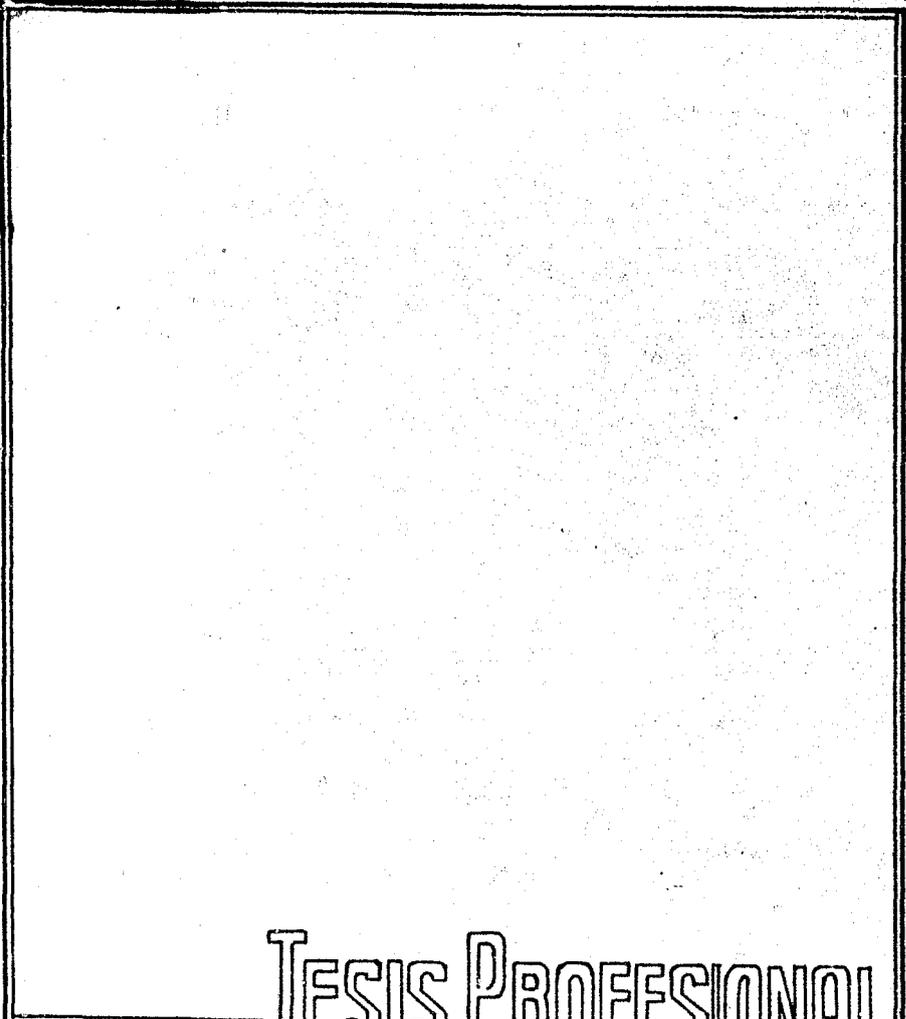


616.07(64)

25



TESIS PROFESIONAL

SUSANA CALDERON CABRERA

MEXICO

1955



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.

5 Hojas f. d. t
1 Fotografía "

616.07(04)

FACULTAD DE QUIMICA "BERZELIUS"
Incorporada a la
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INVESTIGACIONES SOBRE
LA RESPUESTA AL ACTH DE LOS 17 CETOESTEROIDES
EN PERSONAS NORMALES Y EN HIPERTENSAS
(Estudio cromatográfico en micro-columna de alúmina)

T E S I S
que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
presenta
SUSANA CALDERON CABRERA

México, D. F.
1 9 5 5 .

A LA SANTA MEMORIA DE MI MADRE

Antes de iniciar la exposición de esta tesis debo dejar constancia de mi gratitud a las personalidades e Instituciones siguientes:

Al señor Doctor Don Ignacio CHAVEZ, Director del Instituto Nacional de Cardiología por su bondadosa autorización para realizar mis trabajos en dicho prestigiado -- Centro Hospitalario, Docente y de Investigación.

Al señor Doctor Don Tomás G. PERRIN, Jefe del Laboratorio de Química del mismo Instituto en cuyo Departamento realicé mi tesis y a quien debo la revisión final de mi trabajo.

Al señor Doctor Don Pedro A. SERRANO, Encargado de la - Sección de Hormonas de dicho Laboratorio, quien me brindó el tema de estudio y bajo cuya docta y asidua dirección le llevé a término.

Al señor Doctor Don Flavio JIMENEZ ROMO, Médico adjunto del Instituto, por su valiosa cooperación escogiéndome los casos clínicos.

Al señor Doctor Don Oscar DOMINGUEZ Q.B., por su competente ayuda.

Y a los Laboratorios "SYNTEX" y "ORGANON" que generosamente me proporcionaron las sustancias puras indispensables para mis estudios.

S. C. C.

C A P I T U L O S

Introducción

- I.- Antecedentes
- II.- Material y Métodos
- III.- Trabajo experimental
 - 1.- Resultados en personas normales
 - 2.- Resultados en personas hipertensas
- IV.- Discusión
- V.- Conclusiones
- VI.- Bibliografía

I N T R O D U C C I O N

En este trabajo se ha hecho un estudio cromatográfico de la excreción urinaria de 17-cetoesteroides en sujetos hipertensos, comparando los resultados con los obtenidos en personas normales, con el fin inmediato de buscar una orientación de la supuesta participación suprarrenal en el origen de la hipertensión arterial.

A continuación se citan los puntos de mayor interés que dan base a esta investigación:

I.- Se conocen distintos tipos de hipertensión:

a).- Hipertensión secundaria a padecimientos renales, endócrinos, nerviosos y de tipo obstructivo, mecánico-vascular.

b).- Hipertensión Esencial, cuyo origen es desconocido.

II.- La influencia que las cápsulas suprarrenales tienen sobre la presión arterial se refleja en los siguientes ejemplos:

a).- La insuficiencia suprarrenal siempre se acompaña de hipotensión.

b).- La hipertensión es un síntoma importante en la hiperfunción suprarrenal.

c).- Un grupo de hormonas corticoadrenales poseen efectos biológicos sobre el metabolismo electrolítico y se caracterizan por ser hipertensinógenas.

III.- La exploración funcional de la suprarrenal, por dosificación de sus esteroides en la hipertensión arterial, autoriza para hacer las siguientes consideraciones:

a).- No se obtienen datos de valor fundamental mediante la determinación de los 17-cetoesteroides neutros totales.

b).- La separación cromatográfica de los 17-cetoesteroides en micro-columna de alúmina permitirá aislar e identificar sus principales componentes, es decir, los 17-cetoesteroides que se encuentran en la fracción neutra total.

c).- El mismo estudio cromatográfico efectuado en orinas de pacientes tratados con ACTH permitirá conocer la respuesta suprarrenal a través de los cambios en uno ó varios de los esteroides secretados por ella.

Así pues, el presente trabajo tiene por objeto:

a).- Conocer la diferencia que existe en la excreción de los distintos 17-cetoesteroides en sujetos normales e hipertensos.

b).- Observar los cambios que tienen lugar en ambos grupos (normales e hipertensos), después de estimular la corteza suprarrenal con ACTH.

CAPITULO I

ANTECEDENTES .

Generalidades.- Los 17-cetoesteroides son sustancias formadas por un núcleo ciclo pentano perhidro fenantreno (figura I), con función cetónica en el carbono 17.

Origen.- La configuración química de los 17-cetoesteroides es muy semejante a la del colesterol (figura II); ésta substancia, considerada como el esteroi más importante del organismo animal, es la fuente de origen de las hormonas adrenales y gonadales. Por transformaciones sucesivas, degrada la cadena lateral del carbono 17 de su molécula, dando lugar a la formación de los esteroides de 19 y 21 carbonos.

Mason y colaboradores (1) opinan, que en su mayoría, los 17-cetoesteroides son productos de degradación de los esteroides adrenocorticales de 21 carbonos y en menor proporción (en el hombre, aproximadamente una tercera parte de ellos), deriva de los esteroides de 19 carbonos.

La evidencia de que se forman 17-cetoesteroides a expensas de esteroides adrenocorticales, se apoya en las razones enumeradas a continuación:

a).- La extirpación de las cápsulas suprarrenales en los animales y en el hombre, disminuye la excreción urinaria de 17-cetoesteroides.

b).- Después de hipofisectomía, por medio de la cual desaparece la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), ó sea el estímulo fisiológico que mantiene activo el funcionamiento normal de las suprarrenales, ocurre disminución de 17-cetoesteroides urinarios.

c).- También se encuentra disminuida su excreción en ciertas enfermedades que atacan a la hipófisis ó a las cápsu-

las suprarrenales, como sucede en los casos de tumores hipofisarios y en la enfermedad de Addison.

d).- La excreción de los 17-cetoesteroides aumenta en casos de tumores e hiperplasias en las suprarrenales que se acompañan con un cuadro de hiperactividad adrenal.

e).- Así mismo, se ha encontrado aumento en su excreción siguiendo a la administración oral y parenteral de hormonas adrenocorticales.

El origen testicular de los 17-cetoesteroides se comprueba también por los hechos siguientes:

a).- Su excreción es superior en el hombre que en la mujer.

b).- No desaparecen totalmente de la orina después de la adrenalectomía y descienden más aún, si una vez practicada dicha operación se castra al animal en experimentación, o al hombre en tratamiento.

c).- Disminuye su excreción urinaria después de que se han extirpado los testículos ó por padecimientos que impidan el funcionamiento normal de los mismos.

d).- Aumentan notablemente en caso de tumores secretantes del testículo ó en caso de tumores de tipo testicular en el ovario.

e).- Aumenta su excreción urinaria al inyectar extractos testiculares.

Los ovarios contribuyen aunque en muy pequeña proporción a la formación de 17-cetoesteroides de 19 carbonos. Existe la posibilidad de que la progesterona, por diversos cambios en el metabolismo, pierda en determinadas condiciones su cadena lateral en el carbono 17, apareciendo en su lugar una función cetónica; sin embargo, por ser tan pequeña la cantidad -

de 17-cetoesteroides que derivan de las hormonas segregadas por los ovarios, no se les toma en consideración.

Por lo anterior, se puede afirmar que los 17-cetoesteroides son sustancias que tienen un doble origen, ya que - provienen del metabolismo de las hormonas que se generan en las cápsulas suprarrenales y en los testículos; por lo tanto su dosificación total es de gran importancia: nos da un índice de funcionamiento suprarrenogonadal.

Excreción.- Los 17-cetoesteroides son eliminados en forma de ésteres, conjugados con los ácidos sulfúrico y glucurónico, lo que los hace solubles en agua y así pueden ser excretados por la orina. Su dosificación en esta forma conjugada sería larga y complicada; es necesario obtenerlos - primero al estado libre y para ello, se recurre a la hidrólisis con HCl. En estas condiciones se pueden extraer fácilmente con un solvente orgánico (éter, tetracloruro de carbono, benceno). Para purificar los extractos, se lavan con una solución alcalina y posteriormente con agua, hasta tener en el extracto reacción neutra: a la fracción del solvente orgánico que contiene el extracto final, se le conoce con el nombre de "fracción neutra total".

La cantidad de 17-cetoesteroides eliminados por la orina varía del hombre a la mujer, siendo en el primero de 7.4 a 20 mgr. (con media de 12 mgr.), por 24 horas y en la segunda de 4.3 a 14 mgr. (con media de 8 mgr.), por 24 horas (2).

Mientras que casi toda la fracción de los 17-cetoesteroides excretados por la mujer tienen su origen en compuestos segregados en la corteza adrenal, aproximadamente una tercera parte de ellos deriva de los testículos del hombre (3).

de 17-cetoesteroides que derivan de las hormonas segregadas por los ovarios, no se les toma en consideración.

Por lo anterior, se puede afirmar que los 17-cetoesteroides son sustancias que tienen un doble origen, ya que provienen del metabolismo de las hormonas que se generan en las cápsulas suprarrenales y en los testículos; por lo tanto su dosificación total es de gran importancia: nos da un índice de funcionamiento suprarrenogonadal.

Excreción.- Los 17-cetoesteroides son eliminados en forma de ésteres, conjugados con los ácidos sulfúrico y glucurónico, lo que los hace solubles en agua y así pueden ser excretados por la orina. Su dosificación en esta forma conjugada sería larga y complicada; es necesario obtenerlos primero al estado libre y para ello, se recurre a la hidrólisis con HCl. En estas condiciones se pueden extraer fácilmente con un solvente orgánico (éter, tetracloruro de carbono, benceno). Para purificar los extractos, se lavan con una solución alcalina y posteriormente con agua, hasta tener en el extracto reacción neutra: a la fracción del solvente orgánico que contiene el extracto final, se le conoce con el nombre de "fracción neutra total".

La cantidad de 17-cetoesteroides eliminados por la orina varía del hombre a la mujer, siendo en el primero de 7.4 a 20 mgr. (con media de 12 mgr.), por 24 horas y en la segunda de 4.3 a 14 mgr. (con media de 8 mgr.), por 24 horas (2).

Mientras que casi toda la fracción de los 17-cetoesteroides excretados por la mujer tienen su origen en compuestos segregados en la corteza adrenal, aproximadamente una tercera parte de ellos deriva de los testículos del hombre (3).

Dosificación.- Los 17-cetoesteroides reaccionan con el meta-Dinitrobenceno en solución alcalina, produciendo un cromógeno específico con un máximo de absorción de 520 m μ . Esta reacción fue estudiada originalmente por Zimmerman (1935) y aplicada más tarde a los extractos urinarios por Callow y colaboradores (1938). Muchas modificaciones se le han hecho desde entonces para su aplicación a la clínica, pero los fundamentos de la reacción aún permanecen constantes. Los 3 cetoesteroides y los 20 cetoesteroides también contribuyen, aunque en menor proporción, al valor total obtenido por los métodos comúnmente empleados; sin embargo, dan coloraciones atípicas con la reacción de Zimmerman, caracterizadas por un coeficiente de absorción menor al de la reacción específica y su máxima de absorción no se encuentra en 520 m μ . (4).

Estructura Química.- El nombre de 17-cetoesteroides, indica en común la presencia de un grupo cetónico en la posición 17 del núcleo esteroide. Todos ellos poseen, así mismo, una función hidroxílica ó cetónica en el carbono 3.

Difieren entre sí en algunos otros grupos estructurales, pero la presencia de la cetona en el carbono 17 les imprime una propiedad química específica, por la cual reaccionan con el meta-Dinitrobenceno.

Isomería nuclear.- Las sustancias esteroides que nos ocupan, derivan de los núcleos del androstano y del etiocolano (figuras III y IV), que se diferencian entre sí, por la posición del hidrógeno en el carbono 5, siendo este átomo de carbono común a dos anillos adyacentes. Si se supone que el hidrógeno se halla detrás del plano del papel, se le denomina "alfa" y se le representa unido al núcleo por una línea de pun

tos; en el caso contrario, se le designa con la letra "beta" y se le representa unido al núcleo por una línea continua. - Los átomos de hidrógeno en las posiciones 8, 9 y 14, no merecen atención especial, pues generalmente conservan posiciones constantes.

Los dos grupos metálicos angulares, unidos al carbono 10 y al carbono 13, se hallan a un mismo lado del plano de la molécula y sirven como puntos de referencia (5).

Para designar la disposición espacial de los substituyentes del núcleo y de la cadena lateral, se siguen las reglas anteriormente enunciadas, usándose los términos "alfa" (para aquellos que guardan en el espacio una relación recíproca inversa con respecto a los grupos metálicos angulares) y "beta" (para los que se encuentran en el mismo lado del plano de la molécula) para designar la posición del grupo OH en el carbono 3. Como ejemplo del primer grupo tenemos la androsterona y la 5-Isoandrosterona (3 alfa hidroxí, etiocolán-17-ona) y del segundo la Epiandrosterona (figuras V, VI, VII).

Bajo condiciones normales la androsterona y la 5-Isoandrosterona (erróneamente llamada Etiocolanolona) se encuentran en mayores cantidades que cualesquiera de los demás esteroides eliminados por la orina; por lo tanto la mayor porción de los esteroides neutros excretados, tienen una configuración alfa del grupo OH en el carbono 3 (6).

Lieberman (1948) reporta haber aislado de la orina humana, 42 substancias esteroides diferentes; 35 de ellas identificadas como pertenecientes a la fracción 3 alfa hidroxí y 7 de ellas a la fracción 3 beta hidroxí (7).

En estudios posteriores, Lieberman y colaboradores (1953)

aislaron 3 sustancias esteroideas más, 2 de ellas de la fracción 3 alfa hidroxil y la otra de la fracción 3 beta hidroxil. (8).

Cambios estructurales.- Las diferentes sustancias esteroideas presentan diversos cambios en su estructura. Hay algunas que poseen una doble ligadura en su molécula, tal es el caso de la dehidroepiandrosterona (figura VIII).

La hidrólisis con HCl puede dar lugar a la formación del derivado halogenado correspondiente (Lam. II). Estos cloroesteroideas, forman parte de los esteroideas, usualmente llamados artefactos. Como ejemplo tenemos la formación del 3 cloro, delta 5, androstén 17-ona (4) (figura XV).

Dingenanse logró aislar de la orina de una niña con adonoma de la corteza adrenal la 1-androstén, 6 ol, 17 ona, la cual por la acción del HCl y ebullición durante 10³, da lugar a la formación aproximadamente en un 65% de dehidroepiandrosterona y el resto se transforma en el derivado halogenado. (9). (figura XVI).

Se ha encontrado también que algunas sustancias que poseen una función OH en el carbono 11 del núcleo esteroide, - la pierden durante la hidrólisis ácida y aparece en su molécula una doble ligadura, tal es el caso de la 11 beta hidroxil androsterona que da lugar a la formación de la delta 9 androsterona. (10). (figura XVII).

Por acetilación dan lugar a la formación del acetato. (figura IX).

Acción biológica.- En cuanto a sus propiedades biológicas, los esteroideas presentan también ciertas diferencias entre sí. Butenandt en 1931 trabajando sobre extractos urina-

rios, observó que en ellos existía una substancia que tenía la capacidad de provocar el crecimiento de la cresta de los gallos castrados, mostrando el mismo poder andrógeno que el extracto de tejido de testículo. Mas tarde en 1934 la substancia que presentaba dichas propiedades fué aislada de cientos de litros de orina en forma cristalina e identificada como androsterona: primera de las substancias conocidas ahora como 17-cetoesteroides. (11).

La estrona (figura X) es una substancia esteroide de 18 carbonos que se elimina también por la orina, tiene como su nombre lo indica propiedades estrógenas. Presenta en su configuración un anillo fenólico que le imprime carácter ácido y por esta razón, a pesar de poseer una función cetónica en el carbono 17 de su núcleo, no se le considera dentro de la "Fracción neutra total", ya que en los extractos urinarios es eliminada por los lavados con álcali.

Otra parte de la orina contiene esteroides con acciones biológicas semejantes a los esteroides adrenales; esta porción se le conoce con el nombre de fracción corticosteroide. Son substancias de 21 carbonos, con una cadena lateral en posición 17. En este grupo tenemos esteroides de acción glucocorticoide y otros con acción mineralocorticoide.

Separación química.- En los extractos neutros totales se encuentra pues una mezcla de 17 cetoesteroides. La separación y dosificación parcial de ellos, tiene una gran importancia en clínica, ya que éstos presentan cambios cualitativos y cuantitativos en su excreción bajo diversas circunstancias.

Por medio de reacciones químicas específicas, se pueden hacer diversas separaciones:

1o.-Separación de la fracción cetónica de la no cetónica.- Se logra por la formación de hidrazonas entre el reactivo de Girard y el radical cetónico del núcleo esteroide. En esta forma los esteroides se vuelven solubles en agua. Las sustancias cetónicas son liberadas de sus hidrazonas con HCl y posteriormente recuperadas. (12).

2o.-Separación de las fracciones 3 alfa y 3 beta hidroxiladas.- Se basa en la formación de digitónidos con el hidroxilo en posición beta del núcleo esteroide. Las sustancias que poseen una función 3 alfa hidroxilada no reaccionan y son recuperadas con éter. Los 3 beta hidroxilados son liberados de los digitónidos con piridina y posteriormente extraídos. (12).

3o.-Separación de la fracción alcohólica de la no alcohólica.- Se logra por la formación de ftalatos con anhídrido ftálico y titulación posterior de los grupos carboxílicos libres con una solución alcalina, siendo la valoración proporcional a la cantidad de grupos OH presentes en los esteroides tratados. (13).

4o.-Purificación, aislamiento e identificación de las sustancias esteroides.- La obtención de los esteroides en forma individual, se ha logrado mediante técnicas que aprovechan las diferencias de polaridad que les confieren los cambios estructurales en sus moléculas.

Las funciones hidroxílicas, los grupos cetónicos, las dobles ligaduras y los cambios de posición, influyen en las sustancias esteroides modificando su polaridad. Esta propiedad se aprovechó, al colocarlos sobre un material adsorbente y tratarlos con solventes de distinta polaridad que -

arrastran consigo diferentes esteroides (elución), para lograr separar unos de otros. Esta es la base de las técnicas de separación cromatográfica en columna, que usan una sustancia adsorbente, como la alúmina.

Existen varios métodos de cromatografía en columna para llevar a cabo la separación de las sustancias esteroides que se encuentran en los extractos urinarios, sin embargo, algunos de ellos, por ser muy complicados, no son aplicables a la clínica.

Dingemans en sus estudios realizados en columna, usando 15 gr. de alúmina, ha logrado realizar la separación e identificación de diversos 17-cetoesteroides en los extractos urinarios. (10).

Wilkins usando una columna con 6.5 gr. de alúmina, llevó a cabo un estudio sobre las variaciones que sufre la excreción de 17-cetoesteroides en sujetos normales bajo diversas condiciones (1). Zigmuntowicz en 1951, por medio de un proceso de cromatografía en micro-columna de alúmina logró la separación e identificación de diferentes sustancias esteroides (14). Pond en su trabajo publicado casi simultáneamente al anterior, usa también un micro-método semejante con una columna que contiene 1.5 gr. de alúmina (15).

En nuestro trabajo se siguió la técnica de Pond, con las modificaciones que posteriormente enunciaremos. La evaluación del método ha sido ya realizada y por su desarrollo sencillo y rápido es fácilmente aplicable a la química. (16).

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Generalidades.- La preparación de extractos urinarios - adecuados para la dosificación de 17-cetoesteroides, consiste en separar el esteroide libre no hidrosoluble, del complejo hidrosoluble (sulfato y glucuronidato), mediante ácido mineral y calor, extrayendo posteriormente el esteroide liberado con un solvente orgánico.

T E C N I C A .

Recolección de la muestra de orina.- Hay una considerable variación de los 17-cetoesteroides en la excreción de orina diurna comparada con la nocturna; por tanto, es necesaria la obtención de orina de 24 horas, para tabular correctamente su excreción (17). Los sujetos deben ser instruidos para desechar la primera orina de la mañana, juntar todas las demás muestras e incluir la primera matinal del día siguiente. No es necesaria la adición de preservativos.

Prueba de funcionamiento suprarrenal.- La orina debe juntarse durante dos días consecutivos y en el segundo día el sujeto debe inyectarse 40 unidades de ACTH gel en dos dosis de 20 unidades cada una con diferencia de 12 horas entre cada aplicación.

Obtención del extracto.- Para la obtención del extracto que contiene los 17-cetoesteroides, se mide el volumen total de la orina de 24 horas y se toma una alícuota de 100 cc. de orina, que contiene un mínimo aproximado de 0.5 mlgr. de 17-cetoesteroides, cantidad necesaria para la separación cromatográfica posterior. A continuación se siguen los pasos siguientes:

- a).- Hidrólisis
- b).- Extracción
- c).- Purificación
- d).- Destilación

a).- Hidrólisis.- 100 cc. de la orina total de 24 horas se ponen a calentarse en un matraz de 500 cc. de boca esmerilada; en el momento en que empieza la ebullición se le agregan 10 cc de HCl concentrado; después se enfría en baño de agua.

b).- Extracción.- A esta muestra ya fría, se le agregan 60 cc de CCl_4 y se pone a hervir bajo reflujo, contando 10' a partir del momento en que cae la primera gota. Se deja enfriar. Se aparta del solvente por medio de un embudo de separación. La orina hidrolizada que queda en el embudo se extrae por agitación durante un minuto con 20 cc de CCl_4 por dos veces consecutivas; éste tetracloruro de carbono se junta con el obtenido en el paso anterior.

c).- Purificación.- En el extracto así obtenido se encuentran los esteroides y junto con ellos otros tipos de sustancias que deben evitarse, pues interfieren en la estimación colorimétrica final. De estas impurezas, los estrógenos (esteroides con una función fenólica en su núcleo), otras sustancias fenólicas y algunos cromógenos son solubles en álcali y se eliminan por medio de lavados con soluciones alcalinas.

El solvente que contiene el extracto se pone en un embudo de separación y se lava por agitación durante un minuto con 30 cc. de solución de sosa 2 Normal; esta operación se repite tres veces.

Las soluciones alcalinas que resultan de cada lavado se juntan y se reextraen con tetracloruro, el cual se reúne con-

el resto.

A continuación, el solvente se lava con 30 cc. de agua - destilada, tantas veces cuantas sean necesarias para que este líquido no de reacción alcalina. También estas porciones deben reextraerse con tetracloruro y sumarse a las anteriores.

En estas condiciones al solvente que contiene el extracto y que da reacción neutra, se le añade sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua, se deja reposar por lo menos durante una hora y se filtra. El sulfato de sodio se lava con tetracloruro para evitar pérdidas.

d).- Destilación.- La eliminación del solvente para poder llevar a cabo la reacción colorimétrica, se logra utilizando un aparato de destilación al vacío y en baño maría. En el recipiente que contenía la solución, permanece la "Fracción neutra total", que no es volátil.

Dosificación.- Para apreciar la cantidad de 17-cetoesteroides totales presentes en el extracto se lleva a cabo la reacción de Zimmerman.

El extracto seco se disuelve en 4 cc. de alcohol. De este volumen se toman 0.2 cc. (un vigésimo del total), por triplicado y en ellos se efectúa la reacción colorimétrica por duplicado y un blanco de cromógenos.

Reacción de Zimmerman.- Se hace siguiendo la técnica de Holterff y Koch.

Reactivos:

Alcohol 5 veces redestilado.

m-Dinitrobeneno al 2% en alcohol redestilado.

Solución de potasa acuosa 5 Normal.

Tubos testigos.- Se preparan de la siguiente manera:

Se parte de una solución que lleva 10 miligramos de dehidroepiandrosterona en 100 cc. de alcohol. En un cc. de esta solución hay 100 gammas de dehidroepiandrosterona

Se preparan 3 tubos:

Tubo I.- 20 gammas de dehidroepiandrosterona.

II.- 40 " " "

III.- 60 " " "

A estos tubos se les evapora el alcohol en baño maría.

Técnica de la reacción.- Se colocan los tubos en el orden siguiente: a).- Blanco de reactivos, por duplicado.

b).- Tubos testigos.

c).- Problemas, por duplicado.

d).- Blanco de cromógenos.

A cada tubo se le añade:

0.2 cc. de alcohol.

0.2 cc. de m-Dinitrobenceno.

0.2 cc. de KOH 5 N.

Al blanco de cromógenos que es particular para cada problema, se le ponen:

0.4 cc. de alcohol.

0.2 cc. de KOH 5 N

No se le añade m-Dinitrobenceno para que no se desarrolle la reacción y la coloración leída corresponda únicamente a los cromógenos. (2).

Todos los tubos se agitan y se incuban en baño de agua a 25°C durante 45', preservándolos de la luz.

Al cabo de este tiempo se añaden a cada tubo 10 cc. de alcohol al 66% y se leen en el fotocolorímetro Coleman Jr., Modelo 6-B con filtro de absorción de 620 m μ .

Las lecturas que da el colorímetro se transforman en densidades ópticas. Se traza una gráfica poniendo en las ordenadas las densidades ópticas y en las abscisas la cantidad de gamma. De esta manera se puede leer sobre la gráfica la cantidad de gammas de 17-cetoesteroides que hay en un vigésimo del extracto neutro total.

Separación cromatográfica.- La técnica es la establecida por la Dra. Pond (1951), modificada por el Dr. P. A. Serrano. Consiste en un método micro-cromatográfico para la separación de ciertas fracciones de los 17-cetoesteroides - que se eliminan por la orina humana y que se encuentran presentes en los extractos urinarios.

La modificación que se le ha hecho a la técnica original es la siguiente: Se emplea presión en lugar de vacío, lo que permite mantener circuito cerrado y evitar que se rompa la columna de alúmina. Esto trae como consecuencia cambios en el aparato como se describirá más adelante.

Aparato.- La columna está formada por un tubo de vidrio de 15 cms. de largo, cuyo diámetro interno es de 0.6 cms. - (alúmina), en su parte superior tiene un ensanchamiento esférico con capacidad aproximada de 130 cc. (solvente). Se le puede adaptar una bomba para hacer presión. En su parte inferior tiene una llave de goteo, con ajuste esmerilado.

Técnica.- La columna se llena con benceno redestilado y se obtura en su extremo inferior con un poco de algodón.- Se le ponen 1.5 gr. de alúmina desecada en atmósfera de H_2SO_4 (21.5-21.8 Normal), se deja asentar por gravedad y - por medio de ligeros golpes se forma una columna homogénea y con una superficie superior lisa.

La columna de alúmina debe permanecer siempre cubierta por el solvente, pues cuando se seca, se forman falsas vías que interfieren el contacto entre solvente y alúmina y alteran los resultados. Se deja correr el benceno a través de la columna y estando la alúmina todavía húmeda se le pone el

extracto disuelto en la menor cantidad posible de benceno - (0.3 cc. aproximadamente).

En estas condiciones se principian a correr las substancias eluyentes. Se usan mezclas de benceno y etanol, ambos deben ser puros y redestilados. Se mezclan estos dos solventes en diversas proporciones para cambiar su polaridad y de esta manera lograr la separación de los esteroides. Están divididos en siete porciones y su orden de elución es el siguiente:

30 cc. de benceno

120 cc. de etanol-benceno al 0.05%

120 cc. de etanol-benceno al 0.10%

120 cc. de etanol-benceno al 0.50%

50 cc. de etanol-benceno al 1.00%

10 cc. de etanol

El líquido eluído se recoge en porciones de 10 cc. por medio de un fraccionador; se evaporan a sequedad en baño maría y con corrientes de aire en la superficie del solvente para acelerar la evaporación. Sobre el residuo seco se practica la reacción de Zimmerman. En total se obtienen 45 fracciones.

Cálculo de resultados.- Los 17-cetoesteroides contenidos en cada tubo expresados en gammas por fracción, se miden colorimétricamente por la reacción ya descrita. La recuperación total se obtiene sumando los resultados de las 45 fracciones y transformándolas en miligramos de 17-cetoesteroides recuperados.

Observaciones en el método cromatográfico.- La separa-

##

ción de las diversas sustancias esteroideas se logra aprovechando los cambios en su polaridad, que se debe a las diferencias en su estructura. También influye la polaridad de los solventes.

Por la forma expuesta anteriormente se pueden separar cierto número de 17-cetoesteroides contenidos en la orina humana.

Se han identificado según su lugar de elución de la manera siguiente:

- a).- Por el uso de sustancias puras
- b).- Por mezclas de sustancias puras
- c).- Por extractos urinarios a los que se les ha añadido una ó mas sustancias conocidas.

a).- En el caso en que se use una sustancia pura, en una fracción determinada y según el esteroide de que se trate, comienza a eluir la sustancia dando coloraciones en la reacción de Zimmerman, que van aumentando progresivamente, hasta llegar a un máximo para luego decrecer rápidamente; se dice entonces que dicho esteroide forma un pico en las fracciones.

b).- Cuando se usa una mezcla de sustancias puras de distinta polaridad, se obtienen tantos picos cuantos esteroides se hayan empleado y su posición en el cromatograma se puede identificar fácilmente conociendo el lugar de elución para cada uno de ellos.

c).- En los extractos urinarios se encuentra un gran número de sustancias, las cuales se pueden separar e identificar. Si a un determinado extracto se le añade una sustancia pura, por ejemplo androsterona y se hace el análisis cromato

gráfico, se encuentra que el pico correspondiente a dicha substancia está muy aumentado y el resto del cromatograma no se altera.

SUSTANCIAS PURAS USADAS Y SU LUGAR DE ELUCION

<u>Substancia co-</u> <u>nocida.-</u>	<u>Cantidad</u> <u>usada.</u>	<u>No. del Tubo</u> <u>en el que</u> <u>eluye.</u>	<u>Fracción</u>
Epiandrosterona	100 gammas.	7 al 10	II
Dehidroepiandrosterona	100 gammas.	11 al 15	III
Androsterona	100 gammas.	17 al 22	IV
5-Isoandrosterona	100 gammas.	23 al 27	V

Los ocho picos ó fracciones logradas en los cromatogra-
mas, son similares a las descritas por Pond (1951) (1953) (18)
y Dingemans (1952), son las siguientes:

Fracción.

- I Esteroides no alcohólicos; principalmente artefactos resultantes de la hidrólisis de los 17-cetoesteroides pertenecientes a la fracción beta. Como: Delta 3 androsterona y 3 cloro, delta 5, androstén 17 ona.
- II) Esteroides pertenecientes a la fracción beta: Epian-
- III) drosterona y dehidroepiandrosterona.
- IV) Androsterona { Estas dos fracciones incluyen pe-
- V) 5-Isoandrosterona { queñas cantidades de Delta 9 deri-
- { vados, que provienen de los 11-oxi-
- { 17-cetoesteroides.
- VI) 11-oxi-17-cetoesteroides (Probablemente conteniendo -
- VII) 11-hidroxi y 11, 17-dicetoesteroides).
- III) Esteroides no identificados.

CAPITULO III

TRABAJO EXPERIMENTAL

Material.- El estudio se llevó a cabo, observando los cambios que se presentan en la excreción de los 17-cetoesteroides, en sujetos normales e hipertensos, antes y después de la administración de 40 unidades de ACTH.

Análisis realizados.- a).- Se hizo la separación cromatográfica de los 17-cetoesteroides, con orina colectada - antes de la aplicación de la hormona, lo que constituye la obtención de un cromatograma inicial.

b).- Análisis cromatográfico del extracto urinario obtenido con la orina colectada durante el día en que se aplicó ACTH, lo que nos da un cromatograma posterior.

Cálculo de gráficas.- El análisis de los resultados, se lleva a cabo sobre las gráficas obtenidas colocando en - las ordenadas las gammas y en las abscisas las 45 fracciones de los solventes; se les denomina cromatogramas.

Los cromatogramas nos proporcionan un esquema, en donde encontramos los ocho picos anteriormente descritos, cuya altura y extensión es variable, según los diversos casos. - La altura representa la cantidad de gammas recuperadas por fracción y la extensión el número de fracciones que corresponden a un pico determinado.

Identificación de los picos.- Se obtiene de acuerdo - con las siguientes características:

a).- Teniendo en cuenta el lugar donde teóricamente y según los esquemas de sustancias puras, un esteroide aparece en la gráfica.

b).- La separación entre pico y pico se hace considerando el lugar máximo de la lectura de un pico, su descenso y el

momento en que vuelve a ascender, indicando la presencia de otro esteroide.

Cuando hay una separación imperfecta, el pico que corresponde a dichas fracciones se debe separar en el momento de una rápida elevación del siguiente.

Tanto por ciento de recuperación.- Una vez identificadas los picos, se suzan las gammas que corresponden a cada uno de ellos y luego se hace la suma total de gammas recuperadas, de esta manera se obtienen:

a).- La recuperación total, sacando la diferencia que existe entre las gammas usadas inicialmente y las gammas recuperadas.

b).- La proporción que corresponde a cada uno de las fracciones, indicándonos cual es el esteroide ó los esteroides que predominan en un cromatograma determinado. (Las fracciones VII y VIII se reportan juntas).

Análisis de los resultados.- Los cromatogramas obtenidos, fueron analizados de acuerdo con las siguientes normas generales de interpretación cromatográfica:

a).- La altura del cromatograma, que está en relación directa con la cantidad de 17-cetoesteroides que se encuentran en el extracto.

b).- La separación de los picos, que puede ser satisfactoria ó imperfecta.

c).- El predominio ó ausencia de uno ó varios de los esteroides.

d).- Los cambios que aparecen después de la administración de ACTH.

I.- RESULTADOS EN PERSONAS NORMALES

Presentamos el estudio de los cromatogramas de seis -
hombres normales:

Caso # 1.-Edad: 36 años.- I (Antes del ACTH).- El cro-
matograma inicial presenta una altura normal, con predomi-
nio para la androsterona y los 11-oxi-17-cetoesteroides.

II (Después del ACTH).- Es un cromatograma de altura-
normal, con aumento ligero en la excreción de los 11-oxi-
17-cetoesteroides.

Caso # 2.-Edad: 32 años.- I.- Cromatograma de altura
normal, con predominio de la androsterona y de los 11-oxi-
17-cetoesteroides. (Gráfica 1).

II.- Cromatograma de altura normal, con aumento de la
excreción de androsterona y de 11-oxi-17-cetoesteroides, a
expensas de la fracción beta que disminuye proporcionalmen-
te. (Gráfica 2).

Caso # 3.-Edad: 30 años.- I.- Cromatograma de altura-
normal, con separación defectuosa de androsterona y 5-Iso-
androsterona, escasa eliminación para esta última.

II.- Cromatograma de altura normal, con aumento para -
la excreción de dehidroepiandrosterona, androsterona y 11-
oxi-17-cetoesteroides, separación defectuosa de la fracción
alfa y casi ausencia de 5-Isoandrosterona.

Caso # 4.- 22 años.- I.- Cromatograma de altura normal,
con imperfecta separación de sus picos; predominio de la -
fracción beta con excreción máxima para la epiandrosterona,
disminución de la fracción alfa y casi ausencia de 5-Isoan-
drosterona.

II.- Cromatograma de altura normal, con aumento en la excreción de los esteroides predominantes en el anterior; persiste la eliminación pobre de 5-Isoandrosterona.

Caso # 5.- 23 años.- I.- Cromatograma de altura normal, con imperfecta separación de sus picos, predominio para la fracción beta con excreción máxima de epiandrosterona, la eliminación de 5-Isoandrosterona es muy pobre.

II.- Cromatograma de altura normal, separación imperfecta de la fracción beta, aumento uniforme de la excreción de todos los esteroides, persistiendo escasa la eliminación de 5-Isoandrosterona.

Caso # 6.- 24 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio en la excreción de epiandrosterona y muy escasa eliminación de 5-Isoandrosterona.

II.- Cromatograma de altura normal, aumento uniforme en la excreción de los esteroides, siendo mayor la excreción de epiandrosterona y muy pobre la de 5-Isoandrosterona.

Estudio de los cromatogramas de seis mujeres normales.

Caso # 7.- 16 años.- I.- Cromatograma de altura normal, separación defectuosa de la fracción beta, predominio en la eliminación de epiandrosterona, dihidroepiandrosterona y 11-oxi-17-cetoesteroides; escasa excreción de 5-Isoandrosterona.

II.- Cromatograma de altura normal, aumento uniforme en la excreción de todos los esteroides, persistiendo escasa la excreción de 5-Isoandrosterona.

Caso # 8.- 27 años.- I.- Cromatograma de altura normal, separación defectuosa de la fracción beta, predominio en la excreción de epiandrosterona y dihidroepiandrosterona, escasa

dominio importante en la eliminación de epiandrosterona.-
(Gráfica 4).

Caso # 12.- 22 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio en la excreción de dehidroepiandrosterona y androsterona, siendo escasa la eliminación de epiandrosterona.

II.- Cromatograma de altura normal, aumento uniforme en la excreción de todos los esteroides, predominio de la androsterona conservándose baja la excreción de epiandrosterona.

II.- RESULTADOS EN PERSONAS HIPERTENSAS.

Estudio de los cromatogramas de cinco hombres hipertensos.

Caso # 13.- 43 años.- I.- Cromatograma de altura, más baja que en los normales, predominio en la excreción de androsterona, 5-Isoandrosterona y 11-oxi-17-cetoesteroides; la eliminación de los esteroides que forman la fracción beta se encuentra notablemente disminuida.

II.- Cromatograma bajo, con respuesta positiva en la excreción de dehidroepiandrosterona, 5-Isoandrosterona y 11-oxi-17-cetoesteroides, manteniéndose baja la eliminación de epiandrosterona.

Caso # 14.- 52 años.- I.- Cromatograma bajo, separación defectuosa de la fracción alfa, predominio en la excreción de androsterona, 5-Isoandrosterona y 11-oxi-17-cetoesteroides, siendo muy escasa la eliminación de los esteroides que constituyen la fracción beta.

II.- Cromatograma bajo, respuesta pobre, perciste escasa la eliminación de la fracción beta, disminución en la -
##

sa eliminación de 5-Isoandrosterona.

II.- Cromatograma de altura normal; encontramos invertida la proporción que existía en el cromatograma inicial y en éste predomina la fracción alfa, siendo la androsterona el esteroide que más se elimina, con un aumento notable en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides y en menor proporción aumento de 5-Isoandrosterona.

Caso # 9.- 39 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio en la excreción de androsterona y 11-oxi-17-cetoesteroides, y baja eliminación de dehidroepiandrosterona.

II.- Cromatograma de altura normal, aumento en la excreción de los esteroides que forman la fracción alfa, sobre todo la androsterona y en menor proporción aumento de 5-Isoandrosterona y 11-oxi-17-cetoesteroides, persiste -- la eliminación baja de dehidroepiandrosterona.

Caso # 10.- 27 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio en la excreción de dehidroepiandrosterona y 5-Isoandrosterona con regular excreción del resto de los esteroides.

II.- Cromatograma de altura normal, aumento en la excreción de los esteroides predominantes en el anterior, con un máximo de eliminación para la 5-Isoandrosterona.

Caso # 11.- 22 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio de la androsterona y excreción uniforme del resto de los esteroides excepto la epiandrosterona que se encuentra en poca cantidad. (Gráfica 3).

II.- Cromatograma de altura normal, con aumento uniforme en la excreción de todos los esteroides, existiendo un -

excreción de 5-Isoandrosterona y aumento exclusivamente en los 11-oxi-17-cetoesteroides.

Caso # 15.- 63 años.- I.- Cromatograma bajo, predominio en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides, escasa - eliminación del resto de los esteroides sobre todo de los que constituyen la fracción beta. (Gráfica 5).

II.- Cromatograma bajo, respuesta pobre, aumento importante en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides exclusivamente. (Gráfica 6).

Caso # 16.- 50 años.- I.- Cromatograma bajo, predominio en la excreción de la fracción alfa y 11-oxi-17-cetoesteroides, escasa eliminación de los esteroides que forman la fracción beta. (Gráfica 7).

II.- Cromatograma bajo, respuesta positiva intensa para la eliminación de 11-oxi-17-cetoesteroides, a expensas de los demás esteroides que disminuyen. (Gráfica 8).

Caso # 17.- 52 años.- I.- Cromatograma de altura normal, predominio de la fracción beta y de los 11-oxi-17-cetoesteroides, muy escasa excreción de los esteroides que forman la fracción alfa.

II.- Cromatograma de altura normal, respuesta positiva con aumento importante en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides, muy escasa eliminación de los esteroides que forman la fracción alfa.

Estudio de los cromatogramas de cinco mujeres hipertensas.

Caso # 18.- 62 años.- I.- Cromatograma casi plano, con muy escasa eliminación de todos los esteroides.

II.- Cromatograma bajo, con respuesta pobre, aumento sensible en la eliminación de androsterona y 11-oxi-17-cetoesteroides ##

roides.

Caso # 19.- 58 años.- I.- Cromatograma bajo, predominio en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides.

II.- Cromatograma bajo, respuesta pobre en la eliminación de todos los esteroides.

Caso # 20.- 25 años.- I.- Cromatograma de altura normal, sin separación de los esteroides que forman la fracción alfa, muy escasa eliminación de la fracción beta, existe un predominio importante en la excreción de androsterona y 5-Isandrosterona que se confunden en un mismo pico.- (Gráfica 9).

II.- Cromatograma de altura normal, sin separación de la fracción alfa, sin cambio en la excreción de los esteroides que constituyen la fracción beta y con aumento importante en la eliminación de 11-oxi-17-cetoesteroides, persiste el predominio de la androsterona. (Gráfica 10).

Caso 21.- 48 años.- I.- Cromatograma muy bajo, predominio en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides, el resto de los esteroides se encuentran en muy poca cantidad.

II.- Cromatograma bajo, respuesta uniforme con aumento en la excreción de todos los esteroides pero sobre todo para los 11-oxi-17-cetoesteroides.

Caso # 22.- 51 años.- I.- Cromatograma bajo, predominio de la androsterona y muy escasa eliminación de los esteroides que forman la fracción beta. (Gráfica 11).

II.- Cromatograma bajo, respuesta pobre, aumento en la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides, sin aparecer ningún cambio apreciable en la fracción beta. (Gráfica 12).

Valor estadístico. - Se hizo un cálculo del promedio -
##

de recuperación total y se obtuvo una cifra de 85.5%.

El análisis final fue hecho en forma estadística, sacando la media aritmética de las proporciones obtenidas para una fracción determinada en los casos pertenecientes a un mismo grupo. (Lámina III).

MUJERES NORMALES, antes del ACTH.

No.	Mgts. Usados	Mgts. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
7	.560	.500	89.2	7.3	28.0	21.5	13.0	8.4	15.8	6.0
8	.780	.678	86.9	10.3	31.8	21.0	11.0	4.7	13.0	8.2
9	.700	.632	90.2	6.0	12.3	3.1	24.4	9.8	30.4	14.0
10	1.020	.884	87.2	7.6	10.5	28.0	11.4	23.0	13.6	5.9
11	1.080	1.000	92.5	6.8	6.4	19.6	26.2	16.3	15.2	9.5
12	1.224	1.067	87.1	5.2	6.0	23.4	31.5	11.9	16.5	5.5
				7.2	16.0	19.5	19.5	12.3	17.4	8.1

MUJERES NORMALES, después del ACTH.

No.	Mgts. Usados	Mgts. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
7	.620	.525	84.6	6.0	28.0	21.0	12.8	9.5	15.7	7.0
8	.954	.793	83.1	4.7	9.0	6.0	25.7	18.5	21.5	14.6
9	1.422	1.200	84.3	5.2	7.7	5.5	31.4	27.4	17.0	5.5
10	1.260	1.185	94.0	7.6	7.6	21.4	15.5	23.5	17.7	6.7
11	1.400	1.447	103.3	4.0	22.3	13.5	12.7	20.3	15.3	7.2
12	1.380	1.137	82.3	3.0	5.1	19.0	29.0	14.5	15.0	9.4
				6.8	13.6	14.4	21.2	18.6	17.0	8.4

HOMIENES HIPERTENSOS. Antes del ACTH.

No.	Mgns. Usados	Mgns. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
13	.670	.440	65.6	10.4	8.2	15.5	21.8	22.5	15.7	5.9
14	.476	.391	82.1	4.0	11.2	9.7	27.1	20.9	20.6	6.5
15	.850	.364	80.8	10.3	10.6	13.0	23.8	9.0	26.4	6.9
16	.325	.237	72.9	28.6	9.9	6.5	13.6	17.4	15.0	9.0
17	.340	.254	72.4	11.8	37.0	16.9	8.6	5.4	14.1	6.2
				13.0	15.5	12.4	18.9	15.0	18.3	6.9

HOMIENES HIPERTENSOS. Después del ACTH.

No.	Mgns. Usados	Mgns. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
13	.690	.591	85.6	7.0	9.5	14.0	19.4	31.5	11.8	6.8
14	.500	.377	75.4	10.9	14.6	10.3	21.1	17.8	20.6	4.7
15	.570	.454	79.6	6.5	9.1	12.3	22.0	9.6	34.6	5.9
16	.560	.470	84.0	13.0	11.0	8.8	7.9	9.2	40.0	10.1
17	.375	.305	81.3	8.0	30.2	16.3	12.1	8.0	18.6	6.8
				9.1	15.0	12.3	16.5	15.2	25.1	6.8

MUJERES HIPERTENSAS. Antes del ACTH.

No.	Mgms. Usados	Mgms. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
18	.200	.149	74.7	20.2	12.8	18.0	10.3	8.4	10.5	19.8
19	.305	.235	77.0	9.0	17.8	13.0	8.5	11.7	26.0	14.0
20	.800	.624	78.0	10.0	8.0	9.0	12.0	12.0	14.0	5.0
21	.275	.203	74.0	15.0	14.0	9.0	10.0	8.0	30.0	14.0
22	.300	.197	65.8	13.9	10.9	12.7	28.8	13.0	16.8	3.9
				13.6	12.8	12.4	19.9	10.6	19.4	11.3

MUJERES HIPERTENSAS. Después del ACTH.

No.	Mgms. Usados	Mgms. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
18	.405	.236	58.2	14.5	7.8	9.5	15.0	13.5	25.0	14.7
19	.390	.276	70.7	16.5	18.0	14.8	15.0	7.9	19.1	8.7
20	1.000	.662	66.2	6.0	7.0	9.5	29.5	12.0	30.5	5.5
21	.495	.359	72.5	10.0	10.0	12.0	18.0	16.0	17.0	17.0
22	.380	.257	67.7	10.0	9.1	7.6	27.0	13.5	28.0	4.8
				11.4	10.4	10.8	20.9	12.5	23.9	10.1

CAPITULO IV
D I S C U S I O N .

Se sabe que las técnicas de cromatografía en micro-columna de alúmina presentan algunas causas de error, como son, - la interferencia de cromógenos que eluyen principalmente en las fracciones correspondientes a dehidroepiandrosterona y - androsterona y las transformaciones que sufren los 17-ceto-esteroides durante la hidrólisis ácida, lo que origina cambios en su polaridad, característica fundamental para la separación cromatográfica.

Sin embargo, se ha encontrado que esta técnica permite - abordar el estudio del funcionamiento suprarrenal y en algunos casos proporcionarle ayuda al clínico y al investigador, pues se observaron:

10.- Diferencias en la excreción de 17-cetoesteroides urinarios en sujetos normales e hipertensos, encontrándose se cifras más bajas para éstos últimos y una respuesta inferior al estímulo con ACTH.

20.- En los casos de hipertensión predomina la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides.

30.- En el caso # 20 hay un predominio importante-- en la excreción de androsterona y aumento en su eliminación-- después de la administración de ACTH, éste comportamiento - anormal puede explicarse porque se trataba de una mujer cuya hipertensión arterial se acompañaba de hirsutismo.

De donde, con las debidas reservas, se puede concluir - que mediante esta técnica hay posibilidad de identificar algunos tipos de patología suprarrenal que acompañen a la hipertensión y éstos resultados parecen permitir al clínico un

estudio más preciso, que lo acerque al supuesto origen suprarrenal de ciertos casos de hipertensión arterial.

En los sujetos hipertensos se encuentra en general una excreción pobre de esteroides y las cápsulas suprarrenales son capaces de responder al estímulo con ACTH aumentando la excreción de 11-oxi-17-cetoesteroides, superior a los normales. Se puede interpretar como expresión de un posible trastorno en el metabolismo enzimático de los esteroides, que los encamina a la producción selectiva de hormonas más oxigenadas, siendo las hormonas de acción hipertensiva compuestos de 21 carbonos con oxigenación de importancia.

CAPITULO V
CONCLUSIONES.

10.- No se encontraron diferencias específicas en la excreción de 17-cetoesteroides para cada sexo.

20.- Todos los sujetos normales presentaron respuesta positiva al estímulo con ACTH.

30.- La excreción de 5-Isoandrosterona es superior en las mujeres que en los hombres, esto se hace más patente después de la aplicación de la hormona.

40.- En los sujetos hipertensos se encuentra menor cantidad de 17-cetoesteroides totales y una respuesta pobre en casi todos los casos al estímulo con ACTH.

50.- En los casos de hipertensión, la excreción de los esteroides que constituyen la fracción beta se encuentra notablemente disminuida, predominando la eliminación de 11-oxi-17-cetoesteroides que se acentúa después de la administración de la hormona.

HOMBRES NORMALES, Antes del ACTH.

No.	Mgms. Usados	Mgms. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
1	.872	.752	86.2	15.0	16.0	14.0	23.0	9.5	18.0	4.5
2	1.000	.757	75.7	5.4	11.1	16.3	23.4	12.9	20.6	10.3
3	.800	.678	84.7	11.0	10.0	24.0	32.5	5.0	13.0	4.5
3	.920	.771	77.2	12.3	45.3	18.5	7.7	2.6	7.4	6.2
5	.665	.551	82.8	9.8	34.3	19.2	15.4	4.5	10.7	6.1
6	.558	.720	77.5	11.1	20.8	18.0	14.5	4.8	10.2	10.6
				10.7	24.7	18.4	19.4	6.5	13.3	7.0

HOMBRES NORMALES, Después del ACTH.

No.	Mgms. Usados	Mgms. Recup.	% de Recup.	Tanto por ciento por fracción.						
				I	II	III	IV	V	VI	VII
1	1.494	1.302	87.5	14.0	13.0	13.5	22.0	9.0	21.5	7.0
2	1.060	.866	76.0	3.8	5.6	10.0	33.5	15.0	21.0	11.1
3	1.460	1.302	85.5	7.0	9.5	25.0	31.5	7.5	14.5	5.0
4	1.200	1.038	86.5	17.1	36.0	20.9	9.0	3.1	7.5	6.4
5	1.240	1.000	80.6	19.7	36.9	18.6	13.9	4.3	10.9	4.7
6	1.350	1.234	91.4	9.6	38.0	21.0	11.8	4.2	10.0	5.4
				10.3	23.3	18.3	20.2	7.1	14.2	6.6

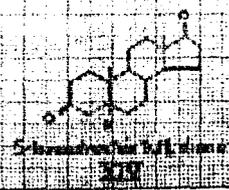
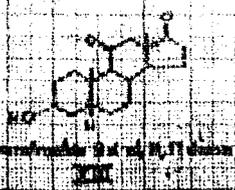
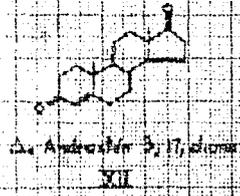
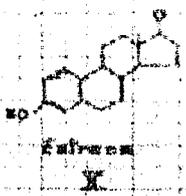
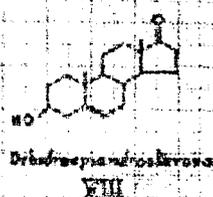
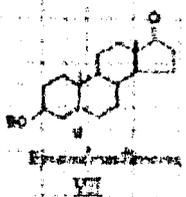
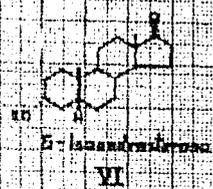
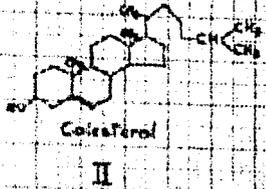
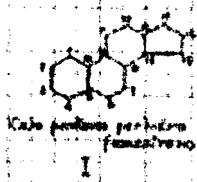
CAPITULO VI

B I B L I O G R A F I A .

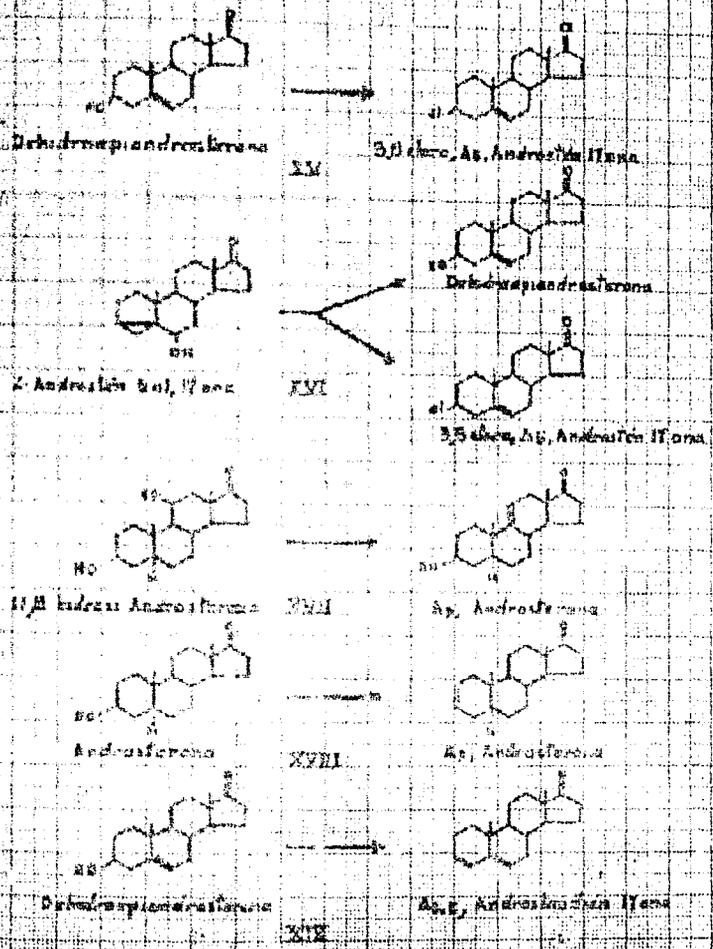
- 1.- Wilkins, R.; Carlson, L.; Qualitative studies of neutral 17-ketosteroids in normal subjects. *J. Clin. Endocrinol* 12; 647; 1952.
- 2.- Manual de Laboratorio de Hormonas. Hospital de las Enfermedades de la Nutrición. 1954.
- 3.- Thorn, G.; Diagnosis and Treatment of Adrenal Insufficiency. Second Edition. 55.1951.
- 4.- Dorfman, R.; Shipley, R.; 17-cetoesteroides en la orina humana. *Progresos de la Endocrinología Clínica*. 220; - 1951.
- 5.- Seyle, H.; *Endocrinología*. 49. 1952.
- 6.- Mason, H.; Engstrom, W.; The 17-ketosteroids: Their origin, determination and Significance. *Physiol. Rev.* 30; 321; 1950.
- 7.- Lieberman, S.; Dobriner, E.; et al.; Identification and characterization of ketosteroids isolated from urine of healthy and diseased persons. *J. Biol.Chem.* 172;263;1948.
- 8.- Lieberman, S.; Praetz, B.; et al.; Isolation of three - new steroid triols from humane urine. *J. Biol. Chem.* - 204; 491. 1953.
- 9.- Dingemans, E.; Huis in't Veld, L.; et al.; "17-ketosteroid II" Isolated from urine; its reaction with hydrochloric acid. *Nature*. 162; 492. 1948.
- 10.- Dingemans, E.; Huis in't Veld, L.; et al.; Clinical method for the chromatographic colorimetric determination of urinary 17-ketosteroids. II. Normal adults. *J. Clin. Endocrinol.* 12; 66; 1952.
- 11.- Fieser & Fieser. *Organic Chemistry*. Second edition, 992. (1953.)

- 12.- Azuara, M.E.; Micro-método para el fraccionamiento de Alfa y Beta 17-cetoesteroides. Tesis profesional. Facultad de Química. 1953.
- 13.- Dobriner, A.; Lieberman, S.; Rhoads, C.; Methods for the isolation and quantitative estimation of neutral steroids present in humane urine. J. Biol. Chem. 172; 241; 1948.
- 14.- Zygmuntowicz, A.; Wood, M.; et al.; Studies of urinary 17-ketosteroid excretion by means of a new micro-chromatographic fractionation procedure. J.Clin. Endocrinol. 11; 578; 1951.
- 15.- Pond, H.; A. micro-chromatographic method for the separation of certain fractions of 17-ketosteroids in humane urine. Lancet. 261; 906; 1951.
- 16.- Escárcega, A.; Evaluación de la técnica para la separación cromatográfica de ceto-17-esteroides en micro-columna de alúmina. Tesis profesional. Facultad de Química. 1953.
- 17.- Pincus, G.; A diurnal rhythm in the excretion of urinary ketosteroids by young men. J. Clin. Endocrinol. 3; 195; 1943.
- 18.- Pond, H.; 17-ketosteroid fractionation studies by a micro-chromatographic technique in endocrine disorders. J. of Endocrinol. 10; 202; 1954.

LAM I



ALGUNAS TRANSFORMACIONES QUE SUFREN LOS 17-CETOSTEROIDES POR HIDROLISIS ACIDA



ANTES DEL ACTH

DESPUES DEL ACTH

LAM. 3

PROPORCION POR GRUPO

PROPORCION POR GRUPO



Mayor en niños de Espondiloma, hiperteremia y Diabetes mellitus; menor en la hipertensión arterial en el material que muestra sus alteraciones.



Mayor en niños de hipertensión arterial, menor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.

HOMBRES NORMALES

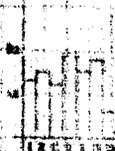


En hipertensión arterial y en Diabetes mellitus; menor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.



Mayor en la hipertensión arterial, menor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.

MUJERES NORMALES



Mayor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.



Mayor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.

HOMBRES HIPERTENSOS



Mayor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.

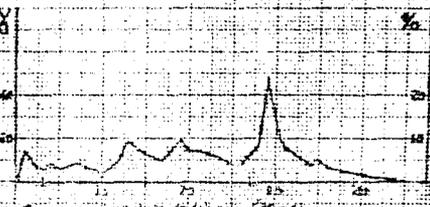
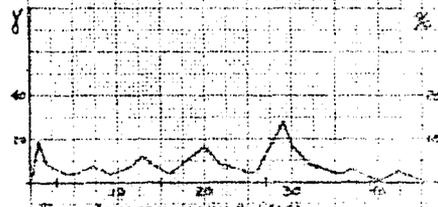
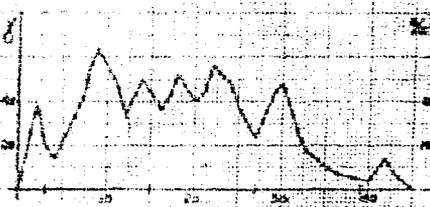
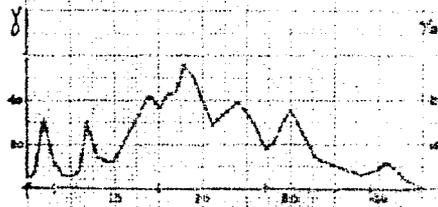
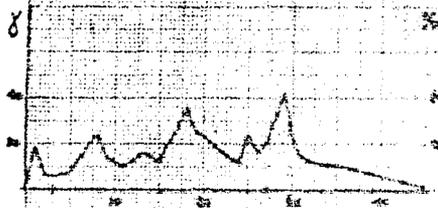


Mayor en la hipertensión arterial y en los hipertensos tratados.

MUJERES HIPERTENSAS

ANTES DEL ACTH

DESPUES DEL ACTH

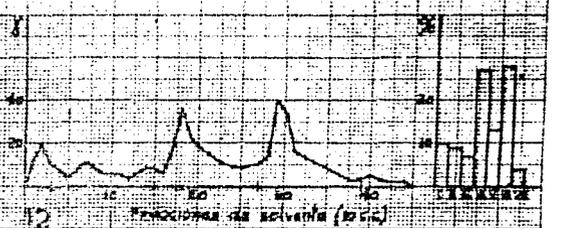
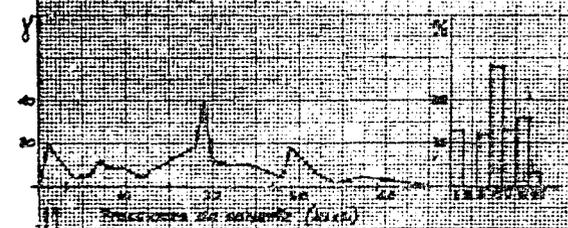
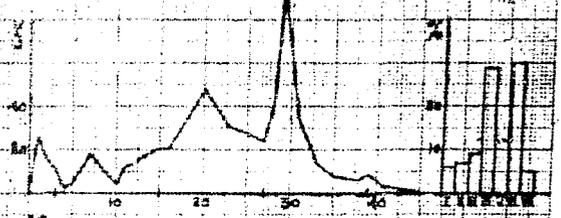
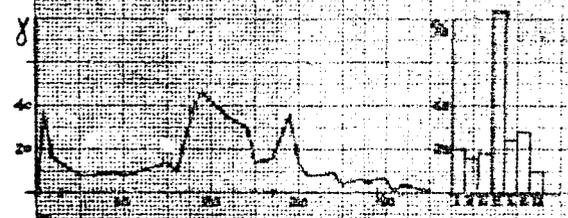
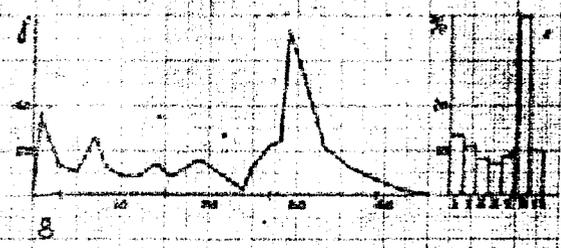
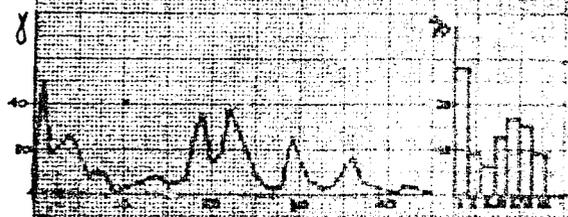


5

6

ANTES DEL ACTH

DESPUES DEL ACTH



Reacciones de suero (A11C)

Reacciones de suero (B11C)

