

## RADIOINMUNOANÁLISIS SIMULTANEO DE CINCO HORMONAS ESTEROIDALES

MYRIAM SANCHEZ DE GOMEZ\*, VIRGINIA MONTES DE GOMEZ\*

### SUMARIO

En este trabajo se describe un método para la determinación de androstendiona, progesterona, dihidrotestosterona, testosterona y 17-hidroxi-progesterona en muestras de 1 ml de suero femenino y masculino.

Después de la extracción de los esteroides la mezcla es sometida a cromatografía en una columna de Lipidex-5000 (hidroxialcoxiopropil Sephadex) en n-hexano: cloroformo 95:5. La evaluación final de los diferentes esteroides se hace por medio de radioinmunoanálisis específicos usando carbón-dextrano para separar las fracciones libre y ligada de la radioactividad.

Los cinco compuestos se resolvieron en cuatro fracciones eluyendo conjuntamente androstendiona y progesterona, las cuales fueron determinadas específicamente usando antiseros selectivos. La recuperación varió entre 63.5 y 93.7% siendo los valores más bajos para dihidrotestosterona. La interferencia o blanco para los cinco esteroides fue inferior al límite de detección de los radioinmunoanálisis (10 pg) y la exactitud, usando el criterio de la prueba de pureza radioquímica, fue comprobada para los análisis de progesterona y testosterona.

En un estudio comparativo se analizaron las cinco hormonas en un grupo de hombres y mujeres normales mediante la determinación directa del extracto y después de la etapa cromatográfica. En la mayoría de los casos se encontraron diferencias significativas entre los promedios de uno y otro método y solo en uno de ellos (17-hidroxiprogestero en suero masculino) no hubo diferencia.

Se establecieron los niveles de estos esteroides en suero femenino en las fases folicular y luteal del ciclo menstrual y en algunos de ellos se estudió la variación circadiana. Dichos niveles también se determinaron después de practicar pruebas de estímulo y/o de freno para su secreción, en muestras provenientes de pacientes con sospecha de alteración relacionada con el hirsutismo.

---

\* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

## SUMMARY

A method for the determination of androstenedione, progesterone, dihydrotestosterone, testosterone and 17-hydroxyprogesterone in 1 ml samples of male and female blood serum is described.

After extraction of the steroids they are chromatographed on a column of Lipidex-5000 (hydroxyalkoxypropyl Sephadex) in n-hexane:chloroform, 95:5. The final measurement of the individual steroids is made by radioimmunoassay using dextran-coated charcoal in the separation of bound and unbound radio activity.

We resolved these five compounds into four fractions with androstenedione and progesterone eluting together, which were also determined specifically by use of selected antibodies. The overall recovery ranged from 63.5 to 93.7%, the lowest values being for dihydrotestosterone. Blank values for all steroids were below the detection limits of the assays (10 pg) and the accuracy, in terms of the radiochemical purity test, was confirmed for progesterone and testosterone determinations.

In a comparative study the serum concentrations of these five steroids in a group of normal males and females were measured by direct assay of the extract and after the chromatographic step. All the assays gave significant differences in the means by the two methods, except for 17-hydroxyprogesterone in male serum, where the means were indistinguishable.

Also concentration values are presented for women in the follicular and luteal phases of the menstrual cycle, some of them measured for circadian rhythm. In addition, values obtained in a group of patients with alterations related with hirsutism are given after stimulation and inhibition tests.

## INTRODUCCION

La introducción del radioinmunoanálisis (RIA) en el campo del análisis de las hormonas esteroidales incrementó apreciablemente la sensibilidad de las determinaciones. De esta manera fue posible establecer las bajísimas concentraciones de muchas de las hormonas esteroidales y que escapaban a los límites de detección de los métodos tradicionales. Por otra parte, al poder correlacionar estos niveles con diversos estados patológicos, abrió un campo nuevo en la investigación de la bioquímica y fisiología endocrinas.

Una condición esencial para que todo radioinmunoanálisis tenga una alta exactitud es que cumpla con un alto grado de especificidad. Para lograr esto se busca, por lo general, combinar un antisuero de alta especificidad, con el mejor método que permita separar los esteroides que se van a analizar de los demás compuestos que pueden interferir en la reacción inmunológica.

Se han descrito varios métodos para extraer y purificar los esteroides de tejidos y fluidos biológicos. Se pueden mencionar la cromatografía en papel y capa delgada (1), de columna con soportes como celita (2), Sephadex LH-20 (3) y más recientemente se ha introducido el empleo de un derivado lipofílico del Sephadex, Lipidex-5000.(5). Este derivado hidrofóbico se hincha en solventes no polares en contraste con el Sephadex LH-20, lo cual permite su empleo en la purificación de esteroides de baja polaridad y que difícilmente se pueden separar por otros métodos. El propósito de este trabajo fue el de desarrollar un método para la determinación de cinco esteroides de importancia bioquímica con un alto grado de especificidad, precisión y exactitud.

Se empleó la capacidad potencialmente alta que ofrece el Lipidex-5000 para fraccionar endrostendiona, progesterona, dihidrotestosterona, testosterona y 17-hidroxiprogestero de suero humano, para posteriormente medir sus niveles por medio de radioinmunoanálisis usando antisueros de reconocida especificidad.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material para Análisis

Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres y hombres voluntarios sin ninguna enfermedad aparente. Las muestras de sangre donde se sospechaba algún trastorno relacionado con hirsutismo se obtuvieron de pacientes del Servicio de Endocrinología del Hospital Militar Central, Bogotá.

### Solventes y Reactivos

Todos los reactivos empleados eran de grado analítico. Los solventes, con excepción del éter, se destilaron antes de usarlos. Los esteroides no radiactivos se obtuvieron de Steraloids Inc. (Wilton New Hampshire, USA). Fueron cristalizados y su pureza se verificó por cromatografía en capa delgada (sílica gel, benceno:metanol, 95:5) y determinación de punto de fusión.

### Esteroides Radioactivos

1,2,6,7-<sup>3</sup>H Testosterona (93 Ci/mmol), 5 -Dihidro 1,2,4,5,6,7-<sup>3</sup>H Testosterona (155 Ci/mmol), 1,2,6,7-<sup>3</sup>H Androst-4-ene 3, 17-diona (99 Ci/mmol), 2,6,7-<sup>3</sup>H Progesterona (92 Ci/mmol) y 17-Hidroxi 1,2,6,7-<sup>3</sup>H progesterona (82 Ci/mmol) se obtuvieron del Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra). Todos los esteroides se purificaron por cromatografía con Sephadex LH-20 (tolueno:metanol 85:15) a intervalos de 2 meses y se guardaron en este solvente a 4°C.

## Antisueros

Antitestosterona (77-E) obtenido de OMS y preparado por inoculación de oveja con testosterona-CMO- albúmina sérica bovina.

Antitestosterona preparado por Dr. C. Tafurt por inoculación de conejos con testosterona-CMO-albúmina sérica bovina. Se empleó para el RIA de dihidrotestosterona.

Antiprogesterona (79/6) obtenido de OMS y preparado en conejo por inmunización con progesterona-CM)-albúmina sérica bovina.

Anti 17-hidroxiprogesterona obtenido de Dr. M. Rivarola, Buenos Aires, Argentina.

## Soportes Cromatográficos

Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) Lipidex-5000 (Packard Instrument Co., Downers Grove, Il. USA) Aprox. 6 g de lipidex equilibrados en n-hexano: cloroformo, 95:5 se empacaron en columnas de vidrio ( $d_i = 1$  cm) y el gel se dejó decantar por gravedad. Se hizo pasar solvente por lo menos 24 h. antes de su empleo. La columna resultante medía aprox. 12 cm.

## Procedimiento Cromatográfico

El diagrama de flujo empleado en la separación de los cinco esteroides se muestra en la fig. 1.

El suero (1 ml femenino, fase folicular; 0.1 ml fem, fase luteal y 0.1 ml masculino) se mezcló con aprox. 5000 DPM (en 0.1 buffer fosfato 0.1 M, pH 7.0) de progesterona, testosterona, dihidrotestosterona y 17-hidroxiprogesterona tritizados como estándares internos. Después de 15 min. a temperatura ambiente se extrajo con éter etílico en proporción de 10 volúmenes de solvente por volumen de muestra. Se agitó 1 min., se congeló la mezcla con hielo seco: etanol y se decantó la fase orgánica la cual se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en 0.5 ml del solvente cromatográfico y se aplicó a la columna de lipidex. Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente y a una velocidad de flujo de 30 ml/h.

Se colectaron las fracciones indicadas (fig. 1) el solvente se evaporó y el residuo se disolvió en 1 ml de buffer fosfato calentando en un baño de agua a 60° C por 5 min.

De cada solución se tomaron 0.5 ml para determinar las recuperaciones de cada esteroide y 4 alícuotas de 0.1 ml para las estimaciones

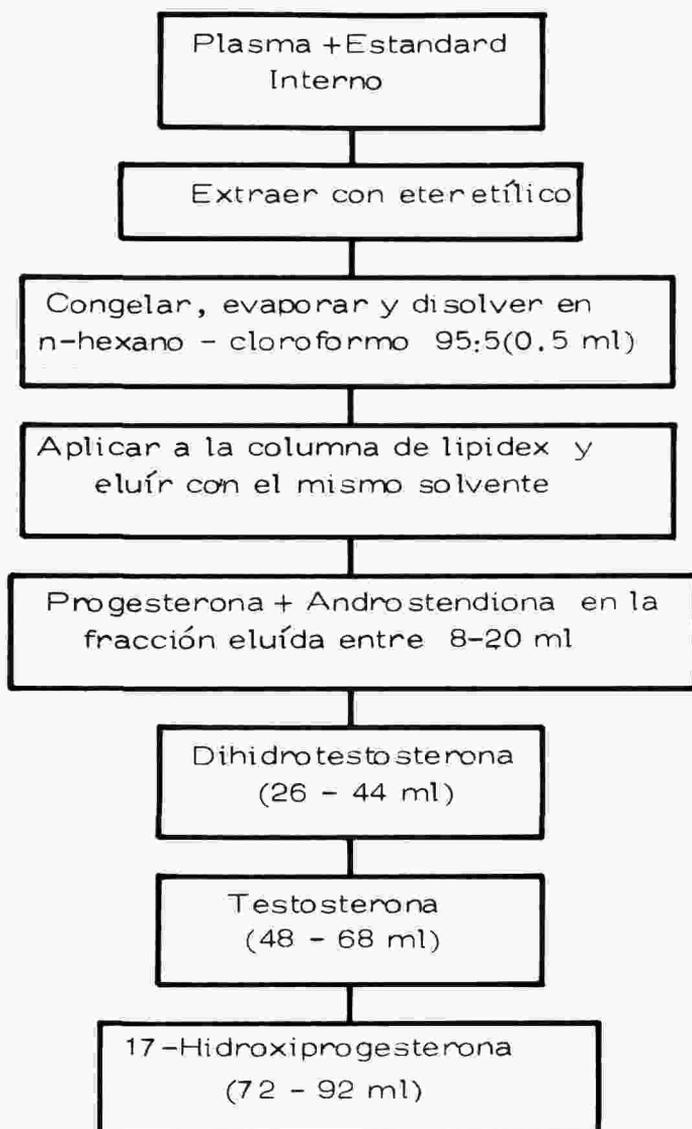


FIG. 1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO CROMATOGRAFICO

por RIA. Para las determinaciones de paralelismo se tomaron 3 alícuotas de 0.1, 0.05 y 0.025 ml y 0.4 ml para lecturas de recuperación.

### **Radioinmunoanálisis**

El método de radioinmunoanálisis empleado fue esencialmente el descrito por Brenner et al (5). Se denominó método directo (D) al RIA practicado sobre el extracto en éter y método cromatográfico (C) al realizado después de la inclusión de la etapa cromatográfica. Después de separar las fracciones libre y ligada de las hormonas, mediante carbón-dextrano (1%, 0.1%, 0.5 ml), el sobrenadante (0.8 ml) se decantó en viales que contenían etanol (1 ml) y se mezcló con el líquido de centelleo (10 ml, 4 g PPO, 0.44 g dimetil POPOP, 20 ml etanol y tolueno hasta 1 l). La radioactividad se midió en un contador beta, Beckman, perteneciente al Hospital Militar.

La pureza final se evaluó por el método descrito previamente (6) cuando la cromatografía antecede al RIA. Según él se asume que una fracción cromatográfica está pura cuando la actividad específica (radioactividad/masa) es constante a todo lo largo de la fracción cromatográfica. En este estudio se aplicó la prueba a los análisis de progesterona y testosterona en suero fase folicular donde la concentración relativa de las sustancias interferentes es alta. El suero (3–4 ml) se mezcló con esteroide tritiado ( $\times 10^4$  DPM) y se hizo la cromatografía en la forma usual. En la zona de elusión de la hormona en cuestión se colectaron fracciones (1–2 ml) que se denominaron con números arábigos de acuerdo con volumen eluido. Las fracciones se evaporaron, se disolvieron en buffer (0.5 ml) y se tomó una alícuota (0.1 ml) para determinar la masa por RIA y otra alícuota igual para medir la radioactividad, ambas determinaciones por duplicado.

### **Cálculos**

Las curvas estándar se linearizaron por el método logit-log (7). En cada serie de análisis se construyó una nueva curva estándar. El ajuste se hizo por un método de regresión lineal verificando la linealidad por medio de la prueba de Fisher (valor F).

En las fracciones cromatográficas que contenían diferentes cantidades de estándar interno, fue necesario hacer una corrección para la masa adicional al hacer el cálculo de la masa real de las fracciones, para lo cual se siguió el método descrito por Cekan y de Gómez (6).

Las pruebas de paralelismo se hicieron con base en la estadística del bioensayo (8) donde las respuestas (logits) de 3 dosis de hormona pura se compararon con las obtenidas en 3 volúmenes de extracto de

suero, ambos por triplicado. El paralelismo y la linealidad se analizaron por las pruebas estadísticas de Fisher y de Student (valor t) a un nivel de confianza de 95%.

En lo que se refiere a las pruebas de pureza radioquímica se aplicó un análisis de regresión lineal de las actividades específicas de las fracciones cromatográficas. La pendiente obtenida (b) y la estimación del error estándar de la pendiente ( $s_b$ ) se emplearon en el cálculo de los límites de confianza de la misma, a un nivel de confiabilidad del 95%. Cuando dichos límites de confianza incluían el valor cero, se asumía una pendiente indistinguible de cero y por lo tanto existía constancia en las actividades específicas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El propósito de este estudio fue el de desarrollar un método radioinmunológico para la determinación de cinco hormonas esteroidales clínicamente importantes, combinando el alto poder de resolución del Lipidex-5000 con la alta sensibilidad y especificidad del radioinmunoanálisis. Las condiciones en que se realizaron los RIAs se indican en la tabla 1 y en la fig. 2 se muestra una curva estándar típica. Siempre se usó un rango entre logit 2 y logit -2 recomendado previamente (7) y se descartaron las curvas cuyas pendientes (b) no estaban contenidas dentro de los siguientes límites de confianza:

$$b - s_b t_{.95(n-2)} \leq -2.303 \leq b + s_b t_{.95(n-2)}$$

En estudios recientes (9, 10) se han realizado comparaciones de los resultados obtenidos en análisis de plasma femenino y masculino incluyendo una etapa cromatográfica y sin ella, con el objeto de ver si la cromatografía es un factor necesario para alcanzar resultados específicos. En esta investigación se hizo un estudio del efecto sobre las determinaciones de algunas hormonas esteroidales, al purificarlas previamente en columnas de lipidex. En la tabla 2 se muestran los volúmenes de elusión relativos usando tres sistemas de solventes. Los valores que figuran son el promedio de 4 cromatografías observadas durante un período de 2 meses. Se escogió la mezcla hexano-cloroforno 95:5 porque permite separar testosterona y dihidrotestosterona, lo cual es una gran ventaja ya que asegura determinaciones específicas para ambos compuestos. Aunque progesterona y androstendiona eluyen superpuestas, se pudieron determinar selectivamente ya que los antisueros respectivos no mostraron afinidades cruzadas.

El empleo de este sistema cromatografico permitió separar efectivamente del suero humano los cinco esteroides en cuestión, lo cual

## CONDICIONES DEL RADIOINMUNOANÁLISIS PARA ALGUNOS ESTEROIDES

| Propiedad                    | Progesterona  | Androsterona | Dihidrotestosterona              | Testosterona         | 17-Hidroxi-progesterona |
|------------------------------|---|--------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Dilución final del A.S. a)   | 1: 21,000   | 1: 27,000    | 1: 150,000                       | 1: 90,000            | 1: 4,500                |
| Porcentaje de enlace max. b) | 42  | 30           | 43                               | 44                   | 34                      |
| Sensibilidad (pg) c)         | 10  | 12.5         | 6.25                             | 6.25                 | 10                      |
| Pendiente d)                 | -2.290  | -2.257       | -2.154                           | -2.413               | -2.169                  |
| Reacción cruzada (%) e)      | Cortisol < 0.01<br>Testost. < 0.2<br>17-OHP < 0.5<br>DHT 14 |              | Testost. < 0.1<br>Androst. < 0.1 | DHT 14<br>Androst. 8 | Progest. 3.2            |

- a) Dilución del antisuero en la mezcla final de reacción  
 b) Enlace de la forma radioactiva en ausencia de la no radioactiva  
 c) Dosis de la curva estándar linealizada correspondiente a logit +2  
 d) Pendiente de la curva estándar linealizada  
 e) Medidas al 50% de enlace relativo a los tubos "cero"

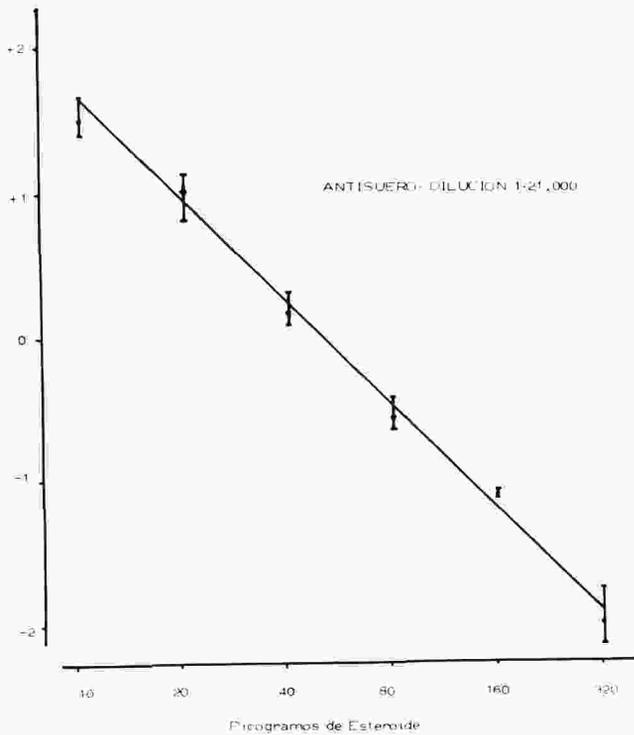


FIG. 2. CURVA DE CALIBRACION PARA PROGESTERONA

hizo posible su determinación específica y simultánea usando un volumen reducido de muestra. (Fig. 3). El patrón de elusión se verificó aproximadamente cada 2 semanas por un término de 2 meses que fue el tiempo de empleo de una columna individual.

La exactitud del método se evaluó por medio de experimentos de recuperación. A un pool de suero femenino, fase folicular, se agregaron cantidades conocidas de esteroide no radioactivo y se midió la recuperación al final de todo el proceso cromatográfico. (Tabla 3). Los valores encontrados son bastante altos lo que eventualmente podría indicar que no es necesario emplear un estándar interno, excepto tal vez para dihidrotestosterona, que reportó los valores más bajos.

Para verificar la validez de las determinaciones por medio del sistema Lipidex/RIA, se empleó el criterio de la pureza radioquímica descrita previamente (6). La prueba se aplicó a los análisis de progesterona y testosterona en suero femenino fase folicular, por ser los que estaban sujetos a mayores interferencias. La purificación de testosterona del suero (4 ml) adiconado con 20.000 DPM de testosterona tritiada,

TABLA 2

VOLUMENES DE ELUCION ABSOLUTOS Y RELATIVOS A LA PROGESTERONA  
EN COLUMNAS DE LIPIDEX - 5000 a)

| Esteroides             | Solvente   |                         |                          |             |            |             |
|------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|-------------|------------|-------------|
|                        | n-Hexano   | n-Hexano 95: Cloroformo | 5 n-Hexano 80:Cloroformo | 20          |            |             |
|                        | Rango (ml) | Vol. relat.             | Rango (ml)               | Vol. relat. | Rango (ml) | Vol. relat. |
| Progesterona           | 18 - 25    | 1.00                    | 7 - 14                   | 1.00        | 4 - 10     | 1.00        |
| Androstendiona         | 23 - 36    | 1.48                    | 10 - 20                  | 1.45        | 5 - 12     | 1.13        |
| Dihidrotestosterona    | 60 - 85    | 3.48                    | 26 - 48                  | 3.27        | 19 - 27    | 2.88        |
| Testosterona           | 110 - 140  | 5.76                    | 45 - 66                  | 4.73        | 22 - 31    | 3.25        |
| 17-Hidroxiprogesterona | 160 - 200  | 9.00                    | 72 - 92                  | 7.27        | 24 - 33    | 3.50        |

a) 6.0 g de lipidex / columna; h = 12 cm., di = 1 cm.

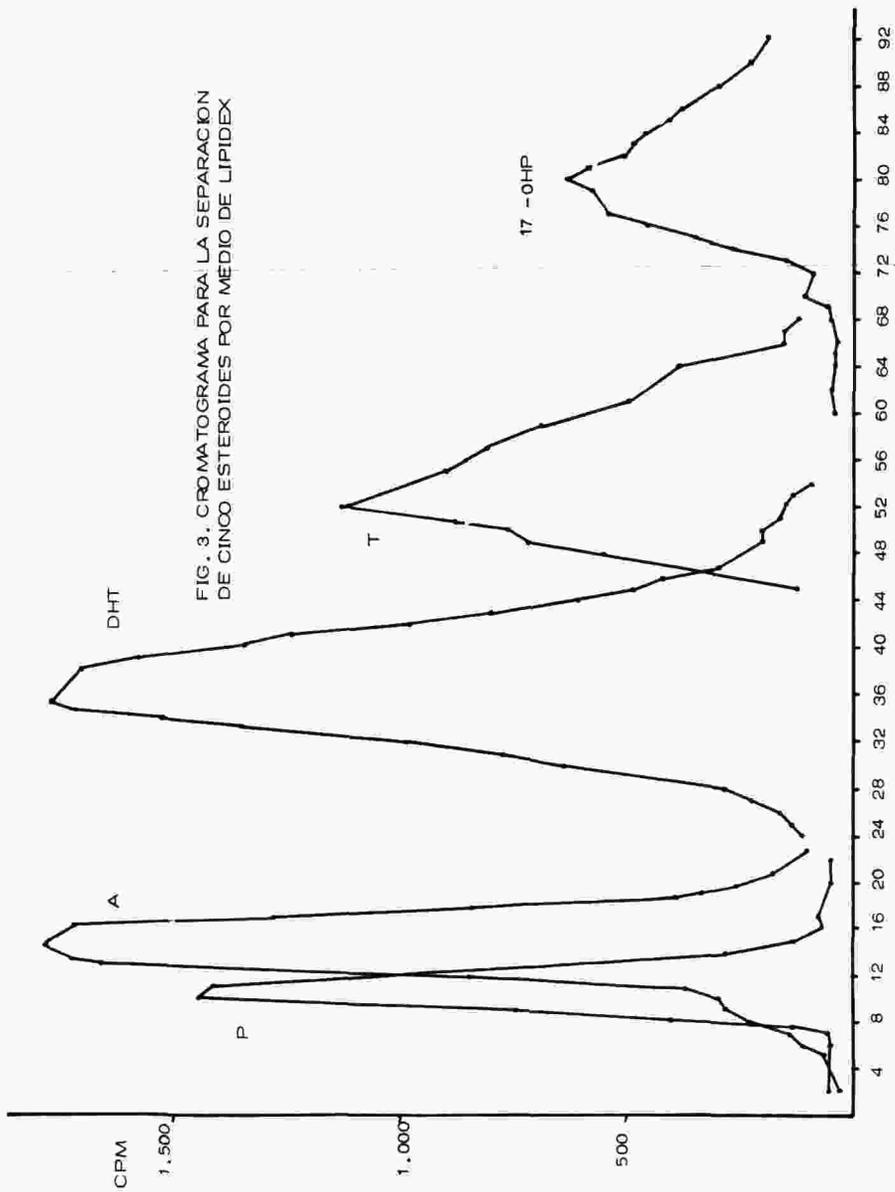


FIG. 3. CROMATOGRAMA PARA LA SEPARACION DE CINCO ESTEROIDES POR MEDIO DE LIPIDEX

TABLA 3

## RECUPERACION DE ESTEROIDES NO RADIOACTIVOS

| Esteroides             | Concentración Inicial <sup>a)</sup> (ng/ml) | Concentración Adicionada (ng) | Número de análisis | Recuperación ng | Recuperación % | CV % |
|------------------------|---|-------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|------|
| Androstendiona         | 2.88  | --                            | 10                 | --              | --             | 11.6 |
|                        |   | 0.7                           | 10                 | 0.57            | 81.4           | 8.5  |
|                        |   | 1.4                           | 10                 | 1.31            | 93.7           | 4.5  |
| Dihidrotestosterona    | 0.63  | --                            | 10                 | --              | --             | 12.0 |
|                        |   | 0.5                           | 10                 | 0.32            | 63.5           | 8.9  |
|                        |   | 1.0                           | 10                 | 0.77            | 77.0           | 7.3  |
| Testosterona           | 0.58  | --                            | 4                  | --              | --             | 12.0 |
|                        |   | 0.5                           | 4                  | 0.42            | 84.0           | 4.2  |
|                        |   | 1.0                           | 4                  | 0.85            | 85.0           | 5.1  |
| 17-Hidroxiprogesterona | 0.74  | --                            | 5                  | --              | --             | 3.1  |
|                        |   | 0.5                           | 5                  | 0.38            | 76.0           | 5.5  |
|                        |   | 1.0                           | 5                  | 0.76            | 76.0           | 17.2 |

a) Los esteroides fueron adicionados a un pool de suero femenino fase folicular. Se dan los contenidos iniciales del pool.

usando una columna de lipidex, condujo a valores de actividad específica para las fracciones individuales estadísticamente indistinguibles para los valores de masa comprendidos dentro del rango de concentración del método. (Fig. 4 y Tabla 4).

Este hallazgo contrasta con lo encontrado en experimentos similares de purificación de testosterona usando columnas de Celita (11), donde no se encontró constancia en las actividades específicas dentro del pico de elusión de este compuesto. Al encontrarse un incremento en la desviación de la línea de regresión a medida que aumenta el número de átomos de tritio, se atribuyó este efecto al remplazo isotópico, el cual retarda la elusión de la forma tritiada. Los resultados de este estudio muestran que no hay efecto isotópico en el sistema Testosterona/Lipidex ni en el sistema Progesterona/Lipidex. Para este último compuesto tampoco se encontró en el sistema Progesterona/Celita (6). Se puede concluir por lo tanto que el efecto isotópico depende no sólo de la naturaleza de la molécula sino también del sistema cromatográfico.

Las concentraciones de los cinco esteroides fueron determinadas en grupos de mujeres y hombres normales por el método directo (D) y cromatográfico (C). (Tabla 5). En la mayoría de los casos se encontró diferencia significativa entre los promedios alcanzados por uno y otro método. Los niveles de significancia variaron dependiendo de la hormona y del tipo de muestra y solo en uno de ellos (17-hidroxiprogesterona/suero masculino) no existía diferencia significativa. Estos resultados indican que por lo general, el RIA directo puede estar sujeto a la interferencia de sustancias presentes en el extracto que pueden dar reacción cruzada con el antisuero, en proporción variable. La disminución de los valores al hacer la cromatografía, muestra que el Lipidex es efectivo en la separación de algunas de las sustancias interferentes y por lo tanto, las determinaciones hechas en estas condiciones son más confiables.

Los valores normales de progesterona encontrados para las dos fases del ciclo menstrual, son similares a los reportados por Apter et al. (12) y Aedo et al. (13) y son un poco más bajos que los de Jänne et al. (14). Se dispone sólo de unos pocos valores reportados para progesterona y 17-hidroxiprogesterona en hombre. El valor de progesterona encontrado en este estudio es igual al reportado por Jänne et al. (14) y la concentración de 17-hidroxiprogesterona es similar a la descrita por Sjöberg et al. (15). Con relación a los niveles de testosterona en mujeres no se encontró diferencia entre los promedios para las dos fases del ciclo. Este punto ha sido objeto de gran controversia, pues algunos reportes muestran niveles luteales superiores (16) mientras otros indican niveles foliculares mayores (17). En cambio los niveles masculinos encontrados concuerdan con la literatura investigada (15) (16).

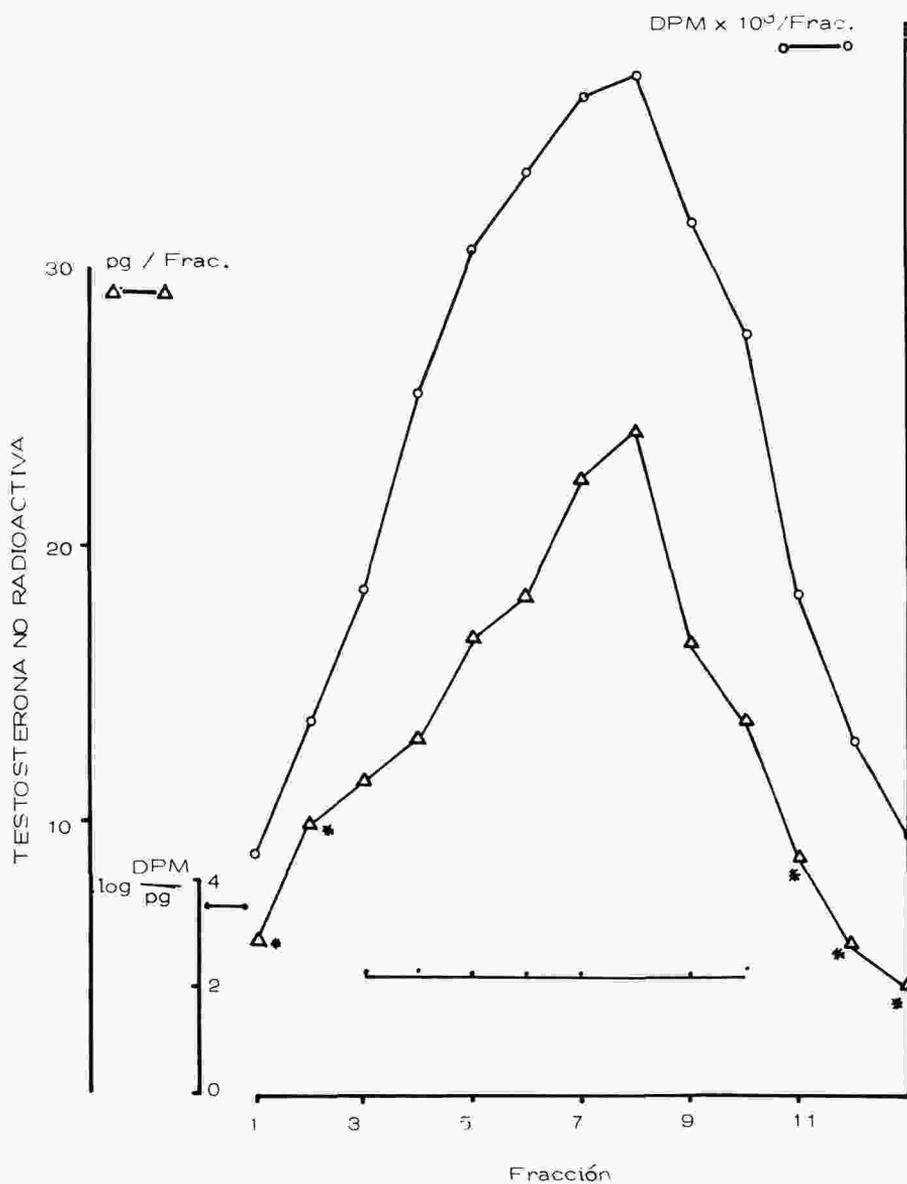


FIG. 4. CROMATOGRAFIA DE TESTOSTERONA DE SUERO ADICIONADA CON LA FORMA RADIOACTIVA DE LA MISMA.

TABLA 4

ACTIVIDAD ESPECIFICA (DPM/pg) DE LAS FRACCIONES  
CROMATOGRAFICAS DE TESTOSTERONA

| Fracción | DPM/pg | pg/Frac. | DPM/pg | Regresión   |
|----------|--------|----------|--------|---|
| a) 1     | 882    | 5.65     | 156.05 | $r = 0.91$<br>$n = 13$<br>$b = 54.85$<br>$s_b = 5.88$<br>$b/s_b = 9.32$ |
| 2        | 1372   | 9.91     | 138.41 |   |
| 3        | 1850   | 11.54    | 160.31 |   |
| 4        | 2564   | 13.07    | 196.34 |   |
| 5        | 3088   | 16.89    | 182.55 |   |
| 6        | 3368   | 18.20    | 185.03 |   |
| 7        | 3635   | 22.40    | 162.28 | $41.91$<br>$b/s_b = 67.79$  |
| 8        | 3705   | 24.15    | 153.42 |   |
| 9        | 3170   | 16.44    | 160.43 | $n = 8$<br>$b = -0.17 \times 10^{-3}$<br>$s_b = 7.00$                   |
| 10       | 2768   | 13.72    | 201.71 |   |
| 11       | 1835   | 8.73     | 210.19 |   |
| 12       | 1304   | 5.60     | 232.89 |   |
| 13       | 955    | 4.04     | 236.39 |   |

a) Análisis de 4 ml de suero folicular adicionado con 20.000 DPM

TABLA 5

## NIVELES ESTEROIDALES PROMEDIO EN SUERO HUMANO ( ng/ml )

| ESTEROIDE                     | FEMENINO          |                   |                   |                   | MASCULINO       |                 |                 |   |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|
|                               | D                 | FOLICULAR         | C                 | D                 | LUTEAL          | C               | D               | C |
| <b>PROGESTERONA</b>           |                   |                   |                   |                   |                 |                 |                 |   |
| Promedio - d.s.               | 0.786 $\pm$ 0.139 | 0.307 $\pm$ 0.051 | 6.20 $\pm$ 1.61   | 2.83 $\pm$ 1.25   | ---             | ---             | 0.37 $\pm$ 1.11 |   |
| Rango                         | 0.646-0.982       | 0.250-0.378       | 3.57-8.53         | 1.49-5.04         |                 |                 | 0.20-0.52       |   |
| n                             | 6                 | P<0.001<br>7      | 7                 | P<0.001<br>7      |                 |                 | 8               |   |
| <b>ANDROSTENDIONA</b>         |                   |                   |                   |                   |                 |                 |                 |   |
| Promedio - d.s.               | 4.78 $\pm$ 2.48   | 1.77 $\pm$ 0.58   | ---               | 1.613 $\pm$ 0.71  | 10.1 $\pm$ 1.88 | 2.61 $\pm$ 0.56 |                 |   |
| Rango                         | 2.21-8.12         | 0.99-2.56         |                   | 0.80-2.69         | 7.35-12.42      | 1.88-3.23       |                 |   |
| n                             | 6                 | P<0.02            |                   | 16                | 6               | P<0.001<br>6    |                 |   |
| <b>DIHIDROTESTOSTERONA</b>    |                   |                   |                   |                   |                 |                 |                 |   |
| Promedio - d.s.               | 0.727 $\pm$ 0.171 | 0.237 $\pm$ 0.067 | 0.679 $\pm$ 0.134 | 0.242 $\pm$ 0.093 | 1.27            | 1.26 $\pm$ 0.34 |                 |   |
| Rango                         | 0.55-0.96         | 0.13-0.32         | 0.48-0.85         | 0.132-0.376       | 0.9-9.09        | 0.91-1.75       |                 |   |
| n                             | 6                 | P<0.001<br>8      | 7                 | P<0.001<br>8      | 6               | P<0.001<br>6    |                 |   |
| <b>TESTOSTERONA</b>           |                   |                   |                   |                   |                 |                 |                 |   |
| Promedio - d.s.               | 0.845 $\pm$ 0.193 | 0.528 $\pm$ 0.118 | 0.710 $\pm$ 0.181 | 0.467 $\pm$ 0.068 | 6.70 $\pm$ 1.90 | 6.07 $\pm$ 1.11 |                 |   |
| Rango                         | 0.57-1.03         | 0.30-0.65         | 0.459-0.993       | 0.395-0.580       | 5.88-8.73       | 5.01-7.54       |                 |   |
| n                             | 5                 | P<0.01<br>7       | 13                | P<0.01<br>8       | 6               | P<0.05<br>6     |                 |   |
| <b>17-HIDROXIPROGESTERONA</b> |                   |                   |                   |                   |                 |                 |                 |   |
| Promedio - d.s.               | 1.20 $\pm$ 0.35   | 0.70 $\pm$ 0.18   | 7.06 $\pm$ 1.84   | 2.61 $\pm$ 1.07   | 1.60 $\pm$ 0.26 | 1.56 $\pm$ 0.21 |                 |   |
| Rango                         | 0.74-1.59         | 0.43-0.93         | 4.64-9.60         | 1.49-3.96         | 1.29-1.83       | 1.30-1.74       |                 |   |
| n                             | 6                 | P<0.01<br>6       | 12                | P<0.001<br>11     | 5               | N.S.            |                 |   |

Los resultados que aquí se reportan para la dihidrotestosterona están de acuerdo con los reportados en la literatura (12) (18) y se caracterizaron por ser relativamente estables en suero femenino fases folicular y luteal. Los niveles de estas hormonas analizadas en suero de pacientes con posible hirsutismo, resultaron elevados en comparación con los normales. Los pocos casos femeninos donde se analizó la *variación diurna de los niveles esteroideos*, mostró fluctuaciones para androstendiona y 17-hidroxiprogesterona y prácticamente ninguna para testosterona y dihidrotestosterona, lo que está de acuerdo con Aedo et al. (13). (Tabla 6).

Los cuatro andrógenos respondieron a las pruebas de estímulo y supresión de la función adrenal. El estímulo se practicó mediante la administración de ACTH (1 mg en depósito a continuación de la toma basal) y posterior análisis de los esteroides mencionados (4 pm). La inhibición de la producción de esteroides se realizó mediante la aplicación de dexametasona (1 mg, 11 pm) y análisis posterior (7 am). No es posible realizar una discusión de los valores encontrados bajo estas pruebas pues el número de casos considerados fue reducido y porque solo después de establecer los contenidos en sujetos normales tratados en idénticas condiciones, será posible encontrar su significado.

Sin embargo, con este estudio se puede afirmar que el empleo de Lipidex como soporte cromatográfico, permite aislar y purificar cinco hormonas esteroideas de polaridad diversa y con una buena recuperación. El hecho de que las columnas de lipidex se pueden usar varias veces y por un término de 2 meses constituye una ventaja para el método.

El empleo de volúmenes pequeños de muestra y además el poder determinar simultáneamente hasta cinco hormonas con una buena precisión y reproducibilidad, son características que hacen de este método un instrumento muy útil en el estudio de problemas clínicos y fisiológicos que dependan de una o varias de estas hormonas.

## AGRADECIMIENTOS

Los resultados de esta investigación son parte del trabajo de Tesis de Magister Scientiae adelantado en el Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional y el Laboratorio de Hormonas del Hospital Militar Central. Fue financiado en parte por el Seminario Internacional de Química, Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia y la Unidad de Investigaciones en Reproducción Humana, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia.

TABLA 6

NIVELES DE ALGUNOS ESTEROIDES EN SUERO FEMENINO<sup>a)</sup> (ng/ml)

| Paciente | BASAL                                    |              |              | ESTIMULO (ACTH) |      |      | INIBICION (Dexametasona) |      |      |       |      |      |
|----------|--|--------------|--------------|-----------------|------|------|--------------------------|------|------|-------|------|------|
|          | A  | DHT          | T            | 17-P            | A    | DHT  | T                        | 17-P | A    | DHT   | T    | 17-P |
| M.A.     | 4.79 <sup>b)</sup><br>3.09 <sup>c)</sup> | 0.36<br>0.33 | 1.03<br>0.61 | 3.99<br>2.19    | 5.34 | 1.12 | 1.18                     | 3.56 | 0.65 | 0.17  | 0.71 | 0.93 |
| G.H.     | 2.43 <sup>b)</sup><br>2.14 <sup>c)</sup> | 0.34<br>0.28 | 0.50<br>0.49 | 2.58<br>2.05    |      |      |                          |      | 0.90 | 0.068 | 0.20 | 1.34 |
| S.E.     | 1.63 <sup>b)</sup>                       | 0.41         | 0.65         | 1.76            | 3.85 | 0.63 | 1.09                     | 5.79 | 2.99 | 0.43  | 0.69 | 1.27 |
| R.C.     | 6.4 <sup>b)</sup><br>5.89 <sup>c)</sup>  | 0.44<br>0.46 | 1.21<br>0.9  |                 |      |      |                          |      | 3.13 | 0.13  | 0.52 |      |
| M.C.     | 2.12 <sup>b)</sup>                       | 0.73         | 0.53         |                 |      |      |                          |      | 1.59 | 0.50  | 0.69 |      |
| Ro.C.    | 3.59 <sup>b)</sup>                       | 0.83         | 0.92         | 1.49            | 4.53 | 1.75 | 0.99                     | 2.39 | 2.69 | 0.60  | 0.63 | 1.12 |
| L.T.     | 2.34 <sup>b)</sup>                       | 0.85         | 0.76         | 2.03            |      |      |                          |      |      |       |      |      |

a) Suero femenino de pacientes con posible hirsutismo

b) Análisis practicados en muestras tomadas a las 7 am.

c) Análisis practicados en muestras tomadas a las 4 pm.

## BIBLIOGRAFIA

1. EKINS, R.P. et al., J. Steroid Biochem., **3**, 289 (1972).
2. CEKAN, S.Z., Acta Universitatis Upsaliensis, No. 14, 1-48, (1976).
3. CARR, B.R., G. MIKHAIL and G.L. FLICKINGER, J. Clin. Endocr., **33**, 358 (1971).
4. GOLDZIEHER, J.W., A. DE LA PENA y M.M. AIVALIOTIS, J. Steroid Biochem., **9**, 169 (1978).
5. BRENNER, P.F. et al., Steroids, **22**, 775 (1973).
6. CEKAN, S.Z. and M.S. de GOMEZ, Anal. Letters, **12** (B6), 589 (1979).
7. CEKAN, S.Z., J. Steroid Biochem., **11**, 135 (1979).
8. FINNEY, D.J., "Statistical Methods in Biological Assay", Griffin Ed. London, 1971.
9. CORKER, C.S. and D.W. DAVIDSON, J. Steroid Biochem, **9**, 373 (1978).
10. RAO, P.N. et al., J. Steroid Biochem., **9**, 539 (1978).
11. XING, S., S. ZHENG and S.Z. CEKAN, Clin. Chem., **27**, 600 (1981).
12. APTER, D. et al., Clin. Chem., **22**, 32 (1976).
13. AEDO, A.R., B.M. LANDGREN and E. DICZFALUSY, Contraception, **24**, No. 5, 543 (1981).
14. JANNE, O., D. APTER and R. VINKO, J. Steroid Biochem., **5**, 155 (1974).
15. SJOBERG, B. et al., J. Endocrinol. Invest., **2**, 131 (1979).
16. COYOTUPA, J.A. F. PARLOW and G.E. ABRAHAM, Anal. Letters **5**, 329 (1972).
17. DAWOOD, M.Y. and B.B. SAXENA, Amer. J. Obstet. Gynec., **126**, 430 (1976).
18. HAMMOND, G.L. et al., J. Clin. Endocr. Metab., **45**, 16 (1977).



**XVII CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA  
VI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA**



**Octubre 12 al 19 de 1986**

**Hotel Tequendama  
Bogotá, Colombia**



**Un compromiso de las ciencias químicas colombianas para la  
cooperación e integración Latinoamericana**

**Información:**

Comité Organizador Apartado Aéreo 2395 Bogotá, Colombia  
Presidente Dagoberto Cáceres Rojas  
Secretario Científico Luis Eduardo Henao  
Secretaria General Flor Marina Poveda



Sociedad Colombiana de Químicos e Ingenieros Químicos  
Apartado Aéreo 10968 Bogotá, Colombia S.A.



Asociación Química Colombiana (ASQUIMCO)  
Apartado Aéreo 18010 Bogota, Colombia S. A.



Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Departamento de Química  
Ciudad Universitaria Bogotá, Colombia S. A.



