

00381
rej.
12

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESARROLLO Y EVALUACION DE NUEVOS ENFOQUES
METODOLOGICOS EN LA CUANTIFICACION DE
PROGESTINAS SINTETICAS**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOLOGIA MOLECULAR)
Presenta el Médico Cirujano
JORGE PONCE FRAUSTO**

MEXICO, D.F.

1989

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	pág.
ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
INDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	V
INTRODUCCION.....	VI
CAPITULO 1. ANTECEDENTES GENERALES	
PROGESTINAS.....	1
ESTROGENOS.....	3
ANDROGENOS.....	5
ASPECTOS BIOQUIMICOS.....	5
CAPITULO 2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS	
ASPECTOS FARMACODINAMICOS DE LAS PROGESTINAS	
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA.....	9
NORETINDRONA.....	11
LEVONORGESTREL.....	12
METODOS DE CUANTIFICACION DE PROGESTINAS.....	12
CAPITULO 3. HIPOTESIS.....	15
CAPITULO 4. OBJETIVOS.....	18
CAPITULO 5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.	
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA)	
a. MATERIAL.....	19
b. INSTRUMENTOS.....	19
c. METODOS	
c.1. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ALGUNOS	
COMPUESTOS CETO-ALFA-BETA-INSATURADOS.	
c.1.1. ESPECTROFOTOMETRIA UV.....	20

c. 1. 2.	CROMATOGRAFIA EN GEL DE SILICE.....	20
c. 1. 3.	CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX LH-20.....	20
c. 1. 4.	DISEÑO DEL ENSAYO EN HPLC.....	21
c. 2.	EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA HUMANO	
c. 2. 1.	EXTRACCION DIRECTA CON ETER.....	22
c. 2. 2.	EXTRACCION CON SEP-PACK C-18.....	23
c. 3.	CUANTIFICACION DE MPA EN PLASMA	
c. 3. 1.	PERFIL EN HPLC DEL EXTRACTO LIPIDICO DEL PLASMA.....	24
c. 3. 2.	CURVA ESTANDAR DE MPA.....	24
NORETINDRONA (NET)		
a.	MATERIAL.....	25
b.	INSTRUMENTOS.....	25
c.	METODOS.....	25
LEVOMORGESTREL (LNG)		
a.	MATERIAL.....	26
b.	INSTRUMENTOS.....	27
c.	METODOS.....	27
CAPITULO 6. RESULTADOS		
CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ALGUNOS COMPUESTOS CETO α - β -INSATURADOS.		
1.	ESPECTROFOTOMETRIA UV.....	28
2.	CROMATOGRAFIA EN GEL DE SILICE.....	31
3.	CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX LH-20.....	31
4.	DISEÑO DEL ENSAYO EN HPLC.....	34
EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA HUMANO		
1.	EXTRACCION DIRECTA CON ETER.....	39
2.	EXTRACCION POR ADSORCION.....	39

CUANTIFICACION DE MPA, NET Y LNG EN PLASMA.	
1 PERFIL LIPIDICO DEL PLASMA POR HPLC.....	43
2 CURVAS ESTANDAR DE MPA, NET Y LNG.....	50
3 PLASMAS ESTANDAR Y PLASMAS DE USUARIAS	
DE PROGESTINAS.....	55
CAPITULO 7. ANALISIS DE DATOS.	
METODOS DE EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA.....	56
METODOS DE SEPARACION DE LIPIDOS PLASMATICOS.....	57
CARACTERIZACION DE PROGESTINAS POR HPLC.....	58
CURVAS DE CALIBRACION.....	58
PREPARACION DE PLASMAS ESTANDAR.....	59
CAPITULO 8. DISCUSION.....	60
CAPITULO 9. CONCLUSION.....	62
APENDICE 1. CLASIFICACION DE PROGESTINAS (IUPAC).....	64
APENDICE 2. NOMBRES COMUNES Y SISTEMATICOS.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO.

AMPC	Adenosinmonofosfato ciclico.
a.u.f.s.	absorbance units for sensitivity.
CLAE	Cromatografia de liquidos. de alta eficiencia.
CG	Cromatografia de gases.
E ₂	Estradiol.
EM	Espectrometria de masas.
HPLC	High performance liquid chromatography.
LC	Liquido de centelleo.
LH	Luteotrophic hormone.
RIA	Radioinmunoanálisis.

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Derivados metabólicos esteroideos.....	8
Figura 2. Fórmulas químicas de compuestos Δ -4-3-ceto analizados en éste trabajo.....	10
Figura 3. Acetato de Medroxiprogesterona.....	19
Figura 4. Procedimiento de extracción de MPA-H ³ del plasma.....	23
Figura 5. Procedimiento de cuantificación de MPA en plasmas estándar.....	24
Figura 6. Noretindrona.....	25
Figura 7. Procedimiento de extracción de NET-H ³ del plasma.....	26
Figura 8. Norgestrel.....	26
Figura 9. Espectrofotometría de absorción en UV de compuestos Δ 4-3-ceto.....	29
Figura 10. Espectrofotometría de absorción en UV.....	30
Figura 11. Cromatografía en Sephadex LH-20.....	33
Figura 12. Cromatograma HPLC de compuestos Δ 4-3-ceto.....	34
Figura 13. Cromatograma HPLC de Δ 4-3-ceto naturales. A.....	35
Figura 14. Cromatograma HPLC de Δ 4-3-ceto naturales. B.....	36
Figura 15. Cromatograma HPLC de Δ 4-3-ceto.....	37
Figura 16. Cromatograma HPLC de Δ 4-3-ceto.....	38
Figura 17. Extracción de NET-H ³ con Sep-pack C-18.....	40
Figura 18. Extracción de MPA-H ³ con Sep-pack C18.....	41
Figura 19. Lípidos del plasma por HPLC. Extracto directo con éter.....	43

Figura 20. Lípidos del plasma por HPLC. Extracto en Sep-pack C-18.....	44
Figura 21. Lípidos del plasma por HPLC. Sephadex LH-20.....	45
Figura 22. Identificación de NET en plasma por HPLC.....	46
Figura 23. Identificación de LNG en plasma por HPLC.....	47
Figura 24. MPA, NET y LNG en plasma por HPLC.....	48
Figura 25. MPA, NET y LNG en plasma por HPLC.....	49
Figura 26. Curva estándar de NET.....	50
Figura 27. Curva estándar de LNG.....	51
Figura 28. Curva estándar de MPA.....	52

INDICE DE TABLAS

pág.

TABLA 1. CLASIFICACION DE LAS PROGESTINAS.....	16
TABLA 2. CARACTERIZACION ESPECTROFOTOMETRICA DE MPA, LNG Y NET.....	31
TABLA 3. CARACTERIZACION CROMATOGRAFICA DE ALGUNOS COMPUESTOS ESTEROIDES.....	32
TABLA 4. TIEMPOS DE RETENCION DE COMPUESTOS Δ^4 -3CETO.....	39
TABLA 5. EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA.....	42
TABLA 6. EFICIENCIA DEL EXTRACTO DIRECTO DE NET-H ³	42
TABLA 7. VALORES DETERMINADOS PARA LAS PROGESTINAS ESTUDIADAS.....	63
TABLA A. CURVA ESTANDAR NET.....	83
TABLA B. CURVA ESTANDAR LNG.....	84
TABLA C. CURVA ESTANDAR MPA.....	84

RESUMEN.

El fundamento de este trabajo lo constituye la cromatografía de líquidos de alta resolución, a base de una columna de octadecilsilano (C-18) con partículas de 5 μm de diámetro. La detección de los compuestos estudiados se llevó a cabo en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. El objetivo consistió en desarrollar un método eficaz y rápido para cuantificar Acetato de Medroxiprogesterona (MPA), Noretindrona (NET) y Levonorgestrel (LNG) en plasmas de mujeres usuarias de algunas de estas progestinas sintéticas. Los procedimientos seguidos fueron: a) caracterización fisicoquímica de las progestinas y otros esteroides con grupo Δ^4 -3-ceto (o α - β insaturado), b) métodos de extracción de lípidos del plasma humano y c) desarrollo del método en HPLC para caracterización y cuantificación de las progestinas estudiadas. La caracterización espectrofotométrica, permitió establecer las condiciones, para el análisis cromatográfico en HPLC. La resolución, es decir, la eficiencia de la separación entre compuestos estructuralmente similares, resultó satisfactoria para permitir cuantificar separadamente cada una de las progestinas mediante HPLC en las condiciones estandarizadas. En cambio la sensibilidad del método, entendida como la cantidad mínima de compuesto que se puede cuantificar, no resultó suficiente para las concentraciones que presentan usuarias de algunas de estas progestinas sintéticas. Esto nos lleva a considerar que el método es muy útil en cuanto a la separación de los compuestos estudiados; pero si se desea cuantificarlos, deberá emplearse un método lo suficientemente sensible, como lo sería la espectrometría de masas.

INTRODUCCION.

La terapéutica anticonceptiva, concebida en sus inicios como la consecuencia lógica de numerosos e interesantes descubrimientos sobre la fisiología de la reproducción humana, ha alcanzado un alto grado de desarrollo y actualmente constituye parte fundamental de todo plan de política poblacional a nivel mundial. Esto es, su gran asequibilidad permite controlar el número de individuos en un lugar y periodo de tiempo determinados. Asimismo, cada individuo puede manejar a voluntad el número de descendientes directos y el momento en el que desea tenerlos.

La diversidad de métodos da idea de los abundantes estudios que han venido a proporcionar sistemas más adecuados para tal fin y adaptarse a cada caso particular, obedeciendo a factores como: edad, número de partos previos, situación económica, patrones culturales, características de cada método y tiempo probable de uso, entre otros.

La gama de procedimientos va en aumento y parte desde la aplicación del método del ritmo menstrual hasta elaborados procedimientos farmacéuticos como implantes pasando por compuestos inyectables y preparaciones orales; los procedimientos quirúrgicos también son empleados frecuentemente.

A pesar de los conocimientos actuales respecto a la fisiología reproductiva masculina, no hay grandes perspectivas aún, ya que no existe la situación tan diversa de aspectos hormonales cíclicos en los que se puede incidir farmacológicamente. Ello conduce a centrar la práctica anticonceptiva en el desarrollo de compuestos

del tipo de estrógenos y progestinas sintéticas y variar la forma de administración.

En base a lo anterior, se puede considerar que gracias a los elaborados procesos de química orgánica y farmacología, se ha alcanzado un alto grado de desarrollo en la producción de drogas de tipo hormonal esteroidal con cierto grado de potencia farmacológica, así como medios y formas de administración más adecuados. La combinación secuencial o simultánea de hormonas sintéticas puede ofrecer mejor resultado y al mismo tiempo disminuir los efectos colaterales, así como dar una estrecha simulación de los eventos hormonales naturales del ciclo sexual.

La eficacia del empleo de éstas hormonas, ha sido el resultado de extensos estudios en distintas áreas de biomedicina y cabe mencionar el papel preponderante de dos procedimientos clave: el radioinmunoanálisis y el análisis estadístico. El primero tiene la ventaja de ser un método analítico muy sensible, específico, preciso y reproducible. No obstante su alto costo y elaborado proceso, su utilidad es evidente en el estudio integral de un nuevo compuesto sintetizado, así como en estudios comparativos en población abierta. El análisis estadístico permite hacer cálculos rápidos y confiables para evaluar cada una de las etapas de análisis farmacológico de compuestos nuevos.

Un método especial, pero sumamente preciso, es la espectrometría de masas (EM). Sin embargo su aplicación se limita, por el momento, a resolver cuestiones particulares de investigación básica, siendo restringida su aplicación en aspectos de control terapéutico. Proporciona información detallada de los derivados

metabólicos y ello permite conocer a fondo los mecanismos implicados en el efecto terapéutico y la aparición de los efectos colaterales.

La cromatografía de gases (CG) es otro procedimiento analítico que ha dado importantes contribuciones en la caracterización de compuestos esteroideos hormonales y constituyó la forma inicial de cuantificar compuestos en concentraciones inferiores a las detectadas por procedimientos hasta entonces disponibles. Las limitantes de su uso consisten en su baja separación y sensibilidad, requeridos en estudios actuales. Sin embargo, dió la pauta para desarrollar métodos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC) y la combinación de métodos cromatográficos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución o eficiencia, posee ciertas características como: versatilidad en el tipo de compuestos, costo relativamente bajo, consume poco tiempo, permite gran maniobrabilidad al efectuar variantes en los sistemas de separación (gradientes de polaridad y variaciones en el flujo de la fase móvil) y el manejo de muestras biológicas, por lo cual se pretende implementar un método que permita cuantificar progestinas para apoyar las etapas de estudio en usuarias de progestinas sintéticas haciendo uso del método HPLC.

El estudio del metabolismo de las hormonas anticonceptivas así como de los efectos biológicos apenas comienza a desarrollarse. Por ello, al conjuntar las mejores herramientas para elaborar estrategias de estudio que ayuden a comprender los fenómenos implicados en la reproducción y su regulación, deben tomarse en cuenta las técnicas analíticas antes descritas y analizar el papel que tiene la cromatografía de líquidos, que de manera particular se aborda en

este trabajo.

En los últimos años, el área de biología de la reproducción se ha enriquecido con nuevos conocimientos, cuya aplicación permite efectuar métodos de control de la fertilidad con el fin de aumentar las probabilidades de una mejor condición de vida en base a los indicadores de salud, o al menos no poner en peligro las que se tienen actualmente. Esto es, el nivel de vida de una comunidad tenderá a aumentar si se logra reducir la tasa de crecimiento poblacional, ya que permite correlacionar la economía con el número de individuos que forman parte de ella.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES GENERALES.

Es necesario ubicar a los compuestos en estudio desde dos aspectos: a) el sustrato químico y b) el efecto biológico. En cuanto al primero, cabe mencionar que las progestinas sintéticas derivan de la progesterona desde el punto de vista estructural. En cuanto al efecto biológico, se tiene suficiente información general que apoya los fundamentos fisiológicos que permiten entender las funciones principales de progestinas, estrógenos y andrógenos. Los conceptos fundamentales de éstos esteroides hormonales se describen a continuación.

PROGESTINAS.

Desde fines del siglo pasado se pensaba en el papel que el cuerpo lúteo desempeñaba en la gestación, lo cual se demostró al provocar abortos en conejas ovariectomizadas y el impedimento del aborto al administrar extractos luteales (1,2,3). La completa descripción de los efectos de un extracto luteal en útero de cerdas, marcaron el principio de la endocrinología sexual.

Al sintetizar derivados de la progesterona (análogos sintéticos) se pretendía mejorar la incómoda situación del efecto poco duradero de la progesterona en los modelos experimentales.

La progesterona se produce en el cuerpo lúteo, hacia la segunda mitad del ciclo menstrual (el día uno corresponde al primer día de sangrado menstrual) por efecto de la estimulación de la hormona hipofisiaria luteotrófica (LH). El papel de ésta hormona consiste en mantener la producción de progesterona y, si ocurre embarazo, el

trofoblasto da continuidad de estímulo hormonal mediante otra hormona denominada gonadotropina coriónica, para mantener viable al cuerpo lúteo como fuente de progesterona, al menos hasta el segundo o tercer mes de la gestación, ya que para ese entonces, la placenta asume el papel principal de la producción de progesterona durante el resto de la gestación.

La progesterona estimula el desarrollo del endometrio secretor (etapa lútea del ciclo) y la caída en su concentración desencadena la menstruación, ya que el cuerpo lúteo recibe influencia sólo de LH cuando no existe embarazo. La acción conjunta de estrógenos y progesterona es responsable de las características histológicas del conducto vaginal y endometrio. Las glándulas endometriales se atrofian cuando se administra una progestina sintética que no posee efecto estrogénico, demostrándose de ésta manera la complementariedad funcional de dichas hormonas en el ciclo sexual hormonal.

Las glándulas del endocervix, maduradas bajo la influencia de estrógenos, tornan su secreción fluida en una más viscosa al exponerse a la progesterona. De la misma manera, el patrón típico de la mucosa endocervical en el embarazo se desarrolla a partir de un patrón estrogénico verificable en frotis. Así, la presencia de estrógeno y la subsecuente acción progestágena, repercute en cambios citológicos y es ahora posible medir la potencia farmacológica de un nuevo compuesto sintético en base a dichos cambios.

Como efectos biológicos atribuibles a la progesterona se encuentran: proliferación de acinos en glándula mamaria (conjuntamente con estrógenos) e inducción de aumento en temperatura corporal basal, a dosis que producen efectos en vagina, endometrio y cuello uterino.

El tratamiento previo con estrógenos induce un aumento poblacional de receptores celulares para progesterona en los tejidos blanco (4,5).

ESTROGENOS.

La relación entre ovario y función uterina, así como diversas funciones sexuales, quedó establecida desde 1900 (3) y fue corroborada por reimplantes que restauraban funciones suprimidas o modificadas por la extirpación de los ovarios. La presencia en la circulación sanguínea de una sustancia durante el estro en cordas (principio sexual activo), así como el hallazgo de una sustancia en la orina de la mujer en período menstrual, cuya cantidad fluctuaba durante el ciclo, vinieron a establecer la relación "ovario-hormona-función sexual" (6, 7, 8, 9). Durante el embarazo se eliminan grandes cantidades de estrógeno por orina, de donde pudo aislarse el principio sexual activo (10, 11, 12).

Los estrógenos tienen distintos efectos: por acción directa producen desarrollo y crecimiento en vagina, útero y trompas, además de causar aumento de tamaño en mamas (conductos, estroma y depósito de grasa) y por acción más bien indirecta, se moldea el contorno corporal (distribución de la grasa de depósito), configuración esquelética, cambios en epifisis de huesos largos y fusión epifisiaria. Los estrógenos además influyen en el crecimiento del vello axilar y pigmentación de areola, pezón y región genital. Aunado a esto, se relaciona el comportamiento característico femenino en el humano y otras especies.

Lo más sobresaliente es el comportamiento cíclico de la secreción estrogénica del ovario entre una menstruación y otra. En una

primera fase (fase folicular o inicio del sangrado) comienza a aumentar la secreción de estradiol en sangre y se detectan hasta 20 pg/mL. Esta primera etapa o fase, se denomina folicular o proliferativa e implica cambios histológicos en ovario y mucosas uterina y vaginal: la secreción glandular de endocérvix está aumentada y las mamas están turgentes. La caída en la actividad estrogénica se desarrolla aproximadamente al final del ciclo (28 días aproximadamente), como preludio de la aparición de la menstruación. Este fenómeno se desarrolla en la etapa de ciclos inmaduros (anovulatorios de la pubertad) y en la menopausia. En la adolescencia, el factor desencadenante de la menstruación es la suspensión de la secreción de progesterona.

Respecto al mecanismo de acción de los estrógenos, se ha propuesto la presencia de receptores en células de tejidos "blanco" (vías reproductoras femeninas, mamas, hipófisis, hipotálamo). En lo referente a útero, se conoce un receptor de naturaleza proteica que se encuentra en citosol, que recibe al estrógeno y al disociarse de él se transforma en una partícula protéica más pequeña para viajar al núcleo e inducir síntesis de ARNm específico, así como una tasa elevada de síntesis de nueva proteína. Posteriormente se promueve la síntesis de ADN (4,5).

Los conocimientos actuales sobre la función de los estrógenos, nos permiten aplicarlos en diferentes situaciones, citando algunos ejemplos: anticoncepción, control de cuadros clínicos como menopausia, dismenorreas, disgenesia óvarica, acné y control de neoplasias hormonodependientes.

ANDROGENOS.

Hacia 1770 se incursionó en el campo de los compuestos con actividad estimuladora de los caracteres sexuales masculinos. Un reporte preliminar habla de los efectos debidos a la administración de un extracto testicular en la prevención de la castración en gallos. Lo anterior, aunado a la consideración de entonces de que los signos y síntomas de la senilidad en el hombre se debían a insuficiencia testicular, impulsaron la inquietud de resolver estas cuestiones, por lo que fue necesario diseñar modelos más adecuados (13,14).

Los andrógenos son el sustrato químico responsable de la diferenciación biológica del niño y su transformación en adolescente, hasta completar las características de la madurez sexual biológica. Estos cambios obedecen a un rearrreglo funcional hipofisiario-gonadal que comienza en la infancia con un fenómeno de escape de la inhibición que la secreción de andrógenos testiculares y suprarrenales ejercen sobre el hipotálamo. Aún cuando persisten las concentraciones sanguíneas de andrógenos, la hipófisis produce LH y hormona foliculo estimulante (FSH) para el desarrollo de características sexuales secundarias y estimulación de mayor producción de testosterona, sustrato químico al que se le atribuye la propiedad de inducir en forma directa: crecimiento testicular y peneano, aumento de la masa muscular, movilización característica de la grasa subcutánea y de manera indirecta estimulan el crecimiento a todos niveles en el organismo.

ASPECTOS BIOQUIMICOS.

Los andrógenos, progestinas y estrógenos, son compuestos químicos derivados del colesterol, el cual se sintetiza en hígado,

suprarrenales, piel, testículo y aorta. El sitio de síntesis es el citosol y fracción lisosomal (retículo endoplásmico liso). La síntesis de colesterol alcanza la cifra de 1 gr al día; pero puede disminuir hasta el 30% de la producción total, dependiendo del aporte en la dieta.

Los átomos de carbono que forman el colesterol, provienen de la acetil-Coenzima-A, que a su vez es producto de las vías oxidativas de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos cetogénicos. Una vez producida la acetil-Coenzima-A, puede seguir dos vías: una biosintética (síntesis de ácidos grasos, cuerpos cetónicos o colesterol) y otra oxidativa (ciclo de Krebs, para obtención de energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa).

Respecto al colesterol, la edad y el tipo de alimentación determinan la magnitud de síntesis del núcleo esteroide. Por otro lado, el colesterol tiene diversas funciones en el organismo, lo cual es evidente cuando se analiza la tasa de recambio en las etapas de crecimiento y desarrollo.

La colesterogénesis es la vía metabólica que parte del metabolito denominado β -hidroxi- β -metil-glutaril-Co-A. Su transformación en mevalonato, por una reacción de oxidorreducción dependiente de poder reductor ($\text{NADPH}+\text{H}^+$), es el paso regulador de la vía, a través de un mecanismo poco estudiado, donde participa el colesterol. El mevalonato se activa mediante fosforilación, a lo que sigue un paso de descarboxilación para dar un compuesto isoprenoide denominado isopentenil-pirofosfato (IPPP), base estructural de diversos compuestos terpenicos (vitamina A, ubiquinona, colesterol, dolicol y otros compuestos de origen vegetal). Por un rearrreglo

molecular de un IPPP se forma el dimetilalil-pirofosfato (DAPP), el cual se une a un IPPP para dar un compuesto de diez átomos de carbono (C-10) que se denomina genéricamente como monoterpeno: geranylpirofosfato (GPP), el cual se une a otro IPPP para formar el sesquiterpeno farnesilpirofosfato (FPP). Dos moléculas de FPP se condensan y forman un triterpeno lineal: el escualeno, que se hidroxila, desmetila y cicliza para dar el producto final de la vía: el colesterol, con 27 átomos de carbono. Una vez formado sale de la célula y es exportado a otros tejidos en forma de ésteres de colesterilo, así como en forma libre que viaja en moléculas proteicas complejas llamadas lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL). El destino metabólico ulterior del colesterol, dependerá del tejido al cual llegue y así, se tendrán: sales biliares, hormonas sexuales y corticosuprarrenales, además de su participación en la conformación de la membrana de células y orgánulos celulares. Véase la figura 1 en donde se esquematiza el metabolismo de las hormonas sexuales esteroidales.

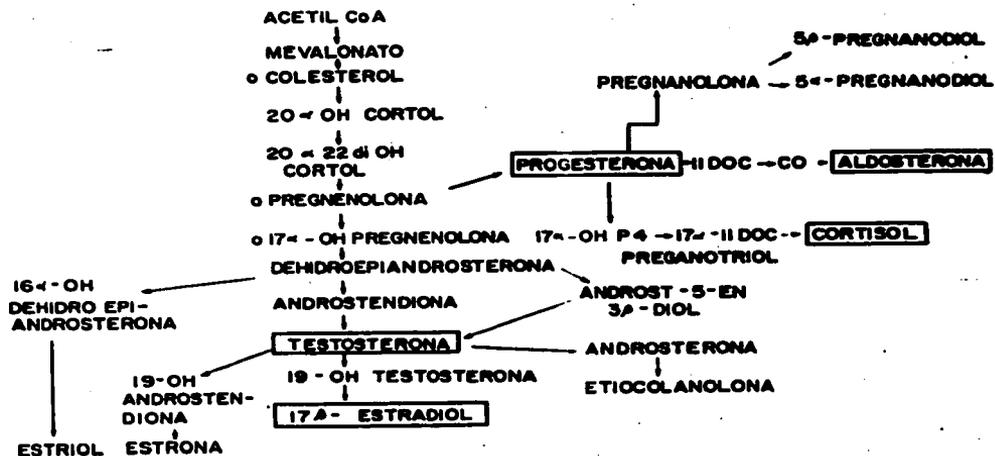


Figura 1. Derivados metabólicos esteroideos. Los circulos claros señalan los compuestos que pueden estar sulfatados; P $_4$, progesterona; CORTOL: colesterol; OH: grupo hidroxilo; DOC: desoxicorticosterona; CO: corticosterona. Modificado de: Kilshaw D. "Esteroides: Principios y técnicas". Ed. El Manual Moderno. 1975. México.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

Las progestinas sintéticas están sujetas a transformación química a nivel de los tejidos. Esta transformación puede generar derivados con diferentes propiedades: mayor efecto terapéutico, disminución del efecto terapéutico, alterar funciones celulares y tisulares. Por ello, es necesario indagar las rutas posibles de transformación farmacológica (farmacodinamia) de los anticonceptivos hormonales esteroideos. Por otro lado, es necesario indicar los métodos actuales de estudio que permiten conocer éstos aspectos. A continuación se describen estos dos apartados: la farmacodinamia en su estado actual y los métodos que se emplean para el estudio de los derivados metabólicos de las progestinas. Véase la figura 2, para ubicar los cambios químicos que se describen.

ASPECTOS FARMACODINAMICOS.

a) Acetato de medroxiprogesterona (MPA).

Al igual que el acetato de megestrol, la MPA ha sido estudiada intensamente en diversos modelos experimentales. La MPA tiene la desventaja de degradarse si se administra por vía oral, lo cual no sucede por vía parenteral, pero para fines de aplicación extensa, éstos fármacos representan ciertas ventajas, pues se obtiene un periodo considerablemente largo de efecto terapéutico (mínimo de tres meses, con una sola dosis de 150 mg). Sin embargo hay dudas respecto de la seguridad en el empleo de MPA, en base a los efectos colaterales hallados en algunos de esos modelos. Así, el uso indiscriminado por las usuarias se intenta suprimir al emplear otros

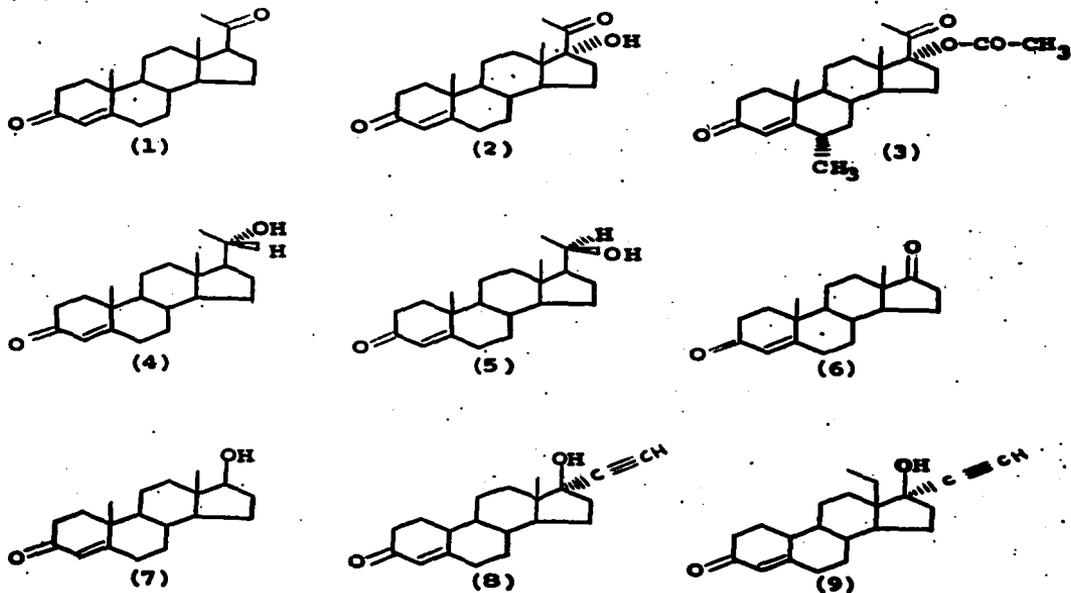


Figura 2. Fórmulas químicas de compuestos Δ -4-3-ceto analizados en este trabajo.

- (1) Progesterona
- (2) 17 α -hidroxiprogesterona
- (3) acetato de medroxiprogesterona (MPA)
- (4) 20 α -hidroxiprogesterona
- (5) 20 β -hidroxiprogesterona
- (6) androstendiona
- (7) testosterona
- (8) 17 α -etnil-19-nor-testosterona (NET)
- (9) levonorgestrel (LNG)

compuestos con menor riesgo, sin embargo su uso ocasional resulta cómodo y útil si se concreta su uso a una o dos aplicaciones como máximo.

El estado actual de conocimientos en cuanto a efectos colaterales bien estudiados es el siguiente: inducen un aumento de peso, alteraciones dérmicas, hipoplasia ductal en mamas, hiperplasia endometrial, diversos cambios bioquímicos en glándula mamaria y útero (en sabuesas) (18). Sin embargo se debe mencionar la gran utilidad que ha ofrecido en ciertos tipos de neoplasias hormonodependientes como el adenocarcinoma endometrial y en el cáncer de mama, en los cuales la respuesta es bastante satisfactoria, ya que un número bastante importante de pacientes, tiene un excelente pronóstico para la vida, una vez que se ha detectado en etapas iniciales de la enfermedad.

Se conoce más acerca de los derivados metabólicos en el caso del acetato de megestrol que en cuanto a MPA; por ello, el emplear muestras de plasma de usuarias sin control médico que acuden a consulta, puede servir para desarrollar un método capaz de separar los posibles derivados de MPA y su estudio farmacológico ulterior.

b) Noretindrona (NET).

Durante más de veinticinco años, el compuesto sintético NET ha sido empleado ampliamente para fines anticonceptivos. La utilidad de su empleo ha sido bien demostrada y ha servido para conocer aspectos de la biotransformación de este tipo de compuestos.

Los cambios químicos de NET ocurren principalmente en el anillo A del núcleo esteroide y consisten en hidrogenaciones. Particularmente el grupo Δ -4-3-ceto, se reduce, formándose un grupo hidroxilo en el carbono 3 (C-3) y saturándose el doble enlace entre

C-4 y C-5. Los productos resultantes son cuatro: 1) 3 α -OH,5 α -H (o simplemente 3 α -5 α), 2) 3 α -OH,5 β -H (o 3 α -5 β), 3) 3 β -OH,5 α -H (o 3 β -5 α) y 4) 3 β -OH, 5 β -H (o 3 β -5 β). Todos ellos como conjugados con glucurónido en orina, siendo el más abundante el "3 α -5 β " (25-28%) (15); pero el compuesto con mayor actividad farmacológica es el derivado "3 β -5 α ". La cadena lateral etinil-C17 sufre poco cambio, pero impide la aromatización del anillo A y en consecuencia la transformación a estrógeno se ve impedida (derivados de estradiol a partir de progestinas) (15).

c) Levonorgestrel (LNG).

La diferencia entre NET y LNG radica en el metilo de la posición C-18 en el caso de LNG y ausente en NET, por lo que podría esperarse que tuviesen un destino metabólico similar. Sin embargo, el LNG es principalmente hidroxilado (OH) en C-1, C-6 y C-16. En C-3 la reducción es más lenta. Así, se tienen como principales derivados: 1) 16 α -OH, 2) 16 β -OH, 3) 1 β -OH, 4) 2 α -OH, 5) 6 α -OH y 6) 6 β -OH. A nivel del anillo A se tienen: 1) 3 α -OH,5 β -H, 2) 3 β -OH,5 β -H y derivados en 16-OH. Los derivados más abundantes son los 16-OH y el 3 α -5 β (16). Las transformaciones encontradas se explican en el hecho de que el etilo de C-13 impide o retrasa las reducciones del anillo A y tiende a favorecer las hidroxilaciones, en el resto de la molécula. Los resultados se extrapolan con la duración del efecto en forma comparativa entre NET y LNG, encontrándose que a dosis similares el LNG tiene mayor duración y permite por lo tanto el empleo de microdosis (17).

MÉTODOS DE CUANTIFICACION DE PROGESTINAS.

La forma actual de identificar un compuesto en

particular se basa en las propiedades fisicoquímicas de su estructura, la cual podemos estudiar valiéndonos de métodos instrumentales de análisis químico. Los métodos desarrollados entre 1937 y 1954 son: espectroscopia ultravioleta (UV), espectroscopia infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN). Las dos primeras, con química elemental y cromatografía, permitieron cuantificar y caracterizar diversos tipos de compuestos. Sin embargo, no es sino hasta la década de los 50's en que un método abrió enormes horizontes: el radioinmunoanálisis (20,21,22). Haciendo uso de los mecanismos específicos de la reacción entre antígeno y anticuerpo, se logró detectar y cuantificar radioisótopos ligados a un anticuerpo, obteniéndose una sensibilidad del orden de pg de compuesto, además de una gran precisión. La cromatografía de líquidos de alta resolución viene a constituir un método perfeccionado de la cromatografía en columna de fase normal (polar) estacionaria, ya que tiene una mayor sensibilidad (en micro y nanogramos).

Si bien el RIA ofrece muchas ventajas, el HPLC tiene muchas posibilidades, aún en escala diferente del RIA, ya que no se necesita apuntar hacia alguna dirección en particular sino que en una misma muestra se pueden buscar sustancias derivadas o relacionadas con los compuestos en estudio. Además, se tiene un perfil químico casi completo de cada muestra, a diferencia del RIA, que puede interpretarse como una búsqueda extremadamente particular y fina, que posee un alto grado de especificidad; pero restringido a un solo compuesto. Por ello, el enfoque aplicativo de ambas metodologías es evidentemente diferente. El RIA ayuda a cuantificar un compuesto, pero en farmacodinamia es imposible pensar en preparar un anticuerpo

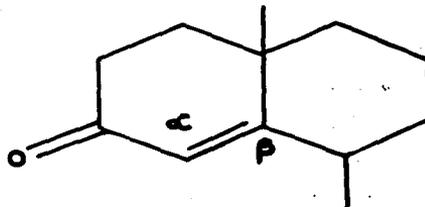
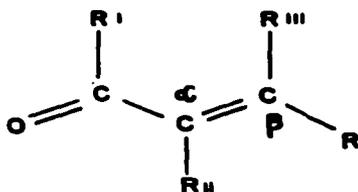
dirigido contra un compuesto desconocido. Es aquí en donde un método confiable de separación e identificación puede sentar las bases del estudio del metabolismo de una progestina sintética.

La química analítica maneja hoy en día un método extraordinario que permite identificar un compuesto y dar incluso su peso molecular exacto. Se basa en ciertos patrones de fragmentación producidos al bombardear con electrones emanados de un filamento de tungsteno con alto voltaje, muestras aplicadas al vacío para permitir su aceleración y someterlos a un campo electromagnético para diferenciar partículas positivas/negativas y partículas ligeras/pesadas. Se denomina espectrometría de masas y puede servir para complementar estudios después de emplear separaciones cromatográficas e identificar finalmente los compuestos posibles (19,23,24,25).

CAPITULO 3. HIPOTESIS.

Tres progestinas sintéticas se estudian en el presente trabajo: MPA, NET y LNG. Pertenecen desde el punto de vista químico a la familia de la progesterona, la cual posee un grupo cromóforo denominado "ceto- α - β -insaturado" o " Δ^4 -3-ceto" o " Δ^4 -3-oxo", en el anillo A del núcleo esteroide.

La progesterona constituye el prototipo en química orgánica para la obtención de análogos que posean mayor potencia progestacional, siendo el sustrato común en ellos el grupo enunciado arriba y esquematizado en la figura siguiente:



En base a los sustituyentes en el resto de la estructura, las progestinas se clasifican en dos subgrupos: las derivadas de la 17-hidroxiprogesteroona y las derivadas de la 19nor-testosterona (Tabla 1).

T a b l a 1
CLASIFICACION DE LAS PROGESTINAS

GRUPO	NOMBRE
17 α -HIDROXI- PROGESTERONA	Acetato de Medroxiprogesterona (MPA)
	Acetato de Megestrol
	Acetofénido de Dihidroprogesterona
	Acetato de Clormadinona

19-nor-TESTOS- TERONA	Noretindrona (NET)
	Acetato de noretindrona
	Linestrol
	Levonorgestrel (LNG)

Se muestran algunos compuestos representativos. Los paréntesis indican las progestinas en estudio (26).

Los compuestos correspondientes (ver apéndice 1), pueden estudiarse mediante un método basado en la propiedad fisicoquímica del grupo cromóforo que poseen todos ellos, al absorber luz ultravioleta en 230-240 nm de longitud de onda. El coeficiente de extinción molar esperado es del orden de 1.4×10^6 , para una longitud de onda de 240 nm, según las reglas de Woodward-Fieser para grupos carbonilos conjugados (27).

Todo lo anterior hace suponer que pueden detectarse cantidades de compuesto en el orden de nano o pico gramos, si se toman en consideración las condiciones del microensayo para HPLC: celda de 20 μ L, sensibilidad de 0.01 unidades de absorbancia, columna de octadecilsilano con partículas de 5 μ m, además de la versatilidad en el manejo de diversos sistemas de elución (solventes con diferente polaridad) y la posibilidad de efectuar gradientes de polaridad. Deben determinarse: sensibilidad del método así como seleccionar el tratamiento previo de las muestras de usuarias de progestinas. La posibilidad de transformación del compuesto inmediatamente a su administración puede o no alterar la determinación, ya que el método

descrito es de utilidad mientras el grupo cromóforo se mantenga en la molécula, aún cuando sufra cambios en cualesquiera de los carbonos restantes.

CAPITULO 4.

OBJETIVOS.

1.- Desarrollar una metodología que permita cuantificar progestinas sintéticas y aplicarla en el estudio de plasmas de usuarias de alguno de estos compuestos. Para ello, se determinará la especificidad, sensibilidad, precisión y reproducibilidad de la cromatografía de líquidos de alta resolución.

2.- Evaluación de la metodología para efectuar microanálisis rápidos con el fin de proporcionar una herramienta en estudios preliminares o definitivos en la farmacología de las progestinas.

CAPITULO 5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.

ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (MPA).

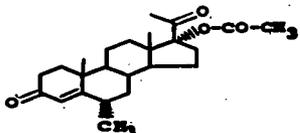


Figura 3. Acetato de Medroxiprogesterona. 17 α -acetoxi-6 α -metil progesterona.

a) Material.

Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) (Upjohn de México); 6 α -metil-, 17 α -acetoxi-, 4-pregnen-3, 20-diona (1, 2-H³ (ND)), actividad específica 50-60 Ci/mmol (New England Nuclear); éter dietílico, acetato de etilo, metanol, diclorometano, placas de sílica gel de 20 x 20 x 0.02 cm (Merck de México), tolueno, benceno y hexano (Baker de México); Sephadex LH-20 (Sigma Chem Co.); testosterona, androstendiona, 20 α y 20 β - dihidroprogesterona, acetato de ciproterona, estrona (Sigma Chem Co.); cartuchos Sep-pack C-18, columnas para HPLC μ Bondapack C-18 y Novapack C-18 y material de empaque para precolumna (Waters Assoc.).

El agua empleada en los sistemas de separación por HPLC fué purificada mediante un equipo Milli-Q (Waters Assoc.), se desgasificó y ultrafiltró (0.4 μ m) antes de ser utilizada.

b) Instrumentos.

Cromatógrafo de gradiente líquido modelo 420 (Beckman

Inst.), acoplado a un detector Varian UV-50, de longitud de onda variable, con celda de 20 μ L. Registrador de eventos Kipp-Zonen BD-41 con escala total de 1 mV; espectrofotómetro Aminco DW-2a (Aminco Inst.); contador de centelleo líquido modelo 3255 (Packard).

c) Métodos.

c.1. Caracterización de MPA y compuestos ceto α - β insaturados.

c.1.1. Espectrofotometría ultravioleta. Los compuestos con grupo ceto α - β insaturado absorben luz ultravioleta a 230 nm. Varios compuestos con dicho grupo, fueron estudiados de la manera siguiente: se disolvió 1 mg de cada uno de ellos en 25 mL de metanol y en metanol/agua 70/30. Un mL de cada solución fue empleado en el ensayo espectrofotométrico empleando una celda de cuarzo y efectuando un barrido desde 200 a 300 nm, con el fin de determinar tanto el máximo de absorción (λ) como el coeficiente de extinción molar (ϵ). Se compararon los dos sistemas de solventes mencionados.

c.1.2. Cromatografía en gel de sílice. La cromatografía en capa fina se desarrolló en placas de sílice con espesor de 0.02 cm. El MPA así como MPA-H³ y otros esteroides, se estudiaron de la manera siguiente: se tomaron de 200 a 300 μ g de cada uno de ellos y se eluyó la placa con hexano/acetato de etilo 80/40 y 80/20, por separado. La forma de revelarlos e identificarlos consistió en I₂ (sublimado) o H₂SO₄ al 10%. Este estudio persigue determinar la pureza de los compuestos empleados en el estudio completo. La marca radiactiva en MPA sirvió para evaluar el método en base al porcentaje de recuperación de la marca como MPA.

c.1.3. Cromatografía en Sephadex LH-20. Se empleó una

columna de vidrio empacada con Sephadex LH-20 (1.2 x 23 cm). Se estudiaron los compuestos del apartado anterior. Finalmente se eligió como procedimiento para la separación de los lípidos del plasma humano, posterior a la extracción con éter, como se describe más adelante. El sistema cromatográfico en columna empleado es a base de tolueno/metanol como eluyente en proporción 85/15 (v/v). Se colectaron 40 fracciones de 1 mL cada una. Se emplearon también como fases estacionarias: alúmina, florisil y sílice, con diferentes solventes y condiciones; pero no ofrecieron ventajas sobre el método descrito.

c.1.4. Diseño del ensayo HPLC. Se estudiaron simultáneamente varios compuestos: MPA, LNG, NET, 20 α - y 20 β -dihidro progesterona, testosterona, androstendiona, 17 α -hidroxiprogesterona. Se prepararon soluciones de ellos en concentración de 1 μ g/mL. Se aplicaron a la válvula de inyección del cromatógrafo 10 μ L (ca. 10 ng) de cada uno de ellos por separado. También se preparó una solución de todos ellos. Las condiciones desarrolladas fueron:

- * columna Novapack C-18 (partículas de octadecilsilano de 5 μ m de diámetro, dimensiones de la columna 0.39 mm de diámetro x 15 cm de largo).
- * sistema de elución a base de metanol/agua 70/30 (v/v).
- * flujo de solvente 1 mL/min.
- * velocidad de registro de eventos 1 cm/min.
- * sensibilidad del detector 0.01 unidades en la escala de absorbancia.
- * longitud de onda 247 nm (en base a los datos de espectrofotometría en UV).
- * volumen de muestra variable entre 5 y 20 μ L.

El sistema descrito se conoce como isocrático de solventes premezclados, ya que no es necesario emplear gradientes de polaridad a lo largo de la etapa de separación.

c.2. Extracción de lípidos del plasma humano.

c.2.1. Extracción directa con éter. El plasma humano se obtuvo de dos fuentes: venopunción antecubital y centrifugación de muestra heparinizada, así como plasma proveniente del banco de sangre. En ambos casos el plasma fue almacenado a 5°C, hasta el momento de su empleo. El procedimiento general de la extracción fue el siguiente: se empleó éter:plasma en proporción 20:1 (v/v), se procedió a la agitación en vortex por 3 min, al final de los cuales se sedimentó la fase acuosa, para posteriormente congelar con hielo-seco/acetona y decantar la fase orgánica. Todo el proceso se repitió en dos ocasiones y el éter se colectó en un tubo de ensayo. Después se evaporó el éter a 35°C con flujo de nitrógeno, para concentrar el extracto de cada una de las muestras. Por otra parte, la extracción etérea se estudió en función del tiempo de agitación en vortex (1, 2 y 3 min), también en función del número de extracciones y de la proporción de éter/plasma. El método que dió mejores resultados fue el siguiente: a) proporción éter/plasma 10:1, b) 1 min de agitación y c) una sola extracción. Con ello se obtiene más del 85% de recuperación, en base MPA-H²(figura 4).

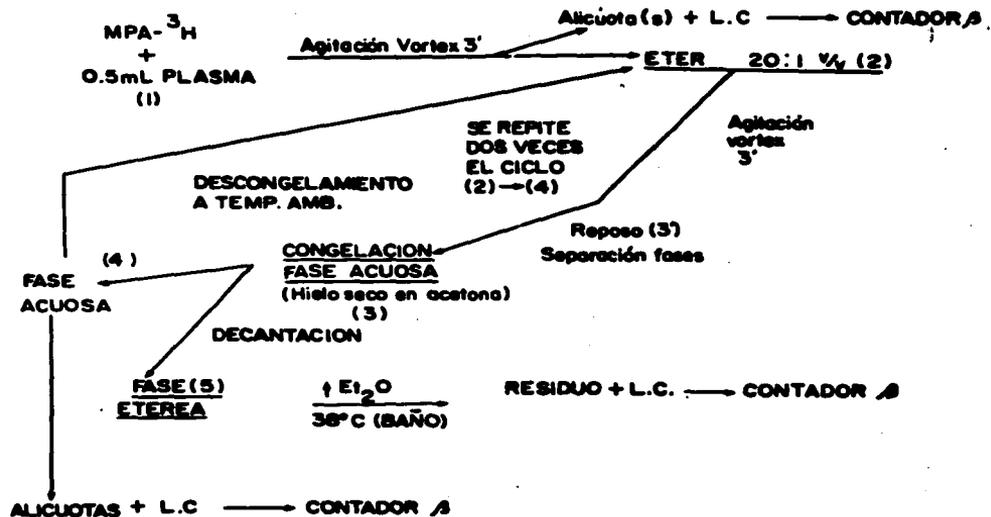


Figura 4. Procedimiento de extracción de MPA-H³ del plasma. Los números entre paréntesis indican el orden del proceso. LC: líquido de centelleo.

c.2.2. Extracción con Sep-pack C-18. Este método consiste en hacer pasar una muestra biológica a través de una pequeña columna (1.0 x 1.3 cm) empacada con octadecilsilano, siguiendo el sistema de cromatografía de partición directa. El método que inicialmente se empleó fue el recomendado por el fabricante: a) lavado del cartucho, b) aplicación de la muestra, c) lavado con 5 mL de agua, d) 10 mL de agua/metanol 40/60 y e) metanol 100% de 10 a 20 mL. En nuestro laboratorio se desarrollaron otros sistemas y compararon los porcentajes de recuperación de MPA-H³ adicionada a plasmas control.

c.3. Cuantificación de MPA en plasma.

c.3.1. Perfil en HPLC del extracto lipídico del plasma.

Las muestras para estudio se sometieron al método descrito en el inciso c.1.4. Se procedió a comparar los patrones cromatográficos de los métodos de extracción lipídica y de muestra total (sin extracción), con el objeto de seleccionar adecuadamente: a) tipo de extracción de lípidos del plasma, b) separación parcial de los componentes de naturaleza lipídica y c) condiciones de cromatografía en HPLC. Se procedió a preparar plasmas estándar conteniendo cantidades conocidas de MPA con el fin de evaluación integral del método desde la extracción hasta la cuantificación (ver figura 5).

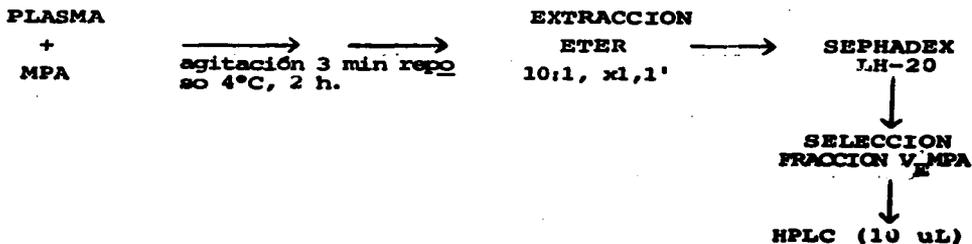


Figura 5. Procedimiento de cuantificación de MPA en plasmas estándar.

c.3.2. Curva estándar. Seleccionadas las condiciones cromatográficas del apartado anterior, se procedió a precisar una relación directa entre cantidad conocida de MPA y la altura del pico correspondiente en el cromatograma, o bien, la relación con el área bajo la curva. Un rango de 1 a 12 ng de MPA en cinco intervalos de concentración y volúmenes entre 5 y 20 μ L de cada concentración se inyectaron al cromatógrafo. Cada concentración se aplicó por

decuplicado.

NORETINDRONA <NET>

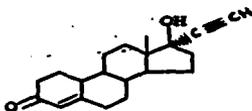


Figura 6. Noretindrona. 17 α -etinil, 17 β -hidroxi, 19-nor-4-estren-3-ona (39).

a) Material.

19nor-17 α -etinil-testosterona (Sigma Chem. Co); NET-H³ (1,2(N)), actividad específica 50 a 60 Ci/mmol (New England Nuclear). Resto de material, el descrito en la sección de Material para MPA.

b) Instrumentos. ver misma sección para MPA.

c) Métodos. Los descritos en MPA.

c.3.1. Perfil lipídico de plasma humano y NET. Los plasmas control se prepararon después de la extracción lipídica y purificación por Sephadex, adicionando cantidades conocidas de NET a las soluciones aplicadas al cromatógrafo (figura 7).

c.3.2. Curva estándar. Seleccionadas las condiciones se procedió a precisar una relación directa entre cantidad conocida de NET y la altura del pico correspondiente en el cromatograma, o bien, la relación con el área bajo la curva. Un rango de 0.3 a 9.3 ng de NET en nueve intervalos de concentración y volúmenes entre 10 y 15 μ L de cada concentración se inyectaron al cromatógrafo. Cada concentración se aplicó por decuplicado.

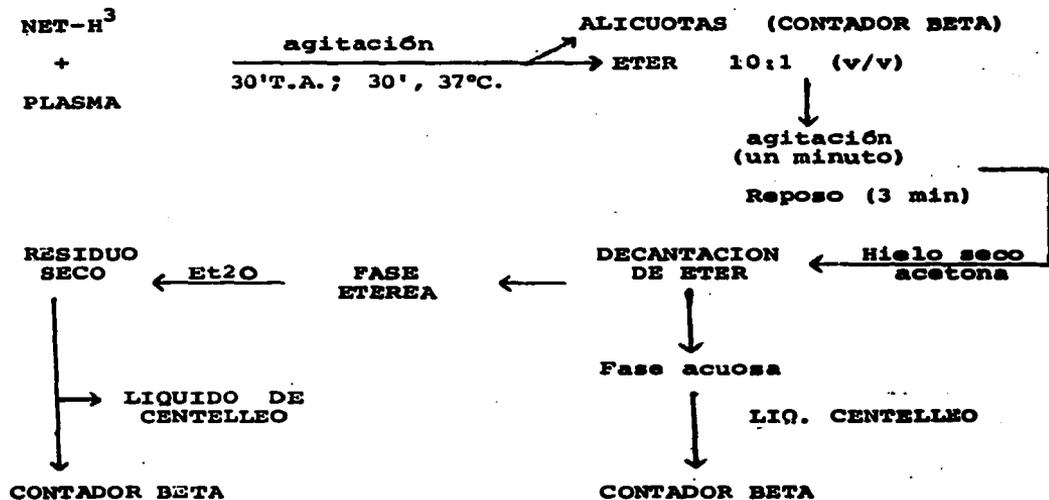


Figura 7. Procedimiento de extracción de NET-H³ del plasma.

LEVONORGESTREL (LNG).

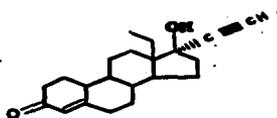


Figura 8. Norgestrel.
13 β -etil-17 α -etinil-17 β -hidroxi-
gon-4-en-3-ona (-) (LNG).

a) Material.

17 α -etinil. 17 β -hidroxi, 19nor-4-estren-3-ona (LNG).

Resto de material, el descrito en la sección Métodos para MPA.

b) Instrumentos. Los descritos en MPA.

c) Métodos. Los descritos en MPA.

c.3.1. Perfil lipídico de plasma humano y LNG. Los plasmas control se prepararon después de la extracción lipídica y purificación por Sephadex, adicionando cantidades conocidas de LNG a las soluciones aplicadas al cromatógrafo.

c.3.2. Curva estándar. Seleccionadas las condiciones se procedió a precisar una relación directa entre cantidad conocida de LNG y la altura del pico correspondiente en el cromatograma, o bien, la relación con el área bajo la curva. Un rango de 1.3 a 15 ng de LNG en seis intervalos de concentración y volúmenes entre 2.5 y 15 μ L de cada concentración se inyectaron al cromatógrafo. Cada concentración se aplicó por decuplicado.

CAPITULO 6 RESULTADOS

Los resultados se muestran en el orden descrito para la descripción de los METODOS. Se describen simultáneamente MPA, NET y LNG para facilitar la presentación de los datos.

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE ALGUNOS COMPUESTOS CETO-ALFA BETA INSATURADOS.

1. ESPECTROFOTOMETRIA UV. Las figuras 9 y 10 muestran el espectro de absorción en ultravioleta. Los datos obtenidos se dan en la tabla 2. Obsérvese el corrimiento al rojo al aumentar la polaridad del solvente en el que se estudian (parte baja de la tabla 2).

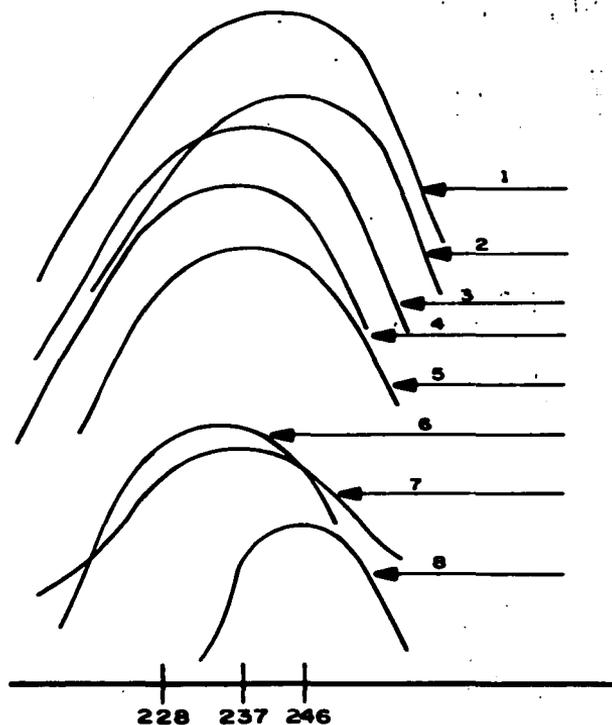


Figura 9. Espectrofotometria de absorción en UV de compuestos Δ^4 -3-ceto. Intervalo: 220-350 nm; solvente: metanol; escala de absorbancia 0-1; concentración: 1mg/25 mL.

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1) 20α -hidroxiprogesterona | 5) 20β -hidroxiprogesterona |
| 2) testosterona | 6) NET |
| 3) 17α -hidroxiprogesterona | 7) progesterona |
| 4) LNG | 8) MPA |

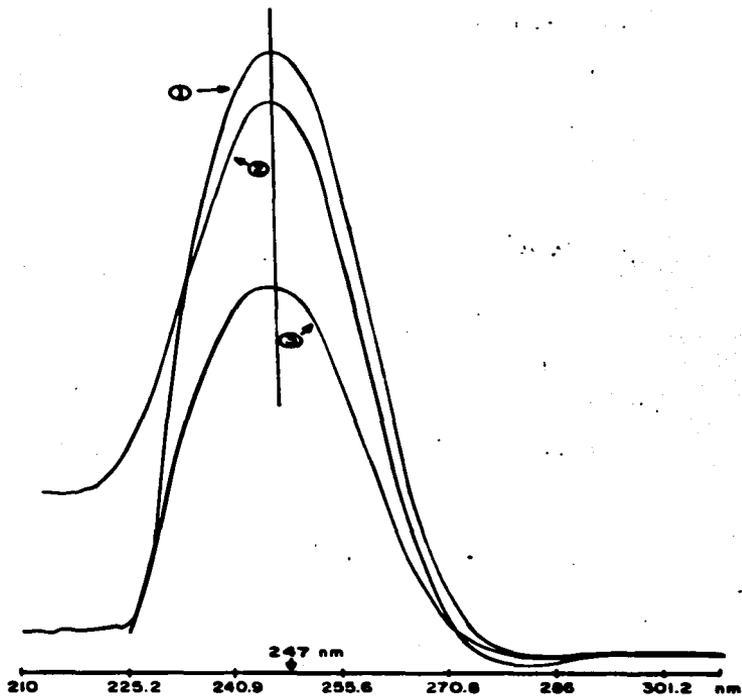


Figura 10. Espectrofotometría de absorción en UV.
 Intervalo: 200-300 nm; solvente: metanol/agua 70/30
 (v/v); escala de absorbancia: 0-2; concentración ca.
 1mg/25 mL.

1) LNG

2) NET

3) MPA

T a b l a 2
 ESPECTROFOTOMETRIA UV DE COMPUESTOS
 CETO α - β INSATURADOS

COMPUESTO	$\lambda_{MAX}(nm)$	ϵ (L · M ⁻¹ · cm ⁻¹)
TESTOSTERONA	242.98	11537.6
PROGESTERONA (P4)	242.11	14936.0
20 α -P4	243.15	20570.0
17 α -OH-P4	242.28	12061.4
20 β -P4	243.4	25792.0
MPA	233.0	-----
NET	241.33	13577.7
LNG	241.68	10466.7
-----	-----	-----
MPA *	246.7	13535.0
NET *	246.2	-----
LNG *	246.5	-----

Espectrofotómetro Aminco DW-2a. Intervalo: 220-350 nm.
 Solvente: metanol. Escala de absorbancia 0-2.
 *Solvente: metanol/agua 70/30 (v/v). Las líneas
 discontinuas corresponden a datos no calculados.

2. CROMATOGRAFIA EN GEL DE SILICE.

3. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX LH-20.

Se muestran en la tabla 3 los datos correspondientes a los dos incisos. La figura 11 muestra una gráfica de la elución de NET-H³. La zona sombreada corresponde al volumen considerado como fracción que contiene, por datos cromatográficos, las tres progestinas de interés.

T a b l a 3

CARACTERIZACION CROMATOGRAFICA DE ALGUNOS
COMPUESTOS ESTEROIDES

NOMBRE	R _f		V _e (c) mL
	(A)	(B)	
MPA	0.19	0.29	11-14
NET	0.18	0.29	11-14
LNG	0.23	0.43	11-14
Colesterol	0.49	----	----
Estradiol	0.21	----	----
Progesterona	0.25	----	----

Cromatografía en capa fina. Placas de 5 x 20 x 0.02 cm; eluyente: hexano/acetato de etilo, (A) 80/20 (v/v) y (B) 60/40 (v/v). (c) volumen de elución en columna de Sephadex LH-20 con 7 gr de Sephadex. Eluyente: tolueno/metanol 85/15. Las líneas punteadas indican que no se determinaron los datos para dichos compuestos.

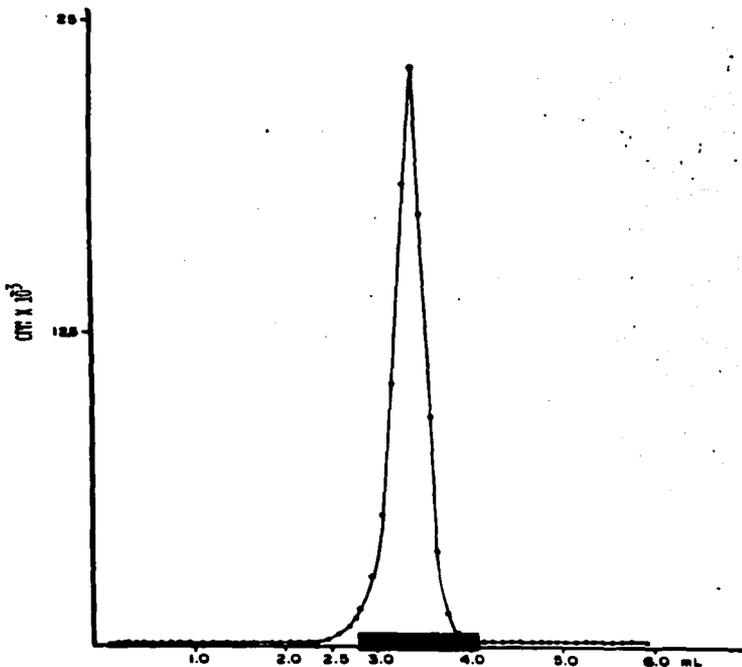


Figura 11. Cromatografía en Sephadex LH-20. Dimensiones: 0.6 x 14.4 cm (equivalente a 1g de Sephadex LH-20); solvente: tolueno/metanol 85/15 (v/v); fracciones: 0.1 mL; la zona sombreada equivale al 99% de NET-H⁺ aplicada; la columna empleada en todo el estudio fue de 1.2 x 25 cm (equivalente a 7g de Sephadex).

4. DISEÑO DEL ENSAYO EN HPLC.

Las figuras 12, 13, 14, 15 y 16 muestran los procedimientos efectuados para seleccionar el mejor sistema de elución. Los datos se condensan en la tabla 4 y representan las condiciones empleadas a lo largo del estudio por HPLC.

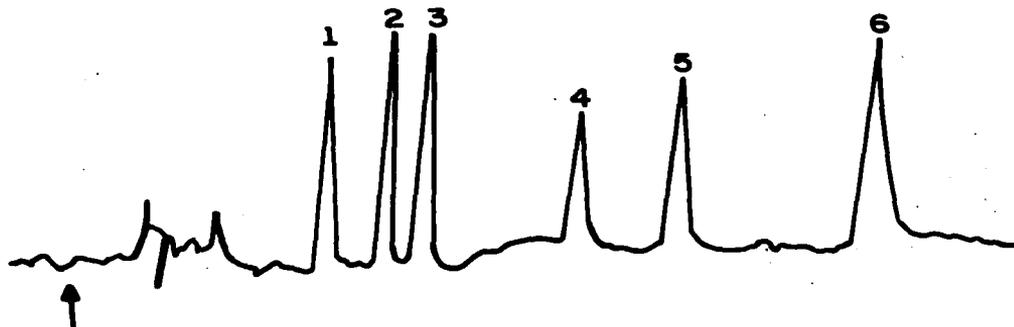


Figura 12. Cromatograma HPLC de compuestos Δ^4 -3-ceto. Columna: Novapack C18; solvente: metanol/agua 70/30; flujo 1 ml/min; longitud de onda: 247 nm; escala de absorbancia: 0-0.1; registro: 1cm/min; volumen de muestra: 10 μ L; concentración: 1mg/25 mL; muestras: 1) NET, 2) 17 α -hidroxiprogesterona, 3) LNG, 4) MPA, 5) 20 α -hidroxiprogesterona, 6) 20 β -hidroxiprogesterona.

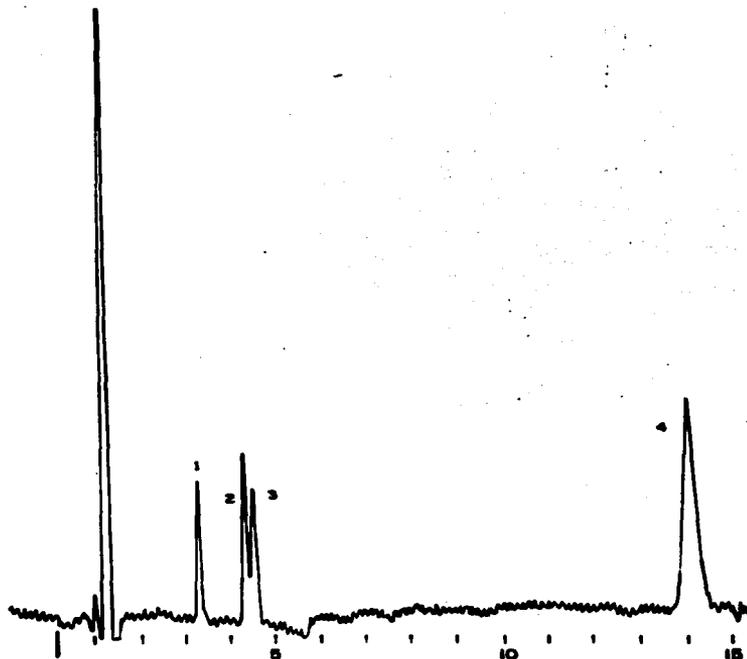


Figura 13. Cromatograma HPLC de Δ^4 -3-ceto naturales. A.
Columna: Novapack C-18; solvente: acetonitrilo/aqua
50/50 (v/v); flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 230 nm;
escala: 0-0.1; registro 1 cm/min; volumen: 10 μ L;
muestras: 1) estrona, 2) testosterona, 3) estradiol, 4)
progesterona.

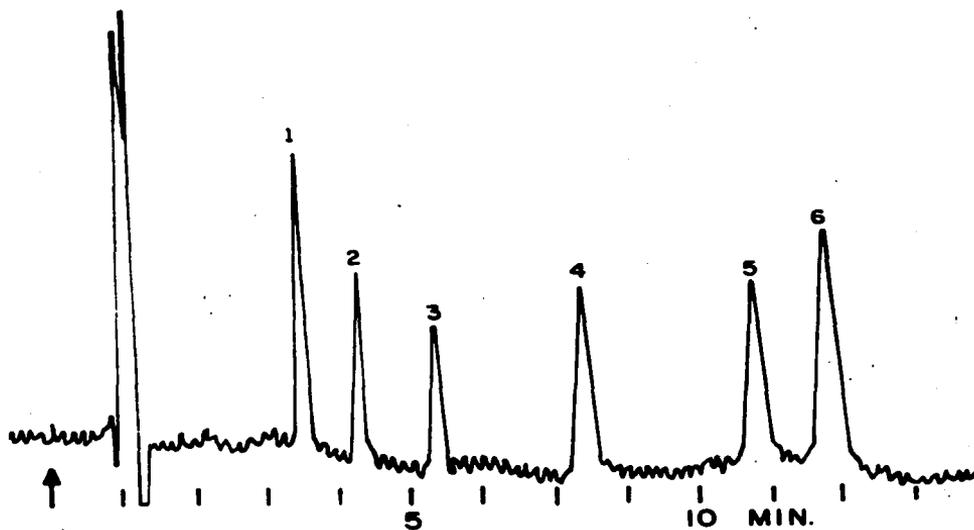


Figura 14. Cromatograma HPLC de Δ^4 -3-ceto naturales. B.
 Columna: Novapack C-18; solvente: acetonitrilo/agua
50/50 (v/v); flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 230 nm;
 escala: 0-0.1; registro 1 cm/min; volumen: 10 μ L;
 muestras: 1) NET, 2) 17 α -hidroxiprogesterona, 3) LNG,
 4) 20 α -dihidroprogesterona, 5) 20 β -dihidroprogesterona, 6) MPA.

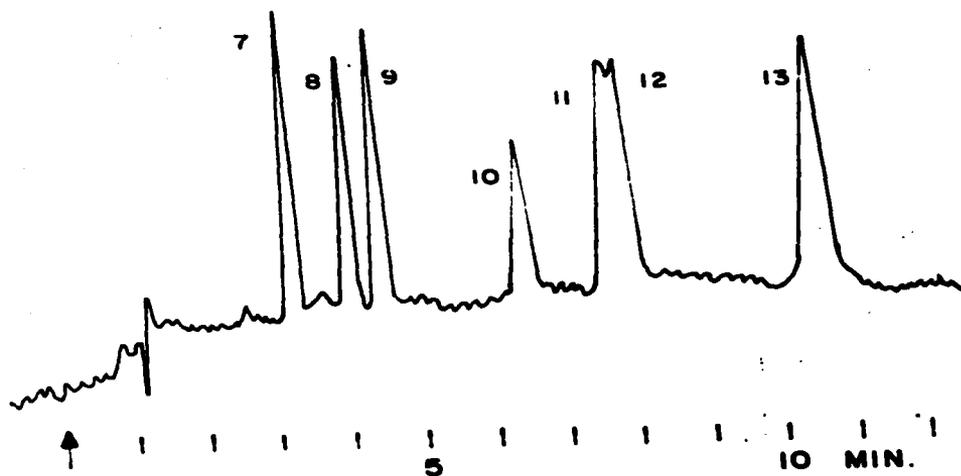


Figura 15. Cromatograma HPLC de Δ^4 -3-ceto. Columna: Novapack C-18; solvente: metanol/agua 85/15; flujo: 1ml/min; longitud de onda: 247 nm; escala: 0-0.1; registro: 1cm/min; volumen de muestra: 10 μ L; muestras: 7) NET, 8) 17α -hidroxiprogesterona, 9) LNG, 10) MPA, 11) 20α -dihidroprogesterona, 12) progesterona, 13) 20β -dihidroprogesterona.

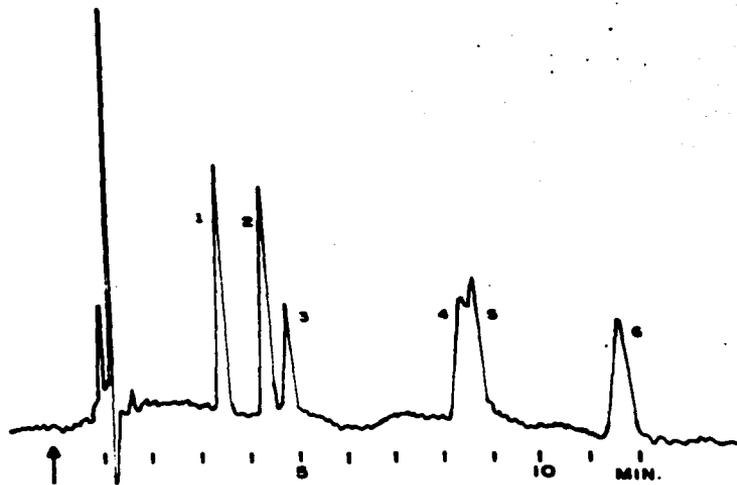


Figura 16. Cromatograma HPLC de Δ^4 -3-ceto. Columna: Novapack C18; solvente: metanol/agua 70/30; flujo 1 ml/min; longitud de onda: 247 nm; escala de absorbancia: 0-0.1; registro: 1cm/min; volumen de muestra: 10 μ L; muestras: 1) NET, 2) 17 α -hidroxi-progesterona, 3) LNG, 4) 20 α -dihidroprogesterona, 5) progesterona, 6) 20 β -dihidroprogesterona.

T a b l a 4

TIEMPOS DE RETENCION DE COMPUESTOS $\Delta 4$ -3CETO

NOMBRE	METANOL/AGUA		MeC≡N/AGUA 50/50
	70/30	85/15	
NET	3.2	3.3	3.5
17 α -HIDROXI PROGESTERONA	4.5	4.1	4.3
LNG	4.3	4.6	---
MPA	6.3	6.6	11.2
20 α -DI HIDROPROGESTERONA	8.5	7.8	7.3
PROGESTERONA	8.8	8.0	12.4
20 β -DI HIDROPROGESTERONA	11.85	10.7	9.7
ANDROSTENDIONA	---	---	4.5
TESTOSTERONA	---	---	3.7

MeC≡N: acetonitrilo. Los datos se dan en minutos. Para detalles ver apartado c.1.4.

EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA HUMANO.

1. EXTRACCION DIRECTA CON ETER.
2. EXTRACCION POR ADSORCION.

Las figuras 17 y 18 muestran las gráficas correspondientes a los extractos etéreo y por cartucho Sep-pack C-18, para MPA-H². La tabla 5 muestra los valores en forma comparativa de ambos sistemas de extracción. La tabla 6 resume las condiciones del procedimiento de extracción directa de NET-H² con éter en función de las variables: proporción éter:plasma, tiempo de agitación en vortex y número de extracciones por muestra.

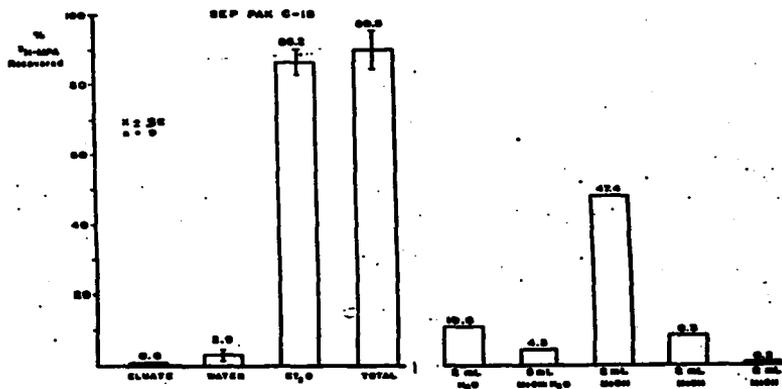


Figura 17. Extracción de NET-H³ con Sep-pack C-18. Se muestra el perfil comparativo entre la recomendación del fabricante y con éter como eluyente (partes izquierda y derecha de la gráfica, respectivamente).

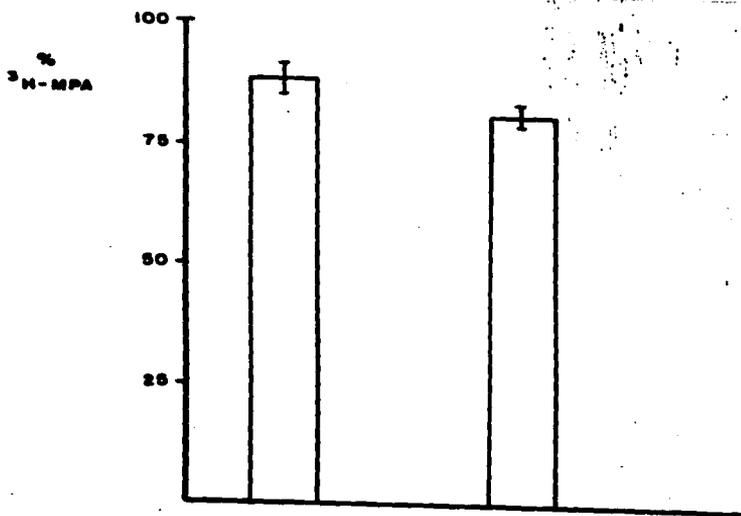


Figura 18. Extracción de MPA-H³ con Sep-pack C18. En porcentaje, promedio \pm D. S. La extracción directa se refiere a la descripción del apartado c.2.1.

T a b l a 5
EXTRACCION DE LIPIDOS DEL PLASMA

METODO	$\bar{x} \pm D. S.$
SEP-PACK C-18 (A)	91.6% \pm 11.6
ETER 10:1 (B)	83.9% \pm 10.1

(A) n = 7, (B) n = 8.

T a b l a 6
EFICIENCIA DEL EXTRACTO DIRECTO
DE NET-H²

Plasma	Extractos	% Recup
1 mL	1	100
2	1	83
3	2	106
4	2	96
5	2	96

La proporción éter:plasma fue 10:1.
Tiempo de agitación: 1 minuto.

CUANTIFICACION DE MPA, LNG Y NET EN PLASMA.

1. PERFIL LIPIDICO EN HPLC. La figura 19 corresponde al perfil en HPLC del extracto directo con éter.

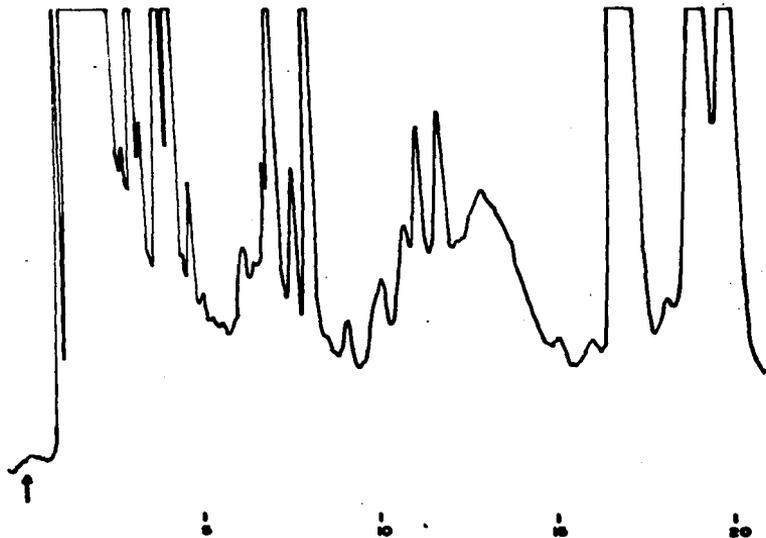


Figura 19. Lípidos del plasma por HPLC. Extracto directo con éter. Columna: μ Bondapack C-18 (30 x 0.39 m, partícula de 10 μ m); solvente: metanol/agua 70/30 (v/v); flujo: 1 cm/min; longitud de onda: 247 nm; escala absorbancia: 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: 20 μ L; muestra: plasma humano 0.5 mL extraído con éter 10:1, resuspendido a 1 mL.

La figura 20 muestra el perfil observado al efectuar la separación de la fase lipídica con cartucho Sep-pack C-18, empleando éter como eluyente y la figura 21, muestra el perfil obtenido mediante extracción directa con éter y separación en Sephadex LH-20.

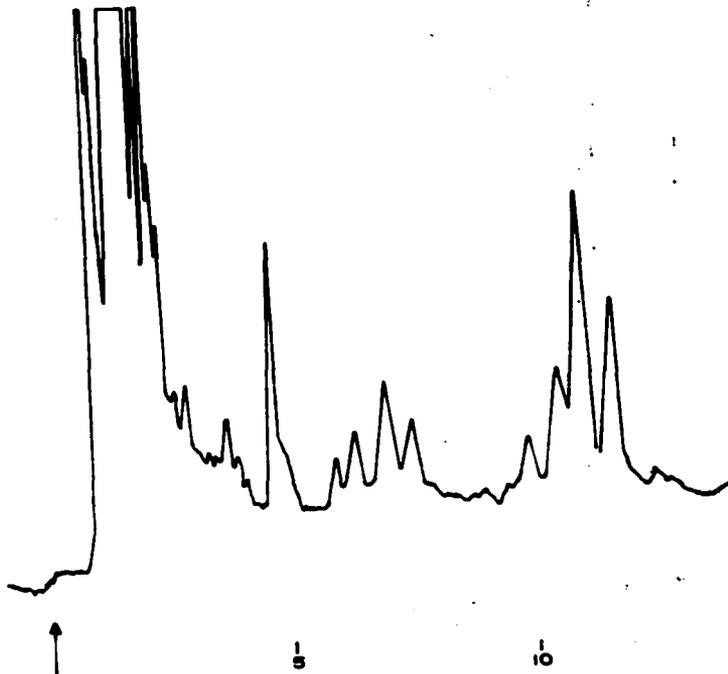


Figura 20. Lípidos del plasma por HPLC. Extracto en Sep-pack C-18. Columna: Novapack C-18; solvente: metanol/agua 70/30; flujo 1mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala: 0-0.1; registro 1 cm/min; volumen de muestra: 20 μ L; muestra: 0.8 mL de plasma eluidos en el cartucho y resuspendido al mismo volumen para su inyección al cromatógrafo.

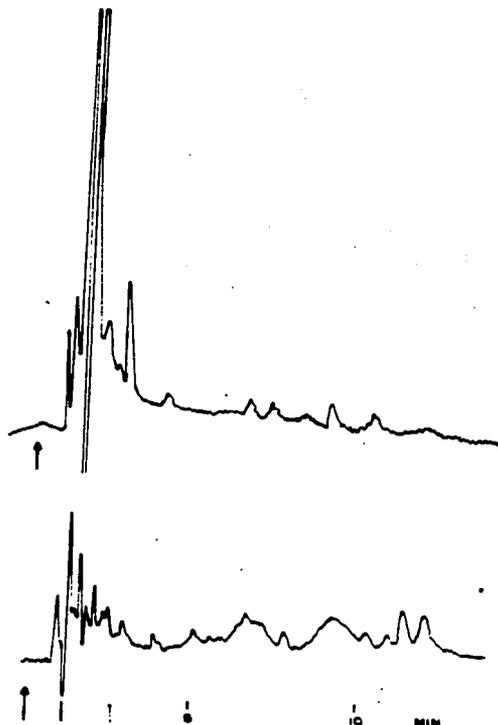


Figura 21. Lípidos del plasma por HPLC. Sephadex LH-20. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: 10 μ L; muestra: 1.0 mL de plasma extraído con éter y pasado por una columna de Sephadex LH-20; las fracciones correspondientes al volumen de elución (V_e) de las progestinas se colectaron, el solvente se evaporó y resuspendió la muestra a un volumen de 1 mL.

Las figuras 22, 23, 24 y 25, muestran los perfiles cromatográficos correspondientes a la adición de alguna de las tres progestinas y un perfil conteniendo a las tres en una sola muestra. Obsérvese el trazo en cada una de ellas y el sitio correspondiente de aparición en el gráfico de MPA, NET y LNG.

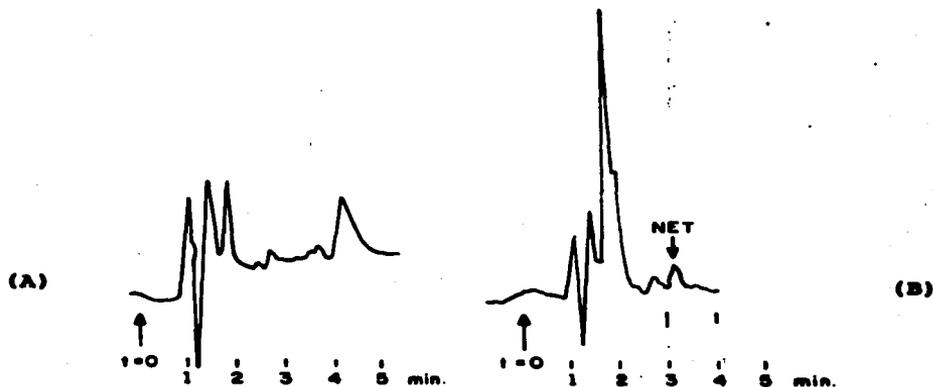


Figura 22. Identificación de NET en plasma por HPLC. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: 10 μ L; muestra: extracción directa con éter y separación en Sephadex LH-20 de 1 mL de plasma. A: plasma sin NET, B: plasma + NET (1 μ g/mL).

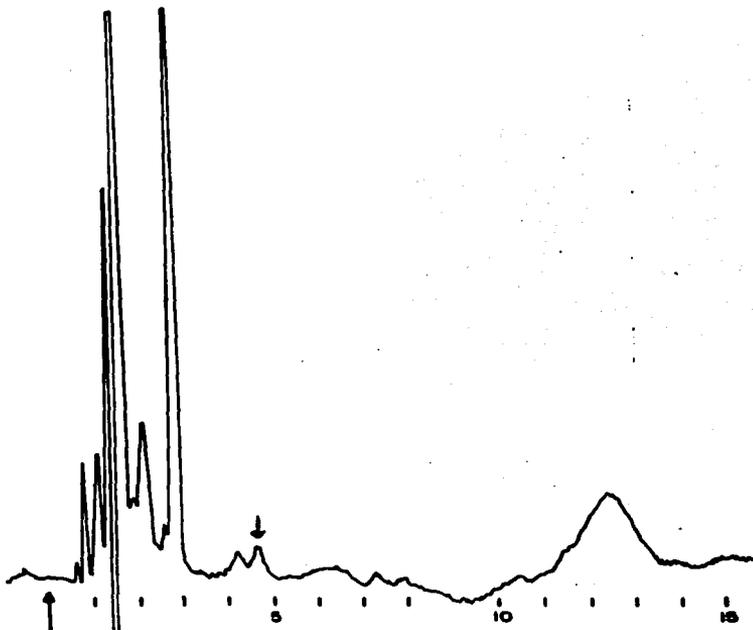
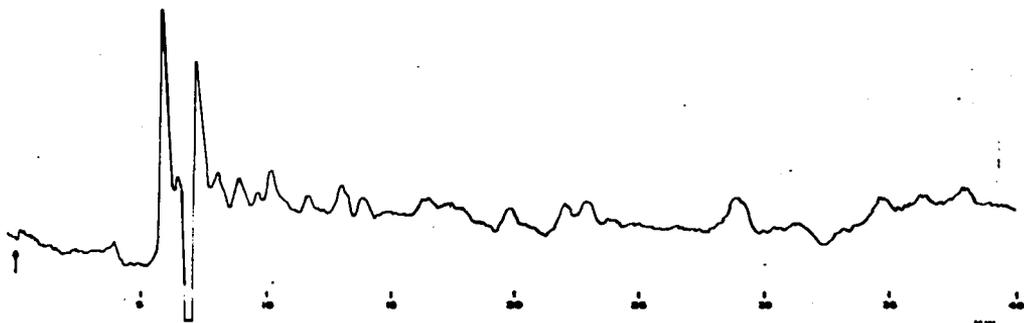
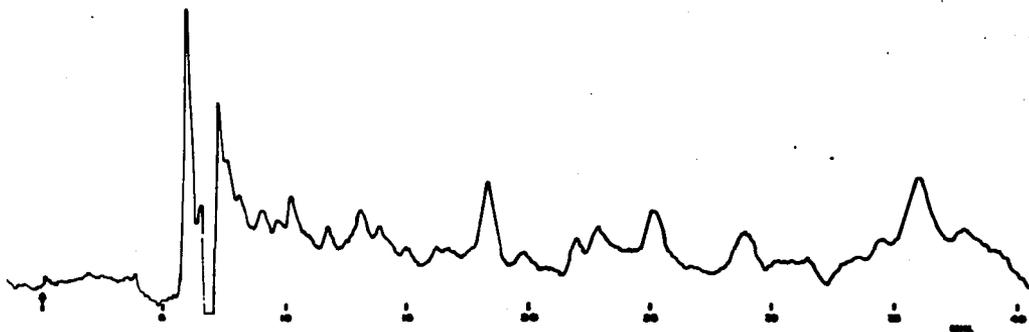


Figura 23. Identificación de LNG en plasma por HPLC. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1ml/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: 10 μ l; muestra: 0.5 mL de plasma se extrajeron con éter; se agregó 0.1 mg de LNG y eluyó en Sephadex LH-20, se colectaron las fracciones correspondientes y evaporado el solvente se resuspendió a 0.5 mL. La flecha señala el pico de LNG (\approx 2 ng), a los 4.6 min.



(A)

Figura 24. MPA, NET y LNG en plasma por HPLC. Columna: Novapack C-18; solvente: acetonitrilo/agua; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala: 0-0.01; registro: 1 cm/min; volumen de muestra: 10 μ L.
 A. Extracto en éter de 1 mL de plasma, pasado por Sephadex LH-20, resuspendido a 1 mL.
 B. A 180 μ L de la muestra anterior (1 mL), se agregó 10 μ L de una solución de MPA, NET y LNG (100 ng de cada progestina en total) y se inyectaron 10 μ L.



(B)

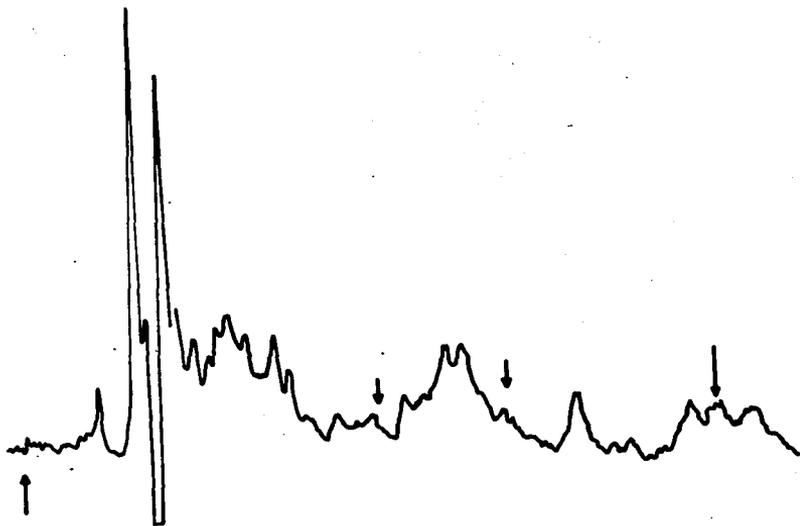
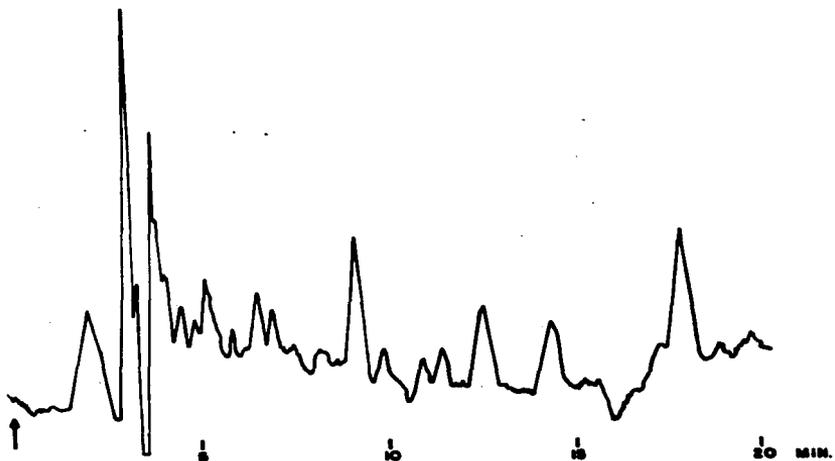


Figura 25. MPA, NET y LNG en plasma por HPLC. Mismas condiciones que la figura 24, excepto por la velocidad de registro, la cual se realizó a 0.5 cm/min. El orden de aparición es: NET, LNG y MPA.



2. CURVAS ESTANDAR DE MPA, NET Y LNG. Las figuras 26 27 y 28 muestran las gráficas obtenidas al relacionar concentración de progestina contra altura del pico correspondiente.

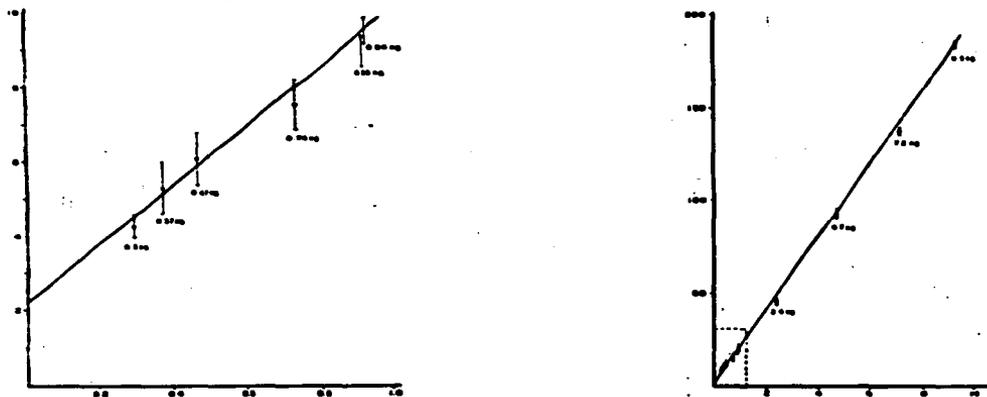


Figura 26. Curva estándar de noretindrona. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: ver tabla ; la curva de a) está calculada incluyendo los datos del recuadro representado en b). Ordenadas: altura del pico de cada muestra. Abscisas: cantidad de ng aplicados en cada inyección (por decuplicado).
a) $n = 10$; $y = 7.82 x \pm 2.19$; $r = 0.989996$; $x \pm D.S.$
b) $n = 10$; $y = 9.71 x \pm 0.87$; $r = 0.9997$; $x \pm D.S.$

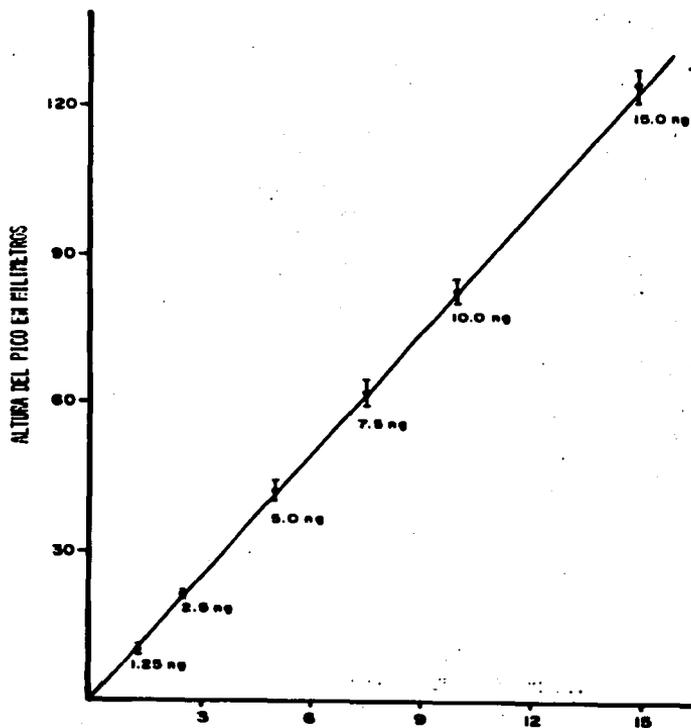


Figura 27. Curva estándar de levonorgestrel. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1 mL/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: ver tabla
 $n = 10$; $y = 8.2 x \pm 0.4$; $r = 0.99996$; $x \pm D.S.$

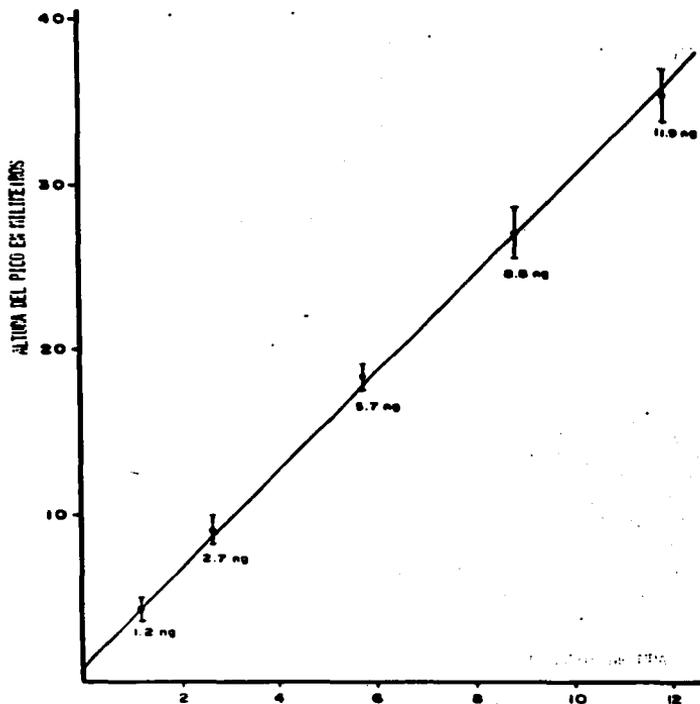


Figura 28. Curva estándar de MPA. Columna: Novapack C-18; solvente metanol/agua 70/30; flujo: 1ml/min; longitud de onda: 247 nm; escala 0-0.01; registro 1 cm/min; volumen de muestra: ver tabla
 $n = 10$; $y = 3.02 x \pm 0.87$; $r = 0.9997$; $x \pm D.S.$

Las tablas A, B y C contienen los datos respecto a la altura de cada uno de los picos del gráfico en HPLC, las concentraciones empleadas en cada uno de los puntos y el coeficiente de variación hallado para cada determinación.

T a b l a A

NORETINDRONA

	CANTIDAD (ng)	VOL	ALTURA (mm)	C.V. (%)
A	0.3	15 uL	4.25 ± 0.3	7.05
	0.4	10 uL	5.33 ± 0.66	12.38
	0.5	12 uL	6.07 ± 0.68	11.20
	0.7	10 uL	7.52 ± 0.7	9.31
	0.93	10 uL	9.91 ± 0.67	6.76
B	2.4	10 uL	22.7 ± 0.8	3.52
	4.7	12 uL	46.2 ± 1.06	2.29
	7.15	15 uL	69.3 ± 1.05	1.52
	9.3	10 uL	92.2 ± 0.86	0.93

$$A + B : Y = 9.71 X + 0.87$$

$$r = 0.9997$$

$$B : Y = 7.82 x + 2.19$$

$$r = 0.989996$$

Condiciones:

Novapack C-18, metanol/agua 70/30, Flujo 1 mL/min
Detector 247 nm. Sensibilidad 0.01 aufs.

Tabla B

LEVONORGESTREL

CANTIDAD (ng)	VOL	ALTURA (mm)	C.V. (%)
1.25	2.5 uL	10.19 ± 0.67	6.58
2.5	5 uL	21.1 ± 0.91	4.31
5.0	10 uL	42.0 ± 2.07	4.93
7.5	15 uL	61.8 ± 2.36	3.82
10.5	10 uL	83.7 ± 1.62	1.94
15.0	15 uL	123.8 ± 3.2	2.58

ECUACION: $Y = 8.2 x + 0.4$
 $r = 0.99996$

Tabla C

ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

CANTIDAD (ng)	VOL	ALTURA (mm)	C.V. (%)
1.23	20 uL	4.32 ± 0.74	17.13
3.1	5 uL	9.05 ± 0.81	8.95
5.34	10 uL	18.23 ± 0.67	3.68
9.26	15 uL	26.97 ± 1.6	5.93
12.35	20 uL	35.27 ± 1.56	4.42

ECUACION: $Y = 3.023 x + 0.807$
 $r = 0.9997$

3. PLASMAS ESTANDAR Y PLASMAS DE USUARIAS DE PROGESTINAS. Las figuras 22 y 23 muestran el perfil cromatográfico (cromatograma) de NET y LNG, respectivamente, las cuales fueron agregadas al plasma en el momento de tener preparados los extractos plasmáticos correspondientes. La figuras 24 y 25 muestran las tres progestinas en la misma muestra plasmática. En los plasmas provenientes de usuarias, la concentración de NET y LNG no fue suficiente para sobrepasar la desviación estándar y poderse cuantificar sin lugar a error.

CAPITULO 7

ANALISIS DE DATOS

METODOS DE EXTRACCION DE LIPIDOS DE PLASMA.

Se estudiaron dos métodos con fines comparativos con respecto a su eficiencia para obtener progestinas del plasma: a) extracto directo con éter dietílico y b) con cartucho Sep-pack C-18. El extracto directo se efectuó tomando como variables: la cantidad de plasma, la proporción éter:plasma, tiempo de agitación y número de extracciones. La extracción con cartucho se realizó según las instrucciones del fabricante y alternativamente con éter como eluyente en lugar de metanol puro. La evaluación de los procedimientos se efectuó en base a MPA-H³ y NET-H³.

Para la extracción directa las condiciones de ensayo fueron las siguientes:

- a) proporción éter plasma 10:1 (v/v),
- b) tiempo de extracción = 1 minuto,
- c) una sola extracción.

Para un volumen de 2 a 5 mL de plasma, basta con dos extracciones en las mismas condiciones anteriores. El porcentaje mínimo de recuperación obtenido es de 83% hasta 100% según el número de extracciones.

La extracción con cartucho Sep-pack C-18 posee la ventaja de ser rápida y con gran resolución para los compuestos de interés al manejar sistemas de separación en base a diversos solventes. El porcentaje de recuperación de MPA-H³ en el caso de las recomendaciones del fabricante (metanol 100% para progestinas) no ofreció ventajas comparativamente frente al sistema empleado a base

de éter. El porcentaje de recuperación del compuesto MPA-H³ es mayor con el cartucho, hasta 90%. Sin embargo, en ambos casos el perfil del extracto está en desventaja frente a una posterior purificación de la muestra del extracto plasmático (pureza del cromatograma), dado que impide cuantificar apropiadamente determinada progestina al coeluir otros compuestos con las progestinas de interés.

Una vez explorado el perfil cromatográfico de diversos compuestos esteroides, se procedió a estudiar el perfil cromatográfico del plasma en tres etapas: En primer lugar, se cromatografió una muestra de plasma extraído con éter. Enseguida se cromatografió una muestra de plasma pasada por cartucho Sep-pack C-18. Finalmente, se cromatografió en HPLC una muestra de plasma extraída con éter y prepurificada en Sephadex LH-20.

De ésta manera, el extracto directo fué seleccionado para la fase de extracción de lípidos del plasma, aún cuando la eficiencia de extracción mediante el cartucho superó al primero. La razón de ello consiste en el hecho de intentar proteger la columna, ya que su vida media se acorta cuando se manejan muestras complejas no prepurificadas. Por otro lado, se facilita la identificación de determinado compuesto, en el caso de no contar con un integrador de eventos y manejar en forma directa los gráficos obtenidos.

MÉTODOS DE SEPARACION DE LIPIDOS DEL PLASMA.

La cromatografía en columna fué realizada con el fin de purificar parcialmente el extracto directo del plasma. Para ello, se emplearon diversas fases estacionarias: sílica, alúmina, florisil y Sephadex LH-20. Las dimensiones de las columnas fueron diversas, al igual que los sistemas de elución. El control empleado consistió en

NET-H³. El sistema seleccionado fué el siguiente:

- * Fase estacionaria: Sephadex LH-20.
- * Dimensiones de la columna: 1.2 x 28 cm.
- * Cantidad de Sephadex: 7.0 g.
- * Solvente: tolueno:metanol 85:15 (v/v).
- * Fracciones: 40 de 1 mL c/u.

En estas condiciones, la recuperación de NET-H³ fué de 95 a 110%. El volumen de elución fue de 11 a 14 mL.

CARACTERIZACION DE PROGESTINAS POR HPLC.

Condiciones generales para el ensayo en HPLC de las progestinas y el estudio de éstas en el plasma humano:

- * Columna: Novapack C-18, 0.39 x 15 cm, ODS, 5 μ m.
- * Precolumna: Octadecilsilano (ODS), 2.0 x 0.39 cm.
- * Solvente: metanol:agua, 70:30 v/v.
- * Flujo: 1 mL·min⁻¹. Sistema isocrático, premezclado.
- * Asa de inyección: 20 μ L. Volúmenes empleados: 2.5-20 μ L.
- * Longitud de onda: 247 nm.
- * Sensibilidad de registrador: 0.01 unidades absorbancia.
- * Velocidad de registro: 1 cm·min⁻¹.
- * Voltaje: 1 mV.

En los casos en que se modifica el solvente empleado, se verifica primeramente la absorbancia máxima para los compuestos en el solvente particular y se ajusta la longitud de onda empleada en la detección de los compuestos eluidos en el sistema.

CURVAS DE CALIBRACION.

Las curvas de calibración son relaciones directas de

cantidad de compuesto y un gráfico al que se puede medir: altura de un pico, área bajo la curva o mixta. Para realizar una curva se requiere preparar soluciones estándar o concentraciones conocidas de un compuesto y dado que se requiere un cierto grado de sensibilidad del método, se estudian las concentraciones mínimas detectables que posean una relación lineal con incrementos lineales de concentración.

El coeficiente de correlación lineal, así como los coeficientes de variación, nos dicen si nuestro método es reproducible y preciso. La gráfica obtenida nos da una ecuación de línea recta, de donde podemos determinar una concentración en una muestra por extrapolación o bien al manejar el dato en regresión lineal.

PREPARACION DE PLASMAS ESTANDAR.

Se describen dos métodos de preparación de plasmas con cantidades conocidas de progestina. En ningún caso se prepararon estándares para evaluar las tres etapas: extracción, prepurificación y cuantificación. La sensibilidad del método, así como otros valores hallados en el estudio, se muestran en la tabla 7.

En cuanto a MPA, hay que hacer notar la aparición de un compuesto que coeluye con la progestina y que dificulta la cuantificación de la misma. Al parecer, corresponde a un derivado esterooidal que posee un grupo cromóforo similar al contenido en las progestinas. Aparece en mujeres aparentemente normales y tiene un máximo en concentración hacia los días 20 a 22 del ciclo (fase progestacional) (34).

CAPITULO 8

DISCUSION

Efectuar el extracto plasmático con éter, se consideró la mejor alternativa en base a su eficiencia, rapidez y costo. La gran cantidad de material lipídico contenido en la extracción por cartucho representa acortar la vida media de la columna, además de dificultar la lectura del trazo de alguna de las progestinas. En ocasiones el material extraído presentaba turbidez, lo cual refleja precipitación de los componentes y pone en riesgo la columna, aún cuando se empleó una precolumna para evitar daño directo a la columna principal.

La purificación parcial de los extractos mediante Sephadex LH-20, representa una ventaja al eliminar compuestos ajenos a los que interesa estudiar. Además, la cantidad de compuesto no se altera al añadir éste procedimiento, debiéndose considerar solamente la pérdida implícita en el proceso de extracción.

La cuantificación de progestinas sintéticas mediante HPLC reviste actualmente mucho interés en diversos campos de biomedicina. Particularmente, existen algunos trabajos estrechamente relacionados con MPA (33, 34 y 35). El enfoque de ellos es con fines de cuantificación en muestras de pacientes que reciben dosis masivas de MPA para el tratamiento antineoplásico (tumores mamarios). La metodología seguida es esencialmente la descrita en el presente trabajo.

En el caso de la cuantificación de MPA, se encontró que puede trabajarse con él cuando está ausente un compuesto natural del plasma que, como Read y cols. (34), se encontró que posee el mismo tiempo de retención y se detecta a la misma longitud de onda. Su

concentración es fluctuante en el ciclo hormonal ya que muestra una periodicidad según se describió arriba. Es de suponer que se trate de un éster de progesterona (acetato) (36). Su presencia en el cromatograma impide cuantificar bajas concentraciones de MPA.

Se agregó un estándar interno (20 β -dihidroprogesterona) y una cantidad conocida de MPA a muestras de mujeres aparentemente sanas; pero no pudo cuantificarse en bajas concentraciones a las dosis usuales con fines anticonceptivos.

Para el caso de NET y LNG, las concentraciones plasmáticas en usuarias no fueron suficientes para cuantificarlas, debido a que dichas concentraciones caen dentro de la primera desviación estándar. Se pretendió agregar un estándar interno (la misma progestina en concentración conocida a las muestras de pacientes) y calcular la diferencial de altura entre la cantidad agregada y el gráfico obtenido; pero la diferencial no superó la desviación estándar, por lo que no fue posible distinguir entre ruido del trazo y concentración de progestina (31 y 32). Se intentó concentrar hasta 2 mL del extracto plasmático parcialmente purificado, y resuspenderlo a 200 y 500 μ L.

Lo anterior conduce al empleo de esta metodología en el aspecto farmacocinético para el análisis de distribución inicial de las progestinas, dada la separación eficiente demostrada; pero ubicada en el empleo en casos de administración aguda de progestinas (primeras horas después de la administración) (37 y 38).

CAPITULO 9 CONCLUSION

En el apéndice 1, se muestran los datos obtenidos en cada parte del estudio descrito en METODOLOGIA EXPERIMENTAL. Es evidente que la separación de las progestinas es muy eficiente de acuerdo a las necesidades del presente trabajo, debido a la facilidad de emplear diversos sistemas de elución y variables de flujo de solventes.

El aspecto no resuelto es la sensibilidad del método, la cual, en el mejor de los casos llega a 0.2 ng de compuesto en un volumen de 10 μ L, situación que daría la posibilidad de detectar hasta 2 ng/mL en el plasma, al concentrar el extracto de las muestras.

La extracción de lípidos con Sep-pack C-18 da un perfil cromatográfico complejo, a diferencia de la extracción más prepurificación con Sephadex LH-20, lo cual puede aplicarse con dos fines: cuando se requiera identificación rápida de los compuestos se debe optar por el uso del cartucho Sep-pack; en cambio, como segunda posibilidad, si se pretende separar e identificar derivados, se selecciona Sephadex LH-20 con el fin de obtener fracciones poco complejas o casi puras (o un sistema de purificación concatenada, haciendo uso de columnas tandem en HPLC).

T a b l a 7

VALORES DETERMINADOS PARA LAS PROGESTINAS ESTUDIADAS

COMPUESTOS	λ_{\max}^a	ϵ^a	Rf ^b	Ve ^c	Rt ^d	SENSIB. ^e	CANTIDAD ^f	RIA ^g
MPA	246.2	10427.8	0.29	11-14	6.8	0.6	1-15 ng	0.1
LNG	246.5	7465.1	0.43	11-14	4.3	1.0	1-20 ng	0.05
NET	246.7	6996.1	0.29	11-14	3.2	0.2	0.3-10 ng	0.16

a) Solvente Metanol/Agua 70/30 barrido UV 200-300 nm.

b) Silica gel 5 x 20 x 0.02 cm Hexano/Acetato de Etilo 60/90 (v/v).

c) en mL. Sephadex LH-20 (7 gr) tolueno/metanol (85/15) Recuperación 95-110%.

d) HPLC. Novapack-C-18, Metanol/agua 70/30, 0.01 aufs, 247 nm.

e) en nanogramos. mismas condiciones que "d".

f) cantidades exploradas de cada compuesto en HPLC.

g) sensibilidad en nanogramos/mL. Comparación de métodos. Ver ref. (35).

A p é n d i c e 1

CLASIFICACION DE LAS PROGESTINAS SINTETICAS (IUPAC)

	ACETATO DE MEDROXI PROGESTERONA	17-alfa-acetoxi, 6-alfa-metil, 4-pregnen- 3,20-diona
PREGNANOS	ACETATO DE MEGESTROL	17alfa-acetoxi, 6alfa-metil, 4,6-pregnandien, 3,20-diona
	ACETATO DE CLORMADINONA	17alfa-acetoxi, 6-cloro, 4,6-pregnandien 3,20-diona
	ACETOFENIDO DE PROGESTERONA	16alfa-17alfa-dihidroprogesterona acetoféni do.
ESTRANOS	NORETINDRONA	17alfa-etinil, 17beta-hidroxi, 4-estren, 3- ona
	ACETATO DE NORETISTERONA	17alfa-etinil, 17beta-acetoxi, 4-estren, 3- ona
	NORETINODREL	17alfa-etinil, 17beta-hidroxi, 5(10)-estren, 3-ona
	LINESTRÓL	17alfa-etinil, 17-beta-hidroxi, 4-estrano
GONANOS	NORGESTREL	d1-13etil, 17alfa-etinil, 17beta-hidroxi, 4- gonen, 3-ona
	LEVOMORGESTREL	d-13-etil, 17alfa-etinil, 17beta-hidroxi 4- gonen, 3-ona

A p é n d i c e 2

NOMBRES COMUNES Y SISTEMATICOS DE LOS ESTEROIDES
ESTUDIADOS POR HPLC EN ESTE TRABAJO

<u>NOMBRE COMUN</u>	<u>NOMBRE SISTEMATICO</u>
Acetato de Medroxiprogesterona -----	6 α -metil-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
Androstendiona -----	4-Androsten-3,17-diona
Dihidroprogesterona-20 α -----	Pregn-4-ene-20 α -hidroxi-3,20-diona
Dihidroprogesterona-20 β -----	Pregn-4-ene-20 β -hidroxi-3,20-diona
Hidroprogesterona-17 α -----	Pregn-4-ene-17 α -hidroxi-3,20-diona
Levonorgestrel -----	13-etil-17-hidroxi-18,19-dinor-pregn-4-en-20- in-3-ona (-)
Noretisterona -----	19-nor-17 α -etinil testosterona
Progesterona -----	Pregn-4-en-3,20-diona
Testosterona -----	17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona

* The Merck Index 10th Edition
M. Windholz Ed.
Merck Co. Inc.
Rahway, N.J. USA
1983.

BIBLIOGRAFIA.

1. - Corner GW, Allen WM (1929): Physiology of the corpus luteum II. Production of special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *Am. J. Physiol.* 88:326-346.
2. - Beard J (1897): The span of gestation and the cause of birth. G. Fisher, Jena, Ed.
3. - Fraenkel L (1903): Die funktion des corpus luteum. *Arch. gynaek* 68:483-545.
4. - Jensen EV, De Sombre ER (1972): Mechanism of action of the female sex hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 41:202-230.
5. - Mueller GC et al (1972): Estrogen action: an inroad to cell biology. *Rec. Prog. Horm. Res.* 28:1-45.
6. - Loewe S (1925): Nachweis brunster zeugender Stoffe im weiblichen Blute. *Klin. wscrh.* 4:1407-1408.
7. - Frank RT et al (1925): Demonstration of female sex hormone in the circulating blood. I. Preliminary report. *J. Ann. Med. Assoc.* 85:510.
8. - Loewe S, Lange F (1926): Der Gehalt des frauenharns an brunsterzeugenden Stoffen in Abhängigkeit von ovariellen Zyklus. *Klin. Wschr.* 5:1038-1039.
9. - Zondek B (1928): Darnsteilung des weiblichen Sexual hormonaus dem Harn insbesondere dem Harn von Schwageren. *Klin. Wschr.* 7:484-486.
10. - Butendant A (1929): Über PROGYNON, ein crystallisiertes, weiblichen Sexual hormone. *Naturwiss.* 17:870.
11. - Doisy EA et al (1930): The preparation of the crystalline ovarian hormone from the urine of pregnant women. *J. Biol. Chem.* 86:499-509.
12. - Doisy EA (1929): Folliculin from the urine of pregnant women. *Am. J. Physiol.* 90:329-330.
13. - Forbes TR ((1947): Crowing hen: early observations on spontaneous sex reversal in birds. (Yale) *J. Biol. Med.* 19:955-970.
14. - Butendant A (1931): Über die chemische Untersuchung der Sexual hormones. *Z. angew. Chem.* 44:905-908.
15. - Garattini S, Berendes HW (1977): Pharmacology of steroids contraceptive drugs. Ed Raven Press (NY). pp 74-76.
16. - *ibid.* pp 79-81.

- 17.- Dorfingler LJ (1985): Relative potency of progestines used in oral contraceptives. *Contraception* 31(6):557-570.
- 18.- id. ref. núm 15, pp 185-209.
- 19.- Allinger NL y Cols (1976): *Organic Chemistry. Capitulo 37, página 945.* Editorial Worth Publishers Inc. N.Y.
- 20.- Berson SA, Yallow RS (1969): Quantitative aspects of the reaction between insuline and insuline-binding antibody. *J. Clin. Invest.* 38:1966.
- 21.- Peron FG, Caldwell BV (1970): *Immunologic methods in Steroid determination.* Appleton-Century-Crofts (NY).
- 22.- Skelley DS et al (1973): *Radioimmunoassay. Clin. Chem.* 19(2):146-186.
- 23.- Desiderio DM, Fridland GH (1984): A review of combined Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Liq. Chrom.* 7:317-351.
- 24.- LeBlanc RB, Johnson CY et al (1961): *Mass Spectrometry.* pp 582-647. Ed. Clark Reinhold Publ.
- 25.- Allinger NL y cols.(1976): *Mass Spectrometry, en: Organic Chemistry, cap 31.4, pp 836-844.* Ed. Worth Publ. Inc. (NY).
- 26.- Garza-Flores J, Díaz-Sánchez V. (en prensa): *Anticoncepción hormonal, en: Medicina Interna.* Editor H. Jinich.
- 27.- id. ref. núm. 25, cap 29.4, pp 765-768.
- 28.- The Merck Index. 10a edición. Referencia monográfica 5616. Ed. Windholz M. Editorial Merck and Co. Inc. (NY). 1983.
- 29.- id. referencia monográfica 6538.
- 30.- id. referencia monográfica 6543.
- 31.- Brown PR, Krstlovic AM (1979): Practical aspects of reversed phase liquid chromatography applied to biochemical and biomedical research (Review). *Anal. Biochem.* 99:1-21.
- 32.- Meyer V (1985): High performance liquid chromatography. Theory for the practitioner. *J. Chrom.* 334:197-209.
- 33.- Milano G et al (1982): *J. Chrom.* 232:413.
- 34.- Read J, Mould G (1985): Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of medroxiprogesterone acetate in human plasma. *J. Chrom.* 341:437.
- 35.- Phillipou G, Frith RG (1980): Specific quantitation of plasma medroxiprogesterone acetate by gas chromatography/mass spectrometry. *Clin Chim. Acta* 103:129-133.

- 36.- Guzmán-Durán A, Ponce-Frausto J, Díaz-Sánchez V, Díaz-Zagoya JC, Garza-Flores J (1984): Determination of Synthetic progestins in plasma by sequential column chromatography and high performance liquid chromatography. IX Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR), A.C.. Abril 26-29, Boca del Río, Veracruz, México.
- 37.- Gual C, et al (1987): Metabolic fate of a long-acting injectable estrogen-progestogen contraceptive. *Contraception* 34:271-287.
- 38.- Recio R, Garza-Flores et al (1985): Pharmacodynamic assesment of dihydroprogesterone acetophenide plus estradiol as a monthly injectable contraceptive. *Contraception* 33:579-589.