

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

*El uso de Isotopos Radioactivos en el estudio
de los procesos de Biosintesis de las Hormonas Androgénicas*

*Trata que para obtener el título de
Químico (Farmacéutico Biólogo*

presenta:

Ana Elena Lemus Bravo

México, D. F., 1963.



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.



*El uso de Isotopos Radioactivos en el estudio
de los procesos de Biosintesis de las Hormonas Androgénicas*

Ana Elena Lemus Prado

1963.

A la Memoria de mi Padre

A mi Madre y a mi Hermano

Al Sr. C.P.T. Francisco Castellanos

Al Sr. Guillermo Bedolla

**A la Rev. Madre Ma. Guadalupe Camarena
Directora de la Facultad de Química de
la Universidad Motolinía**

A mis Maestros

Agradesco al señor Dr. Salvador Kubizán,
Director del Hospital de Enfermedades de
la Nutrición, por sus recomendaciones que se
me dieron para la elaboración de esta tesis,
así como al Sr. Dr. Carlos Gual, Jefe
del Laboratorio de Endocrinología del
Departamento de Bioquímica de esta institución,
quien supervisó y dirigió mi trabajo.

I N D I C E

CAPITULO I.

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE NOMENCLATURA Y ESTEREOQUIMICA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

VIAS METABOLICAS EN LA BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS ANDROGENICAS

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODO

1.- Incubación y Extracción.

2.- Purificación.

3.- Cromatografía en papel. Generalidades.

- Técnicas y Aparatos.

A.- Preparación de hojas y tiras de papel.

B.- Impregnación del papel con la fase estacionaria

C.- Técnica de aplicación de los compuestos en los papeles.

D.- Preparación de las cámaras cromatográficas.

E.- Métodos para la detección de esteroides en los cromatogramas.

Reacciones de color

Absorción de luz ultravioleta.

F.- Elución de compuestos de los cromatogramas.

4.- Determinación de compuestos marcados con C^{14} y H^3 .

A.- Centelleo Líquido.

5.- Localización de metabolitos radioactivos en cromatogramas de papel.

6.- Identificación de metabolitos radioactivos. Criterio.

CAPITULO III.

RESULTADOS

CAPITULO IV.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

CAPITULO V.

RESUMEN

CAPITULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CAPITULO I

CAPITULO I.

INTRODUCCION

Las hormonas esteroides son compuestos que tienen en común la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno y que, debido a sus diferentes efectos fisiológicos, se han dividido en glucocorticoides, entre los que se encuentra de manera importante a la hidrocortisona, mineralocorticoides, es decir, aquéllos que intervienen en la regulación de los electrolitos y cuyos principales representantes son la aldosterona y la desoxicorticosterona, y por último un grupo de hormonas sexuales que comprenden compuestos progestacionales, andrógenos y estrógenos.

En el presente estudio solo trataremos aquellos problemas relacionados con la síntesis de las hormonas androgénicas, las que, en términos generales, están constituidas por compuestos de 19 átomos de carbono, ó sea, que son derivados del androstano.

En la corteza suprarrenal estos compuestos están representados fundamentalmente por la dehidroepiandrosterona, la androstendiona y la adrenosterona. De estas hormonas, la dehidroepiandrosterona, posiblemente sea la que reviste mayor importancia, ya que recientemente se ha sugerido que es el principal andrógeno producido por la corteza suprarrenal y por consiguiente sería el precursor de la mayor parte de los

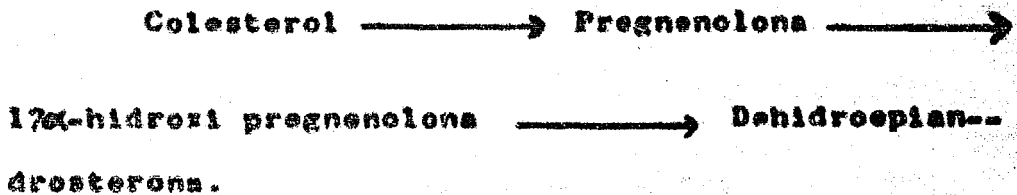
17-cetoesteroides que se encuentran en la orina.

Ya desde 1938 Callow y Callow (1) sugirieron que la dehidroepiandrosterona (DHA) se originaba en la corteza suprarrenal. Durante muchos años el origen de esta hormona permaneció en la obscuridad, pero en 1950, Migeon y Plager (2) aportaron mayores datos para sostener esta idea, al informar su aislamiento de la fracción hidrolizada del plasma humano. Unos cuantos años más tarde Oertel y Kik-Nes (3,4) aislaron en sangre venosa suprarrenal un complejo formado por DHA y ácido fosfórico; Lombardo y colaboradores (5) informaron el aislamiento de la forma libre, y recientemente Baulieu (6) demostró en sangre suprarrenal al esteroide conjugado con ácido sulfúrico.

A pesar de los esfuerzos para aislar esta hormona en el tejido suprarrenal, no fue sino hasta 1957 - cuando Plantin y colaboradores (7) informaron el aislamiento e identificaron la forma libre de la dehidroepiandrosterona en un tumor de la corteza. Por último Baulieu (8) en 1960, demostró en un tumor suprarrenal que este esteroide se encuentra conjugado fundamentalmente como sulfato.

La biosíntesis de la DHA en la corteza suprarrenal puede llevarse a cabo a partir de acetato como ha sido demostrado e inferido por Bloch y colaboradores

(10). En 1953 Lieberman y Teich (11) indicaron un camino metabólico para la conversión del colesterol a dehidroepiandrosterona, el cual estaría representado de la siguiente manera:



También existe la posibilidad de este compuesto de 19 átomos de carbón se forme parcialmente a partir del colesterol sin ir a través de un intermediario de 21 átomos de carbón del tipo de la pregnenolona, tal y como informan Goldstein y col. (12).

El uso de isótopos radioactivos de diferente energía, como se observa con los esteroides marcados con ^{14}C y ^3H , nos permitió en el presente trabajo estudiar las vías metabólicas que se presentan durante la biosíntesis de esta hormona androgénica en un tumor virilizante de la corteza suprarrenal y el poder establecer una metodología de grandes posibilidades en el estudio de los diferentes procesos que se presentan en el metabolismo intermedio del organismo humano.

Con objeto de facilitar el análisis de todos los resultados y procedimientos empleados, será con-

veniente hacer una breve introducción sobre las generalidades de nomenclatura y estereoquímica de las -- hormonas esteroides, así como el describir las principales reacciones metabólicas que se suceden durante la síntesis de los compuestos androgénicos. Por otro lado se dará gran importancia a los procedimientos y metodología empleada en este estudio.

GENERALIDADES SOBRE NOMENCLATURA Y ESTEREOQUINICA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Los esteroides forman un grupo de sustancias de gran importancia biológica, que tienen en común el poseer como núcleo químico básico el ciclopentano perhidrofenantreno. Dentro de este grupo encontramos compuestos como el colesterol, ácidos biliares, hormonas adrenocorticales, estrógenos, hormonas progestacionales, etc.

Para facilitar la escritura común de estos compuestos, en las fórmulas se omiten los átomos de hidrógeno que saturan a los de carbón, representándose como puede verse en la figura 1.

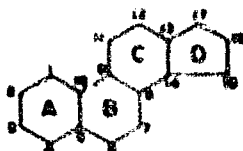


Figura 1.

Los átomos de carbón se enumeran con números arábigos progresivos y los anillos se designan como A, B, C y D, siendo este último un anillo de 5 átomos de carbón a diferencia de los otros tres que están formados por 6 átomos.

El grupo de las hormonas esteroides que contiene el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno derivan fundamentalmente de tres hidrocarburos básicos que son: pregnano, androstano y estrano.

Los compuestos derivados del pregnano tienen 21 átomos de carbón y de éstos el 18 y 19 están unidos a los átomos 13 y 10 respectivamente. Los carbonos 20 y 21 constituyen la cadena lateral que se desprende del carbón 17 del anillo D. Figura 2.

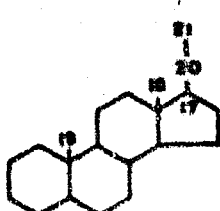


Figura 2.

Los compuestos derivados del androstano tienen 19 átomos de carbón y no poseen la cadena lateral presente en los compuestos derivados del pregnano. Figura 3.

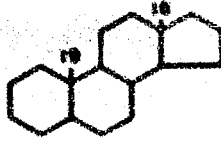


Figura 3.

Los esteroides que derivan del estrano no poseen el metilo angular unido al carbón 10 y por lo tanto tienen 18 átomos de carbón. Figura 4.

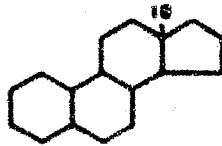


Figura 4.

Podemos considerar a la molécula esteroide en un solo plano y a los metilos angulares hacia arriba y - perpendiculares a él. La representación de cualquier otro grupo químico substituyente en el núcleo se considerará que se encuentra por arriba ó por abajo de este plano, y estará en relación directa con los metilos angulares antes mencionados. Estas substituciones, como en el primer caso, se representan unidas al carbón respectivo por una línea continua, denominándose posición beta (β). Cuando la substitución se encuentra hacia abajo del plano de la molécula, ésta se representa por una línea interrumpida y se denomina posición alfa (α). Figura 5.

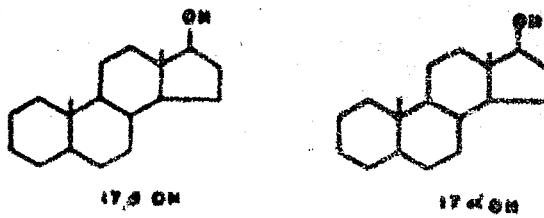


Figura 5.

Los metilos angulares, que se encuentran en todos los esteroides en posición beta, sirven como referencia para establecer el tipo de unión que presentan entre sí los cuatro anillos del núcleo básico. Hay dos posibilidades en la unión de los anillos A y B y se denominan forma "Cis" y "Trans". En la primera, el hidrógeno que satura al carbono 5 se encuentra hacia arriba del plano del papel, es decir en posición beta y cis con respecto al metilo angular del carbono 10. - Figura 6.

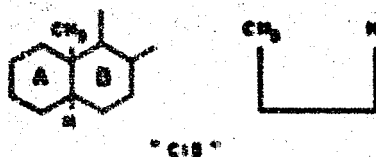


Figura 6.

En todos los esteroides naturales los tipos de unión que presentan los anillos B y C, y C y D, son trans. Figura 7.

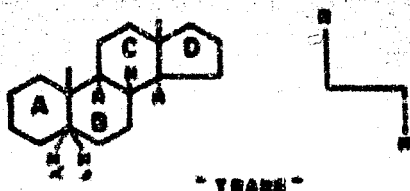


Figura 7.

En la química de esteroides los anillos que forman el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno están formados por 6 átomos de carbón de manera semejante al ciclohexano, que puede asumir conformaciones diferentes denominadas, en "silla" y en "bote".

Figura 8.

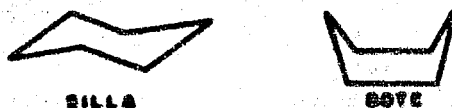


Figura 8.

De éstas, la conformación en "silla" es mucho más estable y es la que se encuentra en la mayoría de los compuestos esteroides.

Las valencias de los 6 átomos de carbón en el anillo del ciclohexano son de dos tipos: unas están más o menos en el mismo plano general del anillo y

son llamadas "ecuatoriales", y otras son perpendiculares a este plano y reciben el nombre de "axiales". Figura 9.



Figura 9.

Debido a que las distancias interatómicas que existen entre cualquier par de grupos axiales son pequeñas, cualquier compuesto que tenga un grupo de sustitución axial es menos estable que el compuesto correspondiente que tiene un sustituyente ecuatorial y en el que las repulsiones entre estas moléculas son mínimas.

A este respecto D. H. R. Barton (13,14) ha propuesto reglas generales en relación a la estabilidad y facilidad para reaccionar de los sustituyentes ecuatoriales y axiales, que en la metodología que hemos empleado en el presente trabajo tienen una gran aplicación práctica en lo relacionado a la purificación de los diferentes compuestos esteroides en los sistemas cromatográficos en papel.

La nomenclatura de estos compuestos presenta algunas variaciones, debido a que existen varios tipos de nombres con los que se puede designar a un esteroide. En primer lugar tenemos el nombre "trivial", el que de una manera práctica y rápida sirve para designar al compuesto, aunque tiene el inconveniente de -- que no indica nada sobre la estructura del esteroide, v.gr., testosterona, progesterona, etc.

El segundo tipo de nombre es el denominado "semi trivial" y toma como base el nombre trivial, pero --- agregando ciertas modificaciones que presenta el compuesto a que se refiere, por ejemplo, 17 α -hidroxipregnenolona, lo cual nos indica que a la pregnenolona se le ha añadido un grupo alcohólico en la posición 17 α .

Por último tenemos el nombre "sistemático", que es el que verdaderamente indica la estructura del compuesto. Para esto es necesario seguir ciertas reglas que se mencionarán a continuación. A manera de ilustración analizaremos el nombre sistemático de compuestos derivados de los tres hidrocarburos básicos, ó -- sean el estrano, androstano y pregnano.

Si tomamos como ejemplo a la hidrocortisona, nos damos cuenta que se trata de un compuesto de 21 átomos de carbón y por lo tanto es un derivado del pregnano. Figura 10.

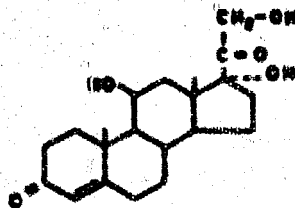


Figura 10.

El nombre de este hidrocarburo básico nos servirá para establecer el nombre sistemático de este compuesto. Cualquier doble ligadura ó punto de insaturación que presente el núcleo, hará cambiar la terminación "ano" del nombre del hidrocarburo básico por la terminación "eno" en caso de ser una sola doble ligadura, "dieno" si existen dos, "trieno" cuando hay tres y así sucesivamente. En el caso del compuesto que vamos a analizar, ó sea el de la hidrocortisona, la doble ligadura que presenta entre los átomos de carbón 4 y 5, hace que el nombre sea el "pregneno". Para indicar la posición de la doble ligadura, se designa al carbón de número menor de donde parte, que en este caso será el carbón 4 y se escribe inmediatamente antes del nombre de pregneno. En cuanto a los grupos de sustitución, que se presentan en la mayor parte de los esteroides, pueden mencionarse como prefijos ó como sufijos del hidrocarburo básico. Los

substituyentes químicos más comunes se expresan en el cuadro No. I.[†]

[†] Tomado de W. Klyne, The Chemistry of the Steroids. Methuen and Co. LTD. London 1957.

C U A D R O No. I

GRUPO	PREFIJO	SUFIXO
Doble enlace olefinico C=C	-----	eno
Triple enlace C≡C	-----	ino
Acetato, .O.CO.CH ₃ (OAc)	Acetoxi	il acetato
Hidroxilo, .OH	Hidroxi	ol
Benzoato, .O.CO.C ₆ H ₅ (B ₂)	Benzoiloxi	il benzoato
Carbonilo, C=O	Oxo (↓)	ona
Acido Carboxílico, .CO ₂ H	Carboxi	cico
Ester Carboxílico	Metoxicarbonil (↓↓)	metil..... onte
Epóxido -O-	Epoxi	-----
Cl (ú otros halógenos)	Cloro, etc.	-----
Amina, .NH ₂	Amino	amina

(↓) Antiguamente "ceto"

(↓↓) Antiguamente "carbometoxi"

El tipo de substitución, que se designa como su-
fijo, se escoge de acuerdo con el siguiente orden de
prioridad: ácido carboxílico (ó sus derivados inclu-
yendo ésteres), carbonilo, alcohol, amina y éter. --
Los halógenos siempre se representan por un prefijo.

En la hidrocortisona los grupos químicos de sub-
stitución son exclusivamente carbonilos y alcoholes, y
de acuerdo con el arreglo de prefijos y sufijos los
grupos carbonilos tienen prioridad y son los únicos
que se colocan después del nombre básico y reciben el
nombre "ona", "diona", "triona", etc., de acuerdo con
el número de carbonilos presentes. Además se pone an-
tes del sufijo el número del átomo de carbón donde se
encuentra. En el caso de la hidrocortisona quedaría:
4-pregneno-3,20-diona. Los grupos alcohólicos quedan
como prefijos denominándoseles "hidroxi", que en este
caso serían 11 β , 17 α , 21-trihidroxi.

Cuando no existe más substituyente que los gru-
pos alcohólicos, entonces se da el nombre de ol, diol,
triol, etc., según el número en que se encuentren pre-
sentes y se les coloca como sufijo.

Por lo tanto el nombre sistemático de la hidro-
cortisona, también llamada cortisona y compuesto "Y" -
(Kendall), sería el de 11 β , 17 α , 21-trihidroxi-4-preg-
neno-3, 20-diona.

Si ahora tomamos como ejemplo a la androsterona, podemos ver que este compuesto tiene como hidrocarburo básico al androstano, ya que es un esteroide de 19 átomos de carbón.

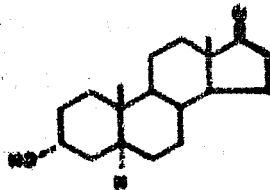


Figura 11.

La fórmula de la androsterona la tenemos en la figura 11. Este compuesto no tiene dobles ligaduras, por lo que la terminación será "ano". Tiene además un radical alcohólico en el carbón 3 y un grupo carbonilo en posición 17. De acuerdo con el uso de prefijos y sufijos el compuesto sería: ~~3~~-hidroxi-androstan-17-ona.

Es muy importante tomar en cuenta que el carbón 5 es un punto de isomería, en el cual existen dos posibilidades para el átomo de hidrógeno que lo satura. En la androsterona, el hidrógeno del carbón 5 se encuentra en posición "alfa", pero existe también la posibilidad de que se presente en posición "beta". En el primer caso la unión entre los anillos A y B es --

"trans" y esta conformación recibió durante algunos años el nombre de androstano. El otro isómero, es decir, el 5 beta, presenta un tipo de unión "cis", y para designarlo se utilizaba el nombre de etioicolano. Por lo tanto, antes de dar el nombre del compuesto es necesario hacer la aclaración de que se trata de un compuesto 5 "alfa" ó 5 "beta". En conclusión el nombre de la androsterona será: 1 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona.

Por último como representante de los derivados del estrano, es decir, aquellos compuestos que poseen un núcleo de 18 átomos de carbono, tenemos al estradiol. Figura 12.

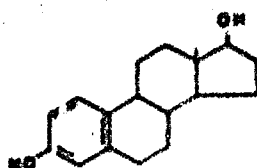


Figura 12.

Este compuesto tiene el anillo A, fenólico y un grupo alcohólico en el carbono 17 en posición "beta". De acuerdo con las reglas establecidas el nombre sistemático sería: 1,3,5(10) estratrieno-3,17 β -diol.

En este caso, cuando la doble ligadura no se encuentra entre átomos de carbón numericamente progresivos, por ejemplo entre los carbonos 5 y 10, la localización de la doble ligadura se representa en la siguiente forma: 5(10).

Con estos ejemplos será posible darse una idea de los reglamentos generales que hay que seguir, para designar por su nombre sistemático a todos los esteroides que se mencionarán en esta tesis, así como los que se usan dentro de la química de este grupo de substancias.

VÍAS METABÓLICAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS ANDROGÉNICAS

Anteriormente se mencionó que la dehidroepiandrosterona y en general todas las hormonas esteroides tienen como precursor común al acetato y al colesterol. Este último compuesto es el intermediario común de los esteroides y vale la pena mencionar algunas de las reacciones principales que se suceden durante su formación.

El acetato unido a la coenzima A reacciona con otra molécula semejante para dar lugar a la formación de la acetoxacetil coenzima A, la que, a través de una serie de reacciones más ó menos bien conocidas, conduce a la formación del ácido mevalónico (Figura 12).

compuesto que ha sido demostrado como intermediario importante en la biosíntesis del colesterol. El ácido mevalónico forma un pirofosfato, que más adelante constituye una unidad isoprenoide, capaz de reaccionar con otras y producir un compuesto de 30 átomos de carbón, que recibe el nombre de Escualeno (Figura 15). Este compuesto se cicliza formando Lanosterol, que por pérdida de tres metilos y algunas modificaciones en los puntos de insaturación, da lugar a la formación del colesterol (Figura 15).

Para mayores detalles deberá acudir a publicaciones especializadas (15,16,17,18).

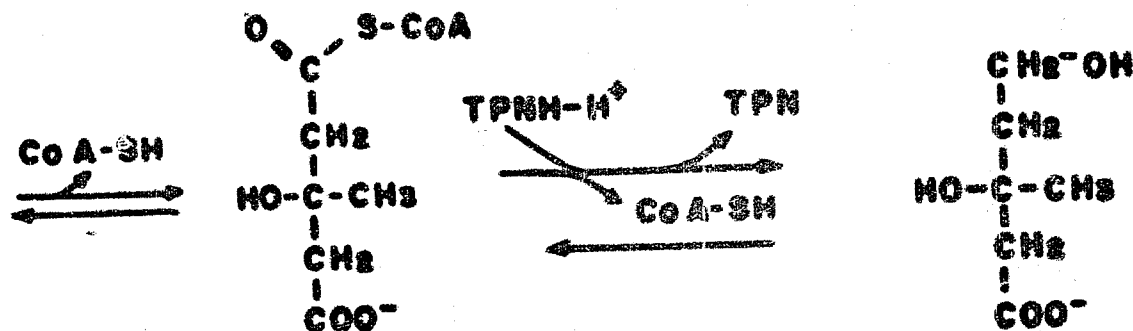
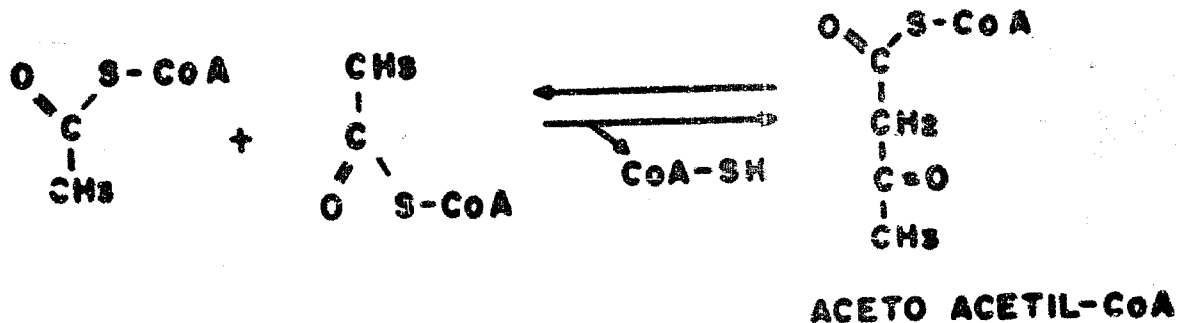


Figura 13.

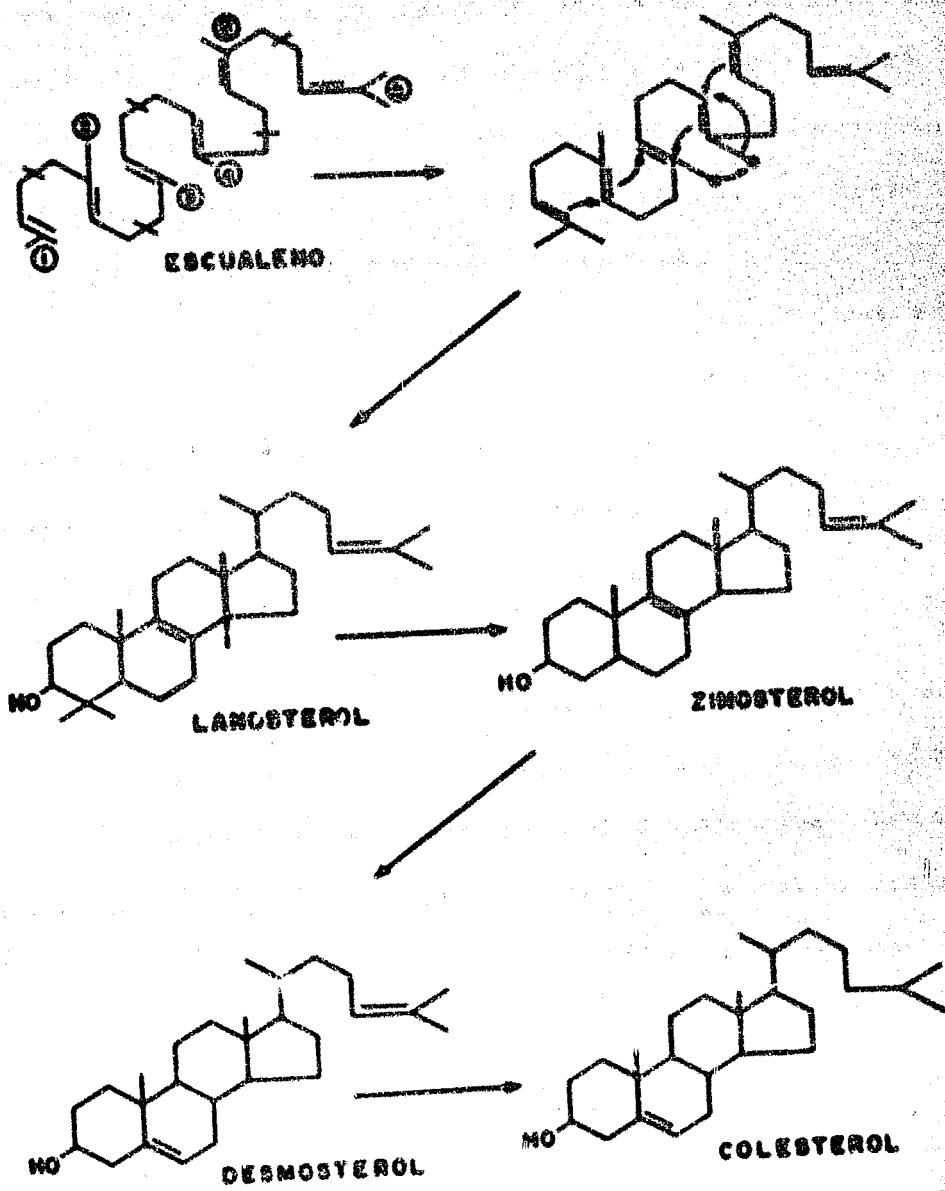
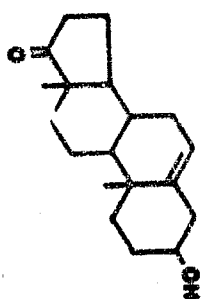
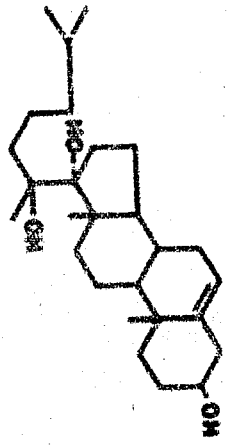
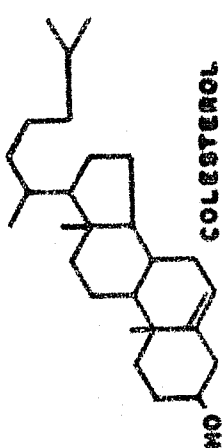


Figura 15.

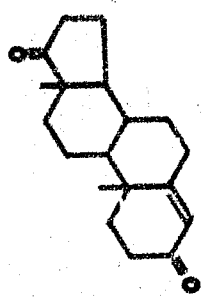
Ahora bien los caminos metabólicos que se presentan a partir del colesterol para la síntesis de los compuestos de 19 átomos de carbón, pueden seguir dos vías principales: la primera de estas se realizaría a través de compuestos de 21 átomos de carbón, como serían la pregnenolona ó la progesterona, y la segunda estaría representada por la transformación directa del colesterol a dehidroepiandrosterona.

En la figura 16 se sintetizan las reacciones enzimáticas que se presentan durante la biosíntesis de los principales andrógenos suprarrenales y de la testosterona, que es el andrógeno de mayor efecto fisiológico que se produce en las células de Leydig del testículo.

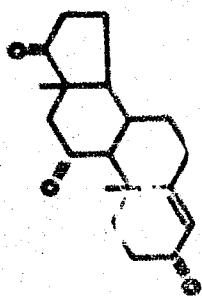
En la figura 17 se representa la segunda vía metabólica, que posiblemente ocurra durante la biosíntesis de la dehidroepiandrosterona ó de algunos otros compuestos androgénicos que presentan la estructura Δ^4 ceto, como son la androstendiona y la adrenosterona.



DEHIDROEPIANDROSTERONA



**4-ANDROSTENE
3,17-DIONA**



ADRENOSTERONA

Figura 17.

La demostración de estos dos caminos metabólicos será una de las metas principales en el presente estudio y, como ya se mencionó anteriormente, el uso de isótopos radioactivos de diferente energía será de gran utilidad para la resolución del problema.

CAPITULO II

CAPITULO II.

MATERIAL Y METODO

1.- Incubación y extracción.

La incubación realizada en el presente estudio se hizo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

10 gramos obtenidos de un tumor suprarrenal virilizante de 720 g. de peso¹, fue homogenizado durante 1 minuto en una licuadora y en 10 ml. de una solución de:

	Proporción
Solución amortiguadora de Fosfato 0.1 M pH 7.6	3
Fumarato al 2% pH 7.6	2
Sol. Acuosa de Nicotinamida al 1%	1
Sulfato de Magnesio heptahidratado al 25%	1

A este homogeneizado se agregaron:

22 μ M de Difosfopiridín-nucleótido (DPN).

29 μ M de Trifosfato de Adenosín (ATP).

20 μ M de Trifosfopiridín-nucleótido reducido (TPNH).

40 U.I. de HACT (Corticotrofina A de Wilson).

A la mezcla anterior se agregaron en 0.2 ml. de Propilénglicol, los siguientes substratos radioactivos¹¹:

50 μ c. de 3β -hidroxi-5pregnen-20-ona- $20\alpha^3$
(Actividad específica (a.e.) 2.2 μ c/mg.)
2 μ c. de Colesterol $6-C^{14}$ (a.e. 0.12
mc/mg.)

El volumen final fue de 15 ml. y las incubaciones se llevaron a cabo en una incubadora rotatoria - tipo Dufnoff a 37°C ., durante 3 horas y con aire como fase gaseosa.

El producto de la incubación se extrajo 4 veces con 20 ml. de cloroformo, y después de juntar los extractos cloroformicos, se añadieron los siguientes - "portadores" no radioactivos¹¹¹:

Hidrocortisona	1.5 mg.
Corticosterona	1.5 mg.
Dehidroepiandrosterona	3.0 mg.
4-Androsteno-3,17-diona	3.0 mg.
11β -hidroxi-4androsteno-3,17-diona	3.0 mg.

La mezcla se evaporó al vacío en un evaporador rotatorio.

2.- Purificación.-

El extracto seco fue sometido a un proceso de purificación de partición entre Ligroín y Metanol - Agua al 90%. La fracción metanólica se evaporó y el

residuo se sometió al mismo procedimiento descrito - por Bagget y colaboradores (19). Esta fracción neutra, ya purificada, se desarrolló en diferentes procesos cromatográficos, de acuerdo con la técnica y - procedimientos descritos en los incisos subsecuentes.

- 1 Extirpado 15 minutos antes, a una mujer de 35 -- años de edad, que presentaba hirsutismo de regular intensidad y que los estudios hormonales demostraron que antes de la operación eliminaba -- por la orina entre 1000 y 2000 mg. diarios de -- 17-oxosteroides.
- 11 Estos compuestos radioactivos fueron obtenidos - de New England Nuclear Corporation, Boston, Mass.
- 111 La pureza química de todos los esteroides usados se corroboró por medio del análisis de Infrarrojo, determinación de puntos de fusión y cromatografía en papel.

3.- Cromatografía en papel. Generalidades.-

La cromatografía es un procedimiento analítico ó de separación basado en los experimentos de adsorción descritos por Tswett en 1903 y 1906 (20).

En estos primeros ensayos se obtuvo la resolución de una mezcla de compuestos en cada uno de sus diferentes componentes, en los que no se observó ninguna alteración química, de manera que podían ser utilizados para la investigación de sus propiedades. - En esta forma, se proporcionó a los científicos un -

instrumento de trabajo extraordinariamente útil en el estudio de infinidad de sustancias químicas.

Durante la primera mitad del siglo se describieron numerosos procedimientos cromatográficos, y de éstos las técnicas de cromatografía en papel fueron utilizadas por primera vez por J. P. Martin en 1941 (21). Años más tarde Zaffaroni, Hurton y Keutsan (22) utilizaron estos procedimientos cromatográficos para separar en papel filtro una gran variedad de hormonas corticales. Este sistema es referido como cromatografía descendente, en la que la tira de papel se impregna en una fase fija y a continuación se cuelga de un recipiente que contiene la fase móvil la cual corre a lo largo del papel, tanto por razones de capilaridad como por la fuerza de gravedad. A medida que esta fase móvil avanza, se realiza la partición de los esteroides entre ambas fases. De todos los procedimientos descritos en la literatura, hemos seleccionado los sistemas cromatográficos de Bush (23), Savaró (24) y Zaffaroni (25), y en relación a éstos se harán las explicaciones pertinentes para su correcta aplicación.

La velocidad de desplazamiento en los cromatogramas de las diferentes mezclas de esteroides se representa en formas variadas, pero en nuestro laboratorio

se han adoptado fundamentalmente las denominaciones de R_f y R_T .

El R_f se refiere al cociente que resulta de dividir la distancia recorrida por el compuesto cromatografiado entre la distancia recorrida por el frente del solvente y que constituye la fase móvil. Este R_f representa una constante para cada uno de los esteroides, que varía de acuerdo con los sistemas y solventes usados y que está en relación con las condiciones de saturación de la cámara cromatográfica, temperatura de ésta, presencia de varios compuestos en la mezcla que se cromatografía y la clase de papel.

El R_T expresa la velocidad de desplazamiento en centímetros de un compuesto dividida entre el número de horas en que se efectúa la cromatografía (24).

En general, los valores de R_T y de R_f de los esteroides, independientemente de los sistemas cromatográficos usados, dependen fundamentalmente de su estructura química y de manera muy especial de los grupos de sustitución y funciones oxigenadas que se presentan en diferentes sitios de la molécula y que confieren a ésta propiedades particulares de desplazamiento.

El sistema de Ligroín-Propilénglicol de Savard, que se usó con bastante frecuencia en este trabajo, es un sistema difásico en el cual la fase fija y polar, impregna la tira de papel filtro y el desplazamiento de los esteroides lo determina el coeficiente de distribución de los compuestos entre esta fase fija y el solvente móvil que, como ya dijimos antes, desciende por el papel por capilaridad y gravedad. El sistema de Zaffaroni está basado en el mismo principio. En los sistemas de Bush la tira de papel se impregna por un solvente volátil durante la saturación de las cámaras cromatográficas y la partición se realiza al hacer descender una fase móvil también volátil, de manera semejante a los procedimientos de Zaffaroni y Savard.

En los sistemas en los cuales la velocidad de desplazamiento del esteroide depende del coeficiente de distribución entre estos dos fases, debe ser tomada en consideración la forma en la cual los grupos funcionales del compuesto se unen con la fase fija. Esta unión se hace a expensas de ligaduras de hidrógeno que se presentan entre los grupos alcohólicos del esteroide y del propilénglicol. El número de grupos alcohólicos de la fase fija es constante a todo lo largo del papel, siempre y cuando

éste se haya impregnado uniformemente, y varía en los diferentes compuestos esteroides, que pueden tener un número variable de funciones oxigenadas. -- Por lo tanto, a mayor número de funciones alcohólicas, será mayor la unión con la fase fija y por lo tanto menor el desplazamiento del compuesto en estudio. También tiene gran importancia la posición -- que ocupen en la molécula estos grupos alcohólicos, ya que, de acuerdo con los conceptos de conformación de la molécula esteroide, desarrollados por -- D. H. R. Barton (13, 14), se ha podido establecer -- que los grupos alcohólicos situados en una posición ecuatorial están menos escondidos que los localizados en posición axial, y por lo tanto están en posibilidad de reaccionar más fácilmente con la fase fija, con la consiguiente disminución en la velocidad de desplazamiento. De esta manera cualquier esteroide con un grupo alcohólico axial se desplazará -- con mayor rapidez que el epímero ecuatorial. A este respecto tenemos que la etiocolanolona (3α -hidroxi- 5β -androstano-17-ona) se desplazará más lentamente que la androsterona (3α -hidroxi- 5α -androstano-17-ona), debido a que la isomería que se presenta en el carbono 5, hace que el alcohol orientado en la posición del carbono 3 sea ecuatorial en el caso de la

etiocolanolona y axial en el de la androsterona, -- ocasionando una resolución adecuada de estos dos esteroides, con el resultado de que el primero de éstos sea más lento.

Entre otros los grupos funcionales que disminuyen la velocidad de desplazamiento de los esteroides, son los grupos cetónicos ó carbonilos y las debiles ligaduras que se pueden presentar en cualquiera de los anillos del núcleo básico del esteroide.

Por último quiero mencionar que las constantes de desplazamiento de casi todos los esteroides (ΔR_{Ng}) pueden calcularse tomando en cuenta la presencia de los diferentes grupos de sustitución, de acuerdo con el procedimiento propuesto por I. E. Bush en su libro intitulado "The Chromatography of Steroids" (26).

- TECNICAS Y APARATOS

A.- Preparación de hojas y tiras de papel.

Existen varios tipos de papel filtro para los sistemas cromatográficos antes mencionados, pero en nuestro laboratorio solo hemos utilizado el papel Whatman No. 1, el cual es sometido a un proceso de lavado antes de ser utilizado, ya que en éste existen impurezas que nos pueden dar alteraciones en --

las zonas que, después de ser eluidas, se someten al análisis de Ultravioleta, Infrarrojo ó bien, se les hacen reacciones con ácido sulfúrico concentrado ó con algunos otros reactivos que se usan para determinar los esteroides.

El lavado de papel por los sistemas cromatográficos es uno de los métodos más satisfactorios y se realiza metiendo las hojas dentro de una cámara cromatográfica, a las que se les hace descender en forma continua algún solvente adecuado que podría ser benceno-metanol a partes iguales. Después de 48 horas se sacan las hojas de papel de la cámara y se dejan secar, ya sea en el medio ambiente ó bien aplicándoles una corriente de aire. Una vez secas, se guardan con objeto de evitar que se empolven y contaminen nuevamente.

En la figura No. 1ª se observa la forma habitual de cortar estas tiras para cromatografiar en los sistemas de Savard y Zaffaroni.

La longitud del papel entre la línea de aplicación y la punta, puede ser variable, pero nosotros acostumbramos cortarlas con una longitud de 48 cm., que desde luego requiere tanques cromatográficos apropiados.

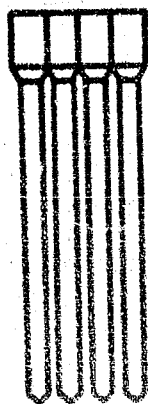


Figura 18.

B.- Impregnación del papel con la fase estacionaria.

La impregnación del papel con la fase estacionaria se realiza en forma diferente según la técnica cromatográfica empleada. Con los sistemas de Bush la impregnación de la fase fija se realiza con solventes volátiles, con los que se satura previamente el papel dentro de los tanques cromatográficos herméticamente cerrados; mientras que con los sistemas de Savard y Zaffaroni la fase estacionaria ó fija está constituida por solventes poco volátiles como serían el propilenglicol y la formamida, y éstos se aplican directamente a la tira de papel antes de meter ésta en el tanque de cromatografía.

por lo general diluidos con metanol y de acuerdo con el procedimiento ilustrado en la figura No. 19. En este trabajo hemos utilizado exclusivamente al propilénglicol mezclado con metanol en una proporción de 1:1. Una vez impregnada la tira de papel, se quita el exceso de propilénglicol-metanol presando ésta entre dos tiras de papel filtro, previamente lavadas, con lo que se absorbe el exceso de la fase fija.

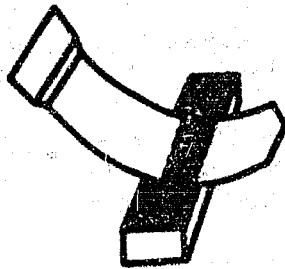


Figura 19.

C.- Técnica de aplicación de los compuestos en los papeles.

La transferencia del extracto al papel se ha
cerse en forma cuantitativa. Este se disuelve en
un solvente que se evapora fácilmente, y por medio

de una pipeta Pasteur ó micropipeta se aplica en un extremo del cromatograma. Cada fracción del extracto se aplicará utilizando volúmenes de 5 a 20 lumbdas y ayudando la evaporación del solvente con una corriente de nitrógeno. La aplicación del extracto con mayores cantidades de solvente produce la formación de un depósito anular, el que, después de la cromatografía, forma una zona muy irregular.

Por estas razones existe otra técnica en la aplicación de los componentes y que consiste en aplicar el material en una zona bastante ancha y con volúmenes abundantes de solvente, para después reducir esta zona a la línea de aplicación, efectuando un procedimiento de cromatografía ascendente.

D.- Preparación de las cámaras cromatográficas y control de temperatura.

Las cámaras cromatográficas usadas en estos sistemas de cromatografía descendente son por lo general de vidrio Pyrex, pudiendo tener un diámetro y altura variables. De esta manera tenemos que los tanques originales descritos por Zaffaroni, tienen una altura de 46 cm. Existen también "tanques dobles" de 120 cm. de longitud, que han sido usados por T. F. Gallagher (Sloan Kettering Institute, New

York) para separar diferentes metabolitos esteroides, pero el tipo más usado en la mayor parte de los laboratorios tiene una longitud de 60 cm. y son semejantes a los tanques cromatográficos que existen en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, cuyo diseño puede verse en la figura 20.

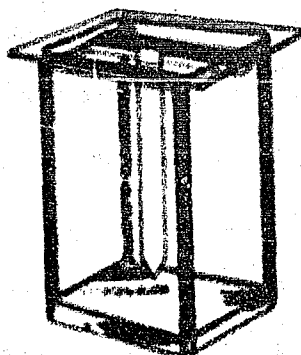


Figura 20.

En los sistemas de Savard y Zaffaroni, estos tanques se saturan antes de la introducción de la tira de papel la cual está debidamente impregnada con la fase fija y ya tiene el extracto del esteroide en la línea de aplicación. La saturación del tanque se realiza con la fase móvil, previamente equilibrada con propilén glicol (fase fija), posterior

de en el tanque una cantidad suficiente para cubrir el fondo de éste y que pueda ascender por capilaridad por una hoja de papel filtro que se introduce pegada a la pared interior de la cámara. Habitualmente se corta esta hoja en forma tal que tenga una ventana, por la que se pueda ver a través de uno de los lados del tanque de cromatografía.

En recipientes de vidrio localizados en la parte superior de estas cámaras, se vierte una porción adecuada de la fase móvil saturada y se tapa herméticamente ésta con un vidrio plano, el cual hace íntimo contacto con los bordes superiores del tanque, mediante el uso de una pasta formada por 9 partes de almidón y 33 de glicerina que se prepara calentando la mezcla a 140°C , y escurriendo el agua hasta que queda con consistencia de engrudo. Con objeto de favorecer el cierre hermético se puede poner encima de la tapa una plancha de fierro ó lingotes de plomo. En estas condiciones se deja saturar la cámara cromatográfica en cuartos especiales de temperatura constante y que pueden variar entre 20 y 25°C .

Una vez saturada la cámara, lo que se realiza en 4 ó 5 horas, se levanta la tapa de vidrio y se introduce rápidamente la tira de papel colocando et

extremo superior de ésta dentro del recipiente que contiene la fase móvil, dejándola colgar de manera que el solvente descienda por capilaridad y gravedad. Una vez introducida la tira, se debe cerrar nuevamente la cámara en forma tal, que no haya escape de los solventes que se hubieren volatilizado.

En algunos casos se dejará que el solvente llegue hasta la punta del papel y, antes de que empiece a gotear, se saca el cronómetro para calcular, en esta forma, el desplazamiento de los compuestos, expresándolos en valores de R_f . En otros casos se dejará gotear la fase móvil, por lo cual hay que introducir previamente un vaso de precipitados en la parte inferior de la tira de papel. En estos géneros pueden encontrarse sustancias de rápido desplazamiento, quedando en el papel compuestos más pesados, que, una vez localizados por procedimientos apropiados, nos indicarán la velocidad de su desplazamiento expresadas en R_f .

En los sistemas de Bush, tanto el solvente que constituye la fase fija polar, como el que forma la fase móvil no polar, son relativamente volátiles. Las cámaras son iguales a las usadas en los sistemas de Savard y Zaffaroni, pero presentan ciertas modificaciones. Estas deben estar a una temperatu-

ra relativamente elevada, que varía entre 30 y 36°C. Para la saturación de las cámaras se debe colocar una fase móvil en el piso de ésta, y la fase fija en un vaso de precipitados de 500 ml. de capacidad. La fase fija consiste por una hoja de papel filtro plegada, que se introduce en el vaso de precipitados.

Independientemente de que la cámara debe saturarse tanto por la fase móvil como por la fase fija, de manera parecida a los sistemas de Davard y Zaffaroni, la tira de papel cromatográfico se introduce al momento de iniciar la saturación, con objeto de que la fase fija, que se deposita en el vaso de precipitados, al evaporarse impregne la tira en forma tal, que la cromatografía se inicie al verter por un pequeño orificio de la tapa de la cámara, más fase móvil equilibrada y hacer que descienda por el cromatograma saturado con la fase fija.

Debido a la gran volatilidad de los solventes, en este sistema es mucho más difícil mantener en equilibrio la saturación de las cámaras, pero al mismo tiempo ésta se alcanza en un tiempo menor, generalmente dos horas.

Este sistema tiene la ventaja de que, una vez sacada la tira de la cámara, tanto la fase fija co-

se la móvil que impregnan el papel, se evaporan rápidamente.

En el cuadro No. II tenemos representados los principales sistemas de Bush.

CUADRO No. II

SISTEMAS	S O L V E N T E S			
A	Heptano (1,000)	/ Metanol (900)	: Agua (200)	
B ₁	Tolueno (500)	: Heptano (500)	/ Metanol (700)	: Agua (300)
B ₂	Tolueno (667)	: Heptano (333)	/ Metanol (600)	: Agua (400)
B ₃	Heptano (667)	: Benceno (333)	/ Metanol (800)	: Agua (200)
B ₄	Tolueno (1,000)	/ Metanol (500)	: Agua (500)	
B ₅	Benceno (1,000)	/ Metanol (500)	: Agua (500)	
C	Tolueno (900)	: Acetato de Etilo (100)	/ Metanol (500)	: Agua (500)

E.- Métodos para la detección de esteroides en los cromatogramas de papel.

1).- Absorción selectiva de luz.

(a).- Absorción directa.

(b).- Fotografía de contacto.

(c).- Fluorescopia de contacto.

(a). Absorción directa.- Con una lámpara apropiada es posible detectar zonas que absorban la luz ultravioleta por el contraste que presentan con la luz azul fluorescente del papel. La lámpara usada en nuestro laboratorio es el modelo manual SL-2537 "Xinerallight" de onda corta. Esta lámpara tiene como fuente, un tubo de cuarzo con vapor de mercurio y un filtro violeta con alto porcentaje de transmisión de radiaciones a 253.7 milimicrones ($m\mu$). Este método no es muy sensitivo, pero nos permite identificar compuestos con doble ligadura conjugada en una concentración de 20 a 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de papel.

(b). Fotografía de contacto.- Este método es muy útil y tiene algunas variaciones. En este trabajo se usó con gran frecuencia y nos permitió detectar fácilmente la presencia de cetonas α, β insaturadas (230-250 $m\mu$).

El cromatograma se coloca encima de un papel fotográfico (Kodak-Graph de contacto estándar) de las mismas dimensiones y se expone durante 5 a 8 segundos a la luz de la lámpara ultravioleta, que se describió en el inciso anterior, la que se coloca a una distancia de 50 cm. del cromatograma. La película se revela y se fija en unos cuantos minu-

tes, dando una fotografía de los compuestos en el cromatograma, que puede ser conservada dentro del protocolo del experimento. Para revelar la película se usamos revelador Kodak: una lata de 5 onzas de polvo (Kodak Dektol Developer) se diluyen a 38°C. en 946 ml. de agua, constituyendo la solución madre. Para usarlo, se diluye una parte de esta solución con dos partes de agua. La película expuesta se pasa a través de esta dilución durante 30 segundos, se enjuaga con agua corriente y se sumerge a un fijador durante 4 minutos. El fijador (Kodak Acid Fixer) se prepara agregando 6 onzas de ácido a 946 ml. de agua. Una vez fijada la película, se enjuaga con agua corriente y se pone a secar con corriente de aire. Con este método habitualmente se detectan esteroides que poseen cetonaes, Δ insaturadas (con coeficientes de extinción molar por arriba de 10,000) en concentraciones muy cercanas a $1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

(c). Fluoroscopia de contacto.- La detección visual de zonas que absorben la luz ultravioleta se puede mejorar al combinar la misma lámpara de luz ultravioleta de onda corta con una pantalla fluorescente similar a la descrita por Drake, Haines, Knauff y Stelson (27). Esta pantalla fluoresce

cente está hecha con una base de alcohol polivinílico al cual se aplica un fosfor de silicate de zinc de la casa Dupont. El cromatograma se coloca por encima de la pantalla fluorescente, entre ésta y la lámpara de luz ultravioleta situada a 20 ó 30 cm. de distancia. Con este procedimiento se pueden marcar con un lápiz las zonas en donde están los compuestos que absorben la luz ultravioleta.

2).- Reacciones de color.

Existe una gran cantidad de procedimientos para detectar los esteroides por medio de reacciones de color ó de fluorescencia, que están diseñados para poner de manifiesto la presencia de algunos grupos funcionales presentes en la estructura de las moléculas. En este trabajo solo hemos usado cuatro de éstos y por lo tanto nos limitaremos a la descripción exclusiva de cada uno de ellos.

(a). N.-dinitro benceno alcalino (28).

Para realizar este procedimiento se preparan dos soluciones, una de ellas contiene hidróxido de potasio 5% en solución acuosa y la segunda contiene m.-dinitro benceno al 2% en etanol absoluto redestilado. Una tira del cromatograma de 2 cm. de ancho se pasa rápidamente por la solución de hidróxido

xido de potasio; se seca la tira entre dos hojas de papel para quitar el exceso de la solución alcalina y se vuelve a pasar por la solución de m.-di-nitro benceno, repitiendo el mismo procedimiento de secado. Se esperan unos cuantos segundos a que aparezca el color violeta característico de los 17-oxoesteroides, y en caso de que no aparezca inmediatamente el color, se pone la tira durante 1 a 2 minutos en un horno a 60-100°C. ó bien se seca con aire caliente (secador manual de pelo).

Una gran variedad de grupos metilénicos activos de diversos esteroides reaccionan para dar productos rosados, violetas, café y azules. Como ya mencionamos, los grupos 17-oxo dan un color violeta, en cambio en los 3-oxoesteroides los colores son azules ó grises; las cetonas en posición 20 dan un color rosado ó café. De todos éstos, el color más intenso y de mayor duración es el que se obtiene con los 17-oxoesteroides.

(b). Azul de Tetrasolio (29).

Existe una gran variedad de sales de tetrasolio y de éstas la más extensamente usada es el 3, 3' di anisol 4, 4'-(3, 5-difenil) cloruro de tetrasolio.

Con este reactivo, los esteroides que poseen la estructura 20, 21 cetol dan un color morado característico con una sensibilidad de $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Las soluciones con las que se realiza esta solución son dos y se preparan de la siguiente manera:

1a.- Se disuelve 1 g. de azul de tetrazolio en 15 ml. de metanol y se diluye esta solución a 100 ml. con agua destilada. Se filtra si es necesario.

2a.- Solución de hidróxido de sodio al 10%.

La tira de papel se pasa por una mezcla de dos partes de la solución de azul de tetrazolio y una parte de la solución alcalina. Se seca el exceso de reactivo entre dos hojas de papel filtro y se espera en la obscuridad a que aparezca el color morado característico de los compuestos con la estructura α, β cetol.

(c). Dinitro Fenilhidrazina (DNPH) (30).

La 2, 4-dinitro fenilhidrazina se utiliza para la detección de los grupos carbonílicos. Cuando estos grupos tienen un punto de insaturación adyacente se producen derivados amarillos y con grupos no saturados se forman compuestos de color rojo.

La solución utilizada en esta reacción es una solución saturada de 2, 4-dinitro fenilhidrazina - en ácido clorhídrico 1%, la cual debe guardarse - en frasco oscuro y filtrarse antes de ser usada.

La tira de papel en la que se van a detectar los compuestos sensibles a la 2, 4-dinitro fenilhidrazina, se introduce en esta solución y se deja - por espacio de 10 a 30 minutos; después se saca y se observan las zonas que presenten un color amarillento fuerte ó un color rojizo.

(d). Tricloruro de Antimonio (31).

Con este reactivo podemos detectar una gran - variedad de esteroides, y de éstos nos fue muy - - - útil para aquéllos con la estructura Δ^5 - β hidroxi.

El reactivo se prepara diluyendo 25 g. de tri - cloruro de antimonio anhidro en 5 ml. de nitroben - ceno. Las tiras de papel se pasan por esta solu - ción, se seca el exceso de éste y se suspenden en un horno a 90°C. durante 5 minutos.

Con este procedimiento la DHA da un color ca - fè rojizo, y la Δ^5 -pregnenolona dió un color rosa morado. La sensibilidad aproximada de este método es de 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

F.- Elución de compuestos de los cromatogramas.

La mayoría de los esteroides se pueden eluir del papel, simplemente al poner éste en contacto con un solvente adecuado, con ó sin agitación. Sin embargo la elución cromatográfica es superior y con ella se pueden obtener recuperaciones de cerca del 100%. Ha sido costumbre en este laboratorio usar como solvente al metanol poniendo las señas del cromatograma a eluir en un aditamento como se muestra en la figura 21.

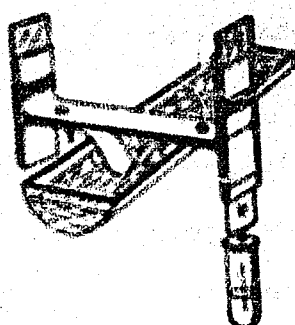


Figura 21.

Este aditamento se introduce en una cámara cromatográfica semejante a las usadas para la cromatografía descendente, pero con una pequeña adaptación, que nos permite recoger el eluido en tubos de centrífuga ó matraces de fondo redondo, para su

evaporación posterior. Figura 22.

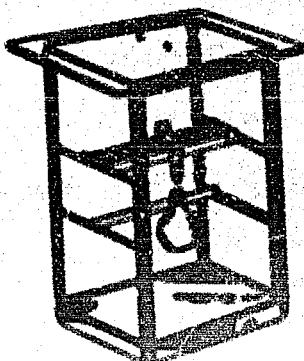


Figura 22.

4.- Determinación de compuestos - marcados con C^{14} y H^3 ..

La determinación de los metabolitos radiactivos de esteroides marcados con C^{14} y H^3 se realiza fundamentalmente con el uso de contadores de centelleo líquido ó bien contadores Geiger de flujo de gas, cuando se trata de compuestos marcados exclusivamente con C^{14} . Es también frecuente determinar el isótopo en la fase gaseosa después de la combustión de la muestra biológica. Debido a que en nuestros experimentos se utilizaron mezclas de isótopos marcados con C^{14} y H^3 , me limitaré a describir en forma sucinta la metodología relacionada con el conteo por medio del centelleo líquido.

A.- Contalles líquido. El principio de esta técnica está basado en que la substancia radiactiva se disuelve en un fosfor líquido, con el cual se obtiene una geometría de 4π . Es en este fosfor donde la partícula radiactiva produce emisión de luz, la cual se puede detectar en aparatos adecuados por medio de uno ó dos fotomultiplicadores.

El instrumento utilizado en este estudio fue un espectrómetro de contalles líquido Tri-Carb modelo 314 de la Packard Instrument Co., el que, está conectado a un analizador de pulsos con dos canales, -- puede discriminar las emisiones beta de diferente energía del H^3 y C^{14} que son de 0.015 mev. para el primero y 0.155 mev. para el C^{14} . Estos dos canales (Figura 23) se obtienen por medio de los controles de tres discriminadores denominados A, B y C, que operan a la salida de uno de los fotomultiplicadores, que recibe el nombre de "Analizador". El otro fotomultiplicador, que recibe el nombre de "Monitor", está seguido solamente de un discriminator que en el esquema está marcado como A'. Los dos discriminadores A y A' tienen un solo voltaje de referencia, que se modifica por un control único. Los pulsos que salen de los discriminadores A y A' son transmitidos a un circuito de coincidencia

cia y si estos pulsos llegan al mismo tiempo como sería un centelleo de la muestra, entonces serán contados.

Los pulsos que llegan a tiempos diferentes al circuito de coincidencia, como sería el ruido terminal esporádico de los dos fotomultiplicadores, son descartados. Hay que hacer notar que la señal de salida del circuito de coincidencia es la única que en realidad se cuenta, ya que los señales de los discriminadores B y C solo ayudan al analizador a determinar la altura de un pulso en particular.

Los discriminadores que hemos mencionado están dotados de un segundo voltaje de referencia, de manera que cualquier pulso que les llegue, tiene que ser de mayor voltaje que la referencia, para que salga una cuenta. De esta manera cuando los discriminadores A y A' se sitúan por arriba de 5 volts no transmiten ninguna pulsación, debido a que el ruido terminal de los preamplificadores se encuentra por debajo de este nivel.

Una de las razones fundamentales por las que el espectrómetro de centelleo líquido sea extraordinariamente valioso es que puede realizar análisis de la altura de pulsos. La altura de estos es

pulsos a la salida del amplificador es proporcional a la energía de la partícula beta que los originó. Este aspecto tiene una gran importancia, ya que la energía de luz emitida por el "fosfor" está en relación directa a la energía de la partícula beta, ocasionado que los fotomultiplicadores produzcan pulsos eléctricos de un voltaje proporcional a la energía de luz que incide en el fotocátodo.

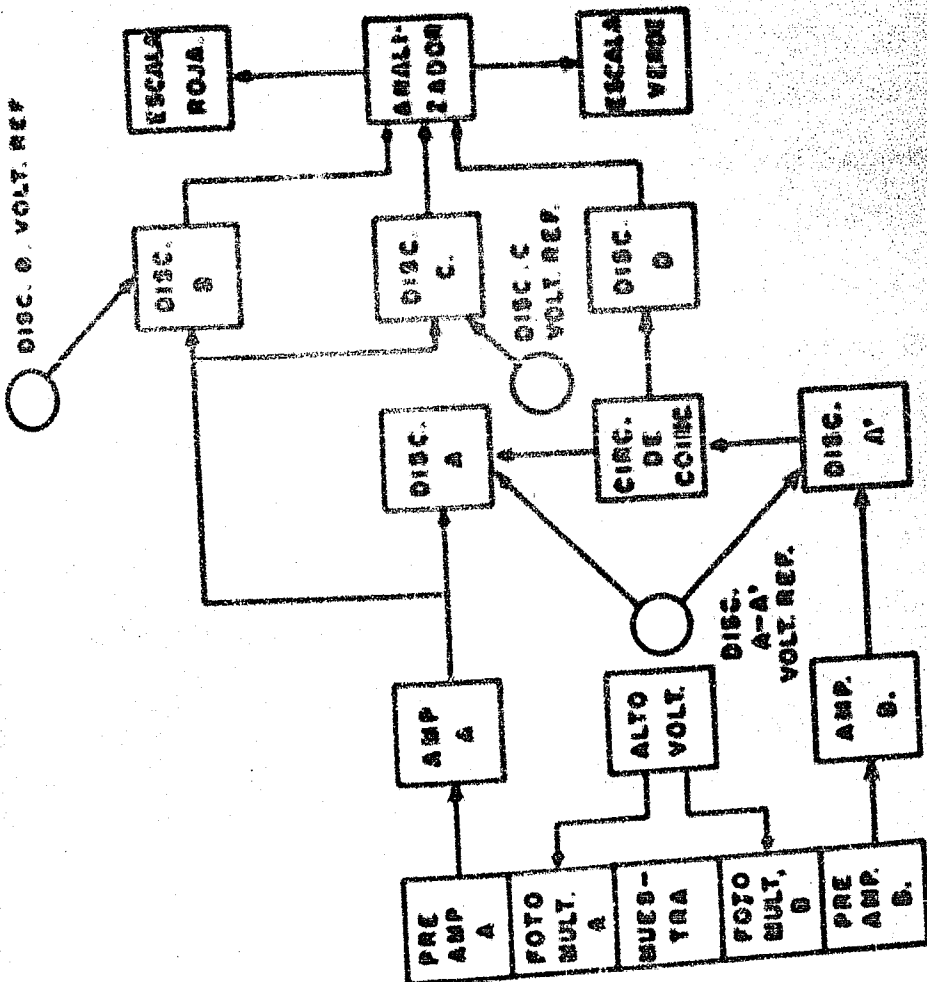


FIGURA 23.

En la figura No. 24 podemos observar el espectro idealizado de un pulso de la energía de la partícula beta. Como se puede ver, el espectro de las partículas beta presenta pulsos aún con energías cercanas a cero y también se observan estos pulsos en el máximo de la energía. Entre estos dos extremos el espectro se levanta uniformemente y después decae, siendo característico de emisores de partículas beta. La constante de la altura de un pulso y la energía de la partícula beta, está en relación directa, como ya mencionamos antes, pero también está en función de la amplificación que se hace en los canales lineales. A su vez esta amplificación es una función importante

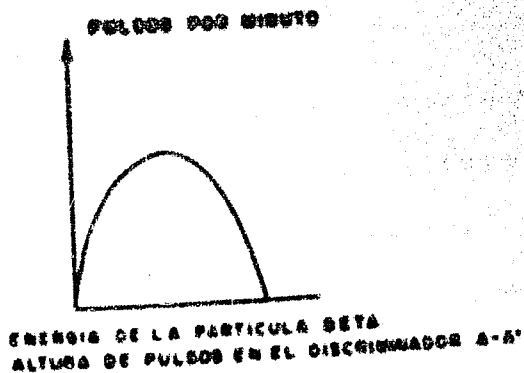


Figura 24.

del alto voltaje que se aplica a los fotomultipli-

caderos. De esta manera es importante señalar que la forma del espectro cambia a medida que se aumenta el alto voltaje, en forma tal que el punto donde desaparecen los pulsos, se extiende hacia estos voltajes y hace que el máximo de la curva tenga valores más bajos. Figura 25.

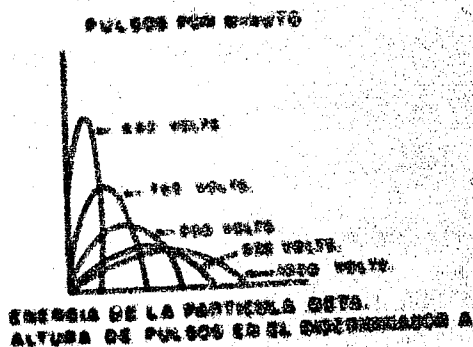


Figura 25.

Una vez establecida esta relación entre la -- energía de la partícula beta, la altura del pulso y el alto voltaje que se aplica a los fotomultiplicadores, vamos a ver en que forma se puede situar el analizador para realizar el conteo normal en -- cualquiera de los dos canales ya mencionados y que en la práctica estén representados en el instrumento por una escala roja y una escala verde. El con

troel de estas tres funciones tiene tres posiciones con las que podemos obtener información específica en la escala respectiva.

Posición de Contacto	Escala Roja Discriminadores	Escala Verde Discriminadores
2	AA'-B	B-C
3	AA'-B	AA'-C
4	AA'-C	B-C

En esta forma cuando el analizador está en posición 2, en la escala roja se registrarán aquellas cuentas que tengan una energía mayor que el voltaje que asignamos al discriminador AA' y menores que el voltaje del discriminador B. Asimismo en forma simultánea se registrarán en la escala verde aquellos pulsos con energía superior al voltaje del discriminador B y menores que C.

Esta posición 2 es la que se utiliza habitualmente en el trabajo rutinario y el uso de la escala roja y escala verde dependerá del método de conteo utilizado. Debido a cierta inestabilidad del instrumento seleccionamos el método de "Pantalla" (7), en el que solo se toman en cuenta las lecturas de la escala roja.

Los voltajes seleccionados para los discriminadores en este método de "Pantalla" fueron de 10 volts para el discriminador AA' y 30 volts para el discriminador B. En la figura 26 hemos representado de los valores obtenidos en la escala roja después de contar estándares sellados de C^{14} y H^3 , con los fotomultiplicadores sometidos a diferentes altos voltajes y con los discriminadores AA' en 10 volts y el discriminador B variando entre 20 y 30 volts.

Como puede verse, cuando el estándar de C^{14} se cuenta con los discriminadores situados en 10 y 30 volts, se obtiene un máximo con 840 volts en los fotomultiplicadores. También puede observarse que, conforme se baja el nivel del discriminador B, disminuye la eficiencia de conteo y el máximo se obtiene en voltajes menores de 840 volts: v.gr. 780 volts cuando el discriminador B está en 20 volts.

El estándar de H^3 da un máximo de eficiencia con los discriminadores situados en 10 y 30 volts, como ya observamos con el estándar de C^{14} , pero en este caso la máxima eficiencia se obtiene cuando se aplican 1080 volts a los fotomultiplicadores. Hay que hacer notar que en este alto voltaje todavía es posible contar pulsos debidos al C^{14} , lo --

cuales nos obliga a usar fórmulas especiales desarrolladas para este método de "Pantalla". Para poder utilizar este método es necesario contar las pulgaciones debidas al C^{14} en un voltaje tal que no se obtengan cuentas debidas al H^3 . Esto se logra --- aplicando a los fotomultiplicadores 750 volts y --- con los discriminadores situados en 10 y 30 volts. El punto óptimo para contar H^3 fue situado en 1050 volts con los discriminadores en 10 y 30 volts, --- aunque hay que tener en cuenta que en estas posiciones todavía tenemos un 11% de eficiencia para compuestos con C^{14} .

El procedimiento para determinar el contenido neto de una mezcla de estos dos isótopos se realiza aplicando las fórmulas (1) y (2) que a continuación se representan:

$$(1) \quad C = \frac{N_1}{c_1}$$

$$(2) \quad H = \frac{N_2 - (C \times c_2)}{h_2}$$

en donde:

C = Desintegraciones por minuto de C^{14} .

N_1 = Cuentas netas por minuto obtenidas - en la escala roja en 750 volts --- (Disc. AA' = 10 volts y B = 30 volts)

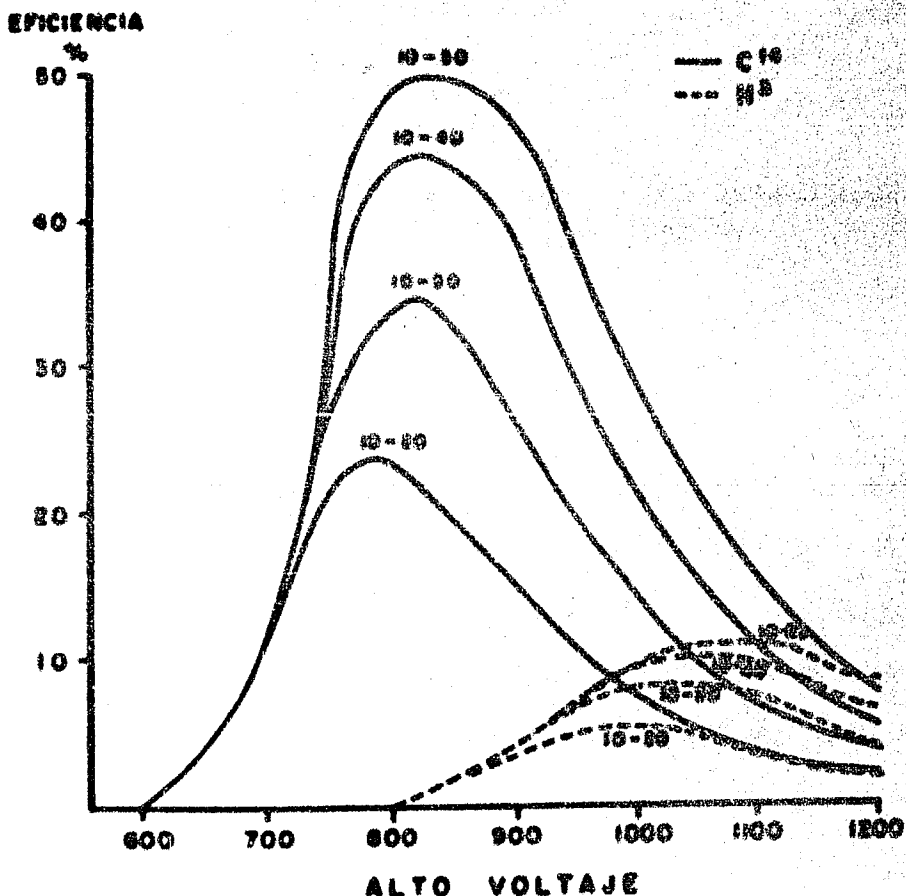


Figura 26.

Las líneas continuas representan los valores obtenidos para el estándar de Cl³⁶ a diferentes voltajes y con los discriminadores AA'-B situados en 10 y 20 volts, 10-30 volts, 10-40 volts y 10-50 volts. Las líneas discontinuas representan las curvas obtenidas con el estándar de H³ contado en la misma forma que el estándar de Cl³⁶.

ϵ_1 = Eficiencia para el estándar de C^{14} en 750 volts.

H = Desintegraciones por minuto de H^3 .

$\%_2$ = Cuentas netas por minuto obtenidas en la escala roja en 1050 volts.

ϵ_2 = Eficiencia para el estándar de C^{14} en 1050 volts.

h_2 = Eficiencia para el estándar de H^3 en 1050 volts.

Si tomamos como ejemplo una mezcla de isótopos radioactivos marcados con C^{14} y H^3 a los cuales deseamos valorar por este método de "Pantalla", primero tenemos que establecer las eficiencias de conteo para estándares de estos dos isótopos en 750 y 1050 volts. De acuerdo con los resultados obtenidos y expresados en la gráfica 26, la eficiencia para el estándar de C^{14} será de 26% en 750 volts y 11% en 1050 volts. Para el estándar de H^3 las eficiencias serán de 0 y 9% en estos mismos voltajes.

Si en 750 volts registramos en la escala roja 8,542 cpm. y en 1050 volts 23,300 cpm. tendremos -

que, si aplicamos la fórmula (1), obtendremos el número de desintegraciones debidas al C^{14} que están presentes en la mezcla en cuestión:

$$C = \frac{8,362 - 10^{(a)}}{0.28^{(b)}} = 30,471$$

$$C^{14} = \underline{30,471} \text{ desintegraciones por minuto (dpm).}$$

El número de desintegraciones de H^3 presentes en la mezcla se obtiene al aplicar la fórmula (2).

$$H = \frac{(2), 300 - 30^{(c)}}{0.01^{(d)}} - (30,471 \times 0.11^{(d)}) = 248,975$$

$$H^3 = \underline{248,975} \text{ dpm.}$$

Para expresar el número absoluto de desintegraciones de estos dos isótopos en unidades de radioactividad, que en este caso lo más adecuado sería en microcuries (μc)^(f), hay que hacer las siguientes consideraciones:

$$C^{14} = 30,471 \text{ desintegraciones por minuto} = 508 \text{ desintegraciones por segundo} = \underline{0.0137 \mu c.}$$

$$H^3 = 248,975 \text{ desintegraciones por minuto} = 4,150 \text{ desintegraciones por segundo} = \underline{0.112 \mu c.}$$

- (a) = Número de cuentas del medio ambiente en 750 volts.
- (b) = Eficiencia de un estándar de C^{14} en 750 volts (20%).
- (c) = Número de cuentas del medio ambiente en 1050 volts.
- (d) = Eficiencia de un estándar de C^{14} en 1050 volts (11%).
- (e) = Eficiencia de un estándar de H^3 en 1050 volts (9%).
- (f) = 1 curie = 3.7×10^{10} dps.; 1 millicurie = 3.7×10^7 dps.; 1 microcurie = 3.7×10^6 dps.

Es conveniente hacer breves consideraciones generales en relación a la muestra que se va a contar en el espectrómetro de centelleo líquido. En esta muestra hay que tomar en consideración cuatro aspectos importantes que son: el solvente, el material de centelleo, el material radiactivo y el recipiente.

Solvente.- Se usan varios tipos de solventes para el conteo en centelleo líquido y en la mayoría de los casos la selección de éste, reviste una gran importancia. El primer requisito del solvente es que permita una eficiente transferencia de energía de la partícula beta hacia el material de centelleo y que permita que la luz emitida por este último material se transmita con muy poca absor-

ción. Si el solvente posee estas cualidades podemos decir que no produce "quenching". Este proceso que se produce en la muestra, se traduce en una atenuación de la altura de pulsos. Las interferencias con la transmisión de la luz pueden ser debidas a una absorción propia del solvente hacia la partícula beta, lo cual recibe el nombre de "quenching" térmico ó químico, ya que la energía de la partícula se disipa como calor. Si el solvente absorbe la luz emitida por el material de centelleo, se le da el nombre de "quenching" de color.

Otro de los atributos importantes del solvente es que el compuesto radiactivo que se analiza sea soluble en él y que no se congele a las temperaturas que se utilizan para contar. Entre éstos el tolueno tiene estas características y es el que más se usa en Bioquímica de Hermanas Esteroides, - debido a la solubilidad de los esteroides en él.

Material de centelleo.- El material de centelleo ó "fluer" se usa en este método de conteo para convertir la energía de la partícula en cuantos de luz. Existen varios flueros de donde escoger, - de éstos, nosotros usamos el 2, 5-difenil-oxazol - (PPO). Es conveniente agregar un fluer secundario

el cual actúa cambiando la longitud de onda de la luz emitida por el PPO a una región en la cual -- los fotomultiplicadores son más sensibles. Muy pequeñas cantidades de este fluor secundario nos dan aumentos impresionantes en la eficiencia de -- centeo, particularmente cuando se trata de contar H^3 , en donde las energías en cuestión son bajas. Con el Cl^{36} se observa también algún aumento en la eficiencia, pero sin ser notable como en el caso anterior. Este compuesto de centelleo secundario puede ser el 1,3-bis-2-(5-fenil-oxazolil)benzene -- (POPOP), el cual hemos utilizado para nuestras de -- terminaciones, ó bien un derivado recientemente -- lanzado al mercado que es el dimetil POPOP (1,4-bis-2-(4-metil-5-fenil-oxazolil) benzene.

La solución de centeo se prepara en la si- -- guiente forma:

PPO	4.0 g.
POPOP	0.100 g.
Toluene (Grade de centelleo) o.b.p.	1,000 ml.

De esta solución, se agregan al recipiente -- con la muestra seca de 5 a 15 ml. Por lo general nosotros usamos 10 ml. para cada problema.

Material radiactivo.- Las partículas radiactivas que a nosotros nos interesan incluyen el C^{14} y H^3 , que forman parte de la estructura química de los esteroides en estudio. Estos esteroides marcados se transfieren con un solvente orgánico a los recipientes donde se contará la muestra, y antes de agregar la mezcla Teluene-POPOP-PPO, se evaporan bajo corriente de nitrógeno.

Recipiente para contar.- Se usan por lo general frascos de vidrio ó bien de polietileno de 22 ml. de capacidad. Los frascos deben de ser de un vidrio con bajo contenido de K^{40} , el cual está presente normalmente en toda clase de vidrio, pero que varía en los frascos, de acuerdo con los diferentes fabricantes. La importancia del bajo contenido de K^{40} en el vidrio radica en que éste produce mayores cuentas de fondo y por consiguiente a mayor contenido de K^{40} mayor será el número de estas cuentas.

Con el uso de recipientes de polietileno se ha logrado disminuir este inconveniente, pero este material es relativamente permeable al teluene y no es recomendable dejar la muestra ya preparada por períodos de tiempo más ó menos prolongados.

5.- Localización de metabolitos - radiactivos en cromatogramas de papel.-

Para la localización de compuestos radiactivos en los cromatogramas de papel se usan una gran variedad de procedimientos, entre los que resulta de una manera importante, el análisis de la tira cromatográfica con un contador Geiger sin ventana incluido en un circuito de gas "Q", adaptado a un medidor y a un graficador automático. En nuestro laboratorio este procedimiento se realiza con un Scanogram II, modelo NSC-160 de Atomic Accessories Inc. Este procedimiento tiene el inconveniente de que no nos permite hacer una buena diferenciación de isótopos de diferente energía, como serían el C^{14} y H^3 usados en este método.

Con objeto de poder tener una gráfica adecuada que nos permita analizar simultáneamente compuestos marcados con C^{14} y H^3 , establecimos el siguiente procedimiento:

De un cromatograma en donde se habían localizado los diferentes portadores, por medio de las reacciones de color y absorción a la luz ultravioleta tal y como hemos mencionado anteriormente, se corta una tira longitudinal de 2 cm. de ancho.

la que a su vez se subdivide de centímetro en centímetro a partir de la línea de aplicación hasta el extremo opuesto de ésta. Estas fracciones de la tira se numeran en forma progresiva y cada una de ellas se deposita en un frasco de centos que contiene 5 ml. de la mezcla de Tolueno-PCPOT-IPG. El compuesto radiactivo que está en el papel, se eluye en el tolueno y se cuenta en el espectrómetro de centelleo líquido para determinar su contenido en C^{14} y H^3 de acuerdo con el procedimiento ya descrito. Una vez obtenidos los valores de C^{14} y H^3 para cada fracción del cromatograma se grafican en la forma representada en la figura 27.

Cuando tenemos algún cromatograma con compuestos marcados exclusivamente con C^{14} , éste puede cortarse de centímetro en centímetro a todo lo ancho del cromatograma, siempre y cuando éste no tenga más de 25 mm. de ancho, y las fracciones así obtenidas y previamente numeradas se pegan con una tirita de Durox a planchetas de aluminio las cuales son analizadas en un contador Geiger con ventana de "Microsil" modelo D-47 de Nuclear de Chicago, adaptado a un cambiador automático de muestras, modelo C-100A y a un escalador de déca-

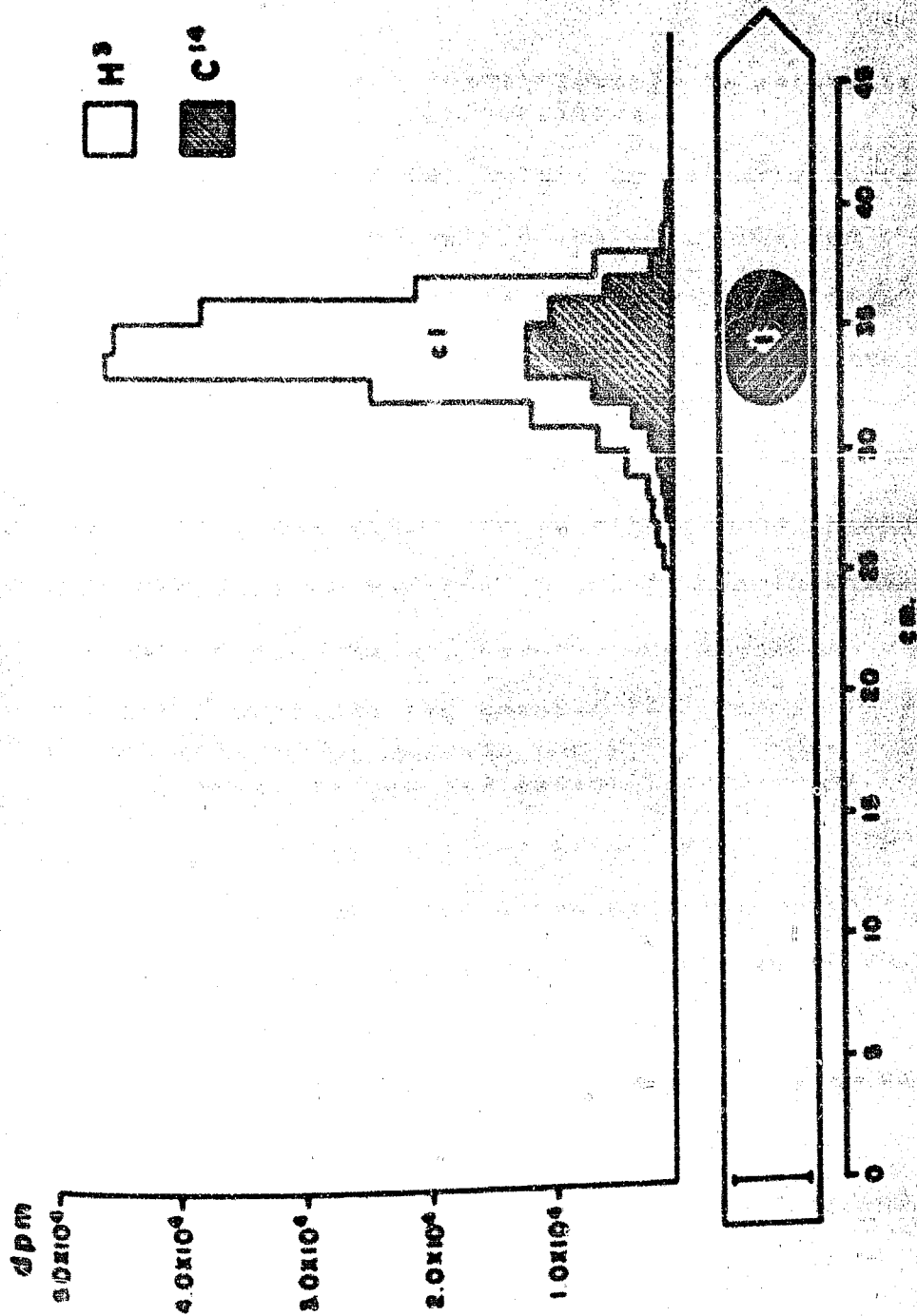


FIGURE 27.

das modelo 181-A. Una vez obtenidos los valores de radioactividad expresados en desintegraciones por minuto, se grafican éstos de manera semejante a la técnica anterior.

6.- Identificación de metabolitos radioactivos.-

En este mismo capítulo y en la parte correspondiente a los procedimientos de incubación y extracción, mencioné que se incubaron 50 μc de Δ^5 -pregnenolona- $7\alpha\text{-}^{14}\text{C}$ de una actividad específica de 2.2 mc/mg , y 2 μc de colesterol $4\text{-}^{14}\text{C}$ con una actividad específica de 0.17 mc/mg . Si relacionamos la radioactividad con la cantidad de esteroide incubado y si tomamos en cuenta las actividades específicas dadas, tenemos que los 50 μc del esteroide tritinado representan 22.7 μg , y los 2 μc del colesterol marcado con ^{14}C , 11.1 μg .

Es evidente que los metabolitos radioactivos formados a partir de estos precursores, estarán presentes en cantidades directamente proporcionales a estos precursores y se recuperarán en cantidades de microgramos ó fracciones de éstos.

Si queremos establecer la estructura de estos metabolitos por los procedimientos físicos habituales, nos daremos cuenta inmediatamente que con estas cantidades tan insignificantes de este-

roide es imposible realizar estudios de infrarrojo, análisis cuantitativo de C, H y O, absorción en ultravioleta, rotación óptica, punto de fusión, y en fin todos aquellos estudios que nos permiten establecer su estructura química, sin dejar lugar a duda. Por esto es necesario recurrir a procedimientos indirectos que nos indiquen con bastante precisión la estructura química de los esteroides encontrados. Existen algunas variantes, pero en general todos están orientados a demostrar la radiopureza química de la sustancia esteroide después de agregar una cantidad suficiente de esteroide no radioactivo, con una estructura química que suponemos sea igual a la sustancia que tratamos de identificar. Esta sustancia pura que se agrega recibe el nombre de portador y se somete, mezclada al compuesto radioactivo en estudio, a diferentes procedimientos de purificación incluyendo cromatografía en papel, distribución de cocorriente y cristalizaciones sucesivas. En caso de que la sustancia radioactiva tenga la misma estructura que el portador seleccionado, acompañará siempre a éste a través de los diferentes procedimientos de purificación y conservará siempre la misma actividad específica. Estos métodos reciben el nombre de dilución isotópica inversa.

CAPITULO III

CAPITULO III.

RESULTADOS

Después de realizar los procedimientos de incubación y extracción se obtuvieron 1.75 μc . de compuestos marcados con C^{14} y 12 μc . de compuestos marcados con H^3 , lo cual corresponde a un porcentaje de recuperación de 87.5 y 84% respectivamente. Si a los substratos radiactivos incubados les asignamos un valor de 100% y tenemos en cuenta las pérdidas de radiactividad ocasionadas por los procedimientos de purificación, tenemos que al final de éstos, la cantidad neta de radiactividad se distribuye en las diferentes fracciones de acuerdo con los porcentajes expresados en el cuadro No. III.

EXTRACTO CRUDO

$C^{14} = 87.5 \%$

$H^3 = 24.0 \%$

$C^{14} =$ METABOLITOS DEL COLESTEROL - 4 C^{14}

$H^3 =$ METABOLITOS DE PREGNENOLONA - 7 H^3

90% MeOH-H₂O

$C^{14} = 35.4 \%$

$H^3 = 22.4 \%$

LIGROIN

$C^{14} = 82.1 \%$

$H^3 = 1.6 \%$

F. NEUTRA

$C^{14} = 33.8 \%$

$H^3 = 21.2 \%$

F. FENOLICA

$C^{14} = 1.0 \%$

$H^3 = 1.2 \%$

Como puede verse después de la partición entre Metanol-Agua y Ligroín, más de la mitad de los metabolitos marcados con C^{14} se encontraron en la fase menos polar representada en este caso por el Ligroín. En términos generales, esto nos indica que el 32.1% del colesterol no fue transformado a sustancias de mayor polaridad como serían los esteroles que en este sistema de solventes se encontrarían en la fase más polar de Metanol-Agua. Por el contrario, los metabolitos derivados de la pregnenolona- $7\alpha H^3$, se encuentran fundamentalmente en la fase metanólica, y el 1.6% encontrado en el Ligroín puede explicarse como contaminación -- por este simple procedimiento de partición, é -- bien que ésta se deba a metabolitos muy poco polares derivados de la pregnenolona.

Con objeto de separar los metabolitos neutros de los fenólicos, el extracto metanólico se sometió al procedimiento de partición entre Tolueno e hidróxido de sodio 1N. con lo cual se obtuvo la mayor parte de la radioactividad en la fracción neutra, y un porcentaje mínimo en la fracción fenólica. Debido a la naturaleza de este estudio no se trataron de identificar los metabolitos fenólicos presentes en esta fracción.

En la fracción neutra se encuentran metabolitos esteroides de 21 y 19 átomos de carbón derivados tanto del colesterol $h-C^{16}$ como de la pregnenolona- $7\alpha(H)$. Con objeto de aislar individualmente estos metabolitos y el poder establecer su identidad se siguieron los procedimientos de cromatografía en papel y cristalización a una actividad específica constante de manera semejante a lo descrito en el capítulo anterior.

Una alícuota de la fracción neutra se aplicó a un papel Whatman No. 1 de 11 cm. de ancho y se desarrolló durante 11 horas en el sistema de Líquido-Preparilóglícol, recogiendo en los goteos compuestos muy poco polares ó bien restos de colesterol $-4 C^{16}$. Inmediatamente después de esta primera cromatografía, el papel todavía húmedo se transfirió a otra cámara cromatográfica en donde se desarrolló durante 11 horas más en el sistema de Tolueno-Preparilóglícol, recogiendo nuevamente los goteos que contienen compuestos de polaridad intermedia. Después de esta segunda cromatografía, la tira de papel se sacó, evaporó y localizaron algunos de los portadores no radioactivos agregados, por medio de las reacciones de color y absorción al ultravioleta. Los compuestos radio-

activos se localizaron por medio de un analizador de cromatogramas modelo Scanogram II como ya se mencionó en el capítulo anterior y están representados en la figura 28.

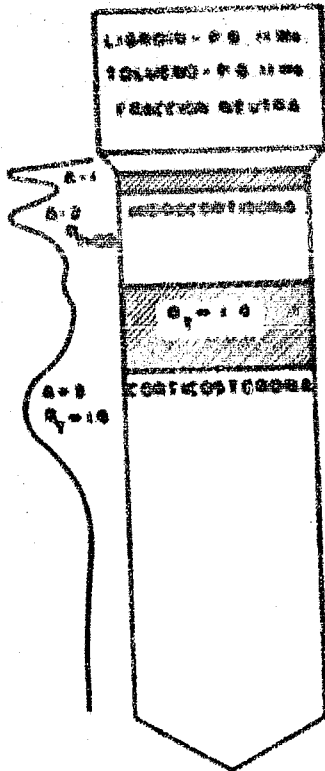


Figura 28.

Como puede verse en esta figura, el cromatograma reveló la presencia de tres zonas de radiactividad identificándose como A-1, A-2 y A-3. La zona A-1 corresponde con el portador de Hidrocortisona y la zona A-3 se desplazó un poco más rápido que el portador de Corticosterona. Estos dos portadores fueron localizados por medio de la reacción en papel de Azul de Tetra

zelle entre la línea de aplicación y 2.5 cm. y 17.0 y 16.5 cm. respectivamente. El R_f calculado para la Corticosterona en este sistema fue de 1.6

El R_f para el portador de Hidrocortisona no se pudo precisar, debido a que en este sistema el compuesto no se movió de la línea de aplicación. Las R_f calculados para las zonas radiactivas A-2 y A-3 fueron de 0.5 y 1.6 respectivamente.

ZONA A-1 .- Del análisis de estas tres zonas radiactivas se dedujo que la zona A-1 podría corresponder a Hidrocortisona, aunque era posible que esta zona estuviera representada por radioactividad, que se encuentra muy frecuentemente en la línea de aplicación, y que no represente ningún compuesto radiactivo en especial. Al eluir la zona se encontró, después de calcular las pérdidas de radioactividad ocasionadas por los procedimientos previos de purificación, un rendimiento de 0.6% de Cl^{36} y 1.0% de H^3 , tomando como base la cantidad total de substratos radiactivos incubados. Esta fracción se rechromatografió al frente en el sistema H_f de Bush, observándose que la radioactividad persistía en la línea de aplicación sin encontrarse radioactividad alguna en la zona correspondiente al portador de Hidrocortisona que en este sistema tiene un R_f de 0.32, es decir, se desplaza aproximadamente hasta el primer tercio -

del cromatograma. Con la evidencia anterior se puede establecer en forma definitiva que el Colesterol y la Pregnenolona no fueron transformados en esta incubación a hidrocortisona.

ZONA A-2 .- Esta zona de radioactividad que se desplazó en Tolueno-Propiléniglicol con un R_f de 0.5, podría corresponder a Cortisona. Con objeto de estudiar esta posibilidad, se eluyó y se determinó con un Espectrómetro de Contorno Líquido de su contenido de C^{14} y H^3 , los que fueron de 0.6% para el primero y 2.8% para el segundo. Al extracto seco se agregaron 500 μ g. de Cortisona y se recromatografiaron al frente en el sistema B_2 de Bush. El portador fue localizado por medio de su absorción en ultravioleta y la reacción de Azul de Tetrazolio; obteniéndose un R_f de 0.51 que corresponde al informado en la literatura para este sistema de Bush. Figura 29.

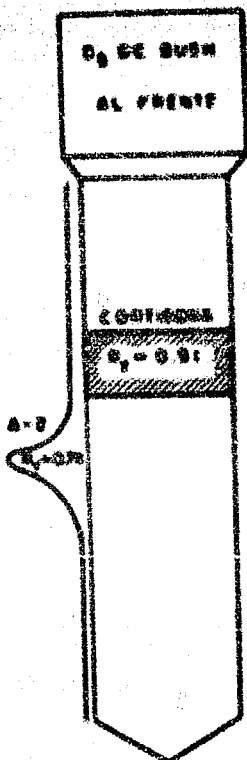


Figura 29.

La radioactividad se localizó con un Scanegram II, obteniéndose un R_f de 0.74.

Del análisis de los resultados obtenidos por estos procedimientos cromatográficos se concluyó que la sustancia A-2 no era Cortisona, y que su estructura le daba características especiales en forma tal que su polaridad era mayor

que la Corticosterona y menor que la Cortisona. Aunque la estructura no pudo ser establecida, es posible concluir que este compuesto es un metabolito de la Pregnenolona y del Colesterol, observándose una relación de H^3/C^{14} expresada en desintegraciones por minuto (dpm), de 100:1.

ZONA A-3 .- Esta zona radiactiva fue analizada junto con la zona correspondiente al portador de Corticosterona. Se determinó su contenido de C^{14} y H^3 en el Espectrómetro de Controles líquidos y éste fue de 1.7% y 2.4% respectivamente. Esta zona se recrematografió nuevamente durante 13 horas en Teluene-Propilénglicol, observándose que la radioactividad, prácticamente se superpone al portador de Corticosterona, aunque con un desplazamiento ligeramente más rápido, tal y como se expresó en el cromatograma original. Con objeto de comprobar en forma definitiva si esta zona A-3 era Corticosterona, se acetiló una alícuota de A-3 mezclada con el portador de Corticosterona auténtica, con el procedimiento habitual de Piridina y Anhídrido Acético en proporción de 2:1, a temperatura ambiente y durante toda la noche. Una vez evaporados los reactivos utilizados, el extracto seco se recrematografió en Teluene-Propilénglicol durante 4 horas, observándose el portador de Monoacetato de Corticosterona un poco por abajo de la mitad del papel (R_f 8.0) y el compuesto radiactivo, posiblemente un mono ó diacetato, cerca del fin del papel con un R_f de 10.0.

La evidencia definitiva de que la zona A-3 no era Corticosterona, se obtuvo después de cristalizar varias veces una alícuota de ésta con 20 mg. de Corticosterona pura y observándose que la radioactividad se localizaba continuamente en las "aguas madres", y que los cristales agregados estaban totalmente desprovistos de radioactividad - después de dos cristalizaciones a partir de Aceto te de Etilo. Cuadro No. IV.

CUADRO No. IV

Crist. Sucesiva	mg.	Actividad Específica	
		C^{14}	H^3
	20	1,812	5,112
1a.	13.1	16	618
2a.	10.5	11	497

La estructura de este compuesto de una polaridad parecida a la Corticosterona no se pudo establecer hasta la fecha, pero es posible decir que es un metabolito que proviene tanto del Colesterol $4-C^{14}$ como de la Pregnenolona- $7(H^3)$, con una relación de H^3 y C^{14} de 35:1.

Los goteos del cromatograma original desarrollados durante 11 horas en el sistema de Tolueno-Propilénico, se evaporaron y recromatografiaron en Tolueno-Propilénico durante 45 horas más. Con este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados:

ZONAS B-1 y B-2 .- Después de detectar la presencia de portadores y compuestos radiactivos con las técnicas ya mencionadas, se obtuvo una señal positiva al reactivo de Zimmermann, con un R_f de 0.3, que correspondía al portador de Espíroepiandrosterona (DHA). Figura 30.

Sobreponiéndose a la zona del portador, se localizó una zona radiactiva ó posiblemente desuperpuestas (indicado por un pequeño hombre en el pico radiactivo) a las cuales se les asignó la denominación de B-1 y B-2. Debido a la poca resolución de estos dos compuestos, se recromatografiaron juntos en el sistema de Ligroína-Propilénico durante 72 horas más y al analizar la tira de papel con el Espectrómetro de Contorno Líquido en lugar del Scanegram II, de acuerdo con la técnica previamente descrita, se obtuvo el resultado representado en la figura 31.

En esta figura podemos ver que la zona radiactiva, que encontramos en el cromatograma anterior, está representada por dos sustancias de las cuales, la más polar, é sea, aquella indicada con B-1, se encuentra al mismo nivel que el portador de DNA y su radioactividad está dada por una mezcla de C^{14} y H^3 . El segundo compuesto, es decir, el representado como B-2, es un poco menos polar que el B-1 y su radioactividad está dada exclusivamente por H^3 .

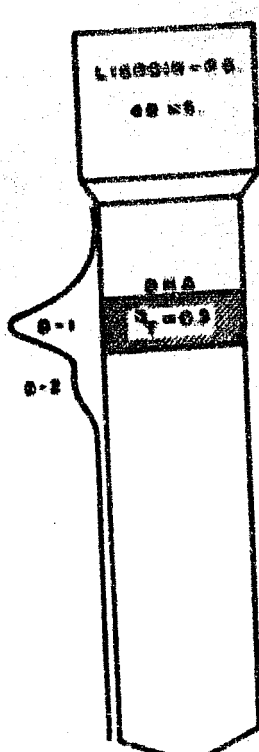


Figura 30.

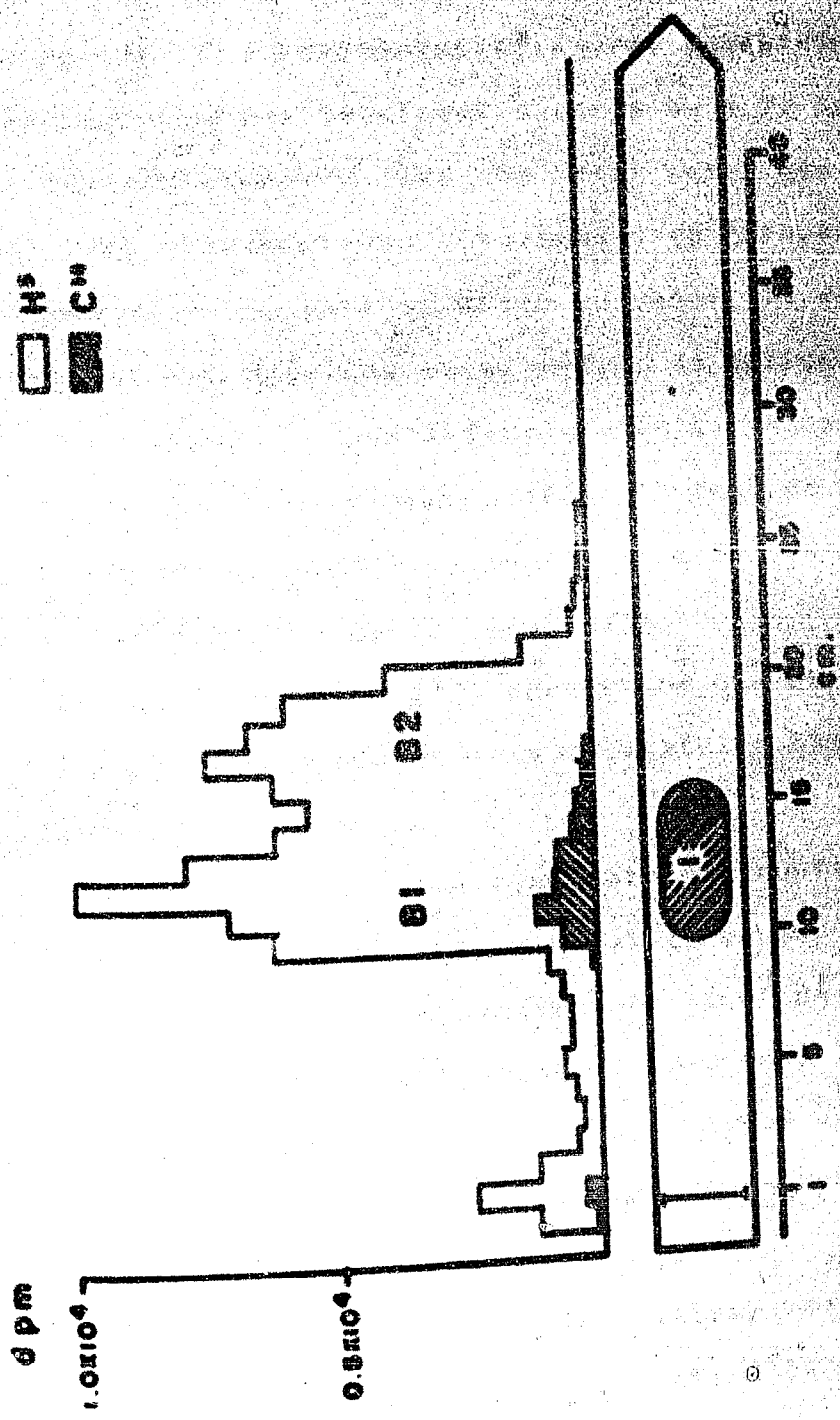


Figure 21.

ZONA B-1 .- Estas dos zonas se eluyeron por separado y a B-1 se le agregó una cantidad extra (100 µg) de DNA, recromatografiándose sucesivamente en Ligrofo-Propilóglícol durante 48 y 72 horas, respectivamente. Hay que hacer notar que en estos tres cromatogramas obtuvimos tres diferentes valores de R_f para el mismo portador, lo cual se explica por defectos en el método de aplicación del extracto y por diferencia en las temperaturas del cuarto de cromatografía, la cual no fue posible mantener constante debido a fallas técnicas en los sistemas de su regulación.

En las figuras 32 y 33 observamos que la Zona B-1 se separa perfectamente de posibles contaminaciones de la zona B-2.

Después de eluir este compuesto que contiene el portador de DNA, se determinó el contenido de C^{14} y H^3 obteniéndose un rendimiento total de 6.5% de H^3 y 16.9% de C^{14} , tomando en cuenta las pérdidas ocasionadas por los procedimientos mencionados, la relación H^3/C^{14} expresada en dpm. fue de 10:1.

Con objeto de establecer definitivamente la estructura de B-1, se tomó una alícuota a la que

se agregaron 30 mg. de DHA pura y se recristalizaron 4 veces a partir de Metanol. Los resultados obtenidos se incluyen en el cuadro No. V.

CUADRO No. V

Crist. Sucesiva	mg.	Actividad Especifica cpm/mg.	
		C ¹⁴	H ³
1a.	21.7	609	6,170
2a.	19.2	606	6,072
3a.	13.6	602	5,907
4a.	10.9	613	6,169

Estos resultados nos demuestran que la actividad específica de la DHA permanece constante a través de repetidas cristalizaciones, tanto en un contenido de C¹⁴ como en el de H³. Este criterio es suficiente para establecer la estructura de B-1 como DHA (7- β -hidroxil-5-androsten-17-ona).

La presencia de DHA marcada con C¹⁴ y H³ nos indica que tanto el Colesterol como la 5-Pregnenolona fueron transformados a este compuesto de 19 átomos de carbón. El porcentaje de conversión -- fue de 16.9% a partir de Colesterol-4-C¹⁴ y 6.5%

a partir de 5-Pregnenolona- 7α -H³.

ZONA B-2 .- Esta zona fue rechromatografiada al igual que la zona B-1 en Ligroin-Propilénogli-col durante 40 horas. Figura 34.

En esta figura se observa que el compuesto B-2 se desplaza más rápidamente que la DHA y que su radioactividad está constituida exclusivamente por H³, es decir, es un metabolito exclusivo de la 5 Pregnenolona. El R_F que se estableció para esta substancia en las condiciones específicas del cromatograma fue de 0.77, en donde el R_F para la DHA fue de 0.57. De acuerdo con el desplazamiento observado, este compuesto es ligeramente más polar que la pregnenolona. Después de eluir B-2 y determinar su contenido de radioactividad, se pudo corroborar que tenía exclusivamente H³, con un porcentaje de conversión a partir de Pregnenolona de 4.7%, tomando en consideración las pérdidas durante todo el procedimiento.

Con objeto de establecer la identidad de la zona B-2, se agregaron a una alícuota de ésta, 20 mg. de Pregnenolona pura y después de repetidas cristalizaciones a partir de Metanol, la actividad específica disminuyó rápidamente, de manera

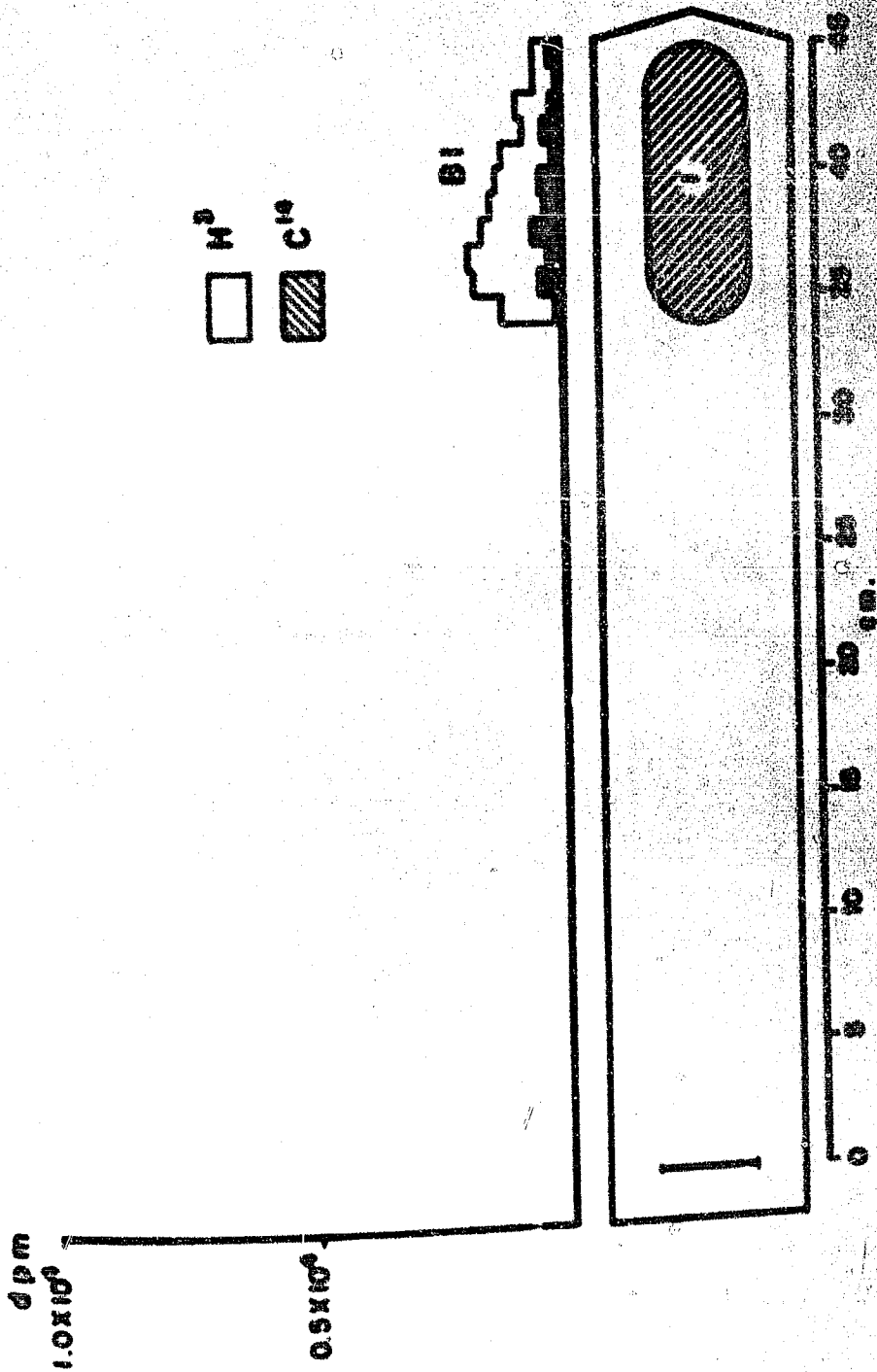


Figure 12.

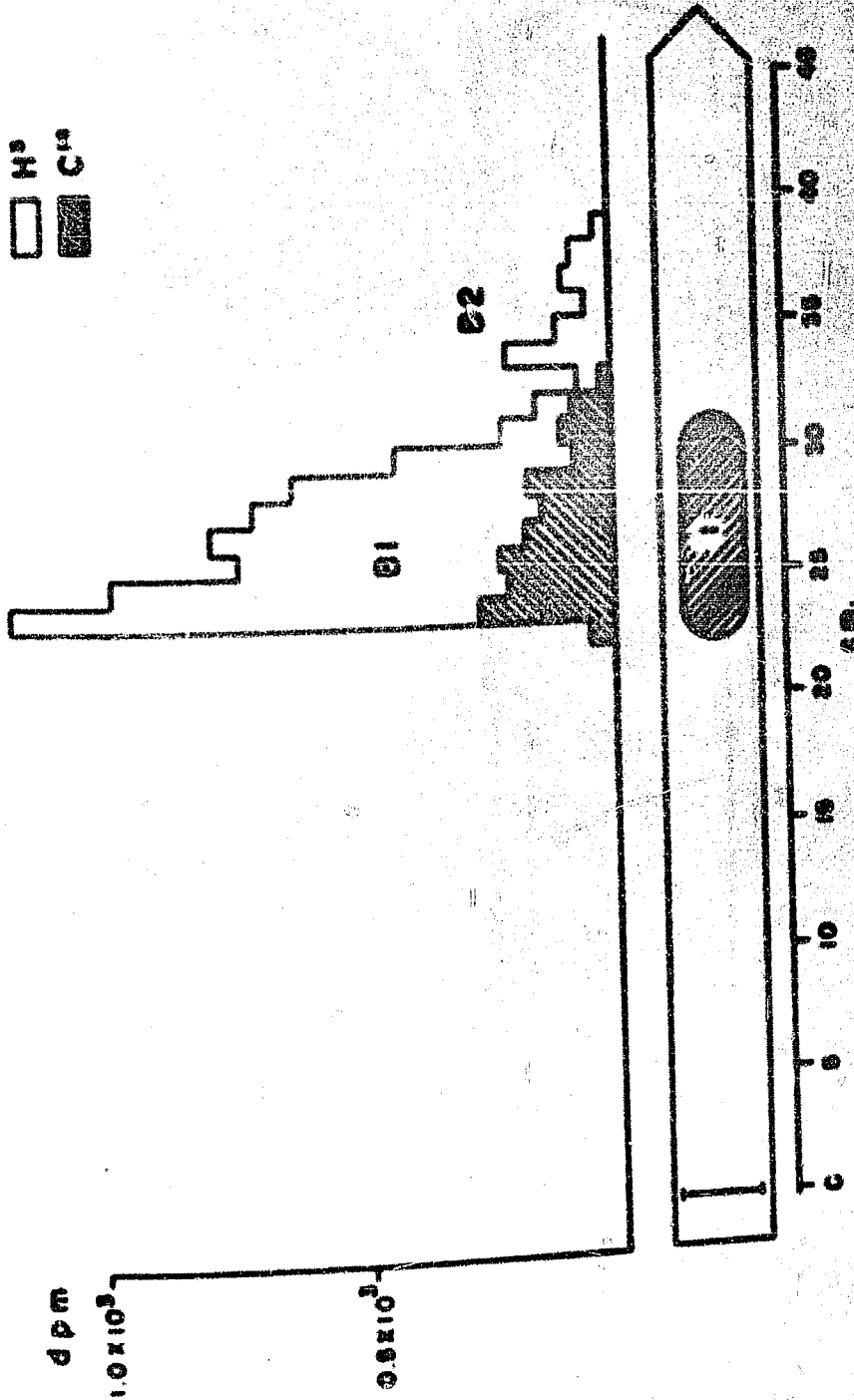


Figure 33

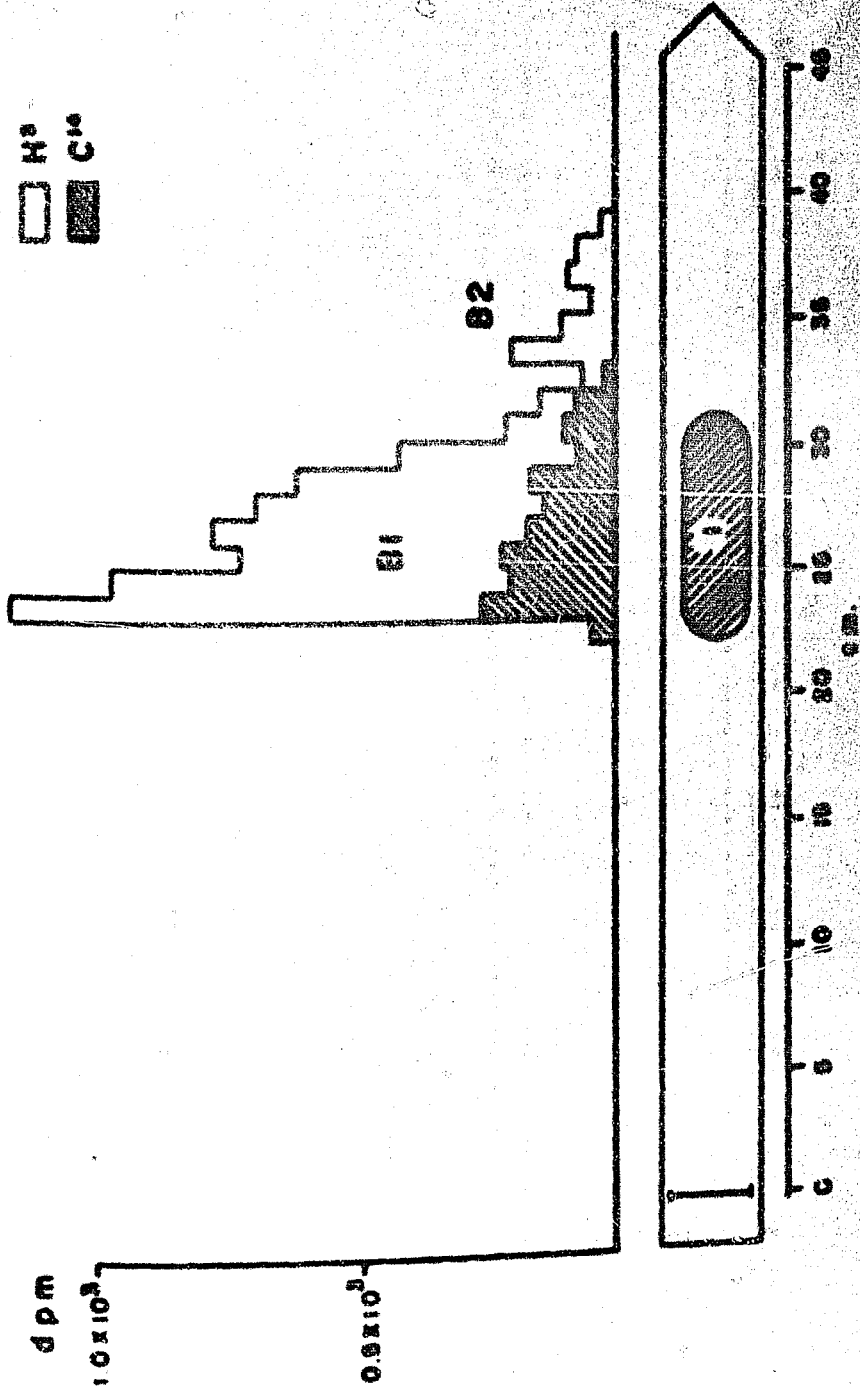


Figure 15.

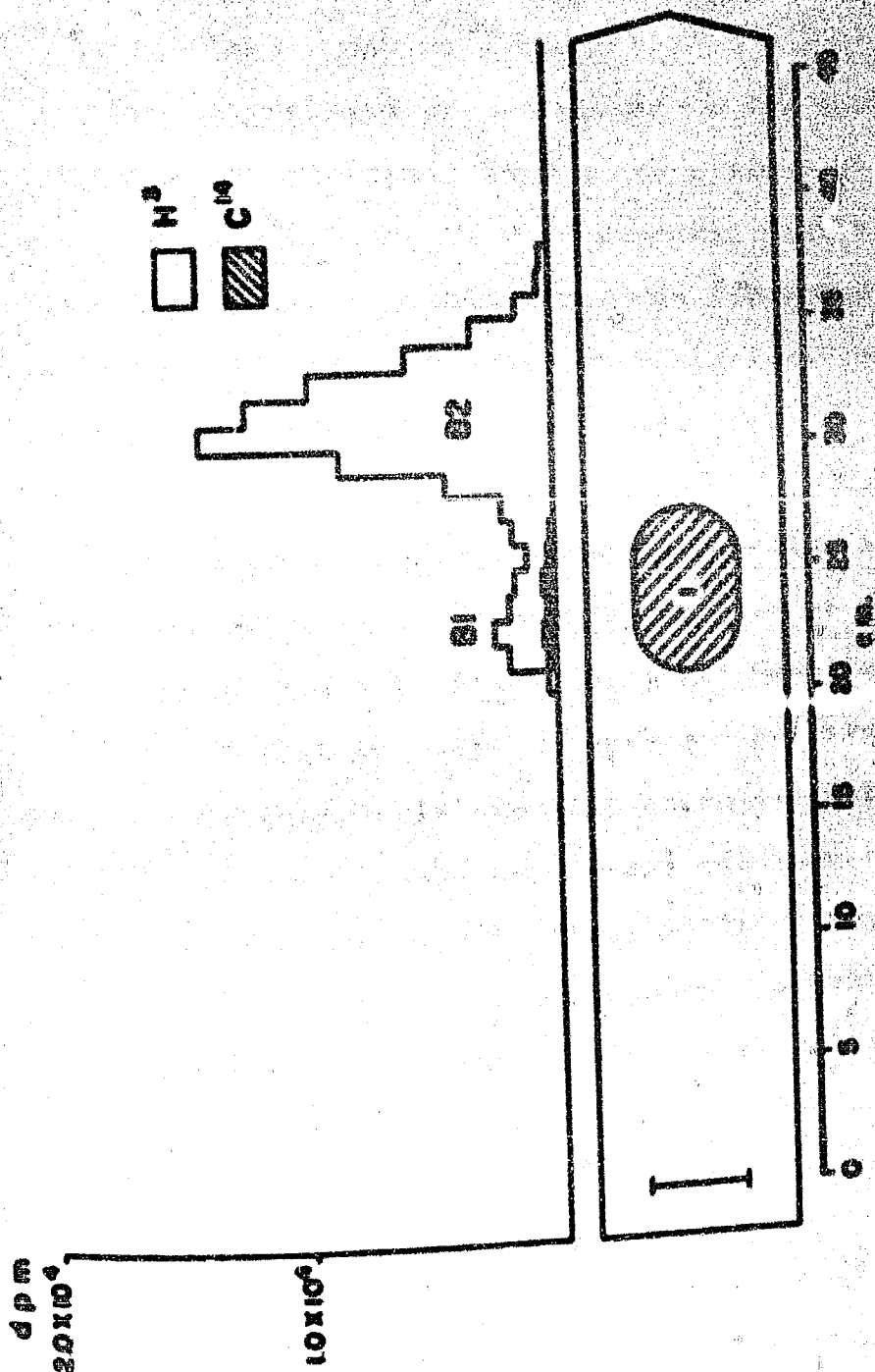


Figure 37.

que después de la segunda cristalización la Pregnenolona agregada y purificada de esta manera no contenía radioactividad alguna, encontrándose ésta en las "aguas madres".

Aunque por este procedimiento no fue posible establecer la identidad de H-2, si podemos decir que es un derivado de la Pregnenolona, posiblemente de 21 átomos de carbono y con dos funciones oxigenadas. Ya en la discusión de estos resultados veremos las implicaciones que puede tener el aislamiento de este metabolito.

Las demás fracciones obtenidas con los diferentes procedimientos cromatográficos no se han identificado hasta la fecha, pero los resultados obtenidos fueron lo suficientemente sugestivos para poder establecer la transformación del Colesterol y la Pregnenolona a uno de los más importantes andrógenos que se sintetizan en la corteza suprarrenal y que está representado por la Dehidroepiandrosterona. Las posibles vías metabólicas seguidas durante este proceso de biosíntesis serán discutidas en el capítulo siguiente.

CAPITULO IV

CAPITULO IV.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos se pudo establecer que este tumor suprarrenal es capaz de convertir al colesterol y a la pregnenolona, en un compuesto androgénico de 19 átomos de carbón representado por la DHA. Ya hemos mencionado que esta hormona casi seguramente constituye el andrógeno que se biosintetiza en mayor cantidad por las glándulas suprarrenales y tiene grandes probabilidades de ser el principal precursor de los 17-oxoesteroides urinarios. Este experimento sugiere que la pregnenolona siguió la vía metabólica representada por:

Pregnenolona \longrightarrow 17 α -OH-Pregnenolona \longrightarrow Dehidroepiandrosterona.

Con anterioridad se ha demostrado que tanto el tejido suprarrenal (33) como el placentario (34) son capaces de transformar el colesterol a pregnenolona, con lo cual el camino más probable para la transformación de nuestro colesterol- ^{14}C a DHA, se hará a través de pregnenolona: sin embargo la proporción de H^3 y C^{14} presentes en la -

DHA y en otros metabolitos no identificados no parece apoyar esta vía metabólica. Es evidente que el colesterol fue metabolizado a DHA, pero también es posible que esta transformación se haya realizado a través de un camino metabólico diferente a lo encontrado con anterioridad y que no incluye a la pregnenolona como intermediario. Este camino metabólico podría estar representado por la transformación del colesterol a un derivado 17, 20 dihidroxilado, el cual perdería la cadena lateral por oxidación al nivel del carbón 17, originando directamente la DHA sin necesidad de un intermediario de 21 átomos de carbón.

Si estudiamos el cuadro No. III nos damos cuenta que el Colesterol- $4C^{14}$ incubado, se transformó a compuestos de mayor polaridad, posiblemente esteroides de 21 y 19 átomos de carbón, en un porcentaje de 35.6%. Asumiendo que esta transformación se hubiera realizado exclusivamente a pregnenolona, la relación teórica de H^3 y C^{14} que deberíamos encontrar en la pregnenolona ó sus derivados estaría alrededor de 70:1 (asumiendo que incubamos 25 veces más desintegraciones de H^3 que de C^{14}). Figura 35.

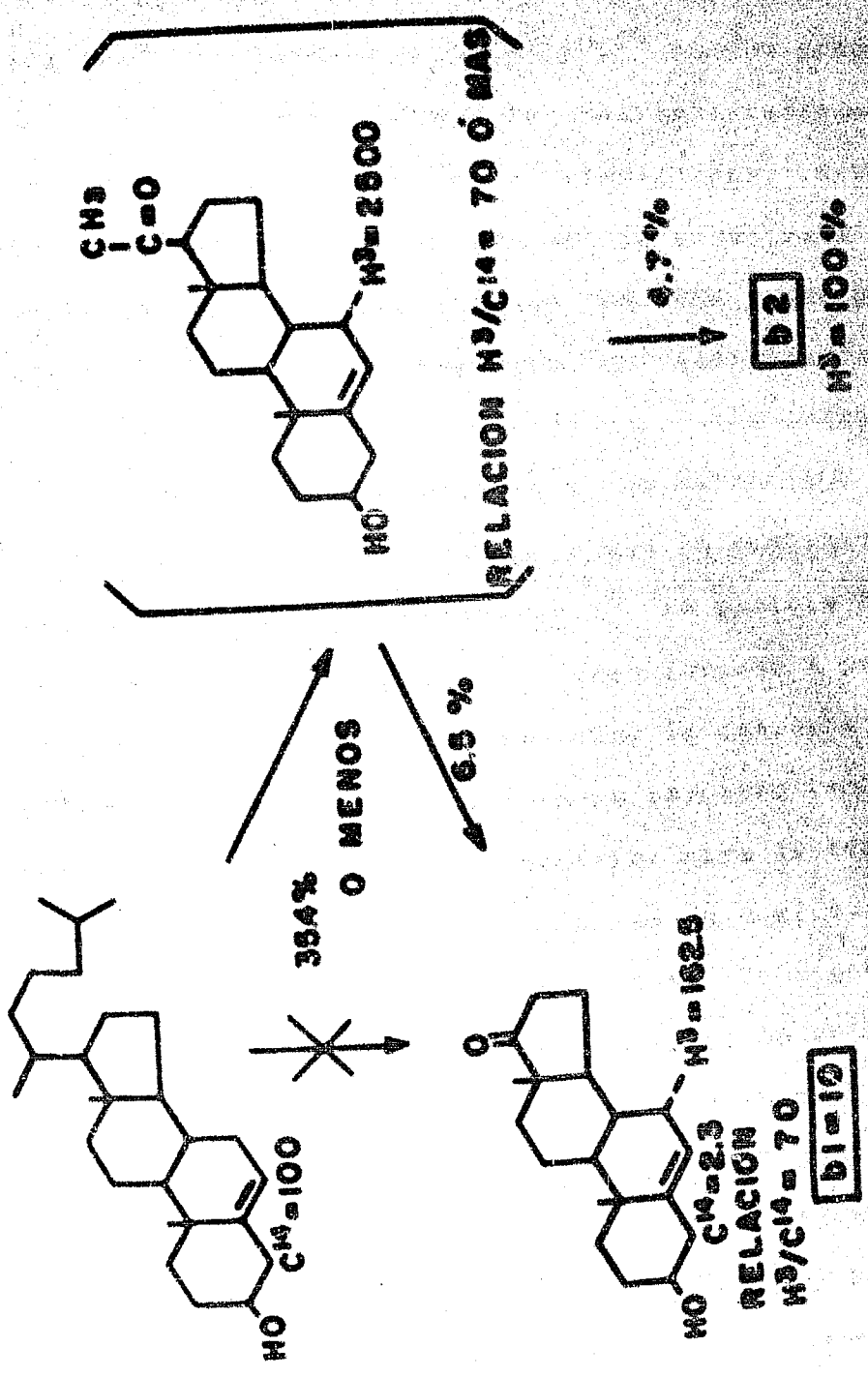


Figure 35.

Si el colesterol- h C^{14} incubado se hubiera transformado a pregnenolona, la DHA aislada debería tener un contenido de H^3 y C^{14} en una proporción de 70:1, semejante a la calculada teóricamente para los derivados de la pregnenolona. Esta relación no está de acuerdo con la encontrada en el compuesto B-1 identificado como DHA y que presenta una relación entre estos dos isótopos de 10:1. A mayor abundamiento el compuesto identificado como B-2 es indudablemente un metabolito derivado de la pregnenolona y ya que su contenido radioactivo es exclusivamente H^3 , es posible deducir que el colesterol no fue transformado a pregnenolona, tal y como lo demuestra la ausencia de C^{14} . Si este razonamiento fuera correcto tendríamos que buscar otra vía metabólica para la transformación del colesterol a DHA, en la cual no estuviera involucrada la pregnenolona. Para esto es necesario considerar la posibilidad de un intermediario común del colesterol y de la pregnenolona; posiblemente representado por el 5-androsterone- 3β - 17α - 20γ -triol, ilustrado en la figura 36. Si este compuesto ó alguno similar fuera el precursor de nuestra DHA, ésta debería tener una relación de H^3 y C^{14} cercana a 35, que es la misma

que presenta el compuesto no identificado A-3 y que indudablemente proviene del colesterol y de la pregnenolona. Esta hipótesis explicaría la falta de C^{14} en el metabolito B-2 derivado de la progesterona, pero no está de acuerdo con la relación de 10:1 observada en la DHA.

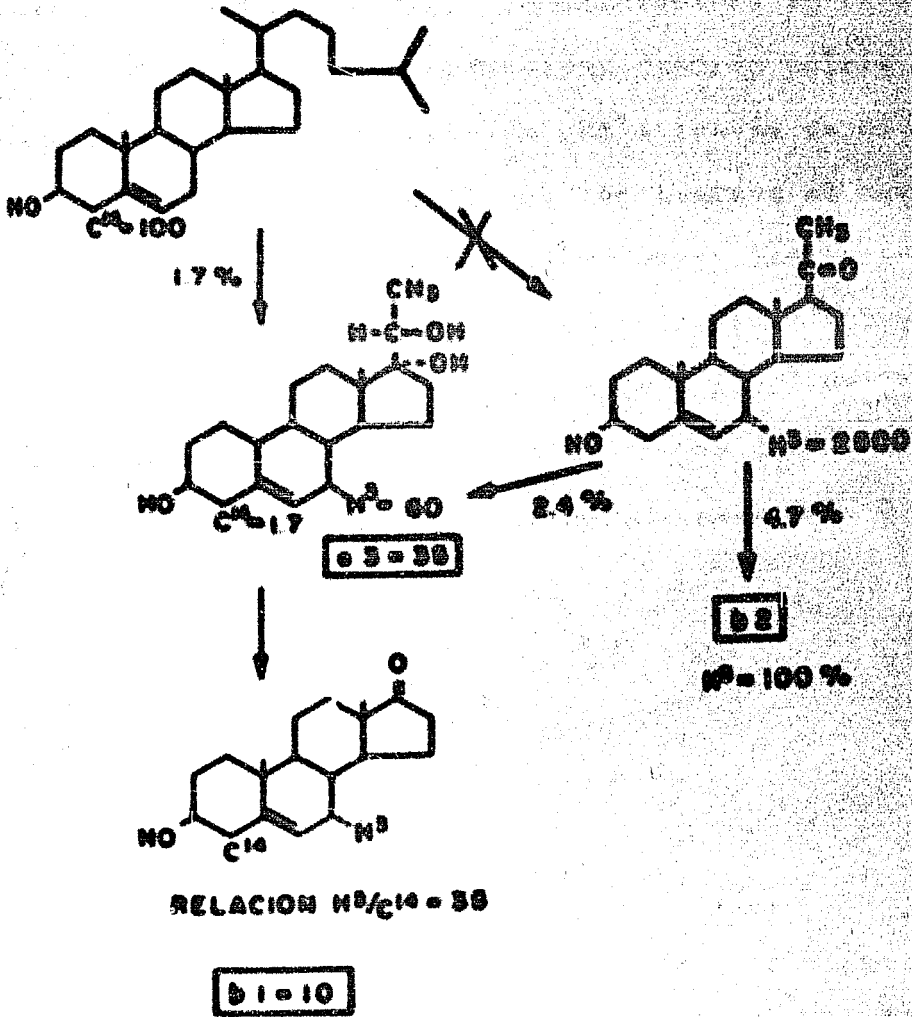
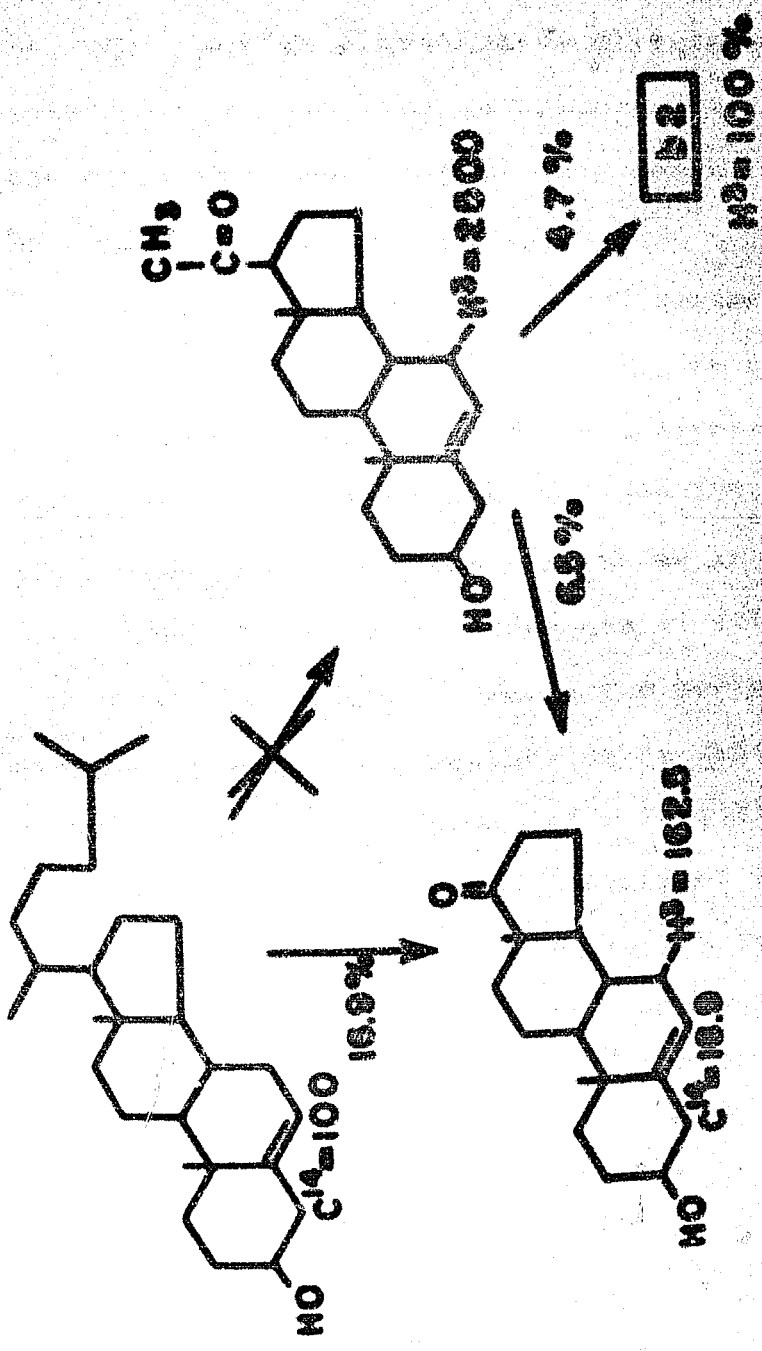


Figura 36.

Una tercera posibilidad es la que ya anotamos al principio de esta discusión y estaría relacionada con la transformación directa del celestrol a un derivado de 19 átomos de carbón, que en este caso sería la DHA. Indudablemente en esta transformación, la pregnenolona también podría dar lugar a la formación de DHA a través de un intermediario 17 α hidroxilado. Si tomamos en cuenta, como en las hipótesis anteriores, los porcentajes de conversión de los dos substratos incubados, tendremos que la relación de H³/C¹⁴ de la DHA resultante sería de 9.6:1, que es del todo semejante a la proporción demostrada para B-1. Figura 37.



RELACION $H^3/C^{14} = 0.0$

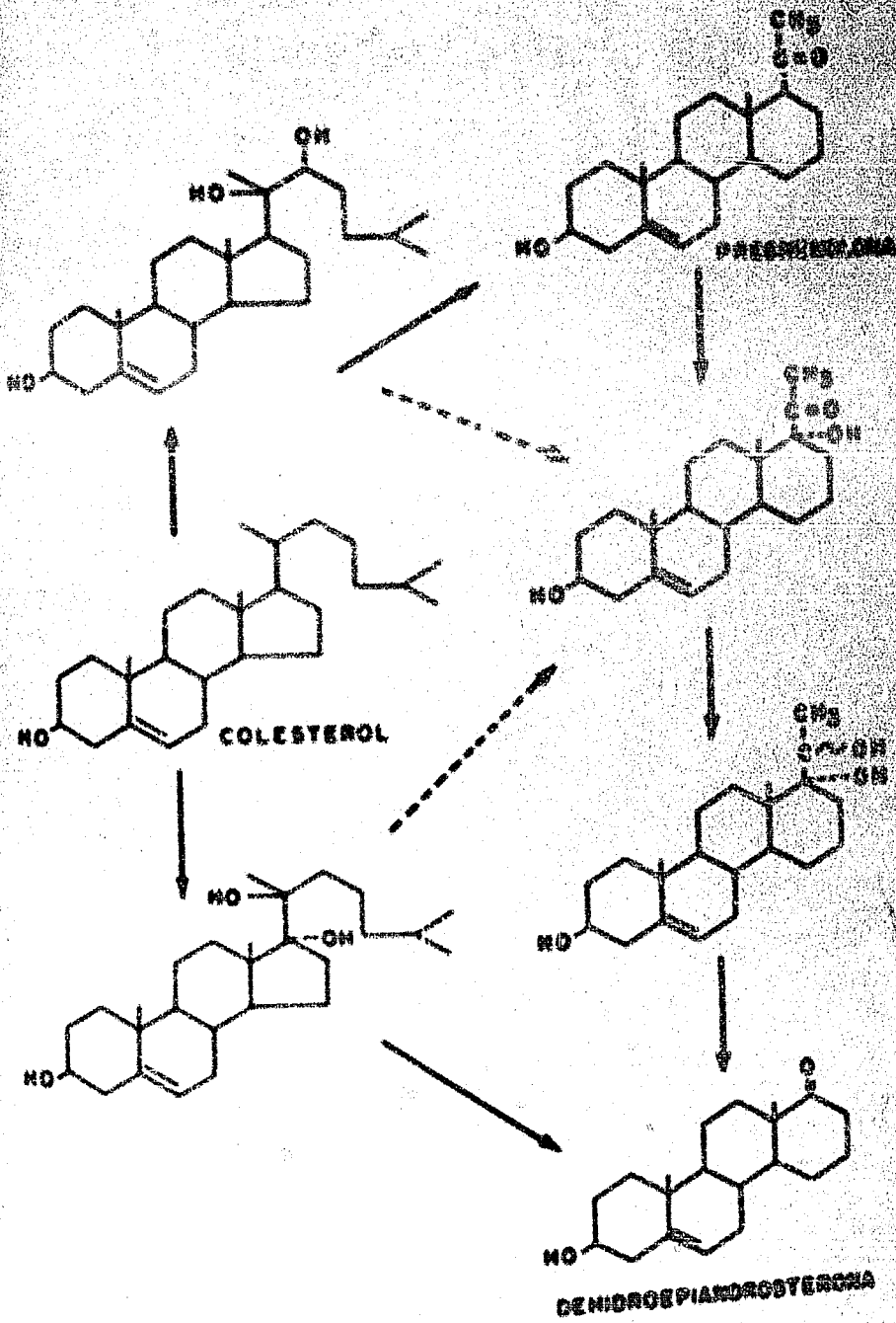
41=10

Figure 37.

Esta vía metabólica explicaría la ausencia de C^{14} en el metabolito B-2 y sugiere que, cuando menos en este tumor, los compuestos de 19 átomos de carbón pueden sintetizarse directamente del colesterol sin necesidad de precursores de 21 átomos de carbón, como serían la pregnenolona ó sus derivados 17 α -hidroxilados.

En apoyo de que este camino metabólico realmente existe, se presenta el hecho de que las suprarrenales de rata producen andrógénos en ausencia de corticoides 17 hidroxilados (35,36). Además estudios metabólicos realizados in vivo con esta misma paciente sugieren que el colesterol administrado por vía endovenosa fue convertido directamente a DHA por ruptura de la cadena lateral entre los átomos de carbón 17 y 20 (37).

En la figura 3ª podemos observar los posibles caminos metabólicos que ocurren durante la transformación del colesterol a pregnenolona por este tumor suprarrenal.



La ausencia de Hidrocortisona, Cortisona, Corticosterona y otros esteroides con la estructura Δ^4 3 ceto, nos indican una posible deficiencia de 3β dehidrogenasa, lo cual se refuerza por la gran cantidad de DHA aislada. Este defecto enzimático ha sido demostrado previamente en casos clínicos de tumores suprarrenales virilizantes, en los que habitualmente se pueden aislar en la orina cantidades elevadas de DHA, con predominio sobre otros metabolitos (38,39,40). Esta deficiencia de la 3β dehidrogenación podría indicarnos que los metabolitos aislados A-2 y A-3 podrían tener la configuración Δ^5 3β -hidroxi, y en caso de persistencia de la cadena lateral, presentar en ésta la configuración 20-ceto, 21-hidroxi. Tentativamente podríamos asignar al compuesto A-3 la estructura $3\beta, 21$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona y para A-2 cualquiera de las configuraciones $3\beta, 17\alpha$ -21-trihidroxi-5-pregnen-20-ona ó bien $3\beta, 11\beta$ -21-trihidroxi-5-pregnen-20-ona.

Vale la pena hacer notar que el empleo de compuestos marcados con isótopos de diferente energía, permitirá estudiar de manera semejante al presente trabajo una gran cantidad de vías metabólicas que se presentan durante el metabolismo

intermedio del organismo, no solo en lo relativo
de a las hormonas esteroideas sino también a los
hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

CAPITULO V

CAPITULO V.

RESUMEN

Hace más de dos décadas se sugirió que la dehidroepiandrosterona (DHA) se biosintetizaba en la corteza suprarrenal, y no fue sino hasta muy recientemente en que se pudo demostrar su presencia en sangre venosa suprarrenal y en tejido tumoral adrenal. Bloch y col., demostraron "in vitro" que las suprarrenales eran capaces de transformar el acetato a DHA y Colicain y col. encontraron que un tumor suprarrenal con manifestaciones clínicas de Cushing transformaba el colesterol y pregnenolona en el compuesto de 19 átomos de carbono antes mencionado. Se ha sugerido que el camino metabólico para la conversión del colesterol a DHA, procede a través de pregnenolona y 17 α -hidroxipregnenolona, la que por oxidación de la cadena lateral da lugar a DHA. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican de una manera indirecta, que, cuando menos en este tumor, la dehidroepiandrosterona puede ser sintetizada directamente a partir de colesterol sin necesidad de pasar a través de un intermediario de 21 átomos de carbono del tipo de la pregnenolona.

La incubación de 2 μ c de colesterol- C^{14} y 50 μ c de pregnenolona- H^3 con un homogenizado de un tumor suprarrenal virilizante al cual se añadieron diversos cofactores, dió lugar a la formación de diferentes metabolitos radiactivos, entre los que se identificó a la DHA como el principal esteroide derivado, tanto del colesterol como de la pregnenolona. La conversión total a partir de colesterol fue de 16.9% y a partir de la pregnenolona de 6.5%. La relación de H^3/C^{14} observada en la DHA fue de 10, lo cual contrasta con relaciones de 100, observadas para otros metabolitos de 21 átomos de carbón derivados tanto del colesterol como de la pregnenolona.

Dentro del grupo de compuestos aislados, no se obtuvo pregnenolona en cantidad apreciable lo cual nos indicó que ésta se metabolizó en su totalidad tanto a DHA, como a otros compuestos, entre los que logramos aislar uno que representaba el 4.7% de la cantidad total de H^3 incubada y que estaba marcado exclusivamente con este isótopo radioactivo. La ausencia de C^{14} en este metabolito no identificado hasta la fecha, nos sugiere que el colesterol no dió lugar a la formación de pregnenolona y, aunque los dos substratos usá

dos fueron transformados a dehidroepiandrosterona, los resultados obtenidos sugieren diferentes caminos metabólicos a partir de estos dos compuestos. Es posible que este camino metabólico proceda a través de un compuesto del tipo del 17 α ,20-dihidroxi-colesterol.

El contenido radioactivo de las muestras de este estudio se detectó con un espectrómetro de centelleo líquido (Tri-Carb Modelo 316), y se usó el método de "pantalla" para las cuentas de doble marcaje.

Durante la purificación de extractos, se usaron diferentes procedimientos de cromatografía en papel y la identidad de los compuestos aislados se estableció después de la formación de derivados, desplazamiento semejante a muestras auténticas en diferentes sistemas cromatográficos y orígenes repetidos a una actividad específica constante.

CAPITULO VI

CAPITULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Callow N. H. and Callow R.K.
THE ISOLATION OF 17-KETOSTEROIDS FROM THE
URINE OF NORMAL WOMEN.
Biochem. J. 33, 391, (1939).
- 2.- Nigeon C. J. and Pinger J. E.
IDENTIFICATION AND ISOLATION OF
DEHYDROISOANDROSTERONE FROM PERIPHERAL
HUMAN PLASMA.
J. Biol. Chem. 209: 767, (1954).
- 3.- Oertel G. W. and Bik-Hes K. B.
DEHYDROEPIANDROSTERONE IN BLOOD. I.
CLEAVAGE OF DEHYDROEPIANDROSTERONE
CONJUGATES BY PHOSPHATASE.
Acta Endocrinol. 28: 293, (1958).
- 4.- Oertel G. W. and Bik-Hes K. B.
DEHYDROEPIANDROSTERONE IN BLOOD. II.
ISOLATION OF COMPLEXES FROM HUMAN BLOOD
PLASMA CONTAINING DEHYDROEPIANDROSTERONE
AND PHOSPHORIC ACIS.
Acta Endocrinol. 30: 93, (1959).
- 5.- Lombardo M. E., Mc. Morris C. and Hudson
P. B.
THE ISOLATION OF STEROIDAL SUBSTANCES FROM
HUMAN ADRENAL VEIN BLOOD.
Endocrinology 65: 426, (1959).
- 6.- Baulieu E. E.
THREE SULFATE ESTERS OF 17-KETOSTEROIDS IN
THE PLASMA OF NORMAL SUBJECTS AND AFTER
ADMINISTRATION OF ACTH.
J. Clin. Endocrinol. & Metab. 20: 900,
(1960).
- 7.- Plantin L. O., Diezfelusy E. and Birke G.
ISOLATION OF DEHYDROEPIANDROSTERONE FROM
AND ADRENAL CORTICAL TUMOUR.,
Nature 179: 421, (1957).

- 8.- Baulieu E. E.
ESTERS-SULFATES DE STEROIDES HORMONAUX,
ISOLEMENT DE L'ESTER-SULFATE DE 5-ANDROSTENE-
3 α -OL, 17-ONE. (DEHYDROEPIANDROSTERONE) DANS
UNE TUMEUR CORTICO-SURRENALIENNE ASSOCIEE AU
STEROIDE LIBRE.
Compt. Rend. Acad. Sc. 249: 1421, (1960).
- 9.- Bloch E., Dorfman R. I. and Pinous G.
THE CONVERSION OF ACETATE TO
DEHYDROEPIANDROSTERONE BY HUMAN ADRENAL
GLAND SLICES.
Biochem. Biophys. Acta 61: 245, (1956).
- 10.- Goldstein M., Gut M. and Dorfman R. I.
CONVERSION OF PREGNENOLONE TO
DEHYDROEPIANDROSTERONE.
Biochem. Biophys. Acta 30: 150, (1960).
- 11.- Lieberman S. and Teich S.
METABOLIC PRECURSORS OF URINARY
DEHYDROEPIANDROSTERONE.
J. Clin. Endocrinol. & Metab. 13: 1140,
(1953).
- 12.- Goldstein M., Gut M., Dorfman R. I. and
Seffer L. J.
- 13.- Barton D. H. R.
CONFORMATIONAL ANALYSIS.
J. Chem. Soc. 1027, (1953).
- 14.- Barton D. H. R.
CONFORMATIONAL ANALYSIS.
Experientia 6: 316, (1950).
- 15.- Popják O.
BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL AND RELATED
SUBSTANCES.
Ann. Rev. Biochem. 27: 533, (1958).
- 16.- Cornforth J. W. and Popják O.
BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL.
Brit. Med. Bull. 14: 221, (1958).
- 17.- Bloch E.
BIOGENESIS AND TRANSFORMATIONS OF SQUALINE.
Proc. Intern. Congr. Biochem., 6th. Congr.,
Vienna, 1958. Symposium IV, p. 30.

- 18.- Bloch K.
THE BIOLOGICAL SYNTHESIS OF CHOLESTEROL.
Vitamins and Hormones 15: 119, (1957).
- 19.- Bagget B. and Engel L. L.
THE USE OF COUNTER-CURRENT DISTRIBUTION FOR
THE STUDY OF RADIOCHEMICAL PURITY.
J. Biol. Chem. 229: 443, (1957).
- 20.- Towett N.
ABSORPTIONSANALYSE UND CHROMATOGRAPHISCHE
METHODE. ANWENDUNG AUF DIE CHEMIE DES
CHLOROPHYLLS.
Ber. Dcut. botan Ges. 26: 384, (1906).
- 21.- Martin A. J. P. and Synge B. L. H.
Biochem. J. 35: 1354, (1941).
- 22.- Hurton R. B., Zaffaroni A. and Keutman E. H.
THE APPLICATION OF PAPER PARTITION
CHROMATOGRAPHY TO KETOSTEROIDS.
J. Clin. Endocrinol. and Metab. 6: 618, (1948).
- 23.- Bush I. E.
METHODS OF PAPER CHROMATOGRAPHY OF STEROIDS
APPLICABLE TO THE STUDY OF STEROIDS IN
KAMALIAN BLOOD AND TISSUES.
Biochem. J. 50: 370, (1952).
- 24.- Savard K.
SOME THEORETICAL AND SOME PRACTICAL ASPECTS
OF PARTITION CHROMATOGRAPHY OF KETOSTEROIDS.
Recent Progress in Hormone Research 9: 185,
(1954).
- 25.- Zaffaroni A., Hurton R. B. and Keutman E. H.
ADRENAL CORTICAL HORMONES: ANALYSIS BY PAPER
PARTITION CHROMATOGRAPHY AND OCCURRENCE IN
THE URINE OF NORMAL PEARSON.
Science 111: 6, (1950).
- 26.- Bush I. E.
QUANTITATIVE TREATMENT OF STEROIDS BEHAVIOUR
ON CHROMATOGRAMS.
The Chromatography of Steroids 2: 83, (1961).

- 27.- Drake W. A., Haines W. J., Knauff R. E. and
Nielson E. D.
ULTRAVIOLET SCANNER-CAMERA FOR PAPER
CHROMATOGRAPHY.
Analyst. Chem. 28: 2036, (1956).
- 28.- Neher R.
CHROMATOGRAPHY OF STEROLS, STEROIDS AND
RELATED COMPOUNDS.
Chromatography Reviews 1: 99, (1959). Ed. by
Lederer H., Amsterdam Elsevier.
- 29.- Chen Ch., Wheeler J., Towell H. E.
METHODS OF ESTIMATION OF ADRENAL CORTICAL
STERIODS WITH TETRAZOLIUM SALTS.
J. Lab. Clin. Med. 42: 749, (1953).
- 30.- Axelrod L. R.
THE SEPARATION AND IDENTIFICATION OF MIXTURES
OF C₂₁ AND C₁₉ STEROIDS BY PAPER
CHROMATOGRAPHY.
J. Biol. Chem. 205: 173, (1953).
- 31.- Rosenkrantz W.
AN ANTIMONY TRICHLORIDE REAGENT SUITABLE
FOR THE DETECTION AND ESTIMATION OF
NONKETONIC STEROIDS.
Arch. Biochem. 46: 1, (1953).
- 32.- Okita T. G., Kabara J. J., Richardson F.,
Le Roy V. G.
ASSAYING COMPOUNDS CONTAINING H₃ AND C¹⁴.
Nucleonics, 15: 111, (1957).
- 33.- Saba N., Hechter O., Stone D.
THE CONVERSION OF CHOLESTEROL TO PREGNENOLONE
IN BOVINE ADRENAL HOMOGENATES.
J. American Chemical Society 7: 3862, (1954).
- 34.- Solomon S., Lenz A. L., Van de Wiele R.,
Lieberman S.
Proc. Am. Chem. Soc. New York, p 290., 1954.
- 35.- Rush I. E.
SPECIES DIFFERENCES IN ADRENOCORTICAL
SECRETION.
J. Endocrinol. 9: 95, (1953).

- 36.- Longwell B., Reif A. E., Hansbury E. and Baker H. S.
Fed. Proc. 14: 246, (1955).
- 37.- Burnstein S., Dorfman R. I.
BIOSYNTHESIS OF C₁₉ STEROIDS FROM 4-C₁₄-
CHOLESTEROL AND 7-H³ PREGNENOLONE IN VIVO;
CONSIDERATION OF NEW PATHWAYS.
For Publication.
- 38.- Callow N. H. and Callow R. K., Hemens C. W.
and Stroud S. W.
J. Endocrinol. 1: 76, (1939).
- 39.- Talbot N. H., Butler A. H. and Kao Lashland
R. A.
New Eng. J. Med. 223: 769, (1960).
- 40.- Hirschmann H. and Hirschmann F. S.
STEROID EXCRETION IN A CASE OF ADRENOCORTICAL
CARCINOMA. III. THE ISOLATION OF Δ^5 -PREGNENEDIOL-
3(β), 17(β)-ONE-20 AND OF 17 α -METHYL- Δ^5 -
NONANDROSTENEDIOL-3(β), 17 α (α)-ONE-17.
J. Biol. Chem. 167: 7, (1947).