

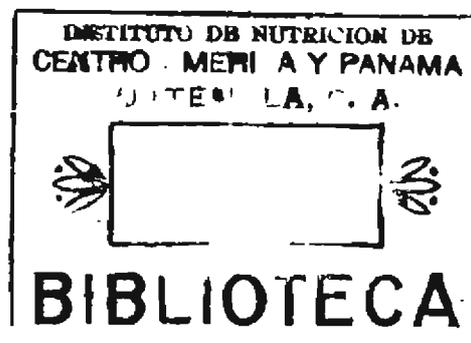
Reimpreso de la Revista del Colegio Médico de Guatemala

VOL. XI

MARZO 1960

NUM. 1

**LA DETERMINACION DEL YODO
LIGADO A LAS PROTEINAS
SERICAS (PBI)**



JOSE MENDEZ
MARTHA ROSA DIAZ

La Determinación del Yodo Ligado a las Proteínas Séricas (PBI)

JOSE MENDEZ Y MARTHA ROSA DIAZ *

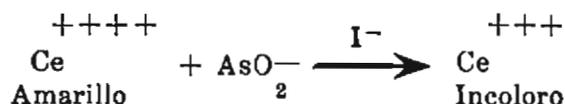
En la clínica endocrinológica, la determinación del estado funcional de la glándula tiroidea es de suma importancia. Los niveles de yodo orgánico del suero, presentan relación directa con la actividad del tiroides. Esta fracción está constituida por la hormona tiroidea, principalmente por la tiroxina y por fracciones de menor contenido de yodo que se encuentran ligadas a las proteínas séricas, tales como la triyodotironina. Por otra parte, la otra forma del yodo sérico, el yodo inorgánico, no refleja directamente el estado funcional de la glándula tiroidea, aunque sí podría reflejar el balance en el organismo entre la ingesta, el metabolismo y la excreción de yodo. La determinación del yodo ligado a las proteínas séricas (PBI), por consiguiente, es una medida de la función tiroidea. Los valores bajos de PBI se asocian con el hipotiroidismo, mientras que los valores altos, por arriba de lo normal, se observan en los casos de hiperfunción de la glándula tiroidea.

La determinación del PBI en el suero, constituye un método que se ha popularizado grandemente debido a que en los últimos años se han encontrado técnicas que pueden ser aplicables en los laboratorios clínicos. Sin embargo, estas técnicas no son fáciles, el procedimiento es tedioso y requiere gran experiencia y cuidado en su ejecución. El objetivo principal de esta publicación es describir y discutir la determinación del yodo ligado a las proteínas séricas (PBI), mediante la técnica de Grossman y Grossman (1) adaptada para ser fácilmente aplicable en los laboratorios clínico-bioquímicos.

PRINCIPIO DEL METODO

Las proteínas del suero y el yodo ligado a las mismas se precipitan con sulfato de zinc e hidróxido de sodio (precipitación de Somogyi). El yodo

inorgánico se elimina por medio de lavados sucesivos con agua destilada. La proteína se destruye por calcinación en medio alcalino y el yodo se determina colorimétricamente mediante la reacción de Sandell y Kolthoff (2), que se basa en la acción catalítica del ión yoduro sobre la reducción de las sales céricas por medio del ión arsenioso. Las sales céricas, que son de color amarillo, al ser reducidas pierden su color.



Esta reacción depende tanto del tiempo de reacción como de la concentración del catalizador y temperatura. Manteniendo el tiempo de reacción constante, así como la temperatura, ésta se vuelve únicamente dependiente de la concentración de yodo. Asimismo, utilizando un exceso de iones céricos, la pérdida de color se puede determinar colorimétricamente. Además, de acuerdo con el método de Grossman y Grossman, tal reacción se detiene a un tiempo estándar por medio del sulfato de brucina, obteniendo así una coloración estable.

MATERIAL Y METODOS

A. Reactivos

1. Agua bidestilada en aparato de vidrio.
2. Sulfato de Zinc al 10%. Disuélvanse 100 g. de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hasta completar un litro con agua bidestilada.
3. Hidróxido de sodio 0.5N. 20 g. de NaOH por litro. Titúlense 10 ml. de la solución de sulfato de zinc con la solución de hidróxido de sodio usando fenolftaleína como indicador, y ajústese la concentración del hidróxido de sodio para que 10.8 a 11.2 ml. den el punto final.

* Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Publicación INCAP E-198.

4. *Carbonato de sodio 4 N.* Empléense 212 g. de Na_2CO_3 anhidro por litro.
5. *Acido clorhídrico 2 N.* Utilicéense 175 ml. de HCl concentrado ($d=1.18$) por litro.
6. *Arsenito de sodio al 1%.* Disuélvase 1 g. de NaAsO_2 y complétese hasta 100 ml. Esta solución también se puede preparar disolviendo 7.6 g. de As_2O_3 y 4 g. de NaOH en una pequeña cantidad de agua bidestilada, hasta lograr un volumen final de 100 ml. Diez ml. de esta solución diluidos a 100 ml. con agua bidestilada constituyen una solución de trabajo similar a la de arsenito de sodio al 1%.
7. *Estándar de yodo. Solución Madre No. 1.* Disuélvanse 130.8 mg. de KI desecado, llévase a volumen de 1 litro con solución de carbonato de sodio 4 N, y guárdese en un frasco pyrex. Esta solución contiene 100 mcg. de yodo por ml.
Solución Madre No. 2. Dilúyanse 10 ml. de la solución madre No. 1 a 100 ml. con solución de carbonato de sodio 4 N y guárdese también en un frasco pyrex. Esta solución tiene una concentración de 10 mcg. de yodo por ml.
Solución estándar de trabajo. Dilúyase 1 ml. de la solución madre No. 2 a 100 ml. con solución de carbonato de sodio 4 N y, al igual que en los casos anteriores, guárdese en un frasco pyrex. Esta solución contiene 0.1 mcg. de yodo por ml.
8. *Acido sulfúrico 7 N.* Dilúyanse 200 ml. de H_2SO_4 concentrado ($d=1.84$) a 1 litro, con agua bidestilada.
9. *Sulfato cérico amoniacal.* Disuélvanse 5 g. de $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y llévase a 1 litro con ácido sulfúrico 7 N.
10. *Sulfato de brucina al 1%.* Utilicéense 1 g. por 100 ml. de solución.

B. Aparatos

Tubos pyrex de paredes gruesas. A. H. Thomas: No. 9454-D. 125×16 mm.

Agitadores de vidrio de 2 mm. de diámetro y 20 cm. de largo.

Centrífuga.

Estufa eléctrica con termostato para mantener la temperatura a 90°C .

Horno de mufla con pirómetro.

Baño de maría, eléctrico con termostato regulable.

Espectrofotómetro o filtrofotómetro (colorímetro) con filtro de transmisión de 420 mu.

C. Procedimiento Analítico

1. *Precipitación y lavado de las proteínas.* En tubos pyrex, dos para cada muestra, se pone 1 ml. de suero y se diluye con 7 ml. de agua bidestilada. Esto se mezcla con los agitadores de vidrio, usando uno para cada tubo; se agrega 1 ml. de la solución de sulfato de zinc, agitando nuevamente, luego 1 ml. de la solución de hidróxido de sodio 0.5 N. Los tubos se agitan bien con los agitadores de vidrio y se dejan reposar durante cinco minutos. Los agitadores se remueven eliminando el material pegado a ellos por frotación con las paredes del tubo y, por último, se lava el agitador con una pequeña cantidad de agua bidestilada (aproximadamente 1 ml.). Estos agitadores tienen que guardarse, ya sea en pequeños tubos de vidrio o en una gradilla de madera, perfectamente identificados para que se puedan usar de nuevo durante todo el proceso.

Cuatro tubos, a los que no se les pone suero, se procesan al mismo tiempo, utilizando dos para «blancos» y dos para el estándar de yodo. Todos los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 2,600 rpm y luego se descarta el sobrenadante por inversión. Los tubos se escurren boca abajo sobre papel filtro. Reinsertando los agitadores de vidrio respectivos a cada tubo, el precipitado se esparce por las paredes y luego, agregando pequeñas cantidades de agua, se agita perfectamente hasta destruir los grumos y obtener una suspensión uniforme. Se agrega más agua destilada lavando las paredes del tubo hasta obtener un volumen aproximado de 10 ml., agitando continuamente para lavar bien el precipitado. El agitador de nuevo se remueve como se ha explicado anteriormente. Repítase la centrifugación y el lavado con agua bidestilada en la forma descrita hasta completar un número de tres lavados, en el último de los cuales, los tubos de nuevo se centrifugan y el sobrenadante se descarta.

A cada tubo que contenga las muestras y a dos tubos de los «blancos», se agrega 1 ml. de solución de carbonato de sodio 4N. Se agitan bien con los agitadores de vidrio respectivos y luego se eliminan los grumos adheridos, por frotación con las paredes del tubo, y se lavan los agitadores con una pequeña cantidad de agua. Algunas veces se prefiere agregar primero 0.8 ml. de la solución de carbonato de sodio, se mezcla bien y luego se lavan los agitadores con 0.2 ml. de la solución de carbonato de sodio.

A los tubos que se han designado para los estándares, se agrega exactamente 1 ml. de la solución estándar que contiene 0.1 mcg. de yodo por ml. (solución estándar de trabajo), y se mezclan con el agitador, lavando éste con una pequeña cantidad de agua.

2. *Incineración.* Todos los tubos se colocan en una estufa a la temperatura de 80 a 90° C hasta llevarlos a sequedad, trabajo que se puede efectuar durante la noche. Los residuos secos luego se incineran en el horno de mufla a la temperatura de 600° C ($\pm 25^\circ$) durante dos horas y media y luego se dejan enfriar a temperatura ambiente.

3. *Determinación de Yodo.* Añádase a los tubos que contienen las cenizas 1 ml. de ácido clorhídrico 2 N, mézclese con los agitadores y déjese reposar durante 10 minutos hasta que la efervescencia haya concluido. Agréguese 1 ml. de agua y mézclese bien, añadiendo luego 5 ml. más de agua bidestilada y agitando perfectamente hasta obtener una suspensión uniforme. Déjese reposar durante 10 minutos y vuélvase a mezclar con el agitador. Quítese el agitador del tubo, esta vez *sin lavarlo* y centrifúguese a 2,600 rpm durante 10 minutos.

En tubos limpios (o directamente en tubos de colorímetro) póngase una alícuota de 3 ml. del sobrenadante de la solución de cenizas y agréguese 0.25 ml. de la solución de arsenito de sodio, mezclándolo bien por agitación. Sujétense todos los tubos a baño de maría a 25° C (temperatura que deberá mantenerse durante toda la reacción) y déjense reposar durante 10 minutos para que la temperatura sea uniforme en todos los tubos. Llévense también las soluciones de sulfato cérico y sulfato de brucina a esa tempera-

tura. Añádase a cada tubo, principiando por los «blancos», 0.5 ml. de la solución de sulfato cérico amoniacal, exactamente cada minuto, usando un cronómetro para controlar el tiempo. A cada adición del reactivo mézclese el contenido con la mayor rapidez posible, y exactamente a los 10 minutos de reacción, agréguese a cada tubo 0.5 ml. de la solución de sulfato de brucina para parar la reacción. Esta adición se debe hacer cada minuto en la misma forma como se hizo la adición del sulfato cérico amoniacal a fin de que el tiempo de reacción en cada tubo sea exactamente de 10 minutos. Al adquirir la experiencia necesaria, esta adición de reactivos se puede hacer cada 30 segundos y así aumentar el número de tubos en cada corrida.

Léase luego la transmisión por ciento en un colorímetro o espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 mu. usando agua destilada para comparación. Las concentraciones de los reactivos descritos son adecuadas para utilizar tubos que tengan un paso de luz (diámetro) de 1.3 a 1.5 cm; esto, sin embargo, no es obligatorio.

4. *Cálculos.* Las lecturas se hacen en transmisión por ciento. La concentración del yodo ligado a la proteína en la muestra se obtiene por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Mcg. PBI por 100 ml.} = 10 \times \frac{\Delta M}{\Delta S} \quad 1)$$

Esta ecuación 1 se deriva de la relación directa entre la concentración de yodo y la reducción de ión cérico (Ce++++), en la forma siguiente.

$$\text{Mcg. PBI por 100 ml.} = \frac{\text{Mcg. I s/tubo} \times \Delta M \times V \times 100}{\Delta S \times V_m \times A_m} \quad 2)$$

La concentración de yodo en el tubo estándar (S) es igual a:

$$\text{Mcg. I s/tubo} = \frac{(\text{Mcg. I s/ml}) \times V_s \times A_s}{V_{ds}} \quad 3)$$

Sustituyendo en la ecuación 2 el valor obtenido en la ecuación 3, queda:

$$\text{Mcg PBI por 100 ml.} = \frac{(\text{Mcg I}_2 \text{ s/ml}) \times V_s \times A_s \times V_{dm} \times \Delta M \times 100}{V_{ds} \times A_m \times V_m \times \Delta S} \quad 4)$$

Si V_m es igual a V_s , A_m igual a A_s y V_{dm} igual a V_{ds} , la ecuación 4, por consiguiente, queda reducida a:

$$\text{Mcg PBI por 100 ml.} = \frac{(\text{Mcg I}_2 \text{ s/ml.}) \times \Delta M \times 100}{\Delta S} \quad 5)$$

De acuerdo con el procedimiento indicado en esta presentación, la concentración de yodo del estándar (Mcg I_2 s/ml.) es de 0.1 mcg por ml. y, substituyendo esta concentración en la ecuación 5, se obtiene así la ecuación 1.

$$\text{Mcg. PBI por 100 ml.} = 10 \times \frac{\Delta M}{\Delta S}$$

S = Estándar.

m = Muestra.

V_m = Volumen de muestra usado.

V_s = Volumen de estándar usado.

V_{dm} = Volumen de dilución de la muestra.
(Volumen total de soln. cenizas)

V_{ds} = Volumen de dilución del estándar.
(Volumen total de soln. cenizas)

A_m = Alícuota de la solución de cenizas de las muestras.

A_s = Alícuota de la solución de cenizas del estándar.

ΔM = Lectura muestra - Lectura «blanco»

ΔS = Lectura estándar - Lectura «blanco»

DISCUSION

Capacidad de Reacción del Sistema.

Debido a que la capacidad del sistema es limitada en cuanto a la reacción del sulfato cérico con el ión arsenito, los valores de yodo arriba de 16 microgramos por 100 ml. de suero no siguen la

línea recta en la relación negativa color-concentración de yodo y, por lo tanto, en estas condiciones se obtienen resultados más bajos que los valores reales, tal como lo ilustra la Gráfica. Si esto sucediere, sin embargo, la dificultad se puede obviar utilizando la mitad de la muestra (0.5 ml. de suero). Como se puede observar, se obtuvo relación lineal hasta niveles de 0.07 mcg. de yodo por tubo, concentración que corresponde a un valor de 16.31 mcg. de PBI por 100 ml. de suero. Esta observación es aún más importante cuando la cantidad de yodo de la muestra se calcula por medio de los llamados «estándares internos», es decir, agregando una cantidad estándar de yodo a cada alícuota de la solución de cenizas de las muestras, ya que el cambio debido al estándar, en este caso, podría ser leído en la parte plana de la curva, lo que daría resultados extremadamente elevados.

Significado Fisiológico de los Valores del PBI.

Generalmente se aceptan como valores normales del PBI entre 4 y 8 microgramos por 100 ml.; sin embargo, algunos autores (3-7) han considerado como límites valores que oscilan de 3.4 a 8 microgramos. En personas que no manifiestan sintomatología clínica se pueden encontrar valores altos de PBI. Esto se observa corrientemente durante el embarazo, pudiendo muchas veces presentarse niveles hasta de 12 microgramos por 100 ml. (8,9). También se han observado niveles altos de PBI en niños recién nacidos, pero éstos bajan a los niveles normales entre la cuarta y octava semanas (10). Por otra parte, se han notificado niveles bajos de PBI, sin que haya sintomatología de hipotiroidismo, en casos de nefrosis (4, 11). En pacientes de cirrosis los niveles del PBI son bajos, mientras que en los casos de hepatitis los niveles de PBI son altos en las primeras semanas de la enfermedad, y descienden a niveles normales en la cuarta semana (12).

Mucho se ha especulado sobre la *significancia* del PBI en relación con la hormona tiroidea y algunos autores han indicado que la única medición real de la hormona se hace en la fracción de yodo soluble en butanol (BEI). Sin embargo, Man y colaboradores (10) han demostrado que los valores de PBI únicamente son 0.5 mcg. más altos que los que se determinan por extracción con butanol.

Precauciones Necesarias para Evitar Valores Erróneos.

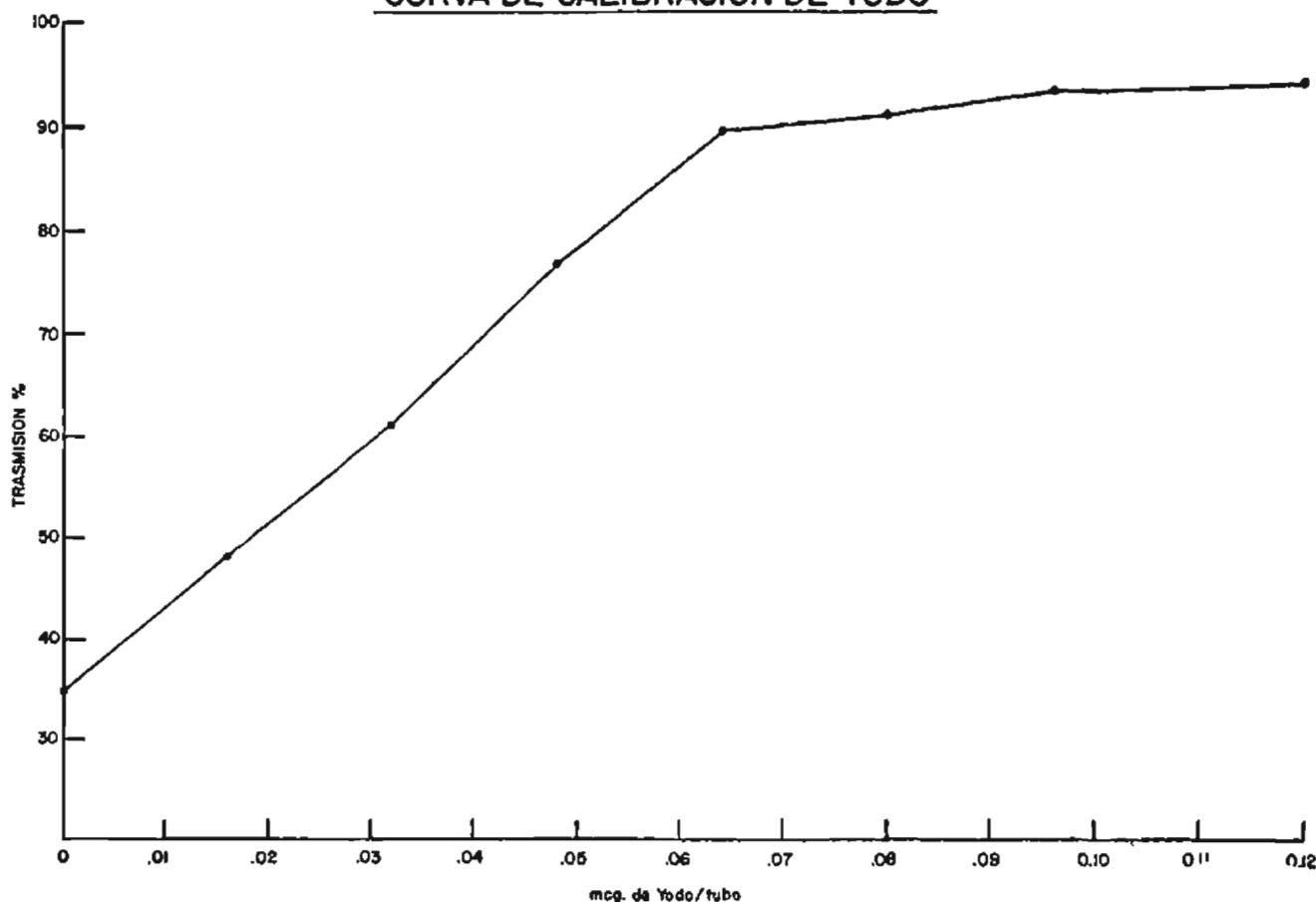
La presencia de yodo inorgánico en el suero puede obstaculizar la determinación del PBI cuando los niveles sobrepasan de 250 mcg. por 100 ml. Se ha demostrado (5) que el 99% del yodo inorgánico es eliminado en los tres lavados del precipitado de proteínas indicados en el método. Sin embargo, la presencia de cantidades fuertes de yodo inorgánico en el organismo puede interferir esta determinación, debido a la capacidad que tiene de unirse a las proteínas y formar compuestos yodados que

no son de carácter hormonal. Otras precauciones en cuanto a sustancias que interfieren la determinación del PBI deben aplicarse al uso de compuestos yodados, como el lugol y otras sustancias utilizadas corrientemente en la radioscopia, recomendación que también se debe tener presente en lo que respecta a drogas empleadas en el tratamiento de enfermedades de la tiroides, efectos éstos que generalmente desaparecen en el término de 1 a 6 meses. En el caso del Lipiodol usado intratecalmente, el efecto puede llegar a durar hasta 5 años.

Para la determinación del PBI no es necesario extraer la sangre en ayunas ni mantener previamente al paciente en reposo. El material para recolectar las muestras se debe lavar con mezcla sulfocrómica o ácido nítrico diluido y luego ser perfectamente lavado con agua bidestilada libre de yodo. Esta misma precaución se debe observar en el caso del material a utilizar en el laboratorio para la determinación de yodo.

CURVA DE CALIBRACION DE YODO

FIGURA 1



Esta curva se efectuó haciendo diluciones de la solución madre No. 2, así: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, y 7 ml y diluidas a 10 ml con agua bidestilada. A 2 ml de estas soluciones se les añadió 1 ml de HCl 2 N y 4 ml de agua bidestilada. La determinación de yodo se efectuó en una alícuota de 3 ml de estas soluciones, usando el método descrito en el presente trabajo. El espectrofotómetro empleado fue el Spectronic 80 de la casa Bausch and Lomb.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe, con fines de divulgación, la técnica de Grossman y Grossman usada para la determinación del yodo ligado a las proteínas séricas. Se sugieren ligeras modificaciones con el propósito de hacer esta técnica fácilmente adaptable en los laboratorios clínico-bioquímicos.

REFERENCIAS

1. Grossman, A. y Grossman, G. F.: Protein-bound iodine by alkaline incineration and a method for producing a stable cerate color. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism.* 15:354, 1955.
2. Sandell, E. B. y Kolthoff, I. M.: Chromometric catalytic method for the determination of micro-quantities of iodine. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 1426, 1934.
3. Brown, H., Reingold, A. M. y Samson, M.: The determination of protein-bound iodine by dry ashing. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism.* 13:444, 1953.
4. Kydd, D. M., Man, E. B. y Peters, J. P.: Concentration of precipitable iodine (SPI) in the serum. *J. Clin. Invest.* 29:1033, 1950.
5. Barker, S. B., Humphrey, M. J. y Soley, M. H.: The clinical determination of protein-bound iodine. *J. Clin. Invest.* 30: 55, 1951.
6. Blackburn, C. M. y Power, M. H.: Diagnostic accuracy of serum protein-bound iodine determination in thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism.* 15:1379, 1955.
7. Tucker, R. G. y Keys, A.: Concentration of serum protein-bound iodine in normal men. *J. Clin. Invest.* 30:869, 1951.
8. Stoffer, R. P., Koeneke, I. A., Chesky, V. E. y Hellwig, C. A.: The thyroid in pregnancy. *Am. J. of Obs. and Gyn.* 74:300, 1957.
9. Méndez, J., Scrimshaw, N. S., Abrams, M. D. y Forman, E. N.: Serum lipids and protein-bound iodine levels of Guatemalan pregnant women from two different socio-economic groups. *Am. J. of Obs. and Gyn.* En prensa.
10. Man, E. B., Pickering, D. E., Walker, J. and Cooke, R. F.: Butanol-extractable iodine in the serum of infants. *Pediatrics* 9:32, 1952.
11. Peters, J. P. y Man, E. B.: The relation of albumin to precipitable iodine of serum. *J. Clin. Invest.* 27:397, 1948.
12. Kydd, D. M. y Man, E. B.: Precipitable iodine of serum (SPI) in disorders of the liver. *J. Clin. Invest.* 30:874, 1951.

NOTA:

Cuando se refiere al suero sanguíneo sérico se escribe con *s*, pero cuando se refiere a las sales de *cerio* se escribe con *c*: sales *céricas*.