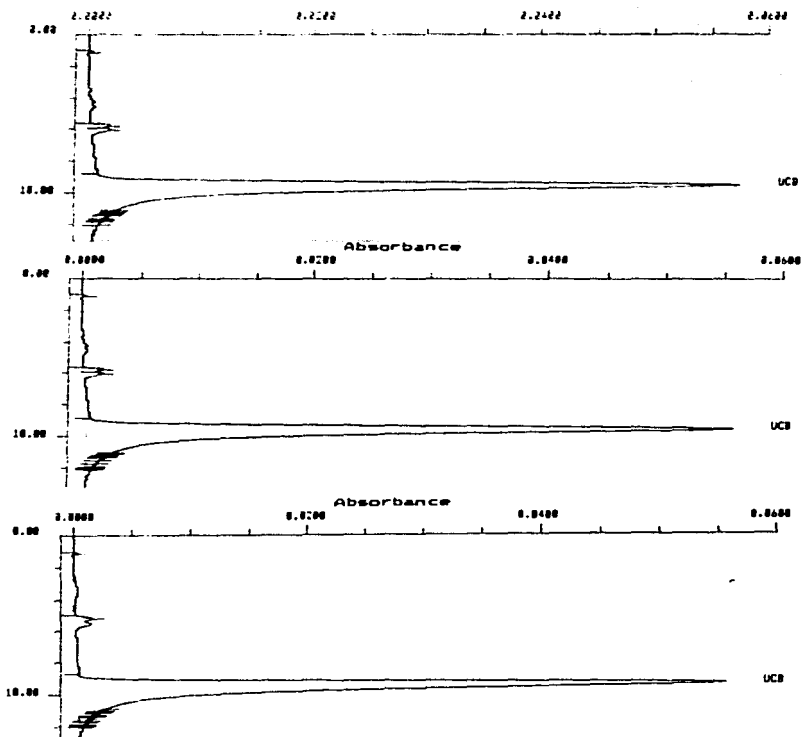
Concentración ( $\mu$ M)	Área Promedio	Tiempo de retención promedio (minutos)
0	0	0
50	36 85172	9 473
100	76 64452	9 418
150	115 45844	9 355
300	220 94313	9 301
400	295 51504	9 285

Datos de Regresión  $m = 1.35846$ ,  $b = -2.10252$ ,  $r = 0.999833$

**CURVA DE CALIBRACION**  
**LINEALIDAD DEL SISTEMA**



**Gráfica 1.** Linealidad del Sistema. Curva de calibración considerando las tres muestras de cada concentración.



**Figura 6.** Linealidad del sistema. Cromatogramas de bilirubina no conjugada concentración 50 $\mu$ M.

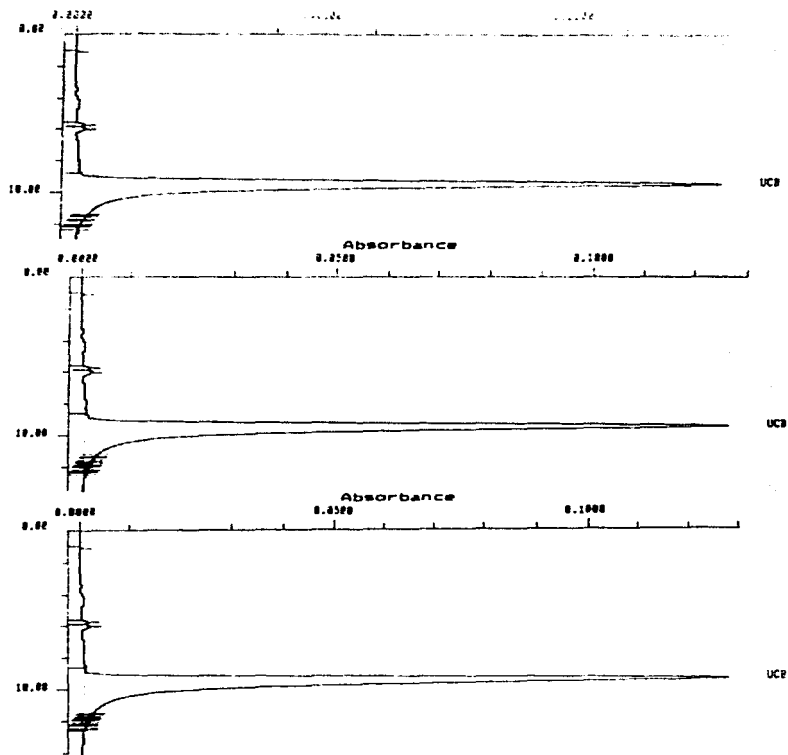


Figura 7. Linealidad del sistema. Cromatogramas de bilirubina no conjugada concentración 100 $\mu$ M.

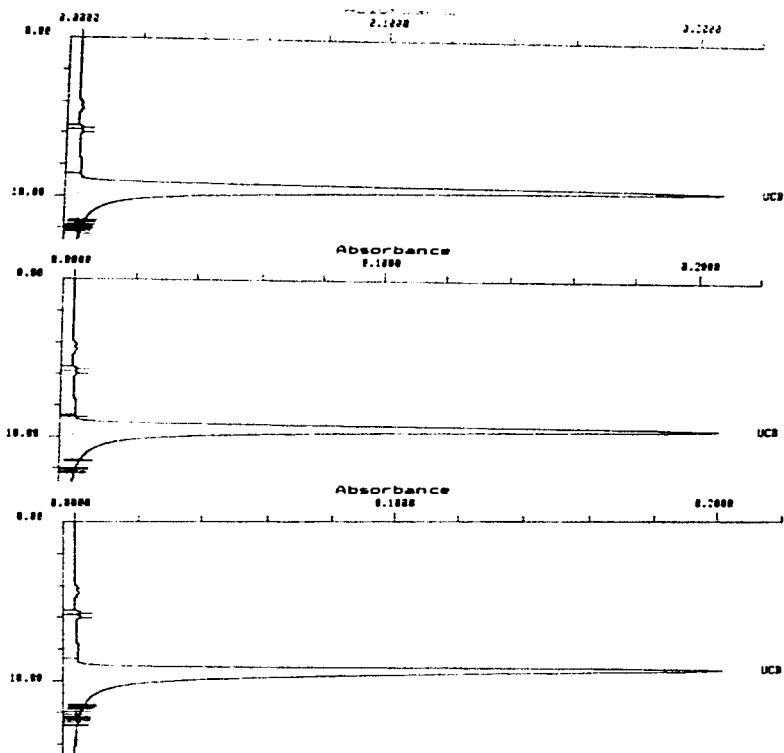


Figura 8. Linealidad del sistema. Cromatogramas de bilirubina no conjugada concentración 150 $\mu$ M.

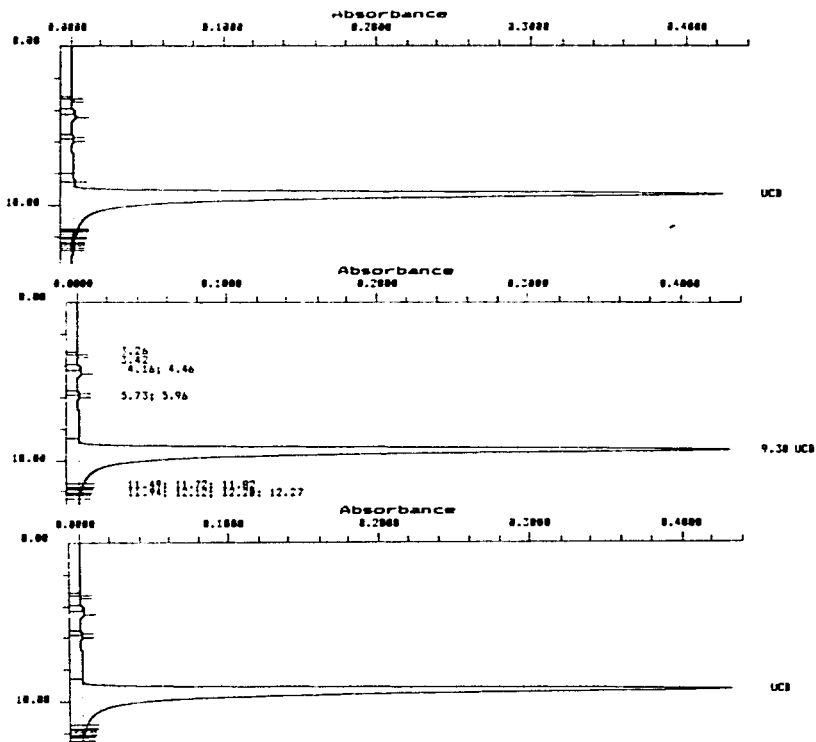
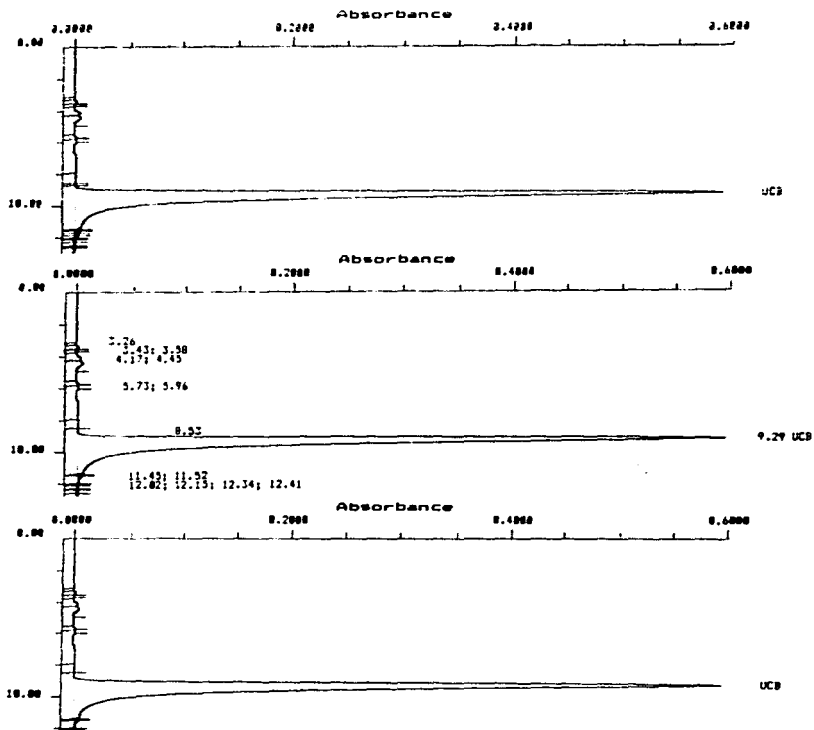


Figura 9. Linealidad del sistema. Cromatogramas de bilirubina no conjugada concentración 300 $\mu$ M.



**Figura 10.** Linealidad del sistema. Cromatogramas de bilirubina no conjugada concentración 400 $\mu$ M.



Para la determinación de bilirrubina por HPLC no existen parámetros o criterios de aceptación establecidos, como sucede con fármacos o compuestos de interés comercial (17).

La curva de calibración se comporta linealmente en el intervalo de concentraciones probadas (50-400 $\mu$ M), lo cual se aprecia claramente en la gráfica y el coeficiente de correlación obtenido. El valor de la pendiente es el factor de respuesta a partir del cual se calcula la concentración de las muestras, multiplicándolo por el área de cada pico.

$$\text{Concentración} = \text{Área} \times \text{Factor de respuesta} (1.35846)$$

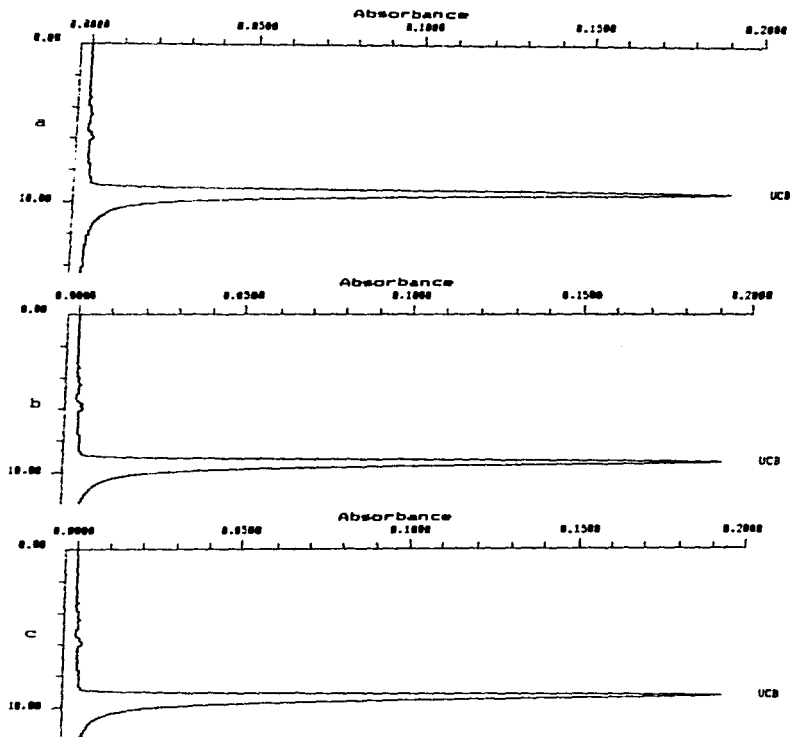
### 5.3 Precisión del sistema.

Se preparó un patrón pesando aproximadamente 57mg de BNC, llevando a un aforo de 10mL en matraz volumétrico (984  $\mu$ M). Se realizó una dilución para obtener un estándar final de 148 $\mu$ M.

Tabla 5. Diluciones para el estándar.

Concentración Inicial ( $\mu$ M)	Alcuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración Final ( $\mu$ M)
984	3	10	295
295	5	10	148

Esta solución estándar se inyectó seis veces consecutivas en el cromatógrafo, en una misma sesión. En la tabla 6 se muestran los resultados. En las figuras 11 y 12 se muestran los cromatogramas de los estándares obtenidos.



**Figura 11.** Precisión del sistema. a) estándar 1. b) estándar 2. c) estándar 3.

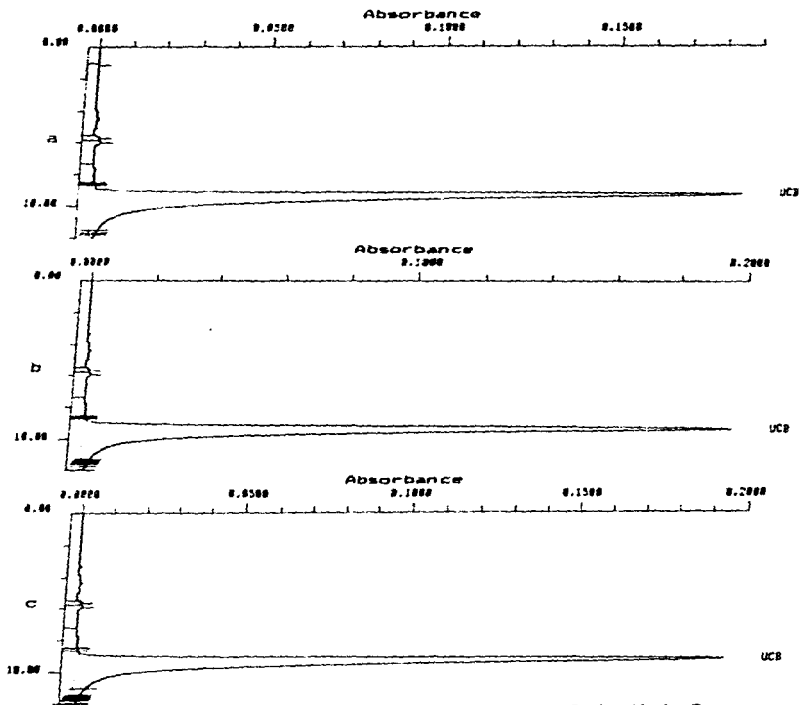


Figura 12. Precisión del sistema. a) estándar 4. b) estándar 5. c) estándar 6.

**Tabla 6. Estándares empleados en la precisión del método**

Inyección	Area	Tiempo de retención (min)
1	107 23476	9 334
2	107 13968	9 336
3	107 63582	9 336
4	106 46834	9 377
5	108 68309	9 313
6	106 89836	9 306
Promedio	107 34334	
Desv. Est	0 76123	
C.V	0 71%	

Para un método cromatográfico, por lo regular se pide como criterio de aceptación un C.V.  $\leq 2.0\%$  (2.17) Como podemos observar, el método presenta un C.V. menor a uno por lo que queda demostrado que es preciso

#### 5.4 Límite de Cuantificación.

Se preparó un patrón pesando aproximadamente 2.9mg de BNC, aforando a 50mL en matraz volumétrico (100 $\mu$ M) A partir de ésta disolución se elaboraron tres curvas independientes, haciendo las diluciones necesarias para obtener 10mL de las siguientes concentraciones: 50, 30, 20, 10, 5 y 2.5 $\mu$ M (tabla 7). Los dos últimos se prepararon a partir de la dilución anterior.

**Tabla 7 Diluciones para los estándares.**

Concentración Inicial ( $\mu$ M)	Alícuota (mL)	Aforo (mL)	Concentración Final ( $\mu$ M)
100	5	10	50
100	3	10	30
100	2	10	20
100	1	10	10
10	5	10	5
5	5	10	2.5

Las tres curvas se inyectaron en una misma sesión, comenzando por los estándares más diluidos y terminando con los más concentrados.

En la tabla 8 se presentan los resultados promediando los datos obtenidos de las tres curvas. En la gráfica 2 se muestra la curva y en las figuras 13 a 18 los cromatogramas obtenidos para los estándares.

Tabla 8 Curva para límite de cuantificación

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área Promedio	Tiempo de retención promedio (min)
0	0	-
2.5	1 31358	9.488
5.0	2 58280	9.657
10.0	5 70985	9.658
20.0	12 98876	9.457
30.0	20 11814	9.407
50.0	35 95212	9.347

Datos de la regresión:  $r = 0.9988707$

$m = 1.38203$ ,  $b = 1.25466$

Como se puede apreciar, el comportamiento lineal del método se conserva aún a concentraciones tan bajas como  $2.5 \mu\text{M}$ . Asimismo, se demuestra que podemos cuantificar bilirrubina a una concentración mínima de  $2.5 \mu\text{M}$ .

Por medio del paquete para cromatografía se obtuvo el coeficiente señal/ruido del sistema (S/N), para el estándar más diluido (2). Para tener un único dato se promediaron los coeficientes de los tres estándares:

Dato 1 ( $2.5 \mu\text{M}$ ) S/N = 21.99

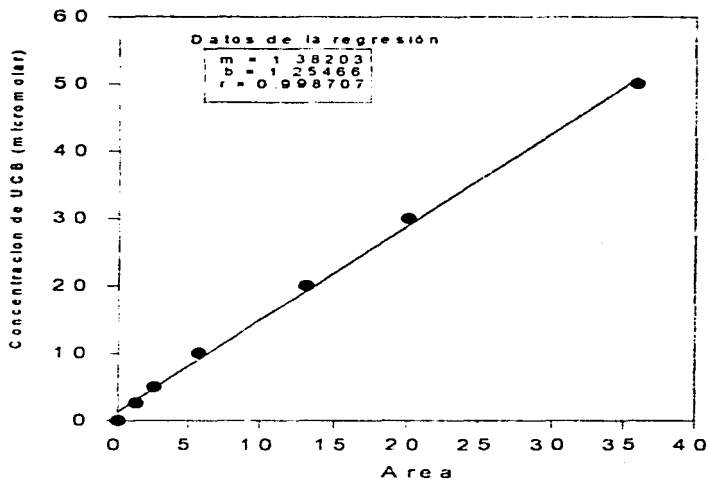
Dato 2 ( $2.5 \mu\text{M}$ ) S/N = 23.12

Dato 3 ( $2.5 \mu\text{M}$ ) S/N = 25.96

Promedio = 23.69 para conc.  $2.5 \mu\text{M}$

Con este dato podemos apreciar que la señal dada por el estándar  $2.5 \mu\text{M}$  se encuentra más de 20 veces por encima del nivel de ruido en el sistema, por lo que claramente se destaca como un pico que se puede integrar y cuantificar por el equipo (2).

**CURVA PARA LIMITE  
DE CUANTIFICACION**



**Gráfica 2.** Límite de cuantificación. Curva empleando el promedio de los tres estándares de cada concentración.

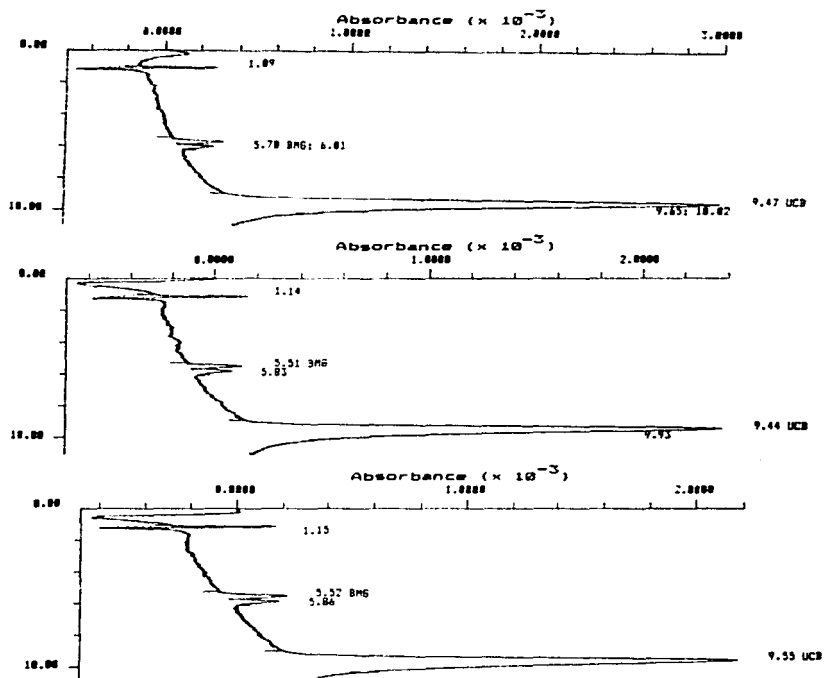


Figura 13. Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirubina no conjugada, concentración 2.5  $\mu$ M.

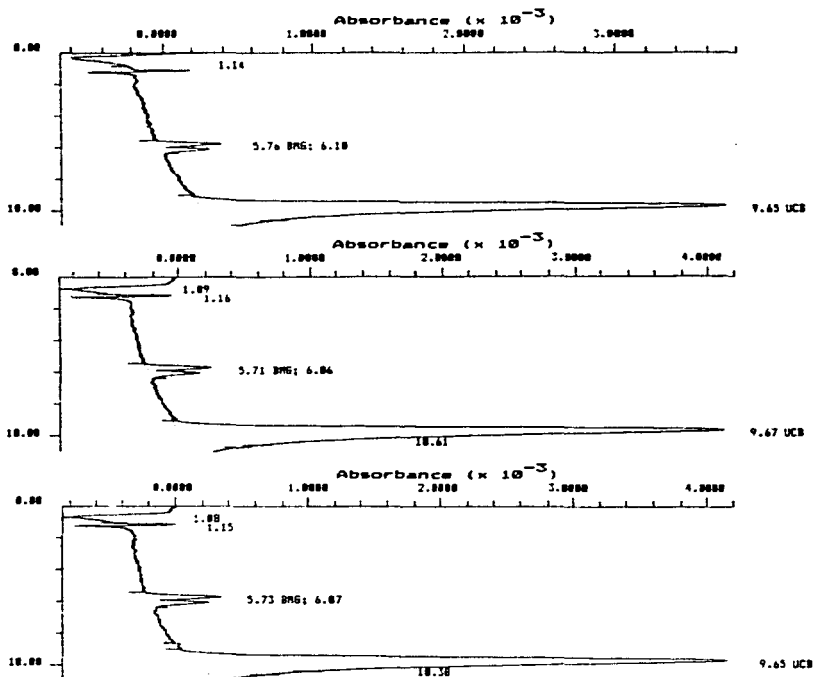
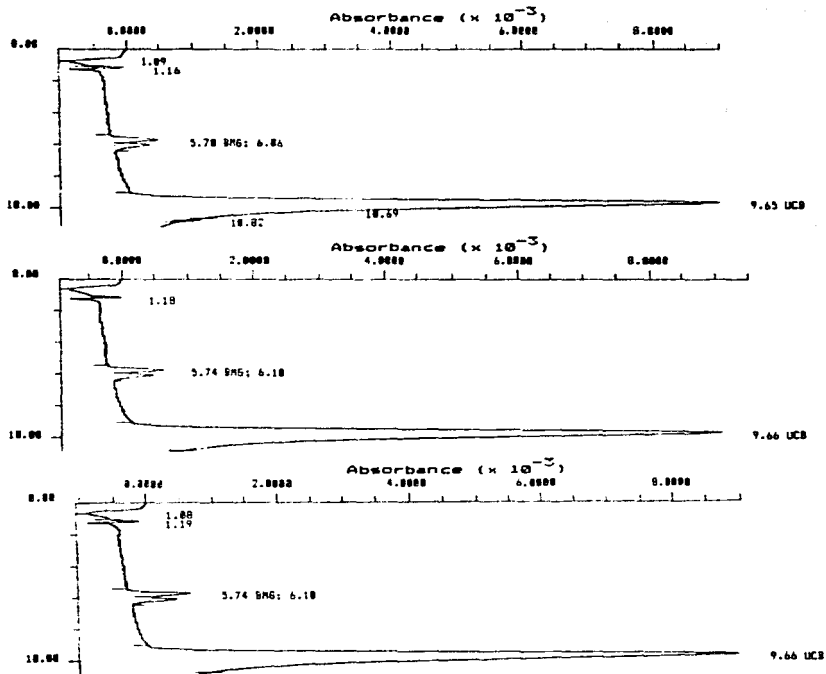
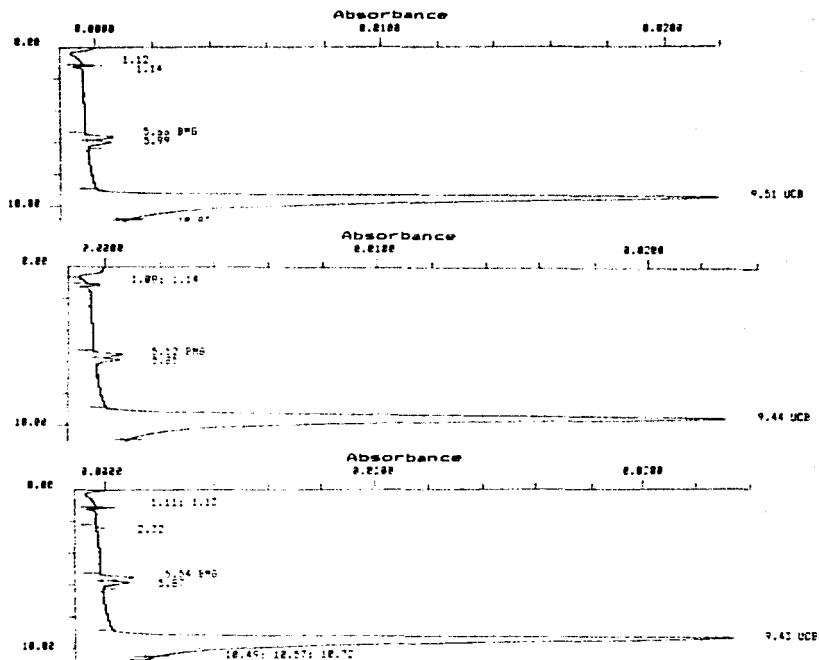


Figura 14. Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirubina no conjugada, concentración 5  $\mu$ M.





**Figura 15.** Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirubina no conjugada, concentración 10 µM.



**Figura 16.** Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirubina no conjugada, concentración 20  $\mu$ M.

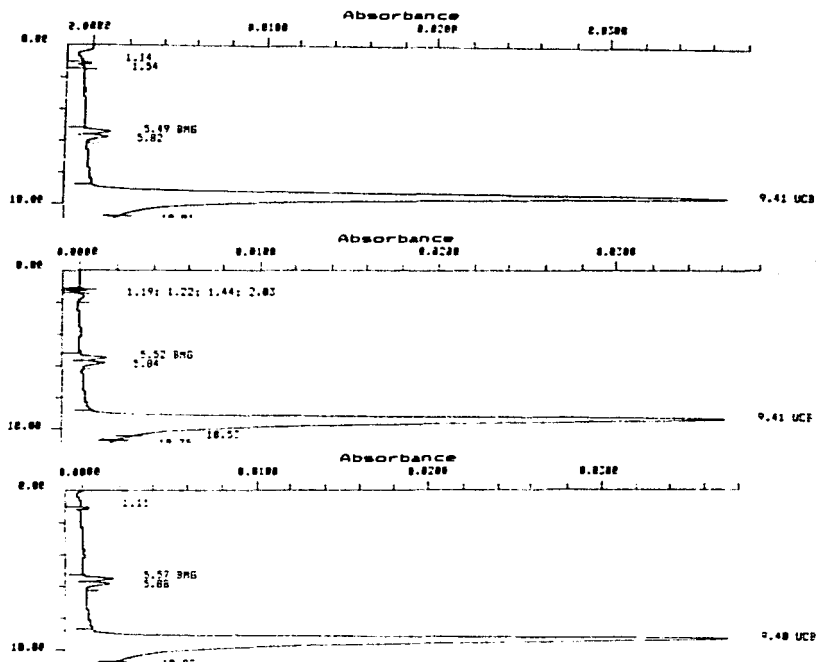
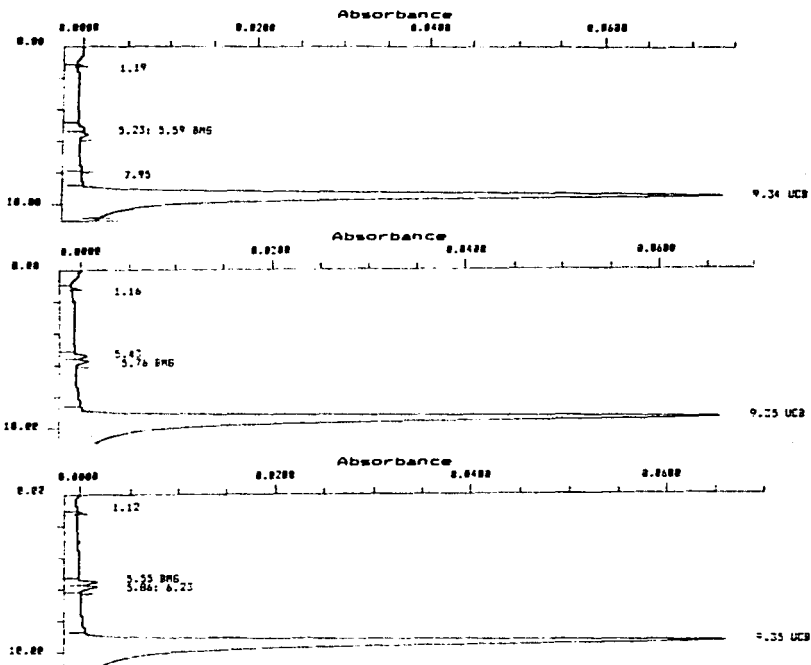


Figura 17. Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirubina no conjugada, concentración 30  $\mu$ M.



**Figura 18.** Límite de cuantificación. Cromatogramas de estándares de bilirrubina no conjugada, concentración 50 µM.

### **5.5 Por ciento de recobro.**

Se preparó un patrón pesando aproximadamente 5.9mg de BNC, llevándolo a un aforo de 10mL en matraz volumétrico (1017 $\mu$ M). De ésta se tomó una alícuota de 3mL y se llevó a un aforo de 10mL en matraz volumétrico, resultando en un estándar final de 305.1 $\mu$ M.

Se empleó una muestra de bilis humana, que corresponde a la muestra del paciente 4 de la sección de análisis de muestras de bilis, la cual mostró tener una concentración de BNC de 12.8 $\mu$ M (página 74).

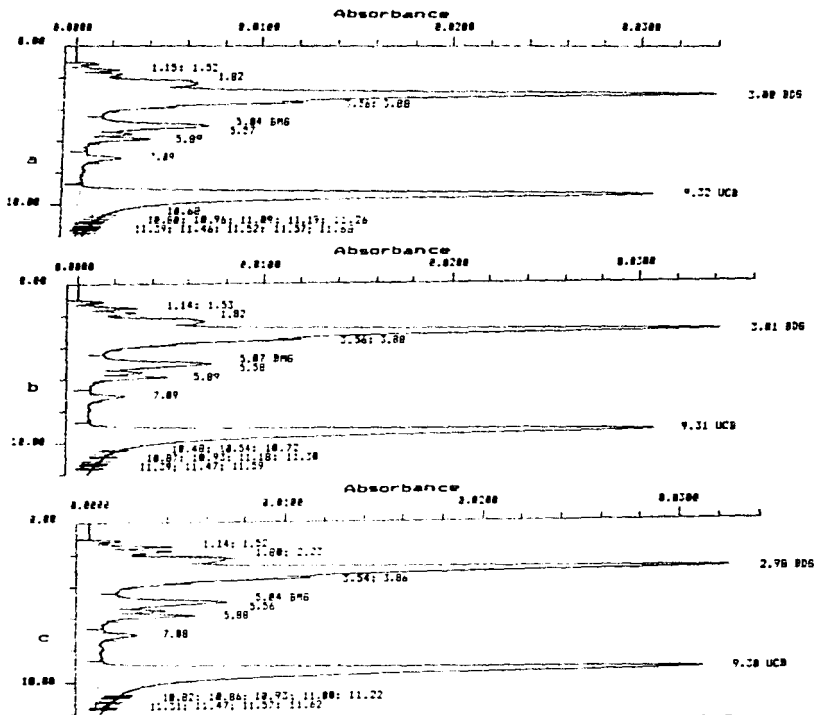
En un tubo de ensaye de 13x100mm se preparó una muestra reforzada mezclando 500 $\mu$ L de la muestra de bilis, 500 $\mu$ L del estándar 305.1 $\mu$ M y 500 $\mu$ L de metanol HPLC (volumen final 1500 $\mu$ L), lo cual deja una concentración final 106 $\mu$ M de BNC. La mezcla se agitó, y guardó en refrigeración hasta usarse.

El sobrenadante se inyectó seis veces al cromatógrafo, analizándose en una misma sesión. En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis y el porcentaje de recobro de BNC. En las figuras 19 y 20 se muestran los cromatogramas de la muestra reforzada.

**Tabla 9. Muestra cargada para el % de recobro.**

Inyección	Concentración ( $\mu$ M)	% Recobro
1	109.1	102.9
2	108.4	102.3
3	108.5	102.4
4	107.3	101.2
5	104.7	98.8
6	103.3	97.5
	Promedio	100.85
	Desv est	2.20
	C V	2.18%

La concentración se obtuvo directamente del reporte del cromatógrafo, el cual empleó el factor de respuesta 1.35846 (calculado en la linealidad del sistema).



**Figura 19.** Porcentaje de recobro. a) inyección 1. b) inyección 2. c) inyección 3.

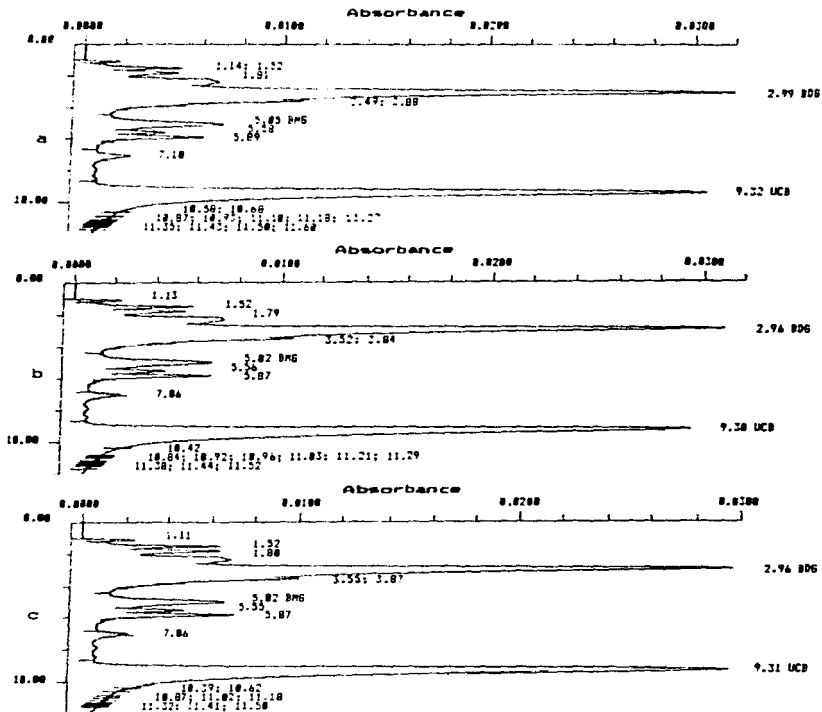


Figura 20. Porcentaje de recobro. a) inyección 4. b) inyección 5. c) inyección 6.

Este método nos proporciona un porcentaje de recobro del 100 85%, con una variación pequeña. En general, el criterio de aceptación para la exactitud en un método cromatográfico es de un promedio de recobro de 98-102% (2.17). Con esto se demuestra que el método es exacto.

### 5.6 Especificidad.

Para la prueba de especificidad se decidió tratar de reproducir la situación más común por la que se presentarían productos de degradación que pudieran interferir mala conservación de la muestra.

Para ello hemos mantenido en congelación durante 4 días una muestra de bilis de hámster (correspondiente al número 1 del análisis de muestras de bilis), expuesta a la luz del laboratorio y al aire. De esta forma esperamos obtener no sólo productos de degradación de bilirrubina sino también de los demás componentes de la bilis, que pudieran interferir con el método.

Al descongelar la muestra de bilis, se analizó para comprobar la degradación de bilirrubina. El cromatograma se presenta en la figura 21a (comparar con la figura 24a, hámster número 1). Los resultados del análisis fueron los siguientes:

Concentración inicial de bilirrubina total = 303.4  $\mu\text{M}$

Concentración final de bilirrubina total = 71.3  $\mu\text{M}$

Concentración final de BNC = 7.5  $\mu\text{M}$  (Tiempo de retención 9.531 min)

Como se puede observar, se produjo una apreciable disminución en la cantidad de bilirrubina total, lo que demuestra que hubo degradación en la muestra de bilis. Además, es importante tomar en cuenta que existe una cierta concentración de BNC antes de reforzar con el estándar, para hacer el cálculo de recobro.

Para reforzar la muestra de bilis se preparó un estándar pesando aproximadamente 4.7 mg de BNC, aforando a 10 mL en matraz volumétrico (810.3  $\mu\text{M}$ ).



En un tubo Eppendorf de 1 OmL se mezclaron 240 $\mu$ L de bilis degradada (7.5 $\mu$ M BNC), con 60 $\mu$ L de estándar 810  $\mu$ M de BNC, con lo que se obtiene una concentración final de BNC de 168.1 $\mu$ M

Se analizaron seis inyecciones consecutivas de la bilis reforzada en una misma sesión. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos y el porcentaje de recobro. Las concentraciones se obtuvieron directamente del reporte del cromatógrafo, el cual empleó el factor de respuesta de 1.35846 para los cálculos. En las figuras 21, 22 y 23 se presentan los cromatogramas obtenidos

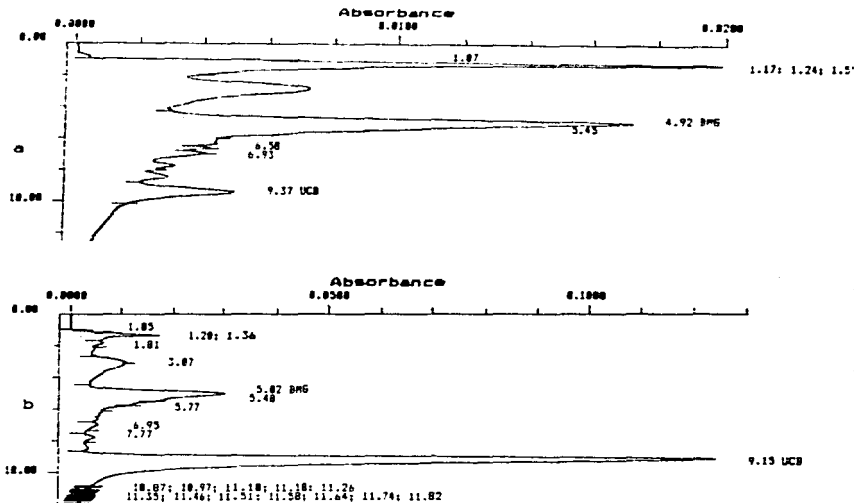
Tabla 10. Muestra reforzada para la especificidad del método

Inyección	Concentración ( $\mu$ M)	% Recobro
1	123.1	73.2
2	120.8	71.9
3	130.9	77.9
4	128.4	76.4
5	120.5	71.7
6	108.8	64.7
Promedio		72.6
Desv Est		4.62
C V		6.4%

El C.V. es elevado y el recobro es muy bajo, si lo comparamos con el obtenido en los resultados de porcentaje de recobro del método. El método demuestra ser poco específico en presencia de productos de degradación, los cuales interfieren disminuyendo aparentemente la concentración de bilirrubina.

Es conocida la labilidad de la bilirrubina y sus conjugados, por lo que se consideró innecesario realizar una prueba de estabilidad de muestra. En su lugar hemos optado por demostrar que bajo las condiciones propuestas de manejo y conservación de muestra no se produce degradación de la misma, evitando así interferencia en los resultados. Durante todo el trabajo se ha mantenido el límite de conservación de 4h en refrigeración, con

protección de la luz y en recipiente cerrado, lo cual al parecer no ha afectado en la exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Por lo tanto se demuestra que mientras no se exceda de este límite y no se alteren las condiciones de conservación no se presentarán problemas de interferencias.



**Figura 21.** Especificidad del método. a) muestra degradada de bills de hámster. b) inyección 1.

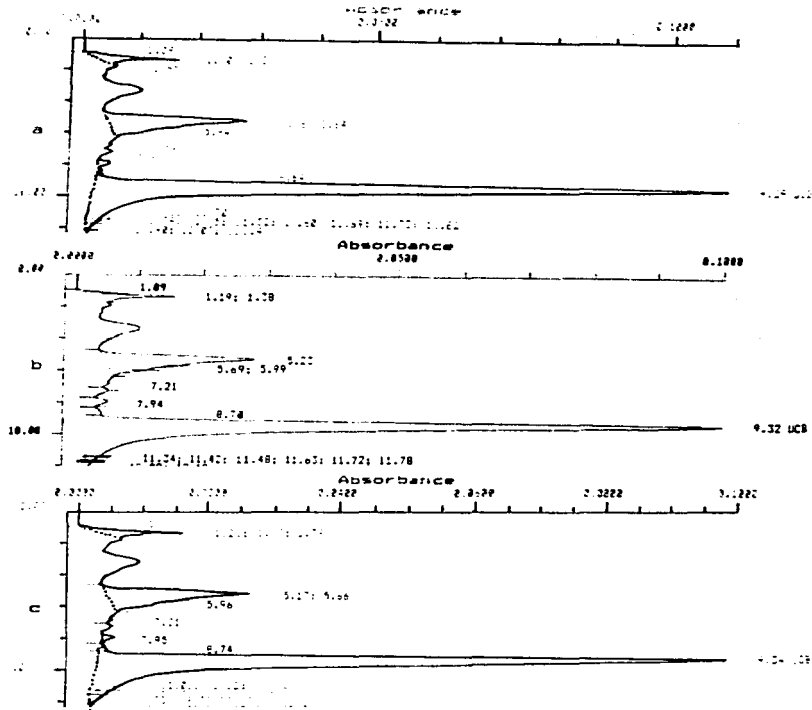


Figura 22. Especificidad del método. a) Inyección 2. b) Inyección 3. c) Inyección 4.

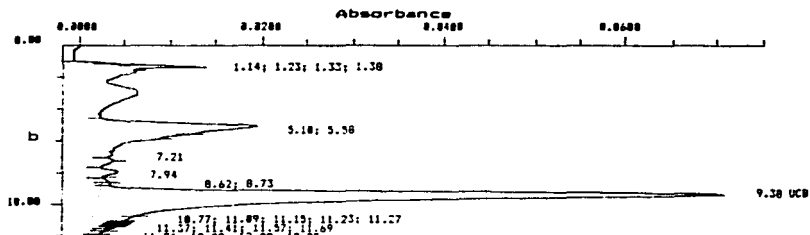
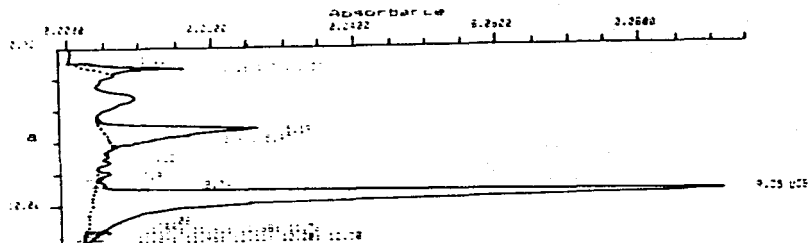


Figura 23. Especificidad del método. a) Inyección 5. b) Inyección 6.

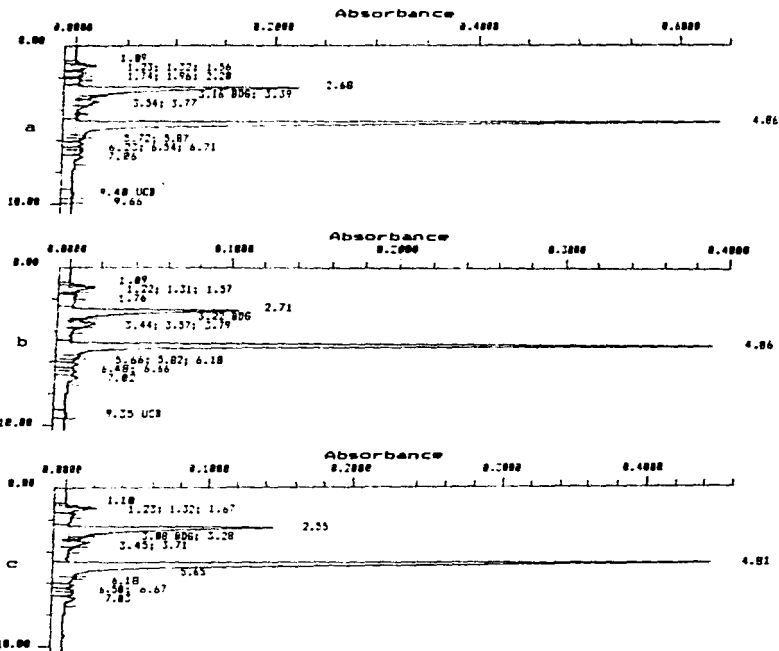
### **5.7 Análisis de muestras de bilis de humanos y roedores.**

Debido a la falta de estándares de bilirrubina mono y diconjugada, se realizó la identificación por el patrón de elución característico descrito para el método (14). Dicho patrón corresponde a que en primer lugar eluyen los diconjugados (dentro de los 3 primeros minutos), seguidos de los monoconjugados (a los 5-6 minutos aprox.), y finalmente la bilirrubina no conjugada.

Las muestras de bilis se analizaron en distintos días, conforme se obtuvieron de las distintas fuentes.

A continuación se presentan los resultados de las muestras de bilis de hámster, rata y humano. En cada grupo se muestran primeramente los cromatogramas obtenidos, y posteriormente una tabla con los datos de tiempo de retención, concentración y porcentaje en la bilis para cada especie molecular de bilirrubina (diconjugada, monoconjugada y no conjugada). Las concentraciones se obtuvieron directamente del reporte del cromatógrafo, el cual empleó el factor de respuesta de 1 35846 para el cálculo. Hay que recordar que las muestras de roedores se inyectaron sin diluir, mientras que las de humano se diluyeron previamente 1:4 o 1:6 con metanol grado HPLC.

En la gráfica 3 se representa la distribución de las especies moleculares de bilirrubina en la bilis de las tres especies de mamíferos, de acuerdo con los datos de las tablas.



**Figura 24.** Cromatogramas de muestras de bilis de hámster. a) hámster 1. b) hámster 2. c) hámster 3.

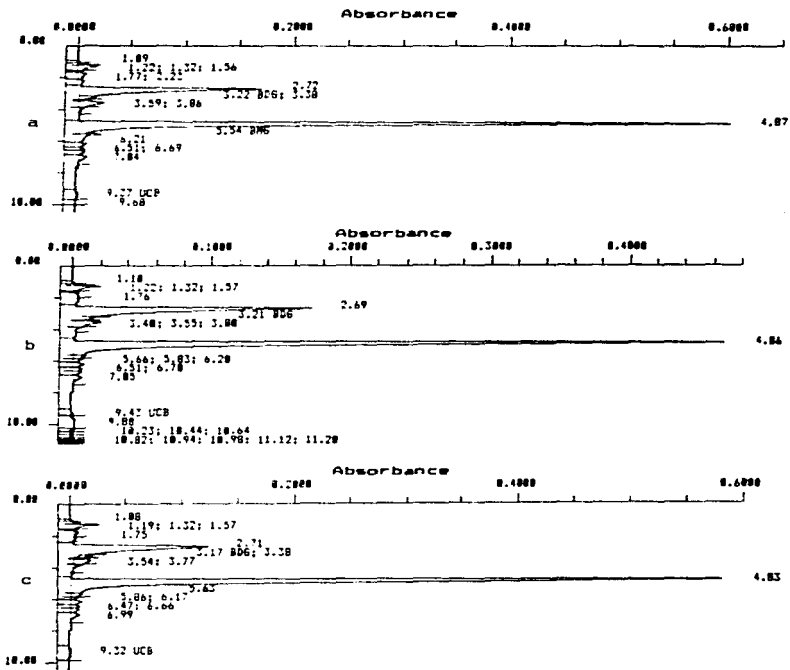
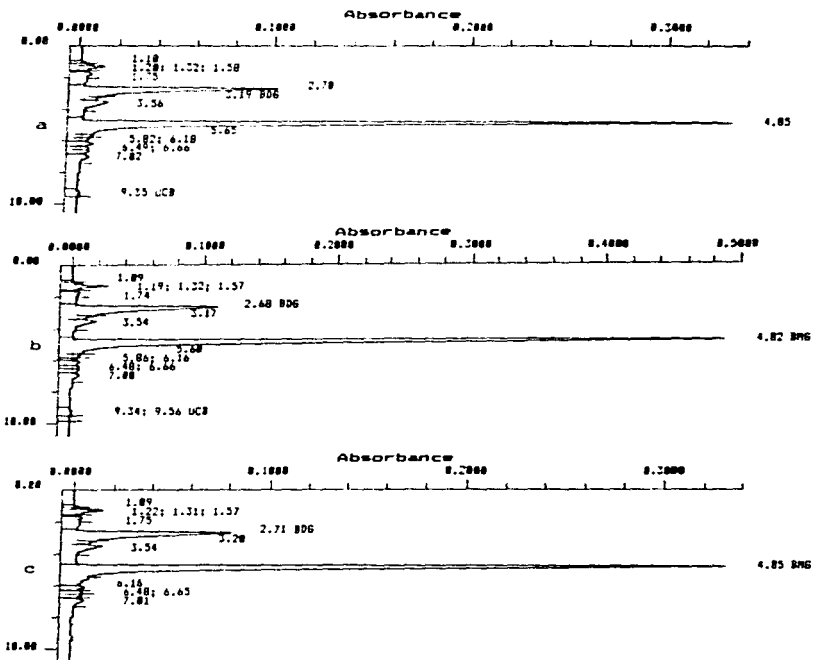
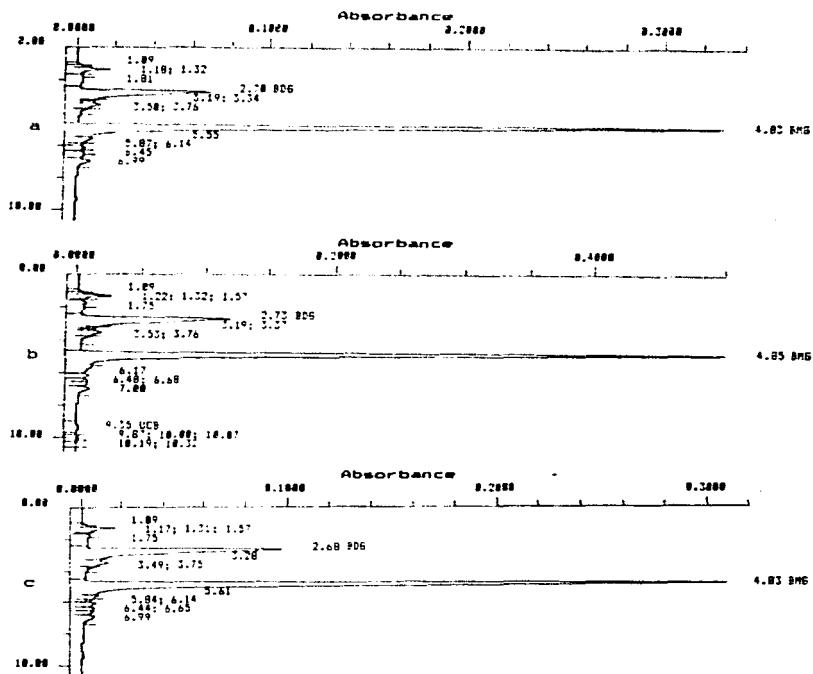


Figura 25. Cromatogramas de muestras de heces de hámster. a) hámster 4. b) hámster 5. c) hámster 6.



**Figura 26.** Cromatogramas de muestras de bilis de hámster. a) hámster 7. b) hámster 8. c) hámster 9.





**Figura 27.** Cromatogramas de muestras de bilis de hámster. a) hámster 10. b) hámster 11. c) hámster 12.

TABLA 11

MUESTRAS DE BILIS DE HAMSTER										
Hamster	Bilirrubina Diconjugada			Bilirrubina Monoconjugada			Bilirrubina no conjugada			Bilirrubina Total
	Tiempo de retención (min)	Conc. ( $\mu$ M)	%	Tiempo de retención (min)	Conc. ( $\mu$ M)	%	Tiempo de retención (min)	Conc. ( $\mu$ M)	%	Conc. ( $\mu$ M)
1	2 684	88.4	29.1	4 860	212.9	70.2	9 395	2.1	0.7	303.4
2	2 715	45.7	26.2	4 862	126.7	72.8	9 353	1.8	1.0	174.2
3	2 550	60.3	29.8	4 812	142.3	70.2	-	-	-	202.6
4	2 720	75.7	29.0	4 865	183.2	70.1	9 374	2.3	0.9	261.2
5	2 692	75.5	31.8	4 858	159.7	67.4	9 425	1.8	0.8	237.0
6	2 708	66.4	24.4	4 832	203.4	74.6	9 324	2.7	1.0	272.5
7	2 702	46.8	28.4	4 845	118.4	70.5	9 347	1.8	1.1	165.0
8	2 679	57.0	24.6	4 822	172.5	74.6	9 558	1.8	0.8	231.3
9	2 710	41.5	26.8	4 846	113.2	73.2	-	-	-	154.7
10	2 698	36.9	23.9	4 827	117.6	76.1	-	-	-	154.5
11	2 731	63.3	27.1	4 849	167.7	72.0	9 348	2.0	0.9	233.0
12	2 680	47.3	26.3	4 829	120.1	71.7	-	-	-	167.4
Promedio	2 689	58.7	27.5	4 842	153.0	72.0	9 391	2.0	0.9	213.1
Dev. Est.	0 047	15.8	2.4	0 018	35.4	2.5	0 075	0.3	0.1	50.6
C.V. (%)	1.75	26.9	8.7	0.37	23.1	3.5	0.80	15.0	11.1	23.7

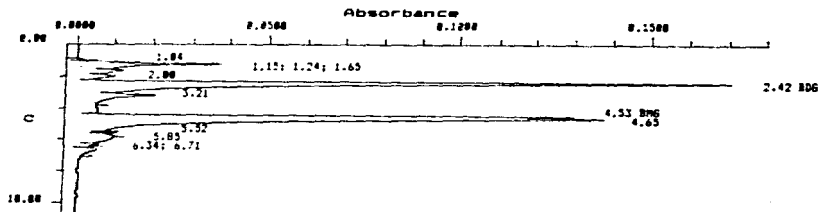
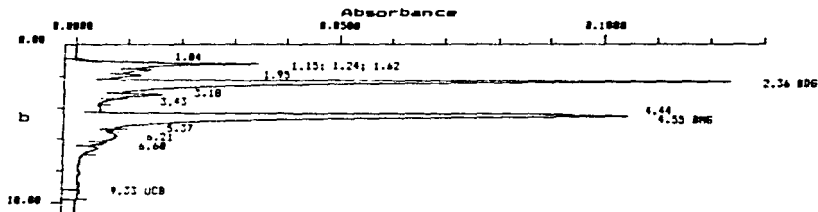
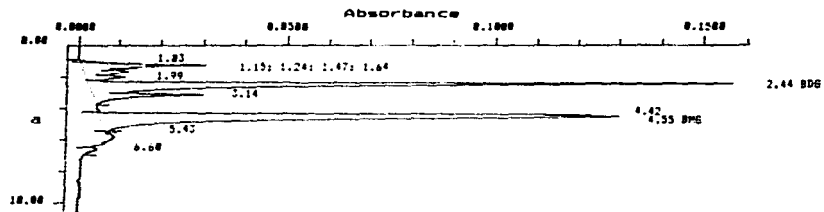


Figura 28. Cromatogramas de muestras de bilis de rata. a) rata 1. b) rata 2. c) rata 3.

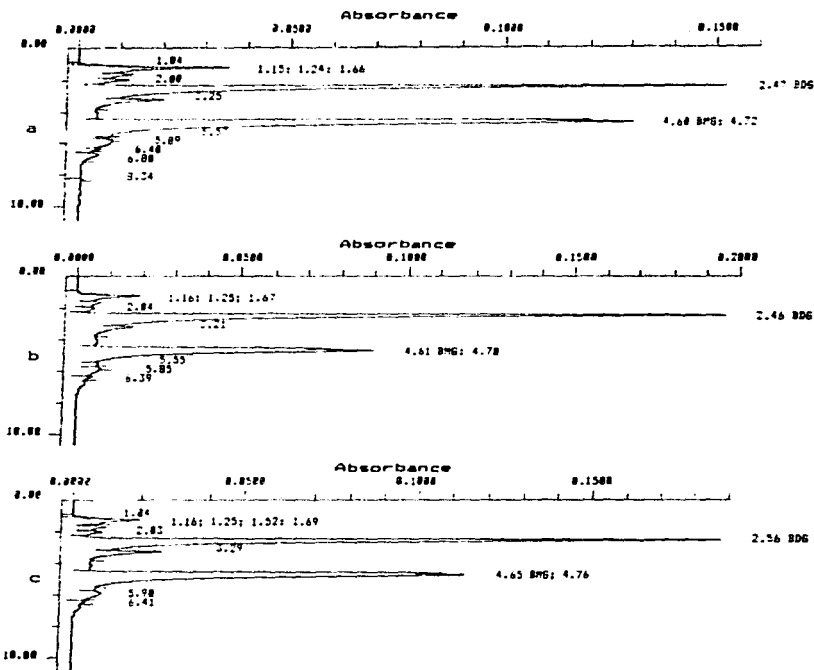


Figura 29. Cromatogramas de muestras de bitis de rata. a) rata 4. b) rata 5. c) rata 6.

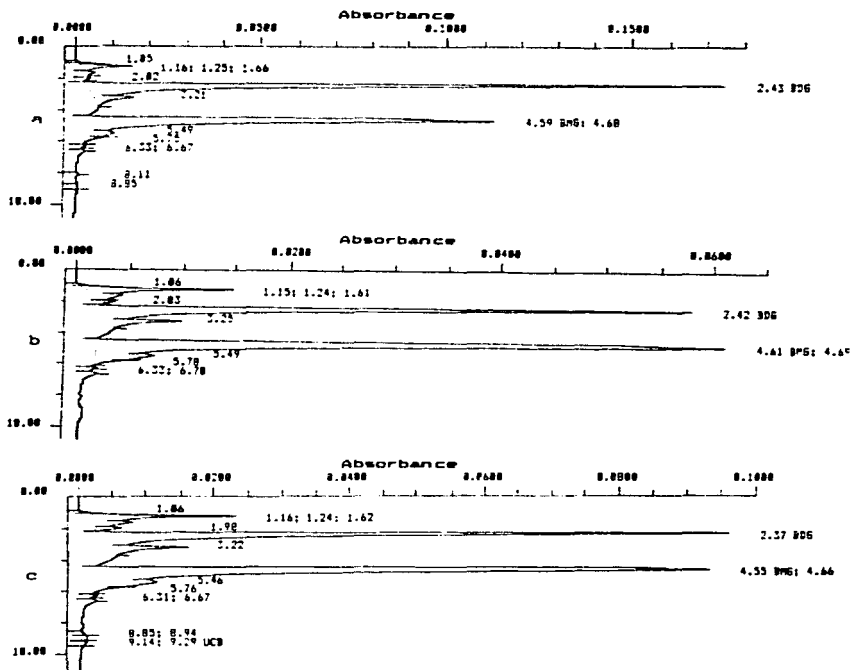
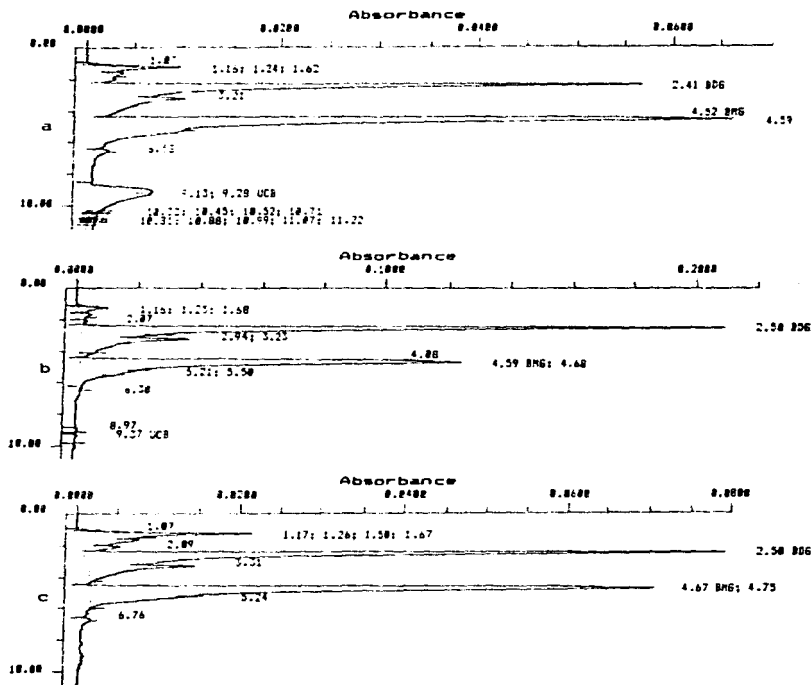


Figura 30. Cromatogramas de muestras de bilis de rata. a) rata 7. b) rata 8. c) rata 9.



**Figura 31.** Cromatogramas de muestras de bílis de rata. a) rata 10. b) rata 11. c) rata 12.

TABLA 12

MUESTRAS DE BILIS DE RATAS										
Rata	Bilirrubina Diconjugada			Bilirrubina Monoconjugada			Bilirrubina no conjugada			Bilirrubina Total
	Tiempo de retención (min)	Conc ( $\mu$ M)	%	Tiempo de retención (min)	Conc ( $\mu$ M)	%	Tiempo de retención (min)	Conc ( $\mu$ M)	%	Conc ( $\mu$ M)
1	2.445	59.8	45.7	4.546	71.0	54.3	-	-	-	130.8
2	2.359	48.9	47.3	4.549	52.7	51.0	9.333	1.8	1.7	103.4
3	2.418	65.5	47.6	4.527	72.1	52.4	-	-	-	137.6
4	2.469	58.4	46.3	4.598	67.7	53.7	-	-	-	126.1
5	2.456	72.3	61.9	4.608	44.5	38.1	-	-	-	116.8
6	2.563	70.1	54.6	4.651	58.2	45.4	-	-	-	128.3
7	2.434	62.6	50.6	4.592	61.2	49.4	-	-	-	123.8
8	2.421	23.4	38.8	4.608	36.9	61.2	-	-	-	60.3
9	2.372	36.5	39.0	4.550	55.4	59.1	9.290	1.8	1.9	93.7
10	2.412	25.7	39.8	4.517	32.3	50.0	9.275	6.6	10.2	64.6
11	2.496	96.1	54.3	4.592	79.1	44.6	9.374	1.9	1.1	177.1
12	2.503	39.1	48.0	4.667	42.4	52.0	-	-	-	81.5
Promedio	2.446	54.9	47.8	4.584	56.1	50.9	9.318	3.0	3.35	112.0
Dev. Est.	0.057	21.1	6.9	0.047	14.9	6.3	0.045	2.4	3.9	33.2
C.V. (%)	2.3	38.4	14.4	1.0	26.6	12.4	0.5	80.0		29.6

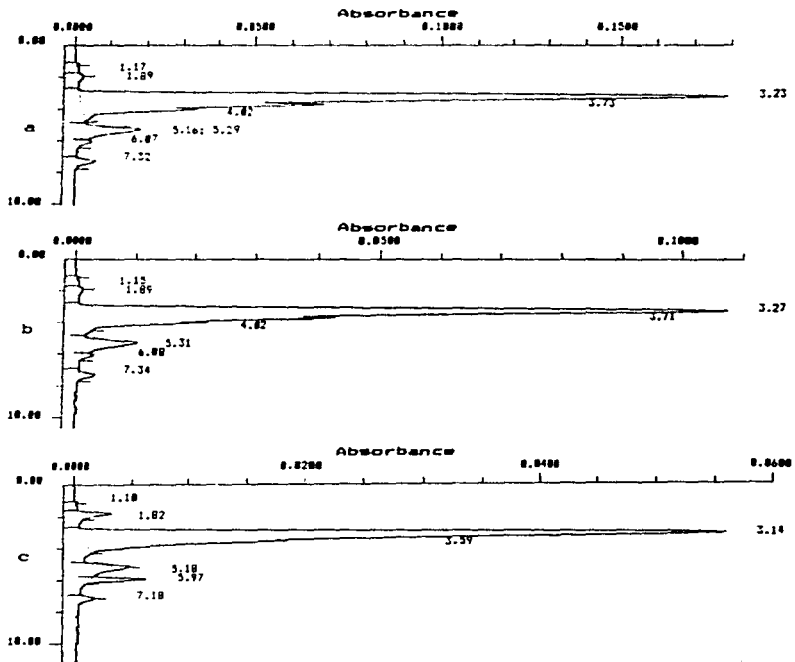


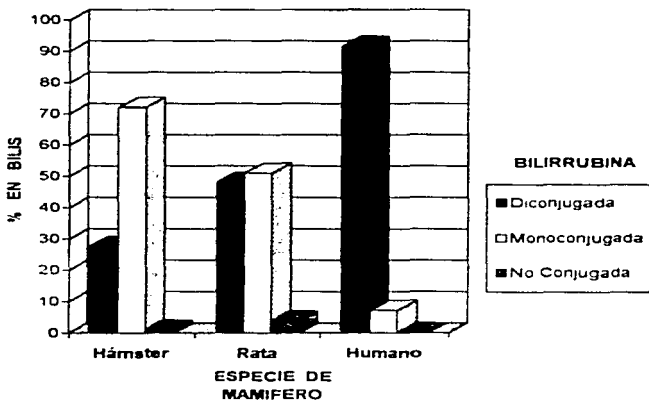
Figura 32. Cromatogramas de muestras de orina de humanos. a) paciente 1. b) paciente 2. c) paciente 3.

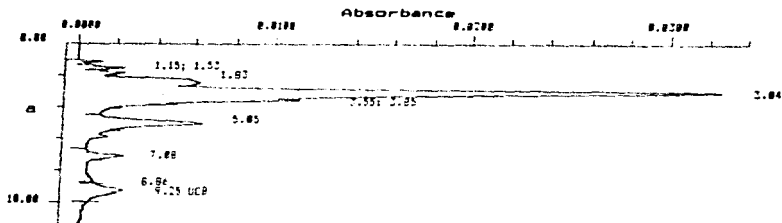


**TABLA 13**

<b>MUESTRAS DE BILIS DE HUMANOS</b>										
<b>Paciente</b>	<b>Bilirrubina Diconjugada</b>			<b>Bilirrubina Monoconjugada</b>			<b>Bilirrubina no conjugada</b>			<b>Bilirrubina Total</b>
	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Conc. (µM)</b>	<b>%</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Conc. (µM)</b>	<b>%</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Conc. (µM)</b>	<b>%</b>	<b>Conc. (µM)</b>
1	3 232	596.0	91.4	5 287	55.7	8.6	-	-	-	651.7
2	3 273	345.2	91.3	5 307	32.9	8.7	-	-	-	378.1
3	3 139	250.8	95.9	5 177	10.7	4.1	-	-	-	261.5
4	3 036	173.7	86.8	5 052	13.6	6.8	9 248	12.9	6.4	200.2
<b>Promedio</b>	3 170	341.4	91.4	5 206	28.2	7.1				372.9
<b>Dev. Est.</b>	0 150	183.6	3.7	0 117	20.8	2.2				200.0
<b>C.V. (%)</b>	3.3	53.8	4.0	2.3	73.8	31.0				53.6

**GRAFICA 3**  
**DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES MOLECULARES DE**  
**BILIRRUBINA EN EL SER HUMANO, HAMSTER Y RATA**





**Figura 32.** Cromatogramas de muestras de bils de humanos. a) paciente 4

Bajo nuestras condiciones de material y disolventes, los tiempos de retención de las distintas especies son un poco más cortos que los originalmente reportados para el método descrito por Spivak y Yuey (14).

En las muestras de hámster, como podemos notar, hay un claro predominio de los monoconjugados sobre las demás especies, lo cual concuerda con lo que previamente se ha determinado y publicado (14,13,4). La bilirubina no conjugada no se encuentra presente en todos los casos, y cuando lo está, aparece sólo en trazas.

En las muestras de rata la proporción de diconjugados es mayor que en las de hámster, encontrándose prácticamente una proporción monoconjugados diconjugados 50 50. Esto coincide con lo reportado por Spivak y Yuey (14).

Sólo se encontraron trazas de bilirubina no conjugada en tres casos, y en uno de ellos una proporción extrañamente elevada. En este último, la concentración total de bilirubina está ligeramente disminuida, sin embargo, se conserva la proporción de mono y diconjugados.

La concentración de bilirrubina total es menor que la presente en la bilis de hámster, y se debe principalmente a una mayor cantidad de monoconjugados (56  $1\mu\text{M}$  en ratas y 153.0  $\mu\text{M}$  en hámster)

En las muestras de pacientes humanos podemos observar que la proporción de mono y diconjugados es muy distinta, la mayor parte de la bilirrubina se encuentra en forma de diconjugados (promedio = 91.4%)

La proporción de especies en los tres primeros casos está de acuerdo a los esperado y reportado (14). En el tercer caso encontramos una baja cantidad de bilirrubina total, y una cantidad excesiva de bilirrubina no conjugada. El patrón de conjugación se mantiene, pero la proporción de cada especie está ligeramente disminuida. Este patrón extraño probablemente sea un resultado falso y no un signo de anormalidad en la conjugación de bilirrubina, ya que la toma de muestra en este paciente fué muy dificultosa, y muy probablemente se contaminó con líquido intestinal o gástrico, el cual pudo diluirla y producir la hidrólisis de los conjugados.

La concentración de bilirrubina total y de cada especie molecular no es muy constante, lo que se refleja en un coeficiente de variación mayor al 20% en las tres especies de mamíferos. Sin embargo, la proporción de diconjugados y monoconjugados de cada mamífero es muy uniforme.

La concentración de bilirrubina total es mayor en los humanos que en los roedores debido principalmente a una mayor cantidad de diconjugados.

Los tiempos de retención se mantienen constantes dentro de cada grupo de muestras, sin embargo, es ligeramente distinto entre las especies de mamíferos estudiadas, siendo mayor en los humanos. El patrón de elución de las especies se conservó.

Los patrones de elución y las proporciones de especies moleculares obtenidos coinciden con lo esperado para el caso de sujetos sanos, lo que nos permite demostrar que el método se comporta adecuadamente y es útil tanto en muestras de seres humanos como en las muestras de los roedores más frecuentemente empleados en experimentación sobre bilirrubina.

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS	
Estandarización de las condiciones de operación	Se obtuvo una línea base estable Tiempo de retención = 9.306 minutos, C.V. = 0.16% El tiempo de retención es reproducible.
Linealidad	$m = 1.35046$ $b = -2.10252$ $r = 0.999833$ Intervalo lineal 50-400 $\mu\text{M}$
Precisión	C.V. = 0.71%
Límite de cuantificación	2.5 $\mu\text{M}$ . Se detecta claramente como un pico.
Exactitud	Promedio de recobro = 100.85% C.V. = 2.18%
Especificidad	<ul style="list-style-type: none"><li>• No hay interferencia bajo las condiciones de manejo y conservación de la muestra.</li><li>• Los productos de degradación generados por un inadecuada o excesiva conservación de la muestra causan interferencia.</li></ul>
Análisis de muestras de bilis de humanos y roedores	<ul style="list-style-type: none"><li>• Patrones de elución y proporción de especies moleculares de bilirrubina de acuerdo a los esperado y reportado en la literatura.</li></ul>

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **6. CONCLUSIONES.**

**En resumen, el método es útil y confiable para ser empleado en investigación**

**Mantiene su linealidad en un amplio intervalo de concentraciones, lo que permite su utilización para la determinación de bilirrubina en bilis. Es un método muy exacto, preciso y con un límite de cuantificación muy bajo. Este último ofrece el potencial para determinar bilirrubina en muestras biológicas donde se encuentra en cantidades muy pequeñas ( heces, suero, tejidos, etc ), siempre y cuando se pueda adaptar la muestra y su tratamiento a las características del método cromatográfico.**

**El método no presenta problemas de interferencias si es conservada adecuadamente la muestra, y es analizada poco después de obtenida. Sin embargo, una mala y excesiva conservación causa interferencias, produciendo valores bajos en la determinación.**

**El método es capaz de separar y cuantificar a la bilirrubina y sus conjugados. Se comporta adecuadamente con muestras de bilis, permitiendo obtener los patrones de elución esperados para las especies de mamíferos probadas.**

## 7. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Billing BH. Intestinal and renal metabolism of bilirubin including enterohepatic circulation. En Ostrow JD (ed) *Bile Pigments and Jaundice*. Marcel Dekker N Y. pág 255-269
- (2) Dong MW, Vandemarck FL, Passalacqua pv. Validating HPLC methods using and intelligent system controller. *American Laboratory* Mayo 1992
- (3) González-Gallego C, Tribelli C. La bilirrubina. *Investigación y Ciencia* Enero 1995 70-77
- (4) Hauser SC, Gollan J. Bilirubin metabolism and hyperbilirubinemic disorders. En *Milward-Sandler GH, Wright R, Arthur MJP. Wright's Liver and Biliary Disease* 3a ed. London WB, Saunders Company, 1992. Cap 14. pág 318-351
- (5) Jansen P., Cuyper HT, Peters WHM. Quantitation of bilirubin conjugates with high-performance liquid chromatography in patients with low total serum bilirubin levels. *European Journal of Clinical Investigation* 1984; 14: 295-300
- (6) Madero García S. *Principios de cromatografía líquida de alta resolución*. Curso Merck-México S.A. 1992.
- (7) Martin CC, William CD. Enterohepatic circulation. En Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, et al. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 3a Ed. Raven Press, 1994. USA. Cap 39. pág 719-767
- (8) Méndez-Sánchez N, Cárdenas R, Ponciano G, Urbe M. Pathophysiology of cholesterol gallstone disease. *Archives of Medical Research* 1996; 27: 433-441.
- (9) Méndez-Sánchez N, Urbe M, Jessurun J, Uscanga L. Patogenia de los cálculos biliares de colesterol. *La Revista de investigación Clínica* 1990, suplemento 42: 53-57
- (10) Ostrow JD, Celic L. Bilirubin chemistry, ionization and solubilization by bile salts. *Hepatology* 1984; 4: 38S-45S.
- (11) Pérez, R. *Principios Básicos de la Cromatografía (HPLC)*. Curso Beckman Instruments S.A. Abril 1997
- (12) Snyder LR, Kirkland JJ. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2a Ed. John Wiley and sons, USA, 1979
- (13) Spivak W, Carey C. Reverse-phase HPLC separation, quantification, and preparation of bilirubin and its conjugates from native bile. *Biochemical Journal* 1985; 222: 787-805.

- (14) Sprvak W Yuey W. Application of a rapid and efficient h.p.l.c method to measure bilirubin and its conjugates from native bile and in model systems. *Biochemical Journal* 1986;234:101-109.
- (15) Stroebel HA, Heineman WR. *Chemical instrumentation a systematic approach* 3a Ed. John Wiley and sons 1989 USA
- (16) *The Merck Index Tenth Edition* Published by Merck & Co. Inc., Rahway, N.J. USA 1983.
- (17) *The United States Pharmacopeia XXII and National Formulary XVII, "Validation of compendial methods"* (U.S. Pharmacopeial Convention Inc. Rockville, MD, 1990)
- (18) Tiribelli C, Ostrow JD. New concepts in bilirubin chemistry, transport and metabolism report of the second international bilirubin workshop April 9-11, 1992, Trieste Italy *Hepatology* 1993 17:715-736
- (19) Yao TC, Stevenson DK. Advances in the diagnosis and treatment of neonatal hyperbilirubinemia. *Clinics in perinatology, sección perinatal hematology* 1995;22:741-758.



## XXVIII. EXPECTACION

No sabría decir por qué algunas cosas me producen  
Una sensación de maravillas inexploradas por venir  
O de grieta en el muro del horizonte  
Que se abre a mundos donde sólo los dioses pueden vivir.  
Es una espectación vaga, sin aliento.  
Como de grandes pompas antiguas que recuerdo a medias,  
O de aventuras salvajes incorpóreas.  
Plenas de éxtasis y libres como un ensueño

La encuentro en puestas de sol y en extrañas agujas urbanas.  
En viejos pueblos y bosques y cañadas brumosas.  
En los vientos del Sur, en el mar, en collados y ciudades iluminadas,  
En viejos jardines, en canciones entreoidas y en los fuegos de la luna  
Pero aunque sólo por su encanto vale la pena vivir la vida  
Nadie alcanza ni advina el don que insinúa.

Hongos de Yuggoth  
H. P. Lovecraft