

## **DETERMINACIÓ DE LA TOLERÀNCIA GASTRO-INTESTINAL DE MEDICAMENTS MITJANÇANT LA QUANTIFICACIÓ RADIOACTIVA DE LES MICROHEMORRÀGIES DIGESTIVES \***

V. RIMBAU, R. LÓPEZ, A. TORRALBA

INTRODUCCIÓ. — Les lesions gastro-intestinals (GI) són, probablement, un dels principals efectes secundaris de l'ús dels antiinflamatoris i de molts altres agents terapèutics. Malgrat que els mecanismes productors de les lesions no són plenament coneguts,<sup>1</sup> el fet és que les intoleràncies existeixen i que cal valorar-les per a poder preparar productes més innocus i formes farmacèutiques més ben tolerades.

Els mètodes més usats en l'estudi de les toleràncies digestives es fonamenten en la valoració «de visu» de les lesions produïdes en els estòmacs dels animals tractats. Evidentment, aquests mètodes només poden donar informació dels danys gàstrics, quedant doncs completament desconeguts els efectes sobre la resta del tub digestiu.

L'estudi de la tolerància general digestiva es pot fer agafant com a criteri que la relació entre la intensitat d'extravasació d'elements sanguinis és en relació directa amb la importància de les lesions. Això permet, a diferència dels mètodes «de visu», valoracions completament objectives, ja que es fonamenten en la quantificació instrumental dels components hemàtics extravasats.

La determinació dels components sanguinis en les femtes es va fer, inicialment, per mètodes químics.<sup>2</sup> Nogensmenys, han anat caient en desús per llur manca de sensibilitat i l'alt nombre d'interferències que produeixen resultats difícilment reproduïbles i sovint contradictoris. Aquestes dificultats s'han pogut resoldre mitjançant l'ús de mètodes radioactius de quantificació dels elements sanguinis marcats que surten per les femtes.

\* Sessió del dia 1 d'abril de 1981.

**ELECCIÓ DE L'ISÒTOP.** — Els isòtops més usats per a marcar components hemàtics són el Crom-51 i el Ferro-59. Altres isòtops, com el Fósfor-32, s'han utilitzat també, encara que molt menys.

El P-32, en general, s'ha usat en forma de fosfat com a marcador dels eritròcits. La facilitat amb què aquest fósfor radioactiu es pot *intercanviar amb el «pool» fisiològic de fosfat i la evident perillositat de l'isòtop (emissor  $\beta$ , 1,71 meV.)* han limitat la seva aplicabilitat.

Les característiques físiques i químiques del Cr-51 i del F-59 són molt millors. L'ur semiperíode de desintegració és més llarg (28 dies el Cr-51 i 45 dies el Fe-59) i permet disposar de més temps per a la realització de les proves.

El Cr-51 és un emissor  $\beta$  pur que es desintegra per captura electrònica i emet una radiació de 0,32 meV. El Fe-59 és un emissor mixt més energètic que el Cr-51 però no tan perillós com el P-32, ja que les seves radiacions  $\beta$  són més febles (0,26 i 0,46 meV.) i les  $\gamma$  (0,19, 1,10 i 1,29 meV.) tenen un factor de risc més petit en cas d'irradiació.

Ambdós isòtops marquen els eritròcits, el Cr-51 per absorció externa i el Fe-59 per fixació interna a l'hemoglobina.

La marcada amb Cr-51 es fa incubant sang total o una suspensió d'eritròcits rentats amb  $\text{Na}_2$   $^{51}\text{CrO}_4$ . Com anticoagulants s'han descrit l'ACD i l'heparina. Nosaltres, amb eritròcits de rata, hem obtingut millors resultats amb l'heparina. Acabada la fase de fixació, s'afegeix ascorbat sòdic per reduir el Cr (6 +) a Cr (3 +), el qual ja no pot fixar-se. Fet això, es pot rentar l'excés de Cr-51 no fixat o injectar-ho tot directament.<sup>3, 4</sup>

La marcada amb Fe-59 és més lenta. L'isòtop s'administra per via i. v. en forma de  $^{59}\text{FeSO}_4$  o  $^{59}\text{Fe}$  (3 +)-citrat. D'aquesta manera s'incorpora al «pool» de ferro i, finalment, a l'hemoglobina. Per a començar les proves cal, doncs, esperar un temps suficient a fi que l'eritropoiesi hagi produït uns nivells de radioactivitat prou alts.

La tria d'un isòtop o l'altre depèn, tenint en compte llurs característiques físico-químiques, de la finalitat de l'estudi. Així, el Cr-51 té un semiperíode curt i una energia baixa que el fan recomanable per a l'home. La marcada és externa, la qual cosa també permet restringir al màxim la dosi radioactiva que s'administra i el temps d'exposició. El fet de no tenir reabsorció per tractar-se d'un element no fisiològic és positiu. Tanmateix, aquesta raó és, en part, negativa, ja que es produeix una eliminació biliar continuada. Això s'agreuja més si l'administració no és autòloga, ja que la destrucció dels hematies és més ràpida.<sup>5</sup>

En el cas del Fe-59, el semiperíode i l'energia més grans afavoreixen el seu ús en els animals. En aplicar-se en marques internes, disminueix el risc de trobar en les femtes radioactivitat no deguda a extravasacions. Contràriament, en tractar-se d'un element fisiològic, la reabsorció pot dificultar les determinacions quantitatives.

**METODOLOGIA.** — El Fe-59 ha resultat una eina molt valuosa per a disposar, en el gos, d'un mètode sensible i objectiu de determinació de toleràncies sobre tot el tub digestiu.<sup>6</sup> Tanmateix, la necessitat d'un reactiu biològic tan gran presenta considerables problemes d'equipament i cost. En conseqüència, ens vam plantejar la possibilitat de desenvolupar una metòdica basada en un animal no tan exigent com és la rata.

En el nostre mètode<sup>7</sup> les rates es deixen 24 h. sense menjar i a continuació se'ls treu 0,5 ml. de sang per punció cardíaca. Després de dejunar 24 hores més, s'administra el Fe-59 per via i. v. i 24 h. més tard es permet menjar els animals. Durant tot aquest temps es permet el lliure accés dels animals a l'aigua de beure. Les femtes de les rates es recullen en fraccions de 24 h. i la radioactivitat es mesura en un comptador  $\gamma$ . Després de determinar la radioactivitat hemàtica en mostres de 10  $\mu$ l de sang, es calcula fent la divisió entre la radioactivitat en femtes i l'hemàtica.

**DISCUSSIÓ.** — L'administració del Fe-59 després del dejuni i la presa de sang fa que els animals tinguin uns nivells de radioactivitat en sang significativament més alts que aquells als quals no s'ha fet l'extracció. Això permet aconseguir unes sensibilitat i precisió més grans a l'hora de mesurar les hemorràgies fecals.

La radioactivitat de les femtes recollides durant les dues primeres setmanes després de l'administració del ferro radioactiu va baixant progressivament fins a estabilitzar-se i a la tercera setmana ja es poden començar els tractaments.

La taula I és un exemple dels valors que s'obtenen en tractar les rates amb una dosi d'àcid acetilsalicílic de 150 o 300 mg/Kg.

**TAULA I.** — *Volum de sang en femtes de rates tractades amb àcid acetilsalicílic a dosis úniques de 150 o 300 mg/Kg. Resultats expressats en microlitres (n = 5)*

	Fracció		
Tractament	0-24 h.	24-48 h.	48-72 h.
Control	29,81	26,28	29,31
150 mg/Kg.	44,97 *	36,52	36,21
300 mg/Kg.	35,60	51,64 ** ***	40,54

\*  $p < 0,05$  v.s. control del mateix dia.

\*\*  $p < 0,001$  v.s. control del mateix dia.

\*\*\*  $p < 0,005$  v.s. dosi de 150 mg/Kg del mateix dia.

Aquestes hemorràgies són equivalents a les trobades per MENASSÉ i KRUPP<sup>4</sup> a 100 mg/Kg usant el mètode del Cr-51, però més baixes que les seves a 300 mg/Kg i que induïen a LEELING i cols.<sup>8</sup> a rebutjar la rata per a estudis de toleràncies GI per hipersensible. Amb el nostre mètode les rates no semblen susceptibles als efectes GI de l'àcid acetil-salicílic. Els valors alts trobats per MENASSÉ a la dosi de 300 mg/Kg poden explicar-se per l'increment de l'eliminació biliar de Cr-51 com a conseqüència de l'efecte colagog dels salicilats.<sup>9, 10</sup> De fet, els nostres valors de les microhemorràgies per unitat de pes corporal, encara que una mica més alts que els trobats per LEONARDS en l'home,<sup>11</sup> són més baixos que els descrits per PHILLIPS<sup>6</sup> en el gos.

El nostre mètode resulta, doncs, adequat per a l'estudi de les toleràncies digestives, ja que permet establir diferències significatives entre tractaments amb un nombre petit d'animals. Ultra això, el mètode ha servit, també, per a confirmar la utilitat de les rates en aquests tipus d'estudis.

#### BIBLIOGRAFIA

1. RAINSFORD, K. D.: *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 2 (1), 121-132, 1977.
2. Rainsford, K. D.: *Agents and Actions*, 5 (4), 326-344, 1975.
3. PHILLIPS, B. M., KRAUS, P. J., ALLEN, J. L., BUSLEE, R. M.: *Toxicol. C. Appl. Pharmacol.*, 20, 515-521, 1971.
4. MENASSÉ-GDYNIA, R., KRUPP, P.: *Toxicol. & Appl. Pharmacol.*, 29, 389-396, 1974.
5. GULLIANI, G. L., CHANANA, A. D., CRONKITE, D. D. JOEL, LAISSUE, J, RAI, K. R.: *Am. J. Vet. Res.*, 36 (10), 1469-1471, 1975.
6. PHILLIPS, B. M.: *Toxicol. & Appl. Pharmacol.*, 24, 182, 189, 1973.
7. RIMBAU, V., LÓPEZ, R., FORN, J., TORRALBA, A.: *Archiv. Farmacol. Toxicol.*, 5 (3), 203-209, 1979.
8. LEELING, J., JOHNSON JR, N., HELMS, R. J.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 31, 63, 1979.
9. STEPHENS, F. O., LAWRENSON, K. B.: *The Lancet*, I, 158-159, 1969.
10. SCHMIDT, C. R., BEAZELL, J. M., ATKINSON, A. J.: *Am. J. Dig. Dis.*, 5, 613-617, 1938.
11. LEONARDS, J. R.: *Gastroenterology*, 44, 617-619, 1963.