

277016

PATENTE DE INTRODUCCION

277016



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la determinación del estado normal genital postovulativo en la mujer, así como medio para la realización del procedimiento!"

Solicitante: F A I A G A.G., entidad suiza, residente en Segantinstrasse 70, ZURICH 49, Suiza.

5. La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación del PGN (estado normal genital postovulativo) en la mujer, así como medio para la realización del procedimiento. El procedimiento se caracteriza esencialmente por la determinación de la altura del nivel de progesterona en forma tal, que por lo menos un producto de desintegración de progesterona, aislado de la úrea, se hace reaccionar con una substancia que con moléculas esteroideas o glucuronuras da una



- reacción tintorea, el producto de reacción se disuelve y su color se enmascara en tal medida que solo permita la determinación de un nivel de hormona tal que se encuentre sobre un valor límite de por lo menos 0,0015 mg. de progesterona fisiológicamente equivalente por cm³ de sangre o por encima de un mínimo de 2,5 mg. de glucuronuro de pregnandiol equivalente por día en la úrea. Los medios para la realización del procedimiento consisten principalmente en que estos muestran en una cantidad total de menos de 20 cm³ los siguientes materiales en un paquete dosificado, listo para el empleo:
5. 1. Una mezcla de dos disolventes con distinta capacidad disolvente para el producto de desintegración de progesterona a extraer.
 10. 2. Una combinación de un medio de absorción con un medio precipitador.
 15. 3. Una solución de substancia productora de color.
 20. 4. Una solución de un colorante de color complementario a la substancia productora de color.

Las ulteriores características de la invención se desprenden de las reivindicaciones y de la descripción.

- Como criterio para la determinación del PGN en la mujer se consideraba hasta ahora el plazo de la ovulación. Por lo tanto, todos los métodos hasta ahora conocidos para la determinación del PGN están dirigidos a una determinación, lo más exacta posible de la ovulación como tal. Según los últimos conocimientos del inventor, sin embargo, la ovulación no tiene importancia
- 25.



con relación al PGN, ya que la esterilidad biológica de la mujer, que sigue por lo general a una ovulación, no es consecuencia de tal ovulación, sino del Corpus luteum que se forma en el folículo de Graaf reventado. Por esta

5. razón, según la presente invención no se determina en la determinación del PGN la ovulación sino la capacidad funcional del Corpus luteum.

El cuerpo amarillo produce, como es sabido, progesterona que, en el transcurso del ciclo mensual de

10. la mujer, ejerce las siguientes funciones importantes: 1ª refrena la ulterior maduración del huevo sobre los ovarios, 2ª paraliza la musculatura de la matriz como protección para 3ª el endometrio "proliferante" y que, bajo su influencia, se transforma en el estado secretórico

15. y 4ª aumenta como ulterior función protectora para el endometrio la viscosidad del tapón de mucosidad cervical en la cervix. Estas cuatro funciones genitales sin embargo solo están garantizadas cuando la producción de progesterona del cuerpo amarillo alcanza una medida

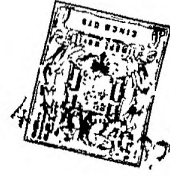
20. suficientemente elevada.

En una producción de progesterona insuficiente, respectivamente en un Corpus luteum no totalmente funcio-

25. nando (lo que puede ser el caso con y sin influencias externas, tales como por ejemplo curas, cambios de clima, enfermedad, etc.) no siempre está garantizado, como primero, la restricción de la maduración del huevo sobre los ovarios. Se forma entonces, dentro de los siguientes 8-10 días, un segundo folículo maduro para reventar en el mismo ciclo de menstruación, que revienta directamente



- antes de la hemorragia mensual generalmente siguiente con el retroceso normal de la cantidad de progesterona, en sí ya deficiente. Se presenta entonces una ovulación secundaria premenstrual que en el período así llamado
5. "esteril" puede conducir a la fructificación del huevo. El segundo cuerpo amarillo que se forma en la ovulación secundaria, evita la presentación de la menstruación acostumbrada en este momento y la desplaza hasta su degeneración en 12 - 14 días. Naturalmente se puede presentar
10. la ovulación secundaria premenstrual también con un Corpus luteum totalmente apto en su funcionamiento, es decir, en el estado genital postovulativo normal; una fructificación del huevo no es entonces posible, ya que, con suficiente producción de progesterona, la mucosa
15. de la matriz se encuentra en estado prolífero y la mucosa cervical en viscosidad incrementada, de manera que estas dos barreras naturales evitan la entrada de los espermatozoes y el paso a través de la matriz y por lo tanto la subida hasta los ovarios.
20. Estas relaciones se comprobaron mediante verificaciones experimentales en más de 758 ciclos de menstruación. En 8 - 10 casos se presentaron ovulaciones secundarias premenstruales con insuficiente actividad del cuerpo amarillo así como otras ovulaciones secundarias
25. con suficiente actividad del cuerpo amarillo. De las primeras condujeron probablemente dos y con seguridad una ovulación secundaria al embarazo, mientras que la segunda clase de ovulaciones secundarias quedaron todas ellas sin consecuencias.



- El producto de desintegración más importante de la progesterona es el complejo de pregnandiól segregado en la orina que en la forma de ácido glucurónico contiene principalmente pregnandiól y aproximadamente 25% de la oxiketona pregnanolon. En las comprobaciones arriba mencionadas se demostró que, al existir un cuerpo amarillo funcionalmente apto, el contenido mínimo o valor límite segregado en la orina asciende en caso extremo a 2,5 y en el caso medio a 3,5 mg. de glucuronuro de pregnandiól por día. Por debajo de este valor nominal se presentan ovulaciones secundarias aptas para la fructificación, ya que entonces la proliferación simultánea de la mucosa de la matriz así como el aumento de la viscosidad de la mucosa cervical son insuficientes y no pueden actuar como barreras, mientras que las ovulaciones secundarias, por encima de este valor límite, ya no son capaces de la fructificación.

- La proporción de transformación progesterona/pregnandiól, en por ejemplo la administración intramuscular de progesterona, se encuentra entre 8 - 22%. Para el caso fisiológico se ha de contar, sin embargo, por razones evidentes, más bien con el valor superior, es decir, con una segregación de aproximadamente 20% de progesterona en forma de pregnandiól en la orina. Bajo la suposición de un ciclo de desintegración de 24 horas de progesterona en pregnandiól (esto aparece por lo general ya 24 horas después de la ovulación en la orina) y un peso del cuerpo de 60 kg. correspondiente a 8,2 l. de volumen de sangre, se obtiene un valor



límite para la progesterona de mínimo 0,0015 mg/cm³ y en promedio de 0,0021 mg/cm³ de sangre, lo que corresponde a 8,5 respectivamente 3,5 mg. de glucuronuro de pregnandi-
5. se encuentra en 8 - 9 mg/día para el glucuronuro de pregnandi-
10. ol, lo que es equivalente a un contenido de progesterona de 0,005 mg/cm³ de sangre.

Al observar estos valores límite no solo se puede demostrar la capacidad funcional del cuerpo
10. amarillo, sino que simultáneamente también se "puentean" las reducidas cantidades de progesterona, respectivamente
15. pregnandi-
20. ol, que provienen del metabolismo de las cortezas de las cápsulas suprarrenales (transformación de la desoxicorticosterona en progesterona) así como las cantidades eventualmente producidas ya preovulativamente en el folículo sin reventar. Los procedimientos conocidos, bien sean para la determinación de la progesterona o del pregnandi-
25. ol, así como los demás procedimientos para la determinación de otros productos de desintegración de la progesterona, se pueden proveer con límites de sensibilidad que son equivalentes a los valores límite arriba mencionados. Con ello resultan tales procedimientos para la determinación de la materia, puramente cuantitativos, automáticamente procedimientos cualitativos para
30. la determinación del PGN, siempre que el tiempo para su realización no sea demasiado largo para obtenerse los resultados aún a tiempo. La introducción de un valor límite de esta índole, en cualquier procedimiento conocido, se puede lograr por ejemplo suprimiendo simplemente la visibilidad de una reacción tintórea hasta el límite



- 7 - 277016

- prescrito. Esto se puede lograr bien recibiendo, mediante reacción estequiométrica limitada, solo tanto material rector en la reacción tintórea que ésta solo responda al valor límite debido a su propio límite de sensibilidad
5. (por ejemplo empleando malos disolventes para que solo una parte de material de reacción se disuelva) , o restringiendo la reacción tintórea misma mediante aditivos de efecto químico o físico. Tales aditivos pueden ser materiales oxidantes o reductores (blanqueadores) y
10. también formadores de complejos, que enmascaren la correspondiente parte de color, o también medios de absorción o precipitadores, que absorban o precipiten la parte del valor límite, o colores complementarios que compensen la parte del valor límite.
15. Los procedimientos conocidos hoy día para la determinación de progesterona en la sangre, respectivamente sus productos de desintegración y especialmente pregnandiol en la úrea, son prácticamente inadecuados para la determinación del PGN y solo sirven para finalida-
20. des de diagnósticos clínicos. Por lo general son poco prácticos, exigen aparatos costosos y un personal altamente cualificado. Además, todos ellos suministran los resultados con gran retraso.
25. El procedimiento según la presente invención evita estas desventajas. Como la demostración del PGN no exige ninguna determinación cuantitativa de hormonas, sino solo la determinación de un nivel de hormonas mínimo en forma semicualitativa, se ha desarrollado un procedimiento sencillo de rápida ejecución.



La ejecución del procedimiento según la presente invención se describe meramente como ejemplo, a continuación, en una ejecución preferente para el complejo de pregnandiol-pregnandolon:

5. La orina matinal que se produce después de un sueño de 8 - 10 horas, y cuya cantidad rara vez supera los 700 cm³, se gradua en caso necesario con agua a 700 cm³ y se satura con sal común. El complejo de pregnandiol se aísla de la orina mediante extracción, lo
10. que se efectúa en las siguientes dos etapas de trabajo en un aparato simple y convenientemente disponible.
 1. Los 700 cm³ de úrea saturados con sal común se dejan fluir a través de una tobera fina (Máx. 0,6 mm. diámetro; caudal max. 22 cm³/min) en chorro de
 15. caída libre desde unos 4 cm. de altura en una capa de disolvente (diámetro de la capa ventajosamente no superior a 11 mm. longitud unos 20 cm.), que se compone de dos componentes de distinta capacidad de solución para el complejo de pregnandiol, es decir de 9 cm³ de
 20. una mezcla de alcohol butílico y alcohol amílico en proporción volumétrica de 2:1 (el complejo de pregnandiol se disuelve mal en el alcohol amílico; mediante correspondiente proporción de mezcla se puede alojar una cantidad del valor límite ya en la extracción).
 25. 2. El extracto obtenido se limpia, en igual forma que la extracción, mediante lavado, y esto mediante una mezcla de 40 cm³ de agua, 5 cm³ de éter y alcohol butílico en proporción volumétrica de 5:1 y 0,05 g. de amoniaco. Lavando a continuación con



35-40 cm³ de solución de sal común saturada se retira el amoníaco restante y el extracto se deshidrata.

3. Para la precipitación del glucuronuro de pregnandiol del extracto lavado se agita éste en un
5. recipiente seco con 0,3 g. de silicagel de un granulado de 0,2 - 1,0 mm., que se impregnó con aproximadamente 25 mg. de acetato de bario. El glucuronuro de pregnandiol es absorbido por el silicagel y casi simultáneamente precipitado por el acetato de bario existente en forma
10. de sal de bario y expulsado de nuevo como suspensión a la fase acuosa. Trasvasando el líquido a un segundo recipiente se separa la suspensión fina del silicagel de granulado más grueso. (Segun el grado de impregnación del silicagel con acetato de bario se obtiene una pre-
15. cipitación más o menos fuerte; de esta manera se puede regular el valor límite en otra etapa).
4. Después de haberse sedimentado la suspensión fina de bario-glucuronuro de pregnandiol y retirar el líquido superpuesto, se le agregan al pregnandiol precipitado 2,5 cm³ de ácido clorhídrico diluidos con
20. agua en proporción 3 : 2 y 0,5 cm³ de una solución alcohólica de 2-3 mg. de naftoresorcina. Para aumentar la duración del alcohol se puede ventilar el alcohol mediante ebullición y, contra la recepción de oxígeno del aire, y saturar con CO₂ y agregar hidroquinona, etc.
25. La mezcla de reacción se calienta durante 1 hora hasta hervir para realizar la reacción tintórea.
5. Después de enfriar se agita la solución de reacción con 1,5 cm³ de benzol que contiene 0,012 mg.



de anilina verde-graso (CIBA). El colorante rojo-violeta extraído del benzol se compensa por el verde anilina como color complementario hasta el valor límite.

- El teñido rojo-violeta de la solución es la
5. indicación del PGN. Si la solución se mantiene verde, incolora o amarilla hasta amarronada, entonces, o bien no existe, o solo hay una actividad del cuerpo amarillo insuficiente y, por lo tanto, el PGN no está aún presente. En este caso se repite el análisis 2-3 días más tarde
 10. hasta que aparezca el teñido rojo-violeta. Normalmente el procedimiento se realizará solo 1-2 veces al mes, cayendo el primer análisis, por ejemplo en un ciclo de 28-30 días, sobre el día 17º - 18º del ciclo. El tiempo de trabajo propiamente dicho para efectuar
 15. la determinación dura solo aproximadamente 15 minutos y todo el tiempo de realización como máximo algunas horas (en comparación con algunas horas de trabajo y algunos días de duración de la ejecución en los procedimientos conocidos para la determinación del pregnandiol).
 20. Para realizar rápidamente y con seguridad el procedimiento según la presente invención por legos, se pueden preparar los medios, es decir, los productos químicos disolventes, reactores, colorantes, etc. necesarios, en forma de paquetes dosificados listos para el
 25. servicio de una determinación. Estos paquetes se componen convenientemente de ampollas, tubitos, etc. de cristal o material sintético, así como por ejemplo bolsitas de plástico, etc. Los paquetes combinados para una determinación ahorran no solo la molesta medición de las



277016

distintas porciones, sino que garantizan una mayor duraci3n que por ejemplo en las botellas abiertas siempre de nuevo.

5. Una forma preferente de uno de estos medios, respectivamente de una combinaci3n de paquete para la ejecuci3n del procedimiento segun la presente invenci3n abarca, por ejemplo:

10. 1) Un medio de extracci3n, compuesto de 9 cm³ de una mezcla de alcohol butílico y alcohol amílico en proporci3n volumétrica 2:1.

2) Un medio limpiador del extracto, compuesto de 5 cm³ de una mezcla de éter y alcohol butílico en proporci3n volumétrica de 5:1 con un aditivo de 0,05 g. de amoniacó.

15. 3) Un medio de absorci3n y precipitaci3n combinado, compuesto de 0,3 g. de silicagel de un granulado de 0,2 - 1,0 mm. impregnado con aproximadamente 25 mg. de acetato de bario.

20. 4) Un ácido compuesto de 2,5 cm³ de 3 partes de ácido clorhídrico y 2 partes de agua.

25. 5) Una mezcla formadora de colorante, compuesta de 2-3 mg. de naftoresorcina disueltos en 0,5 cm³ de alcohol propílico, que fué ventilado y saturado con CO₂ y se le agregó hidroquinona contra la recepci3n de oxígeno de la atmósfera.

6) Un medio emascarador, compuesto de 0,012 mg. de un colorante verde complementario al color de la mezcla formadora del colorante (anilina verde-graso CIA), disuelto en 1,5 cm³ de benzol.

277016



- 12 -

277016

Estos medios muestran en su totalidad menos de 20 cm³ de volumen, por lo tanto, solo una reducida fracción de los productos químicos necesarios hasta ahora (por ejemplo para la determinación de pregnandiol).

5. El procedimiento para la determinación del PGN en la mujer, según la presente invención se utilizó prácticamente por 128 mujeres durante un tiempo total de aproximadamente 63 años. Los resultados demostraron que el riesgo de errores de este nuevo método es
10. extraordinariamente pequeño.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente

15. indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental; siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Introducción por 10 años en España: "Procedimiento para la determinación del

20. estado normal genital postovulativo en la mujer, así como medio para la realización del procedimiento"; caracterizándose por lo siguiente:

25. 1º.- Procedimiento para la determinación del estado normal genital postovulativo en la mujer, mediante comprobación de la actividad del cuerpo amarillo, caracterizado por la determinación de la altura del nivel de progesterona en forma tal que por lo menos un producto de desintegración de progesterona aislado de la úrea se hace reaccionar con una substancia que con



moléculas esteroideas o glucuronuras dá una reacción tintórea, el producto de reacción se disuelve y su color se enmascara en tal medida que solo permita la determinación de un nivel de hormona tal que se encuentre por encima de un valor límite de por lo menos 0,0015 mg. de progesterona fisiologicamente equivalente por cm³ de sangre o por encima de un mínimo de 2,5 mg. de glucuronuro de pregnandiól equivalente por día en la úrea.

- 5.
- 2^o.- Procedimiento, según lo especificado en
10. la reivindicación 1^a, caracterizado porque el producto de desintegración de progesterona aislado de la úrea se reacciona con una substancia que con moléculas esteroideas o glucuronuras de una reacción tintórea, el producto de reacción teñido se disuelve y el color de la solución
15. obtenida se enmascara con un colorante complementario en medida tal para permitir solo la determinación de una cantidad tal del producto de desintegración que sea superior a un valor límite de por lo menos 2,5 mg. de glucuronuro de pregnandiól, fisiológicamente equivalente
20. por día.

- 3^o.- Procedimiento, según reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque el glucuronuro de pregnandiól aislado de la úrea se reacciona con naftoresorcina obteniéndose una reacción tintórea específica para el ácido glucurónico, el colorante rojo-violeta aquí
25. formado se extrae en presencia de una cantidad tan grande de un colorante verde complementario con benzol de manera que solo se pueda determinar aquella cantidad de pregnandiól que se encuentre por encima de un valor



límite de por lo menos 2,5 mg. de glucuronuro de pregnandiol por día.

- 4^a.- Medio para la ejecución del procedimiento según la reivindicación 1^a, caracterizado porque se
5. presentan en una cantidad total de menos de 20 cm³ de los siguientes materiales listos para el servicio en paquete dosificado: una mezcla de dos disolventes con distinta capacidad disolvente para producto de
10. desintegración de progesterona a extraer; una combinación de un medio de absorción con un medio precipitador; una solución de una sustancia productora de color; una solución de un colorante de color complementario para la sustancia productora de color;

- 5^a.- Medio para la ejecución del procedimiento especificado en las reivindicaciones 2^a y 3^a, caracterizado porque en una cantidad total de menos de 20 cm³ se presentan los siguientes materiales en paquetes dosificados, listos para el empleo: un medio de extracción
15. compuesto de 9 cm³ de una mezcla de alcohol butílico y alcohol amílico en proporción volumétrica 2:1 : un medio limpiador del extracto, compuesto de 5 cm³ de una mezcla de éter y alcohol butílico en proporción volumétrica de 5: 1 con un aditivo de 0,05 g. de amoníaco; un medio
20. de absorción y precipitación combinado, compuesto de 0,3 g. de silicagel de un granulado de 0,2 - 1,0 mm. impregnado en aproximadamente 25 mg. de acetato de bario; un ácido
25. compuesto de 2,5 cm³ de 3 partes de ácido clorhídrico y 2 partes de agua; una mezcla formadora de colorante, compuesta de 2 - 3 mg. de naftoresorcina disueltas en
30. 0,5 cm³ de alcohol propílico, que fué ventilado y saturado



con CO_2 y se le agregó hidroquinona contra la recepción de oxígeno de la atmósfera; un medio enmascarador, compuesto de 0,012 mg. de un colorante verde complementario al color de la mezcla formadora del colorante (Anilina verde-graso CIBA) disuelto en 1,5 cm^3 de bencol.

5.
6ª.- Medio, según lo especificado en las reivindicaciones 4 y 5 caracterizado porque los materiales desificados, listos para el empleo, están contenidos en paquetes de masa termoplástica.

10.
7ª.- Procedimiento para la determinación del estado normal genital postovulativo en la mujer, así como medio para la realización del procedimiento; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria, que consta de quince hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

5 MAY. 1962

F A I A G, A.G.

J. GARCÍA MORALES Y MODESTO
E. B.