

Tesis de Posgrado

Valoración del yodo proteico en el suero humano según el método de Barker modificado por Carr y Col., y adaptación de dicho método a la determinación de yodo total en tiroides de sapos normales e hipofisoprivos

Scacciati, Josefina María

1956

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Scacciati, Josefina María. (1956). Valoración del yodo proteico en el suero humano según el método de Barker modificado por Carr y Col., y adaptación de dicho método a la determinación de yodo total en tiroides de sapos normales e hipofisoprivos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0907_Scacciati.pdf

Cita tipo Chicago:

Scacciati, Josefina María. "Valoración del yodo proteico en el suero humano según el método de Barker modificado por Carr y Col., y adaptación de dicho método a la determinación de yodo total en tiroides de sapos normales e hipofisoprivos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1956.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0907_Scacciati.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

VALORACION DEL YODO PROTEICO EN EL
SUERO HUMANO SEGUN BARKER, CARR Y
COL. Y ADAPTACION DEL METODO AL DO-
SAJE DE YODO TOTAL EN TIROIDES DE
SAPOS

(Resumen de la Tesis presentada por Josefina María Scacciati a
la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales para optar al tí-
tulo de Doctora en Química.)

Res. de Tesis: 907

Ben fox

FOFNA

PARTE TEORICA:

Luego de una introducción acerca de la historia de la investigación del metabolismo del yodo, se hace un estudio teórico de las distintas sustancias designadas con el nombre de hormona tiroidea, se mencionan algunos métodos químicos y biológicos para dosar hormona tiroidea, se describe luego el método de Barker y se hace un estudio teórico del mismo.

PARTE EXPERIMENTAL:

Consta de 2 partes:

1°) Valoración del Yodo Proteico en el suero humano según el método de Barker modificado por Carr y colaboradores la cual tiene por objeto ayudar en el diagnóstico clínico de las enfermedades de la glándula tiroides y otras que son consecuencia de anormalidades tiroideas.

2°) Aplicar la técnica antedicha al dosaje de yodo proteico, no proteico y total en suero de sapos, (para hacer estudios de fisiología en estos animales), lo cual resultó infructuoso pues los resultados obtenidos se mantuvieron dentro del orden de los blancos. Por eso, las investigaciones se orientaron hacia la adaptación del método al dosaje de yodo en tiroides de sa-

pos:

a) normales

b) hipofisoprivos

c) inyectados con extractos de lóbulo anterior de hipófisis.

Los puntos a, b y c se desarrollarían para animales machos y hembras en distintas épocas del año para observar las variaciones sexuales y estacionales.

Los resultados permitirían estudiar la interrelación entre las hormonas: hipofisiaria (tirotrofina) y tiroidea expresada como yodo intratiroideo total, como yodo contenido por 100 mgr de tejido fresco tiroideo y como yodo contenido por 100 gr de peso del cuerpo.

A cada valor se le halló el error medio de cada observación y el error cuadrático medio. Al valor promedio de los obtenidos en n animales

se le averiguó el error medio del promedio. Se halló el error relativo del resultado y con estos datos se dió el resultado final.

Por dificultades técnicas solamente pudieron consignarse una serie de datos cuyos resultados finales son:

Sapos operados en invierno:

Normales:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,17 \pm 0,01$ mgr

Yodo intratiroideo total: $3,3 \pm 0,4$ %

I₂/100 gr peso del cuerpo: $2,4 \pm 0,3$ %

Hipofisoprivos de 6 días:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,09 \pm 0,01$ mgr

Yodo intratiroideo total: $2,9 \pm 0,3$ %

I₂/100 gr peso del cuerpo: $1,7 \pm 0,2$ %

Hipofisoprivos de 15 días:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,08 \pm 0,02$ mgr

Yodo intratiroideo total: $2,3 \pm 0,8$ %

I₂/100 gr peso del cuerpo: $1,6 \pm 0,5$ %

Operados durante la primavera:

Normales:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,10 \pm 0,01$

Yodo intratiroideo total: $3,5 \pm 0,4$ %

I₂/100 gr peso del cuerpo: $3,2 \pm 0,4$ %

Hipofisoprivos de 3 días:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,146 \pm 0,006$ mgr

Yodo intratiroideo total: $4,8 \pm 0,9$ %

I₂/100 gr peso del cuerpo: $3,2 \pm 0,6$ %

Hipofisoprivos de 10 días:

Porcentaje I₂ en tejido fresco tiroideo: $0,09 \pm 0,01$

Yodo intratiroideo total: $2,2 \pm 0,5$ %

FOTNA.

I₂/100 gr peso del cuerpo: $1,8 \pm 0,1 \%$

CONCLUSIONES: En humanos: Los valores hallados en entiroideos oscilan entre $4,5 \%$ y 8% ($\%$ por 100 ml de suero).

Para hipotiroideos se hallaron valores entre menos de 1% /100 ml de suero y 4% /100 ml. Para bocios nodulares y difusos no tóxicos se halló entre $2,5 \%$ /100 y $10,2 \%$ /100. Para hipertiroideos entre $8,6 \%$ /100 y 16% /100. (En estos casos los valores consignados son los mínimos y máximos hallados respectivamente).

En animales: El procedimiento descrito no difiere esencialmente del expuesto por Barker. Nuestro objeto fué aplicar esta técnica al dosaje de yodo en suero y en tiroides de sapos y fijar los detalles precisos de técnica que deben cuidarse con ese fin.

De estar presente hormona tiroidea circulante en estos animales, las cantidades de nuestra requeridas para hacer las determinaciones hubieran hecho necesario introducir cambios fundamentales en el método pues aún duplicando la cantidad de suero y no precipitando las proteínas obtuvimos transmisiones ópticas del orden de los blancos.

Para efectuar dosajes en tiroides no aconsejamos hacer una hidrólisis previa de la glándula con HONa y trabajar con una parte alícuota pues sería engorroso y conduciría a pérdidas de muestra. Es preferible colocar la glándula entera (junto con la solución de HONa 2 % en la cual se recoge) dentro del balón y al final de la operación de destilación elegir la dilución adecuada para hacer las lecturas en el fotocolorímetro.

Desde el punto de vista biológico se concluyó: La hipofisectomía, produce un descenso en el contenido de yodo de la tiroides el cual parece manifestarse después del 6° día de hipofisectomizado el animal (en invierno).

En los operados en primavera se observa que después de 10 días de

PO-BA

hipofisectomizados se manifiesta un descenso en el contenido de yodo expresado en yodo / 100 gr de peso del cuerpo mientras que el % de yodo tiroideo no sufrió alteración apreciable.

Dr. G. Saccat

---000---

VALORACION DEL YODO PROTEICO EN EL SUERO
HUANO SEGUN EL METODO DE BARKER MODIFI-
CADO POR CARR y COL., Y ADAPTACION DE DI-
CHO METODO A LA DETERMINACION DE YODO TO-
TAL EN TIROIDES DE SAPOS NORMALES E HIPO-
FISOPRIVOS

Por la exalumna: JOSEFINA MARIA SCACCIATI

Padrino de tesis: Dr. JORGE MENDIVE

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de
Universidad Nacional de Buenos Aires para optar al título de Doc-
tora en Química.

Buenos Aires
1956

TESIS: 907

6-1-1957



FOFBA

Deseo agradecer especialmente al Profesor Dr. Bernardo A. Houssay por haberme sugerido el tema del presente trabajo, por su apreciable guía en todo momento y por el suministro de material biológico y animales de experimentación como, asimismo, de toda clase de información bibliográfica por parte del Instituto de Biología y Medicina Experimental de su dignísima dirección.

Presento también el testimonio de mi mayor agradecimiento al Dr. Jorge Mendive por su dirección y estímulo en la realización de este trabajo.

Al Profesor Dr. Enrique B. del Castillo quien me orientó por el camino de la investigación científica al permitirme hacer uso de los laboratorios de Yodo Proteico del Hospital Rivadavia que dependen del Servicio de Endocrinología que funciona bajo su dirección en dicho nosocomio y que es donde he realizado este trabajo.

Al Dr. Carlos E. Rapela del Instituto de Biología y Medicina Experimental por las operaciones de hipofisectomía realizadas como así también por la enseñanza de dicha técnica.

Al Dr. Miguel A. Etcheberry, Director del Laboratorio Central del Hospital Rivadavia y a los profesionales de la Comisión Nacional de la Energía Atómica quienes me permitieron disponer de los mencionados laboratorios e hicieron posible así mi trabajo.

Y finalmente a todas las personas que en una u otra forma han prestado su colaboración en la realización de este trabajo.

INDICE

Parte teórica:

Introducción histórica	pg. 1
Hormona tiroidea, su constitución	" 5
Síntesis natural de la tiroxina en la tiroides	" 6
La tiroglobulina	" 9
Generalidades sobre la relación entre la estructura química y la actividad fisiológica de los aminoácidos tiroideos	" 10
La tiroxina	" 11
La diyodotirosina: Constitución y propiedades	" 12
La tironina	" 13
La triyodotironina	" 13
Descripción somera de los distintos métodos químicos usados para la determinación de P.B.I.	" 14
Métodos biológicos para dosar h. tiroidea	" 19
Descripción del método de Barker S.B.(1948) modif. por Carr E.A. y colaboradores (1950)	" 21
Breve estudio de los métodos fotométricos para dosar yodo (con especial referencia al método de Barker)	" 27
Recuperación	" 29
Características de la absorción de la luz de las soluciones de $(SO_4)_2Ce$	" 30
Cinética de la reacción $AsO_3^{\frac{3-}{}} + 2 Ce^{4+} + H_2O \rightarrow AsO_4^{3-} + 2Ce^{3+} + 2H^+$..	" 31
El método de Barker modif. por Carr y el dosaje final de yodo	" 33

Parte Experimental

Introducción	" 38
Preparación de reactivos	" 39
Recuperaciones	" 43
Valoración del Yodo Proteico en el suero humano	" 43
Conclusión	" 45
Intentos de valoración del Yodo Proteico y Yodo total en plasma de sapos normales	" 46
Determinaciones en tiroides de ratas normales	" 47
Determinaciones en tiroides de sapos normales	" 48
Experiencias realizadas en sapos operados durante el invierno(1956) ..	" 50
Experiencias en animales operados en primavera (año 1955)	" 55

Calculo de errores en los:

valores obtenidos en los animales operados en el invierno	pg. 58
valores obtenidos en los animales operados en la primavera	" 60
Resumen de los valores hallados	" 63
Conclusiones	
desde el punto de vista biológico	" 63
desde el punto de vista químico	" 64
Bibliografía	" 66

ARTE TEORICA

a) Introducción Histórica:

La historia de la investigación del metabolismo del yodo puede dividirse en 4 períodos:

- 1) Período de Chatin
- 2) de E. Bauman a E.C. Kendall
- 3) de Kendall a Von Fellenberg y C.R. Harington
- 4) de Von Fellenberg y Harington hasta nuestros días.

1) Aunque antes que Chatin otros investigadores realizaron estudios sobre el metabolismo del yodo, sus numerosos trabajos científicos (especialmente durante el último cuarto del siglo pasado), hacen que este período lleve su nombre.

Poco después que en 1811 Courtois descubriera el yodo y que Gay Lussac probara que era uno de los 4 halógenos, se le halla eficaz en el tratamiento del bocio. En 1816, Percut, (luego de probar en experiencia consigo mismo su inocuidad en pequeñas dosis), lo introduce en Inglaterra con ese fin y 3 años después lo adoptan en el Hospital Thomas en Londres. Para el tratamiento del bocio lo adoptan también Coindet y Straub en 1820 y poco después Charles Coindet. Naturalmente la interrelación entre yodo y bocio no era muy clara en esa época. Años antes de Cristo, los chinos habían usado yodo sin saberlo en medicinas misteriosas para combatir el bocio (Li-si-chan, etc.).

En 1850, se publica el método de Roubardin, Chatin, por medio de este método pudo llegar a detectar hasta 0,1% de yodo. Estableció de esta modo la existencia de pequeñas cantidades de yodo en organismos vivos y en la naturaleza o hizo notar por otra parte que el bocio y el cretinismo se manifiestan en regiones donde el agua, el suelo, el aire y los alimentos son pobres en yodo.

Otros investigadores no hallaron yodo en la naturaleza ni aún investigando grandes cantidades de muestra por lo que Chatin no halló mucho apoyo entre sus contemporáneos. Sin embargo en 1852, miembros de la Academia de Ciencias de París confirmaron la existencia de yodo en la naturaleza.

Chatin no investigó las propiedades químicas de la tiroides y Lambert (1862) llamó la atención al respecto.

Las investigaciones químicas sobre la tiroides comenzaron en 1883

con Bubnow.

2) En 1895 Kocher hizo notar la existencia de yodo en la tiroides, Baumann en un principio estuvo en desacuerdo con él, sin embargo fué Baumann quien el 28 de febrero de 1896 lo aisló experimentalmente de la tiroides y afirmó que estaba unido a una proteína. Baumann afirmó que el yodo es el constituyente fundamental de la sustancia activa que él aisló hirviendo material tiroideo varias horas con SO_4H_2 10 % y que llamó "yodo tizina". En 1895 probó, junto con Ross, que dicha sustancia producía efectos reparativos en la tiroides. Es de notar que aún en 1917 hubo autores que negaban la presencia o significación del yodo en la tiroides. Sin embargo en 1896 Oswald, discípulo de Baumann, aisló "yodo tiroglobulina", primero con 1,66 % de yodo y luego con técnica perfeccionada con 14,48 %. Fué entonces ésta, la sustancia activa tiroidea objeto de numerosos estudios posteriores. Baumann afirmó que en el bocio el contenido de yodo decrece. Oswald decía lo contrario, Aún hoy el asunto no está bien aclarado.

En 1899 Callord aisló yodo de 100 ml de sangre de conejo por el método de Rabourdin pero obtuvo valores altos: (420%) en sangre normal. Un año más tarde Gley y Borcet hallaron valores entre 1,5 y 11,2% de yodo en la sangre de carótida de perro, pero ellos estaban lejos de postular la existencia del yodo en combinación proteica en la sangre.

Durante este período se confirmó que la diyodotirosina es inactiva. En 1909 - 1910 Wheeler y Mendel describieron un compuesto llamado ácido yodo gorgónico hallado en ciertos corales oceánicos (coral de Gorgonia) como la 5,5 di yodo - 1 - tirosina y lo obtuvieron sintéticamente por acción del yodo en la tirosina. Y fueron Voegthin y Strouse quienes comparando la acción de la diyodo tirosina con la del polvo tiroideo (de tiroides desecada) hallaron que la primera es inactiva.

Nürnberg (1907 - 1909) obtuvo por hidrólisis de tiroides con $(\text{HO})_2\text{Ba}$ un compuesto yodado activo y quiso conocer su naturaleza química. (No halló diyodo tirosina en el filtrado y no prestó atención al pptado.) Nürnberg pensó que el compuesto activo estaba unido a tiroxina o a triptofano. Kendall, por otra parte sugirió que la tiroxina hallada por él y aislada en 1919 era ácido 4 - 5 - 6 triyodo 2 - 4 - 5 - 6 - tetrahidro 3 - oxo indol - 5 propiónico (tiroxindol). En 1927, Harrington y Barger muestran que la tiroxina no es derivado del triptofano sino de la tiro-

sina.

Otros hechos de importancia durante este período fueron: En 1907 - 1911 Maize y Col. (Hosp. Montefiore de New York) comprueban que el contenido normal de yodo en tiroides está entre 0,1 - 0,55 % y que a menos del 0,1 % hay hiperplasia tiroidea.

En 1907 Ligneris es el 1° en usar animales de experimentación para estudiar la morfología de la tiroides.

Entre 1913 y 1914 Seidell y Fenger prueban variaciones estacionales en la tiroides.

En 1912, Dreytner elabora, en base a experiencias hechas en animales, su teoría de que el coloide es una sustancia de reserva de la tiroides y anuncia que la acumulación (hyporrho) y la desacumulación (hyperrho) del coloide resultan de los cambios funcionales de actividad tiroidea, los que a su vez dependen de los distintos requerimientos de la hormona en el organismo.

3) Aislación del principio activo en la tiroides.

El 25 de diciembre de 1914, Kendall obtiene la sustancia tiroidea activa en forma cristalina. Fué de opinión que la actividad tiroidea depende del contenido en yodo de la glándula. El método se basó en hidrólisis con HO N_2 (usado infructuosamente por Nürnberg) y posterior acidificación. Obtuvo así: fracción A ácido insoluble y fracción B ácido soluble. La 1° contiene tiroxina y parte de diyodo tirosina y la 2° diyodo tirosina. La aislación de la sustancia tiroidea activa constituyó un trabajo de fundamental importancia y que dió comienzo a una nueva era en el estudio de la fisiología y patología del metabolismo del yodo y de la tiroides. El contenido de tiroxina aislado por Kendall fué, sin embargo, muy pequeño (33 g. de cada 3000 Kg de tejido fresco).

En 1916, Kendall y Wilson comprueban que la fracción A (tiroxina) disminuyó apreciablemente en la tirotoxicosis y en 1920 Kendall y Richardson confirmaron lo dicho por Gley y Bourcet de que el yodo es un constituyente fisiológico de la sangre. Haciendo determinaciones de yodo en 100 ml de sangre, ellos mostraron por 1° vez que las variaciones cuantitativas de yodo están entre 10 y 17^X %, promedio 13^X % (valores un poco altos pero bastante aproximados para la época). Otros investigadores obtuvieron resultados semejantes.

4) El 4° período es aquél en el cual numerosos problemas sobre el metabolismo del yodo han sido abordados. Es una etapa de numerosos estudios en la que, cada investigador contribuye con su propio esfuerzo hacia el desarrollo de los actuales conocimientos acerca de la fisiología y patología del metabolismo del yodo.

En 1924 Fellenberg elaboró un micro método basado en los principios del de Rabourdin y Chatin, método rápidamente adoptado aunque adoleciera de algunos defectos hallados más tarde por el propio Fellenberg y por otros investigadores. También aparecieron (entre 1922 y 1938) los estudios de Mc. Clendon y sus colaboradores que fueron publicados aunque sus métodos no fueron adoptados.

Estos dos últimos investigadores confirmaron sin embargo con sus estudios las investigaciones de Chatin. Bajo la influencia de Fellenberg y M. Clendon, Eggenberger (1922 - 1927) (Eggenberger en 1927 formuló su hipótesis de que la pituitaria y la paratiroides producen yodo en pequeñas cantidades) comienza su tratamiento de bocio preventivo con yodo en gran escala y en 1923 Plummer introduce su tratamiento de tirotoxicosis con yodo. Su tratamiento preparatorio fué adoptado.

En 1924 Gley y Cheymol (Gley en 1901 había hallado que en tirotoxicosis el contenido en yodo estaba disminuido) demostraron el pasaje de la hormona tiroidea a la sangre usando el método de Kendall y hallaron que el nivel del yodo está entre 4,3 - 25% en sangre de carótida mientras en sangre eferente de tiroides está entre 5 y 50%. Esta diferencia lo llevó a la conclusión de que el yodo hormonal pasa a la sangre. Las relaciones entre los disturbios en el metabolismo del yodo con los disturbios en la función tiroidea, estimularon a otros autores a investigar sobre el metabolismo del yodo y fueron puestas de manifiesto por 1° vez por Veil y Sturm en 1925.

En 1929 Harington, Randall y Foster aislaron diiodo tirosina de la tiroides. Harington había previamente (1925) preparado ácido 3,4,5 triiodo fenilpirrolidincarboxílico creyendo que era un isómero de la tiroxina pero inactivo, y hasta la aislación de la tiroxina hecha por el mismo (por hidrólisis de tiroides con $(HO)_2 Ba$ 10%) lo sostuvo. Sin embargo cuando la estudió químicamente (1926) la describió como un derivado de la tirosina. Dijo que su fórmula era: $C_{15} H_{11} O_4 NI_4$. Simultáneamente y por o-

tro camino llegaron H.D. Dahin.

En 1930 - 31 Harington y colaboradores aislaron tiroxina y diiodo-tirosina de la tiroides por acción de enzimas proteolíticas y comprobaron la existencia de estos compuestos que contienen yodo como sustancias naturales contenidas en la tiroides y no sustitutos artificiales de ella.

En 1929 Leo-Loeb del Dto. de Patología de la Universidad de St. Louis y 6 meses después, independientemente, Aron del Instituto Histológico de Estrasburgo, obtuvieron hormona tirotrófica del lóbulo anterior de hipófisis. Desde entonces aparecen numerosos estudios respecto a la influencia de estas 2 glándulas (tiroides y pituitaria) en el metabolismo del yodo.

Desde 1930 en adelante aparecen muchos investigadores dignos de mención en fisiología y patología de la tiroides y metabolismo del yodo: Abelin y col. Barnes y col. Bulmann, Breitner, A.T. Cameron, Conzanelli, Closs, Courth, Curtis y col., Dodds y col., Elmer y col., Eufinger, Falsold, Feus, Foster y col., A.B. Gutman y col., Grab, Harington y col., Houssay y col., Leland, Lerman, Loehr, A. Loeser, Lunde y col., Mc. Carrison, Mc. Clendon, y col., Mc. Cullagh, Means y col., Nitschke, Orr y col., Paal, Palmer, Perkin y col., Pfeiffer, Pighini, Salter, Scharrer, Scheffer, Scherringer, Schittenhelm y col., N.O. Thompson y col., Lawadovsky y col y muchos otros.

b) Hormona tiroidea - Su constitución:

La designación de hormona tiroidea es en realidad un término genérico con el que se designa a una serie de sustancias fisiológicamente activas segregadas por la glándula tiroides y que tienen acción específica en el mixedema y en el cretinismo. Se trata de sustancias de propiedades físicas y químicas distintas pero que tienen en común un determinado grupo de fórmula $\text{HO} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{CH}_2 - \text{CH N H}_2 - \text{COOH}$, la tiroxina, cuya acción es específica en la curación del mixedema y del cretinismo. Además las sustancias agrupadas bajo la designación de hormona tiroidea poseen I_2 sustituido en el núcleo de la molécula de tironina; dichas sustancias son las que figuran en el siguiente esquema:

- 1) Tiroglobulina
- 2) sus productos de degradación: albumosus, peptonas, polipéptidos.

HORMONA TIROIDEA

(comprende las sustancias químicas que figuran a continuación)

- 3) Tiroxina derivada de hidrólisis drástica de tiroglobulina o sintetizada químicamente.
- 4) Otros derivados de la tironina, especialmente diiodotirosina que es semejante a la tiroxina pero posee 2 átomos de I₂ sustituidos en el núcleo en lugar de H.
- 5) Probablemente varios derivados todavía no identificados de material albuminoide resultante de la yodinación de las proteínas con subsiguientes hidrólisis y de otros procedimientos de aislamiento. (Salter describió algunos son casi todos derivados de la tiroxina y ejercen su acción biológica pero en menor escala que ésta).

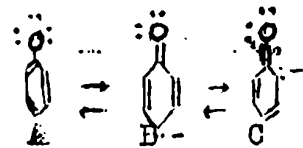
Naturaleza de la hormona tiroidea circulante. Es obvio que se refiere al efecto específico del material endocrino elaborado por la glándula y que es transportado por el torrente sanguíneo.

Según trabajos de Taurog y Chaikoff realizados en plasma de ratas con I¹³¹ y confirmados en papel cromatográfico, se trata de tiroxina unida a proteína plasmática.

Estudios de cromatografía sobre papel realizados con suero humano demuestran que el yodo sanguíneo proteico está constituido por tiroxina y otros compuestos semejantes a ella: 3 - 5 - 3' triiodotirosina y diiodotirosina unidos a las proteínas del plasma. Sin embargo, la naturaleza exacta del yodo sanguíneo proteico no se conoce todavía. Este "protein bound iodine" (P.B.I.) se halla en un 75 % presente en la fracción de las albúminas y el resto distribuido fundamentalmente entre las α y β globulinas. Las globulinas no parecen tener un papel importante en el transporte del yodo.

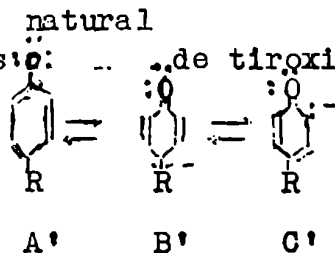
Síntesis natural de la tiroxina en la tiroides: Dentro de la molécula de tiroglobulina en la glándula tiroides, se produce la formación de tiroxina y diiodotirosina y este proceso está ligado a la oxidación aeróbica en la cual el sistema citocromocitocromo - oxidasa está involucrado.

Harrington sostiene que hay resonancia entre



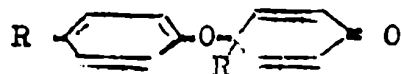
Quizá la síntesis natural de tiroxina en tiroides también involucra los

iones fenoxi:

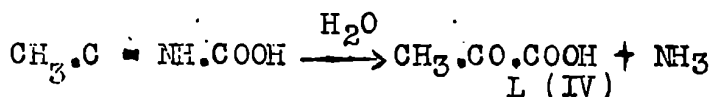
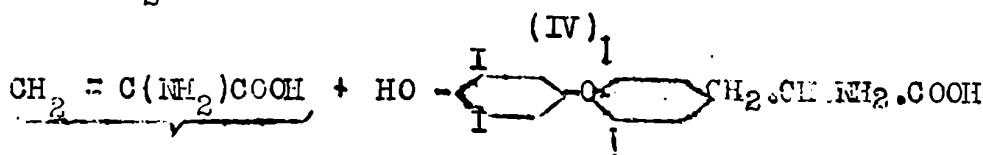
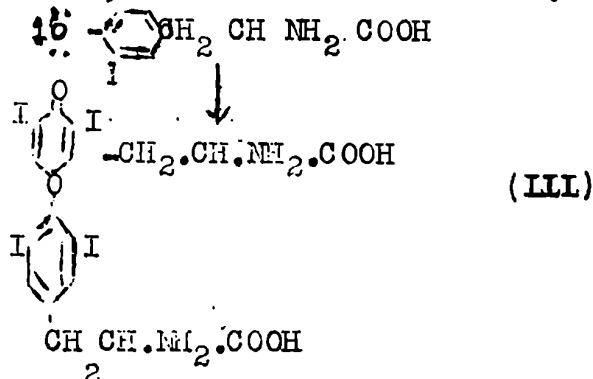
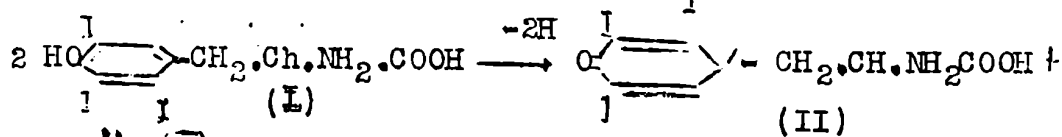
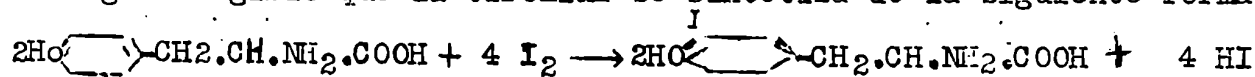


Puede haber interacción de la última forma y se obtiene el siguiente compuesto que fué preparado experimentalmente para el caso: R = C₆H₅

Experimentalmente para el caso: R = C₆H₅

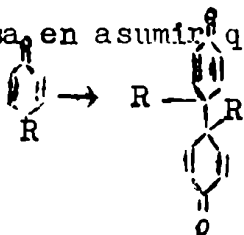


Harrington sugirió que la tiroxina se sintetiza de la siguiente forma:

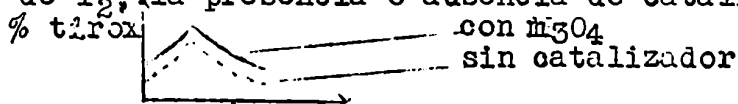


Si no da el producto L (IV) se puede hidrolizar (IV) con producción de serina ($\text{CH}_2\text{HO} \cdot \text{CH} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{COOH}$).

La teoría se basa en asumir que el siguiente compuesto puede reaccionar consigo mismo



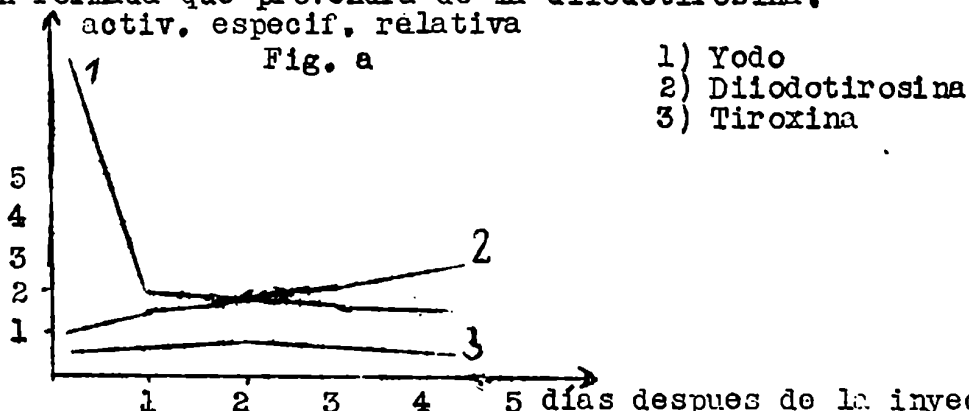
La teoría sugiere una copulación oxidativa de 2 moléculas de diiodo tirosina para dar tiroxina. Más aún sugiere que el rendimiento es mayor por la presencia de yodo en la diiodotirosina. Experimentalmente Ludwig y Mützarbeck se comprobaron que la relación entre el I₂ agregado a determinadas proteínas que contienen tiroxina, y la cantidad de tiroxina obtenida luego por hidrólisis de las mismas es de importancia. El agregado de pequeñas cantidades de yodo conduce a la formación de pequeñas cantidades de tiroxina y el óptimo se alcanza cuando se agregan 4 átomos de I₂ por molécula de tiroxina. Mayores cantidades conducen a la formación de compuestos casi inactivos o inactivos los cuales en la hidrólisis dan poca tiroxina junto con compuestos sin actividad biológica. También influyen además de la cantidad de I₂, la presencia o ausencia de catalizador, especialmente MgO₄.



El mecanismo exacto de la formación de tiroxina no es sin embargo bien conocido. La reacción se inhibe por la presencia de cianida, azida

o SH_2 que inhiben la citocromo oxidasa. También es inhibida por sustancias oxígenas como ser tiocianato y tiourea.

Que la diiodotirosina es un producto intermedio en la producción de tiroxina lo confirma el hecho de que administrando yodo radiactivo a perros (fig. a) se ha podido demostrar una penetración del mismo en la glándula tiroides y mientras el contenido en yodo disminuye con relativa rapidez, en cambio aumenta la formación de diiodotirosina supuestamente formado a expensas de ese yodo. Con menor intensidad aumenta el contenido en tiroxina recién formada que provendrá de la diiodotirosina.



Los mismos resultados se han obtenido empleando cortes de tiroides "in vitro" y algunos autores sostienen que la monoyodotirosina es un antecesor de la diiodotirosina pero que no llega a acumularse en la tiroides. Existe además una pequeña formación extratiroidea de tiroxina.

Sobre la transformación de tirosina en tiroxina por métodos exclusivamente químicos e "in vitro" pueden consultarse los trabajos de Harington y Pitt Rivers (Byological Journal 1945 - 39 - 157). Estos investigadores lograron obtener tiroxina por incubación de diiodotiroxina 14 días a 38°C y además comprobaron que el pH óptimo (para el cual se forma mayor cantidad de tiroxina a partir de una determinada cantidad de diiodotirosina) es 10. Además, observaron la influencia del agregado de H_2O_2 como agente oxidante y vieron que disminuyendo el tiempo de incubación a 15 hs y manteniendo cte la temperatura en 38°C se obtienen resultados satisfactorios. Pero cuando se trabajó a $90 - 100^{\circ}\text{C}$ y se quisieron observar los efectos del aumento de H_2O_2 en la formación de tiroxina a partir de diiodotirosina (a pH 10) se vió que el aumento de H_2O_2 hace aumentar poco la cantidad de tiroxina formada. Esto se explica por la formación de productos en el curso de la reacción que catalizan la descomposición del H_2O_2 de modo que sucesivas adiciones de la misma sustancia se vuelven cada vez menos efectivas. (ver artículo original).

Además son interesantes las conclusiones a que estos autores llegan respecto a la naturaleza del agente oxidante en la transformación diiodo-tirosina \longrightarrow tiroxina. Ellos se plantean el problema de si es el H_2O_2 la que actúa como oxidante o si ésta libera I_2 que es el que oxida. Hay 2 cosas que hablan a favor de lo último: El pH óptimo y el hecho que la reacción prosiga aún en ausencia de H_2O_2 . El I_2 en parte se convierte en IO^- pero si este fuere el responsable de la oxidación, no habrá razón para que la reacción se inhiba a pH 10 que es el pH al cual el I_2 se transforma totalmente en IO^- (a pH 13 el I_2 no existe libre) y es justo al pH en que el I_2 se transforma completamente en IO^- en que la reacción no ocurre ya. Además al pH de los fluidos del cuerpo el IO^- existe en muy pequeña concentración. Se supone que el I_2 tenga la doble función de reaccionar con la tirosina y dar diiodotirosina y de oxidar esta a tiroxina.

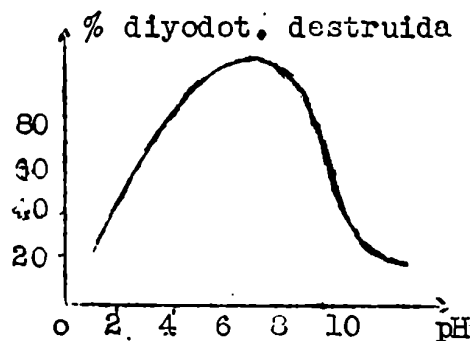
Además al pH en que la reacción ocurre, la existencia del ión OH^- confirma la suposición de que la oxidación involucra su presencia. La reacción diiodotirosina \longrightarrow tiroxina es una oxidación y lo confirma el hecho que en ausencia de O_2 se anula la transformación. El $S_2O_3^{2-}$ inhibiría la reacción porque al reducir el I_2 no permitirá la oxidación.

Por último a pH > 10 la no existencia de la reacción se explica:

- a) Por aumento de estabilidad de la diiodotirosina.
- b) por ineffectividad (o inexistencia) del agente oxidante (I_2)

A pH 7,8 - 10 la existencia de I_2 libre aumenta la ionización de los grupos ácidos de la diiodotirosina.

Curva de los efectos del pH en la destrucción de diiodotirosina por calentamiento de la solución acuosa durante 1 hora a 100° C.



La tiroglobulina: Fué descubierta por Hutchison y Ostwald hace muchos años: Es una molécula coloidal grande con un punto isoeléctrico a pH 5, que coagula por calor y es más soluble en soluciones salinas que en agua. Precipita por $SO_4 (NH_4)_2$ a media saturación. Su contenido en Iodo es variable, depende de la especie animal, región de vida, sexo, etc. Es semejante a las γ globulinas del plasma. (1)

(1) Estudiando espectros de difracción de rayos x se vió que los de la tiroglobulina yodada al igual que los de la caseína yodada son iguales a los de las mismas proteínas sin yodo.

La tiroglobulina no es la sustancia activa que pasa a la sangre porque no sería posible la difusión en los tejidos de una proteína de P.M. 700000.

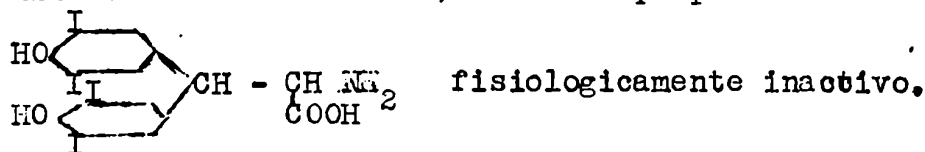
Además no se ha podido demostrar su presencia en la sangre en cantidad apreciable pues no se obtiene reacción de precipitinas. Se cree que una enzima proteolítica que se ha encontrado en la tiroides y que es activada por la tirotrófina (hormona segregada por las células basófilas del lóbulo anterior de hipófisis según descubrieron Purves y Griesbach en 1946), descompone la tiroglobulina y que los productos de hidrólisis pasan a la sangre y son: albuminas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos. Entre estos últimos los más importantes por su actividad fisiológica son: tiroxina, tironina y triiodotironina. (La diiodotirosina es inactiva fisiológicamente).

---0---

Generalidades sobre la relación entre la estructura química y la actividad fisiológica de los aminoácidos tiroideos.

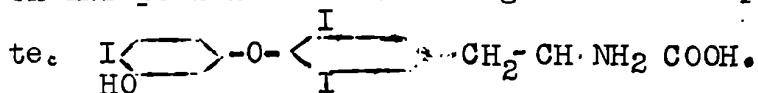
La actividad fisiológica depende de la estructura de difenil éter presente en la molécula tal como la del aminoácido tironina; 4 (4' hidroxi) fenoxifenil alanina $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ y de la presencia de I₂ en el compuesto aromático en las posiciones 3,5, 3',5'.

La necesidad de una configuración de difenil-éter se confirmó cuando Harington sintetizó la iso-tiroxina (isomero de la tiroxina) que es ácido di (3,5 diiodo - 4 hidroxifenil) amino propiónico



El siguiente compuesto por ejemplo: $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{I})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{I})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{I})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

pierde significativamente la actividad fisiológica, pues no se conserva la estructura de difenil éter. También se comprobó que cuando se pierde el I⁻ en la tiroxina el compuesto resultante es 90 % menos activo. Esto se comprobó preparando un compuesto idéntico a la tiroxina pero con I⁻ en las posiciones 4'6 en lugar de 3' 5' pues ese compuesto resultó inerte.

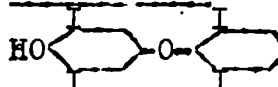


Preparando un compuesto en el que el yodo se sustituyó por átomos de Br (también puede hacerse con otros halógenos) se comprobó que en altas

dosís este compuesto acelera el metabolismo de los renacuajos y cura el mixedema pero en general su actividad es muy inferior a la del mismo compuesto yodado. En general la ausencia de átomos de I_2 en la molécula hace perder la actividad de los compuestos pero la sustitución de átomos de I por halógenos hace disminuir la actividad notablemente. La cadena lateral no es altamente específica.

---0---

La tiroxina: Constitución y propiedades ($C_{15} H_{11} O_4 NI_4$)

OC1=CC(I)=CC=C1Oc2cc(I)ccc2CNC(=O)O (ácido L(-)-3-5 diiodo 4 (3'5' diiodo 4' dihidroxi fenoxifenil) amino propiónico. Posee 1,8 % N y 65,4 % I_2 y además 30 % del I_2 de la tiroides.

Harrington y Salter muestran que la tiroxina natural es levorrotatoria y que existe en forma de unión peptídica dentro de la glándula tiroides, como parte integrante de la proteína tiroglobulina. La tiroxina obtenida por hidrólisis con HOK a partir de las proteínas que la contienen es racémica o sea contiene los isómeros L y D. Investigaciones recientes atestiguan que la actividad de la L es el doble de la DL.

La tiroxina es un polvo microcristalino incoloro e inodoro que se descompone a $230^{\circ} C$. Su máximo de absorción está en 5250 \AA (La mayor parte de las proteínas tienen su máximo de absorción en el ultravioleta entre 2500 y 3000 \AA).

Entre sus propiedades químicas es importante hacer notar que es insoluble en ácido pero soluble en butanol. Ya mayor parte de los métodos usados para dosar tiroxina se basan en esta propiedad. La extracción con butanol se usa mucho actualmente.

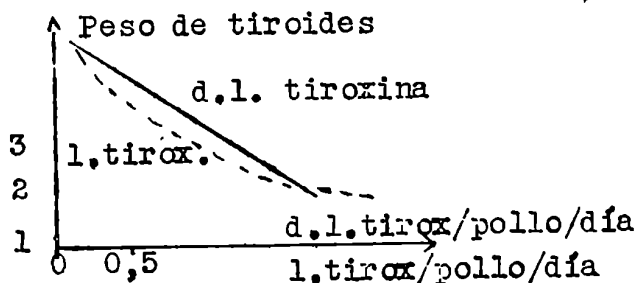
Actividad fisiológica: La administración de tiroxina eleva el metabolismo basal, acelera la evolución de los renacuajos y tiene acción favorable en el mixedema y en el cretinismo así como en otros casos de deficiencia en la función tiroidea. Sin embargo no es la única sustancia tiroidea activa (en el suero humano y de algunas especies animales se encontró triiodotironina que también es activa). Además la actividad de la proteína tiroglobulina depende de su contenido en yodo y no de la cantidad de tiroxina presente. Es decir que la actividad de la tiroglobulina es superior a la de la tiroxina presente. Para explicar esto algunos investigadores hablaron en un tiempo de una unión particular entre la tiroxina dentro de la proteína tiroidea que aumentaba su actividad.

La tiroxina puede ser, además, más o menos efectiva, según la especie animal y la vía de inyección al organismo.

Frieden y Wunler (1948) comprobaron que cuando se da tiroxina y tiroproteína natural por vía parenteral, la última muestra mayor actividad que la esperada por su contenido en tiroxina aún si se sostiene que la L tiroxina tiene 3 veces la actividad de la muestra racémica usada en comparación. Los mismos investigadores hallaron que la tiroproteína sintética tenía mayor actividad que la correspondiente a su contenido en L tiroxina.

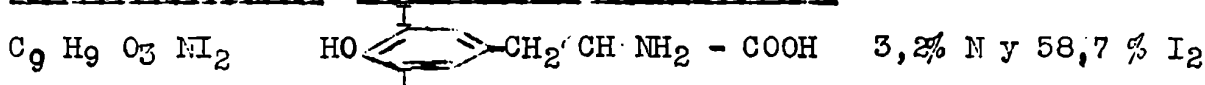
Posteriormente las determinaciones de la potencia tiroidea, usando preparados suministrados parenteralmente, dan resultados mayores que los esperados por su contenido en tiroxina. Las determinaciones se hicieron por métodos biológicos, químicos y de dilución isotópica. Los primeros se basan en la acción metabólica de la tiroxina. Los segundos en el dosaje de I₂ total lo cual da idea de la potencia tiroidea pero no del contenido en tiroxina. El método de dilución isotópica que dosa tiroxina probó que los valores obtenidos por los otros 2 eran demasiado altos.

Potencia relativa de la l y la d.l tiroxina en la reducción del peso de la tiroides en pollos pretratados con tiouracilo.



---0---

La diyodotirosina: Constitución y propiedades:



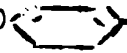
Al principio se la llamó ácido yodogorgónico por haberse encontrado originariamente en el coral de Gorgonia. Más tarde Wheeler y Janneson la identificaron como tirosina yodada. Harington y Randall mostraron que era un constituyente de la tiroglobulina usando enzimas estos investigadores aislaron 5 - 5 diyodo L tirosina cristalina lo que demuestra que esta sustancia es levógira en la tiroides y que está unida a la proteína tiroglobulina. En cantidad apreciable no se ha podido demostrar su presencia en forma libre en la tiroides.

Guisel demostró que existen 2 moléculas de diyodotirosina por una de tiroxina, midiendo los espectros de absorción de la tiroxina, diyodotirosina y tiroglobulina.

Al igual que la tiroxina, la diyodotirosina da la reacción característica del grupo O - diyodo fenólico: con NO₂ H + N H₃ da color rojo cereza.


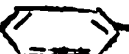
También fueron estudiados los espectros de difracción de rayos X en tirosina, diyodotirosina y tiroxina y se comprobó que la yoduración causa algún reordenamiento en la molécula.

Estudiando los efectos de la yoduración en la constante de disociación de la tirosina se notó que hace aumentar unas 100 veces la disociación del OH fenólico y que el amino grupo se disocia también a una mayor reacción acida. (La tirosina tiene 3 p K: 2 debido a la disociación del amino grupo y del COOH y el 3° del OH⁻ fenólico).

Actividad fisiológica: Es inactiva en los mamíferos y en anfibios solamente muy poco activa. (Esto por otra parte se infiere al ver que su fórmula no tiene estructura de difenil-éster). La tirosina: HO  CH₂.CHNH₂

(añado β para hidroxifenil amino propiónico). Es el amino ácido precursor de la diyodotirosina en la síntesis natural y artificial de la tiroxina. No posee actividad fisiológica.

---O---

La tironina: HO  -O-  CH₂.CH NH₂.COOH es 4 (4' hidroxifenoxi) fenil alanina. Es la agrupación que tienen en común la tiroxina y la triyodotirosina. Fue llamada así por Harington. No se halla como tal en los tiroides sino su derivado triyodado que es

la triyodotironina: HO  -O-  CH₂.CH NH₂ COOH

Es fisiológicamente activa. Gross y Leblond hicieron estudios comparativos de los efectos metabólicos en mixedema humano de la l-tiroxina y la l-triyodotironina. Estos investigadores hallaron la triyodotironina observando en sus cromatogramas de suero de animales a los que se les había administrado radiotiroxina, manchas que no eran tiroxina. Las identificaron como triyodotirosina y la sintetizaron. En ratas tratadas con tiouracilo y en humanos mixedematosos encontraron que este compuesto era 3 a 5 veces más activo que la tiroxina. Estudios comparativos de los efectos en el metabolismo basal, de tiroxina, diyodotirosina y triyodotirosina realizados por estos investigadores en una paciente de 41 años con enfermedad de Gull y que había tenido mixedema entre los 5 y los 8 años arrojaron los siguientes resultados:

1) La administración de 1 mg de diyodotirosina no alteró su metabolismo

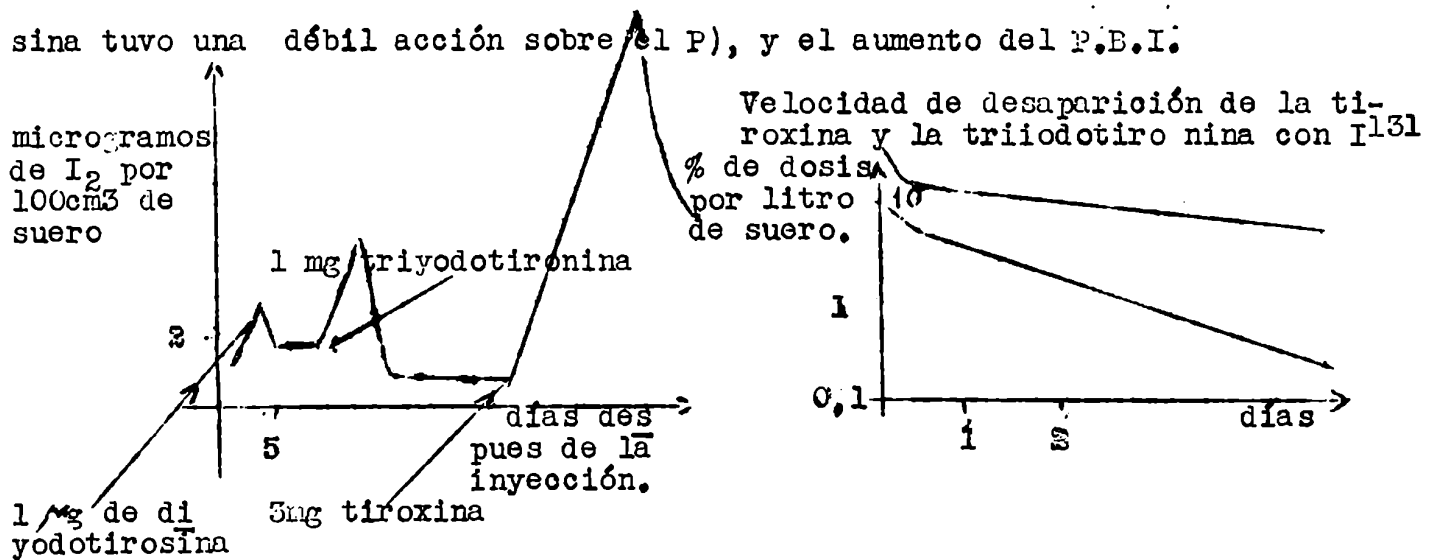
basal.

2) La administración intravenosa de 1 mg de triyodotironina produce un descenso rápido en el metabolismo basal y a los 9 días vuelve al valor anterior al tratamiento.

3) La inyección de 3 mg de tiroxina produce un descenso lento en el metabolismo basal (en 8 días se alcanzó igual nivel que el observado 24 hs después de la administración de triyodotironina) y a los 26 días no se había alcanzado aún el valor anterior al tratamiento.

En síntesis estos investigadores observaron que la triiodotironina ejerce su acción rápidamente mientras que la tiroxina tiene un lento y prolongado efecto.

A los mismos resultados se llegó observando el descenso del colesterol urinario y el aumento del N y del P urinarios (aunque aquí la diyodotirosina tuvo una débil acción sobre el P), y el aumento del P.B.I.



c) Descripción somera de los distintos métodos químicos usados para la determinación de P.B.I.

En sus líneas generales los métodos de determinación de yodo se basan en:

I) Destrucción de materia orgánica en presencia de álcali o ácido

II) Concentración del yodo

III) Dosaje final del yodo

I): Destrucción de materia orgánica en presencia de ácido o de álcali:

I_a : método seco

{ sistema abierto
sistema cerrado

I_b : método húmedo

II): Concentración del yodo:

método de la plata
método alcohólico

III): Dosaje final del yodo

métodos

{ 1) titrimétrico 4) gravimétrico
2) colorimétrico 5) catalítico
3) electrométrico 6) otros

I_a): El método seco se basa en la calcinación a alta temperatura en presen-

cia de exceso de álcali (HOK o $\text{CO}_3 \text{K}_2$) aire y oxígeno. Puede hacerse en:
Sistema abierto: Destrucción por álcali en exceso en crisol de Ni o Fe.
Desventaja: volatilidad del yodo.

Los métodos de este tipo se basan en el de Rabourdin modificado por Chatin. Rabourdin, incineraba la materia orgánica con $\text{CO}_3\text{K}_2 + \text{SO}_4 \text{H}_2$ y liberaba el I_2 por acidificación de la masa con ayuda de $\text{Cl}_3 \text{CH}$, S_2C o Cl_4C . Chatin, luego de la incineración con CO_3K_2 extrae el yodo con alcohol en un disco de Pt, luego la sustancia orgánica es incinerada nuevamente en el disco y luego de una segunda extracción alcohólica determina el residuo colorimétricamente usando la reacción del yoduro de almidón.

Método sensible. Permite dosar 0,1^o de yodo. Punto de partida de los otros micro-métodos. El sistema cerrado: La materia orgánica es calcinada en tubo de combustión (cuarzo, pyrex o supremax) en presencia de corriente de O_2 y los productos volátiles son retenidos en vaso conteniendo solución alcalina, los cuales se conectan con el final del tubo. Se evita la excesiva pérdida de yodo pero requiera un aparato complicado y consume tiempo.

Fellenberg combina ambos sistemas. Es evidente que una de las cosas que hay que tener en cuenta en el sistema abierto es que el punto de ebullición del IK es 680°C y que su descomposición y la volatilidad del yodo libre están relacionados con su punto de ebullición por lo tanto la destrucción debe hacerse a menos de 680°C . Seheffer sostenía que convenía hacerla a $250-300^\circ\text{C}$ porque como el HOK tiene p. eb. 560°C el p. eb. del I_2 en la mezcla $\text{IK} + \text{HOK}$ estaría cerca de esa temperatura y en la mezcla $\text{IK} + \text{HOK} +$ materia orgánica presupuso que sería menor. La temperatura debe ser uniforme. Chatin aconseja usar HOK en lugar de HONa porque las sales de Na dan polvo microcristalino de gran volumen que retiene la solución alcohólica de yodo durante la extracción por inclusión entre los cristales y dificulta así la filtración además de requerir mayor cantidad de alcohol. Motzger y Baumann aconsejan HOK en lugar de CO_3K_2 . Elmer cree que no es la composición química de la sustancia alcalina sino la cantidad lo que interesa ya que un exceso de CO_3K_2 o de HOK produce mínimas pérdidas de I_2 . Además el Pt actúa como catalizador y produce por eso mayor pérdida de I_2 la calcinación en Pt que en porcelana o níquel.

Ib) El método húmedo se basa en la destrucción de materia orgánica por ácido y absorción del yodo liberado. Uno de los primeros el de Pfeiffer usaba SO_4H_2 + 30 % de perhidrol a 120°C y recogía el I_2 liberado en un vaso con álcali que luego es colocado en un crisol de porcelana. Las últimas trazas de materia orgánica son eliminadas por incineración por método seco. A pesar de que el método fué modificado sufrió objeciones por lo siguiente: 1) se requieren muchos reactivos y gran número de filtrados. 2) Hay posibilidad de formación de IO_3^- que ocasionan pérdidas por lo que no se aconseja para microanálisis.

En la modificación del método realizada por Paal y Motz la determinación del yodo se hace electrometricamente pero la necesidad de eliminar el Cl^- y otras sustancias que interfieren hacen el método poco usado. Leipert (1929-35-37) para obviar estos errores destruye la materia orgánica con $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{Cr}_2\text{O}_3$ con SO_4H_2 como catalizador. El yodo se transforma en IO_3^- que luego es reducido a I_2 con As_2O_3 . El yodo es luego destilado y colocado (trapped) en un aparato de absorción conteniendo álcali. Luego se condensa y evapora a sequedad y luego de extraer el I_2 del CO_3K_2 con alcohol absoluto lo titula por el método de Winkler. Pfeiffer, Burger y Möbuis (1934) consideran este un buen método para la determinación del yodo en sustancias que contienen pequeñas cantidades de materia orgánica, no así cuando hay grandes cantidades de materia orgánica. En su opinión existe una pérdida de yodo en el método de Leipert y lo prueban los bajos valores de yodo en sangre hallados por este método.

II) Concentración del yodo: Dado a que el yodo tanto en el organismo humano como en el animal se halla en tan pequeña cantidad, los métodos lo concentran luego de la destrucción de la materia orgánica; por 2 caminos: 1) método de la plata, basado en la precipitación del I^- con NO_3Ag y posterior transformación en IO_3^- por agua de Cloro y luego titulación. Es un método usado en macro-determinaciones de yodo.

2) Método alcohólico: La extracción por alcohol fué usada satisfactoriamente en distintos métodos por Chatin, Fellenberg, Closs, Boe, etc.

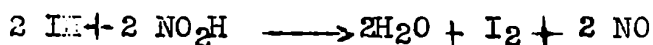
Por ejemplo Fellenberg trataba el sedimento con alcohol (70-90%). Posteriormente trabajó extrayendo 4 veces con alcohol 95 % y luego de evaporar el sedimento y de una segunda calcinación extrajo la última vez agregando al sedimento 0,5 ml de alcohol 95 % y extrayendo varias veces con alcohol 95 %.

No detallaré los métodos usados por cada investigador pero en líneas generales diré que no conviene usar alcohol poco concentrado porque pueden pasar Cl^- y Br^- al alcohol. (Algunos investigadores aconsejan hasta 97-99 %). Reith asegura que no conviene el uso de alcohol absoluto sino 94,2 95,2 % para obtener una pasta de buena consistencia y óptimo sedimento salino. Una extracción alcohólica inadecuada puede ocasionar el 30 % de pérdida mientras una buena extracción no excede de 2 - 3 %.

---0---

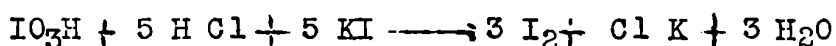
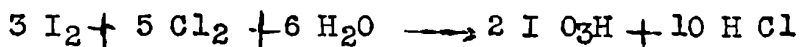
III) Dosaje final del yodo: Luego de una completa extracción alcohólica y de obtener la menor cantidad posible de sedimento, la determinación del yodo tiene lugar por los métodos anteriormente citados y que detallaré a continuación:

1) Titrimétrico: Se usa cuando la cantidad de yodo a dosar excede de 1%, de lo contrario no es aconsejable. El método de Fresenius se basa en la mayor facilidad de oxidación de los I^- , (con respecto a los Cl^- y Br^-) con NO_2H de acuerdo a la siguiente ecuación:



Pero la titulación es posible cuando las cantidades de yodo son pequeñas pues al acercarse a 20% el error aumenta notablemente obteniéndose valores bajos como consecuencia de la alta concentración de NO_2^- .

El método de Dupré (1850) Hunter (1910) y Winkler (1915) introducido por Fellenberg en el método de Chatin - Rabourdin, dió mejores resultados. Se basa en la posibilidad de convertir los I^- en IO_3^- con agua de cloro. El exceso de agua de cloro se elimina por ebullición (aproximadamente 45 seg.) y luego de agregar IK se libera I_2 que es titulado con almidón y tío sulfato.



La sensibilidad del método es mayor porque la cantidad de I_2 a titular finalmente es 6 veces la contenida en el material original. Para evitar la formación de I_2 libre por oxidación con O_2 de la solución de IK Hojer (1929) y Bülman (1931) recomiendan la titulación en presencia de CO_2 . Hay diversas causas de error: la) Oxidación: Algunos autores discuten sobre si conviene oxidar con agua de cloro o de bromo. Según Reith el agua de cloro conduce a la formación de BrO_3^- y según Hojer hay sustancias que quedan luego de eliminar el exceso de Cl_2 por calentamiento y esas sustancias tienen la propiedad de oxidar los I^- a I_2 . Además el agua

de bromo es más conveniente pues se prepara más fácilmente que la de cloro.

2a). Acidificación: Puede usarse Cl_2H o SO_4H_2 pero lo que importa no es la clase de ácido sino el grado de acidez. Hojer notó pérdida de I_2 con SO_4H_2 de normalidad mayor que 0,05 N. Reith afirma que el SO_4H_2 debe ser 0,5 N y que el pH no debe ser mayor de 1,6.

3a) Almidón: Conviene preparar almidón fresco pues si no da color muy intenso con el I_2 , y requiere mayor cantidad de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ por lo cual da datos altos.

4a) $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$: Puede usarse 1/200 o 1/100 N. No hace falta standardizar la droga cada vez si se estabiliza la concentración con el agregado de 1 ml de alcohol amílico.

2) Colorimétricos: Se usan cuando el contenido en I_2 es mayor que 1%. Se basan: a) En la producción de color por agitación del yodo con Cl_3CH (Rabourdin, Chatin, Fellenberg y otros); Cl_4C (Rabourdin, Mc. Clendon, etc.) S_2C (Rabourdin, etc.); Cl_2Pd (Chatin, Kraus); dioxano (Saifer y Hughes). y b) En las reacciones coloreadas de yoduro de almidón (Chatin, Reith, Turner, y otros).

El primer método colorimétrico posee muchas desventajas, primero la lenta transformación en I_3CH (Blum) y por otro lado la coloración puede ser demasiado intensa. El uso de Cl_4C no da mejores resultados principalmente por la contaminación con sales (NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-}) que interfiere en la determinación cuantitativa del yodo. El dioxano no es lo suficientemente sensible para la determinación cuantitativa del yodo (Reith y Van Dijk - 1937).

Una deficiencia del método colorimétrico (con Cl_3C o Cl_4C) es que hay que usar poca cantidad de solución (0,02 ml) para obtener una reacción bien sensible y en tan pequeño volumen es difícil evitar la contaminación con polvo que hace que en lugar de violeta dé color pardo-violeta oscuro. El S_2C no es más aconsejable porque puede contener sustancias que interfieren reaccionando con el yodo (Reith 1929). Elmer adoptó un método basado en la reacción del yoduro de almidón usado por Chatin.

Reith (1929) llamó la atención de que este método a temperatura ambiente es menos sensible que a 0°C . Por eso realizó la reacción colorimétrica en agua helada. La reacción a 0°C es sensible aún para cantidades del orden

de 0,15 I₂. Si se agrega más de 0,1 ml de I K 0,1 % puede obtenerse color violeta oscuro si hay Cl K₂, NO₃K etc. presentes. Elmer considera muy buenos tanto el método titrimétrico como el colorimétrico de Reith.

3) Electrométricos: El de H. Paal y Motz (1935) se basa en la precipitación de las sustancias yodadas por tratamiento con NO₃Ag y luego con SNa₂. La determinación de las sales de yodo precipitadas y purificadas se hacen en aparato electrométrico. Sensibilidad: 0,3% I₂. Posibilidad de contaminación con Cl⁻ y otras sustancias; esta circunstancia fué observada por los autores.

4) Gravimétrico: Los compuestos yodados (I⁻) son precipitados por adición de NO₃Ag y luego pesados en microbalanza con precisión de 1% de I₂. Es poco exacto. Fué introducido por Carins (1865) y adoptado por Baubigny Chavanne y Pregl-Lieb.

5) Catalítico: Fué introducido por Kolthoff y Sandell (1937) para determinación de cantidades de I₂ del orden de 0,05 - 3% en 1 ml de solución. Se basa en que la reacción entre el ión Ce⁴⁺ y el ión As⁵⁺ es incompleta en ausencia de catalizador. Midiendo el efecto acelerante de los yoduros como catalizador de esta reacción (Ce⁴⁺ + As³⁺ $\xrightarrow{I^-}$ As⁵⁺ + Ce³⁺) es posible determinar exactamente las pequeñísimas cantidades de I₂ con error medio del 10%. La presencia de NO₃⁻; F⁻, CN⁻, SCN⁻, citrato, Ag⁺, Hg⁺⁺, Cs, interfieren. Hg⁺⁺ y Ag⁺ son los más probables contaminantes. El Os tiene efecto catalítico, el SCN⁻ cambia el grado de catálisis y los otros interfieren en la acción del yodo.

6) Otros métodos: nefelométricos y espectrofotométricos son inadecuados para pequeñas cantidades de I₂

---0---

Métodos biológicos para dosar hormona tiroidea

Hay métodos basados:

1°) En los efectos de la tiroides sobre el metabolismo energético (lo altera) o en el peso del cuerpo. Se hicieron experiencias basadas en la elevación del metabolismo en ratas, ratones y cobayos. Se hicieron experiencias basadas en la pérdida de peso en ratas, ovejas y cobayos.

2°) En "replacement therapy" en animales tiroidectomizados o tratados

con tiouracilo (sustancia de acción bocigena).

Se observó un estancamiento en el crecimiento luego de la tiroidectomía en animales jóvenes. La tiroproteína dada oralmente (suministrada en distintos niveles de dosaje) causaba un restablecimiento en el crecimiento que era proporcional a la dosis.

Sirve como método cualitativo en algunos casos y es altamente específico para la hormona tiroidea.

3°) En el mantenimiento del balance tiroideo pituitario en animales tratados con tiouracilo.

El descubrimiento de una cantidad de compuestos bocienos hizo posible un nuevo dosaje de hormona tiroidea basado en el mantenimiento del balance hormonal entre la glándula tiroidea y la pituitaria. Fue establecido que la acción bocigena se debe a la inhibición en la formación de hormona tiroidea la cual "in turn" permite aumentar la secreción de tirotrófina y compensatoriamente hipertrofia la tiroidea. La hipertrofia de la tiroidea puede ser evitada por suministro de tiroxina o de hormona tiroidea de modo de influir en la pituitaria y así retornar a mantener el balance tiroideo - pituitario.

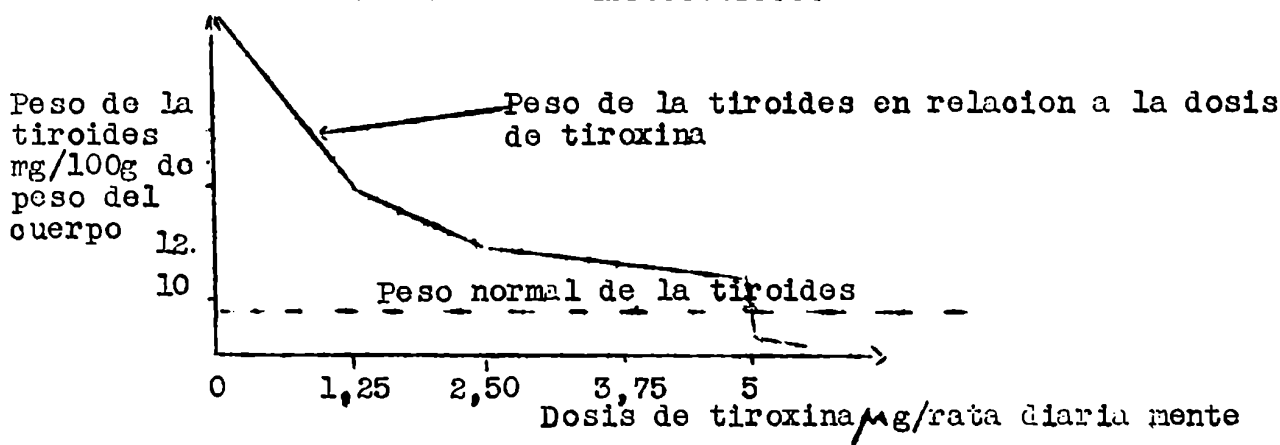
Dempsey y Astwood observaron primeramente la disminución en el peso de la tiroidea de animales tratados con tiouracilo (ratas) y vieron que esta disminución tiene relación cuantitativa con la cantidad de tiroxina agregada y usan esto para determinar la velocidad de secreción de la tiroidea a distintas temperaturas.

En ratas, determinaciones de dosaje de h. tiroidea por este método coinciden con el método metabólico.

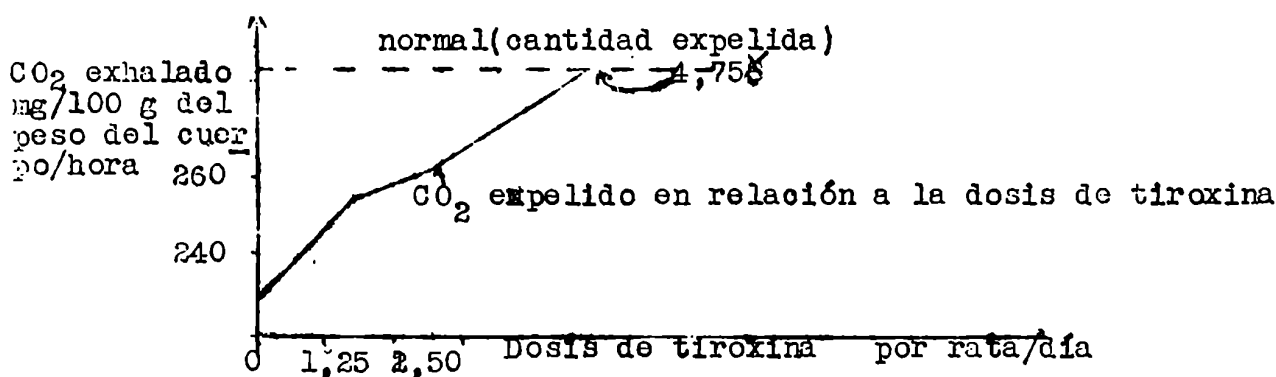
La curva que relaciona el peso de la tiroidea con las dosis de tiroxina es una línea recta que puede ser usada como curva de referencia para preparaciones test en condiciones semejantes. La intersección de dicha curva con la de peso normal de la tiroidea puede tomarse como medida de la velocidad de secreción de la tiroidea y representa la cantidad de D - L tiroxina requerida para mantener el balance normal tiroideo pituitario. Por ejemplo se usaron ratas de un promedio de 140 g. de peso y en ellas la velocidad de secreción de la tiroidea fué de 3,47 μ g/100 g de peso del cuerpo. No fueron determinados los límites estadísticos de error. Se usan generalmente ratas de 100 a 200 g de peso en grupos de 8 a 10 a-

nimales. Cinco grupos son suficientes para construir la curva. Durante el tratamiento se les da 0,1% de tiouracilo en las comidas; 4 grupos son inyectados con tiroxina diariamente en dosis graduales de 1 - 4 g/100 g de peso del cuerpo. Si hay que determinar la velocidad de secreción de la tiroides se incluye un grupo que no reciba tiouracilo y tiroxina y que sean ratas normales. Luego de 14 días los animales son sacrificados y pesadas las tiroides. Los pesos de las tiroides se dan en mg/100 g del peso del cuerpo. En pollos hacen falta 20 animales por grupo porque su respuesta es más variable que en ratas. Temperatura y alimentación deben ser lo más uniformes posible. No es cierto que la cantidad de hormonas tiroidea requerida para mantener el balance tiroideo-pituitario deba ser igual si se suministra por día la inyección que si se trata de la segregada por la glándula tiroides. En el primer caso la inyección de hormona tiroidea es intermitente; en el 2º caso la secreción hormonal y la descarga parecen ser un proceso continuo. Sin embargo los resultados obtenidos son bastante buenos y dan una idea valiosa del estado de la tiroides.

Respuesta en el peso de la tiroides



Curva de respuesta metabólica



d) Descripción del método de Barker S.B. (1948) modificado por Carr E.A. y colaboradores (1950).

Todas las determinaciones realizadas en el presente trabajo han si-

do hechas según este método, en los laboratorios de la Comisión Nacional de Energía Atómica sitos en el Hospital Rivadavia, donde ya funcionaba el Servicio de Yodo Proteico a cargo del Dr. J. F. Sproviero, quien realizaba dosajes en suero humano según el método de Barker modificado por Carr y colaboradores y cuyo trabajo será dado a publicidad próximamente.

El método que paso a detallar es el siguiente:

1a. parte:

1) Obtención de muestras:

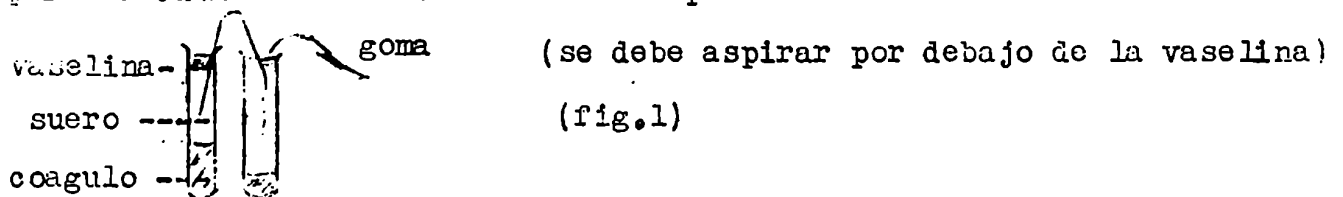
1-a) Las jeringas se lavan con agua y jabón y luego se enjuagan 3 veces con agua, 5 veces con agua destilada, y 3 veces con agua bidestilada.

1-b) Se esterilizan en estufa con calor seco.

1-c) Se coloca a un tubo (que puede ser el de centrífuga) 5 c³ de vaselina líquida. Se mojan las paredes del tubo con la jeringa que se va a usar para sacar sangre del paciente y se vuelve nuevamente al tubo de modo que las paredes queden lubricadas.

1-d) Se sacan 20 c³ de sangre (para poder obtener por lo menos 4 c³ de suero) y se lleva al tubo en el que se halla la vaselina en el cual se produce la coagulación espontánea.

1-e) Se centrifuga 10 min a 1800 r.p.m. y se procede a separar el suero para lo cual nos auxiliamos de un chupador



1-f) El suero se guarda a baja temperatura (heladera) hasta que se haga el análisis.

2) Precipitación de las proteínas.

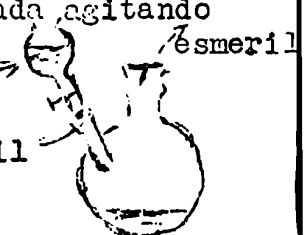
2-a) Se toman 2 c³ de suero usando pipetas distintas para cada suero. Se usan pipetas de escurrimiento y se vierte en tubos de centrifuga de aproximadamente 40 c³ (fondo redondeado).

2-b) Se añaden 16 ml de solución de SO₄Zn 2 ml HONa 0,75 N se mezcla y se deja como mínimo 1/2 hora (ppción según métodos de Somogyi).

2-c) Se centrifuga la mezcla 15 minutos a 1800 r.p.m. y se vierte el líquido sobrenadante.

2-d) Se lava 3 veces el pptado. proteico con agua bidestilada agitando vigorosamente cada vez y centrifugando y decantando. PO₃H₃ esmeril

El precipitado lavado debe guardarse en un refrigera esmeril



dor (se puede guardar un mes en el refrigerador sin dañarse).

3) Digestion del precipitado proteico.

3-a) Transferir el precipitado a un frasco especial, para ello se trata el precipitado 5 veces con 5 ml de SO_4H_2 70 % (fig. 2) y se vuelca cada vez dentro del balón. Se lava el cuello con 5 ml de agua bidestilada.

3-b) Se añaden 3 c³ de Cr_2O_3 , (CrO_3 60 % en peso), usando pipetas especiales de 3 ml (de escurrir). Se añaden unas pocas cuentas de vidrio para evitar la formación de burbujas, se lava con 5 c³ de agua bidestilada el cuello del balón.

3-c) Se calienta la mezcla en el balón hasta que luego de hervir moderadamente los vapores de SO_3 se agiten vigorosamente dentro del mismo. (se necesitan unos 10 a 15 min. de calentamiento para esto). Enfriar, agregar 15 c³ de agua bidestilada lavando las paredes del balón y digerir otra vez hasta la aparición de los primeros vapores SO_3 (5 a 10 min.)

4) Destilación: Cuando la mezcla digerida se ha enfriado añadirle 25 ml de agua bidestilada, ajustar un alambique especial y un embudo gotero usando agua bidestilada como único agente lubricante para todas las paredes esmeriladas.

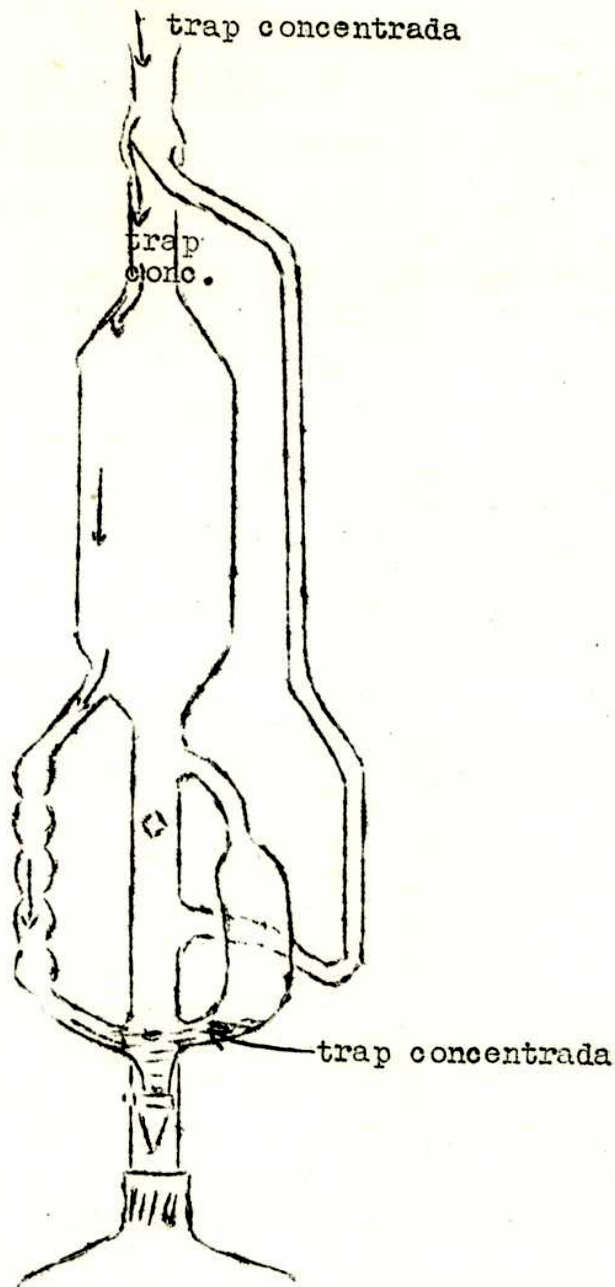
4-b) Con una pipeta poner 1 ml de la solución trap concentrada (ver más adelante) en el alambique de tal modo que la solución "selle" la llave de vidrio a través de la cual aquella parte del alambique que contiene la solución trap puede ser frenada. El aparato es semejante a un Soxhlet en apariencia. (fig. 3). La corriente de yodo burbujea a través de la trampa que contiene la solución trap (AsO_3 en medio alcalino) en la cual se fija y recupera efectivamente el yodo.

4-c) Poner 5 ml de la solución de PO_3H_3 50 % en el embudo gotero.

4-d) Colocar sobre el alambique un refrigerante a reflujo, calentar el frasco con un micromechero teniendo cuidado de agitar la solución hasta que hierva.

4-e) Cuando el condensado empieza a gotear a través del tubo de retorno al frasco (estando la solución hirviendo vigorosamente) se comienza a agregar el PO_3H_3 lentamente gota a gota.

4-f) Dejar que la destilación prosiga exactamente 10 minutos y luego drenar la solución "trap" a un matraz aforado de 25 ml, mientras el mechero



esté todavía calentando el balón. Retirar el mechero, desarmar el alambique y lavar la parte del mismo donde estaba la solución "trap", 3 o 4 veces con agua bidestilada y añadir estos enjuagues al matracito aforado. Envasar a 25 ml. exactamente.

5) Colorimetría: 5-a) Tomar muestras de 10 ml de destilado del matraz aforado de 25 ml y colocarlos en tubos de colorimetría calibrados previamente.

5-b) Añadir a cada tubo 2 ml del reactivo reductor ("end point") (ver más adelante). Las soluciones se homogeneizan en los tubos, incl inándolos y haciéndolos girar.

5-c) Colocar los tubos en un baño de agua cuya temperatura pueda mantenerse constante en un punto entre 35 y 40°C y dentro de una variación de 0,5°C.

5-d) El análisis colorimétrico empíricamente permite analizar grupos de 22 tubos a la vez. Cuatro o más tubos que contengan cantidades conocidas de yodo se incluyen en cada análisis debido a los pequeños cambios de temperatura o de concentración de los reactivos que producen un cambio en la curva standard. Estos tubos standard contienen igual cantidad de solución trap que la que estaría contenida en 10 ml de destilado (5 ml de la llamada solución trap diluida + 5 ml de solución standard de yodo + 2 ml de reactivo reductor).

5-e) Colocar los tubos en el baño de agua de modo que los duplicados estén en distintas áreas del baño por si acaso haya diferencias de temperatura que afectaría el grado de reacción. Si el baño tiene agitador mecánico no hace falta tomar mayores precauciones para la homogeneización de la temperatura y en caso contrario conviene colocar de 1 a 3 tubos conteniendo alrededor de 12 ml de agua en los espacios a continuación de los tubos finales para uniformar el ambiente.

5-f) Dejar que los tubos alcancen la temperatura del baño (dejar al menos 30 minutos termostaticando). Añadir 0,0 ml de $(SO_4)_3 Ce(NH_4)_2$ a cada tubo de acuerdo al siguiente esquema: a la hora 0 poner con una pipeta 0,5 ml en el tubo N°1 (dejar que la pipeta escurra 6 seg más o menos) retirar el tubo inclinando y agitando para mezclar el contenido y ponerlo otra vez en el baño de agua al llegar a los 25 seg. Al minuto añadir 0,5 ml de la solución de $(SO_4)_3 Ce(NH_4)_2$ al tubo N°2, repetir la operación de mezcla y así sucesivamente. Al llegar exactamente a los 22 minutos retirar el tubo N°1 del baño, limpiarlo bien, secarlo y colocarlo en un colorímetro que ya ha sido dispuesto de tal modo que cuando el tubo tiene agua bidestilada corresponda a 100 % de transmisión óptica (λ 420 a 430 m μ)

5-g) Leanse los tubos en orden, retirándose al minuto justo de tal modo que la reacción tenga lugar en ellos a los 22 minutos.

6) Preparación de los blancos para la determinación de Yodo de Proteico en suero humano:

6-a) Se toman las mismas cantidades de reactivo de Somogyi que para precipitar proteínas en el suero

16 c ³ solución de $SO_4 Zn$	} dejar por lo menos $\frac{1}{2}$ hora
2 c ³ solución de $HONa O_1$ 75 N	

6-b) Sigue como 2-c), 2-d), 3-a) y se agrega 1 c³ de Hb. Luego se sigue

3-b) ... y así sucesivamente hasta el último paso.

7) Recuperaciones:

7-a) Se hacen en forma análoga a los blancos pero agregando cantidades conocidas de yodo. Se agrega también 10^3 de solución de hemoglobulina (1) esto se hace para evitar las pérdidas de I^- durante la digestión y destilación. En las experiencias de recuperación, de una manera constante se recupera sólo el 75 % de I^- si durante la digestión no existe proteína en el balón. Para obtener las soluciones de hemoglobulina se usó sangre humana citratada.

Curva de calibración:

Se colocan para construirla, tubos en los cuales haya una cantidad conocida de yodo. La distribución de los tubos es la siguiente:

Tubos:

	0-0'	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
de I_2	0,00	-0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
H ₂ O bidest.	50^3	-	-	-	-	-
trap. dil.	50^3	50^3	50^3	50^3	50^3	50^3
As	20^3	20^3	20^3	20^3	20^3	20^3

Termostatar 30 minutos. A la hora 0 poner con una pipeta 0,5 ml de sulfato cérico amónico en el tubo 0. Al minuto colocar 0,5 ml en el tubo 0' y así sucesivamente hasta llegar al tubo N°22. A los 22 minutos exactamente se saca el tubo, se seca bien y se lee en el fotocolorimetro la transmisión de la luz y así sucesivamente para los otros tubos.

(1) Respecto al agregado de hemoglobina (eritrocitos lavados y hemolizados) en los blancos y recuperaciones para reemplazar la proteína en el balón, se encontró satisfactoria pues los blancos (se comprobó experimentalmente en este laboratorio) dieron resultados aproximadamente iguales con agregado de Hb y sin él; lo cual denota ausencia de yodo en la H₂O bien que está presente en cantidades no detectables, por el método y por lo tanto no interfiere. Sin embargo, no todos los investigadores sostienen que en los eritrocitos lavados no haya yodo pues, mientras Silves por ejemplo sostiene esto, en cambio Mc Clendon y Foster hallan aproximadamente igual concentración de P.B.I. en plasma y en glóbulos. Wallace y Brodie afirman que el I^- se comporta aproximadamente como el Cl^- y que las células son permeables al I^-

Rall, Powdery A. Albert afirman (ver Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1950 v 74 pg. 460-461) que

$$\frac{I^{131} \text{ en eritrocitos}}{I^{131} \text{ en plasma}} = 0,67 \quad \text{El } I^{131} \text{ lo agregaron}$$

como I^{131} Na a sangre venosa heparinizada en la relación 0,1 - 0,3 c³ en 25 c³ de sangre, relación elegida ex-profeso para no alterar el equilibrio osmótico. En una parte alicuota determinaron I^{131-} y Cl^{-} . Otra parte alicuota la centrifugaron, separaron plasma y en él dosaron I^{131-} y Cl^{-} . El contenido de I^{-} (idem el de Cl^{-}) en los eritrocitos lo hallaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{halógenos de los eritrocitos} = \frac{\text{total de halog. en sangre total} - (\text{halog. en plasma} \times \text{fracc. plasmática})}{\text{fracción eritrocitaria}}$$

Glinz e Isenbanch (ver Elmer: Iodine metabolism and thyroid function) hallaron 8 - 12 % de yodo en el suero y 4 - 6 % en los glóbulos pero Jansen y Robert Hallaron 70 - 90 % en el plasma.

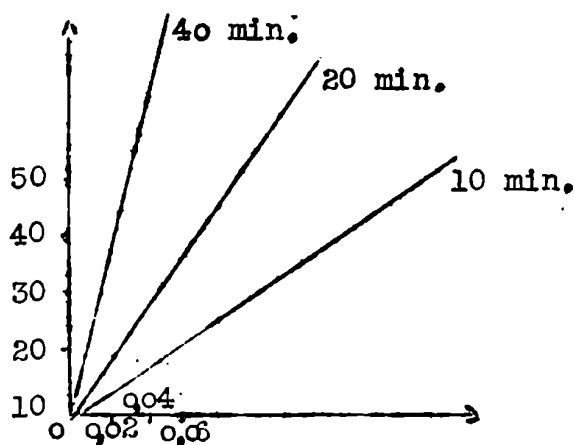
Breve estudio de los métodos fotométricos para dosar yodo (con especial referencia al método de Barker)

Diversos son los métodos fotométricos para dosar yodo basados en el efecto catalítico de los yoduros en la reacción que se produce entre el $(SO_4)_2Ce$ y el AsO_3^{\pm} en medio ácido. La ecuación base de estos métodos es: (a) $As O_3 Na_3 + 2 Ce^{4+} + H_2O \rightarrow As O_4 H_3 + 2 Ce^{3+} + 2 H^+$ la cual nos dice que se trata de una reacción multimolecular con una cinética compleja y cuyo mecanismo no es conocido. Salter afirma que la siguiente ecuación parece estar de acuerdo con los hechos experimentales. $\left\{ \frac{d(Ce^{4+})}{dt} \right\}_{T=cte} = K(I^{-})$; la cual estipula una proporcionalidad entre el grado de reducción del cérico tetravalente y la concentración instantánea del ión I^{-} . Al mismo tiempo implica orden cinético cero con respecto a $1 Ce^{4+}$. El método catalítico fué descrito primero por Kolthoff y Sandell (1937) y tiene la ventaja de una gran sensibilidad y además en condiciones apropiadas una exactitud del 2 - 4 %. La reacción (a) es muy lenta a temperatura ambiente en ausencia de catalizador; tal es así que 1 ml de $(SO_4)_2Ce$ 0,1N en presencia de 2 ml de $As O_3 Na_3$ 0,1N y 2 ml de $SO_4 H_2$ 35N retiene el color luego de 4 días a temperatura ambiente pero la decoloración tiene lugar en pocos minutos en presencia de 1 - 2 % de solución de yodo. Con el objeto de encontrar las condiciones óptimas para una mayor exactitud se estudiaron cuidadosamente los varios factores que controlan la reacción

catalítica: concentración de reactivos, acidez del medio, temperatura e interferencias. Un estudio preliminar muestra que el grado de reducción del sulfato cérico, es proporcional a la cantidad de I^- presente y que la reacción es monomolecular. Como en los últimos grados de la reducción las cantidades de $(SO_4)_2Ce$ presente son muy pequeñas, Chaney halló más conveniente y exacto determinar el Ce^{4+} remanente luego de un período dado en lugar de esperar la completa reducción. Este investigador estudió la relación existente entre la concentración de sulfato cérico y la densidad óptica (calculada a partir del % de transmisión por la fórmula

$$D = \log \frac{100\%}{T\%} \quad \text{leída en el fotocolorímetro usando filtro}$$

azul (coming N° 554). Usó tubos de 1 cm de diámetro y trabajó en las siguientes condiciones que halló satisfactorias: a 4 ml de solución de I^- agregó sucesivamente 0,5 ml de AsO_3H_3 0,2 N y 0,5 ml de $(SO_4)_2Ce$ 0, 1N. Colocó el tubo a 30°C en un baño de agua de temperatura constante y exactamente 5 minutos después de agregar el $(SO_4)_2Ce$ leyó en el fotocolorímetro usando filtro azul. Si el grado de reducción hubiera sido pequeño volvía el tubo al baño y leía luego de 10, 20 o 40 minutos. La figura muestra la relación gráfica entre el I^- contenido en la muestra y la transmisión



de la luz de la solución para distintos tiempos.

Este investigador encontró que la acidez de la solución final debe ser como mínimo 0,4N para prevenir la precipitación del $(SO_4)_2Ce$ y debe ser constante ya que la intensidad del color amarillo es función de la concentración del ión H^+ .

Acidez en exceso ($> 1,5 N$) disminuye el grado de reducción por el yodo. El grado de reducción es mayor a mayor temperatura por lo tanto la temperatura debe ser mantenida constante con $\pm 0,5^\circ C$ de aproximación. Los iones que interfieren son pocos, como lo indican Kolthoff y Sandell. La tabla (I) muestra los iones que interfieren, que causan apreciable error en las medidas de 0,1 mg de yodo en 5 ml. El As tiene efecto catalítico; el SCN^- cambia el grado de catálisis del yodo y los otros interfieren en la acción del I^- .

Tabla (L): Iones que interfiere	Cantidad (en mg)
Os	0,001
Hg ⁺⁺	0,01
Ag ⁺	0,01
S CN	1
CN ⁻	10
Citrato	200

Hg y Ag son los más probables contaminantes. Otros agentes reductores u oxidantes no están presentes en cantidades adecuadas para afectar 0,5 ml de $(SO_4)_2 Ce O_2$ 1N.

Taurog y Chaitoff usan el método de Chaney con pocos cambios para la determinación de microcantidades de yodo en plasma.

Allan Lein y Neene Schwartz dosan I_2 usando el efecto catalítico en la reacción del Ce^{4+} con $As O_3^{\frac{3-}{2}}$ en medio ácido. La transmitancia de las soluciones la miden a 420 m a intervalos de tiempo T y aplican la fórmula siguiente: $I = 0,0439 \frac{\Delta T}{2} - 0,0244$. Las soluciones de Ce^{4+} y As^{3+} no es necesario standardizarlas y el tiempo exacto en que se produce la reacción no es necesario conocerlo (solamente ΔT se requiere).

---0---

Recuperación: En el método de Barker, se recupera aproximadamente entre el 85 % y 95 % del yodo agregado (ver parte experimental). Investigadores que estudiaron el método determinaron la recuperación con ayuda de yodo radiactivo I^{131} . Con la ayuda de este isótopo probaron el método pues permite seguir la conducta del yodo en varios pasos del procedimiento. La radiactividad se midió en la escala del contador Geiger Muller. En la experiencia el yodo radiactivo (preparado por bombardeo de Te con deuterones) contenía cantidades no medibles de I^{127} . Se agregó el I^{131} a 3 ml de plasma antes de la digestión. Las recuperaciones del yodo agregado estuvieron entre 87 % - 90 %. También se hicieron experiencias agregando 0,2 μ de I^{127} a 3 ml de plasma antes de la digestión, y se obtuvo un promedio de recuperación de 90 % (84 % - 94 %). Aumentando el I^{127} agregado a 5 μ se obtuvo una recuperación de 100 %.

En otra experiencia en que se usó I^{131} se obtuvo un promedio de recuperación de 93 % (90 % - 96 %).

Para determinar si la pérdida de yodo ocurre durante la digestión o durante la destilación se hizo la siguiente experiencia: 6 porciones de 3 ml de plasma se agregaron a la mezcla crómica y a cada muestra agregó 1 ml de solución de yodo radiactivo (I^{131}); se hizo la digestión. A otras

2 muestras se las digirió primero y se agregó el yodo radiactivo luego. Se halló que las recuperaciones fueron prácticamente las mismas. Esto indica que poco o nada de pérdida ocurre durante la digestión y que los bajos valores resultan de pérdidas durante la destilación.

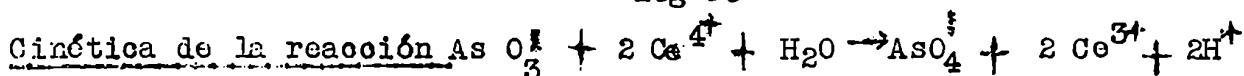
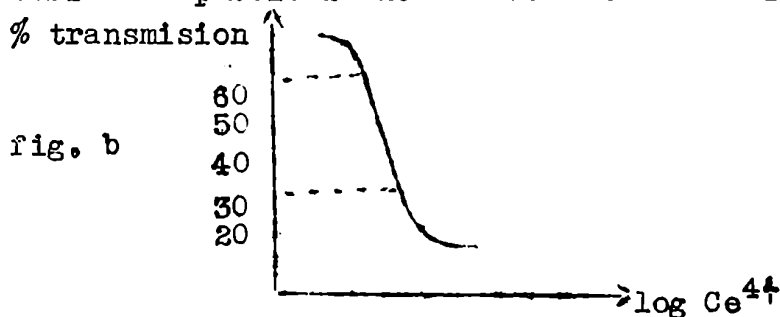
La forma en que el yodo se volatiliza después que el IO_3^- es reducido con PO_3H_3 no se conoce con certeza. Puede volatilizarse ya como I_2 o como IH o posiblemente en las 2 formas. Se halló que cuando el yodo radiactivo se añade como I^- junto con el PO_3H_3 , a la muestra de digestión, el yodo radiactivo es recuperado casi cuantitativamente en el destilado. Esta observación está en concordancia con los resultados de Fashena y Treworow quienes hallaron que el yoduro agregado luego de la reducción con PO_3H_3 se recupera en el destilado. Esto da una razonable evidencia de que no es bastante solamente con reducir el IO_3^- a I_2 para recuperarlo cuantitativamente. En estas experiencias I^- como tal (o probablemente IH) es volatilizado.

La importancia de los agentes de adición como peróxido de hidrógeno, que algunos investigadores agregan junto con el PO_3H_3 para completar la recuperación de yodo, es discutida.

---0---

Característica de la absorción de la luz de las soluciones de $(\text{SO}_4)_2\text{Ce}$:
Allan Lein y Rena Schwartz en su trabajo sobre la reacción del sulfato cérico y el ácido arsenioso en la microdeterminación del yodo; hallaron resultados erróneos al seguir fotométricamente la reducción del amarillo cérico a incoloro ceroso y por este motivo reinvestigaron el método. Como ninguno de los métodos publicados hasta el momento tenían en cuenta la constante de velocidad de reacción como medida de la catalisis por el yoduro, esta posibilidad fue investigada y para eso realizaron estudios sobre las características de la absorción de la luz de las soluciones de $(\text{SO}_4)_2\text{Ce}$ y sobre la cinética de la reacción de óxido reducción. En lo que al primer punto se refiere hallaron que el $(\text{SO}_4)_2\text{Ce}$ absorbe el máximo en el ultravioleta a aproximadamente $315\text{m}\mu$ y en esta región la absorción parece seguir la ley de Beer. Sin embargo, como muchos fotómetros no pueden ser usados a esta longitud de onda se emplea la luz más azul del espectro visible. Channey (I) a $420\text{m}\mu$ encuentra que los valores se desvían de la ley de Beer. Salter (II); sin embargo, a la misma longitud de onda que Channey, usando fotómetro Klett, obtiene lecturas aproximadamente proporcionales a la densidad óptica para espesarse. concentración de $(\text{SO}_4)_2\text{Ce}$ lo cual implica conformidad

con la ley de Beer. A, Lein y N, Schwartz (III) usan fotómetro Coleman tra-
 bajan a longitud de onda 420 μ y emplean cubetas borosilicatadas (tubos) se-
 leccionadas para uniformidad de las propiedades ópticas. Como acidez y tem-
 peratura influyen en la densidad óptica de la solución de $(\text{SO}_4)_2 \text{Ce}$, estos
 factores se controlaron, Se prepararon una serie de soluciones. A cada cu-
 beta agregaron 2 ml de $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 2N, 2 ml de $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 7 N y cantidades variables
 de $(\text{SO}_4)_2 \text{Ce}$, y agua suficiente para completar 10 ml. (El $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ represen-
 ta el residuo del procedimiento alcalino para destruir materia orgánica;
 se incluye por lo tanto un exceso de $\text{SO}_4 \text{H}_2$. Las cubetas se colocan en ba-
 ño de agua a temperatura ote de 40°C y se leen luego a 420 μ . Los resul-
 tados revelan una relación curvilínea (la curva es una hipérbola) entre la
 concentración de $(\text{SO}_4)_2 \text{Ce}$ y el % de luz transmitida a 420 μ . Como en
 la medida de las constantes de velocidad se requiere el log de la concentra-
 ción de los reactantes, los autores hallaron conveniente poner el % de luz
 transmitida en función del log de la concentración de $(\text{SO}_4)_2 \text{Ce}$ y obtuvieron
 una curva en forma de S cuya porción central es lineal (fig. b). Para ex-
 cluir la porción no lineal de la curva y permanecer dentro del rango exacto
 del fotómetro, las lecturas de transmitancia son confinadas a l rango de
 30 % a 65 %; entre estos límites la ecuación es: $\log(\text{Ce}^{4+}) = 0,316 - 0,0158 T$.
 Si sólo cambios en el log (Ce^{4+}) se requieren, se obtiene la ecuación
 $\Delta \log(\text{Ce}^{4+}) = 0,0158 \Delta T$. El error standard de calcular el log (Ce^{4+})
 fué encontrado en 0,011 para la porción lineal de la curva, lo cual repre-
 senta un error standard de $\pm 2,5$ % para la estimación de concentraciones
 céricas a partir de los valores de transmitancia.



Como esta ecuación indica que esta reacción es multimoleoular con com-
 pleja reacción cinética, para expresar la constante de velocidad de reacción
 haciendo frente a esta dificultad puede usarse la recíproca del tiempo re-
 querido para que una dada fracción de uno de los reactantes reaccione. Es-
 te número es proporcional a la constante de velocidad de reacción. Desde el
 punto de vista cinético, Kolthoff y Sandell indican el tiempo transcurrido

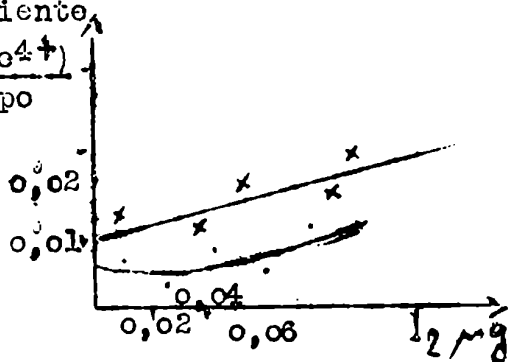
para que la reacción sea completa y encuentran una relación lineal entre la recíproca de este tiempo y la cantidad de yodo presente. Sus hallazgos implican un efecto lineal del ión I^- en la constante de la velocidad de la reacción. Este procedimiento es factible con las cantidades relativamente grandes de I^- usadas por Kalthoff y Sandell ya que la reacción es tan rápida como para dar un rápido y visible punto final pero no es aconsejable para cantidades pequeñas.

Medir el tiempo transcurrido para que una dada fracción de $(SO_4)_2Ce$ reaccione también es discutido. Otro método mide la cantidad de Ce^{4+} reducido en un tiempo dado.

Los autores estudiaron la relación más conveniente $\frac{AsO_3}{Ce^{4+}}$, usando una concentración de I^- constante y cantidades de AsO_3H_3 variables entre 0,5 a 20 veces la concentración de Ce^{4+} . Hallaron una relación lineal entre el log de la concentración de $(SO_4)_2Ce$ y el tiempo transcurrido hasta realizar las lecturas. Además sus resultados revelan que a relativamente bajas concentraciones de AsO_3H_3 , la constante k de velocidad de la reacción permanece independiente del cambio en la relación de los reactantes lo cual en cambio ocurre durante la reacción; y a altas concentraciones tiende a ser independiente de la relación inicial de los reactantes. Hallaron inconveniente una relación $\left[\frac{AsO_3}{Ce^{4+}} \right]_{20}$ debido al límite de sensibilidad del ácido arsenioso.

Para determinar el efecto de la concentración de ión I^- sobre k_1 (velocidad específica en la reacción de primer orden) agregaron a una serie de tubos que contenían AsO_3 y Ce^{4+} en relación 20/1, cantidades variables entre 0 y 0,12 mg de I^- . Los resultados hallados por los autores (ver Allan Lein y N. Schwartz, Anal. Chem. 23, 1850, 1951) son los que muestra el gráfico siguiente.

$$k_1 = \frac{\Delta \log(Ce^{4+})}{\text{tiempo}}$$



Efecto de la concentración de I^- sobre k_1 en $Cl Na x$ con 100 mg de $Cl Na$

(I) Chaney A.L. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 12, 149 (1940)

(II) Salter W.T. Ho Key E.A. Endocrinology 35, 380 (1944)

(III) A. Lein y N. Schwartz. Anal. Chem. 23, 1850 (1951).

El método de Barker modificado por Barr y el dosaje final de yodo:

Como hemos dicho, el dosaje final de yodo según este método se realiza colorimétricamente. El espectro fotómetro (colorímetro) empleado es el "Unicam" y las lecturas se realizan para una longitud de onda de $420m\mu$ pues se comprobó experimentalmente que a esta long de onda y para cantidades de yodo comprendidas entre 0,02 y 0,1% (°) las lecturas de las densidades ópticas permiten comprobar que la ley de Beer se cumple estrictamente.

Para un punto teórico final nos parece oportuno hacer algunas consideraciones acerca de la ley de Beer y el análisis espectrofotométrico. Cuando una onda electromagnética pasa a través de una solución, parte de la energía puede ser absorbida por el medio. Este hecho se debe a la interacción de las partículas del medio (iones o moléculas) con los fotones, que provoca o un aumento de la energía de vibración y rotación o desplazamiento de los electrones interiores de las moléculas. El análisis espectrofotométrico se basa en este fenómeno y es posible, midiendo la absorción que sufre un haz de ondas electromagnéticas, determinar la concentración de un compuesto en solución. A estos métodos se les han aplicado los nombres de análisis espectrofotométrico de absorción, absorciometría, fotometría, y en el caso de radiaciones visibles, colorimetría. Estas definiciones no son, sin embargo, adoptadas por todos los autores. Las leyes sobre las cuales se basan estos métodos y que vamos a dar a continuación se aplican solamente a rayos monocromáticos, es decir, a rayos que comprenden sólo longitudes de onda muy cercanas (por ejemplo 10 Å, aunque hay aparatos más sensibles que seleccionan bandas de 2,3 Å por ejemplo monocromador de Zeiss).

Todo rayo luminoso que atraviesa una solución es en parte absorbido por ésta, en parte reflejado y en parte transmitido sin alteración. Es de

$$I_0 = I_t + I_a + I_r$$

I_0 = intensidad del rayo incidente; I_t = intensidad del rayo transmitido.

I_r = intensidad del rayo reflejado; I_a = intensidad del rayo absorbido.

(°) Para concentraciones de I^- < 0,02 y > 0,1 se supone que se han de producir alguno de los fenómenos más adelante mencionados que ocasionan incumplimiento de la ley de Beer. Cuales son en concreto los fenómenos que ocurren en este caso no han sido estudiados, por nosotros ni hallados en la bibliografía consultada.

En colorimetría no se tiene en cuenta la reflexión ($I_r = 0$). Se trata ahora de hallar una relación I_0 e I , único valor fácilmente accesible a la experiencia. Estas relaciones son fijadas por la ley de Lambert, Beer. Lambert demuestra que hay una relación constante para un sistema absorbente dado, entre la intensidad del rayo incidente y la del rayo transmitido. En el caso de una solución esta relación se designa con la letra a cuando la concentración (c) molar es igual a 1 y la longitud (l) del recipiente es 1 cm. De donde $\frac{I_t}{I_0} = a_{(c=1; l=1)}(l)$ (la ley de Lambert, en realidad ley de Bouguer).

Se puede demostrar (2da. ley de Lambert), que al variar el recipiente en proporción aritmética, la densidad óptica, o sea la relación $\frac{I_t}{I_0}$ varía en proporción geométrica de donde $\frac{I}{I_0} = a^{-l}$ (2).

Si el rayo de intensidad I_0 incide en una capa infinitamente delgada dl , el decrecimiento de intensidad dI de la luz incidente será proporcional a I_0 y a dl

$dI = -k I_0 dl$ (3) donde k es el factor de proporcionalidad. Integrando (3)

$$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -k \int_0^l dl$$

$\ln \frac{I_t}{I_0} = -k l \therefore I_t = I_0 e^{-kl}$ La constante k es a menudo llamada

índice de absorción y coeficiente de absorción. Cambiando de logaritmos naturales a logaritmos de Briggsian ($\log_{10} e = 0,4343$) tenemos

$$I_t = I_0 10^{-0,4343 kl} = I_0 \cdot 10^{-\xi l} \quad (5)$$

Bunsen y Roscoe llamaron a la constante coeficiente de extinción, y es el valor recíproco del espesor l cuando $I_t = \frac{1}{10} I_0$

$$\frac{I_t}{I_0} = 0,1 = 10^{-\xi l} \quad \text{o bien} \quad \xi l = 1 \quad \text{y} \quad \xi = \frac{1}{l}$$

Ley de Beer: Beer simultáneamente con Bernard encontró, estudiando la influencia de l a concentración de una sustancia coloreada en solución y la luz transmitida o absorbida, igual relación que la hallada por Lambert entre transmisión y espesor. La ley de Beer se expresa matemáticamente así: $I_t = I_0 a^{-c}$ (6). En la cual c es la concentración.

(cuando $c = 1$ (6) se reduce a (1)). Otra vez se mantiene la siguiente relación $dI = -k_1 I_0$ de (7), en la cual se implica un cambio infinitamente pequeño en la concentración.

Integrando (7)

$$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -k_1 \int_0^c dc ; \quad] \quad \frac{I_t}{I_0} = e^{-k_1 c} \quad (8') ; \quad I_t = I_0 e^{-k_1 c} \quad (8)$$

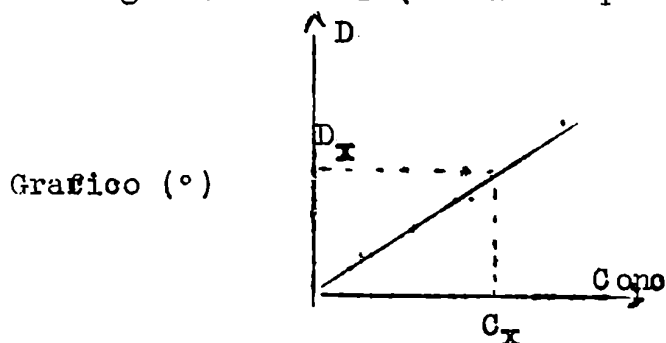
$$y \quad I_t = I_0 10^{-0,4343 k_1 c} \quad (9)$$

Combinando las ecuaciones (5) y (9) se obtiene la ecuación fundamental de la colorimetría y espectrofotometría: $I_t = I_0 10^{-\epsilon l c}$ (10)

De (10) puede verse que el valor de I_t varía con la forma de expresar la concentración si se trata de concentraciones molares; ϵ denota el coeficiente de extinción molar y l es igual al valor recíproco del espesor (en cm) de una solución molar ($c = 1$) a la cual I_t es 0,1 de I_0 .

La ecuación (8) se mantiene para distintos valores de la concentración del compuesto coloreado si la ley de Beer es obedecida. De (8') deducimos que $\ln I_t = -k_1 c \ln I_0$ que es una ecuación de la forma $y = -mx + b$ y por lo tanto es una recta.

En general en la práctica se procede del siguiente modo: Se representa gráficamente D (densidad óptica) $= \ln \frac{I_0}{I_t}$ en función de las concen-



traciones. La densidad óptica se lee directamente sobre el tambor o escala de los espectrofotómetros. Conociendo este valor y habiendo determinado k o ϵ (si se trabaja con

logaritmos decimales) de antemano sobre una solución de concentración conocida, es cosa fácil deducir la concentración del cuerpo desconocido. En general se determinan valores de D para una decena de concentraciones conocidas y se traza la curva experimental. Si la coloración obedece la ley de Beer, se obtiene una recta, sobre la cual será posible determinar C_x , la concentración desconocida, midiendo D_x en el colorímetro.

Casos en que es obedecida la ley de Beer: Como hemos visto, los métodos espectrofotométricos mencionados pueden aplicarse para soluciones para las cuales se cumpla la ley de Beer. La espectrometría ha experimentado un notable incremento estos últimos años. Permite dosar la casi totalidad de las sustancias minerales y un número muy grande de compuestos orgánicos. Es un método rápido, que se aplica particularmente bien a la determinación de sustancias presentes en concentraciones bajas hasta vestigios.

En general si la estructura de los iones coloreados o de los no-electrolitos coloreados en el estado disuelto no cambia con la concentración,

la ley de Beer se mantiene dentro de un amplio rango de concentraciones. Es el caso por ejemplo de los permanganatos, cromatos, picratos y numerosos colorantes orgánicos. Estas sales son electrolitos fuertes y la absorción de la luz está gobernada por la concentración y no por la actividad de estos iones. La presencia de grandes cantidades de electrolitos no coloreados que no reaccionan químicamente con los componentes coloreados, puede afectar el espectro de absorción cualitativa y aun cuantitativamente, debido a interacción física entre los iones del electrolito y los iones coloreados o moléculas de lo cual resulta una deformación de estas últimas con un consiguiente cambio de la absorción de la luz. También puede haber interacción entre el electrolito agregado resultando un cambio en el grado de solvatación (hidratación) del último, con un consiguiente cambio en el espectro de absorción. Si el grado de disociación de un compuesto coloreado cambia con la concentración, la ley de Beer no suele ser obedecida. Además, electrolitos que reaccionan químicamente con los compuestos coloreados afectan el espectro de absorción.

No es el caso de discutir aquí todos los factores responsables de desviación de la ley de Beer; solamente diremos para terminar que los fenómenos de disociación en algunos casos, la formación de complejos en otros, como también la formación de sustancias coloreadas insolubles que permanecen en suspensión (suspensiones coloidales), son, podríamos decir, los más importantes factores responsables de desviaciones en la ley de Beer. En el caso de las suspensiones coloidales la teoría de la absorción de la luz es sumamente compleja. El color de la suspensión depende en gran parte del tamaño de las partículas y éste a su vez de la concentración de los reactivos, la temperatura de preparación de la suspensión, el tiempo que se espereá luego de la adición del reactivo y la presencia de otros electrolitos. Pero aún estudiando cuidadosamente las condiciones para obtener resultados reproducibles en trabajos colorimétricos con suspensiones la ley de Beer sólo se cumple dentro de un estrecho rango de concentraciones.

Volviendo al tema que nos ocupa, no sabemos en concreto qué fenómenos ocasionan el incumplimiento de la ley de Beer en las densidades ópticas de las soluciones céricas, cerosas en presencia de ión I^- fuera del rango mencionado en que dicha ley se cumple. Es evidente que se deberá a algunas

(1) el solvente (generalmente agua) y el compuesto coloreado.

de las causas antedichas (interacción física entre I^- agregado y los iones presentes en la solución, fenómenos de disociación o formación de complejos, etc.).

En la reacción $AsO_3 + 2 Ce^{4+} + H_2O \xrightarrow{I^-} AsO_4 + 2 Ce^{3+} + 2H^+$ se comprenderá ahora fácilmente como, si la ley de Beer se cumple para un rango más o menos amplio de concentración de I^- y siendo la concentración de I^- proporcional al grado de decoloración de las sales céricas (amarillas) a medida que se transforman en cerosas (incoloras) nos será fácil determinar, con la ayuda de un gráfico análogo al gráfico (°), el contenido de yodo presente en la muestra analizada mediante la lectura de las densidades ópticas de las soluciones cérico-cerosas en presencia de I^- .

Se usó para realizar las determinaciones, el espectrofotómetro "Unicam" graduado para la zona visible del espectro (400 - 800 $m\mu$ o sea 4000 - 8000 A° siendo $1 \text{A}^\circ = 10^{-8} \text{cm}$) pues según indica Barker a 420 $m\mu$ la absorción de la luz es máxima y los valores obtenidos son proporcionales a las densidades ópticas. El "Unicam" es un espectrofotómetro a célula en el cual las determinaciones de densidades ópticas se hacen por lectura en la escala graduada, del valor previamente medido por una o varias células fotoeléctricas.

Existe un gran número de espectrofotómetros (colorímetros) que pueden clasificarse en espectrofotómetros visuales (Pulfrich) en los cuales la determinación de la densidad óptica se hace visualmente y en espectrofotómetros a células (Unicam, Speker, Hilger, Beckman, Spectronic) en los que las densidades ópticas son medidas por una o varias células fotoeléctricas.

PARTE EXPERIMENTAL

INTRODUCCION

El presente trabajo consta de 2 partes:

1a.) Valoración del Yodo Proteico (P.B.I.) en el suero humano según el método de Barker modificado por Carr y col. que se explica en la parte teórica. El objeto de estos dosajes es ayudar con ellos en el diagnóstico clínico de las enfermedades de la glándula tiroides y otras que son consecuencia de anormalidades tiroideas. Está científicamente comprobado que el contenido de yodo del plasma sanguíneo humano (hormona tiroidea circulante) varía en individuos eutiroideos, hipotiroideos, hipertiroideos, etc.

---0---

2a.) Adaptación del método mencionado más arriba a la determinación del yodo total contenido en tiroides de sapos a los efectos que se detallan a continuación: Con el fin de hacer estudios de investigación sobre la fisiología del sapo se trató de averiguar el contenido de yodo proteico, no proteico y total contenido en el suero de sapos normales, hipofisoprivos y normales a los que se les haya inyectado previamente extractos de lóbulo anterior de hipófisis. Como se verá más adelante estas investigaciones llevaron a la conclusión de que no podía en este caso emplearse el método de Barker y Carr pues las determinaciones colorimétricas daban transmisiones ópticas del mismo orden que las de los blancos lo cual significa que o bien no existe en el plasma de estos animales hormona tiroidea circulante o la hay pero en cantidades inferiores a las detectadas por el método usado. Las determinaciones en hipofisoprivos se pensó que no tenía sentido realizarlas pues la hipofisectomía se presumió que produciría un descenso en el contenido de yodo. Por estas razones se decidió trabajar con tiroides pues se supuso que la cantidad de hormona tiroidea presente en la tiroides sería indudablemente mucho mayor que la de hormona tiroidea circulante.

Se trabajaría pues de la siguiente forma:

- a) Con tiroides de sapos normales (se usarían sapos machos y hembras para determinar la variación sexual y además se harían las determinaciones en distintas estaciones del año para observar en cada caso las variaciones estacionales).
- b) Con tiroides de sapos hipofisoprivos. Aquí se averiguarían las siguientes funciones: Contenido de Yodo / 100 mg de tejido fresco tiroideo en función de los días después de la hipofisectomía. Contenido de yodo/100 g de

peso del cuerpo en función de los días después de la hipofisectomía. Contenido de yodo total de la tiroides en función de los días después de la hipofisectomía. (ver nota al pie de la página).

Todo esto se realizaría (I) en sapos hembras y en distintas épocas del año y (II) en sapos machos y en distintas épocas del año. Este trabajo permitiría observar los efectos de la hipofisectomía sobre el contenido de yodo tiroideo.

c) Con tiroides de sapos a los que se les hubiera inyectado extractos de lóbulo anterior de hipófisis, lo cual permitiría observar los efectos de la hormona tirotrófica sobre el contenido de yodo tiroideo. Se procedería exactamente como en b).

En resumen: Este trabajo originariamente hubiera tenido como único objeto observar en estos animales la interrelación entre las hormonas: hipofisaria (tirotrófina) y tiroidea expresada como yodo intratiroideo total, como % de yodo en tejido fresco tiroideo y como contenido de yodo en 100 g de peso del cuerpo. Sin embargo, por dificultades técnicas solamente pudo llegarse a consignar una serie de datos hallados en sapos machos normales en distintas épocas del año, y otros en sapos machos hipofisoprivos a distintos días de practicada la hipofisectomía y también en distintas épocas del año.

A continuación se explica detalladamente el trabajo realizado.

Preparación de reactivos: (ver Barker, Journal Biolog. Chem. 173 N°2 abril 1948).

Solución "trap" concentrada: Se llama así porque se coloca en la trampa. Es una solución que contiene 0,0075 g de As_2O_3 por ml. Se prepara disolviendo 70 g de HONa en 200 ml de H_2O (solución 3 N). Se agregan 7,5 g de As_2O_3 , se disuelve y diluye a 1 litro.

Solución "trap" diluida: Contiene 0,003 g de As_2O_3 en 5 ml. Se diluyen 80 ml de la solución trap concentrada a 1 litro 5ml de esta solución tendría $\frac{2}{5}$ de la cantidad de As^{+++} contenida en 1 litro de solución trap concentrada. Agregar 5 ml de esta solución a los tubos de colorimetría y se tendrá así un contenido y concentración de As^{+++} igual a la de los 10 ml de trap, conc.

NOTA: En ratas la forma de la curva que da el efecto de la hipofisectomía sobre el contenido de yodo tiroideo es aproximadamente una hipérbola. (ver Scow y Hollman : Endocrinology, marzo 1953, Vol 52 N°3 pag. 338 - 345.)

colocada en los tubos colorimétricos a partir del matraz de 25 ml. Se usa 5 ml de trap diluida por tubo colorimétrico.

Solución "end point" o Reactivo reductor:

(As⁺⁺⁺ en medio alcalino de HONa)

Se prepara de la manera siguiente:

- a) Disolver 2 gr de HONa en 200 cc de agua (0,25 N) Agregar 3 gr de As₂O₃ y disolver.
- b) En un matraz o balón Pyrex de 2 l poner más o menos 1000 ml de agua y lentamente y enfriando agregar 764 ml de SO₄H₂ conc.
- c) A la solución de SO₄ H₂ añadir la de As³⁺ y luego 87,5 gr de ClNa. Diluir la solución a 2 litros.

Reactivo oxidante: (SO₄)₂ Ce. 2 SO₄(NH₄)₂ 2 H₂O

(5,3 g Ce⁴⁺ por litro de SO₄H₂ 3,5 N)

A más o menos 500 ml de agua bidestilada agregar 96,5 ml de SO₄H₂ conc. libre de yodo. Enfriar, disolver en este 24 gr de (SO₄)₂ Ce. 2 SO₄(NH₄)₂.

2H₂O. diluir a 1000 ml. Luego $\frac{140}{632,5} \times 24 = 5,3 \text{ g Ce}^{4+}$

Purificación del sulfato cérico, amónico : Se hace para reducir los blancos a bajos niveles. Se disuelven 10 gr de (SO₄)₂ Ce. 2 SO₄(NH₄)₂ 2H₂O en la mínima cantidad de SO₄H₂ conc. 3,5 N libre de IO₃⁻, hasta disolución total; luego se concentra con cuidado evitando proyección, hasta que aparezca opalescencia. Se deja enfriar y se tapa parcialmente con cristalizador dejándolo 2 días, luego se enfría con hielo y se filtra a través de placa filtrante. El precipitado, aunque formado se lava con acetona bien fría y se seca al vacío.

Preparación de SO₄H₂ libre de IO₃⁻: A 500 ml de SO₄ H₂ (a) se agregan 2,5 ml de ClH (c). Se hierve 1 hora. Se emplea solución 70 % en peso.

Preparación de glóbulos rojos hemolizados libres de yoduro: Se centrifuga sangre entera y sedimentan los elementos figurados y en la parte superior el plasma. Se separa el plasma. La masa de hematíes se lava 3 veces con solución fisiológica (Cl Na 8,5 %). El lavado se hace agitando y moviendo con cuidado para evitar la hemólisis. A la masa de hematíes lavados se agrega igual volumen de agua bidestilada (exenta de I₂), en este momento se produce la hemólisis de los glóbulos y se obtiene lo que se llama solu

ción de hemoglobina (que es espesa). Se guarda en un Erlenmeyer en la congeladora o nevera a -10°C o -5°C (se conserva meses). Cuando se desee usar se saca una parte y se coloca en la heladera.

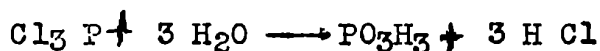
Acido crómico: (CrO_4H_3)

Se usa solución 60 % de CrO_3 en agua bidestilada. Se emplean 3 ml por mustra. El CrO_3 en muchas ocasiones viene impurificado con IO_3H . Nosotros tuvimos que subsanar este inconveniente en nuestro laboratorio pues por lo general las partidas venían impurificadas. Entre los diversos métodos de purificación hallados en la literatura se consideró satisfactorio el que consiste en recrystalizar los cristales de CrO_3 de su solución acuosa a -4°C pues a esa temperatura el CrO_3 es muy poco soluble en agua, y lo contrario ocurre con el IO_3H . (ver tablas de solubilidad en Mellor T XI pag. 212: A Comprehensive treatise on Inorganic and Theoretic chemistry) y en P. Pascal T. Chimie Minérale T I pag. 740).

Los cristales de CrO_3 libres de IO_3H se filtran por placa y se secan en desecador al vacío. La recrystalización en algunas ocasiones debimos repetirla 2 veces.

También se tropezó con la dificultad de no hallar la droga en plaza por lo cual fué preparada en nuestro laboratorio según la técnica hallada en Guirald y Rojam (Productos Farmaceuticos) que obtiene CrO_3 de acuerdo a la siguiente ecuación $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2 + 2 \text{SO}_4\text{H}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4 \text{HK} + 2 \text{CrO}_3 + \text{H}_2\text{O}$
Se utilizó $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ p.a. el cual fué liberado de yodo por recrystalización de su solución acuosa. El SO_4H_2 se liberó de yodo de acuerdo a la técnica ya descripta.

Preparación de ácido fosforoso: Se usa solución 60 % en agua bidestilada. Como se tropezó con la dificultad de no hallar la droga en plaza, debió prepararse en nuestro laboratorio. De las distintas técnicas descriptas en Mellor (Inorganic Chemistry), Pascal (Trat. de Chimie Minérale) etc., se eligió la siguiente que dió resultados satisfactorios: El PO_3H_3 es obtenido a partir de Cl_3P y agua, de acuerdo a la siguiente ecuación:



Se coloca el Cl_3P en un balón de 2 bocas en una de las cuales va una ampolla de decantación y en la otra un refrigerante a reflujo que es conectado a un tubo de desprendimiento que termina en un embudo que pesca en

en un vaso con agua, en este vaso se recoge el H Cl que se desprende. El agua se echa gota a gota por la ampolla de decantación. Se añade 50 % en exceso de agua respecto a lo indicado por las cantidades estequiométricas. La solución de PO_3H_3 que se obtiene dentro del balón se concentra por calentamiento en vaso abierto y luego se recristaliza en baño de hielo, por sombreado de cristales de PO_3H_3 y frotando las paredes del vaso. Se filtra por placa y se seca en desecador al vacío.

---0---

Para preparar todas las soluciones se usó agua bidestilada como así también se la utilizó como único agente lubricante de los aparatos. El motivo por el cual se usó agua bidestilada (como lo indica Barker) es que con agua destilada se obtienen blancos altos debido a la presencia de I^- o de otros iones que interfieren en la reacción entre el As^{3+} y el Ce^{4+} .

---0---

Recuperaciones:

Para probar el método se hicieron las siguientes recuperaciones:

Se procedió como indica la técnica (ver parte teórica).

Los valores se hallaron con los datos que se dan a continuación:

		Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (minutos)	lectura (minutos)	T%	
		B	0	22	45	
0,02	I ₂	2	1	23	51,5	
0,04	I ₂	4	2	24	55	
0,06	I ₂	6	3	25	60,5	
0,08	I ₂	8	4	26	64	
0,10	I ₂	10	5	27	77	
		B	6	28	46	
		B'	7	29	46	
		R ₁	8	30	55	96 %
		R ₁ '	9	31	56	
		R ₂	10	32	56	
		R ₂ '	11	33	57	93 %
		R ₃	12	34	60	
		R ₃ '	13	35	59	90 %
		R ₄	14	36	64	
		R ₄ '	15	37	62	96 %
		R ₅	16	38	58	
		R ₅ '	17	39	57	93 %

R₁, R₁'; R₂ y R₂' se hicieron agregando al balón antes de la digestión 5ml de las soluciones que contenían 0,08 y 0,10 de I₂/5 ml de solución respectivamente R₃, R₃'; R₄, R₄'; R₅ y R₅' se hicieron agregando 10 ml de las soluciones que contenían 0,08 ; 0,10, y 0,06 I₂/5 ml de solución respectivamente.

Por procedimiento análogo se realizaron otras recuperaciones cuantitativas de I₂ que arrojaron resultados satisfactorios (ver cuadro 1)

Cuadro 1: Recuperación de yodo por destilación:

Muestra N°	Yodo Agregado (γ)	Volumen de destilado recogido (ml)	Yodo recuperado (contenido en 10 ml de destilado) (γ)	% de Yodo recuperado
1	0,10	25	0,038	96
2	0,12	25	0,045	95
3	0,08	"	0,026	84
4	0,16	"	0,056	89
5	0,20	"	0,076	95
6	0,10	"	0,035	88
7	0,16	"	0,058	91
8	0,00	"	0,00	--

Valoración del Yodo Proteico en el suero humano:

Las determinaciones de que hago mención en el presente trabajo fueron realizadas en los siguientes grupos de pacientes:

- a) Testigos no enfermos (médicos, estudiantes, etc.)
- b) Hipotiroides
- c) Hipertiroides

d) Pacientes con bocios nodulares o difusos no tóxicos.

e) Pacientes con otras enfermedades pero con función tiroidea normal.

Grafico N° 1:

Nombre del Paciente	% de yodo en suero	Diagnostico
A.L.	1,6%	Hipotiroides
S.B.	2,5%	Bocio nodular no tóxico
C.C.	6,12%	Eutiroides
O.	1,6% /100 ml	Hipotiroides
E.	1% /100 ml	Hipotiroides
S.de R.	8,6% /100 ml	Hipertiroides
T.R.	9% /100 ml	Bocio difuso no tóxico

Los resultados se hallaron con los datos siguientes:

Tubo N°	Agreg. de Ca^{4+} (minutos)	Lect. (minutos)	T %
B ₀	0	22	52
1	1	23	60
2	2	24	65
3	3	25	70
4	4	26	76
B	5	27	55
B ₁	6	28	55
1	7	29	59,5
A.L	8	30	60,5
1	9	31	61
S.B.	10	32	61
2	11	33	65
C.C.	12	34	65
3	13	35	59,5
4	14	36	60,5
O.	15	37	59
5	16	38	60
E.	17	39	69
6	18	40	69
S.de R.	19	41	70
7	20	42	70
T.R.			
7			

Gráfico N° 2

Nombre del Paciente	% de Yodo en suero %/100 ml	Diagnóstico
E.S.	4,5	normal (eutiroides)
M.L.	8	Eutiroides
R.M.S.	5,25	Bocio difuso no tox.
E.M. de T.	7,5	Eutiroides
R. del C.	6	Eutiroides
S.M. de T.	6,4	Bocio nodular no tox.
P.A.	7,18	Acromegalia.

Tubo N°	Agreg. de Ca^{4+} (minutos)	lectura (minutos)	T%
B ₀	0	22	51
1	1	23	56
2	2	24	60
3	3	25	65
4	4	26	70
B	5	27	52
1	6	28	57
E.S.	7	29	57
1	8	30	61
M.L.	9	31	62
2			

Tubo N°	Agreg. de Ce ⁴⁺ (minutos)	lectura (minutos)	T %
R.M.S. 3	10	32	57
R.M.S. 3'	11	33	58
E.M.de T. 4	12	34	60
E.M.de T. 4'	13	35	61
R.del C. 5	14	36	58
R.del C. 5'	15	37	59
S.M.de T. 6	16	38	59
S.M.de T. 6'	17	39	59
P.A. 7	18	40	60
P.A. 7'	19	41	60

Gráfico N° 3

Nombre del Paciente	% de Yodo en suero δ/100 ml.	Diagnóstico
A.M.R.	10,2	Bocio nodular no tox.
J.M.S.	7,1	Acromegalia
J.L.L.	5,75	Enfermedad tiroidea
M.D.N.	10,0	Bocio exoftálmico
B.L.	10,0	Hipertiroides
R.R.	10,0	Hipertiroides
G.C.	16	Hipertiroides

Tubo N°	Agr. de Ce ⁴⁺ (minutos)	Lectura (minutos)	T %
B	0	22	51,5
1	1	23	57,5
2	2	24	61
3	3	25	64,5
4	4	26	71
B	5	27	52
1	6	28	65
A.M.R. 1'	7	29	66
2	8	30	60
J.M.S. 2'	9	31	61
3	10	32	59
J.L.L. 3'	11	33	59
4	12	34	65
M.De N. 4'	13	35	65
5	14	36	66
B.L. 5'	15	37	65
6	16	38	65
R.R. 6'	17	39	65
7	18	40	82
J.C. 7'	19	41	82

Conclusión:

Los valores hallados en e. tiroides oscilan entre 4,5δ % y 8δ % (por 100 ml. de suero).

Para hipotiroideos se hallaron valores entre menos de 1δ /100 ml suero y 4δ /100 ml.

Para bocios modulares y difusos no tóxicos los resultados están entre 2,5δ /100 y 10,2δ /100.

Los valores hallados en hipertiroides están comprendidos entre 10,6δ /100 y 16δ /100.

(En estos casos los valores consignados son los mínimos y máximos hallados respectivamente).

Intentos de Valoración del Yodo Proteico y Yodo Total en plasma de sapos normales

Se trabajó en primer lugar con 2 ml de plasma heparinizado (se hizo un pooling) de sapos normales.

1) Se pptaron las proteínas con $\text{SO}_4\text{Zn} + \text{HONa}$ y en el pptado se hizo la determinación

Blancos: agua + heparina + ag. pptante

Testigos: 2ml de plasma de sapos normales heparinizado + ag. pptante.

Resultados: Lectura de Blancos: 52 y 53

Pooling de plasma: 52 y 53

Trasmisión: Pooling - Blanco = 0

2) Se trabajó con el plasma entero, sin pptar proteínas.

Blancos: agua + heparina

Testigos: 2 ml plasma heparinizado de sapos normales.

Resultados: Lectura de Blancos: 52 y 53

Pooling de plasma: 52 y 53

Trasmisión: Pooling - Blanco = 0

3) Se hizo la determinación en el sobrenadante de 1) y se obtuvo el mismo resultado, lo que deshecha la posibilidad de que hubieran permanecido solubles péptidos di y tri iodados.

4) Se pensó que la pequeñísima cantidad de hormona tiroidea circulante presente en 2 ml de plasma, podía no ser detectada por el método y por eso se duplicó la muestra de plasma.

Se trabajó con 4 ml de plasma heparinizado de sapos normales.

Blancos: agua heparina + ag. pptante ($\text{SO}_4 \text{Zn} \text{ HONa}$)

Testigos: 4 ml plasma hepar. + ag. pptante.

Resultados: Lectura Blancos: 51 y 52

Pooling plasma: 52 y 51

5) Se investigó de la misma forma que 2) pero usando 4 ml de plasma y se obtuvo idéntico resultado.

Conclusión: Se pensó que, o no hay hormona tiroidea circulante en el plasma de sapos o bien ésta no está presente en cantidad detectable por el método usado.

Se resolvió hacer las determinaciones directamente en la tiroides, para investigar así el yodo total presente en la misma.

Para saber si el método podía adaptarse se hicieron previamente deter

minaciones en tiroides de ratas y se compararon los resultados con los obtenidos por otros investigadores.

---0---

Determinaciones en tiroides de ratas: (normales)

Se trabajó con 2 tiroides de ratas hembras.

Peso de las ratas: A: 140 gr Edad según tablas: 3 meses

B: 145 gr

Peso de las tiroides: A 17 mgr Fueron pesadas en balanza

B 17,5 mgr de torsión

Alimentación: leche, maíz y pan.

Las determinaciones se hicieron durante el invierno.

La tiroides fué recogida en un tubo que contenía 2 ml de HONa 2 %.

El tubo se mantuvo 15 minutos en ebullición a baño maría. Se procedió de 2 modos diferentes:

A) Una vez hidrolizada la tiroides se diluyó la solución y se llevó a 200 ml en matraz aforado. Se trabajó con una parte alícuota de esta solución (20 ml, con los cuales se hizo destrucción de materia orgánica, destilación y colorimetría).

B) La tiroides hidrolizada, se colocó, tal como estaba en la solución de HONa 2 %, en el balón de destilación y se hizo destrucción de materia orgánica, destilación y colorimetría.

El producto de la destilación se recogió en matraz aforado de 25 ml y, una vez ensalsado se tomaron 3 ml de dicha solución que se llevaron nuevamente a 25 ml. Con 10 ml de estos 25 se hizo la colorimetría.

---0---

Determinación colorimétrica

Tubo N°	Agr. Ca ⁴⁺	lect.	T %
B ₀	0	22	49
1	1	23	54 - 49 = 5
2	2	24	60 - 49 = 11
3	3	25	64 - 49 = 15
4	4	26	71 - 49 = 22
5	5	27	74 - 49 = 25
B	6	28	50
A	7	29	68
A ₁	8	30	68 68-50 = 18(0,0788)
B	9	31	69
B ₁ ¹	11	32	71 70-50=20(0,08)
B ₂ ¹	12	33	68
B ₂ ²	13	34	70 69-50=19 (0,07758)

Tubo N°	Agr C ⁴	Lect.	T %
B ₂	14	35	70
B ₃	15	36	70
B ₄	16	37	81
B ₄	17	38	83

70-50 = 20 (0,08%)
82-50 = 32 (0,115%)

Para B₄ y B₄' se hizo una dilución 5 / 25 de los 25 recogidos.

A y A'	10 : 25	0,07 : X	X = 0,16	20 : 0,16	200 : X	X = 1,66
B ₁ y B ₁ '	10 : 25	0,08 : X	X = 0,2	3 : 0,2	25 : X	X = 1,66
B ₂ y B ₂ '	10 : 25	0,0775 : X	X = 0,194	3 : 25	0,194 : X	X = 1,66
B ₃ y B ₃ '	10 : 25	0,08 : X	X = 0,2	3 : 0,2	25 : X	X = 1,66
B ₄ y B ₄ '	10 : 0,115	25 : X	X = 0,287	25 : 0,3	X	X = 1,5

B) $2 \times 1,66 + 1,62 + 1,50 = 6,44$ $\frac{6,44}{4} = 1,61$

$0,00161 : 17,5 \dots y : 100$

$\dots X = 0,0091 \% \text{ t.fresco}$

$0,01 \%$

A) $0,00160 : 17,0 \dots X : 100 \dots = 0,0096 \% \text{ tej. fresco}$

Según resultados obtenidos por Bankaran en sus investigaciones sobre tiroides de ratas normales (ver Elmer: "Iodine Metabolism and Thyroid Function" Biblioteca Chutra Facultad de Medicina) : 0,007 - 0,042 % en tejido fresco.

---0---

Determinaciones en tiroides de sapos normales

Al principio se trabajó con el objeto de comprobar si la cantidad de yodo presente en la tiroides de sapo estaba dentro del orden detectable por el método usado. Para ello se hizo una mezcla homogénea de 3 tiroides de sapo hom bra, en ayunas desde el cautiverio, siendo el peso total de las 3 glándulas 10 mgr.

Las tiroides se recogieron en 2 ml de solución 2 % de HONA que se diluyó hasta 15 ml. La solución se hirvió 15 minutos a baño maría para hidrolizar las glándulas. Las determinaciones fueron hechas durante el invierno (año 1955). El total se colocó en el balón de destilación. Se hizo la des-

trucción de materia orgánica y destilación. El producto de la destilación se recogió en un matraz aforado de 25 ml, tal como se hace para las determinaciones en suero humano. Por analogía con lo efectuado en tiroides de ratas, se tomaron 3 ml de estos 25 y se llevaron nuevamente a 25 ml. Con estos se hizo la colorimetría. Pero las determinaciones no pudieron realizarse porque los valores obtenidos salían fuera de la escala. Con los 22 ml restantes se hicieron diluciones sucesivas (1 en 25; 0,5 en 25 etc.) hasta que con una dilución de 2,4 en 200 se obtuvieron lecturas apreciables en el fotocolorímetro usado.

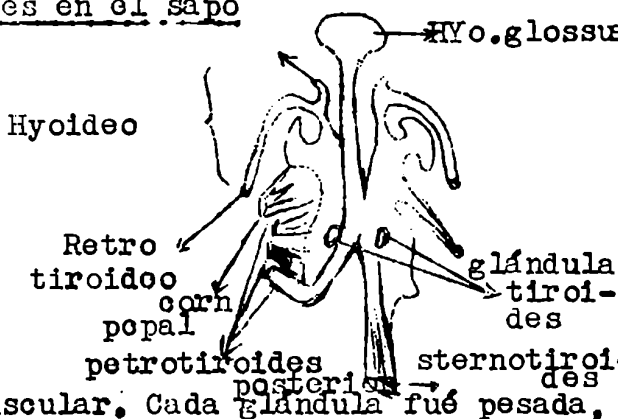
Los blancos para la colorimetría fueron hechos del siguiente modo:

2 ml HONa 2 % + 13 ml agua bidestilada + 1 ml de hemoglobina de sangre humana.

Se hicieron 4 determinaciones (por duplicado cada una) con este "pool" de 3 tiroides y otras 4 con un "pool" de 2 tiroides de sapo hembra. Los valores obtenidos arrojaron un resultado promedio de 0,21 % de I₂ en tejido fresco tiroideo. Estos resultados permitieron únicamente comprobar dentro de qué orden (aproximadamente) se hallarían las determinaciones a realizarse más tarde en cada animal por separado.

En la primavera del mismo año se comenzó a trabajar con cada animal por separado. Se usaron tiroides de sapos machos normales y hipofisopri- vos (son los que se consignan más adelante como determinaciones realizadas en primavera). La hipofisectomía consistió en extirpación del lóbulo ante-

Ubicación de la glándula tiroi- des en el sapo



rrior de hipófisis. La tiroideotomía

consistió en extirpación de ambos lóbulos tiroideos. El trabajo de tiroideotomía debió hacerse con todo cuidado, observando la glándula con microscopio para evitar la presencia de tejido no tiroideo ya sea graso, óseo o muscular. Cada glándula fue pesada, con la mayor rapidez posible para evitar la deshidratación, en balanza de torsión con aproximación de 0,1 mgr y luego recogida en 2 ml de solución 2 % de HONa y mantenidos los tubos en la heladera hasta el momento de realizar las determinaciones.

La destrucción de la glándula por ebullición en HONa 2% fue suprimida a partir de este momento puesto que el método de Barker permite dosar

NOTA

hormona tiroidea como contenido de I_2 y no como tiroxina (ver nota al final). La destrucción de materia orgánica con mezcla sulfocrómica es suficiente para producir la hidrólisis del tejido tiroideo y la liberación del yodo unido a la molécula de la tiroxina y su posterior oxidación a IO_3^- .

Experiencias realizadas en animales operados durante el invierno: (1956)

Porcentaje de los animales y de sus tiroides; (sapos machos en ayunas desde el cautiverio):

a) Normales

Sapo N°	Peso de la tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
N ₁	2	160
N ₂	1,5	125
N ₃	2,2	135
N ₄	1,8	85
N ₅	2	125
N ₆	2	125
N ₇	2,3	144
N ₈	1,6	127

b) Hipofisoprivos de 6 días. (Hipofisectomizados el 13-6-56 y tiroidectomizados el día 19-6-56)

Sapo N°	Peso de la tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
H ₃	2,2	130
H ₁	5,1	185
H ₂	5,1	186
H ₄	2,3	170
H ₅	3,3	190
H ₆	3,1	159
H ₇	3,1	183
H ₈	se encontró muerto	

c) Hipofisoprivos de 15 días: (hipofisectomizados el día 4-6-56 y tiroidectomizados el 19-6-56).

Sapo N°	Peso de la tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
H ₁	2,3	115
H ₂	2,2	177
H ₃	4	170
H ₄	2,4	138
H ₅	2,4	138
H ₆	no se halló tiroides, ni macro ni microscópicamente	
H ₇	muerto	
H ₈	muerto	

NOTA: El método y grado de hidrólisis es de importancia en el dosaje de tiroxina puesto que una hidrólisis suave puede dar altos valores de tiroxina y la acción de álcalis o ácidos siempre conduce a alguna destrucción y pérdida aún en las mejores condiciones. El problema en el caso de dosar la hormona como tiroxina es hallar un agente hidrolítico que libere toda la tiroxina de su unión peptídica y no tenga efectos destructivos. La hidrólisis ácida causa destrucción. Hidrólisis alcalina tiene estabilidad variable. Dentro de los álcalis son unos preferibles a otros, Harington recomienda barita en lugar de HONa.

Antes de extraerles las tiroides los animales fueron sacrificados clavándoles una aguja en la médula.

Los sapos hipofisoprivos de 6 y de 15 días manifestaban las características cutáneas que se observan cuando se extirpa el lóbulo anterior de hipófisis (piel rugosa y descamaciones). Sólo en 2 animales hipofisoprivos de 15 días se observó cambio del color de la epidermis (característica de la extirpación de lóbulo anterior y posterior de hipófisis).

Algunos animales normales presentaban la piel oscurecida, lo cual se atribuyó a características estacionales. Se extirparon ambos lóbulos tiroideos.

Las tiroides fueron pesadas en balanza de torsión con aproximación de 0,1 mg y recogidas en solución de HONa 2 % para evitar la pérdida de yodo. Las determinaciones se hicieron en tejido fresco tiroideo y fueron referidas, como se verá más adelante, a 100 mg de tejido tiroideo fresco, y a 100 gr de peso del cuerpo. También se calculó el yodo total contenido en cada glándula.

A los errores del método de dosaje, acá se sumaron los cometidos en la operación de pesada (poca aproximación de la balanza) y en la extirpación de la glándula.

La glándula total (junto con la solución que la contenía) fué colocada en el balón, realizadas la digestión y destilación y el producto del destilado recogido en matraz aforada de 25 ml. Un ml de esta solución se llevó a 25 ml (para N₁, N₂, N₃, N₄, N₆ y N₇) y con estos 25 ml se hizo la colorimetría en la forma habitual.

Se obtuvieron transmisiones ópticas del mismo orden que los blancos para N₁, N₂, N₃ y N₄ de modo que sólo se pudo calcular el contenido en yodo de N₆ y N₇.

A continuación se dan los resultados obtenidos: (colorimetría I)

Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (tiempo minutos)	Lecturas (minutos)	T %
B ₀	0	22	45
4	1	23	54
6	2	24	57
8	3	25	64
10	4	26	70
B	5	27	45
B'	6	28	46
N ₁	7	29	46
N ₁ '	8	30	47
N ₂	9	31	46
N ₂ '	10	32	45

}45,5

Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (tiempo minutos)	Lecturas (minutos)	T %
N ₃	11	33	47
N ₃ '	12	34	48
N ₄	13	35	47
N ₄ '	14	36	48
N ₅	15	37	64
N ₅ '	16	38	63 0,243 %
N ₇	17	39	56
N ₇ '	18	40	56 0,142 %

(Ver gráfico 1_I)

Se realizó otra colorimetría con N₁, N₂, N₃, N₄ y N₈ tomando 1,5 ml de destilado del matraz de 25 y llevándolo a 25.

Colorimetría 2_I (dilución 1,5/25) : (se hizo 1/25)

Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (minutos)	Lectura (min)	T %
B	0	22	46
4	1	23	54
6	2	24	59
8	3	25	64
10	4	26	71
B	5	27	45
B'	6	28	46 45,5
N ₁	7	29	63
N ₁ '	8	30	63 0,175%
N ₂	9	31	55
N ₂ '	10	32	55 0,125%
N ₃	11	33	62
N ₃ '	12	34	61 0,145%
N ₄	13	35	54
N ₄ '	14	36	55 0,097%
$\frac{1}{25}$ N ₅	15	37	63
N ₅ '	16	38	63 0,248%
N ₈	17	39	63
N ₈ '	18	40	63 0,202%

(ver gráfico 2_I)

Hipofisarios de 6 días: Como la dilución adecuada en cada caso se buscó por tanteo, en todos los casos la columna de la izquierda indica la dilución con que se trabajó.

(Colorimetría 3_I)

Dilución	Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
	B		22	45
	4	1	23	54,5
	6	2	24	59
	8	3	25	65
	10	4	26	74
	B.	5	27	45
	B.	6	28	46
1/25	H ₃	7	29	50
	H ₃ '	8	30	51
2/25	H ₃ "	9	31	61 0,096%
2/25	H ₃ "'	10	32	62
	H ₃ "''	11	33	74
3/25	H ₃	12	34	75
	H ₁	13	35	52
1/25	H ₁	14	36	53
2/25	H ₁	15	37	55 0,026%

Dilución	Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
3/25	H ₁	16	38	56
	H ₁	17	39	61
	H ₁	18	40	61 0,025%
1/25	H ₂	19	41	56
	H ₂	20	42	56 0,056%

(ver gráfico 3I)

Se eligieron las diluciones que arrojaron valores no menores de 0,04[✓] /tubo ni mayores de 0,09[✓] por tubo, para estar dentro del rango más exacto de cumplimiento de la ley de Beer.

(Colorimetría 4I)

Dilución	Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
2/25	B ₀	0	22	44
	4	1	23	54
	6	2	24	59
	8	3	25	65
	10	4	26	75
	B	5	27	74
	B'	6	28	45 44,5
	H ₂	7	29	70
	H ₂ '	8	30	71 0,056%
	H ₂ '	9	31	60
1,5/25	H ₄ '	10	32	61 0,177%
	H ₄ '	11	33	74
1,5/25	H ₄ '	12	34	76
	H ₅	13	35	61
1/25	H ₅ '	14	36	62 0,113%
	H ₅ '	15	37	75
1,5/25	H ₅ '	16	38	75
	H ₅ '	17	39	86
2/25	H ₅ '	18	40	88
	H ₄ '	19	41	87
2/25	H ₄ '	20	42	89

(ver gráfico 4I)

Colorimetría 5I

Dilución	Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
1/25	B ₀	0	22	44
	4	1	23	53
	6	2	24	59
	8	3	25	64
	10	4	26	74
	B	5	27	44
	B'	6	28	43
	H ₆	7	29	55
	H ₆ '	8	30	56 0,101%
	H ₇	9	31	54
1/25	H ₇ '	10	32	55 0,089%

(ver gráfico 5I)

Hipocloruros de 15 días

(Colorimetría 6I):

Dilución	Tubo N°	Agr. Ce ⁴⁺ (min.)	Lectura (min.)	T %
	B ₀	0	22	44
	4	1	23	52
	6	2	24	58
	8	3	25	64

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lectura (min.)	T %
	10	4	26	74
	B	5	27	44
	B'	6	28	45
1/25	H ₁ '	7	29	45
	H ₁ '	8	30	46
2/25	H ₁ '	9	31	44
	H ₁ '	10	32	46
3/25	H ₁ '	11	33	48
	H ₁ '	12	34	49
1/25	H ₂ '	13	35	46
	H ₂ '	14	36	45
2/25	H ₂ '	15	37	45
	H ₂ '	16	38	45
3/25	H ₂ '	17	39	46
	H ₂ '	18	40	48
1,5/25	H ₃ '	19	41	76
	H ₃ '	20	42	75

Debido a los resultados obtenidos este gráfico no se incluye.

(Colorimetría 7I):

Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lectura (min.)	T %	
B ₀	0	22	44	
4	1	23	52,5	
6	2	24	57	
8	3	25	61,5	
10	4	26	70	
B	5	27	45	
B'	6	28	46	
5/25	H ₁ '	7	29	54
	H ₁ '	8	30	55 0,023%
	H ₁ '	9	31	60
8/25	H ₁ '	10	32	60 0,023%
	H ₃ '	11	33	59
1/25	H ₃ '	12	34	59,5 0,001%
	H ₄ '	13	35	58
1,2/25	H ₄ '	14	36	59 0,136%
	H ₂ '	15	37	46
5/25	H ₂ '	16	38	45
	H ₂ '	17	39	47
8/25	H ₂ '	18	40	48

(ver gráfico 7I)

(Colorimetría 8I):

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lectura (min.)	T %
	B ₀	0	22	44
	4	1	23	52
	6	2	24	57,5
	8	3	25	63
	10	4	26	74,5
	B	5	27	46
	B'	6	28	45
15/25	H ₂ '	7	29	48
	H ₂ '	8	30	49
10/25	H ₂ '	9	31	46
	H ₂ '	10	32	46
	H ₅ '	11	33	59 0,151%
1/5	H ₅ '	12	34	61
	H ₅ '	13	35	86
3/25	H ₅ '	14	36	85
	H ₂ '	15	37	54
25 ml origin.	H ₂ '	16	38	55 0,003%

(ver gráfico 8I)

Animales operados en primavera: (año 1955)

Pesos de los animales y de sus tiroides: (sapos machos mantenidos en ayunas desde el cautiverio).

a) Normales

Sapo N°	Peso de las tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
N1	3,0	105
N2	3,6	105
N3	2,6	95
N4	2,0	150
N5	8,0	110
N6	8,1	110
N7	2,5	115
N8	2,5	115
N9	2,0	110

b) Hipofisoprivos de 3 días:

Sapo N°	Peso de las tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
H1	2,0	156
H2	4,5	155
H3	4,5	155
H4	3,0	134
H5	2,0	165
H6	no se halló tiroides ni macro ni microscópicamente	
H7	muerto	

c) Hipofisoprivos de 10 días:

Sapo N°	Peso de las tiroides (mgr)	Peso del cuerpo (gr)
H1	1,2	100
H2	1,8	105
H3	2,9	115
H4	2,8	133
H5	2,0	130

Se procedió de igual manera que con los operados en invierno en los que respecta a extirpación de las glándulas tiroides, recogido de las mismas en HONa 2 %, destrucción de materia orgánica, destilación y colorimetría.

Los animales hipofisoprivos de 3 días fueron sometidos a la operación de extirpación de la tiroides el día 3 de noviembre (hipofisectomizados el 31 de octubre); juntamente con los normales N1, N2, N3, N4 y N5. Los hipofisoprivos de 10 días fueron operados de la tiroides el día 15 de noviembre (hipofisectomizados el 5 de noviembre) juntamente con los normales N6, N7, N8 y N9.

Resultados de las colorimetrías realizadas con los hipofisoprivos de 3 días y los normales operados el día 3 de noviembre:

(Se trabajo en todos los casos con la glándula entera y el producto de la digestión y destilación fué recogido en matraz aforado de 25 ml. De estos 25 ml se tomó 1 ml; se llevó a 25 nuevamente y con estos se hizo la colo-

rimetría de la manera usual. Cuando la dilución 1 en 25 no fué satisfactoria se intentaron otras diluciones que son las que figuran a la izquierda de la columna que indica el número del tubo)

Colorimetría IP:

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lectura (min.)	T %
	B ₀	0	22	43
	4	1	23	52
	6	2	24	60
	8	3	25	65
	10	4	26	75
	B	5	27	43
	B ¹	6	28	43
	N ₁	7	29	62
1/25	N ₁ ¹	8	30	62 0,154 %
1/25	N ₂	9	31	63
	N ₂ ¹	10	32	63 0,133 %
1/25	N ₃	11	33	56
	N ₃ ¹	12	34	58 0,136 %
1/25	N ₄	13	35	52
	N ₄ ¹	14	36	50
1/25	N ₅	15	37	61
	N ₅ ¹	16	38	62 0,056 %
1/25	H ₁	17	39	54
	H ₁ ¹	18	40	54 0,135 %
1/25	H ₂	19	41	83
	H ₂ ¹	20	42	83

(ver gráfico IP)

Colorimetría II P:

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
	B ₀	0	22	43
	4	1	23	52
	6	2	24	56,5
	8	3	25	61
	10	4	26	71
	B	5	27	42
	B ¹	6	28	44
3/25	N ₄	7	29	62
	N ₄ ¹	8	30	62 0,085 %
	H ₂	9	31	68
0,8/25	H ₂ ¹	10	32	67
	H ₂ ²	11	33	56
0,5/25	H ₂ ³	12	34	55 0,166 %
	H ₃	13	35	67
1/25	H ₃ ¹	14	36	67
	H ₄	15	37	61
1/25	H ₄ ¹	16	38	61 0,166 %
	H ₃ ²	17	39	62
0,8/25	H ₃ ³	18	40	63 0,144 %
	H ₅	19	41	53
1/25	H ₅ ¹	20	42	53 0,141 %

(ver gráfico II P)

Colorimetrías realizadas con los hipofisoprivos de 10 días y los normales operados el día 15 de noviembre:

Colorimetría III P:

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min.)	Lecturas (min.)	T %
	B ₀	0	22	44
	4	1	23	52,5
	6	2	24	57,5
	8	3	25	61
	10	4	26	71,5
	B	5	27	43
	B'	6	28	44
1/25	N ₆	7	29	61
	N ₆ '	8	30	62 0,062%
1/25	N ₇	9	31	55
	N ₇ '	10	32	56 0,144%
1/25	N ₈	11	33	54
	N ₈ '	12	34	54 0,112%
1/25	N ₉	13	35	48
	N ₉ '	14	36	50
1/25	H ₁	15	37	42
	H ₁ '	16	38	44
1/25	H ₂	17	39	51
	H ₂ '	18	40	52 0,117%
1/25	H ₃	19	41	56
	H ₃ '	20	42	55 0,121%

(ver gráfico III P)

Colorimetría IV P:

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺	Lecturas	T %
	B ₀	0	22	42
	4	1	23	49,5
	6	2	24	54
	8	3	25	57,5
	10	4	26	67
	B	5	27	43
	B'	6	28	43
3/25	N ₉	7	29	57
	N ₉ '	8	30	57 0,075%
3/25	H ₁	9	31	49
	H ₁ '	10	32	49
5/25	H ₁	11	33	53
	H ₁ '	12	34	53 0,056 %
1/25	H ₄	13	35	50,5
	H ₄ '	14	36	51
3/25	H ₄	15	37	68
	H ₄ '	16	38	66
1/25	H ₅	17	39	48
	H ₅ '	18	40	49

(ver gráfico IV P)

Colorimetría V P:

Dilución	Tubo N°	Agr Ce ⁴⁺ (min)	Lectura (min.)	T %
	B ₀	0	22	42
	4	1	23	49
	6	2	24	54
	8	3	25	58
	10	4	26	68
	B	5	27	42
	B'	6	28	43
2/25	H ₄	7	29	62
	H ₄ '	8	30	63 0,108 %
3/25	H ₅	9	31	61
	H ₅ '	10	32	60 0,087 %

(ver gráfico V P)

Con los datos obtenidos en primavera y en invierno, y sabiendo el peso de cada animal y de sus tiroides, se averiguó el porcentaje de yodo contenido en la tiroides; el contenido total de yodo en tiroides y el porcentaje de yodo tiroideo por peso del cuerpo. Estos datos son los que figuran a continuación. A cada valor se le halló el error medio de cada observación y el error cuadrático medio. Al valor promedio de los obtenidos en n animales se le averiguó el error medio del promedio. Por último se averiguó el error relativo del resultado y se dió el resultado final.

Los errores se calcularon de acuerdo a las fórmulas siguientes:

$$m = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}} \quad \text{Error medio cuadrático (Es el promedio cuadrático de los errores)}$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}} \quad \text{Error medio de cada observación}$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n(n-1)}} \quad \text{Error medio del promedio}$$

$$\epsilon_D = \frac{E_D}{\text{Promedio}} \cdot 100\% \quad \text{Error relativo}$$

Valores obtenidos con los animales operados durante el invierno

Sapos normales

Animal	mgr I ₂ /100 mgr de tej. fres. tiroideo	x _i · 10 ⁻³	x _i ²	
N ₁	0,175	+ 3	9	$m = \pm \sqrt{\frac{21089}{8}} = \pm 51,4 \cdot 10^{-3}$ $e = \pm \sqrt{\frac{21089}{7}} = \pm 55 \cdot 10^{-3}$ $E_D = \pm \sqrt{\frac{21089}{56}} = \pm 19,4 \cdot 10^{-3}$. . D = 0,17 ± 0,01 $\epsilon_D = \frac{0,019}{0,17} \cdot 100 \approx 11,4 \%$
N ₂	0,125	- 47	2109	
N ₃	0,145	- 27	729	
N ₄	0,097	- 75	5625	
N ₅	0,248	+ 76	5776	
N ₆	0,243	+ 71	5041	
N ₇	0,142	- 30	900	
N ₈	0,202	+ 30	900	
Promedio	0,172	∑ x _i ² 21089		

Animal	Yodo total (γ) cont. en cada glándula	x _i · 10 ⁻³	x _i ²	
N ₁	3,502	+ 175	30625	$m = \pm \sqrt{\frac{9731729}{8}} = \pm 1100 \cdot 10^{-3}$ $e = \pm \sqrt{\frac{9731729}{7}} = \pm 1180 \cdot 10^{-3}$ $E_D = \pm \sqrt{\frac{9731729}{56}} = \pm 417 \cdot 10^{-3}$. . D = 3,3 ± 0,4 $\epsilon_D = \frac{0,41}{3,32} \cdot 100 = 12,5 \%$
N ₂	1,875	- 1452	2108304	
N ₃	3,200	- 127	16129	
N ₄	1,750	- 1577	2486929	
N ₅	4,965	+ 1638	2683044	
N ₆	4,875	+ 1548	2386304	
N ₇	3,225	- 102	10044	
N ₈	3,427	+ 100	10000	
Promedio	3,327	∑ x _i ² 9731729		

Animal	Yodo γ /100 gr de peso del cuerpo	x _i · 10 ⁻³	x _i ²	
N ₁	2,180	-315	99225	$m = \pm \sqrt{\frac{5523565}{8}} = \pm 832 \cdot 10^{-3}$ $e = \pm \sqrt{\frac{5523565}{7}} = \pm 890 \cdot 10^{-3}$ $E_D = \pm \sqrt{\frac{5523565}{56}} = \pm 314 \cdot 10^{-3}$. . D = 2,4 ± 0,3 $\epsilon_D = \frac{0,31}{2,49} \cdot 100\% = 12 \%$
N ₂	1,500	-995	990025	
N ₃	1,370	-1125	1265625	
N ₄	2,050	-445	198025	
N ₅	3,972	+1477	2181529	
N ₆	3,900	+1405	709525	
N ₇	2,294	-199	39601	
N ₈	2,695	+200	40000	
promedio	2,495	∑ x _i ² 5523565		

Hipofisoprivos de 6 días

Animal	mgr de yodo /100 mgr de tej.fresco tiroideo	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,026	- 68	4624
H ₂	0,056	- 38	1444
H ₃	0,096	+ 2	4
H ₄	0,177	+ 83	6889
H ₅	0,113	+ 19	361
H ₆	0,101	+ 7	49
H ₇	0,089	- 5	25
Promedio	0,094		$\sum x_i^2$ 13396

$m = \pm \sqrt{\frac{13396}{7}} = \pm 43,8 \cdot 10^{-3}$ $\therefore D = 0,094 \pm 0,017$
 $e = \pm \sqrt{\frac{13396}{6}} = \pm 47,3 \cdot 10^{-3}$
 $E_D = \pm \sqrt{\frac{13396}{42}} = \pm 17,9 \cdot 10^{-3}$ $\left\{ D = \frac{0,017}{0,094} \cdot 100\% = 19\% \right.$

Animal	Yodo total contenido en cada glándula	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	1,375	- 1583	2505889
H ₂	2,875	- 83	6889
H ₃	2,164	- 790	624100
H ₄	4,083	+ 1125	1265625
H ₅	4,291	+ 1333	1776889
H ₆	3,159	+ 201	40401
H ₇	2,759	- 203	40209
Promedio	2,958		$\sum x_i^2$ 6259802

$m = \pm \sqrt{\frac{6259802}{7}} = \pm 946 \cdot 10^{-3}$ $\therefore D = 2,9 \pm 0,3$
 $e = \pm \sqrt{\frac{6259802}{6}} = \pm 1022 \cdot 10^{-3}$
 $E_D = \pm \sqrt{\frac{6259802}{42}} = \pm 386 \cdot 10^{-3}$ $\left\{ D = \frac{0,386}{2,9} \cdot 100\% = 13\% \right.$

animal	γ de I ₂ /100 gr de peso de cuerpo	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,740	- 982	964324
H ₂	1,551	- 171	29241
H ₃	1,661	- 61	3721
H ₄	2,400	+ 678	459684
H ₅	2,257	+ 535	286225
H ₆	1,943	+ 221	48841
H ₇	1,500	- 222	49284
Promedio	1,722		$\sum x_i^2$ 1841320

$m = \pm \sqrt{\frac{1840877}{7}} = \pm 513 \cdot 10^{-3}$ $\therefore D = 1,7 \pm 0,2$
 $e = \pm \sqrt{\frac{1840877}{6}} = \pm 550 \cdot 10^{-3}$
 $E_D = \pm \sqrt{\frac{1840877}{42}} = \pm 208 \cdot 10^{-3}$ $\left\{ D = \frac{0,2}{1,7} \cdot 100\% = 11\% \right.$

Hipofisoprivos de 15 días:

Animal	% de yodo en tiroides	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,023	- 60	3600
H ₂	0,003	- 79	6241
H ₃	0,101	+ 19	361
H ₄	0,151	+ 68	4624
H ₅	0,136	+ 54	2916
Promedio	0,0828		$\sum x_i^2$ 17742

$$m = \pm \sqrt{\frac{17742}{5}} = \pm 59,5 \cdot 10^{-3}$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{17742}{4}} = \pm 66,8 \cdot 10^{-3}$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{17742}{20}} = \pm 29,7 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 0,08 \pm 0,02$$

$$C_D = \frac{0,02}{0,08} \cdot 100\% = 25\%$$

-----0-----

Animal	Yodo total en tirpides (γ)	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,535	- 2922	3319684
H ₂	0,078	- 2279	5193841
H ₃	4,250	+ 1893	3583449
H ₄	3,645	+ 1288	1658944
H ₅	3,281	+ 924	853776
Promedio	2,357		$ \sum x_i^2 $ 14609694

$$m = \pm \sqrt{\frac{14609694}{5}} = \pm 1710 \cdot 10^{-3}$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{14609694}{4}} = \pm 192 \cdot 10^{-3}$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{14609694}{20}} = \pm 854 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 2,3 \pm 0,8$$

$$C_D = \frac{0,85}{2,36} \cdot 100\% = 30\%$$

-----0-----

Animal	γ de I ₂ /100 gr de peso del cuerpo	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,465	- 1140	1299600
H ₂	0,044	- 1561	2436721
H ₃	2,500	+ 895	801025
H ₄	2,640	+ 1635	1071225
H ₅	2,380	+ 260	67600
Promedio	1,605		$ \sum x_i^2 $ 5676171

$$m = \pm \sqrt{\frac{5676171}{5}} = \pm 1065 \cdot 10^{-3}$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{5676171}{4}} = \pm 1095 \cdot 10^{-3}$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{5676171}{20}} = \pm 532 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 1,6 \pm 0,5$$

$$C_D = \frac{0,53}{1,61} \cdot 100\% = 30\%$$

-----0-----

Valores obtenidos con los animales operados durante la primavera

Sapos normales

Animal	% de yodo en tiroides	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
N ₁	0,154	+ 46	2116
N ₂	0,133	+ 25	625
N ₃	0,136	+ 28	784
N ₄	0,085	- 23	529
N ₅	0,056	- 52	2704
N ₆	0,062	- 46	2146
N ₇	0,144	+ 36	1296
N ₈	0,112	+ 4	16
N ₉	0,075	- 33	1089
Promedio	0,108		$ \sum x_i^2 $ 11275

$$m = \pm \sqrt{\frac{11275}{9}} = \pm 35,4 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 0,10 \pm 0,01$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{11275}{8}} = \pm 37,5 \cdot 10^{-3}$$

$$C_D = \frac{0,01}{0,10} \cdot 100\% = 10\%$$

$$ED = \pm \sqrt{\frac{11275}{72}} = \pm 12,5 \cdot 10^{-3}$$

Animal	Yodo total en tiroides (γ)	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
N ₁	4,620	+ 1067	1138489
N ₂	4,788	+ 1235	1525225
N ₃	3,536	- 17	279
N ₄	1,700	- 1853	3433609
N ₅	4,480	+ 927	859329
N ₆	4,960	+ 1407	1979649
N ₇	3,600	+ 47	2209
N ₈	2,800	- 753	567009
N ₉	1,500	- 2053	4214809
Promedio	3,553		$ \sum x_i^2 $ 13720607

$$m = \pm \sqrt{\frac{13720607}{9}} = \pm 1230 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 3,5 \pm 0,4$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{13720607}{8}} = \pm 1310 \cdot 10^{-3}$$

$$\epsilon_D = \frac{0,4}{3,5} \cdot 100\% = 11\%$$

$$ED = \pm \sqrt{\frac{13720607}{72}} = \pm 436 \cdot 10^{-3}$$

Animal	γ de I ₂ /100 gr de cuerpo	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
N ₁	4,400	+ 1142	1304164
N ₂	4,560	+ 1302	1695204
N ₃	3,722	+ 464	215296
N ₄	1,333	- 2125	4515625
N ₅	4,072	+ 714	509796
N ₆	4,510	+ 1252	1567504
N ₇	3,130	- 128	16384
N ₈	2,434	- 824	678976
N ₉	1,363	- 1895	3591025
Promedio	3,258		$ \sum x_i^2 $ 14093974

$$m = \pm \sqrt{\frac{14093974}{9}} = \pm 1250 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 3,2 \pm 0,4$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{14093974}{9}} = \pm 1330 \cdot 10^{-3}$$

$$D = \frac{0,4}{3,2} \cdot 100\% = 12\%$$

$$ED = \pm \sqrt{\frac{14093974}{72}} = \pm 442 \cdot 10^{-3}$$

Hipofisoprivos de 3 días:

Animal	% de yodo en tiroides	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	0,135	- 11	121
H ₂	0,166	+ 20	400
H ₃	0,144	- 2	4
H ₄	0,166	+ 20	400
H ₅	0,141	- 6	25
Promedio	0,146		$ \sum x_i^2 $ 950

$$m = \pm \sqrt{\frac{950}{5}} = \pm 13,8 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 0,146 \pm 0,006$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{950}{4}} = \pm 15 \cdot 10^{-3}$$

$$\epsilon_D = \frac{0,006}{0,146} \cdot 100\% = 4,1\%$$

$$ED = \pm \sqrt{\frac{950}{20}} = \pm 6,85 \cdot 10^{-3}$$

Animal	Yodo total en tiroides γ	$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
H ₁	2,700	- 2190	4796100
H ₂	7,470	+ 2580	6656700
H ₃	6,480	+ 1590	2528100
H ₄	4,980	+ 90	8100
H ₅	2,820	- 2070	4284900
Promedio	4,890		$ \sum x_i^2 $ 18273600

$$m = \pm \sqrt{\frac{18273600}{5}} = \pm 1910 \cdot 10^{-3}$$

$$\therefore D = 4,8 \pm 0,9$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{18273800}{4}} = \pm 2140 \cdot 10^{-3}$$

$$\xi D = \frac{0,95}{4,89} \cdot 100\% = 18\%$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{18273600}{20}} = \pm 955 \cdot 10^{-3}$$

Animal % de I₂/100 gr cpo.

H ₁	1,730
H ₂	4,819
H ₃	4,180
H ₄	3,716
H ₅	1,709
Promedio	3,230

---0---

$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
- 1500	2250000
+ 1589	2524921
+ 950	902500
+ 486	236196
- 1521	2313441
$\sum x_i^2$ 8227059	

$$m = \pm \sqrt{\frac{8227078}{5}} = \pm 1280 \cdot 10^{-3}$$

$$D = 3,2 \pm 0,6$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{8227058}{4}} = \pm 1430 \cdot 10^{-3}$$

$$\xi D = \frac{0,65}{3,22} \cdot 100\% = 19\%$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{8227058}{20}} = \pm 641 \cdot 10^{-3}$$

---0---

Hipofisoprivos de 10 días.

Animal % de yodo en tiroides

H ₁	0,056
H ₂	0,117
H ₃	0,121
H ₄	0,108
H ₅	0,087
Promedio	0,098

$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
- 42	1764
+ 19	361
+ 23	529
+ 10	100
- 11	121
$\sum x_i^2$ 2854	

$$m = \pm \sqrt{\frac{2854}{5}} = \pm 23,9 \cdot 10^{-3}$$

$$D = 0,09 \pm 0,01$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{2854}{4}} = \pm 26,6 \cdot 10^{-3}$$

$$\xi D = \frac{0,01}{0,09} \cdot 100\% = 11\%$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{2854}{20}} = \pm 11,9 \cdot 10^{-3}$$

---0---

Animal Yodo total en tiroides

H ₁	0,672
H ₂	3,393
H ₃	3,388
H ₄	2,160
H ₅	1,566
Promedio	2,235

$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
- 1563	2442969
- 1158	1338964
+ 1153	1329409
- 75	5625
- 669	447561
$\sum x_i^2$ 5566528	

$$m = \pm \sqrt{\frac{5566528}{5}} = \pm 1060 \cdot 10^{-3}$$

$$D = 2,2 \pm 0,5$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{5566528}{4}} = \pm 1180 \cdot 10^{-3}$$

$$\xi D = \frac{0,5}{2,2} \cdot 100\% = 23\%$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{5566528}{20}} = \pm 520 \cdot 10^{-3}$$

---0---

Animal Yodo en %/100 gr de cuerpo

L ₁	0,672
H ₂	2,950
H ₃	2,547
H ₄	1,660
H ₅	1,480
Promedio	1,861

$x_i \cdot 10^{-3}$	x_i^2
- 1189	1413721
+ 1089	1185921
+ 686	470596
- 201	40401
- 381	145161
$\sum x_i^2$ 3255800	

$$m = \pm \sqrt{\frac{3255800}{5}} = \pm 809 \cdot 10^{-3}$$

$$D = 1,8 \pm 0,1$$

$$e = \pm \sqrt{\frac{3255800}{4}} = \pm 900 \cdot 10^{-3}$$

$$\xi D = \frac{0,1}{1,8} \cdot 100\% = 5,5\%$$

$$E_D = \pm \sqrt{\frac{3255800}{20}} = \pm 127 \cdot 10^{-3}$$

---0---

Resumen de los valores hallados:

Animales operados en invierno:

1) Sapos normales:

- 1-a) % de yodo contenido en tiroides: $0,17 \pm 0,01$ (en tejido fresco)
- 1-b) Cantidad de yodo contenido en cada glándula: $3,3 \pm 0,4\%$
- 1-c) Cantidad de yodo intratiroideo hallado, por cada 100 gr de peso del cuerpo: $2,4 \pm 0,7\%$

2) Sapos hipofisoprivos de 6 días:

- 2-a) Contenido de yodo por 100 mgr de tejido fresco tiroideo: $0,09 \pm 0,01\text{mgr}$
- 2-b) Cantidad de yodo contenido en cada glándula: $2,9 \pm 0,3\%$
- 2x) Cantidad de yodo intratiroideo por 100 gr de peso del cuerpo: $1,7 \pm 0,2\%$

3) Sapos hipofisoprivos de 15 días:

- 3-a) Contenido de yodo por 100 mgr de tejido fresco tiroideo: $0,08 \pm 0,02\text{mgr}$
- 3-b) Cantidad de yodo contenido en cada glándula: $2,3 \pm 0,3\%$
- 3-c) Contenido de yodo intratiroideo por 100 gr de peso del cuerpo: $1,6 \pm 0,5\%$

Animales operados durante la primavera:

1') Sapos normales:

- 1'-a) % de yodo en tiroides: $0,10 \pm 0,01$ (en tejido fresco)
- 1'-b) Cantidad de yodo contenido en cada glándula: $3,5 \pm 0,4\%$
- 1'-c) Cantidad de yodo intratiroideo por 100 gr de peso del cuerpo: $3,2 \pm 0,4\%$

2') Sapos hipo fisoprivos de 3 días:

- 2'-a) Contenido de yodo por 100mgr de tejido fresco tiroideo: $0,145 \pm 0,003\text{mgr}$
- 2'-b) Cantidad de yodo hallado en cada glándula: $4,8 \pm 0,9\%$
- 2'-c) Cantidad de yodo intratiroideo por 100 gr de peso del cuerpo: $3,2 \pm 0,6\%$

3') Sapos hipofisoprivos de 10 días:

- 3'-a) Contenido de yodo por 100 mgr de tejido fresco tiroideo: $0,09 \pm 0,01\%$
- 3'-b) Cantidad de yodo hallado en cada glándula: $2,2 \pm 0,5\%$
- 3'-c) Cantidad de yodo intratiroideo por 100 gr de peso del cuerpo: $1,8 \pm 0,1\%$

CONCLUSIONES

Desde el punto de vista biológico: En estos animales la hipofisectomía produce un descenso en el contenido de yodo de la tiroides, el cual parece manifestarse después del 6º día de hipofisectomizado el animal (en invierno).

En invierno, entre 1-a) y 2-a) por comparación, se observa que comienza a manifestarse el efecto de la hipofesectomía como un descenso del yodo tiroideo. Lo mismo se infiere por comparación de 1-c) y 2-c) y de 1-b) y 2-b) aunque en este último caso es dudosa la conclusión, ya que el valor más alto de 2-b) coincide con el más bajo de 1-b).

Entre 1-a), b) y c) y 3 - a, b y c) no se infiere conclusión alguna

porque los valores dados en 3-a, b y c) adolecen de un error relativo que oscila entre 25 % y 30 %.

El aspecto de la piel de los hipofisoprivos de 6 y de 15 días presentaba las características que se observan luego de la extracción del lóbulo anterior de hipofisis: rugoridad y descamaciones.

En hipofisectomizados en primavera: En lo referente a % de yodo tiroideo (puntos 1'-a; 2'-a) y 3'-a) no parece haber diferencia después de la hipofisectomía. Sin embargo después de 10 días de hipofisectomizados (1'-c y 3'-c) se observa descenso en el contenido de yodo por cada 100 gr de peso del cuerpo.

Por comparación de 1'-b y 3'-b) parecería que la glándula se achicara (pero 3'-b está dado con error relativo de 23 %).

1'-b, 2'-b 2'-c y 1'-c están dentro del mismo orden lo cual (junto con lo dicho respecto al % de yodo tiroideo) es indicio de que a los 3 días de practicada la hipofisectomía no se manifiestan todavía sus consecuencias.

El descenso observado en 3'-c) respecto a 1'-c) si tenemos en cuenta que el % de yodo (referido a tejido fresco tiroideo) no sufrió alteración (puntos 1'-a y 3'-a) implicaría un aumento del peso del animal hipofisoprivo respecto al normal, lo cual sería un indicio de alteración en el funcionamiento de la tiroides. Por otra parte en los hipofisectomizados de 10 días habría descamación y rugosidad cutánea mientras que en los de 3 días el aspecto de la epidermis era normal.

Variación estacional: Se observa descenso en el contenido de yodo por 100 mgr de tejido fresco tiroideo en primavera, respecto al valor obtenido en invierno (ver 1-a y 1'-a).

El contenido de yodo en cada glándula parece no sufrir alteración. La glándula disminuye de peso en invierno. (ver 1-b y 1'-b).

Desde el punto de vista químico: El procedimiento descrito no difiere esencialmente del expuesto por Barker.

Nuestro objeto fué aplicar esta técnica al dosaje de yodo en suero de sapos y más tarde en tiroides de sapos, (lo cual permitiría hacer estudios sobre la fisiología de estos animales) y fijar los detalles precisos de técnica, que deben cuidarse con ese fin.

De estar presente hormona tiroidea circulante en el suero de sapos las cantidades de muestra requeridas para hacer las determinaciones hubieran

hecho necesario introducir cambios fundamentales en el método, por lo cual se abandonaron los intentos de adaptarlo a la microdeterminación de yodo en suero de sapos.

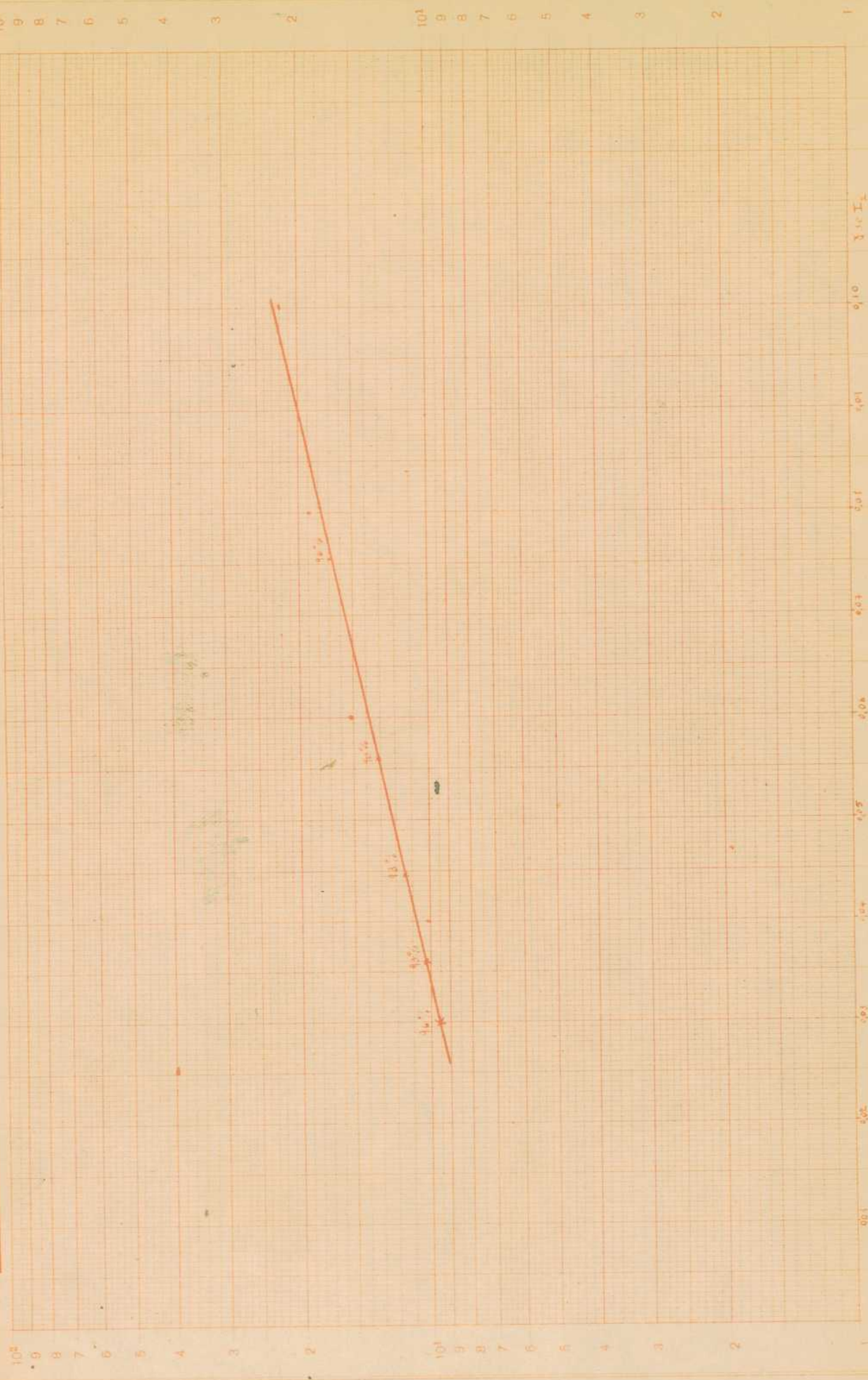
Para efectuar los dosajes en tiroides no es aconsejable hacer una hidrólisis previa de la glándula con HONa y trabajar con una parte alícuota pues sería engorroso y conduciría fácilmente a pérdidas de muestra. Es preferible colocar la glándula entera en el balón y al final de la operación de destilación buscar la dilución adecuada para hacer las lecturas en el fotocolorímetro.

En general hemos obtenido lecturas apreciables en el fotocolorímetro dentro del rango de cumplimiento de la ley de Beer, recogiendo el producto del destilado en matraz aforado de 25 ml envasando y haciendo con esta solución diluciones que generalmente están entre 0,5 y 5 ml/25 habiendo variación de un animal a otro, (normales, hipofisoprivos, variaciones estacionales, etc.)

9/11/57 J. Casarati
9-11-57

Recuperaciones

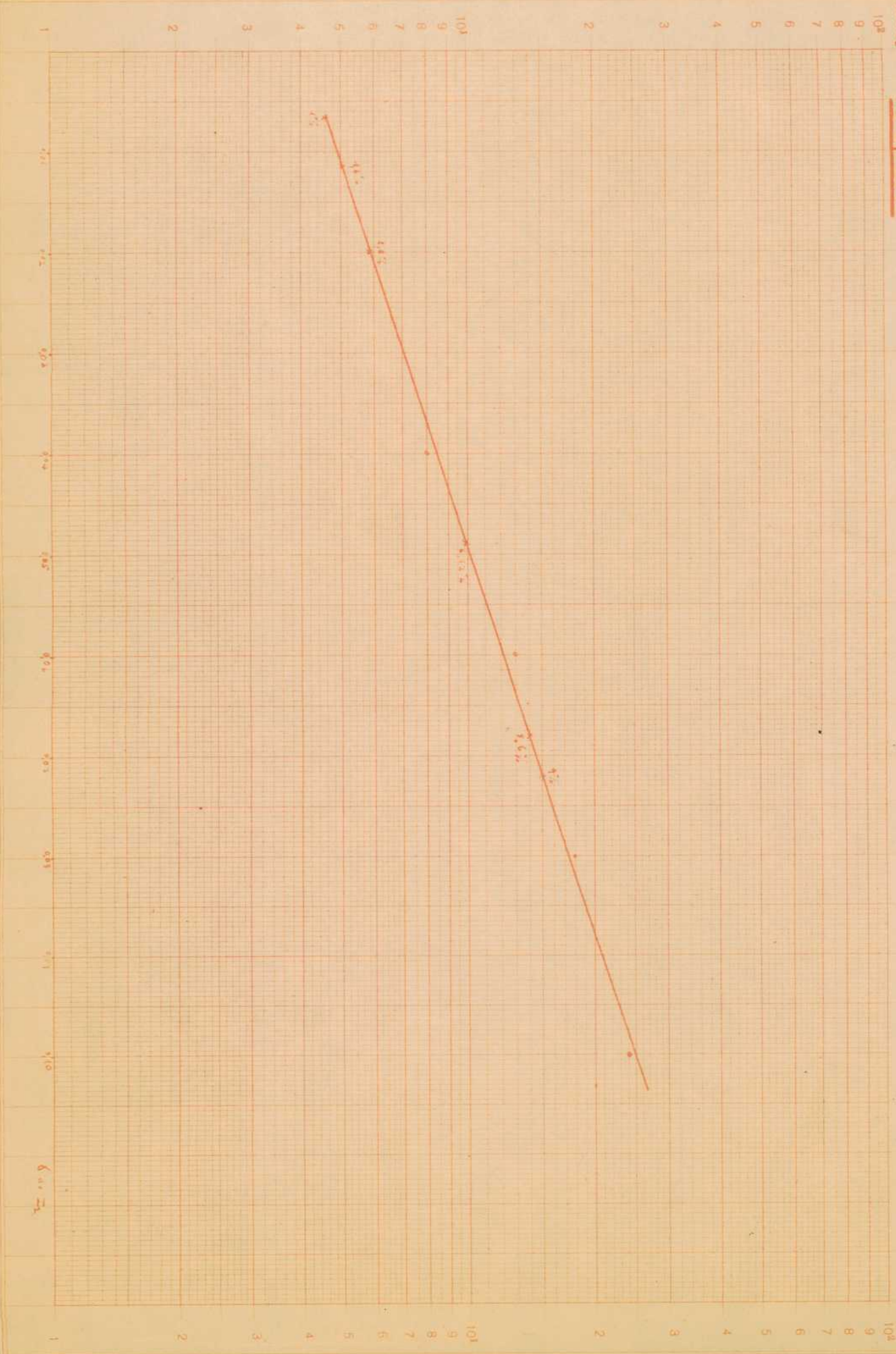
ln σ



Telling } 1-100 Einheit } 83.33 mm
Logar. Division } Unité }

ln I₁

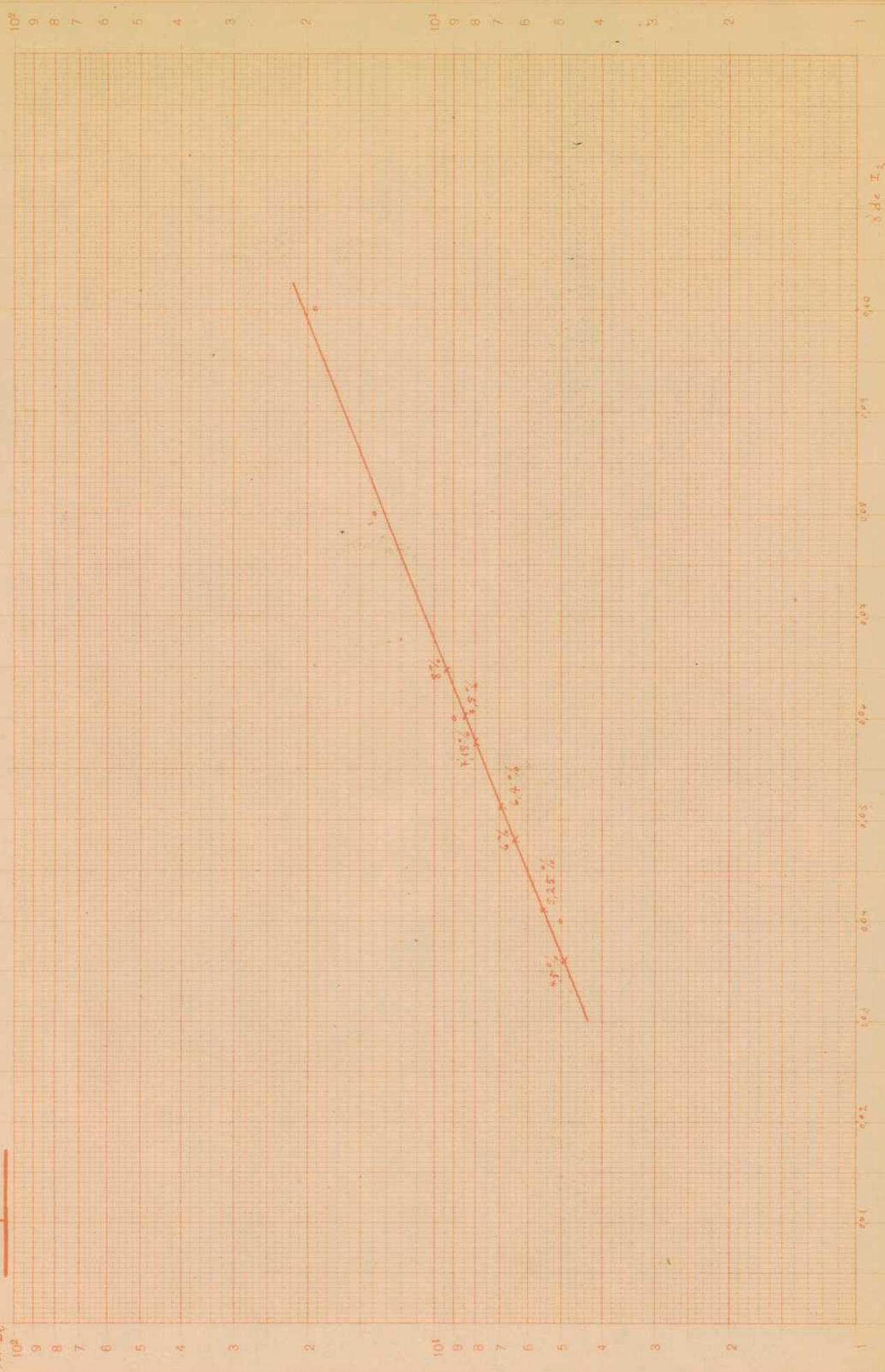
Graticol



Teilung } 1:100 Einheit } 83,33 mm
Logar. Division

Gráfico 2

$\ln I_0$



Tellung } 1-100 Einheit } 83,33 mm
 Logar. Division } 1-100 Unité }

Gráfico 3

$\ln I_c$

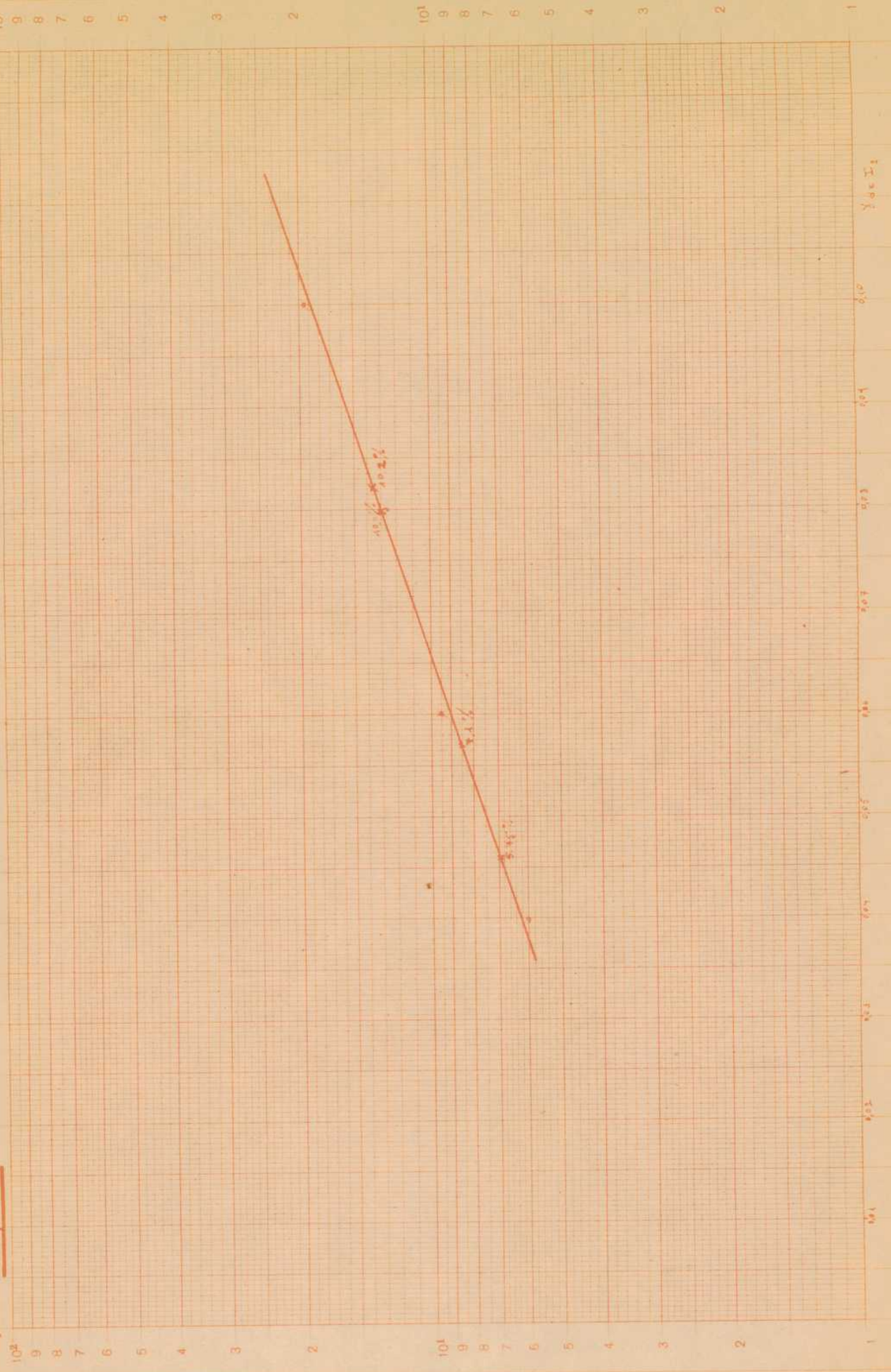


Gráfico II

Im It

10²

9

8

7

6

5

4

3

2

10¹

9

8

7

6

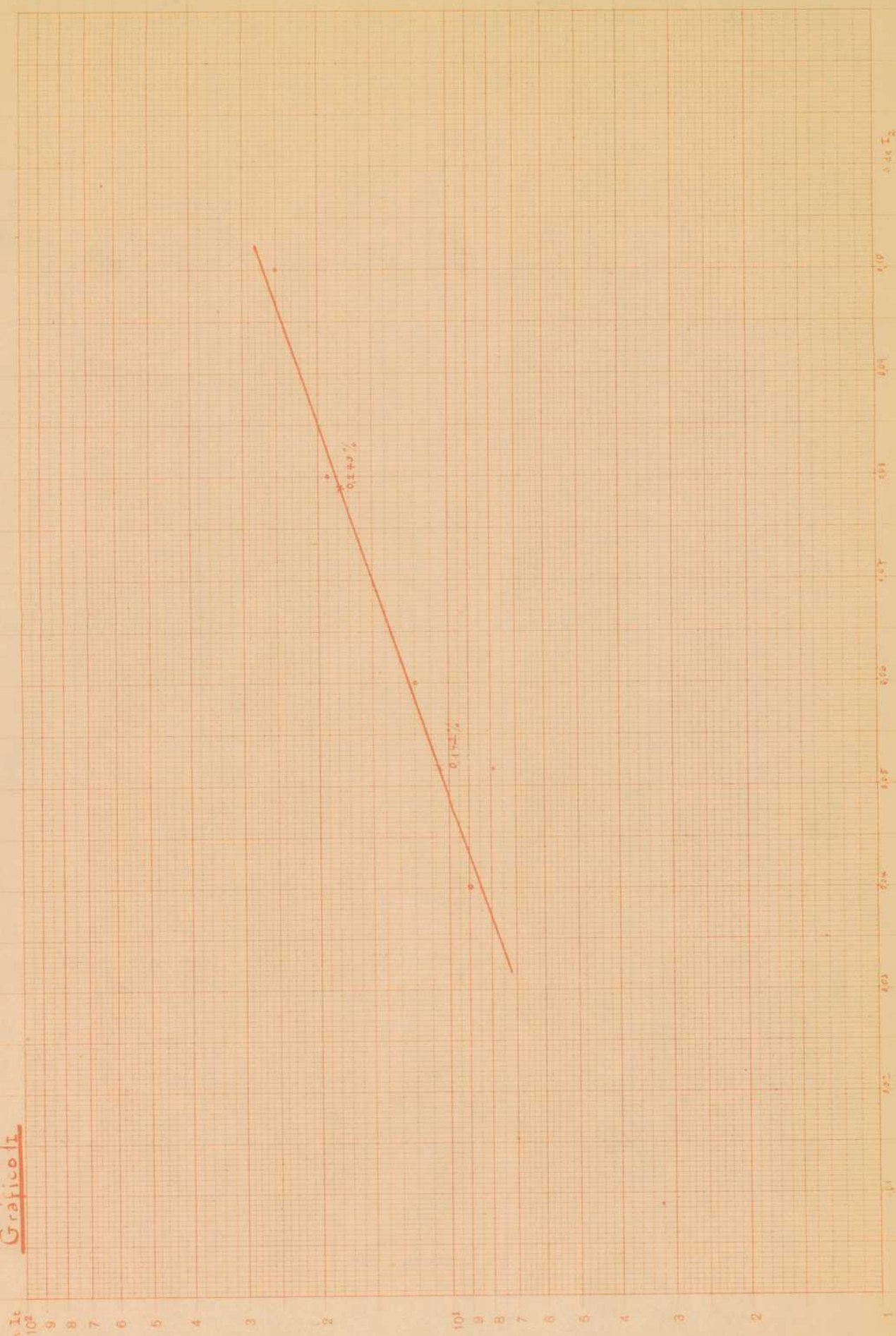
5

4

3

2

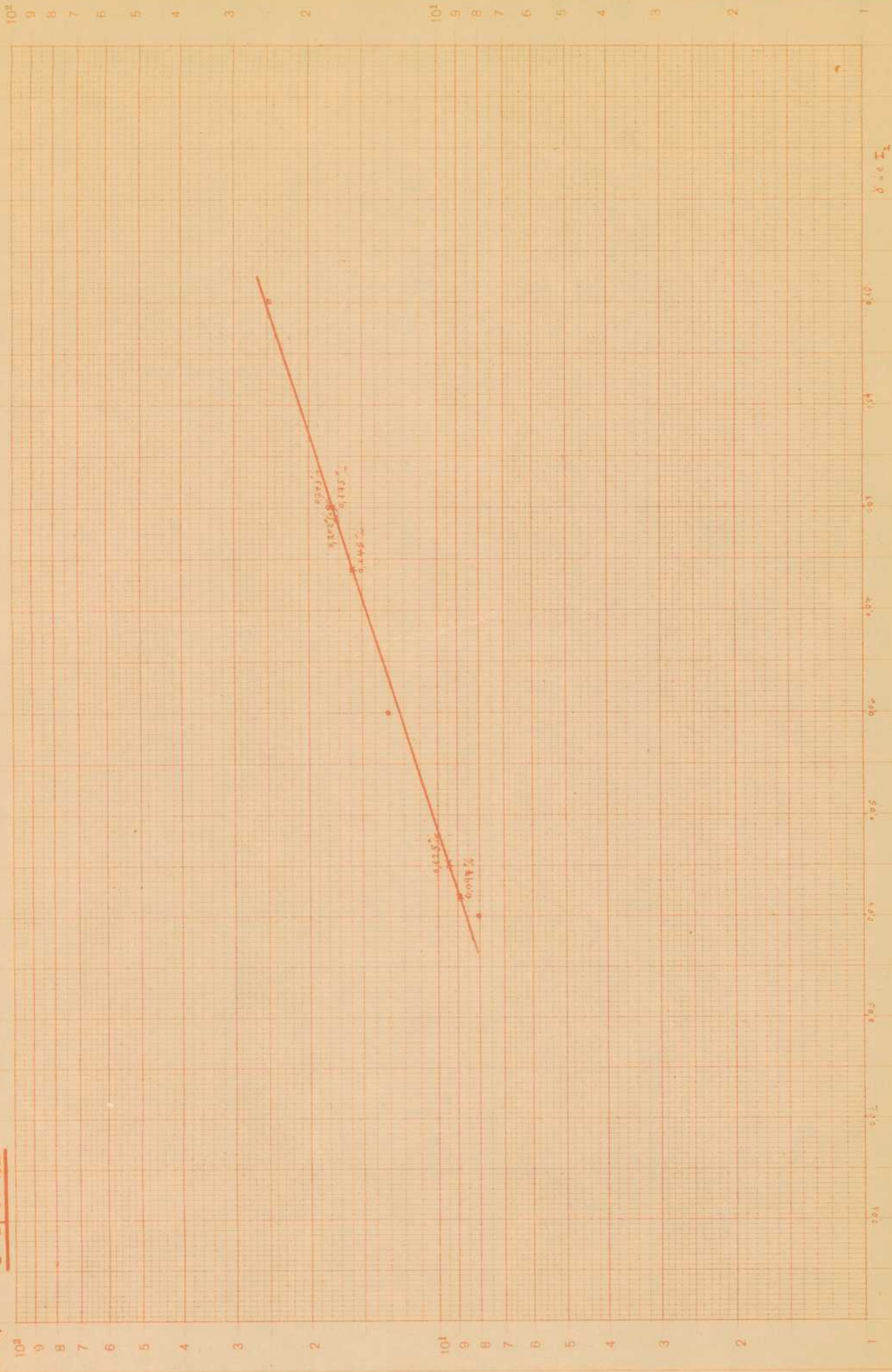
1



Teilung } 1 : 100 Einheit } 83.33 mm
Logor. Division } 1 : 100 Unite }

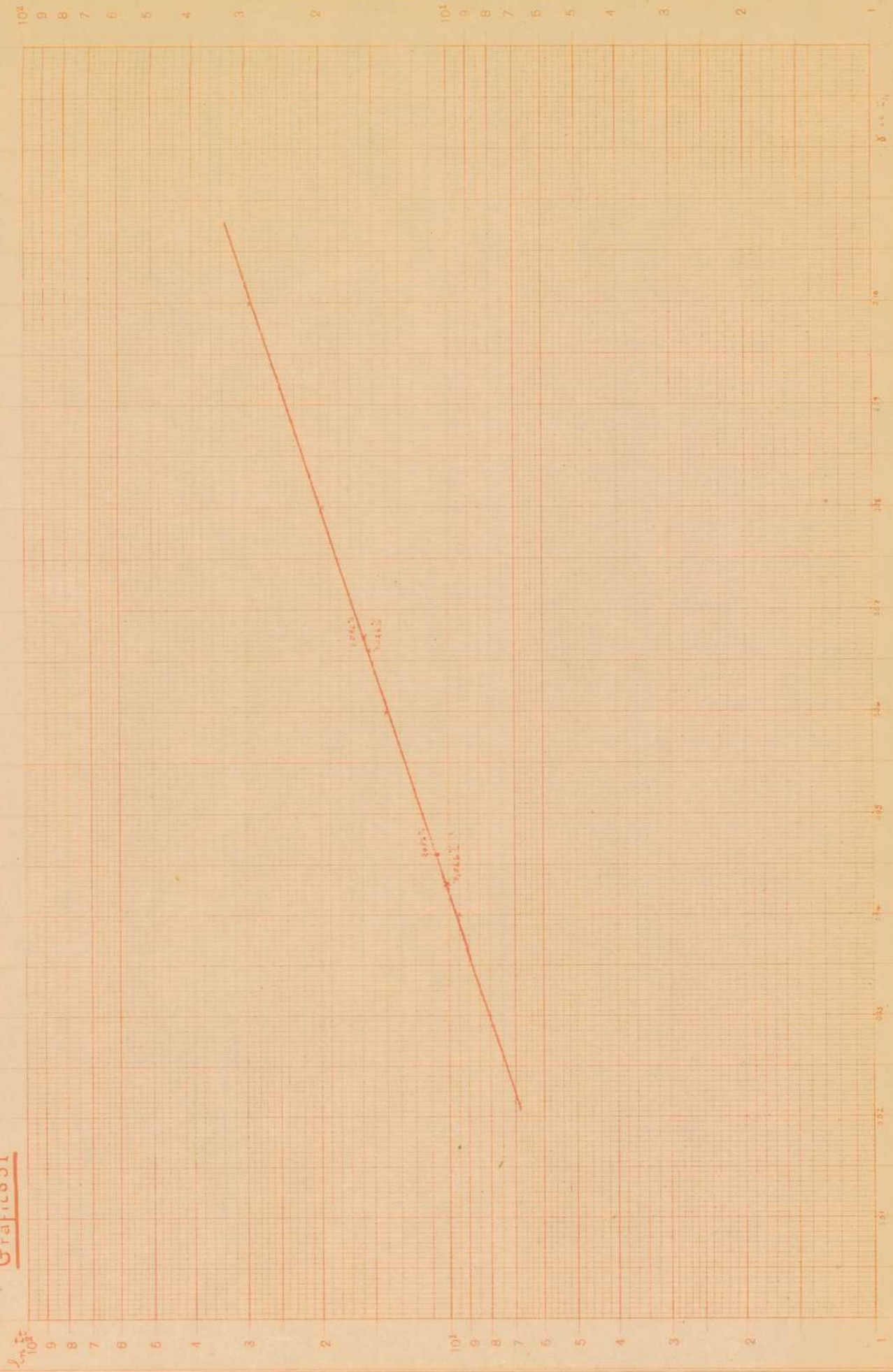
Gráfico 2I

ln It



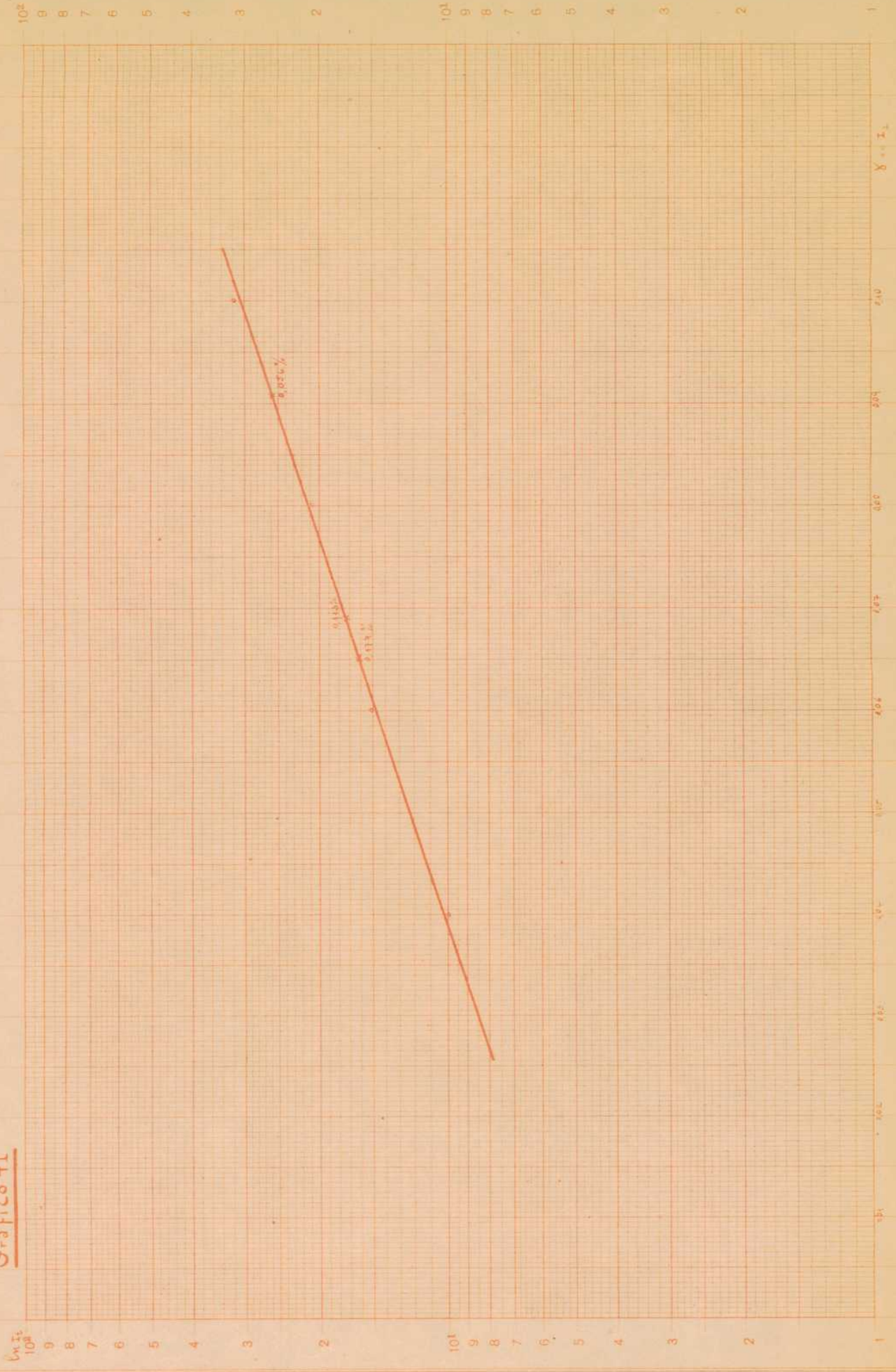
Teilung } 1-100 Einheit } 83.33 mm
 Logar. Division } 1-100 Unité }

Gráfico 31



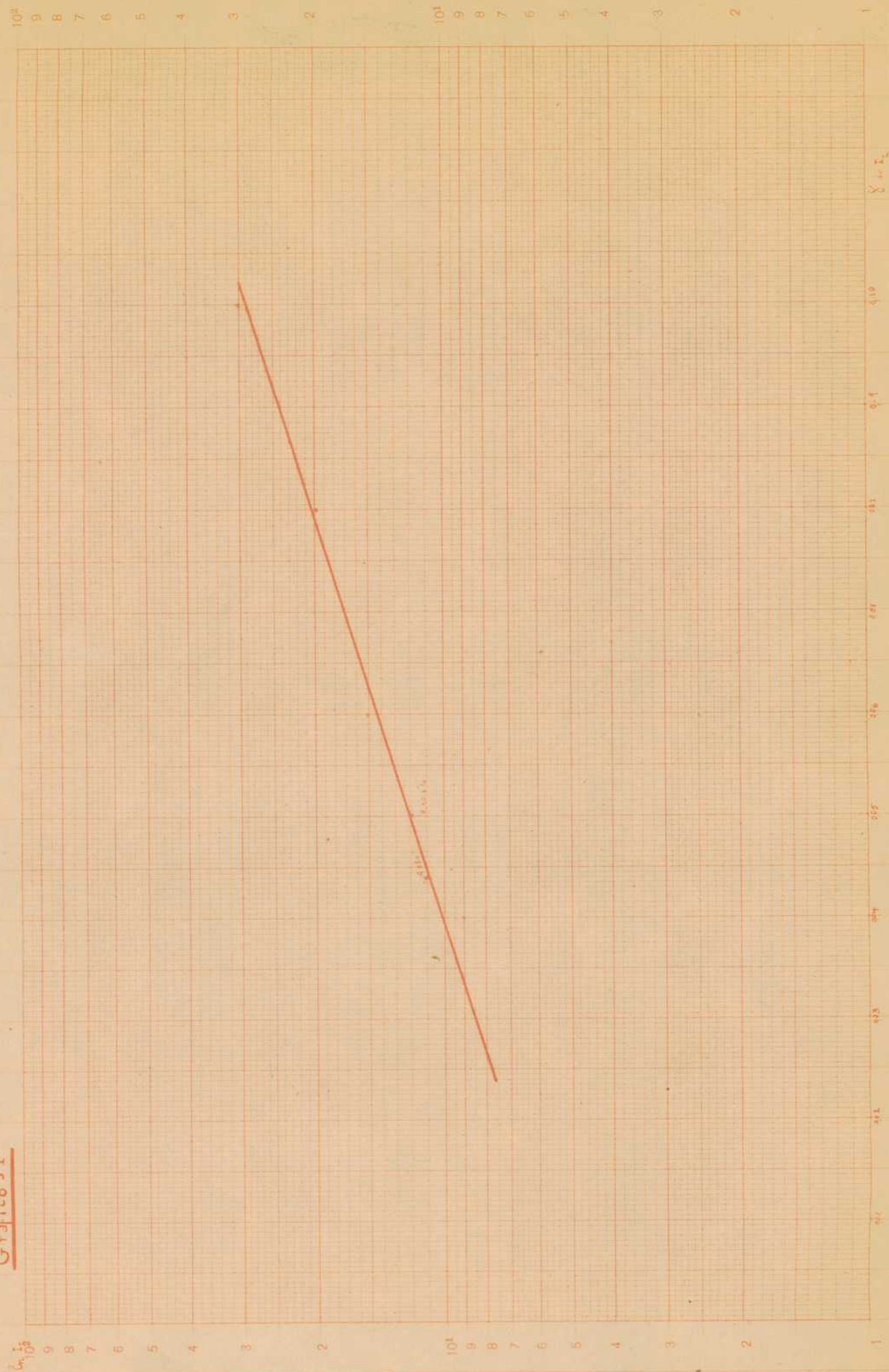
Teilung } 1:100 Einheit } 83,33 mm
 Logar. Division }

Gráfico 4I



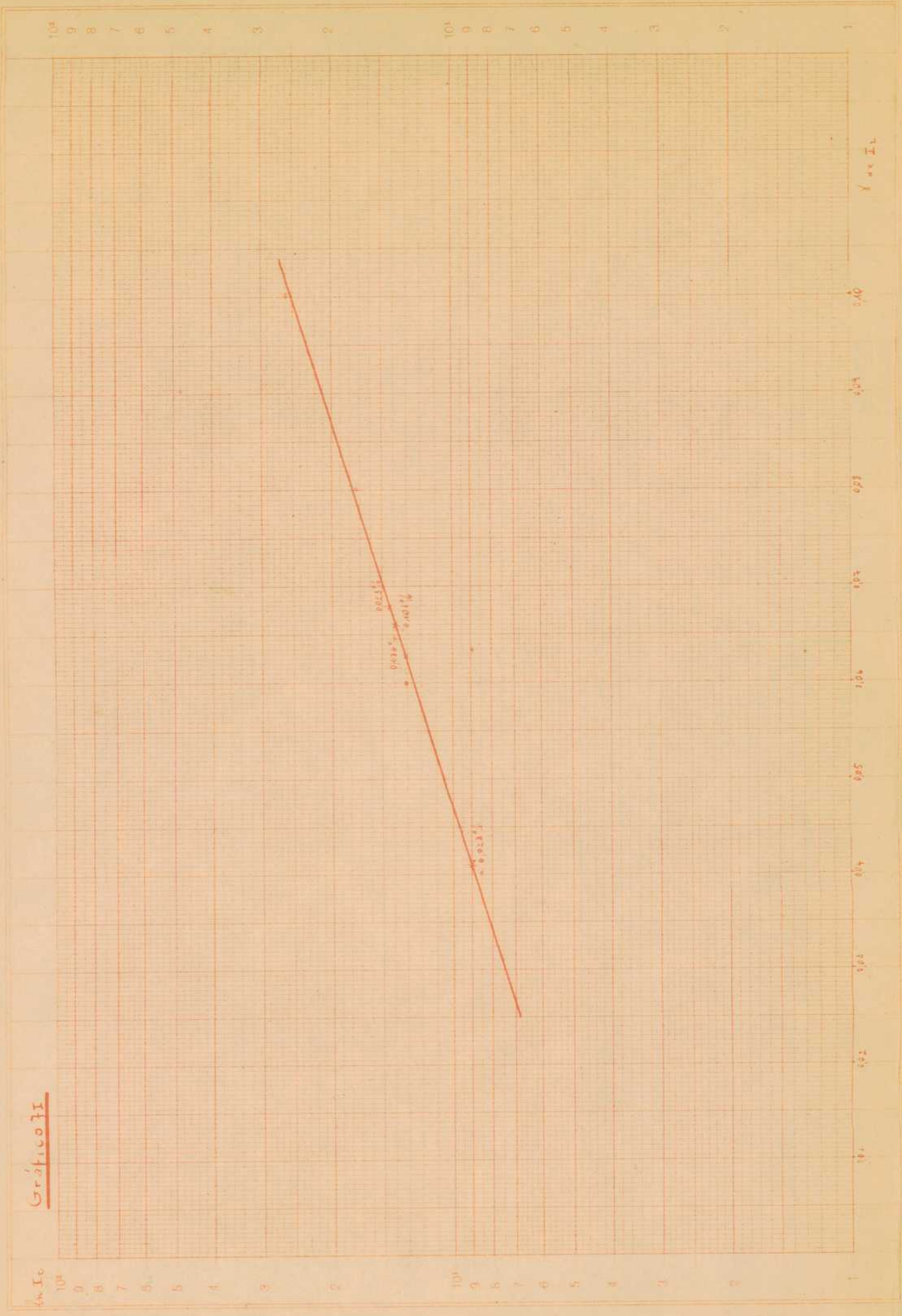
Teilung } 1-100 Einheit } 83,33 mm
 Logar. Division } Einheit }

Gráfico 51



Teilung } 1 - 100 Einheit } 83.33 mm
Logar. Division } 1 - 100 Unité }

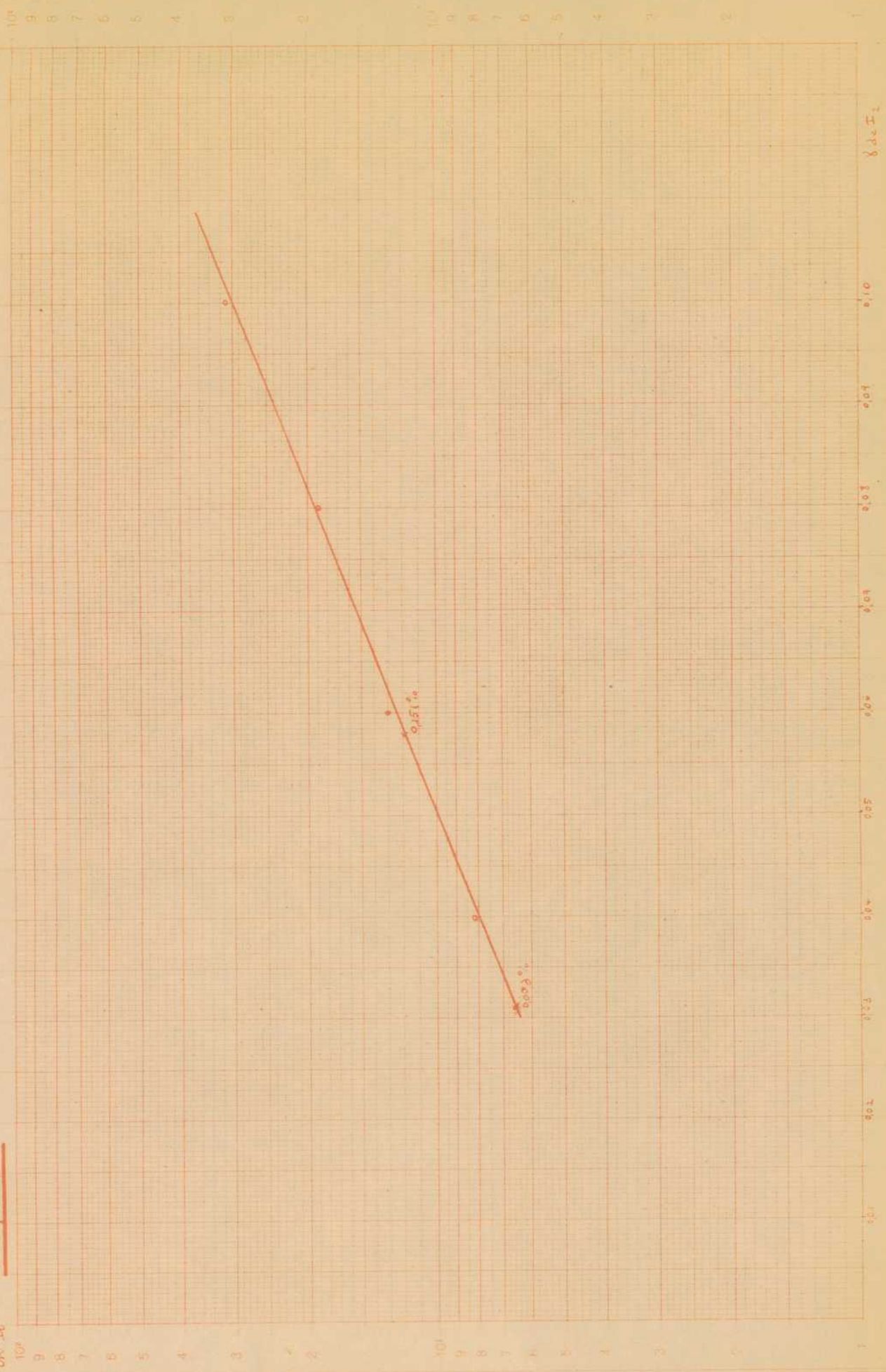
Gráfico II



Teilung } 1 - 100, Einheit } 83,33 mm
Logar. Division } 1 - 100, Unité }

Gráfico 81

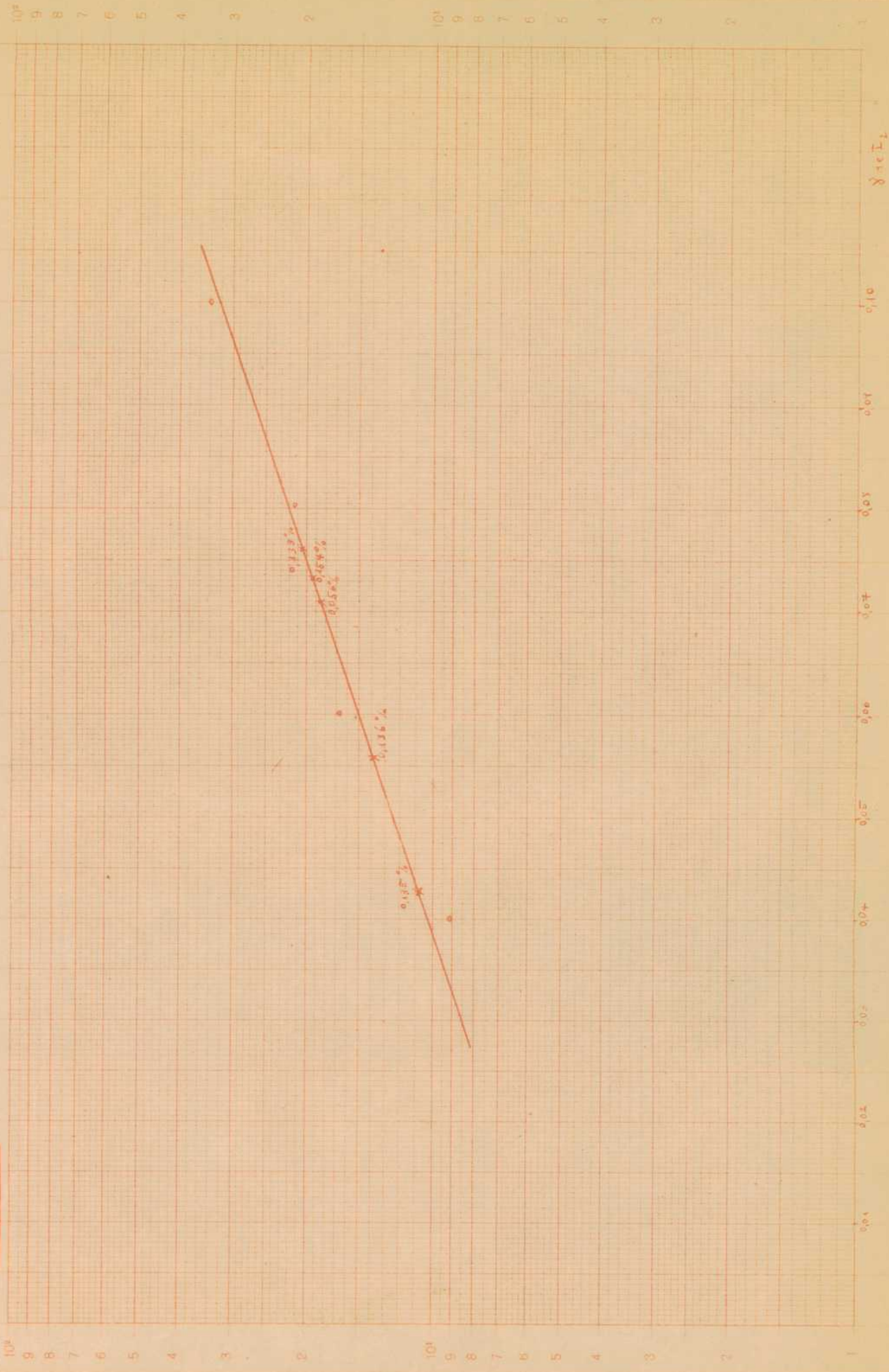
ln τ_0



Teilung } 1 - 100, Einheit } 83,33 mm
Logar. Division } 1 - 100, Unité }

Gráfico I P

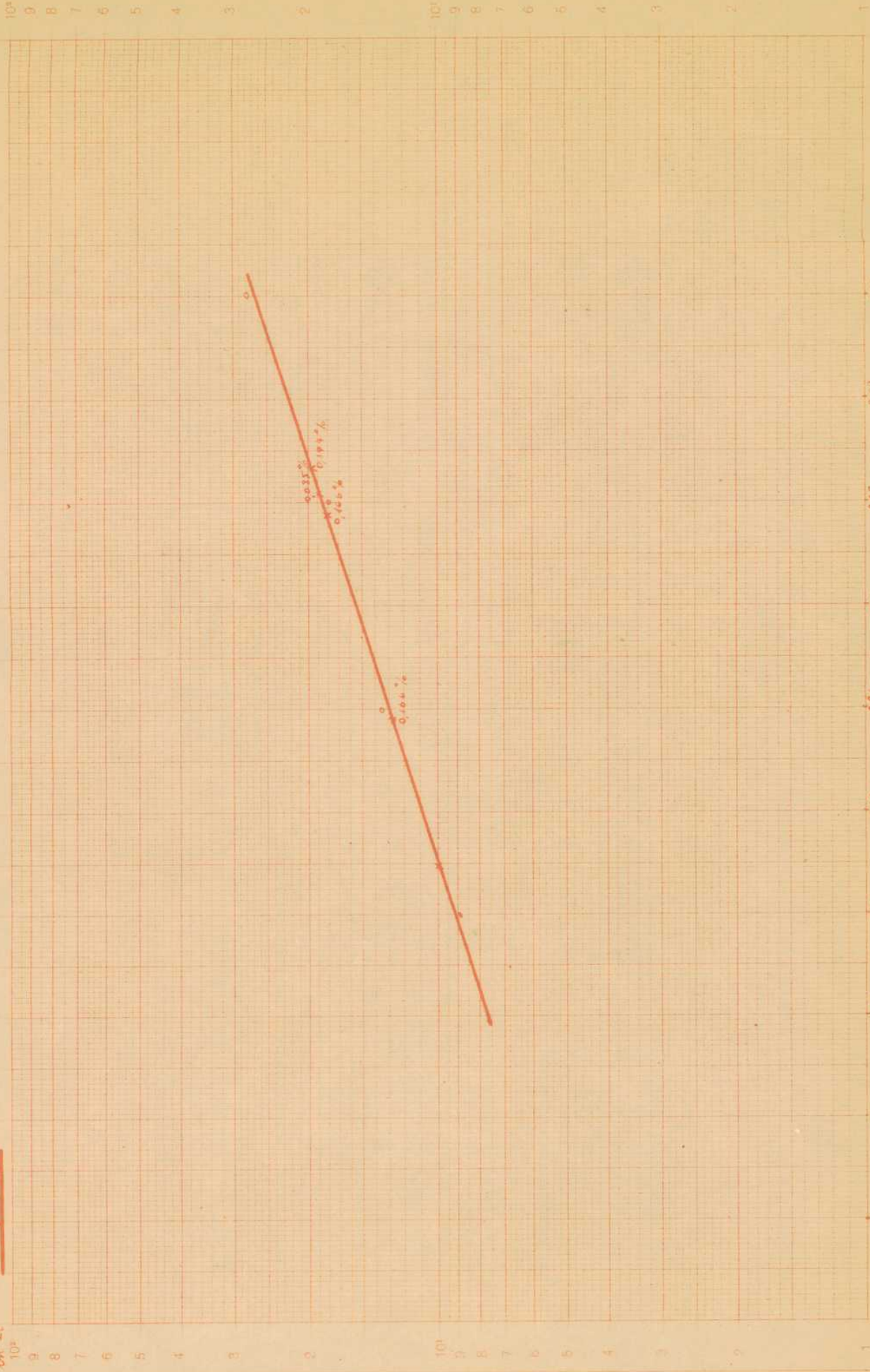
$\ln I_2$



Logar. Teilung } 1-100, Einheit } 83,33 mm

Gráfico II P

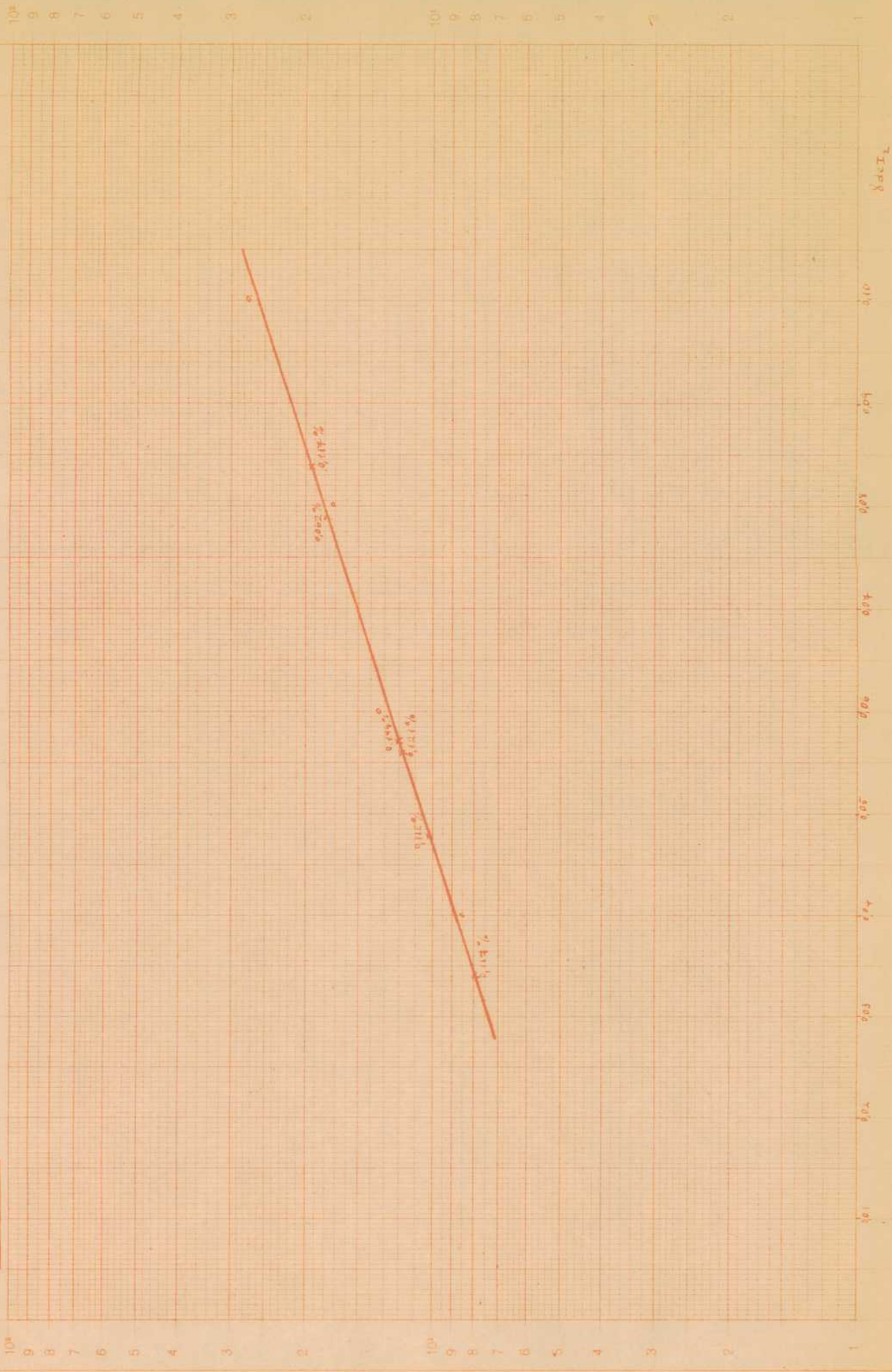
$\ln I_0$



Logar. Teilung | 1 - 100, Einheit } 83,33 mm
 Division | Unite }

Gráfico III

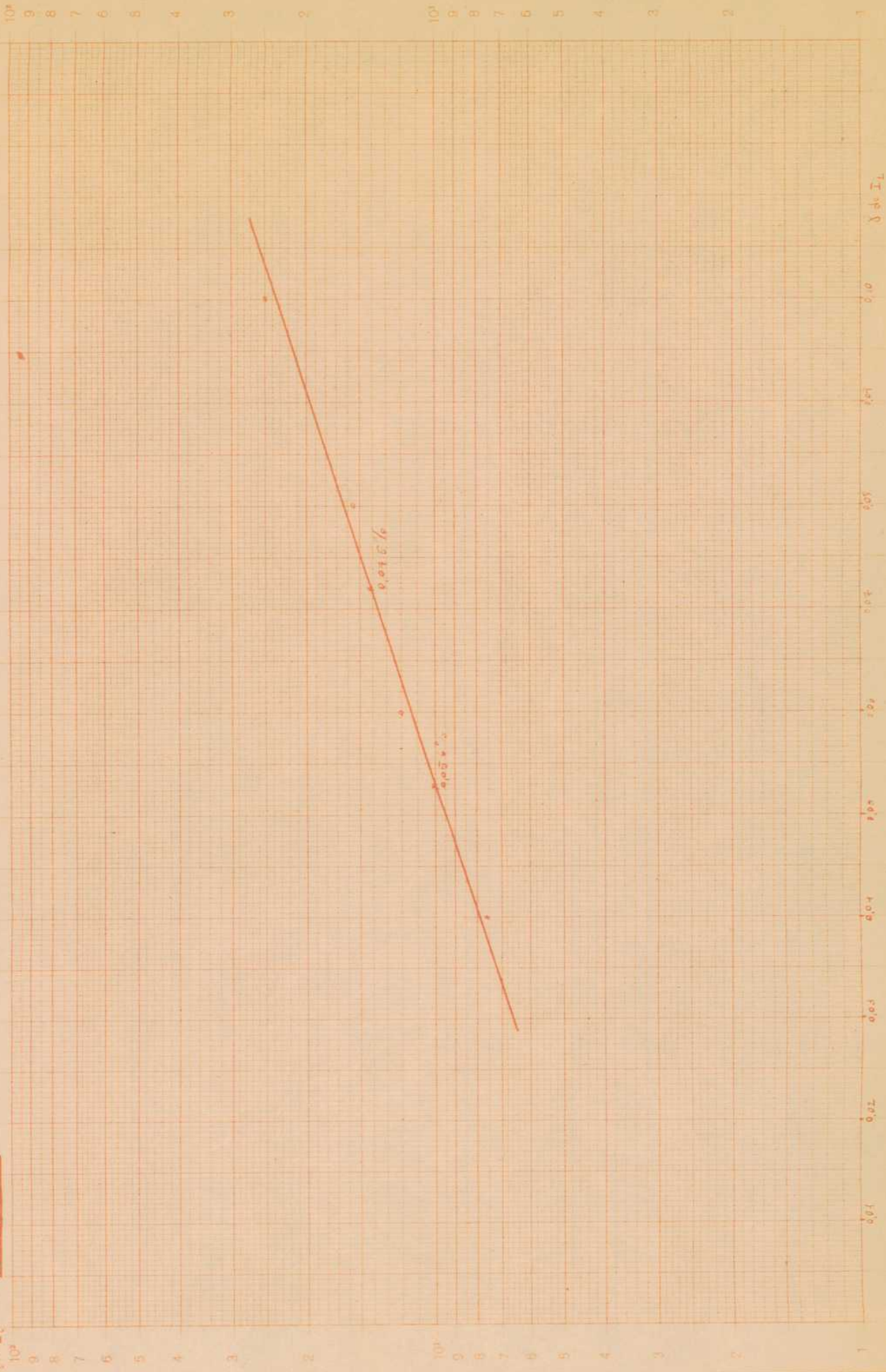
$\ln I_2$



Teilung } 1 - 100, Einheit } 83,33 mm
 Logar. Division }

Gráfico IV

I_4



Teilung } 1 - 100, Einheit } 83,33 mm
 Logar., Division }

Gráfico 5 P (SP)

h. 35

10²

9

8

7

6

5

4

3

2

10²

9

8

7

6

5

4

3

2

10¹

9

8

7

6

5

4

3

2

10¹

9

8

7

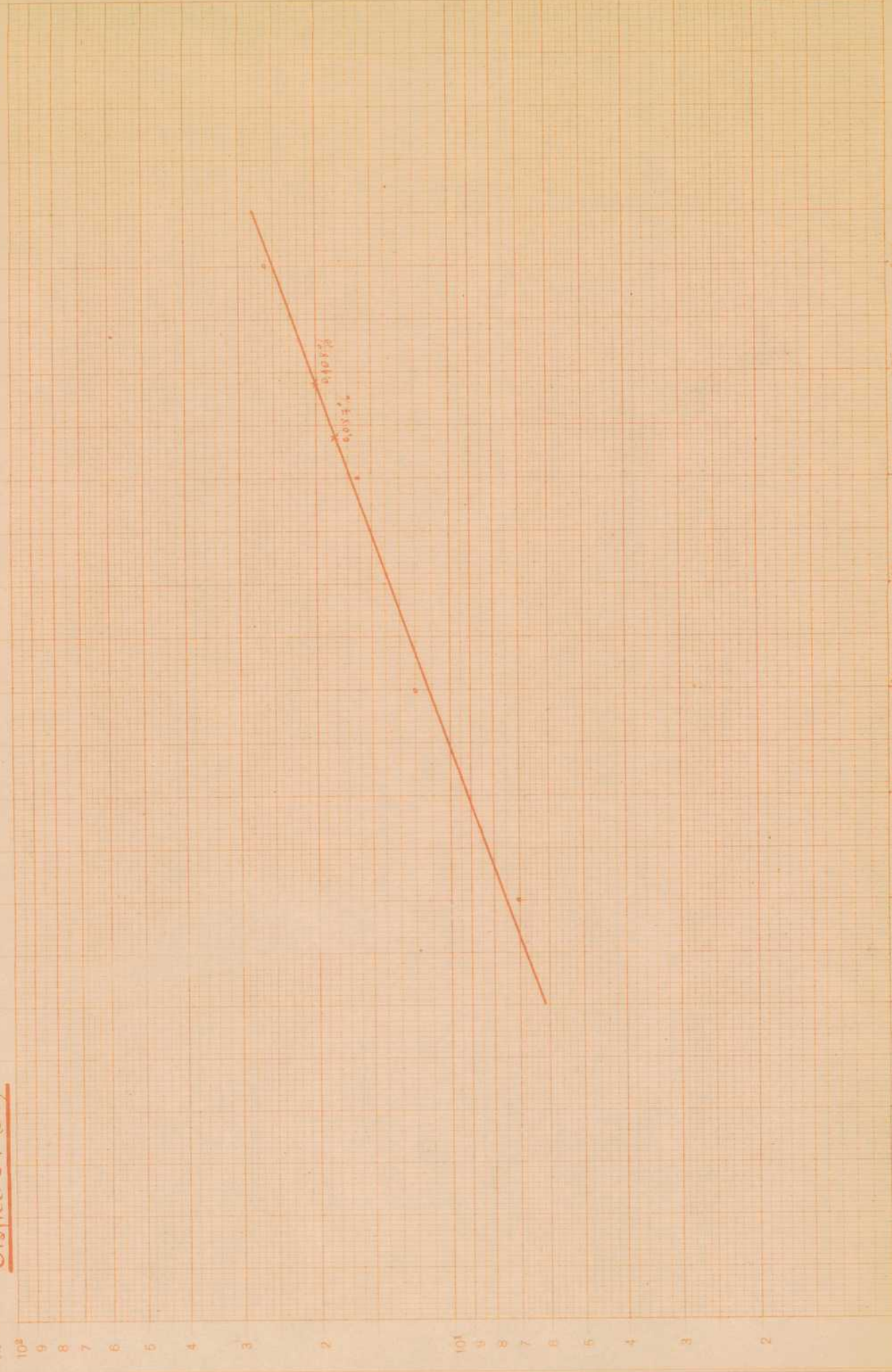
6

5

4

3

2



:
BIBLIOGRAFIA

- 1) G. Pincus y Thimann K.V. The Hormones . Vol.1 New York 1948. Vol 2 New York - 1950
- 2) C.W. Emmens. Hormone Assay - New York, 1950.
- 3) Elmer - Iodine Metabolism and Thyroid Function.
- 4) Harris y Thimann - Vitamins and Hormones - 1941
- 5) A. Ecker's y R. Wiedersherm's - Anatomie des frosches
- 6) Means - La tiroides y sus enfermedades
- 7) Marenzi - Bioquímica Analítica Cuantitativa
- 8) Guiraldó y Rojam - Productos farmacéuticos.
- 9) Pascal . T. de Chimie Minérale.
- 10) Mellor - A comprehensive treatise on Inorganic and Theoretic Chemistry.
- 11) Deulofeu y Marenzi - Curso de Química Biológica.
- 12) J. Fernández y E. Galloni - Trabajos Prácticos de Física.
- 13) K. Lather - Statistical Analysis in Biology
- 14) Snell - Métodos Colorimétricos.
- 15) Kolthoff y Sandell - Textbook of Quantitative Inorganic Analysis
- 16) L.F. Hartmann, A. Portela y A.F. Dardeza - Revista de la Sociedad Argentina de Biología - V. 30, 87 (1954)
- 17) Rulon W. Rawson, J. E. Rall, O.H. Pearson, J. Robbins, H.F. Poppell y C.D. West. Transactions of the Association of American Physicians - v 16, 86 (1953).
- 18) J.E. Rall, M.H. Power, A. Albert - Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine - v. 74, 460 - 561, (1950)
- 19) J.E. Rall, H.W. Johnson, M.H. Power, A. Albert - Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine - v. 75, 390-392 (1950)
- 20) E. Trucco y A. Portela - La Semana Médica - v.107, pg. 1163.
- 21) S.B. Barker - J. Biol. Chem. - v. 173 , (1948)
- 22) S.H. Wollman y R.O. Scow - Endocrinology, v. 52, 358-345 - (1953)
- 23) Denys Monnier - Chemia, v. 16 , n° 109 (diciembre 1955)
- 24) Strickler y Strickler - Endocrinology, v. 37 , 220, (1945)
- 25) Taurogg y Chaikoff - J. Biol. Chem, v.163, 313 (1946)
- 26) W.T. Salter y E. Mc. Kay - Endocrinology - v. 35, 380 (1944)
- 27) Allan Lein y Neene Schwartz - Anal. Chem. v. 23, 1850, (1951)
- 28) Baumann E.J. y N. J. Metzger - Biologie Chem, v. 121 , 23, (1937)
- 29) Methews H.J., G.M. Curtis y W.R. Brode - Indu. Eng. Chem. Anal. Ed. v. 10, 612 (1938)
- 30) E.B. Sandell y Kolthoff - Microthem. Acta 1, 9, (1937)
- 31) Treworow y Fashena - J.Biol. Chem. v. 110, 29 (1930)
- 32) D.S. Riggs, y E.B. Man - J. Biol. Chem. v. 134 , 193 (1940)
- 33) Talbot - J.Biol. Chem, v. 153, 479, (1944)
- 34) A.L. Chaney - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. v.12, 179 (1940)
- 35) A.L. Chaney - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. v.10, 326 (1938)
- 36) G.J. Fashena y Treworow - J. Biol. Chem, v. 114, 35 (1936)
- 37) T. Leipert - Biochem. v. 261, 436 (1933)
- 38) G.O. Stevens - Lab. Clin. Méd., v. 22, 1074 (1937)