

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD NACIONAL DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES.

"METODO PARA DETERMINACION RAPIDA DE  
11 OXIESTEROIDES PLASMATICOS"

TESIS QUE SUSTENTA EL MEDICO CIRUJANO

SALVADOR FRANCISCO VILLALPANDO HERNANDEZ

PARA OBTENER LA ESPECIALIZACION EN

ENDOCRINOLOGIA Y NUTRIOLOGIA

MEXICO - 1 9 7 2

CURSO DE ESPECIALIZACION EN ENDOCRINOLOGIA Y  
NUTRIOLOGIA, SERVICIO DE ENDOCRINOLOGIA DEL  
HOSPITAL GENERAL DEL CENTRO MEDICO NACIONAL  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL,

1970  
*[Handwritten signature]*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	2
Reactivos	
Aparatos	
Extracción	
Fluorometría	
Cálculos	
SENSIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD	5
Sujetos normales	
Estimulación con ACTH	
Enfermedad de Addison	
Inhibición con Dexametasona	
Síndrome de Cushing	
RESULTADOS	6
DISCUSION	8
BIBLIOGRAFIA	11

## "MÉTODOS PARA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE 11 OXIOESTEROIDES PLASMÁTICOS"

### Introducción

La medición del cortisol libre en el plasma o sus metabolitos urinarios, han sido considerados en forma tradicional como el dato más fiel para estudiar la función suprarrenal.

Los primeros métodos descritos para la medición de 17 hidroxisteroides tanto plasmáticos como urinarios, estaban basados en diferentes procedimientos de purificación de la muestra por solventes orgánicos seguido de una reacción cromógena con la fenilhidrazina, según el método descrito por Porter y Silver, Sweat y Col. en 1954 y, más tarde, Lew y Bondy separadamente en 1957, y en 1960 Braunsberg, describieron sendos métodos que tenían como denominador común la individualización cromatográfica de los esteroides midiendo posteriormente su fluorescencia. Estos métodos presentaban como inconveniente, el que sólo podían aplicarse a la clínica en forma muy restringida, ya que el costo era muy elevado y el proceso largo y minucioso, además de requerir, por lo menos, 5 ml. de plasma para cada determinación.

A partir de 1958, Silver y Col. Guillemin y Col., y más tarde, en 1960, Van Der Vies, lograron medir la concentración de 11 hidroxicorticoides en plasma crudo de ratas, cuando encontraron que estos esteroides al ser colocados en

ácido sulfúrico concentrado, tenían una fluorescencia específica, siendo los dos principales los oxisteroides, cortisol y corticosterona.

De Moor en 1960 y Mattingly en 1962, lograron aplicar este método de fluorométrico a la medición de los oxisteroides en plasma humano.

El método que aquí se presenta, ha tomado los principios básicos de los trabajos de estos dos últimos autores. A pesar de que el uso de esta técnica simplificó grandemente el trabajo de laboratorio, tiene dos inconvenientes :

- 1) El error introducido por la concentración plasmática de estrógenos, ya que fluorescen a la misma longitud de onda, además de la fluorescencia inespecífica del plasma.
- 2) El segundo, es la purificación prolongada del cloruro de metileno, principal solvente utilizado, mediante lavados sucesivos con hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, agua y secado posteriormente con sulfato de sodio anhidro.

El objetivo de las modificaciones que se introducen en el método es eliminar los inconvenientes mencionados y reducir el tiempo de duración del proceso.

#### MATERIAL Y METODOS : REACTIVOS

Cloruro de metileno destilado  
 Hidróxido de sodio 0.1 N  
 Acido sulfúrico químicamente puro  
 Alcohol etílico absoluto  
 Carbonato de calcio anhidro

A cada litro de cloruro de metileno Merck, se agregaron 10 g. de carbonato de calcio anhidro y fué destilado a 35° C en un matraz conectado a un condensador enfriado por agua, el que a su vez drenaba a otro matraz.

La solución de hidróxido de sodio 0.1 N se hizo a partir de escamas de la sal. En un matraz colocado en baño de agua helada o puesto sobre hielo se preparó una mezcla a la cual se le denominó fluorescente, compuesta por siete partes de ácido sulfúrico químicamente puro Monterrey, a las cuales se agregaron lentamente tres partes de alcohol etílico absoluto, al tiempo que se agitaba delicadamente el matraz. Esta mezcla fué establecida a la temperatura ambiente protegiéndola de la luz y sólo produjo alteración en la determinación, cuando se usó 72 horas después de preparada.

APARATOS. Un agitador automático de movimiento oscilatorio de 66 PM, con broches en el plato, capaces de sostener matraces de Erlenmayer. Un fluorómetro G. K. Turner modelo 110 con filtro primario 47 B azul y filtro secundario 58 verde. Una bomba de extracción por vacío.

EXTRACCION. En matraces de Erlenmayer de 250 ml. se pusieron 2 ml. de plasma problema a los que se agregaron 15 ml. de cloruro de metileno destilado, colocándose en el agitador de movimiento oscilatorio durante 10 minutos. Se separaron ambas fases por decantación recibiendo el cloruro de metileno en tubos de ensayo de 15 x 150 mm. Se agregó a cada tubo 1 ml. de solución de 0.1 N de hidróxido de sodio, agitándose suavemente con la mano, durante 20 segundos, después fueron centrifugados durante 10 minutos a 1,500 RPM; posteriormente, con la bomba de extracción por vacío se extrajo el sobrenadante.

**BLANCO DE REACTIVOS Y ESTANDAR.** Para cada serie de 6 tubos de plasma "problema", se dispuso un tubo blanco de reactivos usando 2 ml. de agua destilada y los demás reactivos utilizados para la extracción. Para obtener una curva estandar se utilizó el blanco de reactivos como punto cero, preparándose además 2 tubos con 2 ml. de solución acuosa de cortisol a concentraciones de 0.2 y 1 mcg. respectivamente, los cuales fueron procesados de la misma manera que el plasma "problema".

**PREPARACION PARA LA FLUOROMETRIA.** En tubos de centrífuga de 15 ml. de capacidad, se colocaron con pipeta volumétrica 10 ml. del extracto final. A intervalos de un minuto se agregaron 5 ml. de la mezcla fluorescente a cada tubo, comenzando por el blanco y el estandar, agitándose suavemente durante 20 segundos y colocándose de inmediato al abrigo de la luz directa en una gradilla cubierta con una tela oscura e impermeable a la luz.

Se extrajo por vacío el sobrenadante, procediendo a leerlos de inmediato.

**FLUOROMETRIA.** Después de mantener encendido el fluorómetro durante 10 minutos, se llevó la aguja de lectura a posición cero, midiendo la fluorescencia de una celdilla de 10 x 75 mm. que contenía agua destilada, procediendo a la lectura de los tubos blanco, estandar y "problema" con el mismo orden e intervalo de un minuto, entre cada tubo, igual como se agregó la mezcla fluorescente.

CALCULOS. Sobre una carta de papel milimétrico se trazó la curva estandar, graficando en el eje de las abscisas las concentraciones de cortisol y en de las ordenadas, las lecturas obtenidas. La lectura neta de los tubos "problema" fué convertida a microgramos interpolando sobre la curva estandar.

SENSIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD APLICADO A DIVERSOS GRUPOS DE PACIENTES : Para ensayar la sensibilidad y reproducibilidad del método, se seleccionaron cinco grupos de sujetos a los cuales se tomaron muestras para determinar la concentración plasmática de los oxisteroides, bajo diversas condiciones experimentales.

GRUPO 1. Este grupo fué considerado como control por estar integrado por sujetos normales, veinte estudiantes de medicina de los cuales diez eran hombres y diez mujeres, que no excedían en más de 10% de su peso ideal con promedio de edad de 23 años y sin evidencia clínica de patología suprarrenal. Se les tomó sangre venosa por venopuntura de una vena del antebrazo con ayuno previo de 12 a 14 horas entre las 8 y 9 horas del día, para evitar las variaciones circadianas.

GRUPO 2 : Se integró con siete pacientes, tres hombres y cuatro mujeres sin evidencia de patología suprarrenal a los cuales después de reposo nocturno y ayuno de 24 horas, se les administraron 50 U de ACTH en solución salina endovenosa durante 8 horas, manteniéndolos durante ese tiempo en decúbito dorsal.

GRUPO 3. A cuatro pacientes del grupo anterior estando hospitalizados, se les administraron 2 mg. de dexametasona por la noche (a las 24.00 hrs) y 12 horas más tarde, se les tomó una muestra de sangre para determinación de 11 oxisteroides.

GRUPO 4. Se formó con cinco pacientes que sufrían enfermedad de Addison, los cuales ingresaron en insuficiencia suprarrenal aguda por abandono del tratamiento o por alguna forma de stress, tomándose las muestras antes de iniciar el tratamiento específico.

GRUPO 5. Estuvo integrado solamente por un hombre joven de 15 años de edad en el cual se demostró histológicamente la coexistencia de hiperplasia y adenomas suprarrenales bilaterales.

Los plasmas, objeto del estudio, fueron obtenidos por centrifugación de sangre heparinizada. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado dentro de las primeras 24 horas después de obtenidas.

## R E S U L T A D O S

REPRODUCIBILIDAD : El error estandar fué calculado con los resultados de determinaciones hechas por duplicado en 20 tubos que contenían una misma concentración de 0.2 mg. de solución acuosa de cortisol y en 100 determinaciones por duplicado de los plasmas "problema". El error encontrado en las determinaciones de solución acuosa de cortisol, fué de  $\pm 1.7\%$ , mientras que el error estandar encontrado en las determinaciones de plasmas "problema", fué de  $\pm 2.3\%$ .

SENSIBILIDAD : Como se esquematiza en la figura No. 1, el cálculo de la media aritmética de los valores de 11 oxisteroides plasmáticos obtenidos en el grupo de control formado por sujetos normales, fué de 0.31 mcg. con desviación estandar de  $\pm 0.14$  mcg. Estos valores se consideraron importantes, ya que nos sirvieron como referencia para el análisis estadístico de los datos obtenidos en los restantes grupos del estudio.

Analizando por separado los valores de 11 oxisteroides del plasma de hombres y mujeres, pudimos encontrar diferencia en ellos al comparar el promedio aritmético de cada uno de los grupos que fueron de 0.32 mcg para el grupo de hombres y de 0.27 mcg para el grupo de mujeres. A pesar de esta diferencia, no encontramos significancia estadística.

En el grupo de siete pacientes normales que fueron sometidos a estimulación endovenosa con ACTH, observamos que después de la infusión de esa hormona, los niveles de 11 oxisteroides se incrementaron en un rango comprendido entre 0.50 y 0.89 mcg con una media aritmética de 0.74 mcg. La comparación estadística con el grupo de sujetos normales considerados como control, demostró una diferencia significativa con una  $p < 0.001$ .

En los cuatro pacientes a los cuales se practicó inhibición de la función suprarrenal con 2 mg. de dexametasona encontramos un descenso notable de los valores de 11 oxisteroides en un rango entre 0.00 y 0.10 mcg. El estudio estadístico dió un valor de  $p < 0.01$ .

En el grupo de pacientes que ingresaron al hospital con insuficiencia suprarrenal aguda, los hallazgos en cuanto a niveles plasmáticos de 11 oxisteroides fueron muy similares a los encontrados en el grupo de sujetos normales inhibidos con dexametasona. Las cifras encontradas, oscilaron entre 0.00 y 0.15 mcg. con media de 0.06 mcg y el análisis de significancia estadística fué también similar al del grupo anterior.

El último grupo estuvo constituido exclusivamente por un paciente con el diagnóstico de Síndrome de Cushing, al cual se hicieron mediciones repetidas de 11 oxisteroides sin efectuar ninguna manipulación farmacológica; el promedio encontrado en estas mediciones fué de 1.0 mcg.

## DISCUSION

Aunque sabemos que el método descrito en este trabajo no es una innovación substancial en la metodología para la determinación de esteroides, consideramos que es un procedimiento eficaz de aplicación clínica, para el estudio de la función suprarrenal y que requiere tan solo de un equipo de costo bajo, de escaso personal de laboratorio y de un tiempo mínimo de proceso.

La reproducibilidad de esta técnica tiene un pequeño margen de error como lo demuestra el cálculo de error estandar que se obtuvo en las determinaciones por duplicado tanto en muestras de plasma "problema", como de solución acuosa de cortisol y que fué siempre inferior al 3%.

Las diferencias que encontramos en los niveles de 11 oxisteroides entre el grupo control y el grupo sometido a estimulación prolongada de la corteza suprarrenal, así como a otros dos grupos a los que anatómica, fisiológica o farmacológicamente tenían suprimida la función suprarrenal, demuestran que el método es capaz de descubrir estas variaciones en la concentración plasmática de 11 oxisteroides. Este rango de sensibilidad es suficientemente útil para ser utilizado en los estudios clínicos rutinarios de los principales padecimientos de la glándula suprarrenal. Se sabe que este método no es capaz de discriminar entre cortisol y corticoesterona y, por lo tanto, no puede emplearse en los estudios bioquímicos finos.

Sin embargo, la sensibilidad es comparable a la de otros métodos que emplean en su procedimiento mayor número de extracciones y purificaciones con diversos solventes orgánicos, pero que no incluyen una cromatografía en alguno de sus pasos.

Por otra parte, también debemos tener en cuenta que los valores obtenidos en estas mediciones, aunque cercanos a la concentración real existente en el plasma, no corresponden exclusivamente a los oxisteroides, ya que existen otras sustancias en el plasma que fluorescen en la misma longitud de onda que estos esteroides como podrían ser las bases púricas y pirimidícas.

La falta de diferencia estadísticamente significativa en las mediciones hechas en hombres y mujeres, podría deberse a un fenómeno al azar, habiéndose eliminado realmente la contaminación por estrógenos, o bien, porque la eliminación de estas hormonas ha sido parcial, pero suficiente para establecer una franca diferencia estadística.

Encontramos como una de las principales ventajas de esta metodología, el hecho de que el tiempo de proceso de un ensayo de seis tubos dura, en promedio, 90 minutos, permitiendo aligerar el trabajo de laboratorio, si tomamos en cuenta que otros métodos fluorométricos emplean entre 8 y 12 horas de trabajo efectivo.

## S U M A R I O

Se describe un método fluorométrico para la determinación de los oxisteroides del plasma simplificado, que tiene un costo bajo y requiere de un corto tiempo de proceso.

Se demuestra mediante el estudio de varios grupos de pacientes con diversos estados de funcionamiento suprarrenal su sensibilidad y, mediante el análisis estadístico de mediciones por duplicado, su reproducibilidad.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) SWEAT, C. P.  
Analyt. Chem. 26, 773 - 1954.
- 2) LEWIS, B.  
J. Clin. Path. 10, 148 - 1957.
- 3) BONDY, R. I., ABELSON, D., SCHEUER, J.,  
TSEU, T. K.  
J. Biol. Chem. 224, 47, 1957.
- 4) BRAUNSBURG, H., JAMES, V. H.  
J. Endocrinol. 21, 327, 1960.
- 5) SILVER, R. H., BUSCH, R. D., OSLAPAS, R.  
Clin. Chem. 4, 279, 1958.
- 6) GUILLEMIN, R., CLAYTON, G. W., SMITH, J. D.  
Endocrinology 63, 340, 1958.
- 7) VAN DER VIES, J., BACKER, E. F., DE WIED, D.  
Acta Endocr. 34, 513, 1960.
- 8) DE MOOR, P., STEENO, O., RASKIN, M.,  
HENDRIX, A.  
Acta Endocr. 33, 297, 1960.
- 9) MATTINGLY, D.  
J. Clin. Path. 15, 374, 1962.

\*\*\*

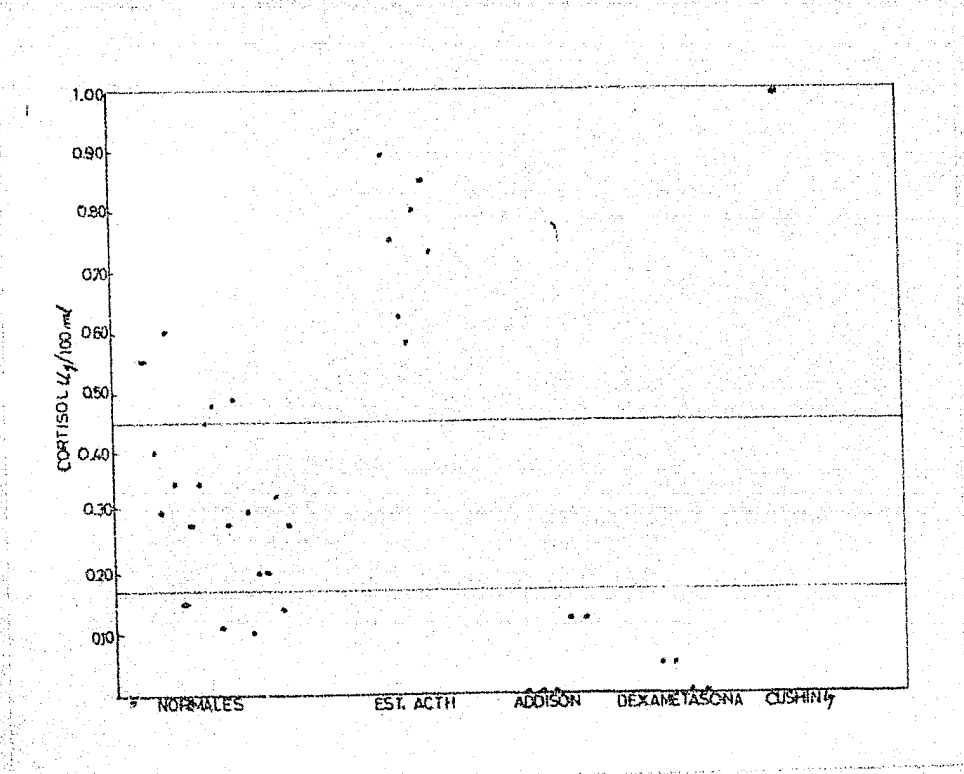


FIGURA No. 1

En esta gráfica, se muestran los niveles de los oxiesteroideos plasmáticos de los diversos grupos estudiados. Los valores comprendidos entre las dos líneas paralelas, corresponden a la media aritmética,  $\pm$  una desviación estándar.