

332

**DETERMINACION DEL PREGNANDIOL URINARIO. VALORES
OBTENIDOS DURANTE EL CICLO OVARICO NORMAL Y EN
EL EMBARAZO**

TESIS PROFESIONAL

BEATRIZ ROJO SANCHEZ

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.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA CIENCIAS QUIMICAS

DETERMINACION DEL PREGNANDIOL URINARIO. VALORES
OBTENIDOS DURANTE EL CICLO OVARICO NORMAL Y EN
EL EMBARAZO

TESIS PROFESIONAL

Que presenta la señorita
BEATRIZ ROJO SANCHEZ
para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Agradezco al Señor Doctor Salvador Subirán Director del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, por las facilidades que se me dieron para la elaboración de esta tesis, así como al Señor Doctor Carlos Gual jefe del Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Bioquímica de esta Institución quien dirigió y supervisó mi trabajo.

Agradezco al Señor Doctor Salvador Subirán Director del Hospital de Enfermedades de la Nutrición, por las facilidades que se me dieron para la elaboración de esta tesis, así como al Señor Doctor Carlos Guai Jefe del Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Bioquímica de esta institución quien dirigió y supervisó mi trabajo.

Con cariño y gratitud a mis padres.

A la memoria de mi tío Sr. Angel Rojo B.

CONTENIDO

CAPITULO I

- 1.- Introducción.
- 2.- Síntesis y Catabolismo de la Progesterona.
- 3.- Desarrollo y evolución de los métodos utilizados para la dosificación del pregnandi-
diol urinario.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODO

- 1.- Material de laboratorio.
- 2.- Material clínico.
- 3.- Método.

CAPITULO III

RESULTADOS

- 1) Curva de absorción
del pregnandi-
diol y
del diacetato de
pregnandi-
diol.
Corrección de Allen.

1.- Estandarización

pregnandi-
diol libre
y del compuesto

diacetilado después
de los procedimien-
tos cromatográficos

3) Hidrólisis enzimáti-
ca.

4) Recuperación de la
pregnandiol en ori-
nas problema.

5) Reproducibilidad. es

1) Dosificaciones de -
pregnandiol durante
el embarazo. en

2.- Cifras de pregnandiol
obtenidas en las pa-
cientes estudiadas.

2) Dosificaciones de -
pregnandiol durante
el ciclo menstrual
normal. n-

3) Dosificación de ---
pregnandiol en ci-
clos anovulatorios. n

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

CAPITULO V

RESUMEN

INTRODUCCION

Hace más de tres décadas se estableció que en el cuerpo -- amarillo del ovario se producía una hormona, que entre otros -- efectos fisiológicos ocasionaba la formación de un endometrio -- secretor en el útero. Ya en 1929 Corner y Allen (1) desarrollaron una prueba biológica relativamente simple para detectar la hormona y en ese mismo año obtuvieron extractos a partir de --- cuerpos amarillos de cerdo. En 1934 diferentes grupos de inves- tigadores entre los que se encontraban Butenandt y Westphal (2), Hartman y Wettstein (3), Wintersteiner y Allen (4), aislaron en forma pura la hormona a la cual se le dió más tarde el nombre -- de "Progesterona" (4-Pregneno-3,20-diona). Los primeros inten- tos para su cuantificación en la sangre se realizaron en 1942 -- por Reynolds y Ginsburg (5) pero la falta de especificidad y -- sensibilidad del método les hizo abandonar este procedimiento -- analítico. En esa misma época se estableció que esta hormona -- se eliminaba por la orina fundamentalmente como pregnandiol -- (~~5 β~~ -pregnano-3 α ,20 α -diol), y más tarde en 1937, Venning (6) in- trodujo métodos rutinarios para su estimación.

Ya hemos mencionado que la progesterona se produce en el -- cuerpo amarillo de los ovarios, y en éstos es posible que se -- origine en las células de la granulosa ó bien en las células de

la teca interna; también se ha aislado en tejido humano placentario y se encuentra en la corteza suprarrenal y en los testículos, en donde participa como precursor de multitud de corticosteroides y hormonas androgénicas. A pesar de que durante el ciclo menstrual normal, la suprarrenal del humano también secreta cantidades pequeñas de progesterona, es hasta la segunda mitad del ciclo y coincidiendo con la formación del cuerpo amarillo, cuando se obtiene una mayor producción de este esteroide que es el responsable de los cambios específicos en el epitelio vaginal y en el endometrio. Durante el embarazo este cuerpo luteo continúa secretando cantidades elevadas de progesterona y después del primer trimestre, la placenta la produce en cantidades ascendentes, constituyendo la hormona esteroide cuantitativamente más importante de este estado fisiológico. De estos conceptos es fácil inferir la gran importancia que tiene la cuantificación de esta hormona ó sus metabolitos urinarios ya que las variaciones que presenta pueden tener gran trascendencia para el diagnóstico y pronóstico de infinidad de problemas clínicos en Ginecología y Obstetricia.

En el presente estudio he estandarizado el procedimiento de Goldzieher para la dosificación de pregnandiol urinario, y al mismo tiempo he tratado de establecer las cifras normales de

este compuesto en nuestro medio, tanto a través del embarazo, como durante las diferentes fases del ciclo menstrual y en ci clos anovulatorios. Además, con objeto de facilitar el análi sis de los resultados obtenidos, hice una breve descripción de los conceptos generales en relación a la síntesis y catabo lismo de la progesterona y de la gran variedad de métodos uti lizados para la dosificación del pregnandiol.

CAPITULO I

SINTESIS Y CATABOLISMO DE LA PROGESTERONA

La formación del cuerpo amarillo y su habilidad subsecuente para producir progesterona, se regula por medio de la acción combinada de dos hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis, conocidas con el nombre de Gonadotrofinas Hipofisiarias y que comprenden a la "Hormona Estimulante del Folículo" (H.E.F.) y la "Hormona Luteneizante" (H.L.). No se conoce exactamente en que etapa de los procesos de biosíntesis ejercen su acción estas hormonas gonadotróficas; sin embargo se conocen las reacciones metabólicas que conducen a su formación. Al igual que todas las demás hormonas esteroides, sus precursores comunes son el acetato y el colesterol (7). Los procesos de biosíntesis que dan lugar a la formación del colesterol han sido perfectamente bien establecidos (8,9,10,11) y en términos generales los podemos representar en la siguiente forma:

Acetil Co.A _____ Acido mevalónico _____ Escualeno _____ Lanosterol _____ Zimosterol _____ Desmosterol _____ Colesterol

Los trabajos de Solomon y colaboradores (12) demostraron que el colesterol $4C^{14}$, es transformado por el tejido humano placentario en 5-pregnenolona y progesterona y nos sugieren que la --

bólico. La conversión de colesterol a pregnenolona se haría a través de un derivado 20,22-dihidroxiado, lo cual facilitaría la pérdida de los 6 átomos de carbón de la cadena lateral del colesterol. La conversión de la pregnenolona a progesterona - estaría condicionada por la presencia de una 3β dehidrogenasa - que habitualmente se encuentra en los tejidos endócrinos encargados de biosintetizar la hormona en cuestión.

En la corteza suprarrenal la síntesis de la progesterona se regula por la hormona adrenocorticotrófica (HACT) la cual - interviene no solamente en la síntesis de este esteroide a partir de colesterol, sino que también regula los procesos de hidroxilación necesarias para la biosíntesis del cortisol. En - la Figura 1 hemos representado los pasos metabólicos más importaⁿtes en estos procesos de biosíntesis.

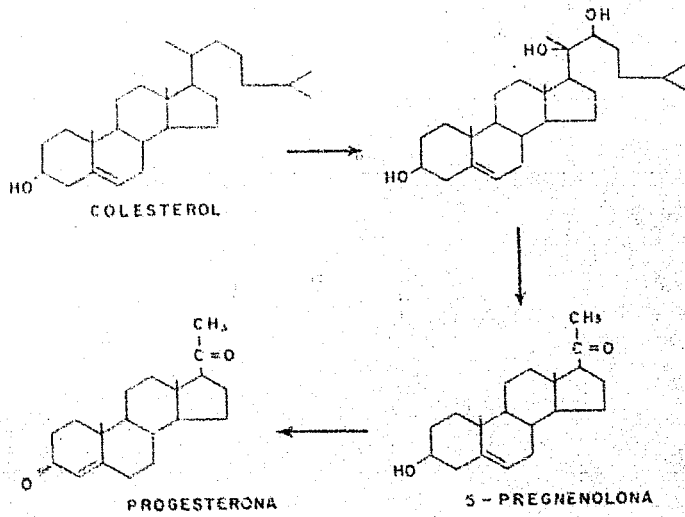


Fig. 1. Vías metabólicas en la conversión de colesterol a progesterona.

CATABOLISMO DE LA PROGESTERONA

Una vez que los ovarios, la placenta, testículos ó supra--
renales han biosintetizado la progesterona, ésta pasa a la cir--
culación donde se transporta al tejido hepático, en donde se --
transforma fundamentalmente en 5β -pregnano- $3\alpha,20\alpha$ diol, que se --
conjuga con ácido glucurónico, y más tarde se elimina facilmen--
te por la orina. Figura 2.

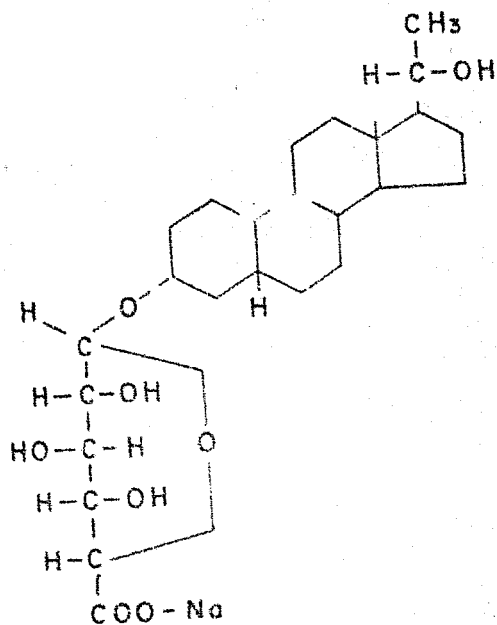


Fig. 2. Glucuronidato sódico de pregnandiol.

Estas reacciones de inactivación que se presentan en el tejido hepático, atacan fundamentalmente la doble ligadura y la cetona que se encuentra en el anillo A, reduciendo la cetona del carbono 20 y dando lugar a los isómeros $20\alpha, 20\beta$. Las reacciones metabólicas y los metabolitos urinarios que se han demostrado en el humano se observan en la Figura 3. De estos metabolitos ya hemos mencionado que el 5β -pregnano- $3\alpha, 20\alpha$ -diol es el compuesto que se produce en mayor proporción y su cuantificación se utiliza como un índice de la producción endógena de progesterona.

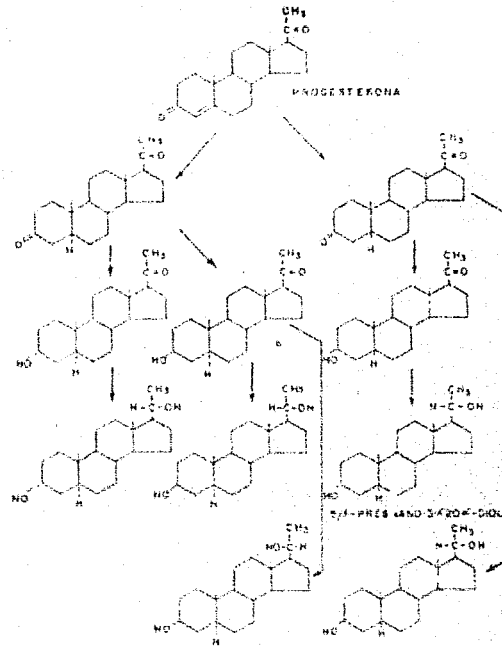


Fig. 3. Catabolismo de la Progesterona

3.- DESARROLLO Y EVOLUCION DE LOS METODOS UTILIZADOS PARA LA DOSIFICACION DEL PREGNANDIOL URINARIO.

Los métodos químicos para la dosificación del pregnandiolo urinario caen dentro de dos grupos:

A.- Aquellos en los cuales se estima al esteroide conjugado con ácido glucurónico.

B.- Aquellos en los cuales se dosifica al pregnandiolo libre después de haber hidrolizado el complejo de glucuronidato por medio de un ácido inorgánico ó por enzimas. Estos métodos a su vez comprenden métodos de precipitación y métodos cromatográficos.

Con objeto de no describir procedimientos que en la actualidad ya no se utilizan, creo conveniente mencionar las principales innovaciones que se han establecido desde 1937 a la fecha.

a) Venning publicó en 1937 y 1938 (13-14) un método basado en el aislamiento de un complejo de glucuronidato sódico de pregnandiolo. Los principales pasos de este procedimiento son:

Extracción de la orina con butanol, el cual después se lava con una solución fuertemente alcalina. Después de evaporar el butanol, el residuo se precipita dos veces con acetona y se

nalmente el precipitado se seca y se pesa. A pesar de que este método permite la determinación del pregnandiol urinario, tiene importantes limitaciones las que en términos generales consisten en lo siguiente:

(1) Es fácil que la orina se contamine con bacterias y que éstas ocasionen la hidrólisis del conjugado de pregnandiol, produciendo un compuesto libre con disminución concomitante en el resultado final de esta dosificación.

(2) La cantidad de esteroide que puede ser medido con cierto grado de exactitud con esta técnica, debe ser superior a los 15 mg. en orina de 24 horas. Es lógico que este método solo sirve en aquellos casos en los que las cifras de pregnandiol estuvieran sumamente elevadas tal y como se encuentran durante el segundo y tercer trimestre del embarazo.

(3) Es posible que el producto final aparentemente purificado contenga cantidades apreciables de otros esteroides conjugados como serían algunos derivados del 3α -hidroxi- 5β -pregnan-20ona. (15).

Se han hecho numerosas modificaciones a este método, pero en general éstas tienen las mismas objeciones que el procedimiento original.

b) Hidrólisis ácida y precipitación.- En 1941 Astwood y Jones (16) introdujeron una modificación a la técnica original de Venning, que ocasionó un gran avance en la metodología. En lugar de extraer el conjugado, primero hidrolizaban la orina con ácido clorhídrico para después extraer con tolueno el esteroide libre. Las impurezas acídicas se quitaban tratando esta fracción con NaOH y después de evaporar el solvente orgánico se purificaba el residuo por medio de precipitaciones repetidas. El precipitado final se secaba y pesaba como en la técnica anterior. Con este método no siempre se obtenían resultados adecuados y con frecuencia las pérdidas de pregnandiol eran elevadas. La poca exactitud de estas técnicas gravimétricas se solucionó parcialmente con el desarrollo de reacciones de color como las que a continuación se describen.

c) Reacción de color con ácido sulfúrico.- En 1941 Talbot y colaboradores (17) encontraron que el pregnandiol libre desarrollaba un color amarillo en presencia del ácido sulfúrico concentrado y aplicaron este procedimiento al material aislado con el procedimiento de Astwood y Jones comparando la absorbancia del color producido por los problemas, con aquellas debidas a la presencia de pregnandiol puro. A pesar de que esta reacción no es específica para este esteroide, sí es posi-

ble cuantificarlo con bastante exactitud cuando el extracto final carece de impurezas. Este factor ha sido solucionado con nuevos procedimientos de purificación y en esta forma Somerville y colaboradores (18) estudiaron todos los pasos involucrados en la técnica e hicieron substanciosas mejoras.

d) Hidrólisis enzimática.- A partir de la publicación original de Astwood y Jones se observó que la hidrólisis ácida a la que se sometían las orinas producía una gran cantidad de pigmentos que más tarde interferían en la reacción de color con ácido sulfúrico. Con objeto de evitar esta contaminación de pigmentos, Cohen publicó en 1951 (19), un método en el cual la hidrólisis se realizaba con glucuronidasa extraída de bazo de ternera. Esta hidrólisis enzimática a pesar de ser más laboriosa, produce extractos más limpios, pero en ocasiones se ve interferida por la presencia de otros glucuronidatos que pueden competir con la enzima cuando se encuentran en cantidades elevadas y por lo tanto producir la hidrólisis incompleta del pregnandiol (20). Este inconveniente puede ser evitado usando cantidades mayores de enzima.

e) Técnicas cromatográficas.- Se han propuesto una gran cantidad de métodos de cromatografía para la purificación del pregnandiol orinario. Desde el punto de vista de su utilidad -

clínica los procedimientos más satisfactorios son aquellos descritos por Watteville, Borth y Gsell (21), Klopper, Michie y Brown (22) y Bongiovanni y Eberlein (23). Recientemente Goldzieher (24) ha propuesto un nuevo método que permite obtener excelentes resultados en orinas con un bajo contenido de pregnandiol. Debido a las grandes posibilidades de estos procedimientos he considerado conveniente su descripción en forma individual.

(1) Método de Watteville, Borth y Gsell. Este procedimiento está basado en el método cromatográfico de Huber (25) para determinaciones rutinarias de pregnandiol urinario y consiste en lo siguiente: Una muestra de orina se hidroliza con ácido clorhídrico de acuerdo con la técnica de Astwood y Jones y se extrae con tolueno. Este se lava con hidróxido de sodio y agua y se evapora a sequedad. El extracto se cromatografía en una columna de alúmina y la fracción del pregnandiol libre se obtiene en un eluido de benceno-etanol absoluto en una proporción de 20:1. Esta fracción después de evaporada se pesa, pudiéndose determinar cantidades hasta de 0.2 a 0.8 mg. dependiendo de la cantidad de pigmentos presentes en la orina. Con este método dos personas pueden hacer 30 determinaciones por semana.

(2) Método de Klopper, Michie y Brown. Este método incluye algunos nuevos pasos que le dan grandes ventajas sobre la gran mayoría de los procedimientos descritos. La hidrólisis y extracción se hacen de manera semejante que en la técnica anterior, pero antes de evaporar el tolueno se agita éste con una solución de permanganato de potasio al 4% en hidróxido de sodio a 1 N. Posteriormente se lava con agua hasta hacer desaparecer el color debido al permanganato de potasio, se filtra y destila a un volumen aproximado de 10 ml. Este extracto de tolueno se aplica a una columna de alúmina activada y se eluye con 25 ml. de etanol al 0.8% en benceno y posteriormente con etanol al 3% en benceno, con lo cual se obtiene el pregnandiol libre. Después de evaporar el solvente, el residuo se disuelve en 2 ml. de benceno a los que se le agregan otros 2 ml. de cloruro de acetilo, dejando acetilar la muestra durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se añaden 25 ml. de éter de petróleo y la mezcla se lava sucesivamente con agua destilada y bicarbonato de sodio al 8% y nuevamente con agua destilada. El éter de petróleo se vierte en una segunda columna previamente preparada sobre éter de petróleo y una vez eluido este primer solvente, se pasan 15 ml. de benceno con lo cual se obtiene el diacetato de pregnandiol. Al residuo del eluado de benceno, se

agregan 10 mg. de sulfito de sodio y 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado. El tubo de reacción se deja a temperatura ambiente durante toda la noche y al otro día se determina su densidad óptica en 425 m μ . La absorbancia obtenida se convierte a miligramos después de comparar contra una curva de calibración establecida con cantidades conocidas de una muestra auténtica de diacetato de pregnandiol. El cálculo del pregnandiol libre se obtiene al multiplicar el valor del diacetato por un factor de 0.8 que equivale a la relación de los pesos moleculares del compuesto diacetilado y del compuesto libre. Con este método es posible detectar valores hasta de 0.5 mg. en orina de 24 horas y practicar con una persona hasta 20 dosificaciones a la semana.

(3) Método de Bongiovanni y Eberlein. - En este procedimiento se utiliza la cromatografía en papel en lugar de la alúmina empleada en los procedimientos anteriores. Una alícuota de 10 ml. de orina de 24 horas se incuba durante 15 horas a 37°C de un buffer de acetato (1.0 M pH 4.5) y 3500 unidades de glucuronidasa (Ketodase, Warner-Chilcott). Después de la hidrólisis se extrae la orina con benceno el cual se lava con NaOH 1 N y agua destilada. El benceno se evapora y el extracto seco se aplica en un papel Whatman # 2 y se cromatografía en un sistema ascendente que consiste en metanol-agua-isooctano-tolueno, en

proporción de 400-100-225-275 respectivamente. La zona correspondiente al de un estandar de pregnandiol se eluye y se aplica a una columna cromatográfica de sílica preparada con etanol al 1% en cloruro de metileno. Posteriormente se eluye sucesivamente con 10 ml. de etanol al 1%, 20 ml. de etanol al 10% y 20 ml. de etanol al 7.5% en cloruro de metilo. En esta última fracción se obtiene el pregnandiol libre y después de evaporar el solvente se les añaden 2 ml. de una mezcla de bisulfito de sodio y ácido sulfúrico (50 g. de bisulfito de sodio en 200 ml. de ácido sulfúrico concentrado). La mezcla se calienta en baño maría durante cuatro minutos, se deja enfriar durante 20 minutos más y se lee en 390, 425 y 460 m μ . Con objeto de obtener la densidad óptica corregida en 425 m μ , se utiliza la fórmula de Allen (26). El resultado final se obtiene al comparar la densidad óptica corregida con aquellas obtenidas con una curva de calibración hecha con estandares de pregnandiol libre. Los resultados obtenidos con este procedimiento son comparables con aquellos obtenidos por Klopffer.

(4) Procedimiento de Goldzieher. - Este procedimiento adopta algunas de las mejoras introducidas por Klopffer y Bongiovanni y permite obtener en poco tiempo resultados muy satisfactorios con una sensibilidad por abajo de 0.5 mg. en orina de 24 -

horas. En términos generales el procedimiento incluye hidrólisis enzimática y extracción semejante al procedimiento de Bongiovanni. El extracto crudo obtenido en esta forma se cromatografía en una columna de sílica con elusiones sucesivas de 5 ml. de benceno, 10 ml. de acetato de etilo al 25% en benceno y 7 ml. de acetato de etilo al 50% en benceno, en esta última fracción se obtiene el pregnandiol libre. Después de evaporar el solvente, el residuo se acetila con anhídrido acético y el compuesto diacetilado se cromatografía en una segunda columna de sílica, pasando sucesivamente 5 ml. de benceno y 7 ml. de acetato de etilo al 5% en benceno. En los primeros 2 ml. de esta última mezcla de solventes se obtiene el diacetato de pregnandiol. Al extracto seco se le practica la reacción de color con ácido sulfúrico concentrado al cual previamente se le pasa una corriente de anhídrido sulfuroso. De manera semejante a la técnica de Eberlein y Bongiovanni se determina la densidad óptica en 390, 425 y 460 m μ . El resultado final se obtiene por comparación de una curva de calibración trazada con estándares auténticos de 50 y 100 μ g. de pregnandiol los cuales son sometidos al mismo procedimiento que las muestras en estudio. Una persona puede practicar aproximadamente 40 dosificaciones a la semana.

Esta técnica por su facilidad y utilidad clínica ha sido adoptada y modificada para su uso en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital de Enfermedades de la Nutrición y su estandarización ha sido el motivo del presente trabajo.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODO

1.- Material de Laboratorio.

1) Buffer de acetato, 1.0 M pH 4.5

Acido acético glacial.....	3.25 ^{56.95} ml.
Acetato de sodio .. 5 (H ₂ O).....	5.785 ^{48.144} g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

2) Glucuronidasa (Ketodase, Warner-Chilcott), 5000 unidades Fishman por mililitro.

3) Acetato de etilo.- Se destila dos veces descartando el 5% de la parte inicial y final del destilado. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se filtra.

4) Benceno.- Cuatro litros de benceno previamente destilado se agitan con 50 ml. de ácido sulfúrico concentrado y después de dejar en reposo, se descarta la capa de ácido. El benceno se lava dos veces con 100 ml. de agua destilada, una vez con carbonato de sodio al 10% y finalmente con otros 100 ml. de agua destilada. El benceno se seca sobre sulfato de so-

dio anhidro, se filtra y después de destilarlo dos veces más a través de una columna de Vigreux se guarda sobre sodio metálico.

- 5) Cloroformo.- Redestilado en la obscuridad a través de una columna de Vigreux y conservado en un frasco ámbar con 10 ml. de etanol por cada litro de solvente. Este último compuesto sirva como estabilizador para prevenir la formación de fósge nos.
- 6) Hidróxido de sodio al 0.1 N (4 g. de NaOH y agua destilada - c.b.p. 1000 ml.) y al 10% (10 g. en 100 ml. de agua destilada).
- 7) Acido sulfúrico concentrado.- Reactivo analítico Adler. --- a) concentrado, b) 5 N (140 ml. de ácido sulfúrico concentrado y agua destilada c.b.p. 1000 ml.).
- 8) Piridina.- Se refluja sobre KOH durante 4 horas y se destila dos veces.
- 9) Anhídrido acético.- Se refluja sobre trióxido de cromo durante 4 horas y se destila dos veces.

- 10) Anhidrido sulfuroso (SO_2) Dupont.
- 11) Solvente I.- Benceno previmante purificado.
- 12) Solvente II.- Acetato de Etilo al 25% en benceno.
- 13) Solvente III.- Acetato de Etilo al 50% en benceno.
- 14) Solvente IV.- Acetato de Etilo al 5% en benceno.
- 15) Solvente V.- Acetato de Etilo redestilado.
- 16) Reactivo de ácido sulfúrico.- A 200 ml. de ácido sulfúrico concentrado se le pasa una corriente de SO_2 durante 30 minutos. Este reactivo se debe preparar inmediatamente antes de usarlo.
- 17) Sílica gel activada.- Davison grado H de 100-200 mallas.
- 18) Estandar de 5β pregnan- $3\alpha, 20\alpha$ diol. (a) 25 mg. de esteroide puro se diluye en 100 ml. de metanol.

- 19) Columnas cromatográficas.- De vidrio pyrex de 30 cm. de longitud por 5 mm. de diámetro interno y llave de Teflón. Figura 4.
- 20) Tubos para acetilación pyrex de 18x80 mm.
- 21) Plancha de evaporación de aluminio con 16 perforaciones en ángulo de 45°. Figura 5.
- 22) Espectrofotómetro Beckman modelo D.U.
- 23) Celdillas pyrex de 12x12x47 mm.

(a).- Este esteroide se obtuvo gracias a la gentileza de los Laboratorios Schering A.G. de Alemania a través de sus representantes en México, Schering Farmacéutica Mexicana S.

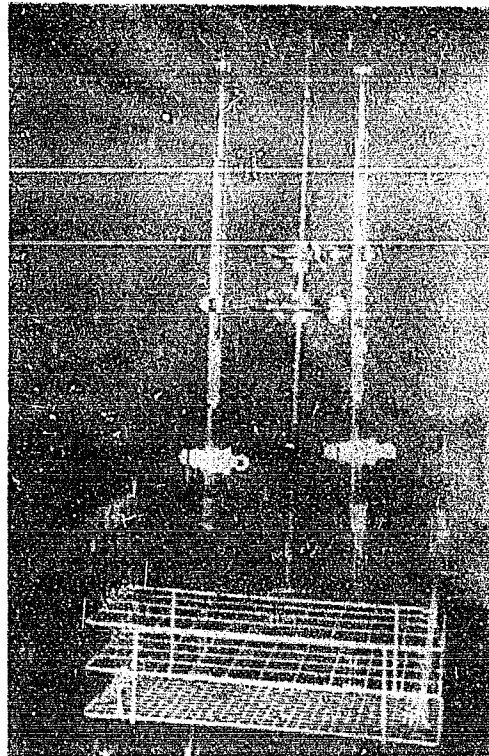


Fig. 4. Columnas Cromatográficas.

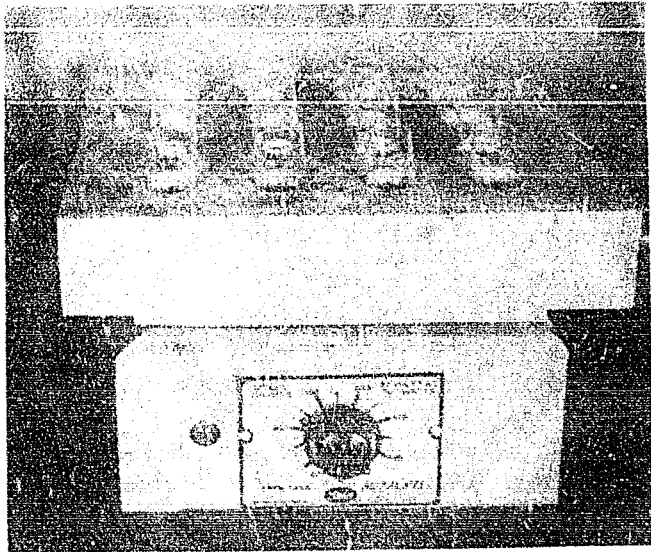


Fig. 5. Plancha de aluminio para evaporación simultánea de 16 tubos.

2.- MATERIAL CLINICO.

Las muestras analizadas en el presente estudio fueron obtenidas de pacientes en diferentes fases del ciclo menstrual^(b) y a través del embarazo^(c). No se tomó en cuenta la edad de los pacientes, pero todas las muestras provenían de mujeres adultas arriba de los 20 años y por abajo de los 45 años.

En total fueron estudiadas 268 orinas de las cuales 54 provenían de mujeres embarazadas, 49 se obtuvieron de pacientes en la fase pre-ovulatoria de ciclos menstruales normales (entre los días 5-12) y 165 se obtuvieron durante la segunda fase del ciclo menstrual (entre los días 18-25). De estas últimas 121 muestras correspondían a mujeres con ciclos anovulatorios y 44 a mujeres con ciclos ovulatorios.

(b) Estas muestras corresponden a casos clínicos estudiados por los Dres. Edmeé Pérez Vega y Joseph Goldzieher (Southwest Foundation for Research and Education, San Antonio, Texas - U.S.A.), a los cuales agradezco su valiosa cooperación. Los ciclos anovulatorios se indujeron por inhibición de las gonadotropinas hipofisarias con terapéutica específica (hormonas estrogénicas y progestacionales asociadas).

(c) Quiero expresar mi agradecimiento a los doctores: Alfonso Alvarez Bravo, Kuba Lichtinger, Javier Soberón y Efraín Vázquez por las muestras de orina de mujeres embarazadas.

3.- METODO

1) Colección y conservación de las muestras.-

El volumen total de orina de 24 horas se colectó sin preservativo, y de éste se guardaron 100 ml. en el congelador en envases de polietileno. En ningún caso se utilizaron las muestras después de 60 días de su congelación.

2) Hidrólisis y Extracción.-

A 50 ml. de orina se les ajustó el pH a 4.5 con ácido sulfúrico 5 N y NaOH al 10% y se les agregaron 5 ml. de acetato buffer y 15000 Us. de Ketodase. La hidrólisis se efectuó a 37°C durante 48 horas al cabo de las cuales la mezcla de incubación se extrajo dos veces con un volumen igual de roformo. Los extractos clorofórmicos se juntaron y lavaron una vez con 25 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N y 25 ml. de agua destilada. El cloroformo se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y evaporó a sequedad en evaporador rotatorio a 40°C.

3) Purificación y Aislamiento del pregnandiol.-

El extracto seco se disolvió en 1.0 ml. de benceno y la mitad de esta solución se depositó en una primera columna cromatográfica preparada en la siguiente forma:

A una de las columnas de pyrex semejantes a las de la Figura 4 se les introdujo un pequeño trozo de algodón el cual se localizó en la parte inferior de ésta muy cerca de la llave de teflón. Con la llave cerrada se agregaron 1 ó 2 ml. de benceno y posteriormente con una pipeta Pasteur despuntada se pusieron 0.2 g. de sílica gel previamente homogeneizada en 5 ml. de benceno. Una vez que la sílica se empacó en el fondo de la columna, se abrió la llave y reguló el goteo del solvente a manera de obtener un flujo de una gota por segundo. Antes de que se terminara el benceno se agregó la alícuota de la muestra disuelta en el volumen antes indicado. A continuación se pasaron sucesivamente 5 ml. del solvente I, 8 ml. del solvente II, 12 ml. del solvente III y 10 ml. del solvente V y se recogieron cada una de estas fracciones en diferentes tubos de ensaye previamente etiquetados del 1 al 4. En el tubo 3 que correspondía al eluado de acetato de etilo al 50% en benceno (solvente III) se encontraba el pregnandiol por cuantificar.

4) Formación del diacetato de pregnandiol.-

Al contenido seco del tubo 3 se le agregaron 0.1 ml. de piridina y 0.1 ml. de anhídrido acético y se dejaron durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1 ml. -

de anhídrido acético y el tubo de reacción se introdujo en una de las perforaciones de la plancha de aluminio demostrado en la Figura 5. Se aumentó la temperatura a 100°C con lo cual se evaporaron los reactivos en un tiempo aproximado de dos horas.

5) Purificación del diacetato de pregnandiol.-

El extracto seco del tubo de acetilación se disolvió en 0.5 ml. de benceno y se transfirió en su totalidad a una segunda columna de sílica preparada en igual forma que la anterior. Posteriormente con pequeños volúmenes de solvente I se lavó el tubo de acetilación y se pasaron a través de una columna de sílica hasta completar un volumen de 5 ml. A continuación se pasaron sucesivamente 9 ml. del solvente IV y 5 ml. del solvente V. Los 5 ml. del solvente I se recogieron en el tubo 1, el primer mililitro del solvente IV en el tubo 2, los últimos 8 ml. del solvente IV en el tubo 3 y los 5 ml. del solvente V en el tubo 4. La fracción purificada del diacetato de pregnandiol se recupera en el tubo 3.

6) Cuantificación.-

Al extracto seco del tubo 3 de la segunda cromatografía se le agregaron 4 ml. del reactivo $H_2SO_4-SO_2$ y después de agitarlos se pusieron a ebullición en baño de agua durante 4 minutos.

al cabo de los cuales se enfriaron en agua corriente. Dos ho-- rofo
ras después se transfirieron 3 ml. a las celdillas de pyrex y -
se leyeron contra el blanco de reactivos de $H_2SO_4-SO_2$ en 400, -
435 y 470 μ . La corrección de Allen para la densidad óptica -
en 435 μ se hizo aplicando la siguiente ecuación:

Densidad Optica (D.O.) corregida en 435 μ =

$$= D.O. 435 \mu - \frac{(D.O. 400 \mu + D.O. 470 \mu)}{2}$$

2

7) Curva de Calibración.-

La curva de calibración se realizó con estandares auténti-
cos de pregnandiol de 50 y 100 μ g. Estos se evaporaron en tu--
bos de ensaye y se sometieron al mismo procedimiento descrito -
para las muestras problema. Los valores obtenidos después de -
la corrección de Allen se graficaron de manera que en la absci-
sa se representó la cantidad del esteroide usado y en la ordena
da la densidad óptica corregida.

8) Blanco de reactivos.-

Esto se obtuvo después de pasar los diferentes solventes -
sin esteroide a través de todo el procedimiento y agregando los
al tubo 3 de la se-

gunda cromatografía. Con este blanco se ajustó el espectrofotómetro a 100% de transmitancia.

CAPITULO III

1.- ESTANDARIZACION DEL METODO.

1) Curva de absorción del pregnandiol y del diacetato de pregnandiol.-

Corrección de Allen.

Los espectros de absorción obtenidos para 100 ug. de pregnandiol libre y de diacetato de pregnandiol en presencia del reactivo de $H_2SO_4-SO_2$ presentaron imágenes similares, con un máximo en 435 m μ y un pequeño hombro en 480 m μ tal y como puede verse en la Figura 6. En esta figura podemos observar que la densidad óptica corregida en 435 m μ después de aplicar la fórmula de Allen nos da un valor representado por a. Hay que hacer notar que en la técnica original de Goldzieher esta corrección se hace tomando en cuenta las densidades ópticas obtenidas en 390, 425 y 460 m μ , sin embargo después de observar la máxima obtenida en nuestra curva, se decidió emplear las longitudes de onda mencionadas en primer término.

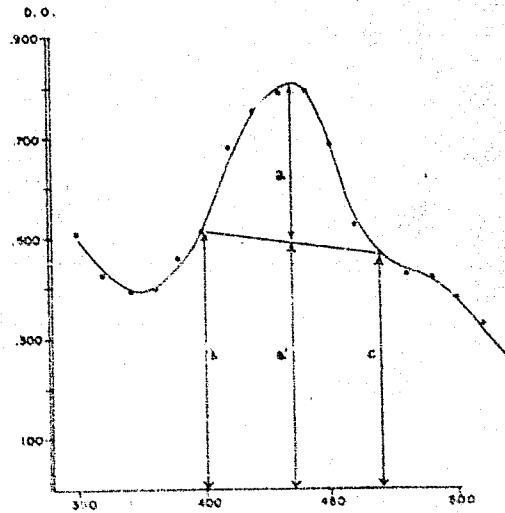


Fig. 6. Curva de absorción de diacetato de pregnandiol.

Cantidades crecientes de diacetato de pregnandi o l, comprendidas entre 25 y 300 microgramos^(d) corroboran que a estas concentraciones las densidades o pticas corregidas siguen la Ley de Lambert-Beer y por consiguiente al graficar estos resultados podemos unirlos con una l i nea recta tal y como se demuestra en la Figura 7.

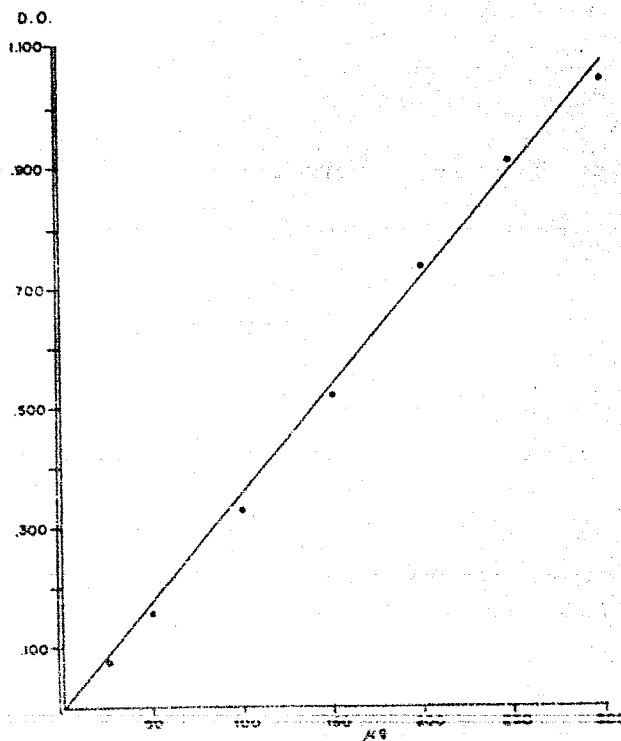


Fig. 7. Ley de Lambert-Beer.

(d) Los valores representados en la Figura 7 expresan las densidades ópticas corregidas para 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 microgramos de pregnandirol sometidos al procedimiento de acetilación. Hay que tomar en cuenta que después de este procedimiento el peso del esteroide aumenta en un 26% y por lo tanto las densidades ópticas obtenidas realmente equivalen a 31.5, 63, 126, 189, 252, 315 y 378 $\mu\text{g.}$ de diacetato de pregnandirol respectivamente.

2) Recuperación del pregnandirol libre y del compuesto diacetilado después de los procedimientos cromatográficos.--

Debido a que diversos factores, entre los que se encuentran: el diámetro interno de las columnas, la cantidad de sílica usada y las condiciones de humedad del medio ambiente pueden influir sobre el comportamiento del esteroide por analizar en estos sistemas cromatográficos, se decidió estudiar este importante aspecto del procedimiento.

Con este fin se tomaron 50 y 100 $\mu\text{g.}$ de pregnandirol libre y se pasaron a través de la primera columna de sílica usando las cantidades descritas en el procedimiento original que com--

prenden 5 ml. del solvente I, 10 ml. del solvente II, 7 ml. del solvente III y 10 ml. del solvente V. Después de evaporar los eluados correspondientes, se agregaron al residuo 4 ml. del reactivo de $H_2SO_4-SO_2$ y las densidades ópticas corregidas en 435 m μ revelaron que parte del esteroide se eliminaba con el solvente II, lo cual nos daba una pérdida importante en esta primera fase del procedimiento. En el cuadro I podemos observar con mayor detalle estos resultados.

CUADRO I

Tubo N	Disolvente		Pregnandirol	
	Tipo	ml. usados	50 μ g.	100 μ g.
1	I	5.0	.000	.000
2	II	10.0	.024	.030
3	III	7.0	.081	.153
4	V	10.0	.000	.000

Para obtener una buena recuperación del pregnandiol libre en esta primer columna cromatográfica, fué necesario modificar las cantidades de los solventes usados, obteniéndose resultados satisfactorios con eluados de 5 ml. de solvente I, 8 ml. del solvente II, 12 ml. del solvente III y 10 ml. del solvente V. En el cuadro II observamos que con estas cantidades de solventes prácticamente todo el esteroide se recuperó en el tubo 3.

CUADRO II

Tubo N	Disolvente		Pregnandiol	
	Tipo	ml. usados	50 ug.	100 ug.
1	I	5.0	.000	.000
2	II	8.0	.000	.000
3	III	12.0	.109	.188
4	V	10.00	.000	.000

En esta misma forma se estudió la recuperación a través de la segunda columna de 50 y 100 $\mu\text{g.}$ de pregnandiol acetilado --- (teóricamente 63 y 126 $\mu\text{g.}$ de diacetato). Resultados preliminares de este proceso indicaron que con el procedimiento de acetilación utilizado, todavía quedaba sin acetilar una porción importante del esteroide. Por este motivo fué necesario modificar las condiciones de acetilación obteniéndose resultados satisfactorios con el uso de anhídrido acético y piridina a partes iguales. Finalmente las cantidades de solventes se ajustaron a 5 ml. del solvente I, 9 ml. del solvente IV y 5 ml. del solvente V. La totalidad del diacetato de pregnandiol se obtuvo con los segundos 8 ml. de solvente IV tal y como se observa en el cuadro III.

CUADRO III

Tubo N	Disolvente		Diacetato de pregnandiol	
	Tipo	ml. usados	50 µg. (63 µg.)	100 µg. (126 µg.)
1	I	5.0	.000	.000
2	IV	1.0	.000	.000
3	IV	8.0	.130	.242
3'	IV	2.0	.000	.000
3''	IV	2.0	.000	.000
4	V	5.0	.000	.000

3) Hidrólisis enzimática.-

Una vez establecidas las condiciones necesarias para hacer una buena recuperación a través de las columnas cromatográficas, fué necesario establecer las condiciones óptimas para hidrolizar el compuesto eliminado por la orina como glucuronidato de pregnandiol y convertirse en pregnandiol libre extraíble con solventes orgánicos.

Debido a que la preparación enzimática utilizada (Ketodase) ha sido perfectamente bien estandarizada y tiene un máximo de actividad a un pH de 4.5 y a una temperatura de 37°C. Solo quedaba establecer la cantidad de enzima necesaria para obtener el máximo de hidrólisis, así como el tiempo de incubación necesario para que ésta se realice en forma completa.

Para establecer la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar cantidades variables de glucuronidato de pregnandiol, se seleccionó una muestra de una paciente durante la décimo séptima semana del embarazo en la cual se esperaban cantidades elevadas de este metabolito. A 10 ml. de estas orinas por triplicado se les agregaron cantidades ascendentes de Ketodase, que incluían 30, 150, 300 y 600 unidades por cada mililitro de orina utilizado. La incubación se llevó a cabo a 37°C, a un pH de 4.5 y durante 48 horas. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 8, en donde cada punto representa el promedio de las tres alícuotas analizadas. Con estos resultados es posible establecer que en las condiciones empleadas para la incubación se obtiene una hidrólisis completa con cantidades de 300 unidades de Ketodase por mililitro de orina. Estos resultados no están de acuerdo con aquéllos obtenidos por Ronan y colaboradores (27), ya que éstos observaron que la hidrólisis de un estándar puro de glucuro-

hidato sódico de pregnandiol se hidrolizaba en un 100% durante las primeras 24 horas con cantidades de 30 unidades de Ketodase por mililitro de orina y que cuando usaban una concentración de 300 unidades por mililitro el porcentaje de hidrólisis descendía a 45% con el mismo tiempo de incubación de 24 horas. En nuestros experimentos 30 unidades por mililitro sólo hidrolizaba el 100% las glucuronidaciones de pregnandiol presente en la orina y era necesaria una concentración de 300 unidades por mililitro para obtener una hidrólisis completa.

Una vez establecida la cantidad óptima de la preparación enzimática se procedió al estudio de la influencia que tiene el tiempo de incubación sobre la liberación del pregnandiol urinario. Con este fin se utilizó una muestra de orina de una gestante durante la trigésima semana de un embarazo normal. Muestras por duplicado se incubaron durante 2, 2.5, 3, 15, 24 y 48 horas en las mismas condiciones anteriores y con 300 unidades de Ketodase por ml. de orina. En la figura 5 vemos que a partir de 24 horas la cantidad de pregnandiol liberado prácticamente se mantuvo en los mismos niveles, con valores ya por el máximo de tiempoación se alcanza con la hidrólisis de 24 horas. De cuando este tiempo como el caso para una hidrólisis completa. En aquellos casos en los que se incubó por tiempos más cortos los resultados eran

glucuronidato sódico de pregnandiól se hidrolizaba en un 100% durante las primeras 24 horas con cantidades de 30 unidades de Ketodase por mililitro de orina y que cuando usaban una concentración de 300 unidades por mililitro el porcentaje de hidrólisis descendía a 45% con el mismo tiempo de incubación de 24 horas. En nuestro experimento 30 unidades por mililitro sólo hidrolizan el 60% del glucuronidato de pregnandiól presente en la orina y era necesaria una concentración de 300 unidades por mililitro para obtener una hidrólisis completa.

Una vez establecida la cantidad óptima de la preparación enzimática se procedió al estudio de la influencia que tiene el tiempo de incubación sobre la liberación del pregnandiól urinario. Con este fin se utilizó una muestra de orina de una paciente durante la trigésima semana de un embarazo normal. Alícuotas por duplicado se incubaron durante 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas en las mismas condiciones anteriores y con 300 unidades de Ketodase por ml. de orina. En la Figura 9 vemos que a partir de 18 horas la cantidad de pregnandiól encontrado prácticamente se mantiene en los mismos niveles. sin embargo y ya que el máximo de recuperación se obtuvo con la hidrólisis de 48 horas, he tomado este tiempo como el ideal para una hidrólisis completa. En aquellos casos en los cuales el tiempo para obtener los resultados sea

factor importante, se podría hacer la hidrólisis en 48 horas y en casos urgentes una hidrólisis ácida en 15 minutos.

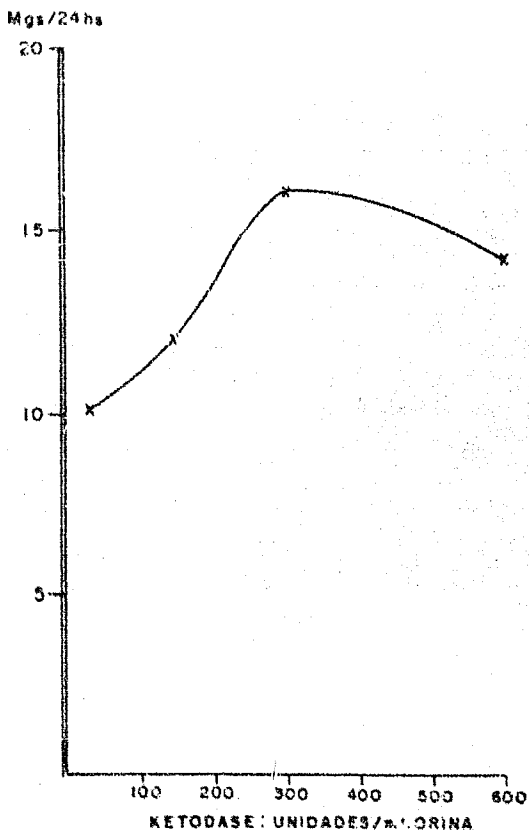


Fig. 8. Cantidades ascendentes de Ketodase por mililitro de ORINA.

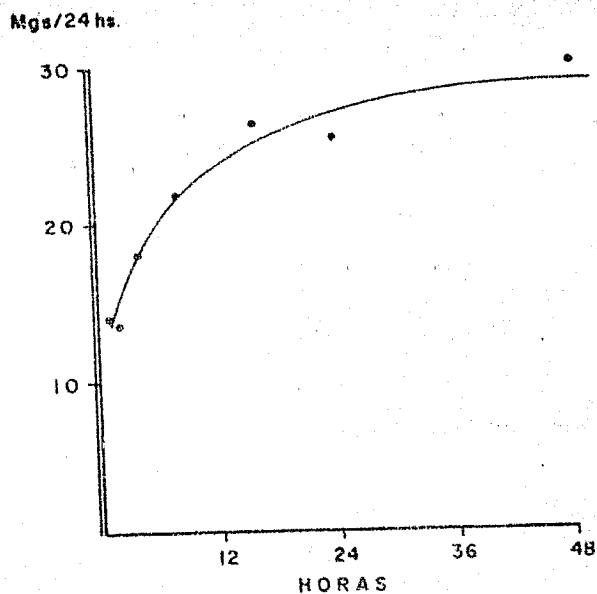


Fig. 9. Tiempo de incubación sobre la liberación del pregnandiol urinario.

4) Recuperación de pregnandiol en orinas problema.-

Las recuperaciones de 50 μ g. de pregnandiol agregado a 15 muestras de orina fué del 98.5% con una desviación estandar de más o menos 8.0. En el cuadro IV podemos ver los resultados obtenidos.

CUADRO IV

RECUPERACION DE PREGNANDIOL. DE ORINAS

Muestra N	Pregnandioli (ug.)			
	en el ex- tracto	agregado	encon- trado	recupe- racion %
1	18.5	50	71	105
2	10.0	50	58	96
3	14.0	50	62	96
4	18.5	50	61	85
5	4.5	50	54	99
6	8.5	50	56	95
7	2.0	50	44	84
8	10.0	50	59	98
9	18.5	50	70	103
10	13.5	50	63.5	100
11	6.5	50	56	99
12	10.0	50	57.5	95
13	10.0	50	68	116
14	18.0	50	75	114
15	5.0	50	51	92

Promedio = 98.5% D.E. \pm 8.0

5) Reproducibilidad.-

Se hicieron dosificaciones de pregnandioli por duplicado en 21 muestras de orina y los resultados obtenidos se han incluido en el cuadro V.

CUADRO V

DOSIFICACION DE PREGNANDIOL POR DUPLICADO EN ORINAS
DE 24 HS. (a)

Muestra N	Pregnandiol (µg.)	
	I	II
1	0.28	0.35
2	0.08	0.11
3	0.33	0.30
4	0.16	0.16
5	0.44	0.41
6	0.29	0.25
7	0.56	0.54
8	4.5	5.0
9	9.7	10.9
10	12.1	12.3
11	15.7	15.9
12	14.8	13.5
13	13.5	13.5
14	14.4	12.3
15	17.6	18.5
16	21.4	22.3
17	24.0	26.0
18	30.2	30.2

(a) Las muestras de orina del 1 al 7 corresponden a casos de ciclos anovulatorios. Las muestras del 9 al 18 corresponden a mujeres embarazadas.

En algunos casos después de realizar la hidrólisis enzimática el extracto se divide en dos alícuotas y por separado se les practicó la dosificación de su contenido de pregnandioli. Los valores obtenidos para cada una de estas alícuotas, están representados en el cuadro VI.

CUADRO VI

DOSIFICACION DE PREGNANDIOL EN ALICUOTAS DE EXTRACTOS DE HIDROLISIS DE ORINA DE 24 HS. (a)

Muestra N	Pregnandioli (ug.)	
	I	II
1	0.74	0.76
2	0.17	0.17
3	0.66	0.77
4	0.72	0.83
5	0.55	0.58
6	0.38	0.38
7	0.25	0.36
8	0.04	0.04
9	0.16	0.16
10	0.74	0.74
11	0.48	0.48
12	1.60	1.70
13	0.11	0.12
14	0.22	0.23
15	0.07	0.07
16	0.33	0.36

(a) Orinas de la segunda mitad del ciclo menstrual de ciclos anovulatorios y ovulatorios (muestra 12).

2.- CIFRAS DE PREGNANDIOL OBTENIDAS EN LAS PACIENTES ESTUDIADAS.

Ya he mencionado que este método fué utilizado para estudiar una gran variedad de condiciones clínicas asociadas a niveles elevados ó bajos de pregnandirol urinario. A continuación se incluyen los resultados obtenidos con las 268 muestras analizadas.

1) Dosificaciones de pregnandirol durante el embarazo.-

Los resultados obtenidos en las 54 diferentes muestras de mujeres embarazadas mostraron cierta variación aún en pacientes que se encontraban en el mismo estadio del embarazo. Sin embargo es evidente que a partir del primer trimestre los niveles ascienden progresivamente hasta llegar a cifras por arriba de los 30 mg. en las últimas semanas del embarazo. En la Figura 10 se observan los valores obtenidos, así como la tendencia general de la curva que une los valores promedio de estas dosificaciones.

Es de hacer notar que durante el primer trimestre las cifras de pregnandirol se mantienen por abajo de los 10 mg. sin mostrar un ascenso apreciable hasta cerca de la 12 semana. En

varios casos alrededor de la 10 y 12 semanas, he encontrado cifras bajas de pregnandiol, que en ocasiones se encuentran por debajo de 1 mg.

En la Figura 11 se incluyen las dosificaciones practicadas a una sola paciente, en diferentes épocas del desarrollo de su embarazo.

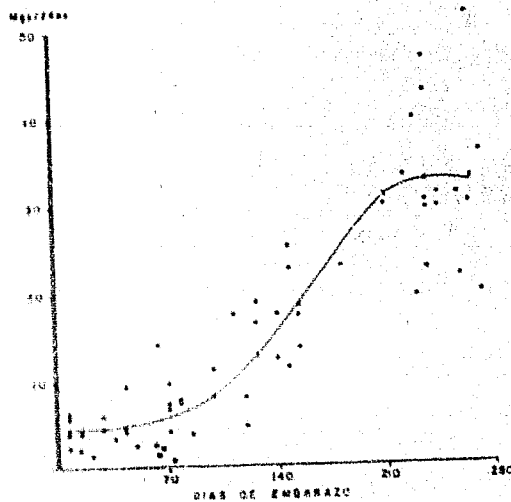


FIG. 11. Dosificación de Pregnanediol durante el embarazo.

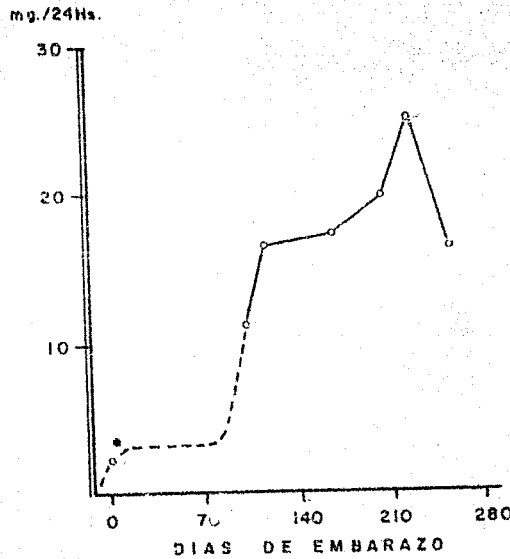


Fig. 11. Dosificaciones practicadas a una sola paciente.

* día 20 del ciclo menstrual que corresponde a día 4° ó 5° del embarazo.

2) Dosificaciones de pregnandiol durante el ciclo menstrual normal.-

De las 49 muestras estudiadas en la fase pre-ovulatoria del ciclo, en la gran mayoría de éstas se obtuvieron cifras por ab-

ajo de 1 mg. Aunque las muestras fueron tomadas en diferentes

días (entre los días 5 y 12) el promedio del pregnandiol fué de

... observar estos valores así co-

mo los encontrados en la segunda fase del ciclo en 44 mujeres -- con ciclos ovulatorios normales. Es de hacer notar que cual---- quier valor por arriba de 1 mg. fué considerado como representa- tivo de ciclos ovulatorios. En esta pequeña serie solo se obtu- vo una cifra superior a 5 mg. en orina de 24 horas.

3) Dosificación de pregnandiol en ciclos anovulatorios --- (días 18 al 25).-

En las 121 muestras de pacientes con ciclos anovulatorios - las cifras de pregnandiol se encontraron por abajo de 1 mg. en - niveles parecidos a los obtenidos en pacientes durante la prime- ra mitad del ciclo menstrual. En la Figura 13 podemos observar los valores encontrados. Es indudable que esta prueba tiene una gran utilidad para establecer la presencia de ciclos anovulato- rios durante el estudio de la función menstrual de la mujer.

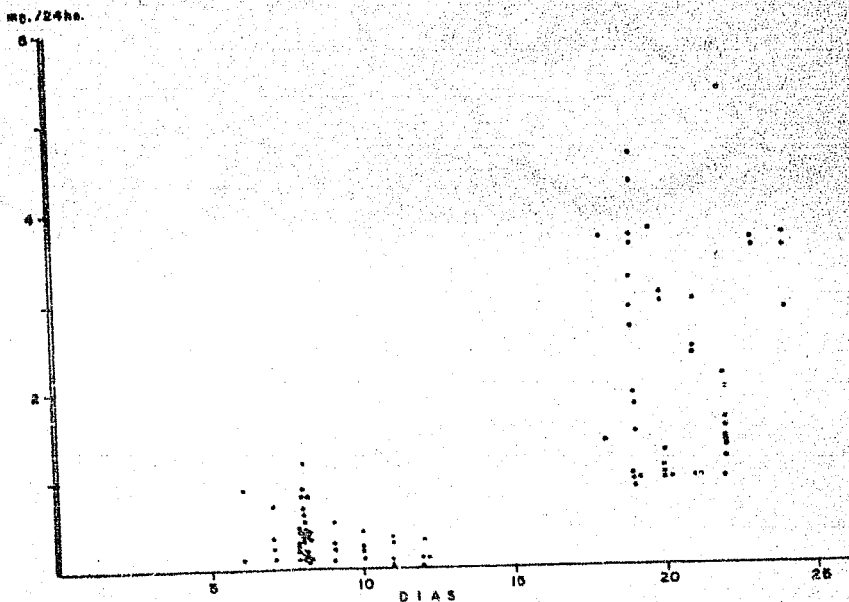


Fig. 12. Resultados obtenidos en las dos fases del ciclo.

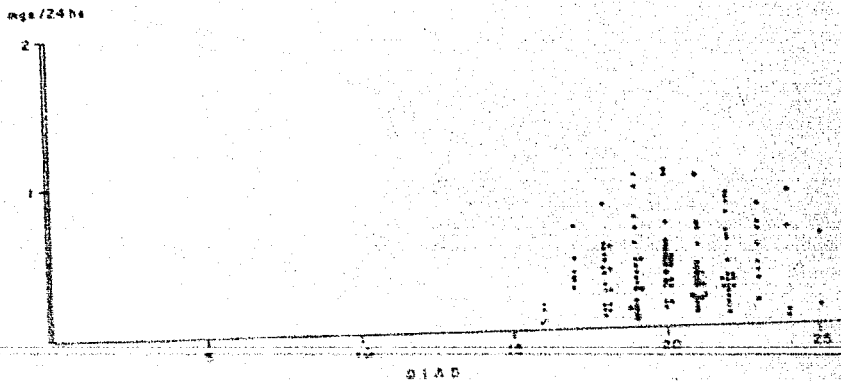


Fig. 13. Desfijación de pregnandiol

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Hemos visto como se obtiene una hidrólisis completa del glucuronidato de pregnandirol con el empleo de 300 unidades de Ketodase por ml. de orina. A pesar de que nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por Bongiovanni (23) y Goldzieher (24) no están de acuerdo con los observados por Ronan y colaboradores (27). Estos últimos autores han encontrado un mayor porcentaje de hidrólisis cuando usan cantidades menores de Ketodase y que la efectividad de la hidrólisis desciende rápidamente cuando aumenta la cantidad de enzima de 300 unidades por ml. Esta divergencia de los resultados no se explica fácilmente, sin embargo hay que hacer notar que en nuestros experimentos los estudios de hidrólisis se realizaron con orinas con un contenido elevado de glucuronidato de pregnandirol de origen endógeno y en cambio Ronan estudió la hidrólisis del esteroide conjugado, agregando el compuesto puro a una solución acuosa. Es posible que en la orina existan numerosos compuestos también conjugados al ácido glucurónico y que la presencia de éstos compita con el conjugado de pregnandirol y que dosis pequeñas de la enzima específica no sean suficientes para hidrolizar a todos los compuestos conjugados que existen en la orina. A este respecto Stempel y colabo-

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Hemos visto como se obtiene una hidrólisis completa del glucuronidato de pregnandirol con el empleo de 300 unidades de Ketodase por ml. de orina. A pesar de que nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por Bongiovanni (23) y Goldzieher (24) no están de acuerdo con los observados por Ronan y colaboradores (27). Estos últimos autores han encontrado un mayor porcentaje de hidrólisis cuando usan cantidades menores de Ketodase y que la efectividad de la hidrólisis desciende rápidamente cuando aumenta la cantidad de enzima de 300 unidades por ml. Esta divergencia de los resultados no se explica fácilmente, sin embargo hay que hacer notar que en nuestros experimentos los estudios de hidrólisis se realizaron con orinas con un contenido elevado de glucuronidato de pregnandirol de origen endógeno y en cambio Ronan estudió la hidrólisis del esteroide conjugado, agregando el compuesto puro a una solución acuosa. Es posible que en la orina existan numerosos compuestos también conjugados al ácido glucurónico y que la presencia de éstos compita con el conjugado de pregnandirol y que dosis pequeñas de la enzima específica no sean suficientes para hidrolizar a todos los compuestos conjugados que existen en la orina. A este respecto Stempel y colabo-

radores (20) han demostrado que la hidrólisis de algunos glucuronidatos de corticosteroides puede ser interferida por la presencia de glucuronidatos del ácido acetil salicílico y aún por los del pregnandiol, cuando éste se encuentra en grandes cantidades como en los casos de embarazo. Este efecto competitivo de otros glucurónidos presentes en las orinas normales se puede evitar -- agregando cantidades extras de glucuronidasa. Tomando en cuenta estos hechos, podríamos explicar la discrepancia observada a inferir que para obtener una buena recuperación del pregnandiol -- urinario es necesario tener una cantidad suficiente de enzima para hidrolizar todos los glucuronidatos presentes y que éstos no compitan con la hidrólisis del pregnandiol.

Un aspecto que tiene gran importancia, es la preparación de las columnas, así como los volúmenes de los solventes utilizados durante el procedimiento. Ya hemos visto como fué necesario modificar la cantidad de solvente de acuerdo con el diseño de nuestras columnas y las condiciones especiales de nuestro laboratorio. Este aspecto deberá ser tomado muy en cuenta cuando se adapte este mismo método en cualquier otro laboratorio.

Vale la pena hacer un pequeño comentario en cuanto al procedimiento de acetilación. En el método original se describe que se efectúa con 1 ml. de anhídrido acético que se evapora a

100°C en un tiempo cercano a dos horas. Con este procedimiento no fué posible obtener una acetilación completa, lo cual fué demostrado al realizar la segunda cromatografía y no obtener todo el esteroide con elusiones de acetato de etilo al 5% en benceno y solo después de pasar acetato de etilo puro se obtuvo un compuesto más polar que indudablemente corresponde al pregnandiolo no acetilado. Este inconveniente se evitó con el uso de pequeños volúmenes de piridina, en forma semejante a los procedimientos habituales para la acetilación de esteroides.

Los resultados obtenidos con las enfermas embarazadas son del todo semejantes a los informados por Ronan y colaboradores, pero los valores son inferiores a los obtenidos por Klopper y Brown (28). Es interesante ver que al final del primer trimestre, los valores obtenidos tienden a disminuir y posiblemente coincidan con el descenso de la actividad del cuerpo amarillo y la iniciación de la producción de progesterona por la placenta. Este hecho observado previamente por Ronan hay que tomarlo en cuenta cuando se realizan dosificaciones de pregnandiolo en este período, pues un descenso en los valores iniciales podría tomarse equivocadamente como un dato de importancia en algunos casos de amenaza de aborto. Nuevamente se confirma que durante la última fase del embarazo las cifras de pregnandiolo tienden a disminuir.

En cuanto a la utilidad de este método en el estudio de la función ovárica, podemos decir que durante la primera mitad del ciclo menstrual, las cantidades de pregnandiól encontradas corresponden posiblemente a precursores de origen suprarrenal, pero el aumento de este metabolito durante la segunda mitad del ciclo deberá interpretarse como un aumento en la producción de progesterona que con toda seguridad es producida por el cuerpo amarillo del ovario. Ya que la formación del cuerpo lúteo es consecutiva a la ruptura de un folículo maduro con la producción concomitante de un óvulo, un aumento cíclico en la producción de progesterona podría interpretarse como equivalente de ciclos ovulatorios.

En Ginecología Endócrina tiene una gran importancia el conocer la existencia de la ovulación, y ya que esta prueba es relativamente sencilla para detectar un aumento cíclico de progesterona, es conveniente tenerla en cuenta para precisar este fenómeno en las mujeres estudiadas.

Con ésto no se pretende sobrevalorar este método, ya que es bien sabido que el fenómeno de la ovulación solo se puede asegurar cuando se le ha visto, pero es posible inferirlo con las cifras de pregnandiól urinario y otras pruebas entre las que se encuentran de manera preponderante, la citología vaginal

la cristalización del moco cervical y el estudio de la curva de la temperatura basal.

En la práctica y usando el método antes descrito, podemos considerar que cuando una orina del día 19 ó 20 de un ciclo tipo de 28 días contiene más de 1 mg. en 24 horas sugiere la presencia de un ciclo ovulatorio. Niveles inferiores a 1 mg. durante los días 19 ó 20 del ciclo se encuentran por lo general en ciclos anovulatorios.

Por último vale la pena mencionar que en un laboratorio -- con instalaciones y equipo adecuado, es posible que una persona efectúe 40 dosificaciones a la semana.

CAPITULO V

RESUMEN

Las modificaciones a la técnica original de Goldzieher para adaptarla a las condiciones de nuestro medio en lo que se refiere a la acetilación y al volumen de solventes usados, nos permitieron estudiar las 286 muestras analizadas, encontrando en las 54 muestras de orina de mujeres embarazadas que a partir del tercer trimestre los valores ascendían hasta llegar a 30 mg. en el último período del embarazo. En las 49 muestras de orina en la fase pre-ovulatoria del ciclo, la mayor parte de ellas se encontraba por abajo de 1 mg. y en las 44 mujeres con ciclos ovulatorios, las cifras de pregnandiol estuvieron por arriba de 1 mg. En el estudio hecho a pacientes con ciclos anovulatorios (días 18 al 25) los valores también se encontraron por abajo de 1 mg. ó sea parecidos a los obtenidos en la primera mitad del ciclo menstrual.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Corner, G.W. y Allen, W.M.
PHYSIOLOGY OF THE CORPUS LUTEUM.
Am. J. Physiol. 88, 326 (1929).
- 2.- Eutenandt, A. y Westphal, V.
UBER DIE DARSTELLUNG DES CORPUS-LUTEUM-HORMONS AUS
STIGMASTERIN; DIE KONSTITUTION DES CORPUS-LUTEUM-HORMONS.
Ber. deut. chem. Ges. 67, 2085 (1934).
- 3.- Hartman, N. y Wettstein, A.
EIN KRYSTALLISIERTES HORMON AUS CORPUS LUTEUM.
Helv. chim. Acta 17, 878 (1934).
- 4.- Wintersteiner, O. y Allen, W.M.
CRYSTALLINE PROGESTIN.
J. Biol. Chem. 107, 321 (1934).
- 5.- Reynolds, S.R.M. y Ginsburg, N.
MICRODETERMINATION OF A Δ^4 -3 KETOSTEROID (PROGESTERONE)
OBTAINED FROM SMALL VOLUMENS OF STRAM.
Endocrinology 31, 147 (1942).
- 6.- Venning, E.H., Henry, J.S. y Browne, J.S.L.
THE MEASUREMENT OF A PREGNANEDIOL COMPLEX IN HUMAN URINE.
Cand. M.A.J. 36, 83 (1937).
- 7.- Bloch, K.
THE BIOLOGICAL CONVERSION OF CHOLESTEROL TO PREGNANEDIOL.
J. Biol. Chem. 157, 661 (1945).
- 8.- Fopják, G.
BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL AND RELATED SUBSTANCES.
Ann. Rev. Biochem. 27, 533 (1958).
- 9.- Cornforth, J.W. y Fopják, G.
BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL.
Brit. Med. Bull. 14, 221 (1958).

- 10.- Bloch, K.
BIOGENESIS AND TRANSFORMATIONS OF ESQUALENE.
Proc. IV Intern. Congr. Biochem. Pergamon Press New York,
4, 50 (1958).
- 11.- Bloch, K.
THE BIOLOGICAL SYNTHESIS OF CHOLESTEROL.
Vitamin and Hormones 15, 119 (1957).
- 12.- Solomon, S., Lenz, A.L., Vandewiele, R. y Lieberman, S.
Proc. Am. Chem. Soc. New York, p. 29 c (1954).
- 13.- Vennart, E.H.
GRAVIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SODIUM PREGNANEDIOL
GLUCURONIDE (EXCRETION PRODUCT OF PROGESTERONE).
J. Biol. Chem. 119, 473 (1937).
- 14.- Vennart, E.H.
FURTHER STUDIES ON STIMATION OF SMALL AMOUNTS OF SODIUM
PREGNANEDIOL GLUCURONIDATE IN URINE.
J. Biol. Chem. 126, 595 (1938).
- 15.- Marrian, G. y Gough, N.
THE ISOLATION OF PREGNANE-3 (α)-OL-20 ONE FROM THE
HYDROLYSIS PRODUCTS OF "SODIUM PREGNANEDIOL GLUCURONIDATE"
Biochem. J. 40, 376 (1947).
- 16.- Astwood, E.R. y Jones, G.E.S.
A SIMPLIFIED METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF
PREGNANEDIOL IN HUMAN URINE.
J. Biol. Chem. 137, 397 (1941).
- 17.- Talbot, N.B., Berman, MacLaghlan, E.A. y Wolfe, J.K.
A COLORIMETRIC DETERMINATION OF NEUTRAL STEROIDS IN 24
HOURS SAMPLE OF HUMAN URINE (PREGNANEDIOL TOTAL, ALPHA-
BETA-ALCOHOLIC 17 KETOSTEROIDES).
J. Clin. Endocrinol. 1, 668 (1941).
- 18.- Sommerville, L.F., Gough, N. y Marrian, G.F.
THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SMALL AMOUNTS OF
PREGNANEDIOL IN HUMAN URINE.
J. Endocrinol. 5, 237 (1948).

- 19.- Cohen, S.L.
THE HYDROLYSIS OF STEROID GLUCURONIDES WITH CALF SPLEEN
GLUCURONIDASE.
J. Biol. Chem. 192, 147 (1951).
- 20.- Stempfel, R.S., Sidbury, J.B. Jr. y Migeon, C.J.
GLUCURONIDASE HYDROLYSIS OF URINARY CORTICOSTEROID
CONJUGATES; THE EFFECT OF SALICYLATE GLUCURONOSIDE AS A
COMPETING SUBSTRATE AND THE EFFECT OF ENZYME INACTIVATION.
J. Clin. Endocrinol. 20, 214 (1960).
- 21.- De Waeleville, H., Borth, B. y Gsell, E.
EFFECT OF DL- α -TOCOPHEROL ACETATE ON PROGESTERONE
METABOLISM.
J. Clin. Endocrinol. 8, 982 (1948).
- 22.- Klopper, A., Michie, E.A. y Browne, J.B.
A METHOD FOR THE DETERMINATION OF URINARY PREGNANEDIOL.
J. Clin. Endocrinol. 12, 209 (1955).
- 23.- Bongiovanni, A.M. y Eberlein, W.R.
MEASUREMENT OF PREGNANEDIOL IN URINE.
Analit. Chem. 30, 358 (1958).
- 24.- Goldzieher, J. y Nakamura, I.
THE DETERMINATION OF URINARY PREGNANEDIOL AND
PREGNANETRIOL.
For publicarse.
- 25.- Huber, D.
DETERMINATION OF PREGNANEDIOL IN URINE FOR DIAGNOSTIC
PURPOSES.
Biochem. J. 41, 609 (1947).
- 26.- Allen, W.J.
A SIMPLE METHOD FOR ANALYZING COMPLICATED ABSORPTION
CURVES OF USE IN COLORIMETRIC DETERMINATION OF URINARY
STEROIDS.
J. Clin. Endocrinol. 10, 71 (1950).
- 27.- Renan, P., Parsons, L., Namier, R. y Watts, H.H.
STUDIES IN STEROID METABOLISM. IX. THE EXCRETION OF
PREGNANE 3 α , 20 TRIOL DURING PREGNANCY.
J. Clin. Endocrinol. 20, 355 (1960).