

Cátedra de Fisiología  
Facultad de Medicina, Universidad de Valencia  
(Prof. J. Viña)

## Un método para la determinación de Dehidroisoandrosterona

por

J. Calderón

---

(Recibido para publicar el 9 de mayo de 1969)

La verdadera significación fisiológica de la dehidroisoandrosterona (3-beta-hidroxandrostano-5-eno-17-ona), permanece aún desconocida; no obstante, en los últimos años parece vislumbrarse una función reguladora de este esteroide en el metabolismo glucídico de los mamíferos. MARKS y BANKS (10), por una parte, y MCKERNS y KALEITA (11), por otra, demuestran casi simultáneamente la inhibición del enzima glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa por la dehidroisoandrosterona; posteriormente, y como consecuencia de la inhibición señalada anteriormente, TSUSUI y col. (19) demuestran que la dehidroisoandrosterona afecta, aumentando la oxidación del carbón 1 de la glucosa o glucosa-6-fosfato y estimulando la formación del trifosfopiridin nucleótido reducido, en un homogenato de glándulas adrenales.

El objeto de este trabajo es dar a conocer un método de valoración de dehidroisoandrosterona en orina que ofrece ventajas de mayor especificidad, sensibilidad y sencillez sobre los ya existentes; además, es aplicable perfectamente a la rutina de la clínica endocrinológica y al

estudio de las posibles variaciones de la eliminación del esteroide en determinados trastornos del metabolismo glucídico.

De los numerosos métodos aparecidos hasta el momento actual para valorar la dehidroisoandrosterona en orina, los más primitivos, fundados bien en la reacción de ZIMMERMANN (19) con el m-dinitrobenzeno como el de TALBOT y col. (15), el de DOBRINER (5), el de FRAME (7), o bien en la reacción de Pettenkofer como el de MUNSON y col. (12), el de PRUNTY (14), son completamente inespecíficos, ya que ningún aislamiento del esteroide ha tenido lugar por cromatografía y además la reacción de color es inespecífica. Además, todos estos métodos utilizan la hidrólisis ácida a elevadas temperaturas, lo cual implica la formación de artefactos a expensas del esteroide. Posteriormente aparecen ya algunos métodos, entre los que destaca el de DINGEMANSE (4), que utiliza la cromatografía en columna de alúmina para el aislamiento del esteroide, pero sigue utilizando la hidrólisis ácida a elevadas temperaturas con los grandes inconvenientes que ésta presenta; este método tiene ade-

más el gran inconveniente de ser demasiado largo y tedioso para su aplicación a la rutina de la clínica diaria.

TALBOT (17) da a conocer que los sulfatos de los Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides son más hábiles que los sulfatos de otros esteroides y, por consiguiente, más fácilmente hidrolizables; BITMAN y COHEN (12) demuestran que al calentar a reflujo durante cuatro horas una solución taponada a pH 4,7 de varios sulfatos de esteroides, únicamente se hidroliza el sulfato de dehidroisoandrosterona, siendo la recuperación del 89%; ROY (15) demuestra que únicamente los sulfatos de los Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides son hidrolizados específicamente al calentar sus disoluciones a pH neutro; JAYLE y col. (3, 8, 9) dan a conocer que toda la dehidroisoandrosterona de la orina está bajo la forma sulfonconjugada. Todas estas comunicaciones han cristalizado con unos métodos específicos de hidrólisis para la dehidroisoandrosterona y demás Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides y que constituyen el punto de partida de unos métodos que, como el de FOTHERBY (6) y el método objeto de esta comunicación, ofrecen grandes ventajas de especificidad sobre los métodos anteriores.

La mayor ventaja del método objeto de esta comunicación radica en las ventajas de la reacción de color de OERTEL y EIKNES (13), reacción que es específica de los esteroides que poseen el agrupamiento Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides. Además de la especificidad, esta reacción de color nos ofrece las ventajas de su sencillez, rapidez y sobre todo su gran sensibilidad, ya que cantidades tan pequeñas como 0,5 gammas son fácilmente medidas.

### Material y métodos

**MATERIAL.** Benceno Probus redestilado. Alcohol absoluto Merck redestilado previa ebullición a reflujo con OHK. Acido sulfúrico Merck P. A. Bicarbona-

to Sódico Merck P. A. Hidróxido sódico Merck P. A. Tampón de Acetato 2M. pH 4,7, comprobado potenciométricamente previa dilución al 1/20. Dehidroisoandrosterona procedente de Mann Research Laboratories. Alúmina neutra de actividad uno (M. Woelm Eschwege), desactivada hasta una actividad comprendida entre los grados cuarto y quinto de la escala de Brockman. La actividad de la alúmina ha sido contrastada, haciendo pasar a su través 10 gammas de dehidroisoandrosterona en las mismas condiciones experimentales y de elución que luego se indicarán. Las columnas utilizadas en la cromatografía fueron de un diámetro tal, que la altura alcanzada en la columna por los 2 g de alúmina es de 2,8 cm.

**METÓDICA.** 30 ml de la diuresis total de 24 horas, recogida sin conservatorio alguno, es llevada con potenciómetro a pH 4,7 mediante ácido acético y se añade 0,1 volumen del tampón de acetato 2 M. La mezcla se hidroliza por calentamiento a reflujo durante cuatro horas en un B.M. hirviente. Se diluyen 10 ml de la orina hidrolizada con otros 10 ml de agua destilada y la mezcla se extrae con 70 ml de benceno en un embudo de decantación. Se despreja la fase acuosa y el extracto bencénico se lava con 25 ml de una disolución de hidróxido sódico al 10 %, despreciando siempre la fase acuosa; el extracto bencénico se lava seguidamente con 25 ml de agua, con 10 ml de una disolución de bicarbonato sódico al 8 % y por último con 30 ml de agua. Se seca el extracto bencénico con sulfato sódico anhidro y se evapora hasta unos 10 ml, aproximadamente, en un B.M. a ebullición. Estos 10 ml a que ha quedado reducido el extracto bencénico se pasan a través de una columna de 2 g de alúmina de la actividad adecuada y preparada con benceno. La dehidroisoandrosterona es eluida con 20 ml de una disolución de etanol en benceno al 0,5 % (v/v), que se hace pasar a través de la columna una vez que ha

pasado la última gota del extracto bencénico. El eluato se evapora a sequedad en un B.M. a ebullición y sobre el residuo se efectúa la reacción de color de OERTEL y EIK-NES (13) utilizando 3 ml del reactivo de color.

### Resultados

**HIDRÓLISIS.** En 44 muestras de orinas diferentes se han estudiado las ventajas e inconvenientes de los dos métodos de hidrólisis específicos de los Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides más corrientemente utilizados; el de BITMAN y COHEN (1, 2) (reflujo durante cuatro horas de la orina tamponada a pH 4,7 con 0,1 volumen del

tampón de acetato 2 M), tal como se utiliza en el método de JAYLE y col. (13) y el de FOTHERBY (6), fundado en los trabajos de ROY (15) (reflujo durante seis horas de la orina llevada a pH 7).

Los resultados pueden verse en la tabla I. Las orinas 1-23 son de una misma mujer, recogidas en días alternos a lo largo de casi dos ciclos menstruales (los resultados sobre la variación de dehidroisoandrosterona a lo largo del ciclo menstrual obtenidos en este y otros muchos casos serán publicados en otra parte). Las orinas 24-44 son de otra mujer recogidas también en días alternos. Se eligen estos dos casos por ser bastante considerable la diferencia existente entre los valores de dehidroisoandrosterona eliminados por

TABLA I

Valores de DHA en mg/orina de 24 horas obtenidos con los dos métodos de hidrólisis descritos en Material y Métodos

| Orina<br>N.º | A<br>mgr. DHA/24 horas |                    | Orina<br>N.º | B<br>mgr. DHA/24 horas |                    |
|--------------|------------------------|--------------------|--------------|------------------------|--------------------|
|              | Hidrólisis<br>pH 4,7   | Hidrólisis<br>pH 7 |              | Hidrólisis<br>pH 4,7   | Hidrólisis<br>pH 7 |
| 1            | 0,385                  | 0,436              | 24           | 1,408                  | 1,627              |
| 2            | 0,516                  | 0,561              | 25           | 2,338                  | 2,975              |
| 3            | 1,023                  | 0,978              | 26           | 1,831                  | 2,228              |
| 4            | 0,708                  | 0,675              | 27           | 2,676                  | 2,488              |
| 5            | 0,493                  | 0,543              | 28           | 1,849                  | 1,800              |
| 6            | 0,577                  | 0,459              | 29           | 2,400                  | 2,385              |
| 7            | 0,441                  | 0,435              | 30           | 1,620                  | 1,379              |
| 8            | 0,552                  | 0,612              | 31           | 2,244                  | 2,712              |
| 9            | 0,850                  | 0,761              | 32           | 3,491                  | 3,116              |
| 10           | 0,554                  | 0,425              | 33           | 3,074                  | 2,836              |
| 11           | 0,530                  | 0,526              | 34           | 3,259                  | 3,256              |
| 12           | 0,809                  | 0,664              | 35           | 2,334                  | 2,089              |
| 13           | 0,604                  | 0,547              | 36           | 2,895                  | 2,515              |
| 14           | 0,660                  | 0,660              | 37           | 2,620                  | 2,621              |
| 15           | 0,643                  | 0,572              | 38           | 2,414                  | 2,699              |
| 16           | 0,545                  | 0,700              | 39           | 2,595                  | 2,564              |
| 17           | 0,816                  | 0,725              | 40           | 3,030                  | 3,140              |
| 18           | 0,695                  | 0,665              | 41           | 2,835                  | 2,635              |
| 19           | 0,553                  | 0,496              | 42           | 2,830                  | 2,731              |
| 20           | 0,770                  | 0,725              | 43           | 1,960                  | 1,925              |
| 21           | 0,693                  | 0,627              | 44           | 5,135                  | 5,133              |
| 22           | 1,131                  | 1,152              |              |                        |                    |
| 23           | 0,361                  | 0,33               |              |                        |                    |

TABLA II

Estudio del porcentaje de recuperación de DHA en las condiciones cromatográficas del Método

| Gamas DHA cromatografiadas | N.º determinaciones | Porcentaje de recuperación |
|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| 5                          | 5                   | 94,6 $\pm$ 2,7             |
| 10                         | 5                   | 95,8 $\pm$ 2,4             |
| 20                         | 5                   | 97,3 $\pm$ 3,1             |
| 25                         | 5                   | 97,9 $\pm$ 2,8             |

cromatográfico, se ha pasado a través de la columna y en idénticas condiciones experimentales a las señaladas en el método, cantidades variables de dehidroisoandrosterona comprendidas entre 5 y 25 gammas. La recuperación puede verse en la tabla II. La recuperación media obtenida ha sido del 96,4 % más menos 2,75 %.

TABLA III

Diferencias obtenidas en treinta y cuatro muestras de orina diferentes al hacer las determinaciones por duplicado

| Orina N.º | mg. DHA/24 horas |        |
|-----------|------------------|--------|
|           | A                | B      |
| 1         | 1,692            | 1,494  |
| 2         | 0,083            | 0,098  |
| 3         | 3,740            | 3,213  |
| 4         | 0,232            | 0,209  |
| 5         | 1,993            | 2,172  |
| 6         | 1,031            | 1,039  |
| 7         | 0,000            | 0,000  |
| 8         | 0,055            | 0,063  |
| 9         | 0,270            | 0,288  |
| 10        | 0,020            | 0,021  |
| 11        | 3,084            | 3,223  |
| 12        | 0,092            | 0,079  |
| 13        | 0,395            | 0,352  |
| 14        | 1,105            | 0,985  |
| 15        | 0,190            | 0,183  |
| 16        | 0,026            | 0,026  |
| 17        | 0,262            | 0,371  |
| 18        | 1,148            | 1,043  |
| 19        | 0,135            | 0,133  |
| 20        | 0,391            | 0,470  |
| 21        | 0,000            | 0,000  |
| 22        | 2,842            | 2,787  |
| 23        | 5,896            | 5,998  |
| 24        | 0,952            | 1,258  |
| 25        | 2,090            | 2,147  |
| 26        | 1,675            | 1,662  |
| 27        | 3,014            | 3,174  |
| 28        | 2,110            | 2,315  |
| 29        | 0,266            | 0,246  |
| 30        | 0,000            | 0,000  |
| 31        | 0,320            | 0,340  |
| 32        | 5,676            | 5,581  |
| 33        | 24,990           | 25,870 |
| 34        | 0,126            | 0,124  |

una y otra mujer. Como puede verse (tabla I), los valores de dehidroisoandrosterona obtenidos por uno u otro tipo de hidrólisis es prácticamente insignificante y en un porcentaje muy considerable (más del 50 %) las diferencias son nulas. El factor de significación para la columna A es 0,43 y para la columna B, 0,04. Estos son los motivos de haber aceptado la hidrólisis de BITMAN y COHEN; se acorta la hidrólisis en dos horas, lo cual no es despreciable.

**EXTRACCIÓN.** Se ha notado alguna mejora en el sentido de arrastrar menos pigmentos con la sola dilución de la orina a partes iguales con agua antes de comenzar la extracción con benceno. Se parte de 10 ml de orina; la mayor parte de las veces esta cantidad de orina es suficiente, teniendo en cuenta la sensibilidad de la reacción de color utilizada; si se sospechan orinas muy concentradas en la hormona, menor cantidad de orina puede ser utilizada, pero siempre aconsejamos completar con agua hasta los 20 ml.

Los lavados del extracto bencénico con sosa y bicarbonato sódico mejoran la extracción, por contribuir a eliminar algunos pigmentos urinarios.

**CROMATOGRAFÍA.** Con el fin de ver las pérdidas de dehidroisoandrosterona en la columna de alúmina durante el desarrollo

**COLORIMETRÍA.** Se utiliza para la colorimetría 3 ml del reactivo de color de OERTEL y EIK-NES (13), inmediatamente se desarrolla un color amarillo, el cual es estable durante dos horas y presenta un máximo de absorción a 400 m $\mu$ . Se efectúa la lectura en un espectrofotómetro Beckman B a 375, 400 y 425 m $\mu$  y se aplica la fórmula de corrección de Allen. Los resultados más reales se obtienen al compensar en los diferentes puntos de la curva de calibración el efecto que sobre el

duplicado. Tal como puede verse en la tabla III, en 34 muestras de orina de personas diferentes se ha efectuado por duplicado la determinación de dehidroisoandrosterona. El factor de significación es 0,028 (mg 24 horas).

**ESPECIFICIDAD.** El método es específico de la dehidroisoandrosterona por ser específica la reacción de color, la hidrólisis y por el aislamiento cromatográfico de la hormona. Como ya vimos, el principio del

TABLA IV

Valores normales de DHA en mg/orina de 24 horas en varones de diferentes edades

| Años  | Casos | DHA mgr./24 horas |            | 17-CO mgr./24 horas | DHA/17-CO<br>%<br>valor medio |
|-------|-------|-------------------|------------|---------------------|-------------------------------|
|       |       | media             | extremos   | valor medio         |                               |
| 10-14 | 5     | 0,174             | 0,02-0,350 | 3,732               | 5,7                           |
| 15-25 | 24    | 2,322             | 0,38-5,11  | 12,312              | 17,8                          |
| 26-45 | 7     | 2,090             | 0,27-3,30  | 11,762              | 15,01                         |
| 46-55 | 4     | 0,749             | 0,37-1,10  | 9,451               | 9,01                          |

desarrollo de color ejercen las pequeñísimas impurezas de los solventes utilizados en el desarrollo cromatográfico.

**SENSIBILIDAD.** La sensibilidad del método se basa en la gran sensibilidad de la reacción de color de OERTEL y EIK-NES (13) que permite la determinación con exactitud de cantidades inferiores a una gamma de cualquier Delta-5,3-beta-hidroxiesteroide. En las condiciones experimentales del método, con frecuencia se han determinado cantidades del orden de 0,5 gammas de dehidroisoandrosterona en los 10 ml de orina utilizada, lo que permite valorar cantidades inferiores a las 100 gammas de la hormona en muestras de orina de 24 horas con una diuresis de 1.500 ml/24 horas.

**PRECISIÓN.** La precisión del método se juzga por las diferencias entre los resultados en una serie de determinaciones por

trabajo de hidrólisis suave de BITMAN y COHEN (1, 2) es específica de los Delta-5, 3-beta-hidroxiesteroides. Sin variar las condiciones experimentales del método, se quiso ver si la hidrólisis enzimática ofrecía algunas ventajas sobre la hidrólisis de BITMAN y COHEN, observando que la hidrólisis con sulfatasas y Beta-glucuronidasa era completamente inadecuada por su gran falta de especificidad. El aislamiento cromatográfico de la hormona en las condiciones del método es correcto y específico siempre que la hidrólisis sea específica. Otros Delta-5,3-beta-hidroxiesteroides, como pregnenolona o 17-hidroxipregnenolona, rara vez se encuentran en la orina y en el caso de estar presentes, sus polaridades son tan dispares de la polaridad de la dehidroisoandrosterona que no pueden eluirse conjuntamente en las condiciones cromatográficas del presente método.

El pico de absorción máximo a 400 m $\mu$  es específico de la dehidroisoandrosterona

TABLA V

Valores normales de DHA en mg/orina de 24 horas en mujeres de diferentes edades

| Años  | Casos | DHA mgr./24 horas |           | 17-CO mg/24 horas | DHA/17-CO<br>% |
|-------|-------|-------------------|-----------|-------------------|----------------|
|       |       | media             | extremos  | valor medio       | valor medio    |
| 10-14 | 5     | 0,077             | 0,02-0,21 | 3,263             | 2,1            |
| 15-25 | 13    | 1,831             | 0,35-4,24 | 9,634             | 19,2           |
| 26-45 | 10    | 1,344             | 0,18-2,17 | 8,405             | 13,8           |
| 46-60 | 7     | 0,675             | 0,00-1,18 | 6,203             | 8,8            |

en la reacción de OERTEL y EIK-NES (13), los restantes Delta-5,3-beta-hidroxiesteroi-des presentan el pico a 405  $m\mu$  y compuestos tan íntimamente relacionados con la dehidroisoandrosterona como Androstano-3-alfa-ol-17-ona; Androstano-3-beta-ol-17-ona; Etiocolano-3-alfa-ol-17-ona; Delta-4-Androsteno-3,17-diona; Delta-4-Androsteno-17-beta-ol-3-ona; Pregnano-3-alfa,20-alfa-di-ol; Delta-4-pregnano-21-ol-3,20-diona; Delta-4-pregnano-11-beta-21-diol-3,20-diona; Delta-4-pregnano-11-beta,17-alfa,21-triol-3,20-diona; Allopregnano-3-beta-11-beta,17-alfa,21-tetrol-20-diona y Delta-4-pregneno-3,20-diona no presentan ningún pico de absorción entre las 380 y 430  $m\mu$ .

**EXACTITUD.** Se determina la exactitud del método por el grado de recuperación logrado a partir del sulfato de potasio de dehidroisoandrosterona añadido a 20 ml de agua y seguidas todas las etapas del método, obteniendo una recuperación media del 89,75 % en pruebas repetidas y con cantidades variables de dehidroisoandrosterona comprendidas entre 2 y 10 gammas.

**VALORES NORMALES. Hombres.** Los valores de dehidroisoandrosterona encontrados en cuarenta hombres normales (10 a 55 años de edad) pueden verse en la tabla IV. Se comprueba fácilmente que los valores de DHA aumentan progresivamente hasta los 30-35 años, para después

disminuir a medida que aumenta la edad. Igualmente ocurre con el porcentaje de DHA a 17-CO totales.

**Mujeres.** Las cifras de dehidroisoandrosterona encontradas en treinta y cinco mujeres normales (10 a 60 años) presentan las mismas variaciones que las observadas en los hombres, con relación a la edad (tabla V).

### Discusión

Se da a conocer un método sencillo, exacto, sensible y específico para la determinación cuantitativa de dehidroisoandrosterona en orina. Una persona adecuadamente adiestrada puede efectuar unas diez determinaciones, aproximadamente, en una jornada de trabajo completa.

Llama la atención las grandes diferencias existentes en la eliminación de dehidroisoandrosterona en las personas normales (de cero a más de cinco mil gammas), así como la diferencia existente en el porcentaje de DHA a 17-CO totales (de 1 % a más de 40 %). Es muy posible que estas diferencias tengan alguna significación fisiológica de determinado alcance.

### Resumen

Se da a conocer un método sencillo, sensible y específico para la determinación cuantitativa de dehidroisoandrosterona en orina. Damos a conocer los valores de dehidroisoandrosterona

encontrados con el método en cuarenta hombres normales y treinta y cinco mujeres normales, llamando la atención las grandes diferencias existentes; los valores medios obtenidos coinciden con los dados por otros autores.

### Summary

#### Method for the Determination of Dehydroisoandrosterone

A simple, sensitive, and specific method for the quantitative determination of dehydroisoandrosterone is presented. Dehydroisoandrosterone was evaluated by this method in normal humans, forty males and thirty five females. The differences between the two groups were highly significant, and the average values obtained were comparable to those reported by other investigators.

*Agradecimiento.* Expreso mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. D. J. VIÑA por su gran interés y dirección en este trabajo. También quiero expresar mi agradecimiento a las señoras Rosa-María Arrufat y Carmen Lidón Fonfria por su asistencia técnica, y a cuantas personas han contribuido a la realización de este trabajo.

### Bibliografía

1. BITMAN, J. y COHEN, S. L.: *J. Biol. Chem.*, **179**, 455, 1949.
2. BITMAN, J. y COHEN, S. L.: *J. Biol. Chem.*, **191**, 351, 1951.
3. CREPY, O., MALASSIS, D., MESLIN, F.: *Acta Endocrinol.*, **26**, 43, 1957.
4. DINGEMANSE, E., HUIS IN'T VELD, L. G., HARTOGH-KATZ, S. L.: *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **12**, 66, 1952.
5. DOBRINER, K.: *J. Clin. Invest.*, **32**, 940, 1953.
6. FOTHERBY, K.: *Biochem. J.*, **73**, 339, 1959.
7. FRAME, E. G.: *Endocrinol.*, **34**, 175, 1944.
8. JAYLE, M. F., HUIS IN'T VELD, L. G. BAULIEU, E. E., CREPY, O.: *Acta Endocrinol.*, **21**, 447, 1957.
9. MALASSIS, D., BAULIEU, E. E., WEINMANN, S. H., CREPY, O., JAYLE, M. F.: *Soc. Biol.*, **151**, 447, 1957.
10. MARKS, P. A., BANKS, J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **46**, 447, 1960.
11. MCKERNES, K. W., KALEITA: *Biochem Biophys. Res. Comm.*, **2**, 344, 1960.
12. MUNSON, P. L., JONES, M. E., MCCALL, P. J., GALLAGHER, T. F.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 73, 1948.
13. OERTEL, G. W., y EIK-NES, K. B.: *Analyt. Chem.*, **31**, 98, 1959.
14. PRUNTY, F. T. G.: *J. Endocrin.*, **9**, 244, 1953.
15. ROY, A. B.: *Biochem. J.*, **62**, 41, 1956.
16. TALBOT, N. B., BUTLER, A. M., MACLACHLAN, E. A.: *J. Biol. Chem.*, **136**, 365, 1940.
17. TALBOT, N. B., RYAN, J., WOLFE, J. K.: *J. Biol. Chem.*, **148**, 593, 1943.
18. TSUTSUI, E. A., MARKS, P. A. y REICH, P.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 3009, 1962.
19. ZIMMERMANN, W.: *Z. Physiol. Chem.*, **233**, 257, 1935.

