

Estudos e revisão dos principais testes para diagnóstico da gravidez

II. Testes químicos (*)

por

Maria Isabel Mello

Ao mesmo tempo que o teste de Aschheim e Zondek sofria modificações no sentido de diminuir seu tempo de leitura, vários pesquisadores ensaiavam técnicas químicas que pudessem dar com a mesma precisão e em menos tempo, um diagnóstico seguro de gravidez.

Como assinalámos no trabalho anterior (49), alguns testes biológicos oferecem uma grande sensibilidade, e podem ser realizados em um período curto. Porém todos exigem manutenção de colônias grandes de animais para que possam ser mantidos nas condições requeridas.

E' interessante verificar que as substâncias sujeitas a modificações no metabolismo da gravidez têm sido propostas como reações indicativas deste estado. Assim, a histidina, a histamina, o ácido hipúrico e a amônia, as relações entre a creatina e a histidina, as substâncias reductoras, presentes na urina em grande quantidade, vem sendo objeto de estudos cuidadosos. O aumento das atividades da diamino-oxídase, da histidinase e da histaminase são elementos que têm servido de base diagnóstica. Ao lado destes métodos incorporam-se, com mais segurança, aqueles baseados na eliminação de hormônios no início da gravidez. As técnicas demonstrando ou determinando a presença e quantidade de gonadotrofinas ou de glicuronato sódico de pregnandiol, as reações coradas para verificação dos estrogênios, são meios que se têm procurado para a realização de um teste seguro, eficiente e rápido.

Faremos de todos estes métodos um ligeiro histórico e daremos em detalhe a técnica da histidina da qual temos maior experiência e que nos ofereceu resultados satisfatórios depois do primeiro mês de gravidez.

Histidinuria.

Em 1929, VOGÉ (72), verificando a conexão entre os produtos elaborados pela hipófise e os compostos do tipo beta — iminazol (histamina, histidina

(*) Trabalho da Divisão de Química e Farmacologia — Chefe Dr. Gilberto G. Villela.

* Recebido para publicação a 8 de fevereiro de 1945 e dada à publicidade em fevereiro de 1945.

e tetelina), pensou em verificar a presença destas substâncias na urina de mulheres grávidas.

Este autor empregou uma modificação da técnica de KNOOP para determinação da histidina. Na urina de 60 mulheres grávidas foi sempre encontrado este amino-ácido. Os resultados obtidos foram controlados pelo teste de Aschheim-Zondek numa percentagem de 98% correto-positivas (Chamamos correto-positivas aquelas reações em que há gravidez; falso positiva é a reação positiva sem gravidez). A técnica é muito simples. A água bromada agindo sobre a urina aquecida desenvolve a formação de côr róseo-avermelhada devido à presença da histidina. Nos casos negativos não há produção de côr.

HANNAN (32), em 1930, repetindo o teste de VOGÉ, obteve em 643 casos de gravidez 95% de resultados correto-positivos, em 117 não grávidos 98% corretos negativos, em 100 homens, 96% corretos negativos. As exceções foram assinaladas em casos de pericardite e pleurisia. Verificou que adicionando à urina xantina, hipoxantina, aloxana, aloxantina, cafeína, arginina e uréia não obtinha reação, enquanto a adição de 0.06 a 0.12% de histidina ou histamina provocava uma reação positiva.

A reação foi ainda positiva com urinas de 3 a 5 dias após o parto.

Em vista dos excepcionais resultados obtidos por VOGÉ (72), HANNAN (32), DODDS (12), SIDDAL, HU e HA e WONG (65), ARMSTRONG e WALTER (2), YOUNG (77) outros autores empregaram o teste sem conseguir entretanto a mesma percentagem ótima.

De 1933 a 1941, KAPPELLER-ADLER e col. estudaram a reação minuciosamente, sugerindo modificações sucessivas visando obter uma técnica para a dosagem quantitativa da histidina. Procuraram ao mesmo tempo determinar o seu período de ocorrência, seu mecanismo de formação e eliminação e os casos em que o seu aumento pudesse falsear os resultados.

Normalmente, a histidina é um produto do metabolismo das proteínas, desdobrada no fígado sob a ação de um fermento específico, a histidínase (16). Na gravidez, o hormônio gonadotrófico aumentado inibe a ação da histidínase permitindo, assim, que a histidina seja eliminada pelos rins em quantidades apreciáveis que facilitam a sua determinação na urina. A dieta também influi neste aumento (39).

A inibição da histidínase ou histídase pelo "prolan" é proporcional à dose (37), (38), (39). A histidinúria está portanto intimamente relacionada ao aumento das substâncias gonadotróficas, sendo a sua presença verificada na urina desde a 1.^a semana após a omissão da menstruação até uma semana depois do parto.

Em 1933, KAPELLER-ADLER isolou a histidina da urina de grávidas e apresentou uma nova técnica que modificou mais tarde para sua determinação quantitativa (34). A última, que é mais simples, vem sendo empregada por vários autores (35), (36) e (41). Citaremos, entre eles, OHLIGMACHER (53), WEISS (74), RENTON (58), STERN (67), SEIDMANN (64), BICKEL (3), GERTLER (22), NEUHARDT (50), SAKAGUCHI (60), NIENDORF (52), NEUWEILER e GRIMM (51), RACKER (57), LANGLEY (45), KRAUS e KOENIGSTERN (43), PLOTZ (55), GOODFRIEND e DANIEL (23) e outros. Os resultados obtidos por estes autores foram reunidos no quadro I.

A determinação da histidina pela técnica de KAPELLER-ADLER exige um número maior de reativos e mais tempo que a técnica preconizada por VOGEL, porém é mais sensível. Adotamos a técnica de KAPELLER-ADLER (41) que passamos a expôr.

Princípio do método.

A primeira urina da manhã alcalinizada e livre de nítritos é aquecida e adicionada do reagente bromo que desenvolve uma cor amarelo-avermelhada.

Liberta-se a urina do excesso de Br e junta-se a solução amoniacal. Aquece-se o tubo, e se houver histidina na urina desenvolve-se um anel vermelho-violeta. Na ausência de histidina forma-se um precipitado pardo.

Reativos.

1. Solução H_2SO_4 a 10%.
2. Solução MnO_4K 1%.
3. Reagente Bromo 1% (Água destilada 66 ml adicionada de 1 ml de bromo puro e 33 ml de ácido acético glacial).
4. Solução de carbonato amoniacal. 10 grs. de carbonato de amônio em 90 ml de água destilada. À solução adicionar 200 ml de amônia pura líquida.
5. Iodeto de potássio. Papel de amido.

Técnica.

Tomam-se 5 ml da urina da manhã e verifica-se o pH; se for alcalino acidifica-se com 1 ou 2 gotas de ácido sulfúrico a 10%. Removem-se os nítritos da urina acidificada oxidando-a a quente por meio de uma solução de permanganato de potássio que se junta, gota a gota, até o aparecimento de uma cor levemente rósea. Esta desaparece em 30 segundos. Caso se tenha

adicionado um excesso de permanganato há formação de um precipitado pardo de peróxido de manganês que se desfaz aquecendo o tubo até a fervura em banho-maria. Se êste tratamento não der resultado filtra-se a urina ou repete-se com uma nova amostra.

À urina clara adiciona-se lentamente, gôta a gôta, o reagente bromo até o aparecimento de uma côr amarelo-citrina. Um grande excesso de bromo inibe o desenvolvimento da côr. Porisso deve-se verificar se há um excesso de bromo no tubo. Toma-se uma gôta da solução, mais uma gôta de amido e uma gota da solução de iodeto de potássio. Se não der coloração, junta-se um pouco mais do reagente e pode-se continuar a reação. Dando uma reação levemente violeta não há excesso de Br. Se houver coloração azul, aquece-se durante 5 minutos até a libertação completa de bromo.

Adiciona-se 1 ml da solução amoniaca pelas paredes do tubo e se aquece 2 minutos em banho-maria fervente.

Se houver histidina na urina, há formação de côr vermelho-violeta que se desenvolve rapidamente em todo o líquido e é estável. Quando a reação é negativa forma-se um precipitado pardo.

Resultados.

Em 67 urinas suspeitas de gravidez por nós estudadas tivemos 3 casos falsos negativos. No primeiro a eliminação de gonadotrofinas determinada pelo nosso teste químico (1) e confirmado pelo teste biológico foi de 630 U.C. por litro. Em outro caso foi verificada uma eliminação de 480 U.C. por litro de urina e no terceiro caso não determinamos a quantidade de hormônios gonadotróficos eliminados. Tôdas as reações observadas foram biológica e clinicamente confirmadas. Donde se seduz que no início da gravidez quando a eliminação hormonal é baixa o teste da histidina não é aconselhável.

Em urinas de homens e mulheres normais tivemos um caso falso positivo. Êste era de mulher ovariectomizada.

KAPPELLER-ADLER verificou que nos casos de toxemia e eclampsia a histidinuria é negativa, fato êste verificado por outros autores (40), (41). Nos casos em que há infecção pelo Bacilo coli a histidinuria também apresenta-se diminuída (RACKER) (1941) (56).

Assim concluimos, com SEIDMAN (64), GERTLER (22), KRIEGER (44) e LANGLEY (45) que o teste da histidina só é positivo na gravidez mais adiantada, não podendo assim ser recomendado para o diagnóstico precoce.

No quadro I encontram-se os resultados obtidos por alguns autores com as técnicas de VOGÉ e KAPELLER-ADLER.

QUADRO I
HISTIDINURIA

AUTOR	ANO	N.º DE CASOS	RESULTADOS CERTOS — %	
			Grávidas	Normais
Vogé.....	1929	60	95%	98%
Hannan.....	1930	860	95%	98%
Dodds.....	1930	229	74,3%	86,9%
Siddal e col.....	1931	260	75%	92%
Young.....	1933	519	63%	84%
Kapeller-Adler.....	1933			
Weiss.....	1934			
Ohligmacher.....	1934		62%	95%
Ferrari e Francis.....	1935			
Renton.....	1935	100	93%	
Seidman.....	1935	199	92%	75%
Gertler.....	1936			
Neuhardt.....	1938			
Sakaguchi.....	1940			
Kraus e Koenigstern.....	1941			
Goodfriend e Daniel.....	1943	56	91%	
Mello:.....	1943	67	95,2%	

Histaminemia.

A inativação da histamina pelo soro de mulheres grávidas foi assinalado por WERLE e EFFKEMANN (76) que verificaram ser típica na gravidez. Este poder de destruição da histamina aumenta até ao 7.º mês. Após a expulsão da placenta a taxa de histamina aumenta. Provavelmente este fato deve ser importante na regulação da dor e do parto.

Determinando o teor de histamina no útero e no sangue do embrião e materno, WERLE e colaboradores encontraram valores muito baixos no soro. Entretanto, quantidades consideráveis de histaminase foram determinadas no soro e no útero de grávidas. Isto explica a destruição da histamina nestes tecidos (75). AHLMARK (1) verificou que a histaminase aumenta desde a 7.ª semana após a última menstruação e atinge 500 a 1.000 vezes o teor normal nos últimos meses.

A destruição da histamina não foi verificada em nenhum outro caso. (17) Isto torna o aumento da histaminase específico na gravidez, sugerindo o seu aproveitamento como teste diagnóstico.

Relação Histidina — histamina.

É interessante notar que enquanto a histidina é eliminada em grandes quantidade na gravidez, o mesmo não se verifica em relação à histamina (76).

KAPPELLER-ADLER (40) admite que o aumento das substâncias gonadotróficas na gravidez seja a causa da não destruição da histidina que não sofrendo a desaminação é eliminada em grandes quantidades pelos rins.

WERLE (75) em 1938, achou que os tecidos animais, especialmente os rins, continham um enzima que denominou de descarboxilase da histidina. Este é capaz de transformar a histidina em histamina pela descarboxilação da primeira. A presença da descarboxilase da histidina explicaria a diminuição da histidinúria nos casos de toxemia e eclampsia. A histidina sofrendo descarboxilação transforma-se em histamina, que é excretada em taxa elevada pela urina. Em casos de ameaça de aborto diminui o poder histaminolítico do sangue o que é um sinal prognóstico característico (1).

Diamino-oxidase.

ZELLER e BIRKHÄUSER em 1940, (78) verificaram que a atividade diamino-oxidásica do soro de mulher grávida está aumentada em uma concentração idêntica à da histaminase.

A diamino-oxidase pode ser verificada colorimétrica e manométricamente. O consumo de O_2 durante a reação do soro com cadaverina 0,01M ou com $H_2 O_2$ é determinada manométricamente. Consideram uma unidade de diamino-oxidase 1 gr. do substrato enzimático que oxida $16 \cdot 10^{-6}M$ em 1 hora. Os valores encontrados na gravidez variam de 0.05 a 0.19 U (79).

A reação corada é qualitativa. Consiste em adicionar a 1 ml de soro dializado a $38^\circ C$, cadaverina e disulfonato índigo. Se o soro for positivo há um descoramento em 12-24 horas.

Na ausência de gravidez a cor muda em 3 dias (78).

ZELLER ainda propõe a formação da amônia no aparelho modificado de BARCROFT e WARBURG como método químico no diagnóstico da gravidez. A amônia difusa no HCl é determinada colorimetricamente pelo reativo de Nessler. Esta técnica permite determinar 0,1y de diamino-oxidase do soro (80).

Não encontramos na literatura consultada, referência aos testes propostos por ZELLER e ZELLER e BIRKHÄUSER. Não temos também nenhuma experiência sobre os mesmos.

Substâncias redutoras da urina.

VISSCHER e BOWMAN em 1934 (71) apresentaram uma técnica química baseada na presença de substâncias redutoras na urina de grávida. Consistia na oxidação da urina com solução de ferricianeto de potássio e água oxigenada em presença do cloridrato de fenil-hidrazina e em banho-maria fervente por 15 minutos. Removido o tubo do banho, a solução era tratada por

1 gota de ácido clorídrico concentrado e um excesso de hidróxido de sódio. Procediam a titulação pelo HCl diluído. O final da reação era dado pela viragem da cor amarelo-esverdeado para o azul da Prússia. Em 317 casos obtiveram uma precisão de 93%.

FRIEDRICH (21), DODDS (13), DOLFF (14), FRECH (20), OSTÁDAL (54), DUNN e NORTHWAY (15), KRIEGER (44) e HADLER (27) modificaram o teste de VISSCHER e BOWMAN conseguindo FRIEDRICH com a sua modificação, 100% de resultados positivos. Porém este resultado ótimo só foi assinalado por FRIEDRICH.

A urina normal contém muitas substâncias redutoras e LOCHLE (46) obteve a reação de VISSCHER e BOWMAN positiva em urinas de homens e mulheres que continham glicose.

Reunimos no quadro II as percentagens obtidas pelos diversos autores.

QUADRO II

AUTOR	ANO	N.º DE CASOS	RESPOSTAS CERTAS
Visscher-Bowman.....	1934	317	93%
Friedrich.....	1936	312	100%
Dolff.....	1936		94,5%
Dodds.....	1936	100	90%
Frech.....	1937		
Ostádal.....	1937		
Sheeham.....	1937		60%
Dunn e Northway.....	1938		84,8%
Krieger.....	1939		
Hadley.....	1941	232	

Como se vê pela análise do quadro, o teste de VISSCHER e BOWMAN é muito falho e inespecífico.

Eliminação hormonal.

Fator redutor da urina grávida — Gonadotrofinas.

BOWMAN em 1939 (5) verificou que as preparações das urinas grávidas continham um fator de redução característico e procurou usar esta propriedade como teste químico no diagnóstico da gravidez. Várias técnicas preconizadas para a preparação das gonadotrofinas foram tentadas. As substâncias redutoras presentes na urina foram isoladas por meio da precipitação fracionada com acetona. Estabeleceu as concentrações relativas dos fatores de redução pela titulação eletrométrica. Injetando ratas imaturas com o material redutor isolado, obteve o mesmo tipo de reação observado com o hormônio gonadotrófico coriônico estabelecendo assim uma relação entre o fator redutor e este

hormônio. Uma vez verificado que o fator redutor da urina gravídica tem as mesmas propriedades químicas e biológicas do hormônio gonadotrófico, BOWMAN procurou utiliza-lo como um teste químico para o diagnóstico da gravidez.

A técnica é muito simples. Separado o fator de redução pela precipitação fracionada com acetona, o líquido viscoso mais o resíduo são dissolvidos em água destilada, e titulados pela solução 0,0005N de iodo usando o amido como indicador.

Escolheu dos valores obtidos um número arbitrário significativo, considerando positiva a urina tratada que consumisse um mínimo de 10 ml de iodo 0,0005N.

Em 303 casos BOWMAN obteve uma percentagem de 98,4% de resultados corretos positivos.

Em 1942 modificamos o teste de BOWMAN (74). Em vez de titularmos diretamente o fator redutor contido na água de dissolução, pelo iodo 0,0005N, tamponamos a solução, adicionamos uma quantidade conhecida da solução de iodo 0,0005N e em excesso, e aquecemos em banho-maria 40-50°C, por 10 minutos. Nas urinas gravídicas a redução dá-se quase imediatamente. O iodo não reduzido é titulado por uma solução de tiosulfato de sódio do mesmo título. Consideramos positivas as urinas que fornecem um precipitado capaz de reduzir em 5 minutos 15 ml da solução de iodo 0,0005N.

Estudamos 43 casos sendo 23 de urinas suspeitas e 20 de homens e mulheres normais. Obtivemos 100% de respostas corretas positivas. Os nossos resultados foram controlados biologicamente.

Baseados nas propriedades óxido redutoras dos hormônios gonadotróficos, minuciosamente estudadas por BOWMAN (6), EVANS e colaboradores (18), GURIN (25), GURIN, BACHMAN e WILSON (24) e outros, procurámos estabelecer sobre base química e quantitativa a eliminação destas substâncias pela urina na gravidez e relacionar os valores obtidos com a unidade biológica. (43).

Experimentamos várias técnicas propostas para a preparação das gonadotrofinas. Verificamos que a adsorção destas pelo Caulim é eletiva e a sua execução simples e econômica.

Os hormônios adsorvidos pelo *caulim* são eluídos por uma solução de soda 0,1N e tratados pelo reagente cúprico de SOMOGYI, e a redução controlada pela titulação com o tiosulfato. O número de ml de tiosulfato 0,0005N gastos é expresso em unidades camondonga. A reação da quantidade de tiosulfato gasto e a unidade biológica, estabelece-se usando quantidades cres-

centes de um mesmo eluato padronizado biologicamente. O número de ml de tiosulfato gastos com a solução que corresponde a 1 U.C. será a constante empregada no cálculo. O fator por nós encontrado foi 5 (5ml de tiosulfato = 0,0005N 1 U.C.)

A presença dos hormônios gonadotróficos nos eluatos caulim foi comprovada biologicamente.

Em 238 casos obtivemos apenas um resultado falso positivo. Tratava-se de uma urina de mulher em início de menopausa.

Os resultados obtidos com a determinação química das substâncias gonadotróficas presentes na urina estão resumidos no quadro III.

QUADRO III

AUTOR	N.º de CASOS	ml de tiosulfato de sódio 0,0005 N gastos								
		GRÁVIDA			NORMAL			HOMEM		
		Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.
Bowman.....	303	50	10	17,2	5	1	2,33	5	1	2,69
Mello.....	43	73,8	17,3	33,62	11,3	3,8		7,9	5,3	5,8

A dosagem química e quantitativa das gonadotrofinas no início da gravidez, oferece resultados seguros logo na primeira semana. Como estes hormônios aumentam consideravelmente nos 2 primeiros meses de gravidez, a sua eliminação mesmo nos casos em que há distúrbios hepáticos ou renais é acima dos valores normais, permitindo assim fazer um diagnóstico seguro.

Os casos em que podem falsear os resultados são os mesmos que invalidam os testes biológicos: amenorréia por insuficiência estrogênica, menopausa, ou mola.

Foliculinuria.

KOBER em 1931 (42), foi o primeiro autor que propoz um teste químico, para dosagens quantitativas dos estrogênios na urina, aproveitando a reação de Liebermann-Burchard para os estéroides. Porém a técnica de KOBER só é quantitativa para a estrona ou alfa-cetohidroxiestrona pura. A reação quantitativa destes hormônios é baseada no desenvolvimento de cor verde-vermelho fluorescente quando tratados pelo ácido fenolsulfônico, comparando-se a cor com um padrão de vermelho cresol no tintômetro Lovibond.

CUBONI em 1934 (11) empregou a técnica de KOBER para foliculina como reação diagnóstica da gravidez em equa. SALA (61) repetiu-a no ano seguinte ligeiramente modificada para urina de equa e mulher grávida — hidrolizava a quente 5 ml de urina com 1 ml de HCl e extraía os estrogênios pelo benzol. Em 19 casos de mulheres entre 2 e 9 meses de gravidez obteve 15 positivos, 1 negativo e 2 duvidosos. Em 16 casos normais obteve 7 positivos, 8 negativos e 1 duvidoso, concluindo assim ser o diagnóstico sem valor na espécie humana enquanto na equa obteve 100% de resultados certos positivos.

COHEN e MARRIAN (9) modificaram o método de KOBER tornando-o quantitativo para os estrogênios da urina gravídica. A intensidade da cor medida num tintômetro de Lovibond e os valores lidos na curva de calibração obtida com hormônio puro, dão o teor de estrogênios eliminados.

SCHMULOWITZ e WILLIE (63) em vez do ácido fenolsulfônico empregaram a para-nitroanilina diazotada proposta por HARRINGTON e SCHEIPBACH.

Os estrogênios extraídos da urina suspeita pelo éter, eram lavados com solução de carbonato de sódio e o éter removido por destilação. Ao resíduo dissolvido em álcool, adicionavam então 1 ml da solução de para-nitro-anilina diazotada e 15 ml de uma solução de carbonato de sódio a 20% provocando assim o desenvolvimento de uma cor vermelha escura na camada alcoólica. A intensidade era comparada ao colorímetro de uma solução padrão de cloreto férrico a 33%. Estabeleceram um valor arbitrário para expressar os resultados, que denominaram (*ferric chloride NUMBER*). Os números acima de 25 F.C.N. eram considerados positivos e duvidosos entre 15 e 25.

Fizeram determinações em 89 urinas de 56 mulheres sendo 38 grávidas. Obtiveram nas grávidas apenas um caso duvidoso enquanto nas normais houve 6 casos falsos positivos. Verificaram também que na toxemia gravídica há uma diminuição considerável na excreção dos estrogênios, (19) confirmado assim os trabalhos de SMITH e SMITH (66).

Em 1937, SAVAGE e WILLIE (62) aplicaram a dosagem dos estrogênios não só como reação para o diagnóstico precoce, mas nos casos mais adiantados, no prognóstico das toxemias nefríticas ou pre-eclânticas, onde a estro-núria se apresenta muito diminuída.

Vários autores trabalharam o método de SCHMULOVITZ e WILLIE, abandonando-o porém devido a alta percentagem do erro que foi encontrado (+ 30%).

Assim, a determinação química dos estrogênios tem sido mais empregada para o diagnóstico dos distúrbios na gravidez do que como teste indicativo deste estado.

Progesteronúria.

A progesterona é encontrada na urina sob a forma de glicuronato de pregnandiol sódico quando o corpo lúteo ou a placenta estão funcionalmente ativas.

JONES e WEIL (1938), (33) removendo os corpos lúteos dos ovários de mulheres grávidas com 58 dias de gravidez determinaram diariamente por um período de 3 meses, o glicoronato de pregnandiol sódico eliminado pela urina. Com esta técnica encontraram valores de 15,08, a 26,4 mg por 24 horas. Em face destes resultados sugeriram a hipótese que a progesterona na gravidez é produzida pela placenta desde o primeiro mês e o seu desaparecimento da urina 24 horas após o parto confirma esta hipótese.

Por outro lado HAMBLÉN, ASHLEY e BAPTIST (1939), (30) estudaram minuciosamente o metabolismo da progesterona, determinando-a como glicoronato de pregnanediol sódico pela técnica gravimétrica. Concluíram que o aparecimento do pregnanediol na urina depende da formação da progesterona nos ovários pelos corpos lúteos post-ovulatórios, da transformação da progesterona em pregnanediol pelo endométrio, da conjugação do pregnanediol com o ácido glicurônico no fígado e da sua subsequente eliminação pelos rins.

A alteração de um destes órgãos reflete-se no metabolismo e excreção da progesterona.

VENNING e BROWNE (1936) (68) (1937) (69) (7), já haviam verificado que o pregnanediol é um produto do metabolismo da progesterona, normalmente presente na urina durante a fase lútea do ciclo menstrual normal e durante toda a gravidez, desaparecendo logo após o parto.

A eliminação total por ciclo variou de 3 a 54 mg em 9 ciclos normais, segundo aqueles autores.

Ainda em 1937, BROWNE, HENRY e VENNING (70) encontraram valores de 4 a 10 mg de pregnanediol por 24 horas, em mulheres com 60 dias de gravidez. Acompanhando estes casos determinaram o máximo de eliminação do oitavo mês que atingiu, 75-80 mg por 24 horas.

WEIL em 1938 (73) observou que nos casos de toxemia gravídica e eclampsia havia uma diminuição acentuada do pregnanediol na urina, fato este já assinalado por VENNING e BROWNE.

HAIN e ROBERTSON em 1939 (29) observando que o glicuronato de pregnanediol sódico só é eliminado durante a segunda fase do ciclo menstrual normal sugeriram a possibilidade de usar a sua determinação para o diagnóstico

precoce da gravidez. Apresentam apenas um caso em que foram feitas dosagens durante dois ciclos e a técnica empregada foi a de BROWNE e VENNING.

A excreção no primeiro ciclo do 10.^o ao 24.^o dia foi de 44,5 mg e no segundo ciclo, no mesmo período a eliminação foi de 114 mg.

O aumento verificado de um ciclo para outro levou-os a suspeitar de gravidez. O teste de ASCHHEIM e ZONDEK foi negativo no 28.^o dia do ciclo tornando-se positivo no 33.^o dia.

Em vista deste resultado aconselham o teste para o diagnóstico precoce. Porém, é difícil sem conhecer a eliminação do ciclo anterior, exclusão feita aos outros fatores, concluir se há ou não gravidez.

COPE, em 1940 (10), estudou detalhadamente a significação da presença do pregnanediol na urina de mais de 100 mulheres. Sugere como base diagnóstica, que nos casos de amenorréia em que se verifica a eliminação de pregnanediol há gravidez, e que a ausência desta significa um diagnóstico negativo.

BUXTON, neste mesmo ano (8), adotou também a determinação gravimétrica do glicuronato de pregnanediol para o diagnóstico da gravidez. Conclui porém que, a pesar da excreção do, pregnanediol desde o primeiro mês da gravidez ser maior que durante a fase lútea do ciclo menstrual normal, a sua dosagem não serve de base diagnóstica, uma vez que o seu metabolismo e excreção não dependem apenas do útero e dos ovários.

Recentemente, GUTERMAN (26) propôs um novo teste para o diagnóstico da gravidez empregando, em vez da técnica gravimétrica já clássica para o pregnanediol, uma reação corada.

O método de extração é semelhante ao de BROWNE e VENNING. Feita a hidrólise ácida da urina suspeita o pregnanediol é extraído com tolueno, purificado, precipitado e isolado. . . O resíduo é tratado com ácido sulfúrico. Se houver um desenvolvimento de cor amarelo-alaranjada, o teste é considerado positivo. Num total de 103 casos, sendo 39 de gravidez, houve apenas 5 resultados falsos assim distribuídos, 3 falsos negativos em casos de gravidez, 1 falso positivo num caso de amenorréia, um falso positivo num caso de cisto luteínico. A sensibilidade do método permite um diagnóstico 6 dias após o não aparecimento das regras.

O autor aconselha o emprêgo do método acima não só para o diagnóstico de gravidez como para orientação terapêutica nos casos de ameaça de aborto.

Relativamente, poucos autores têm usado a determinação gravimétrica ou colorimétrica do pregnanediol para o diagnóstico da gravidez.

Entretanto, a sua excreção durante a gestação tem sido largamente estudada. Assim, BACHMAN e Col. (4), HAIN (28), HAMBLÉN, CUYLER e BAPTIST (31) e outros têm procurado determinar a sua taxa de excreção e a significação na ameaça do abôrto, no abôrto incompleto, na morte do feto, distúrbios hipertensivos, toxemias e preeclampsia, como no diabetes, hidramnios, nefrites crônicas, etc.

Os resultados encontrados pelos diversos autores nesses casos demonstram que a presença de grandes ou pequenas quantidades de glicuronato de pregnanediol sódico na urina dessas pacientes, só tem significação para diagnóstico ou terapêutica quando são feitas várias determinações.

Como o presente trabalho é sobre técnicas químicas para o diagnóstico precoce da gravidez, limitamo-nos a citar apenas os casos gravídicos em que a determinação quantitativa da progesterona pode interessar.

Como não temos experiências nossas sobre o valor da excreção do pregnanediol no diagnóstico precoce da gravidez, damos a conclusão de COPE seguida da de HAIN e ROBERTSON: "A ausência de excreção do glicuronato de pregnanediol sódico pela urina tem o valor de um diagnóstico negativo, enquanto pequenas quantidades podem significar gravidez ou o prelúdio do aparecimento do fluxo menstrual (COPE)" (10).

Somente quando se conhece a excreção "do glicuronato de pregnanediol" sódico do ciclo anterior, pode-se ter um diagnóstico precoce seguro (HAIN e ROBERTSON).

Conclusões.

As determinações químicas, quer dos hormônios, quer das substâncias provenientes do metabolismo normal da gravidez, foram comentadas à medida que foram descritas. daquelas que temos experiência recomendamos a dosagem química dos hormônios gonadotróficos por ser, a) específica; b) porque a sua eliminação já está aumentada depois da primeira semana da gravidez; c) porque mesmo quando há insuficiência hepática ainda estes hormônios são eliminados em valores acima do normal; d) porque a técnica é de execução fácil, e rápida.

BIBLIOGRAFIA

- 1) — AHLMARK (A)
1944. Significance of blood histaminase in pregnancy *Lancet*, 247,6317, 406-07.
- 2) — ARMSTRONG (A. R.) e WALKER (E).
1932. The bromine reaction of pregnancy urine.
Bioch. Jour. 26, 143-46.

- 3) — BICKEL (A)
1936. Disoxydative Carbonuric und die Histidinausscheidung in der Schwangerschaft unter dem Einfluss verschiedenartiger Ernährung Bemerkungen zu dem Aufsatz von R. KAPPELLER-ADLER und WALTER SCHILLER.
Klin. Wochnschr. 15, 94-97.
- 4) — BACHMAN (C) LEEKLEY (D) HIRSCHMANN (H.)
1941. Urinary excretion of pregnanediol glucuronidate in the hypertensive disorders of pregnancy.
Jour. Clin. Endocrinol 1, 3, 206-210.
- 5) — BOWMAN (D. E.)
1939. The use of a reducing factor of pregnancy urine in the diagnosis of pregnancy.
J. Lab. Clin. Med. 24, 1072-1076.
- 6) — BOWMAN (D. E.)
1941. Some of the oxidation reduction properties of the chorionic gonadotropic hormone.
J. Biol. Chem., 137, (1), 293-302.
- 7) — BROWNE (J. S. C.) HERRY (J. S.), VENNING (E. M.)
1937. The corpus luteum hormone in pregnancy Jour. Clin. Invest 16, 678.
- 8) — BUXTON (C. L.)
1940. Pregnanediol determination as an aid in clinical diagnosis.
Am. Jour. Obst. Gynec 40, 2, 202-11.
- 9 — COHEN (S. L.), MARRIAN (G. F.)
1934. The application of the Kober test to the quantitative estimation of oestrine and oestriol in human pregnancy urine.
Bioch. Jour., 28, 1603.
- 10 — COPE (C. L.)
1940. The diagnostic value of pregnandioli excretion in pregnancy disorders.
Brit. M. J. 2, 545-49.
- 11) — CUBONI (E)
1934. Über eine einfache und schnelle chemischhormonale Schwangerschaftsreaktion.
Klin. Wochnschr., 13, (2), 843-847.
- 12) — DODDS (G. H.)
1930. Value of the bromine test for diagnosis of pregnancy.
Brit. Med. Jour. 1, 948-49.
- 13) — DODDS (G. H.)
1936. The Visscher — Bowman test for pregnancy.
Brit. Med. Jour. 2, 224-25.

- 14) — DOLFF (C)
1936. Bericht über einige Nachuntersuchungen der chemischen Schwangerschaftsreaktion von Visscher und Bowman.
Zentralbl. f. Gynäk, 59, 2901-4
- 15) — DUNN (R. D.) e NORTHWAY (F. J)
1938. Results with the Visscher-Bowman pregnancy test.
Am. Jour. Obst. Gyn. 35, 2, 298-300.
- 16) — EDLBACHER (S) e NEHER (M)
1934. Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels des Histidins.
Hoppe, Zeits. Sevler's f. Physiol. Chem. 224, 261-72.
- 17) — EFFKEMANN (G.), WERLE (E)
1940. The significance of the histamine metabolism in the pregnant and nonpregnant organism.
Arch. f. Gynäk., 170, 173.
- 18) — EVANS (H. M.) FRAENKEL-CONRAT (H.) SIMJSON (M. E) e Li (CH. H)
1939. Characterization of gonadotropic hormones of the hypophysis by their sugar and glucosamine content. Science, 89, 249-50.
- 19) — FERRARI (R. A.) e FRANCIS (D. J.)
1935. Experiencias con una nueva reacción química para el diagnóstico del embarazo. Semana Medica B A., 2, 555-56.
- 20) — FRECH (H. C. Jr.)
1937. Modification of Visscher-Bowman pregnancy test, with report on 513 observations. Am. Jour. Obst. Gynec. 33, 854-57.
- 21) — FRIEDRICH (D)
1936. Nachprüfung und Vereinfachung der Schwangerschaftsreaktion nach Visscher und Bowman.
Monat. f. G. und Gynäk, 103, 211-13.
- 22) — GERTLER (H)
1936. Untersuchungen über das Vorkommen von Histidin im menschlichen Harn.
Endokrinol. 17, 1/2, 45-47.
- 23) — GOODFRIEND (M. J) e DANIEL (M)
1943. The histidine test (Kapeller-Adler) in the diagnosis of pregnancy.
Am. Jour. Obst. Gynec. 45, 1, 140-43.
- 24) — GURIN (S), BACHMAN (C) e WILSON (D. W)
1939. The nature of the carbohydrate in the gonadotropic substance of pregnancy urine.
Science, 89, 62-63.

- 25) — GURIN (S)
1942. Carbohydrates of gonadotropic hormones.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, (1), 48-50.
- 26) GUTERMAN (H. S.)
1944. A human pregnancy test based upon a color reaction of pregnanediol in the urine.
Jour. Clin. Endocrinol, 4, 6, 262-67.
- 27) — HADLEY (H. G.)
1941. A note on the Visscher-Bowman Chemical test for pregnancy.
J. Lab. Clin. Med. 26, 8, 1374-75.
- 28) — HAIN (A. M.)
1942. Further observation on the role of progesterone (pregnanediol) and oestrogen in pregnancy.
Jour. Endocrinol, 3, 1, 10-63.
- 29) — HAIN (A. M.) e ROBERTSON (E. M.)
1939. Estimation of luteal activity and early diagnosis of pregnancy.
Lancet. 1, 6041, 1324-25.
- 30) — HAMBLÉN (E. C.), ASHLEY (C), BAPTIST (M)
1939. Sodium pregnanediol Glucuronide. The significance of its excretion in the urine. Endocrinol, 24, 1 1/12.
- 31) — HAMBLÉN (E. C.) CUYLER (W. K), BAPTIST (M)
1942. Pregnanediol determinations in gynecology and obstetrics.
Am. Jour. Obst. Gynec. 44, 3, 442-54.
- 32) — HANNAN (J. H.)
1930. The detection of the presence of the hormone of anterior pituitary body in the urine as an aid to the diagnosis of pregnancy.
Proc. Roy. Soc. Med., 23, 1, 634-39.
- 33) — JONES (H. W.) WEIL (P. G.)
1938. The corpus luteum hormone in early pregnancy. Report of a case in which there was early removal of the corpus luteum.
Jour. Am. Med. Assn. 111, 6, 519-21.
- 34) — KAPPELLER-ADLER (R)
1933. Über eine Methode zur quatitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbenson- dere von Gravidenharnem.
Bioch. Zeitschr. 264, 131-141.
- 35) — KAPPELLER-ADLER (R)
1934. Über eine neue chemische Schwangerschaftsreaktion.
Klin. Woch. 13, 1, 21-22.

- 36) — KAPPELLER-ADLER (R) e HERMANN (H)
1934. Zur frage der Histidinurie bei der gravidität.
Klin. Wochnscher. 13, 2, 34, 1220.
- 37) — KAPPELLER-ADLER (R) SCHILLER (W)
1935. Über die Histidinausscheidung in der Schwangerschaft unter dem Einfluss verschiedenartiger Ernährung.
Klin. Woch. 14, 50, 1790-92.
- 38) — KAPPELLER-ADLER (R) e HERMANN (H)
1936. Zur kenntnis der Histidinurie bei Graviden..
Klin. Wochnschr. 15, 21, 27, 977.
- 39) — KAPPELLER-ADLER (R) e BOXER (G)
1937. Über den Einfluss gonadotroper Hormone auf den Histidinabbau in der Leben.
Bioch. Zeit. 293, 3/4, 207-218.
- 40) — KAPPELLER-ADLER (R)
1940. Histidine metabolism in toxaemia of pregnancy. Isolation of histamine from the urine of patients with toxaemia of pregnancy.
Biochm. Jour. 35, 1-2, 213-18.
- 41) — KAPPELLER-ADLER (R)
1941. Histidine metabolism in normal and toxaemic pregnancy. Excretion of histidine in normal pregnancy urine and in urine of patients with toxaemia of pregnancy.
Jour. Obst. Gynaec. Brit. Emp. 48, 141-54.
- 42) — KOBER (S)
1931. Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons (Menformon)
Bioch. Zeitschr. 239, 209.
- 43) — KRAUS (S) e KOENIGSTEIN (R)
1941. Experiences with the pregnancy test of Kapeller-Adler histidinuria in pregnant women. Chinese Med. Jour. 59, 129.
- 44) — KRIEGER (V)
1936. Histidine in urine as indication of pregnancy.
Med. Jour. Australia, 1, 559-602.
- 45) — LANGLEY (W. D)
1941. Urinary histidine. Determination of histidine in normal and in pregnancy urines.
J. Biol. Chem. 137, 255-265.
- 46) — LOEHLE (L)
1936. Citação de Weisman. Jour. Obst. Gynec. 35, 2, 358. 1938.

- 47) — MELLO (M. I)
1942. Modificação do teste de Bowman para o diagnóstico da gravidez.
Rev. Brasil. Biol. 2, 343-348.
- 48) — MELLO (M. I)
1943. Novo método para o diagnóstico da gravidez baseado na determinação química do hormônio gonadotrófico da urina.
Rev. Brasil. Biol., 3, (1), 119-125.
- 49) — MELLO (M. I)
1944. Estudos e revisão dos principais testes para o diagnóstico precoce da gravidez. I. Testes Biológicos.
Mem. Inst. Cruz. 40, 3, 355-374.
- 50) — NEUHARDT (C. W.)
1938. Importance of correlating specific gravity of urine with intensity of color change in histidine pregnancy test.
Yale Jour. Biol. Med. 10, 261-69 (Abstract).
- 51) — NEUWEILER (W) GRIM (W)
1940. Histidinausscheidung im Harn.
Klin. Wochenschr. 19, 155-57.
- 52) — NIENDORF (F)
1940. Histidinausscheidung im normalen und pathologischen Harn.
Klin. Wochenschr. 19, 937-40.
- 53) — OHLIGMACHER (A)
1934. Schwangerschaftsreaktion nach Kapeller-Adler.
Klin. Wochenschr. 13, 2, 30, 1078-79.
- 54) — ÖSTÅDAL (B)
1937. Chemische Schwangerschaftsreaktion nach Visscher-Bowman.
Zentralbl für gynäk., 61, 5, 266-268.
- 55) — PLOTZ (E. J.)
1941. Über die Histidinausscheidung im Harn von Schwangeren.
Zentralbl. f. Gynäk 65, 309-15. (abstract).
- 56) — RACKER (E)
1940. Histidine detection and estimation in urine.
Bioch. Jour. 34, 1, 89-96.
- 57) — RACKER (E)
1941. Histidine in Urine.
Biochem. Jour. 35, 5-6, 667-71.
- 58) — RENTON (H)
1935. New pregnancy test, demonstrating presence of histidine in urine of pregnant woman. South Afr. Med. Jour. 9, 441-43.

- 59 — ROBERTSON (E. M.)
1939. Citado em Hain e Robertson (29).
- 60) — SAKAGUCHI (R)
1940. Über die Histidinausscheidung im Harn.
Jour. Bioch. 31, 289-302.
- 61) — SALA (S. L.)
1935. La hormona folicular y el diagnostico del embarazo en la mujer y en la yegua. Nueva reacción quimiohormonal.
Rev. Sud. Am. Endocr. Immunol. Quimiol. 17, 5, 325-29.
- 62) — SAVAGE (J) e WILLIE (H)
1937. A chemical test for pregnancy applied to the determination of estrin in the urine of normal and toxemic patients in the last trimester of pregnancy.
Am. Jour. Obst. Gynec. 33, 771-83.
- 63) — SCHMULOVITZ (M. J.) e WILLIE (H. B.)
1935. The chemical diagnosis of pregnancy by detection of estrin in urine.
Jour. Lab. Clin. Med. 21, 2, 210-16.
- 64) — SEIDMAN (T. R.)
1935. The determination of urinary histidins as a chemical test for pregnancy.
Am. Jour. Obst. Gynec. 29, 3, 451-53.
- 65) — SIDDALL (A), HU (S) HA (H) e WONG (W),
1931. Bromine water test for pregnancy. China Med. Jour. 45, 646-48.
- 66) — SMITH (G. V. S.) e SMITH (O. W.)
1934. Excessive Gonad-Stimulating Hormone and Subnormal Amounts of Oestrin in the Toxemias of Late Pregnancy.
Am. J. Physiol. 107, 128.
- 67) — STERN (K)
1935. Erfahrungen mit der chemischen Schwangerschaftsdiagnose nach Kapeller-Adler (Histidinnachweis im Harn).
Zentralbl. f. Gynäk. 59, 39, 2305-2308.
- 68) — VENNING (E. M.), BROWNE (J. S.)
1936. Isolation of a water-soluble pregnandiol complex from human pregnancy urine.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34, 5, 792-93.
- 69) — VENNING (E. M.)
1937. A gravimetric method for the determination of pregnanediol sodium glucuronide.
Jour. Bioch. 619, 473.

- 70 — VENNING (E. M.) e BROWNE (J. S. L.)
1937. The urinary excretion of sodium pregnanediol Glucuronidate in the human menstrual cycle. *Endocrinol* 21, 711.
- 71) — VISSCHER (J. P) e BOWMAN (D. E)
1934. Chemical determination of pregnancy.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31, 460.
- 72) — VOGÉ (C)
1929. A simple chemical test for pregnancy.
Brit. Med. Jour. 1, 929-30.
- 73) — WEIL (P. G.)
1938. The excretion of pregnandiol in the toxemias of pregnancy.
Science., 87, 2247, 72-73.
- 74) — WEISS (M)
1934. Über den Schwangerschaftsnachweis mittels der Histidinreaktion im Harm.
Klin. Wochschr. 13, 44, 1579-80.
- 75) — WERLE (E) e KRAUTZUM (I)
1938. Über die Bildung von Histamin aus Histidin durch tierische Gewebe.
Bioch. Zeitschr. 296, 5-6 315-324.
- 76) — WERLE (E), EFFKEMANN (G)
1940. The destruction of histamine by the blood of pregnant women.
Arch. f. Gynäk. 170, 82.
- 77) — YOUNG (A)
1933. Five Hundred and Nineteen Voge Bromine Tests of Urine for Pregnancy
Jour. Lab. Clin. Med. 19, 153-155.
- 78) — ZELLER (E. A) e BIRKHÄUSER (H)
1940. Chemical test for pregnancy.
Schwiz. med. Wochschr. 70, 975 (Abstract)
- 79) — ZELLER (G. A)
1940. A simple color reaction for pregnancy detection.
Naturwissensch. 28, 712 (Abstract).
- 80 — ZELLER (E. A)
1940. Methodics of the chemical determination of pregnancy. Microdetermination of ammonia.
Helvet. Chim. Acta, 23, 1509-12.
-