

EXCRECION URINARIA DE ESTROGENOS FRACCIONADOS, EN MUJERES CON CICLOS NORMALES (*)

Drs.: WASHINGTON RODRIGUEZ GUTIERREZ y JOSE CARLOS SALINAS HURTADO

El aislamiento e identificación de los estrógenos clásicos: estrona, 17-beta-estradiol y estriol eliminados por la orina durante el ciclo sexual femenino, tiene interés en el campo de la endocrinología ginecológica al permitir una mejor valoración de la función y patología ováricas, en comparación con los reportes dados por un estudio colpocitológico.

Tiene validez medir los estrógenos fraccionados en volúmenes de orina por 24 horas, al haberse demostrado claramente que las variaciones plasmáticas guardan paralelismo con la excreción urinaria (Preedy y Aitken, 1957). Asimismo, suele observarse niveles muy bajos inmediatamente después de la menstruación, seguido de dos elevaciones francas, una bien nítida hacia la mitad del ciclo y otra, más amplia, en plena fase luteínica, alrededor del 21º día (Loraine y Bell, 1963). También se ha destacado la importancia de otros metabolitos como la 2-hidroxiestrona (Fishman, 1963) y el 16-epiestriol con variaciones cíclicas propias (Nocke y Breuer, 1963).

El éxito obtenido con la introducción de métodos cromatográficos en nuestros laboratorios ha permitido realizar el fraccionamiento de estrógenos según la técnica de Brown (1955a), valorada en una comunicación anterior (Salinas, 1967) con respecto a los criterios de confianza y practicabilidad del método.

En el presente reporte comunicamos los valores hallados en la excreción urinaria por 24 horas, tanto de la estrona, 17-beta estradiol y estriol, en tres momentos del ciclo estral: fase folicular, ovulación y fase luteínica, procurando establecer algunos patrones de normalidad, útiles para interpolar otras mediciones efectuadas en condiciones patológicas.

MATERIAL Y METODOS

Grupo de mujeres normales.— Se escogieron 10 mujeres sanas, con edades entre los 21 y 29 años, todas presentaron ciclos regulares por más de

(*) Trabajo realizado en los Laboratorios Clínicos, Sección Endocrinología del Hospital A. Loayza, Facultad de Medicina, U.N.M.S.M.

un año, junto con historia menstrual normal, exceptuando un caso (ICK), que acusaba, el primer día, franca dismenorrea. Los datos importantes se resumen en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1
DATOS CLINICOS DE LAS 10 MUJERES NORMALES ESTUDIADAS

Nombre	Edad años	Talla (cm.)	Peso (Kg.)	Fr. Pulso (/min.)	Fr. Resp. (/min.)	Régimen Catamen.	Dismenorrea	Menarq. (años)
M.C.Y.	21	158	57	88	16	4/30	ausente	9
A.K.M.	29	156	55	88	16	7/28-30	moderada	11
P.C.P.	26	154	54	60	16	6-7/25-32	moderada	11
A.P.K.	27	157	51	80	16	4/30	moderada	13
E.A.K.	24	165	69	72	16	3-4/30	ausente	11
I.C.K.	21	156	47	88	16	3/28-30	severo	13
G.M.M.	23	160	55	82	17	4/28	moderada	13
C.B.T.	20	157	50	86	16	5/29	ausente	12
H.P.R.	25	152	47	84	18	3-4/28	ausente	12
L.J.O.	29	156	51	80	16	4/30	moderada	11

En cada caso con temperatura basal bifásica comprobada, se indicó realizar colecciones urinarias completas de 24 horas durante un ciclo menstrual, en la fase folicular, ovulación y fase luteínica. Las muestras se procesaron inmediatamente después de su recepción, o si no se guardaron bajo congelación hasta el momento de realizar las mediciones, y los volúmenes diarios se verificaron con la excreción de creatinina.

Método: Para la identificación y análisis cuantitativo de los estrógenos fraccionados se recurrió al método de Brown (1955a), adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio y descrito en un trabajo precedente (Salinas, 1967). Los pasos fundamentales se presentan en un esquema (esquema N° 1). El método comprende: Hidrólisis ácida en caliente con ácido clorhídrico, extracción y purificación de los esteroides fenólicos, partición entre agua y soda para separar la fracción fenólica fuerte (estriol) de la débil (estrona y 17-beta estradiol), metilación de las dos fracciones con sulfato de dimetilo en presencia de una solución tampón de ácido bórico, cromatografía de ad-

CUADRO N° 2

VALORES INDIVIDUALES CORRESPONDIENTES A LA EXCRECION URINARIA DE ESTROGENOS EN
10 MUJERES NORMALES DURANTE EL CICLO MENSTRUAL

Caso	Día del Ciclo	Volumen uri- nario (ml./24 hs.)	ESTROGENOS (ug./24 hs.)			
			Estrona	Estradiol	Estriol	E ₁ + E ₂ + E ₃
1) M.C.Y.	8°	1,570	8.4	1.0	10.7	20.1
	14°	1,750	24.3	7.1	23.9	55.3
	25°	1,590	10.9	2.2	25.7	38.3
2) A.K.M.	8°	875	11.1	2.0	8.2	21.3
	14°	1,450	4.2	2.4	41.1	47.7
	22°	920	10.1	0.0	17.5	27.6
3) P.C.P.	8°	1,050	4.1	0.0	11.3	15.4
	14°	900	8.1	4.1	19.4	31.6
	27°	1,390	3.4	2.3	10.0	15.7
4) A.P.K.	8°	1,250	6.1	1.7	10.3	18.1
	14°	790	7.5	4.7	7.3	19.5
	25°	1,450	10.3	3.1	6.2	19.6
5) E.A.K.	10°	910	10.6	4.7	24.2	39.5
	14°	1,200	11.4	2.6	38.3	52.3
	24°	1,200	15.5	3.2	30.2	48.9
6) I.C.K.	8°	850	5.0	0.0	3.0	8.0
	15°	1,450	23.0	3.9	40.6	67.5
	21°	1,200	15.2	2.3	16.4	33.9
7) G.M.M.	8°	860	5.2	1.0	3.2	9.4
	14°	820	8.1	2.6	7.3	18.0
	21°	1,210	10.3	2.3	6.2	18.8
8) C.B.T.	8°	950	10.8	5.1	25.0	40.9
	14°	1,530	24.6	8.2	42.6	75.4
	22°	1,300	15.7	6.2	25.8	47.7
9) H.P.R.	7°	1,200	7.0	2.0	12.6	21.6
	14°	1,090	16.1	6.5	26.0	48.6
	21°	1,470	14.5	4.8	18.1	37.4
10) L.J.O.	7°	1,010	6.9	1.5	14.9	23.3
	13°	1,640	15.6	8.5	25.9	50.0
	21°	1,280	12.9	3.7	12.7	29.3

E₁ = Estrona, E₂ = 17-beta estradiol, E₃ = Estriol.

sorción en 2 columnas de albúmina reactivada para purificar la primera fracción (estriol-3-metil-éter), y separar la segunda en sus dos constituyentes (estrón-3-metil-éter y 17-beta estradiol-3-metil-éter). Finalmente la colorimetría de las tres fracciones individualizadas se hizo por la reacción de Kober, seguido de lecturas espectrofotométricas corregidas según la fórmula de Allen (1950) a 474 mu., 515 mu. y 555 mu. (en espectrofotómetro Carl Zeiss).

RESULTADOS

Hemos preferido comunicar en el cuadro N° 2 los resultados obtenidos en cada caso, para observar mejor las variaciones individuales de las diversas fracciones estrogénicas ubicadas en tres momentos del ciclo y consignando los volúmenes urinarios.

En el cuadro N° 3 se aprecian las variaciones cíclicas de la estrón, estradiol y estriol, tomando los valores medios y sus correspondientes errores standard.

CUADRO N° 3

ESTROGENOS URINARIOS EN LOS 10 CASOS NORMALES, EXPRESANDO LOS VALORES MEDIOS EN ug./24 Hs.

Días del ciclo	Estrón M ± E.S.	Estradiol M ± E.S.	Estriol M ± E.S.	E ₁ + E ₂ + E ₃ M ± E.S.
7° — 8°	7.5 ± 0.82	1.9 ± 0.54	12.3 ± 2.18	21.7 ± 3.54
13° — 15°	14.3 ± 2.40	5.1 ± 0.78	27.2 ± 4.21	46.6 ± 7.39
21° — 25°	11.9 ± 0.80	3.0 ± 0.58	16.9 ± 2.64	31.8 ± 4.02

En el cuadro N° 4 se intercalan nuestros promedios y rangos junto con los comunicados por diversos autores que siguieron métodos comparables.

CUADRO N° 4

COMPARACION DE NUESTROS RESULTADOS CON LOS REPORTADOS POR OTROS AUTORES, TOMANDO LOS VALORES MEDIOS, DE CADA ESTROGENO URINARIO ANALIZADO EN UG./24 HORAS, Y RANGOS NORMALES QUE SE INDICAN PR LOS NUMEROS ENTRE PARENTESIS.

Días del ciclo	ESTRONA	ESTRADIOL	ESTRIOL	N° de casos	Edad media y rango
1) 7° — 8°	7.5 (4.1 — 11.1)	1.9 (0.0 — 5.1)	12.3 (3.0 — 25.0)	10	24.5 (20 — 29)
13° — 15°	14.3 (4.2 — 24.6)	5.1 (2.4 — 8.5)	27.2 (7.3 — 42.6)		
21° — 25°	11.9 (3.4 — 15.7)	5.3 (0.0 — 6.2)	16.9 (6.2 — 30.2)		
2) Aprox. 7°	5.0 (4.0 — 7.0)	2.0 (0.0 — 3.0)	6.0 (0.0 — 15.0)	8	(17 — 40)
„ 13°	20.0 (11.0 — 31.0)	9.0 (4.0 — 14.0)	27.0 (13.0 — 54.0)		
„ 21°	14.0 (10.0 — 23.0)	7.0 (4.0 — 10.0)	22.0 (8.0 — 72.0)		
3) 2° — 5°	4.7 (1.4 — 9.2)	2.7 (0.0 — 8.6)	6.2 (1.6 — 16.2)	17	42.3 (35 — 49)
18° — 21°	8.7 (2.6 — 20.5)	4.4 (0.0 — 11.4)	14.8 (2.9 — 36.0)		
4) 6° — 10°	5.7 (1.4 — 18.0)	2.9 (0.0 — 13.0)	6.8 (1.5 — 17.6)	10	(18 — 37)
11° — 16°	12.6 (2.5 — 24.6)	5.2 (1.0 — 23.0)	17.8 (2.7 — 73.8)		
17° — 28°	9.4 (2.2 — 23.6)	3.6 (0.0 — 13.2)	15.0 (4.0 — 58.7)		
5) 6° — 9°	7.8 (2.0 — 15.8)	3.5 (0.8 — 7.5)	10.2 (3.0 — 24.8)	7	27.0 (19 — 31)
14° — 15°	13.3 (4.5 — 21.0)	4.4 (1.0 — 9.5)	15.1 (5.3 — 31.5)		
19° — 26°	12.3 (8.0 — 19.9)	5.3 (1.3 — 8.2)	16.5 (12.3 — 25.2)		

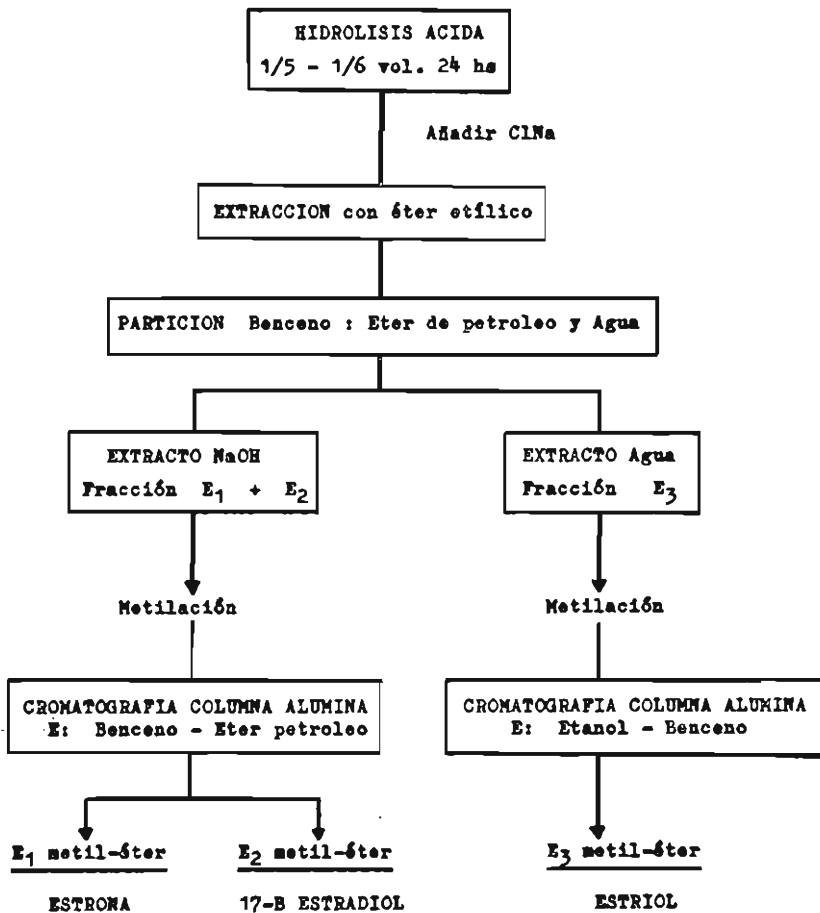
A U T O R

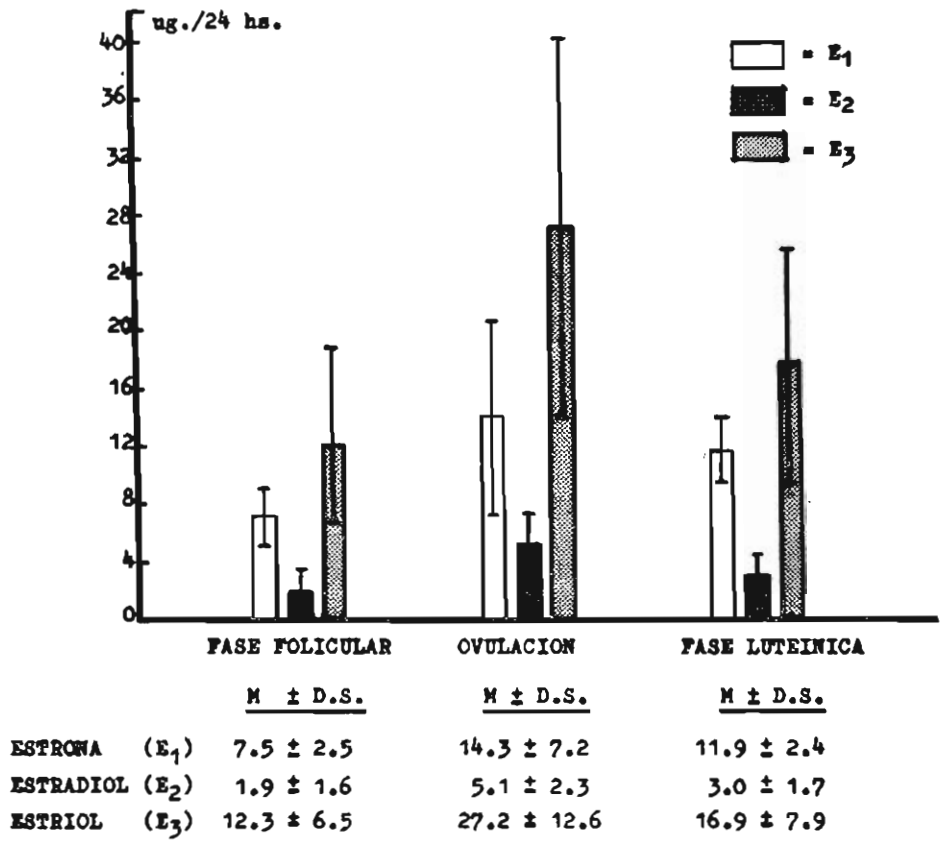
M E T O D O

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1) El presente reporte | BROWN (1955a) |
| 2) BROWN (1955b) | BROWN (1955a) |
| 3) DICZFALUSY y col. (1959) | BROWN y col. (1957) modificado |
| 4) LORAINE y BELL (1963) | BROWN (1955a) |
| 5) BELL y col. (1966) | BROWN (1955a) |

Se ha construido la gráfica N° 1 para ilustrar la relación de los valores medios con sus respectivas desviaciones standard, que hacen posible usarla con fines prácticos cuando se desee interpolar valores desconocidos obtenidos en mediciones rutinarias.

ESQUEMA Nº 1. Separación de ESTRONA, 17-B ESTRADIOL y ESTRIOL
Esquema del Método (Brown, 1955).





GRAFICA Nº 1. Estrógenos urinarios en 10 mujeres normales, considerando los valores medios y 1 desviación standard, obtenidos durante un ciclo.

DISCUSION

El método de Brown (1955a) seguido en nuestros análisis, ha permitido, con relativo éxito, identificar y cuantificar pequeñas cantidades de estrona, 17-beta estradiol y estriol en orina de mujeres con ciclos regulares.

Tanto el método original como su modificación posterior (Brown y col., 1957), ofrecen garantía con respecto a los criterios de confianza establecidos por diversos autores (Diczfalusy y col., 1959; Loraine y Bell, 1963), y también estudiados en nuestro grupo con anterioridad (Salinas, 1967). La recuperación de los esteroides puros agregados es aceptable (75 a 90%) y las cifras mínimas determinables con precisión, por alicuota, son para la estrona 0.4 ug. y para el 17-beta-estradiol y estriol de 0.7 ug. (Brown, 1955a; Brown y col., 1957). Estas evidencias permiten considerar al procedimiento como simple y adecuado para su aplicación rutinaria, con limitaciones impondibles al 17-beta-estradiol, dada sus cantidades tan pequeñas de excreción que se comprobaron en nuestra observación.

Los patrones de excreción de los estrógenos urinarios, descritos en los 10 ciclos, fueron similares a los reportados, durante el ciclo menstrual, por Brown (1955b), Diczfalusy y col (1959), Loraine y Bell (1963), Bell y col. (1966), entre otros. En la mayor parte de los casos estudiados, la variación lineal de cada estrógeno evidenció un pico bien definido a mitad del ciclo, con valores medios significativamente diferentes ($P < 0.005$) a los obtenidos en la fase folicular que resultaron los más bajos.

De las fracciones identificadas en los tres intervalos del ciclo, el estriol presentó las mayores cifras, seguido de la estrona y luego el estradiol con valores definitivamente menores. Estas evidencias sugieren que puede haber limitación en las mediciones del 17-Beta estradiol urinario, dependiente de la sensibilidad metodológica que se considera aceptable para concentraciones del orden de los 4 ug./24 hs. (Brown, 1955a); sin desmerecer el hecho fisiológico de una franca metabolización, hacia estriol, eliminado en cantidades importantes. Esto merecería comprobar investigando las tasas de producción estrogénica.

La efímera duración y ubicación del pico ovulatorio en la mitad del ciclo, destacada por Bell y Loraine (1965), explica que no fue posible observar en este intervalo la elevación característica, sobre todo en la estrona y estradiol, en algunos de nuestros casos (AKM y EAK), no obstante las otras evidencias de ovulación.

La información obtenida en nuestro estudio es posible completarla conduciendo mediciones seriadas por varios ciclos, estudio longitudinal que permitiría conocer con mayor precisión los patrones normales de excreción para los estrógenos urinarios.

RESUMEN

Se han realizado mediciones urinarias por cromatografía en columna de alúmina del 17-beta estradiol, estrona y estriol en 10 mujeres con historia menstrual normal y edades comprendidas entre 21 y 29 años. El estudio se hizo durante un ciclo y las muestras se tomaron en la fase folicular, a mitad del ciclo y en la fase luteínica.

El análisis de resultados indica que el estriol presentó las mayores cifras seguido de la estrona y luego el estradiol con valores definitivamente menores. A su vez las fracciones estrogénicas identificadas presentaron variaciones cíclicas con niveles muy bajos después de la menstruación, seguido de dos elevaciones, una franca y bien nítida alrededor de la ovulación y otra menor en plena fase luteínica.

SUMMARY

By using the Brown's procedure the authors have measured the urinary excretion of estrone, estradiol and estriol in a group of 10 normal women. Two peaks of excretion were observed: the first corresponding to ovulation and a second one in the luteal phase; both were significantly different of the values obtained in the first phase of the cycle.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— ALLEN, W. M.: A simple method for analyzing complicated absorption curves, of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocr.* 10: 71-83, 1950.
- 2.— BELL, E. T. & LORAINE, J. A.: Time of ovulation in relation to cycle length. *Lancet*, 1: 1029-1030, 1965.
- 3.— BELL, E. T., MUKERJI, S., LORAINE, J. A. & LUNN, S. F.: The relationship of gonadotrophin excretion to ovulation during the menstrual cycle. *Acta Endocr. (Kbh.)* 51: 578-590, 1966.
- 4.— BROWN, J. B.: A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. *Biochem. J.* 60: 185-193, 1955a.
- 5.— BROWN, J. B.: Urinary excretion of oestrogens during the menstrual cycle. *Lancet*, 1: 320-323, 1955b.
- 6.— BROWN, J. B., BULBROOK, R. D. & GREENWOOD, F. C.: An additional purification step for a method for estimating oestriol, oestrone and oestradiol-17B in human urine. *J. Endocr.* 16: 49-56, 1957.
- 7.— DICZFALUSY, E., NOTTER, G., EDSMYR, F. & WESTMAN, A.: Estrogen excretion in breast cancer patients before and after ovarian irradiation and oophorectomy. *J. Clin. Endocr.* 19: 1230-1244, 1959.
- 8.— FISHMAN, J.: Role of 2-hydroxyestrone in estrogen metabolism. *J. Clin. Endocr.* 23: 207-210, 1963.
- 9.— LORAINE, J. A. & BELL, E. T.: Hormone excretion during the normal menstrual cycle. *Lancet*, 1: 1340-1342, 1963.
- 10.— NOCKE, W. and BREUER, H.: Eine Chemische Methode zur Bestimmung von 16-epi-Oestriol im Urin des Menschen. *Acta Endocr. (Kbh.)* 44: 47-66, 1963.
- 11.— FREEDY, J. R. K. & AITKEN, E. H.: Plasma-oestrogen levels in late pregnancy, in the normal menstruating female, and in the male. *Lancet*, 1: 191-192, 1957.
- 12.— SALINAS, J. C.: Estrógenos urinarios en el ciclo menstrual, Ts. Br. U.N.M.S.M., Facultad de Medicina, Lima, 1967.