

DIALINAS EN LIQUIDO AMNIOTICO HUMANO

Dra. Hilda L. Montrull* - Dr. Carlos I. Meirovich**

RESUMEN

Líquido amniótico humano proveniente de gestantes de 32 a 43 semanas fue procesado por el método de Meirovich para dialinas. Las corridas cromatográficas con acetona-agua mostraron manchas activas sobre miogastrio, cuyos Rf fueron, respectivamente, 0,03, 0,22, 0,46, 0,70, 0,88 y 0,96.

Las sustancias de Rf extremos corresponden, respectivamente, a dialometrina (DM) y dialogastrotonina (DGT). Las otras, entre las que amniodialina (AD o D-3) no se había detectado previamente en plasma humano, se manifiestan activas sobre miogastrio, elevando muy significativamente la amplitud contráctil las de Rf menor, y la frecuencia las de Rf más alto.

Se puede determinar cierta concordancia entre la edad del embarazo y la concentración amniótica de la dialinas, a las que se asigna un papel fisiológico en relación con los picos que se observan en las semanas 32, 37 y 43.

SUMMARY

Human amniotic fluid was extracted at different pregnancy stages as well as during labour. It was successively submitted to static dialysis, chloroformic fractionation, progressive TCA precipitation, ether extraction and ascendent cetonic paper chromatography. Under Wood lamp, chromatograms showed spots corresponding to Rf values of 0.03, 0.22, 0.46, 0.70, 0.88 and 0.96, each correlated respectively to the following dialynes: dialometrine (DM), D-5, amniodialyne (AD), dialy-4 (D-4), sateline (D-Sat) and dialogastrotonine (DGT). The biological characteristics of DGT and DM were similar to those described for human plasmatic dialynes.

A predominance of high Rf dialynes was found during pregnancy; on the other hand, low dialynes were more predominant in samples obtained during labour. This changes are similar to those described in plasma; however, its appearance in amniotic fluid occur at a later time.

From this results, it is postulated that the physiological role of this autacoids in myometrial activity is directly related to the time of gestation.

En nuestro laboratorio se comprobó la existencia en plasma de varias especies (incluida la humana) de un grupo de autacoides, que fue denominado genéricamente *dialinas* por ser la diálisis estática un primer paso común para su extracción.^(5, 6, 7, 9, 10)

Dichas sustancias presentan actividad variable sobre miometrio^(2, 3, 6, 9, 10, 11, 14), miogastrio,^(2, 3, 5, 7, 8) vejiga urinaria⁽⁷⁾ y miocardio⁽¹⁹⁾ y se han podido relacionar los niveles plasmáticos de algunas de ellas, *dialogastrotonina* (DGT), *dialometrina* (DM), con ciclo menstrual, gestación y parto.^(2, 3, 10, 11)

Ello motivó el presente plan de trabajo destinado a demostrar en líquido amniótico humano las dialinas ya descritas.

La aplicación de las técnicas separativas previamente empleadas en plasma^(4, 5, 10) introdujo una variante en los resultados esperados, ya que simultáneamente con la detección de dialogastrotonina y dialometrina los experimentos piloto sugirieron la probable presencia de otras "dialinas".^(12, 13, 15, 16, 18, 20)

MATERIAL Y METODOS

1. Líquido amniótico obtenido asépticamente de 35 pacientes concurrentes a la Maternidad Nacional, con 32 a 43 semanas de gestación, fue sometido a la técnica separativa para dialinas empleada en nuestro laboratorio, que consta de los siguientes pasos: diálisis estática

fraccionada y progresiva contra agua destilada; partición cloroformica; precipitación tricloroacética fraccionada; extracción etérea; neutralización.

2. De la fracción precipitada con ácido tricloroacético al 6,5 % se sembraron 0,05 ml en tiras de papel Whatman N° 1 de 4×24 cm. Cada tira se sometió a cromatografía ascendente sobre papel usado como solvente acetona + agua 80:20. La saturación previa de la cámara se logró en 24 horas. El tiempo de corrida fue de 140±10 minutos. Las tiras se secaron en estufa a 50° C durante 24 horas y se revelaron bajo la lámpara de Wood.

Las manchas detectadas fueron eluidas con alcohol-agua 50:50, evaporando el eluente a 37° C durante 24 horas. Cada muestra se resuspendió en 1 ml de agua destilada.

3. Ratas "suquia" de ambos sexos provenientes del biotario de Farmacología, pesando 110±8 mg con 24 horas de ayuno y agua *ad libitum* fueron sacrificadas por dislocación cervical. Acto seguido se extrajo el estómago, que se lavó con Ringer-Krebs modificado tibio y, tras eliminar los mesos, se procedió indistintamente a ensayarlos de inmediato o conservarlos en refrigerador a 5° C, para probarlos 24 a 48 horas después.

4. El fundus de cada estómago se accionó en "Z" según la técnica de Vane^(21, 22, 23) y se montó en un baño de termostático a 36±1° C, con 50 ml de la solución nutritiva que aparece en la tabla I. Para ello se empleó un aparato de Braun regulable a 0,01° C.

* Profesor Titular, Cátedra de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba.

** Profesor Titular, Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El trabajo se desarrolló en el Instituto de Farmacología y Maternidad Nacional (Universidad Nacional de Córdoba).

Dirección postal: Santa Rosa 1085 - (5000) Córdoba, Argentina.

Alvear 173 - (5000) Córdoba, Argentina.

El medio era gaseado permanentemente con aire corriente proveniente de un aereador a diafragma, y que llega a través de una placa vítrea porosa que suministra una lluvia invertida de burbujas de diámetro homogéneo de 0,1 a 0,4 mm.

5. El trozo de tejido se conectó a un transductor de tensión *strainingauge* "Statham", regulándose una tensión basal de 5 g. Los registros se efectuaron con un polígrafo tipo Dynograph Beckman RB, calibrado con 5 unidades de sensibilidad, 2 mV de ganancia y 4 unidades de frecuencia de vibración mínima. La velocidad del papel fue de 25 mm por minuto.

6. Tras un período de estabilización de 60 a 90 minutos se ensayaron los eluidos de los cromatogramas, adicionándose al baño 0,5 ml de cada muestra.

7. Para el análisis de la actividad biológica se recurrió a técnicas de doble ciego y de autocontrol previo al agregado de material de las manchas eluidas, todo lo cual se sometió a cálculo estadístico según las normas corrientes.⁽¹⁾ Los resultados se valoraron por porcentaje de cambio.

TABLA I
Solución nutritiva (Ringer-Krebs-bicarbonato)
(modificadas)

Na ⁺	145,20 mM
K ⁺	6,02 mM
Ca ⁺⁺	1,22 mM
Mg ⁺⁺	1,33 mM
Cl ⁻	125,90 mM
CO ₃ H ⁻	25,30 mM
PO ₄ ⁼	1,20 mM
SO ₄ ⁼	1,30 mM
Dextrosa	5,50 mM
Agua destilada, c. s. p.	1.000 ml

RESULTADOS

A. Estudio cromatográfico

El revelado de los cromatogramas mostró el siguiente desarrollo tal como aparece esquematizado en la figura 1:

- 1) Una mancha constante de Rf 0,03 ± 0,01, correspondiente a dialometrina (DM).
- 2) Una errática e inconstante con Rf 0,22 ± 0,04, que se muestra en 43,3 % de los casos, independientemente de la edad de gestación, fue denominada *Diali-5* (D-5).
- 3) Una mancha de Rf 0,46 ± 0,03, que a veces se presenta subdividida en dos, detectada con una frecuencia de 83,3 % (*Diali-3* ó D-3).
- 4) Una mancha de Rf 0,70 ± 0,02, revelada en 80 % de las corridas (*Diali-4* ó D-4).
- 5) Una mancha constante de Rf 0,96 ± 0,02, correspondiente a dialogastrotonina (DGT), de coloración amarillenta.
- 6) Una mancha salélite de DGT, de Rf 0,88 ± 0,01, diferenciada de la anterior tanto por su menor velocidad de desplazamiento cromatográfico cuanto por su coloración azul bajo la luz ultravioleta (*D-sat*).

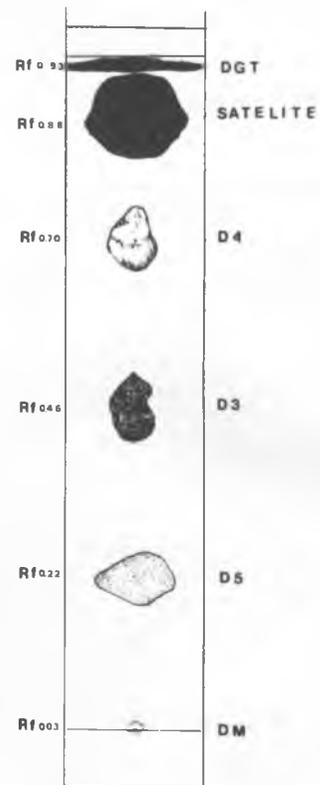


Figura 1. Esquema de cromatograma.

B. Estudio biológico

Para determinar la identidad de las sustancias presentes en cada mancha se efectuaron ensayos biológicos sobre miogastro murino, *in vitro*.

1) Se puede observar que todas las manchas cromatográficas representan sustancias que elevan tono, amplitud y frecuencia del preparado, con variable incidencia sobre el automatismo. Sus acciones pueden ser inmediatas o tardías, con latencia variable (tabla II).

TABLA II
Efectos cualitativos de dialinas

Estómago	Ampl.	Tono	Frec.
DM	▲	▲	▲
Rf 0,22	▲	▲	▲
Rf 0,46	▲	▲	▲
Rf 0,70	▲	▲	▲
SAT	▲	▲	▲
DGT	▲	▲	▲

2) El aumento es más notable en cuanto a la amplitud de las ondas, cuya magnitud puede crecer enormemente con las concentraciones amnióticas de gestantes de la 37ª semana cuando se administran a baño DGT, D-5, DM y D-sat; y en el embarazo a término y parto cuando se administra D-3 (figura 2).

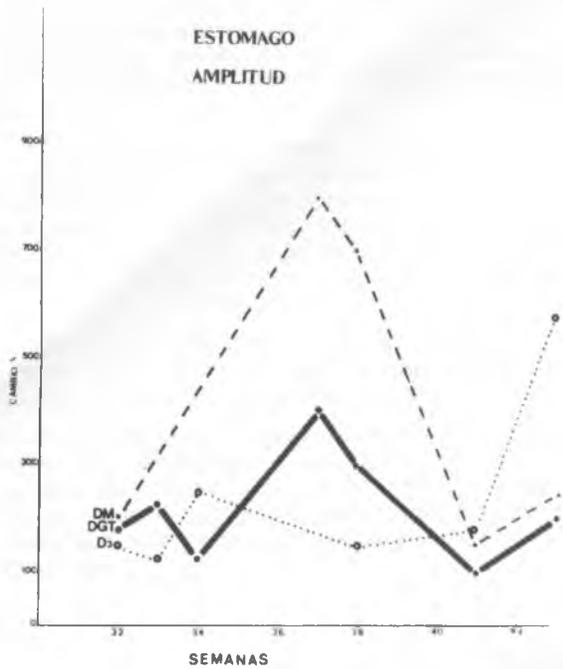


Figura 2. Modificación de la amplitud contráctil gástrica *in vitro* por DGT, DM y D-3, según la semana de gestación, medida en porcentaje de cambio.

3) El tamaño de las ondas, que se triplica con D-sat, se quintuplica con DGT y con Diali-3; alcanza 7 veces su altura inicial con D-5 y 11 veces con dialometrina (DM).

4) La frecuencia también aumenta agudamente por efecto de D-5, DM y D-sat, en la 37ª semana, y por DGT desde la 37ª a 41ª semanas.

5) El tono puede elevarse más de 100 % con D-sat, DGT, Diali-3, DM y D-4, desde la 37ª a la 43ª semanas.

Las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 esquematizan la información anterior.

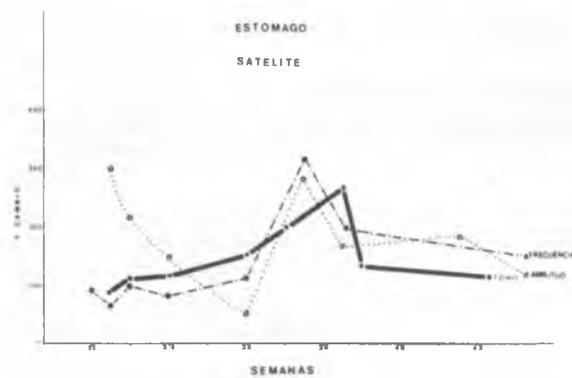


Figura 3. Modificación de los efectos de los eluidos de la mancha D-SAT, sobre frecuencia, tono y amplitud de las contracciones gástricas murinas *in vitro*, a lo largo de las últimas semanas de gestación, medidas por porcentaje de cambio.

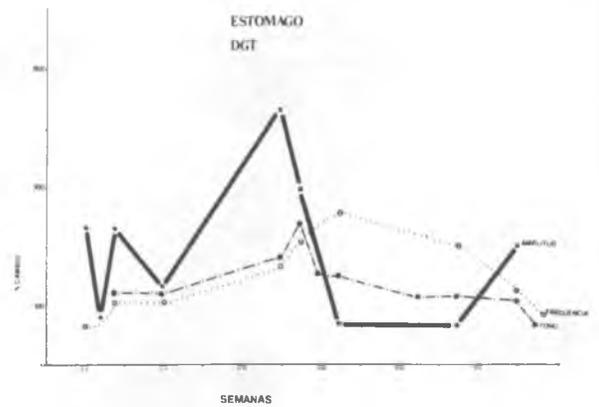


Figura 4. Efectos de dialogastrotonina medidos en porcentaje de cambio sobre amplitud, tono y frecuencia de miogastrio murino *in vitro*, de acuerdo con la semana de embarazo de la paciente dadora.

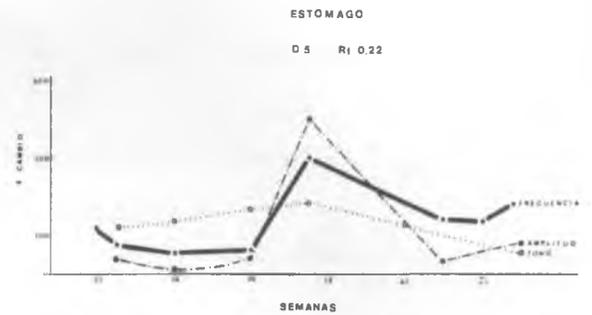


Figura 5. Efectos de eluidos de la mancha de Rf 0,22 (D-5) sobre amplitud, tono y frecuencia de miogastrio *in vitro*, de acuerdo con la semana de gestación, medidos en porcentaje de cambio.

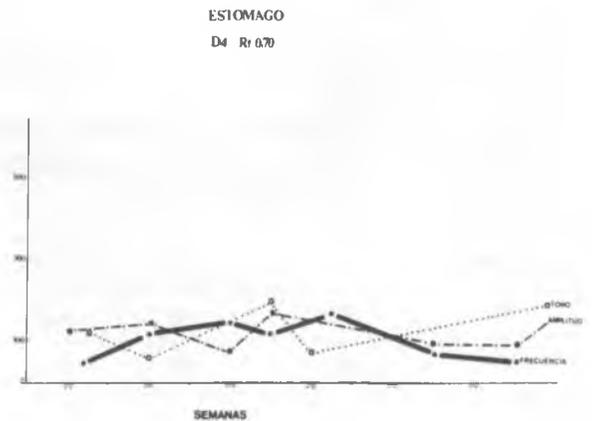


Figura 6. Efecto del eluido de la mancha D-4 de Rf 0,70, medidos en porcentaje de cambio, sobre tono, amplitud y frecuencia contráctiles de miogastrio de rata *in vitro*, según tiempo de gestación.



Figura 7. Respuesta comparada de 3 dialinas amnióticas (DGT, DM y AD) y dialometrina plasmática, sobre la tensión contráctil de miometrio de rata *in vitro*. Curva eficacia/tiempo medida en porcentaje de cambio.

DISCUSION

La cromatografía sobre papel de líquido amniótico de mujeres gestantes de 32 a 43 semanas, muestra tres tipos de manchas que revelan sustancias mioactivas, nitrogenadas no lipídicas:

- Constantes en plasma y amniótico. Son la dialogastrotonina (Rf 0,96) o DGT; la dialometrina (DM) (Rf 0,03) y la satelina (D-Sat) (Rf 0,88), mancha satélite constante de DGT, de tamaño variable, muy frecuente en plasma, aunque allí aparece con menor tamaño y fluorescencia.
- Constantes en amniótico, pero raras o inexistentes en plasmas. Estas son la mancha de Rf 0,46, o Diali-3 (D-3) y la de Rf 0,70, o Diali-4 (D-4), con fluorescencia muy débil. Ambas están presentes en más de 80 % de los cromatogramas amnióticos.

BIBLIOGRAFIA

- BANCROFT, H.: Introducción a la bioestadística. Eudeba, Buenos Aires, 1960.
- BLANK, B., y MEIROVICH, C. I.: Niveles plasmáticos de dialometrina en mujeres gestantes. *Actas XIV Cong. Arg. Obst. Ginecol.*, 3:540, 1973.
- BLANK, B., y MEIROVICH, C. I.: Niveles plasmáticos de DGT en mujeres gestantes. *Actas XIV Cong. Arg. Obst. Ginecol.*, 3:543, 1973.
- BOULANGER, P., y BISERTE, G.: Fractionation of pepsin-catalysed hydrolysates of chrysalbumin, en "The chemical structure of proteins" (a Ciba Found. Symp.), págs. 165-183, 1952.
- MEIROVICH, C. I.: Dialogastrotonina: péptido con actividad biológica obtenido de plasma bovino. Tesis doctoral. Córdoba, 1970.
- MEIROVICH, C. I.: Actividad de fracciones plasmáticas sobre útero de rata, *in vivo*. *Actas XIII Cong. Arg. Obst. Ginecol.*, 2:240, 1970.
- MEIROVICH, C. I.: Un nuevo grupo de péptidos con actividad biológica. *Rev. Fac. Cienc. Méd. Córdoba*, 29:343-348, 1971.
- MEIROVICH, C. I.: Postulación de un sistema regulador de tono y contractilidad de músculo liso. *Rev. Fac. Cienc. Méd. Córdoba*, 30:295-301, 1972.
- MEIROVICH, C. I., y BLANK, B.: Actividad de fracciones plasmáticas sobre útero aislado de rata. *Obst. Ginecol. Lat. Amer.*, 29:374-383, 1971.
- MEIROVICH, C. I., y BLANK, B.: Aislamiento cromatográfico de una nueva sustancia ocitócica: dialometrina. *Obst. Ginecol. Lat. Amer.*, 29:384-392, 1971.
- MEIROVICH, C. I., y BLANK, B.: Nuevas sustancias plasmáticas útero-activas. *Rev. Fac. Cienc. Méd. Córdoba*, 30:171-178, 1972.
- MEIROVICH, C. I.; BLANK, B.; MONTRULL, HILDA L.; NAVARRO, MILCA F., y DIVI, R.: Dialogastrotonina y dialometrina en líquido amniótico. *Actas V Cong. Lat. Amer. Farmacol. Ter. Lima*, 1974.
- MEIROVICH, C. I.; DEMURTAS, SILVIA, y MONTRULL, HILDA L.: Respuesta del miometrio murino aislado, en estro, a dialinas presentes en el líquido amniótico humano. *Actas VI Cong. Lat. Amer. Farmacol.*, 12:42, Buenos Aires, 1976.
- MEIROVICH, C. I., y MONTRULL, HILDA L.: Efecto de la dialogastrotonina sobre el tono uterino, *in vitro*. *Actas XIII Cong. Arg. Obst. Ginecol.*, 241-242, Córdoba, 1970.
- MEIROVICH, C. I., y MONTRULL, HILDA L.: Aislamiento de dialinas de líquido amniótico humano. *Actas VI Cong. Lat. Amer. Farmacol.*, 12:43, Buenos Aires, 1976.
- MEIROVICH, C. I., y MONTRULL, HILDA L.: Amniotic fluid dialynes. Biological study. 7º Cong. Internat. Pharmacol. Paris, 1978.
- MEIROVICH, C. I., y MONTRULL, HILDA L.: Dialinas en líquido sinovial. *Actas III Cong. Reg. Lat. Amer. Farmacol. Montevideo*, 1980.
- MONTRULL, HILDA L.: Dialinas en líquido amniótico. Tesis doctoral. Córdoba, 1978.
- MONTRULL, HILDA L., y MEIROVICH, C. I.: Estudio electrocardiográfico del miocardio de rata bajo la acción de dialogastrotonina (DGT), *in vivo*. *Actas IX Cong. ALACF. Mendoza*, 1973.
- MONTRULL, HILDA L., y MEIROVICH, C. I.: Dialinas en líquido amniótico humano. *Actas 7º Cong. Arg. Biol.*, Mendoza, 1978.
- VANE, J. R.: A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.*, 12:344-349, 1957.
- VANE, J. R.: The relative activities of some tryptamine analogues on the isolated rat stomach strip preparation. *Brit. J. Pharmacol.*, 14:87-96, 1959.
- VANE, J. R.: The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Brit. J. Pharmacol.*, 23:360-373, 1964.

c) Inconstantes en plasmas y amniótico. La mancha Diali-5 (D-5), de Rf 0,22, aparece en 43 % de los líquidos amnióticos y en un tercio de los plasmas.

Los ensayos biológicos indican que las concentraciones amnióticas de las dialinas varían con la edad de embarazo y presentan picos en las semanas 32, 37 y 43, como atestiguan las curvas actividad/tiempo.

Los niveles de DGT y DM calculados indirectamente por sus efectos sobre la función miogástrica *in vitro*, son menores que los plasmáticos para igual momento de la gestación.

Las dialinas propiamente amnióticas son todas activas sobre músculo liso gástrico. Estas sustancias elevan significativamente el tono y afectan al automatismo de modo inconstante, pero las funciones contráctiles, amplitud y frecuencia son influidas con más intensidad. La medida del Rf acusa relación directa con la frecuencia e inversa con la amplitud. D-5 (Rf 0,22) septuplica el tamaño de las ondas. D-4 (Rf 0,70) duplica a las 37 semanas la frecuencia contráctil.

Las dialinas han sido previamente diferenciadas de diversos autacoides mioactivos. Así se constató que no son prostaglandinas, pues la metodología extractiva excluye a estos lípidos, que son eliminados por los solventes. No son tampoco aminas biógenas como serotonina, histamina o acetilcolina, pues por su solubilidad permanecen en el sobrenadante cuando las dialinas son precipitadas, porque además carecen de los efectos vasculares de esas aminas y porque éstas son inactivadas rápidamente por enzimas específicas (DAO, MAO, histaminasa, colinesterasa).^(5, 7, 8, 11, 13, 15, 17, 18)

La D-3 es la única sustancia propia del amniótico cuya actividad crece abruptamente al terminar el embarazo (figura 2). Ese incremento es significativamente mayor incluso que la dialometrina. Se ha sugerido denominarla *amniodialina*.