

DETERMINACION DE PREGNANDIOL EN EMBARAZO Y CICLO MENSTRUAL NORMALES

R. GUERRA-GARCIA (*), IVONNE PUENTE (*), L. A. LLERENA (*)

(*) Departamento de Ginecología y Obstetricia Universidad Peruana Cayetano Heredia.

INTRODUCCION

El pregnandiolo es el principal catabolito de la progesterona, esteroide de 21 átomos de carbono producido por la placenta, cuerpo lúteo del ovario y corteza suprarrenal; se excreta en pequeña cantidad, alrededor de 1 mg./24 hs. en hombres, en mujeres en fase folicular y en niños prepúberes; el recién nacido no excreta pregnandiolo ni aun después de la administración de 25 mg. de progesterona (1).

La determinación de pregnandiolo urinario constituye uno de los métodos de verificar la ocurrencia de ovulación en una mujer, pues en tal situación se produce un característico incremento del pregnandiolo a cifras de 3-5 mg./24 hs., este pregnandiolo es originado en progesterona producida por el cuerpo lúteo y persiste elevado mientras éste tiene actividad, disminuyendo a cifras de alrededor de 1 m. al ocurrir la menstruación. Cuando el óvulo es fecundado; la actividad del cuerpo lúteo se extiende hasta el 3er. mes de embarazo, y el pregnandiolo incrementado desde la ovulación continúa elevando su excreción urinaria en cada mes de embarazo. La placenta completamente estructurada tiene la capacidad de sintetizar progesterona, la cual se cataboliza a pregnandiolo, el cual continúa incrementándose hasta el final del embarazo.

De lo expuesto se deduce la importancia que tiene esta determinación en la clínica ginecológica, para diagnosticar problemas de esterilidad por ciclos anovulatorios, y en la práctica obstétrica para la evaluación de la amenaza de aborto e inadecuada función placentaria.

Estas son las razones que han movido a presentar este trabajo, el cual emplea un nuevo método, cuya principal ventaja es su rapidez y relativa sen-

(*) Trabajo presentado para obtener el grado de Bachiller en Farmacia U.N.M.S.M., Diciembre 1966.

cillez; en nuestro medio se han realizado determinaciones de pregnandiol desde 1963 (2), pero hasta la fecha carecíamos de una curva de normalidad en el embarazo, patrón indispensable para la comparación de valores obtenidos en patología. Se ha escogido el primer y tercer trimestre de embarazo por corresponder a las épocas críticas en clínica obstétrica.

METODO

Hemos usado el método descrito por Sulimovici, Lunenfeld y Shelesnyak (3) que en síntesis supone lo siguiente:

Una alícuota de 1/150 - 1/100 (en casos de embarazo) ó 1/25 (en fase luteal o folicular) de la orina de 24 hs. se filtra y después hidroliza a reflujó con HCL, concentrado (1/10 del volumen orina usado) por 10 minutos a ebullición; luego se deja enfriar. El hidrolizado es extraído con 25 cc. de una mezcla éter: alcohol absoluto (4 : 1 v/v) tres veces; el extracto orgánico se lava con NaOH (20 cc.) y luego con agua (2 × 20 cc.). Después de deshidratada con Na₂ SO₄, la mezcla de solventes se evapora a sequedad y se transfiere cuantitativamente con cloroformo a un tubo de 5 ml. y nuevamente se evapora a sequedad; el extracto diluído en 0.5 ml. de cloroformo es aplicado en una línea de 5 cm. de longitud en una placa de sílica gel de 500 u. de espesor; igualmente se aplican a cada lado de esta placa dos standards de pregnandiol de 25 y 50 ug. c/u., que se denominan standard referencia y standard patrón. La aplicación se hace a 20 mm. una de otra y a 25 mm. del borde inferior de la placa. Se coloca la placa en un tanque de vidrio que contiene una mezcla de cloroformo: acetona (80 : 20 v/v) como fase móvil, y se deja correr por 50 minutos, lo cual es suficiente para que el frente del solvente llegue hasta el borde superior de la placa.

Después de corrida la placa sus bordes laterales son rociados con ácido ortofosfórico al 40% (zona correspondiente a los standards de referencia) protegiendo los standards patrón y extracto problema; después se coloca la placa en una estufa a 110°C por 10 minutos, lo cual determina la aparición de manchas gris oscuro en las zonas donde se encuentra el pregnandiol. La localización y tamaño de las manchas orientan las zonas de la placa que serán removidas, para lo cual puede usarse una navaja como espátula. La sílica removida se transfiere a tubos de prueba a los que se agrega 3 ml. de H₂SO₄ concentrado y más o menos 3 mg. de sulfito de sodio anhidro, luego se calienta a baño-maría a 56°C por 10 minutos, se centrifuga por 5 minutos a 3,000 r.p.m. y se transfiere a las cubetas para las lecturas correspondientes a 380, 425 y 470 mμ., en un espectrofotómetro. Las lecturas a 425 mμ. sufren la corrección de Allen (4) y una porción de sílica gel de la misma

placa eluída con ácido sulfúrico sirve como blanco. Hemos usado el espectrofotómetro Zeiss PMQ II. Para determinar la creatinina urinaria, se ha empleado el método de Philips (5).

Sujetos

Se ha realizado un total de 85 determinaciones de pregnandioli urinario en 75 mujeres distribuidas en los siguientes grupos:

Grupo A: 12 mujeres normales no gestantes de 16-28 años de edad, a las cuales se les determinó pregnandioli urinario en dos diferentes fechas del ciclo menstrual normal; en la primera fase del 4º-8º día del ciclo y en 2º del 19º - 23º día del ciclo menstrual. Sus datos individuales aparecen en los cuadros Nos. 1 y 2.

Grupo B: 63 mujeres gestantes normales divididas en 6 sub-grupos de acuerdo al tiempo de gestación.

Tiempo de embarazo

5ª - 8ª semana:	11	mujeres	normales
9ª - 12ª semana:	10	„	„
13ª - 16ª semana:	10	„	„
17ª - 20ª semana:	11	„	„
25ª - 28ª semana:	10	„	„
37ª - 40ª semana:	11	„	„
T O T A L :	63	mujeres	normales

Grupo C: 11 mujeres normales, dos de las cuales eran gestantes; en todas ellas se hizo la determinación de pregnandioli urinario por los métodos Sulimovici y Klopfer. Las colocamos en un grupo aparte por desconocer el tiempo de gestación y el día del ciclo, por lo tanto la fase a la cual pertenecen estas determinaciones se realizaron con el objeto de comparar los resultados con uno y otro método, los cuales aparecen en el cuadro N° 7.

Las muestras de orina correspondieron en su mayoría a gestantes del Hospital Militar Central y Hospital Arzobispo Loayza de Lima.

CUADRO N° 1

CARACTERISTICAS DE LAS 12 MUJERES NORMALES EN QUIENES SE DETERMINO PREGNANDIOL EN LAS DOS FASES DEL CICLO MENSTRUAL

CASO	EDAD	MENARQUIA	PESO	TALLA	DIA DEL CICLO	
	años	edad	K.	mts.	1° fase	2° fase
C.J.	23	12	60.0	1.60	7°	22°
P.C.	26	13	50.5	1.46	6°	19°
P.I.	23	12	51.0	1.54	6°	23°
P.J.	28	12	52.0	1.56	7°	23°
E.V.	23	14	63.0	1.62	7°	23°
F.M.	21	12	55.0	1.56	5°	23°
F.C.	21	12	54.0	1.64	7°	21°
M.L.	27	11	62.0	1.67	8°	23°
A.E.	16	10	64.0	1.67	8°	19°
F.N.	22	11	58.0	1.60	7°	22°
M.B.	19	13	61.0	1.64	—	22°
J.C.	28	12	55.5	1.61	7°	—

CUADRO N° 2

EXCRECION DE PREGNANDIOL POR GRAMO DE CREATININA EN LA 1° y 2° FASE DEL CICLO MENSTRUAL NORMAL

CASO	Mg. de P-Diol/g.	Creat.
	1° fase	2° fase
C.J.	1.21	6.19
P.C.	0.69	4.22
P.I.	1.37	4.11
P.J.	0.68	4.06
E.V.	1.98	3.88
F.M.	1.07	3.12
F.C.	0.33	3.49
M.L.	0.87	3.45
A.E.	0.52	2.64
F.N.	1.09	2.15
M.B.	—	2.83
J.C.	1.24	—
MEDIA	1.00	3.65

RESULTADOS

En el cuadro N° 2 se presentan las cifras obtenidas en mujeres normales durante el ciclo menstrual; en 11 casos, la media obtenida para la fase folicular fue 1.00 ± 0.15 mg. E.St., los valores extremos de 0.33-1.98; en la 2ª fase del ciclo el pregnandiolo se determinó en 11 mujeres y el valor medio fue de 3.65 ± 0.33 E.St. con valores extremos de 2.15-6.19; la diferencia existente entre los valores medios de las dos fases del ciclo menstrual es altamente significativa ($p < 0.001$).

CUADRO N° 3

EXCRECION DE PREGNANDIOL POR GRAMO DE CREATININA EN LOS DIVERSOS MESES DEL EMBARAZO NORMAL

2° MES		3° MES		4° MES	
Caso	Pdiol mg./g. creat.	Caso	Pdiol mg./g. creat.	Caso	Pdiol mg./g. creat.
L.R.	4.33	V.L.	8.55	C.M.	9.26
A.H.	3.47	I.N.	8.56	M.B.	4.16
B.M.	4.03	D.G.	10.63	C.H.	5.86
E.T.	10.38	C.M.	10.92	C.C.	9.47
C.F.	11.58	C.B.	5.86	D.M.	7.99
L.H.	13.21	J.C.	7.11	N.P.	10.30
P.A.	4.03	M.G.	8.74	N.R.	7.30
Y.A.	7.0	C.S.	8.95	M.C.	9.11
M.P.	7.84	L.H.	10.05	I.M.	9.24
A.S.	7.90	S.S.	12.57	M.M.	10.47
A.C.	9.12				
MEDIA	7.54	MEDIA	9.19	MEDIA	8.32

5° MES		7° MES		10° MES	
Caso	Pdiol mg./g. creat.	Caso	Pdiol mg./g. creat.	Caso	Pdiol mg./g. creat.
D.Z.	9.30	I.B.	9.88	M.T.	24.75
H.V.	10.18	M.M.	26.45	L.P.	31.08
R.S.	10.56	C.S.	26.70	Z.G.	13.97
C.E.	11.26	E.G.	36.33	M.G.	26.23
I.B.	11.59	N.G.	16.80	Y.R.	31.90
M.P.	11.70	M.V.	17.70	Z.I.	35.26
L.H.	13.39	G.R.	14.22	L.G.	39.38
R.S.	14.50	S.T.	19.67	C.A.	42.37
I.V.	12.27	E.N.	22.68	G.S.	14.30
M.G.	12.69	M.L.	26.00	D.C.	19.00
A.C.	19.62	—	—	M.P.	33.85
MEDIA	12.46	MEDIA	21.64	MEDIA	28.37

En el cuadro N° 3 se presentan los valores de pregnandiól de las mujeres gestantes, cifras que están expresadas en mg. de hormona por gramo de creatinina, en los diversos meses de embarazo.

En el 2do. mes la excreción de pregnandiól tuvo una media en 11 casos 7.54 ± 0.32 E.St., teniendo como valores extremos 3.47 al 13.21 mg.

En el 3er. mes el valor medio fue de 9.19 ± 0.65 E.St. con valores extremos de 5.86 a 12.57; este valor medio es significativamente mayor al hallado en el 2do. mes ($p < 0.05$).

En el 4to. mes la media fue de 8.32 ± 0.67 , valor que no difiere significativamente del hallado en el 3er. mes ($p < 0.4 > 0.3$); los valores extremos oscilaron de 4.16 a 10.47.

El promedio obtenido para el 5to. mes fue de 12.46 ± 0.88 en 11 mujeres; los valores extremos entre 9.30—19.62 y la comparación de las medias con el 4to. mes mostró una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

En el 7mo. mes la media de 10 determinaciones fue de 21.64 ± 0.80 que es muy superior a la obtenida en el mes anterior ($p < 0.001$) los valores extremos entre 9.88 y 36.33 mg.

Por último, en el 10mo. mes la media tuvo un valor de 28.37 ± 0.91 E.St. que es significativamente superior a la media del 7mo. mes ($p < 0.001$) los valores extremos oscilaron entre 13.97 y 42.37 mg.

CUADRO N° 4

ANALISIS ESTADISTICO DE LA EXCRECION DE PREGNANDIOL EN EL CICLO MENSTRUAL NORMAL

Fase	Número de Determinaciones	Media \pm E. ST.	D. ST.	Valores Extremos
1°	11	1.00 ± 0.15	0.46	0.33 — 1.98
2°	11	3.65 ± 0.33	1.07	2.15 — 6.19

CUADRO N° 5

ANALISIS ESTADISTICO DE LA EXCRECION DE PREGNANDIOL EN EL EMBARAZO NORMAL

Mes	Número de Determinaciones	Media \pm E. ST.	D. ST.	Valores Extremos
2°	11	7.54 ± 0.32	1.02	3.47 — 13.21
3°	10	9.19 ± 0.65	1.94	5.86 — 12.57
4°	10	8.32 ± 0.67	2.02	4.16 — 10.47
5°	11	12.46 ± 0.88	2.79	9.30 — 19.62
7°	10	21.64 ± 0.80	2.41	9.88 — 36.33
10°	11	28.37 ± 0.91	2.87	13.98 — 42.37

Los cuadros Nos. 4 y 5 muestran en resumen los valores medios de las fases del ciclo menstrual y diversos meses de gestación, y el cuadro N° 6 el significado estadístico de las diferencias observadas.

CUADRO N° 6

COMPARACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN GESTACION Y CICLO MENSTRUAL NORMALES

1º Fase del ciclo menstrual	N = 20	P = < 0.001
2º Fase del ciclo menstrual		
2º Fase del ciclo menstrual	N = 20	P = < 0.001
2º mes de gestación		
2º Mes de Gestación	N = 19	P = > 0.02
3º Mes de Gestación		< 0.05
3º Mes de Gestación	N = 18	P = > 0.30
4º Mes de Gestación		< 0.40
4º Mes de Gestación	N = 19	P = < 0.001
5º Mes de Gestación		
5º Mes de Gestación	N = 19	P = < 0.001
7º Mes de Gestación		
7º Mes de Gestación	N = 19	P = < 0.001
10º Mes de Gestación		

CUADRO N° 7

COMPARACION DE LOS VALORES DE PREGNANDIOL OBTENIDOS CON LOS METODOS DE KLOPPER Y SULIMOVICI

Nº	Klopper	Sulimovici	Diferencia
1	6.02	5.89	- 0.13
2	1.81	1.44	- 0.37
3	2.00	1.83	- 0.17
4	9.76	9.12	- 0.64
5	1.90	2.64	+ 0.64
6	23.45	23.68	+ 0.23
7	2.21	2.03	- 0.18
8	2.37	1.44	- 0.93
9	0.86	1.16	+ 0.30
10	1.62	1.34	- 0.28
11	0.11	0.76	+ 0.65
M E D I A			- 0.07

D.St. = 0.5534

E.St. = 0.175

P = > 0.70 < 0.60

El cuadro N° 7 muestra los resultados obtenidos en la comparación de los valores obtenidos para pregnandiol usando los métodos de Klopper y Sulimovici, la media de las diferencias fue 0.07 ± 0.017 E.St., lo cual hace que no sean estadísticamente significativas ($p < 0.70 > 0.60$).

La gráfica presenta objetivamente los valores medios de la excreción urinaria de pregnandiol en embarazo normal realizada en 63 casos. Las barras muestran el valor medio de pregnandiol \pm E.St. I. Los números en las barras representan las determinaciones hechas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en la determinación de pregnandiol urinario usando el método de Sulimovici muestran diferencia significativa en las dos fases del ciclo mensual, con valores promedio similares a los obtenidos por el mismo autor y por otros laboratorios empleando métodos diferentes.

DETERMINACION DE PREGNANDIOL URINARIO SEGUN LOS METODOS KLOPPER MICHIE Y BROWN (1955) Y EL METODO SULIMOCIVI APLICADO POR NOSOTROS

Autor	Tipo de orina	N° de deter- minaciones	Promedio en mg./24 hs.
Klopper	Fase Proliferativa	8	1.12
Sulimovici (nosotros)	Fase Proliferativa	11	1.00
Klopper	Fase luteínica	18	3.30
Sulimovici (nosotros)	Fase luteínica	11	3.65

Aparece evidente de esta demostración que el método empleado por nosotros es adecuado para distinguir la fase proliferativa de la segunda fase o secre'ora en el ciclo mensual.

Hemos logrado obtener satisfactoriamente cifras de pregnandiol para la primera fase del ciclo mensual, no así Sulimovici, el cual dice que su método es adecuado para las determinaciones de pregnandiol y allopregnan-diol durante la fase luteínica y embarazo pero no durante la fase folicular. Esta diferencia creemos que se debe a una ligera modificación: Este grupo de muestras en su proceso fueron calentadas por 30 minutos antes de la lectura en el fotocolorímetro, a diferencia de los 10 minutos que indica Sulimovici, lo cual suponemos que no es suficiente para una buena elución y adecuado desarrollo de color de pequeñas cantidades de hormona, como en el caso de la primera fase del ciclo menstrual.

Durante el embarazo las cifras de pregnandiol aumentan progresivamente con el tiempo de gestación a excepción del cuarto mes que existe una caída en las cifras de pregnandiol, lo cual no tiene significación estadística y cuya interpretación debe ser cuidadosa; esta disminuida excreción de pregnandiol en la semana 14ª ha sido descrita anteriormente por Ronnan y Wotiz (6), quienes la atribuyen a menor producción de pregnantriol, el cual después de hidrólisis ácida y en los sistemas cromatográficos por ellos usados tiene idéntico Rf. al pregnandiol; los mismos autores han demostrado que la hidrólisis ácida transforma al pregnantriol en una sustancia con propiedades cromatográficas similares al pregnandiol, siendo una interferencia en su dosaje.

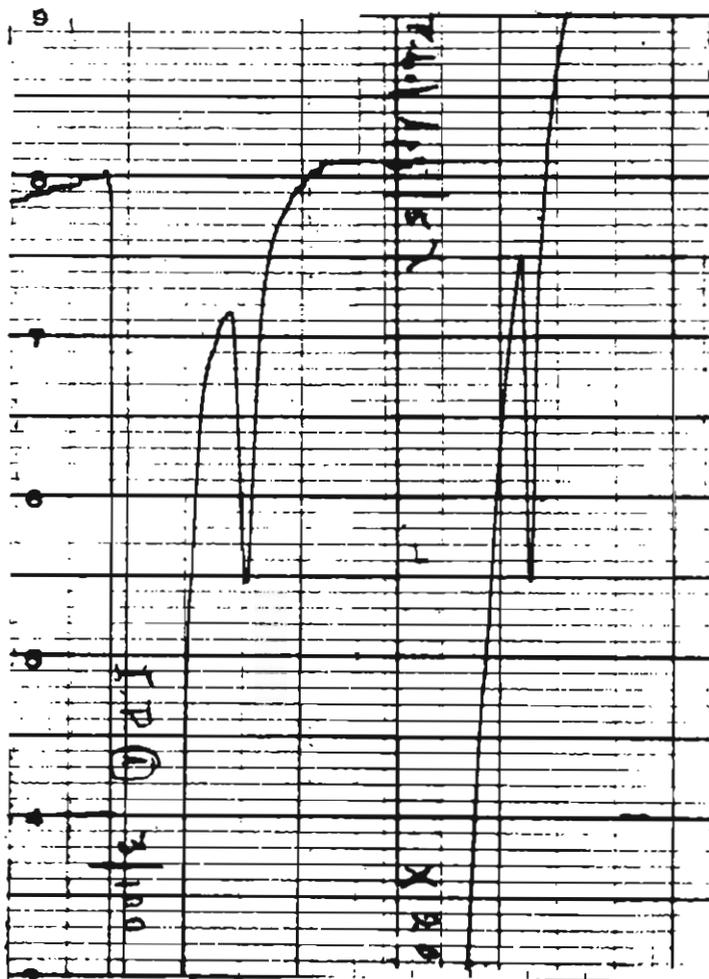
Para dilucidar si algo similar ocurre con la cromatografía en capa fina, hemos hidrolisado 500 ug. de standard de pregnantriol (por duplicado) con ácido clorhídrico y hemos seguido el mismo proceso seguido por Sulimovici y obtenido lecturas de 25.92 ug. en la zona correspondiente al pregnandiol y en cambio muy pequeña cantidad de pregnantriol en su zona respectiva; esta determinación se hizo por reacción colorimétrica con ácido sulfúrico; cuando inyectamos una alícuota de los standards de pregnantriol así procesados en el cromatógrafo de gas no logramos obtener ningún registro de masa, lo cual señala que la hidrólisis del pregnantriol produce: a) cambios en su molécula y origina compuestos con Rf. similares a los del pregnandiol en el sistema de cromatografía que hemos usado; b) estos compuestos son capaces de producir cromogenicidad con ácido sulfúrico pero no se registran como molécula de esteroide en cromatografía de gas.

Nuestras cifras de pregnandiol urinario son inferiores a las de otros autores, pues el método tiene una alta especificidad, como lo demuestra el siguiente experimento:

Se procesaron las muestras en idénticas condiciones a las descritas por Sulimovici, pero la sílica fue eluída con etanol y éste evaporado bajo nitrógeno; el extracto diluído en acetona fue inyectado al cromatógrafo de gas, dando como resultado un solo pico en el trazado con un Rt. que corresponde al standard de pregnandiol.

La columna usada fue de acero inoxidable y contenía como fase estacionaria SE-30 al 3% sobre Diotoport S. grano 80-100; la temperatura de la columna se mantuvo a 245°C, el detector a 250°C y el inyector a 255°C; la presión de nitrógeno fue de 30 libras por pulgada cuadrada.

Esta nueva prueba de la especificidad del método cuando se aplica a orinas de embarazo viene a sumarse a las demostraciones de Sulimovici que fueron la determinación del punto de fusión y el espectro infrarrojo del producto final. El pregnandiol puro y las muestras de orina fueron llevadas a través de todo el procedimiento. Los puntos de fusión de los productos finales así como el punto de fusión mixto fueron similares.



La fotografía muestra de izquierda a derecha: Standard de pregnandiol (1 ug.). Muestra del extracto urinario equivalente a 1 cc. orina procesado, de acuerdo a las condiciones ya descritas. Cromatógrafo Perkin Elmer 801 Columna SE-30 3% a 230°C. Detector de llama N2 38 1b.

La aceptación de un método depende de la demostración de su especificidad acumulando tanta evidencia como sea posible; de la sensibilidad, o sea la más pequeña cantidad de sustancia que es distinguible de cero; de la exactitud que se mide por los experimentos de recuperación y de la precisión

al realizar una serie de dosajes por duplicado y verificando el coeficiente de variación; todo esto es discutido por el autor al hacer la publicación de su método.

Nuestras muestras fueron procesados inmediatamente después de la colección debido a que la congelación de muestras de orina puede llevar a falsos menores valores de pregnandiól (7). Hemos empleado la determinación de creatinina para verificar que la colección urinaria era correcta, sin embargo, debemos tener presente que se ha demostrado que en embarazo normal hay un aumento de la excreción de creatinina, el cual guarda buena correlación con la producción de hormona coriónica (8).

SUMMARY

The authors have studied the excretion of pregnandiól in 85 normal women by using the method of Sulimovici. During the menstrual cycle the mean values \pm S.E. for 12 women were 1.0 ± 0.15 and 3.65 ± 0.33 mg./24 hr. for the proliferative and secretory phases respectively.

The mean values in 63 pregnant women were 7.54 ± 0.32 , 9.19 ± 0.65 , 8.32 ± 0.67 , 12.46 ± 0.88 , 21.64 ± 0.8 and 28.37 ± 0.91 mg./g. creatinine for the months 2nd., 3rd., 4th., 5th., 7th. and 10th.

The procedure was compared to Klopper's method and no differences were detected. As additional proof of the specificity of the method employed, the urine extracts were analyzed by gas-liquid chromatography and, pregnandiól was found to be the principal component of the final extract.

BIBLIOGRAFIA

1. ZANDER, J. and SOLTH. *Klin. Wschr.* 31: 317, 1953.
2. GOMEZ, MARIA. Tesis Br. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, 1963.
3. SULIMOVICI, S., LUNNENFELD, B. and SHELESNYAK, M. *Acta Endocrinol.* 49: 97, 1965.
4. ALLEN, W. J. *Clin. Endocrinol.* 10: 71, 1950.
5. PHILIPS, R. *Quantitative Clinical Chemistry*, vol. 2, 1943.
6. RONAN, F., PARSONS, L., NAMIOT, R. and WOTIZ, H. J. *Clin. Endocrinol.* 20: 355, 1960.
7. COOPER, W., COYLE, M., JAMES, V. and NICHOLAS, M. *J. of Endocrinol.* 35: pg. XXI, 1966.
8. SIMS, E.A.H. and KRANTZ, K.E. *J. Clin. Invest.* 37: 1764, 1958.