

ESTROGENOS URINARIOS EN EL CICLO MENSTRUAL

JOSÉ SALINAS HURTADO

Las primeras investigaciones sobre aislamiento e identificación de los estrógenos fueron hechas en la orina de mujeres embarazadas. La determinación química de estas hormonas en la orina de mujeres normales tropezaba con obstáculos formidables, dada la pequeñez de las cantidades excretadas y las grandes proporciones de material contaminante; por esas razones solamente hace poco más de un decenio y gracias a la introducción de los métodos cromatográficos, se logró desarrollar un procedimiento que sobreponiéndose a esas dificultades pudo ser aplicado por primera vez al dosaje químico de los tres estrógenos clásicos: estrona, 17B-estradiol y estriol, en la orina de mujeres normales durante el ciclo menstrual, Brown; (1). Ese método fue el resultado de varios años de paciente y ardua investigación de la Escuela de Edimburgo inspirada por el profesor Marrian (2). Modificaciones posteriores de este método o de otros desarrollados paralela e independientemente han permitido extender su utilidad hasta el dosaje de cantidades aún más pequeñas de estrógenos como las excretadas por el hombre normal (3), (4), (5) o por la

mujer menopáusica (6), (7) y aún las ínfimas cantidades presentes en la sangre Preedy y Aitken, (8); Svendsen y Sorensen, (9); Roy, (10); Schrepfe y Nicholas, (11).

Revisando la literatura nacional encontramos como trabajo precursor en este terreno el de Naveda y Naveda, (12) quien estudió las variaciones de la estrogenemia empleando un método biológico. Posteriormente Codina, (13) investiga la estrogenemia en el aborto empleando un método químico.

Al introducirse los métodos cromatográficos en los Laboratorios Clínicos de la Facultad de Medicina se pudo estudiar, por primera vez, semicuantitativamente los niveles urinarios de estriol en la gestación normal, Meza Bedroni, (14) y en algunas de sus alteraciones patológicas, Queirolo Maglio, (15). El método de purificación que ellos usaron fue la cromatografía en capa fina.

El presente trabajo constituye entre nosotros la primera comunicación sobre dosaje fraccionado de estrógenos en la orina a los niveles tan bajos que se halla en la mujer normal no gestante.

MATERIAL Y METODOS

Material

Los sujetos que proporcionaron las muestras para el presente trabajo fueron 8 voluntarias normales, cuyas edades oscilaron entre los 18 y 38 años, con un promedio de 25.5 años. Ellas fueron consideradas como sanas desde el punto de vista de un interrogatorio exhaustivo realizado sobre el modelo de las historias clínicas habituales; el examen clínico, por razones obvias, fue reducido al mínimo. A continuación presentamos en forma resumida los datos más importantes de cada una.

Caso N° 1. M. C. Y. 21 años. G: O; P: O. Menarquia a los 9 años; R. C.: 4/30 regular cantidad sin molestias; no hay trastornos premenstruales. Antecedentes: eruptivas en la infancia, no tuvo fiebre urliana ni brucelosis. Talla: 158 cm.; peso: 57 kg.; pulso: 88/min. frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 2. A. K. M. 29 años. G: O; P: O. Menarquia a los 11 años; R. C.: 7/28-30; regular cantidad, acompañada durante todo su curso de dolor tipo cólico en ambos flancos, que se inicia 2-4 días antes; no refiere otras molestias. Antecedentes: eruptivas en la infancia, no tuvo fiebre urliana ni brucelosis; Talla: 156 cm.; Peso: 55 kg.; pulso: 88/min.; frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 3. P. C. P. 26 años. G: O; P: O. Menarquia a los 11 años; R. C.: 6-7/25-32; muy irregular; regular cantidad, acompañando los dos primeros días de dolor abdominal de tipo cólico; hacia la mitad del ciclo presenta casi constantemente una pérdida sanguínea muy discreta y hacia el final presenta sensación de tensión y pesadez que aumentan progresivamente hasta presentarse edema

manifiesto y aumento de peso corporal hasta de 2 kg. Antecedentes: eruptivas, hepatitis y fiebre urliana en la infancia; no tuvo brucelosis. Talla: 154 cm., peso: 54 kg.; pulso: 60/min.; frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 4. A. P. K. 27 años. G: O; P: O. Menarquia a los 13 años; R. C.: 4/30; regular cantidad precedida en un día por dolor gravativo en los flancos, y ocasionalmente por sensación nauseosa que se presenta aproximadamente una semana antes; no refiere otras molestias. Antecedentes: eruptivas y fiebre urliana en la infancia; salmonelosis en una ocasión; no tuvo brucelosis. Talla: 157 cm.; peso: 51 kg.; pulso: 80/min.; frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 5. E. A. K. 24 años. G: O; P: O. Menarquia a los 11 años; R. C.: 3-4/30; escasa cantidad, sin molestias; no hay trastornos premenstruales. Antecedentes: eruptivas en la infancia; hepatitis a los 3 años, fiebre urliana a los 5 años, obesidad progresiva desde la infancia, acné rebelde en la adolescencia; no tuvo brucelosis. Talla: 165 cm.; peso: 69 kg.; pulso: 72/min.; frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 6. E. C. K. 38 años. G: O; P: O. Menarquia a los 12-13 años R. C.: 4-5/28-30; regular cantidad acompañado de dolor abdominal de tipo cólico; no hay trastornos premenstruales. Antecedentes: eruptivas en la infancia; salmonelosis en una ocasión; no tuvo fiebre urliana ni brucelosis. Talla: 155 cm.; peso 50 kg.; pulso: 84 min. frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 7. J. C. K. 18 años. G: O; P: O. Menarquia a los 12 años. R. C.: 5-6/32; regular cantidad, acompañado de dolor lumbar de presentación ocasional; no hay trastornos premenstruales. An-

tededentes: eruptivas en la infancia; fiebre urliana a los 9 años; no tuvo brucelosis. Talla: 157 cm.; peso: 45 kg.; pulso: 80/min. frecuencia respiratoria: 16/min.

Caso N° 8. I. C. K. 21 años. G: O; P: O. Menarquia a los 13 años. R. C.: 3/28-30; regular cantidad acompañada de dolor abdominal tipo cólico, muy intenso el primer día; no hay trastornos premenstruales. Antecedentes: eruptivas en la infancia; fiebre urliana a los 19 años; no tuvo brucelosis. Talla: 156 cm.; peso: 47 kg.; pulso 88/min.; frecuencia respiratoria: 16/min.

Además de este grupo de voluntarias normales, en el curso de nuestro trabajo tuvimos ocasión de conocer, seguir de cerca y colaborar en el diagnóstico de un caso muy interesante de pseudohermafroditismo masculino que presentamos a continuación.

..Caso N° 9. A. R. O. 26 años: natural de Chiclayo con 3 años de residencia en Lima; se dedica al comercio minorista y además estudia el 2° año de Secundaria. Ingresó al Pabellón N° 9 del Hospital "Arzobispo Loayza" el día 18/10/66, ocupando la cama N° 27. Sus padres habían fallecido hace mucho tiempo y la paciente no sabía dar datos respecto a ellos. Aparte de eruptivas en la infancia no refería otros antecedentes patológicos de importancia. Desde los 16 años presenta un flujo muy escaso por vía genital el cual se presentaba cada 30-60 días y era considerado por la paciente como su menstruación, duraba de 2-3 días. Refería que desde diciembre de 1965 había notado la presencia de una tumoración en la ingle izquierda que aumentaba o disminuía de volumen en relación con los ejercicios y ocasionalmente le producía dolor, razón por la cual decidió acudir a un servicio de cirugía pa-

ra que se la extirparan. Sus funciones biológicas eran normales y hasta refería un aumento del apetito. Aparte de un discreto nerviosismo, la paciente refería sentirse en buen estado.

El examen clínico mostraba una paciente en muy buen estado general, de conformación un tanto androide y desarrollo normal, piel fina, apéndices normales, no presentaba hirsutismo y se insinuaban entrantes en la línea de implantación del cabello, no presentaba alteraciones de la voz. Se reconocía la tumoración herniaria en la región inguinal izquierda, pequeña, de consistencia firme y dolorosa, sin crepitación; una tumoración de características similares era reconocible en el lado derecho. Los genitales externos presentaban el aspecto confuso de un pseudohermafroditismo; la aparente vagina era hipoplásica, no permitiendo la exploración digital, parecía terminar en fondo de saco; al tacto rectal no se detectaba la presencia de genitales internos y algunos de los exploradores creyeron palpar más bien un órgano de localización mediana, con todos los caracteres de la próstata masculina.

Desde el punto de vista de los exámenes auxiliares, además de las determinaciones de estrógenos, que se hicieron dentro del marco del presente trabajo por lo que serán presentadas y discutidas más adelante, se le practicó:

El 21/11/66, con un volumen urinario de 1,170 ml. en 24 horas:

- determinación de los 17-cetoesteroides: 12.3 mg./24 horas
- determinación de los 17-hidroxicorticoides: 9.7 mg./24 horas
- determinación de los esteroides 17-cetogénicos: 16.6 mg./24 horas
- determinación de las gonadotropinas hipofisarias: 12 u.f./24 horas.

El 27, 11, 66, con un volumen urinario de 1,680 ml. en 24 horas:

- determinación de los 17-cetoesteroides: 11.6 mg./24 horas
- determinación de los 17-hidroxicorticoides: 8.6 mg./24 horas
- determinación de los esteroides 17-cetogénicos: 14.4 mg./24 horas.

Además se practicó el estudio de la cromatina sexual leucocitaria¹ que arrojó una proporción de 3%.

La laparotomía fue practicada posteriormente y el estudio microscópico de la tumoración extirpada demostró que se trataba de un órgano mal diferenciado con las características de un testículo.

Métodos

Cada una de las ocho voluntarias que tomaron parte en este trabajo recibió una cartilla con instrucciones para el registro diario de la temperatura basal corporal durante todo el ciclo en estudio y también para la recolección de las muestras de orina de 24 horas. Salvo el caso N° 2 cuyo registro fue axilar, en todos los demás casos éste fue oral. Cada sujeto realizó 3 colecciones urinarias de 24 horas correspondiendo a los días 7°-8°; 14°-15° y 21°-25° del ciclo, considerando como primer día al primero del flujo menstrual; en dos casos, para evitar interferencias con sus ocupaciones habituales, las colecciones salieron de esos cánones y fueron practicadas en los días 10° (sue-

to N° 5) y 27° (sujeto N° 3), sus resultados fueron excluidos del cálculo de los promedios.

Las muestras fueron colectadas, en casi todos los casos, en frascos de vidrio de los usados para la infusión endovenosa de soluciones glucosadas, los cuales fueron preparados de antemano por nosotros según el procedimiento seguido con todo el material de vidrio usado en el método que mencionaremos más adelante. No se agregó a las muestras ninguna sustancia preservativa y en los pocos casos en que no se les pudo someter a la hidrólisis inmediatamente después de su recepción, las muestras fueron guardadas en el congelador a -4°C.

Las colecciones urinarias del caso N° 9 hechas en las fechas 21/11/66 y 27 11/66, fueron controladas por el personal de la sala según instrucciones proporcionadas por este laboratorio y contenidas en una cartilla. Inmediatamente después de su colección fueron remitidas al laboratorio donde fueron tratadas como las demás.

En todos los casos en que los volúmenes urinarios de 24 horas resultaron inferiores a 1,000 ml., se determinó la tasa de creatinina para asegurar la totalidad de la colección. Se usó el método de Phillips (16), que es el que se emplea rutinariamente en este laboratorio y está basado en la clásica reacción de Jaffé que consiste en la formación de un complejo coloreado por reacción de la creatinina con el ácido pícrico en presencia del hidróxido de sodio y lectura posterior en el fotocolorímetro de Klett-Summerson o en el espectrofotómetro de Coleman a 515 milimicras.

La determinación fraccionada de los estrógenos se hizo siguiendo el método de Brown (1).

¹ Este trabajo se realizó en la Sección de Hematología por el Dr. Alejandro Padrón y todas las determinaciones hormonales antedichas estuvieron a cargo del Dr. Washington Rodríguez de la Sección de Endocrinología de este laboratorio

Reactivos

1) Acido clorhídrico fumante P. A. (E. Merck A. G.).

2) Eter etílico P. A. (E. Merck A. G.), lavado con solución saturada de sulfato ferroso y agua, redestilado, guardado en frasco oscuro y usado dentro de los 15 días.

3) Eter de petróleo (p.e.: 40-60°C). (E. Merck A. G.), redestilado y saturado con agua.

4) Benceno P. A. (J. T. Baker Chemical Co.), redestilado y saturado con agua. El benceno recuperado se lavó completamente con agua y se destiló.

5) Etanol absoluto P. A. (E. Merck A. G.), refluído con lentejas de NaOH para eliminar los aldehidos y destilado dos veces.

6) Acido bórico cristalizado P. A. (E. Merck A. G.).

7) Sulfato de dimetilo P. S. (E. Merck A. G.), redestilado.

8) Hidróxido de sodio en lentejas y bicarbonato de sodio en polvo P. A. (E. Merck A. G.), se preparó soluciones p/v.

9) Solución concentrada de carbonato de pH 10.5 (aproximadamente) se preparó añadiendo 150 ml. de NaOH al 20% a 1 litro de la solución de bicarbonato de sodio al 8%.

10) Peróxido de hidrógeno al 30% (E. Merck A. G.).

11) Alúmina, malla N° 100/150 y actividad del grado II-III según Brockmann y Schodder fue reactivada con 9.5% de agua para obtener la actividad que se especifica más adelante.

Reactivos de color

1) Para el estriol, se preparó diluyendo 20 gm. de quinol en 1 litro de ácido sulfúrico al 76% (v/v).

2) Para la estrona se preparó diluyendo 20 gm. de quinol en 1 litro de ácido sulfúrico al 66% (v/v).

3) Para el estradiol se preparó diluyendo 20 gm. de quinol en 1 litro de ácido sulfúrico al 60% (v/v).

El quinol fue de grado para laboratorio (British Drug Houses Ltd.) y el ácido sulfúrico purísimo (E. Merck A. G.).

La solución fue acelerada por calentamiento.

Los reactivos estuvieron guardados por lo menos 24 horas antes de su uso.

El reactivo para el estriol fue generalmente de color amarillo claro, el de la estrona entre castaño claro y rosado y el del estradiol rosado claro. Permanecieron estables casi indefinidamente en la oscuridad a la temperatura ambiente.

Soluciones standard. Se preparó soluciones standard (10 μ g/ml) de cada uno de los éteres metílicos de los tres estrógenos, en etanol: estrona-3-metil éter (Sigma Chemical Co.):

-B-estradiol-3-metil éter (Sigma Chemical Co.);

-estriol-3-metil éter (Sigma Chemical Co.).

Las soluciones se guardaron a 4°C y permanecieron estables casi indefinidamente.

Aparatos

El material de vidrio se enjuagó con agua de caño después de su uso y luego con agua destilada, salvo cuando se apreciaba visiblemente la suciedad en cuyo caso se lavó de la siguiente manera:

- a) empapando con mezcla sulfocrónica;
 - b) lavado con agua de caño;
 - c) remojando en solución ácido-sulfito;
- y

d) enjuagando con agua de caño y agua destilada antes de proceder al secado.

La solución ácido sulfito se preparó acidificando el sulfito neutro de sodio aproximadamente al 0.2% con ácido sulfúrico y fue usada para destruir las trazas del ácido crómico que de otro modo resultarían perjudiciales al método.

Los tubos de vidrio para cromatografía tienen un diámetro interno de 13 mm. y una capacidad de 40 ml.; en su extremidad afilada en punta fueron sellados con algodón de vidrio, para obtener una velocidad de flujo de 1 gota/2 segundos. La recepción de las fracciones se hizo en tubos de centrífuga de fondo cónico, de material Pyrex, provistos de tapa esmerilada y con una capacidad de 50 ml.

Las densidades ópticas se midieron en el espectrofotómetro de Coleman usando sus tubos standard de lectura que tienen una capacidad de 15 ml.

Descripción del método

1) *Hidrolisis y extracción.* Se cuantifica una alícuota de orina de 200 ml. hasta su ebullición bajo condensador de reflujo. Se añade 30 ml. de HCl concentrado a través del condensador y se hace hervir la mezcla orina-HCl por 60 minutos, enfriándola luego rápidamente bajo un chorro de agua de caño. Se extrae la orina hidrolizada y enfriada, una vez con 200 ml. y otra vez con 100 ml. de éter etílico. Se lava después el éter con 80 ml. de una solución concentrada de carbonato de sodio de pH 10.5, la cual se elimina. Se agita luego vigorosamente con 20 ml. de la NaOH al 8%. La capa de NaOH no se elimina, se neutraliza parcialmente con 80 ml. de bicarbonato de sodio al 8% y se vuelve a agitar con la capa de éter. Se elimina entonces la ca-

pa acuosa y se lava el éter primero con 20 ml. de bicarbonato de sodio al 8% y después con 10 ml. de agua destilada. Se elimina el agua tan completamente como sea posible.

2) *Extracción y metilación de las fracciones denólicas.* Se vierte la solución etérea en un matraz y se destila el éter hasta su desecación en baño de María, se añade etanol para disolver el residuo, puesto que el estríol no se disuelve fácilmente en benceno y se deja enfriar.

Se trasfiere el contenido del matraz con 20 ml. de benceno a un embudo de decantación que contenga 25 ml. de éter de petróleo. Se extrae la solución benceno-éter de petróleo con 2 volúmenes de 25 ml. de agua y después con 2 de 25 ml. de NaOH al 1.6%.

Los extractos acuosos que contienen la fracción de estríol se recogen en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml., provisto de tapa esmerilada, el cual contiene 0.9 g. de ácido bórico y 4 ml. de NaOH al 20%. Los extractos alcalinos que contienen las fracciones de estrona y estradiol se recogen en un matraz similar el cual contiene solamente 0.9 g. de ácido bórico. Se colocan los dos matraces en baño María a 37°C y se añade a cada uno 1 ml. de sulfato de dimetilo. Estas sustancias deben manejarse con mucho cuidado bajo tiro de humo y midiendo los volúmenes con pipeta de seguridad. Se agitan los matraces hasta que el ácido bórico y el sulfato de dimetilo se disuelvan y se mantienen a 37°C por 10 a 30 minutos. Se repite el procedimiento añadiendo 1 ml. más de sulfato de dimetilo junto con 2 ml. de NaOH al 20% para reponer el que fue neutralizado por el primer volumen de 1 ml. de sulfato de dimetilo.

Se agitan los matraces hasta que se disuelva el sulfato de dimetilo y se mantiene a 37°C por un tiempo adicional de 20 a 30 minutos y se enfría, o se deja a la temperatura ambiente por toda la noche.

3) *Dstrucción de las sustancias contaminantes por oxidación y extracción de los estrógenos metilados.* Se añade 10 ml. de NaOH al 20% y 2.5 ml. de peróxido de hidrógeno al 30% a cada uno de los matraces y se transfiere su contenido a embudos de decantación. La fracción de estriol metilado se extrae con 25 ml. de benceno, y las fracciones de estrona y estradiol metilados se extraen con 25 ml. de éter de petróleo; se usa primero los solventes para enjuagar los correspondientes matraces de metilación.

Los extractos de benceno y éter de petróleo se lavan 2 veces con 2 volúmenes de 5 ml. de agua y se elimina el agua tan completamente como sea posible.

4) *Cromatografía.* Se prepara cada columna saturando parcialmente el tubo de cromatografía con benceno o éter de petróleo, según sea el caso y luego se añaden 2 gr. de alúmina cuya actividad ha sido establecida por los procedimientos que se describen más adelante; en chorro tenue para evitar el ingreso de aire durante su pasaje por el solvente. Cuando ha sedimentado la alúmina, se nivela su superficie. Los solventes se dejan pasar hasta 0.5 a 1 cm. de la superficie de la alúmina, pero nunca por debajo de ella, antes de añadir otro solvente.

La fracción de estriol metilado en benceno, se aplica a la columna de alúmina preparada con benceno, cuidando de no transferir nada de agua. Se eluye entonces la columna con:

a) 12 ml. de una mezcla de etanol

al 1.4% en benceno; el efluente extrae la banda de pigmento urinario y se descarta y

b) 15 ml. de una mezcla de etanol al 2.5% en benceno; el efluente contiene todo el éter metílico de estriol y se recoge para colorimetría.

Las fracciones de estrona y estradiol metilados contenidos en éter de petróleo se aplican de manera similar a otra columna de alúmina preparada con éter de petróleo. Se eluye la columna con:

a) 12 ml. de una mezcla de benceno al 25% en éter de petróleo; el efluente se descarta;

b) 15 ml. de una mezcla de benceno al 40% en éter de petróleo; el efluente que contiene todo el éter metílico de estrona se recoge para colorimetría;

c) 12 ml. más de la misma mezcla de benceno al 40% en éter de petróleo; el efluente se descarta; y

d) 12 ml. de benceno; este efluente que contiene todo el éter metílico de estradiol se recoge para colorimetría.

5) *Evaporación de los solventes.* A cada uno de los tubos que contienen los eluidos se agrega 4 mg. de quinol (0.2 ml. de una solución al 2% p/v. en etanol). Las soluciones se evaporan hasta sequedad por calentamiento de Baño María. Los tubos para el blanco contienen solamente quinol y se preparan al mismo tiempo.

6) *Desarrollo del color y colorimetría.* Se añade 3 ml. del reactivo de quinol correspondiente a cada fracción estrogénica en sus tubos, los cuales se calientan entonces durante 20 minutos en Baño María hirviendo. Se agitan los tubos 2 veces, durante los primeros 6 minutos de calentamiento. Después del calentamiento, los tubos se enfrían en baño de

Cuadro N° 1. Valores individuales correspondientes a la excreción urinaria de Estrógenos en 8 mujeres normales durante el Ciclo Menstrual

Caso.	Día del ciclo	Volumen urinario (ml./24 h)	Creatinina. (g./24 h)	Estrógenos (μ g./24 horas)				
				E ₁	E ₂	E ₃	E ₁ + E ₂ + E ₃	
1) M.C.Y.	8º	1,570		8.4.	0.0	10.7	19.1	
	14º	1,750		24.3	7.1	23.9	55.3	
	25º	1,590		10.9	2.2.	25.7	38.3	
2) A.K.M.	8º	875	1.2	11.1	0.0	8.2	19.3	
	14º	1,450		4.2	2.4	41.1	47.7	
	22º	920	1.2	10.1	0.0	17.5	27.6	
3) P.C.P.	8º	1,050		4.1	0.0	11.3	15.4	
	14º	900	1.0	8.1	4.1	19.4	31.6	
	27º	1,390		3.4	2.3	0.0	5.7	
4) A.R.K.	8º	1,250		6.1	1.7	10.3	18.1	
	14º	790	1.7	7.5	4.7	7.3	19.5	
	25º	1,450		10.3	3.1	6.2	19.6	
5) E.A.K.	10º	910	1.1	10.6	4.7	24.2	39.5	
	14º	1,200		11.4	2.6	38.3	52.3	
	24º	1,200		15.5	3.2	30.2	48.9	
6) E.C.K.	7º	1,150		8.4	2.2	10.7	21.3	
	14º	800	1.2	3.9	0.0	5.7	9.6	
	21º	1,010		9.1	1.4	7.9	18.4	
7) J.C.K.	8º	750	0.8	0.9	0.0	3.0	3.9	
	14º	720	0.8	5.6	0.0	28.7	34.3	
	21º	1,120	0.8	8.5	1.8	22.1	32.4	
8) I.C.K.	8º	850	0.6	5.0	0.0	3.0	8.0	
	15º	1,450		23.0	3.9	40.6	67.5	
	21º	1,200		15.2	2.3	16.4	38.9	

agua helada. Se añade 1 ml. de agua a cada tubo con estriol, 0.5 ml. a cada tubo con estrona y 0.2 ml. a cada tubo con estradiol. Se agitan los tubos y se vuelven a calentar en el Baño de María hirviendo por 10 minutos.

En el método original de Brown (1), la lectura se hace después de este paso, en espectrofotómetro Unicam S. P. 600 usando celdas de 1 cm. En este laboratorio se ha desarrollado un paso adicional para adaptar las lecturas al espectrofotómetro de Coleman del que se dispone; consiste en enfriar los tubos durante 10 minutos en baño de agua helada y agregar luego a cada uno 5 ml. de ácido sulfúrico al 30%, agitar, volver a calentar en el Baño de María hirviendo por 3 minutos y enfriar en agua helada para proceder a la lectura.

Las densidades ópticas se miden contra los blancos de reactivos que han seguido el mismo procedimiento. Las longitudes de onda que fueron previamente determinadas en este laboratorio y encontradas adecuadas fueron las siguientes:

- para estriol y estrona: 470, 510 y 550 milimicras;
- para estradiol: 475, 515 y 55 milimicras.

Se corrige las densidades ópticas

aplicando la fórmula propuesta por Allen (17).

Las lecturas corregidas serían:

— para estriol y estrona:

$$DO_{510} - (DO_{470} + DO_{550})/2$$

— para estradiol:

$$DO_{475} - (DO_{515} + DO_{555})/2$$

Las cantidades de éteres metílicos de los estrógenos presentes en cada tubo se hallan aplicando las densidades ópticas corregidas a la curva de calibración standard propia de cada uno, preparada con éteres metílicos puros.

Estas se convierten luego en las cantidades correspondientes de estrógenos libres multiplicando por la relación de pesos moleculares. En la práctica hemos omitido este paso teniendo en cuenta que la mencionada relación es muy próxima a la unidad.

La excreción de 24 horas se calcula de este valor y del volumen de orina por 24 horas.

RESULTADOS

En el cuadro N° 2 presentamos los promedios y desviaciones standard de nuestros casos.

Como ilustración presentamos gráficamente cuatro de nuestros casos.

Cuadro N° 2. Estrógenos urinarios en 8 mujeres normales: promedio y una desviación standard ($\mu\text{g.}/24$ horas).

Días del ciclo	N° de casos	Estrona (E_1)	Estradiol	(E_2) Estradiol (E_3)	$E_1 + E_2 + E_3$
7° — 8°	7	6.4 ± 3.1	0.6 ± 0.9	8.2 ± 3.4	18.9
14° — 15°	8	11.2 ± 7.6	3.1 ± 2.2	25.6 ± 13.3	39.7
21° — 25°	7	11.4 ± 2.6	2.0 ± 1.0	18.0 ± 8.2	31.4

Abreviaturas usadas: E_1 = estrona; E_2 = 17 B-estradiol; E_3 = estriol.

Gráfico N° 1.—Excreción de estrógenos en el caso N° 1.

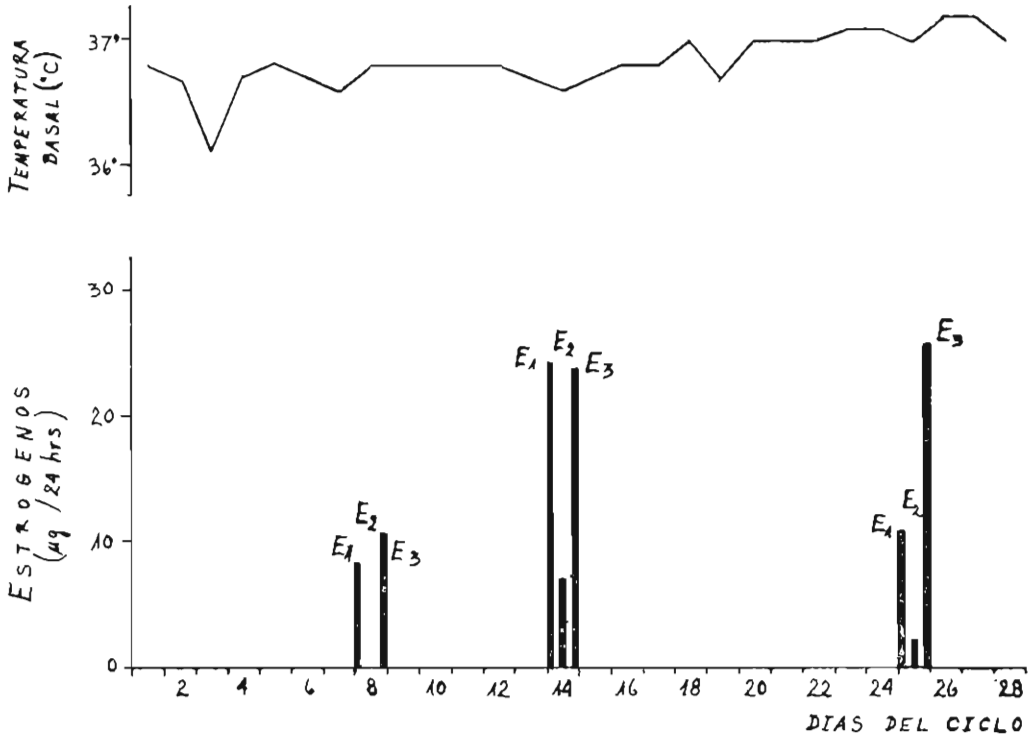
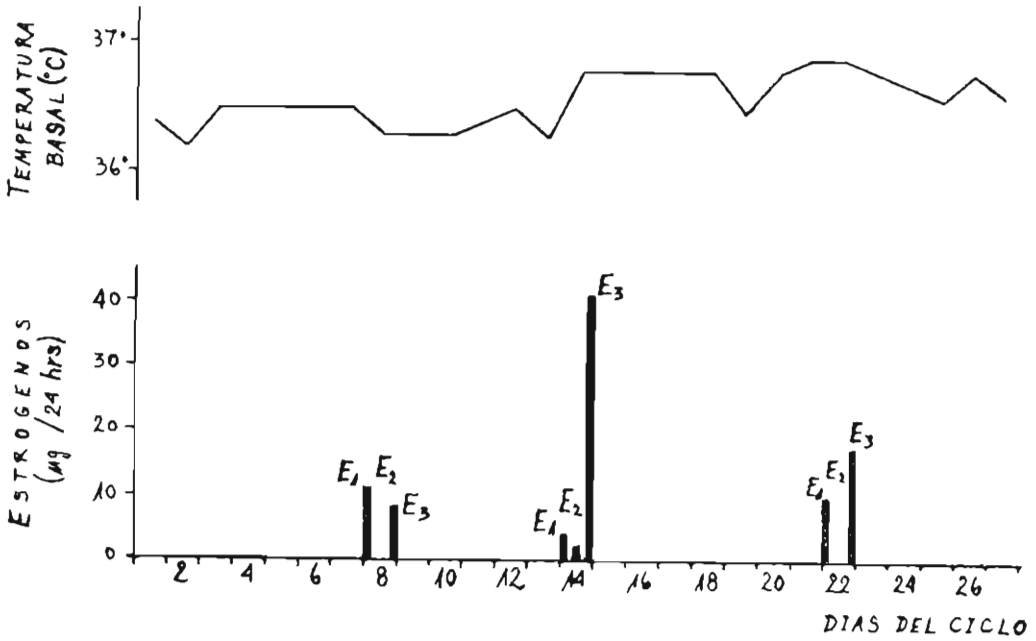
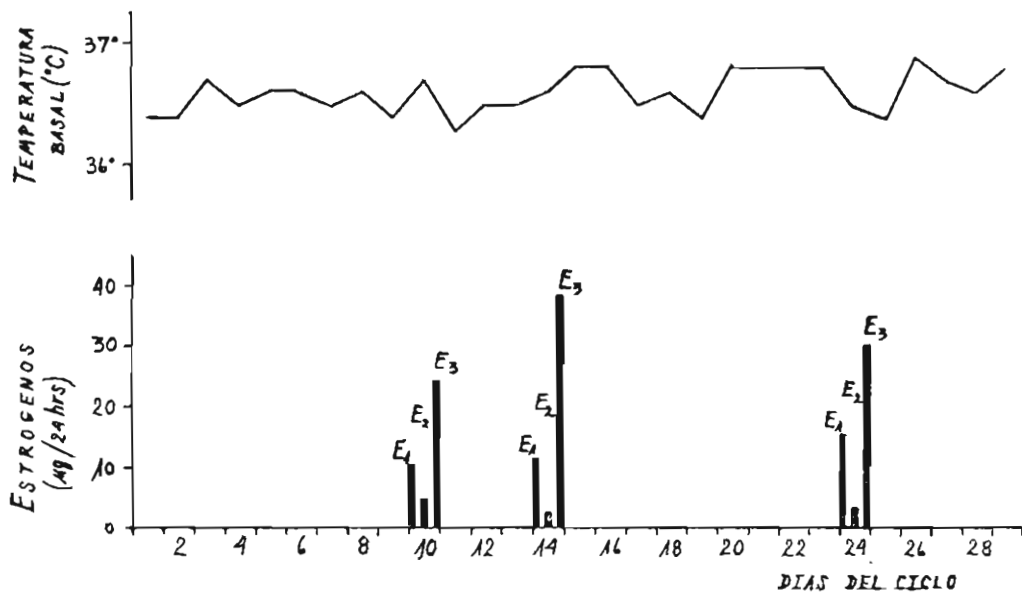


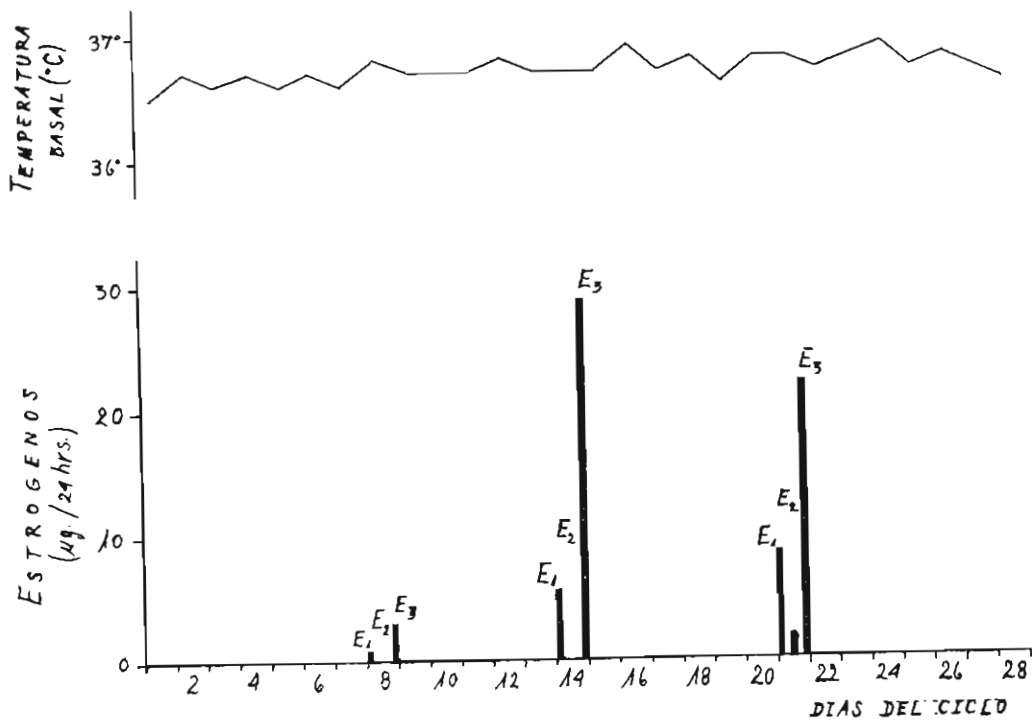
Gráfico N° 2.—Excreción de estrógenos en el caso N° 2.



Gráfica N° 3. —Excreción de estrógenos en el caso N° 5.



Gráfica N° 4.—Excreción de estrógenos en el caso N° 7.



COMENTARIO

Caso N° 1. Presenta las variaciones típicas con valores muy bajos (E_2 nulo) en el 8º día, representando la fase preovulatoria; valores máximos en el 14º día que coinciden con el comienzo del alza térmica, representando la fase ovulatoria; bajando luego, sin alcanzar los valores mínimos de la 1ª fase en el 25º día (fase luteínica). En este caso, el único en nuestra serie, el E_{21} subió aún más en la 3ª fase; fenómeno ya descrito en la serie de Brown, (18).

Caso N° 2. No obtuvimos evidencia del llamado pico ovulatorio y es probable que los valores del día 14º representaran más bien la depresión que sigue al pico; solamente el E_{21} alcanzó un nivel máximo en esa fecha, fenómeno descrito en la literatura y atribuido a la metabolización de los otros dos estrógenos hacia E_{21} . En la 1ª fase los valores fueron algo elevados sugiriendo la pendiente en ascenso del pico ovulatorio. En la 3ª fase los valores fueron típicos de la fase luteínica aunque el E_{21} fue nulo, cosa que también encontraron Loraine y Bell, (19).

Caso N° 3. El pico ovulatorio fue muy claramente demostrado. La 3ª determinación hecha en el 27º día, dos días antes del ciclo siguiente arrojó valores muy bajos no representativos de la fase luteínica. Tales valores fueron excluidos del cálculo de nuestros promedios.

Caso N° 4. Presentó el ciclo más largo de nuestra serie, los valores de las tres determinaciones fueron muy similares y parecen corresponder a cifras basales habiéndose escapado tanto el pico ovulatorio como la fase luteínica. Desde luego estos hallazgos también podrían explicarse postulando la existencia de un ciclo monofásico anovulatorio; pe-

ro contra esa interpretación está el hecho de que la curva térmica fue definitivamente bifásica con un franco nadir en el 17º día seguido por un ascenso de 1°C.

Caso N° 5. No obtuvimos evidencia del pico ovulatorio el cual, de acuerdo a las variaciones de la curva térmica, tuvo lugar probablemente entre el 10º y el 14º día que fueron los que usamos para nuestras determinaciones y obtuvimos valores similares y relativamente altos correspondiendo posiblemente a las pendientes ascendente y descendente del pico ovulatorio. En la 3ª determinación los valores fueron altos todavía, correspondiendo a la fase luteínica.

Caso N° 6. La historia menstrual no presenta ningún rasgo llamativo; el registro térmico resultó prácticamente monofásico y las tasas de excreción estrogénica presentan también una notable uniformidad, habiéndose hallado nula para el estradiol, precisamente donde debiera esperarse el máximo, cosa que no ha señalado ninguno de los autores consultados. Si recordamos que la frecuencia de los ciclos anovulatorios es máximo en los dos extremos de la vida fértil de la mujer, la edad de este sujeto, asociada a los hallazgos que se acaba de enunciar no permiten descartar la existencia de un ciclo anovulatorio, cosa imposible de establecer definitivamente en ausencia de otros exámenes, entre ellos el dosaje de pregnadiol.

Caso N° 7. La duración del flujo y la periodicidad tienden hacia los límites máximos de la normalidad; su curva térmica no presentó un carácter bifásico definido y, salvo el estriol que presentó un pico en la segunda determinación, las otras dos fracciones presentaron más bien un ascenso sostenido y gradual; configuración similar a la descrita por Fotherby

y Brown, (20) en ciclos anovulatorios. Considerando la edad de este individuo, el más joven de nuestra serie, los hallazgos que acabamos de comentar y lo discutido a propósito del caso precedente, se puede plantear igualmente la posibilidad de un ciclo anovulatorio, sin poder confirmarse por las razones ya enunciadas.

Caso N° 8. La historia menstrual llama la atención por el marcado componente dismenorreico; la curva térmica mostró un ascenso definido desde el 13° día, con varias intermitencias en la 2ª fase. Las tasas de estrógenos estuvieron en general bien ubicadas dentro de los rangos establecidos por Brown (18).

Sin embargo, en la 1ª determinación la excreción diaria de creatinina fue definitivamente baja en relación con los promedios normales y probablemente correspondió a una colección incompleta; no obstante no se corroboró con el dosaje de otras muestras, aunque como se nota fácilmente cualquier corrección no alteraría significativamente el patrón general. En suma, en este caso, se obtuvo buena evidencia de ovulación.

CONCLUSIONES

1. El método de Brown, cuya eficacia para la determinación de cantidades muy pequeñas de estrógenos en la orina ha sido ampliamente aceptada y comprobada durante más de 10 años en el ámbito de la investigación clínica mundial, fue adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio para determinar las variaciones de la excreción urinaria de los tres estrógenos clásicos: estrona, 17B-estradiol y estriol, en el curso del ciclo menstrual, en un grupo de 8 mujeres normales.

2. Se obtuvo buena evidencia de las variaciones cíclicas de estas tres fraccio-

nes estrogénicas en tres momentos del ciclo menstrual, por lo menos en 6 de los casos. Tales variaciones fueron muy amplias para un mismo individuo en diferentes momentos del ciclo y para individuos diferentes en momentos comparables del ciclo; de donde resulta evidente que las determinaciones aisladas de estrógenos carecen de valor, y que no es posible señalar de manera precisa promedios de valor, y que no es posible señalar de manera precisa promedios de normalidad sino más bien rangos muy amplios.

3. No hubo correlación definida entre la edad de los sujetos ni entre las variaciones de sus volúmenes urinarios con las tasas de excreción de estrógenos. Se pudo observar en cambio una buena correlación entre el peso y la contextura individuales con las tasas de estriol, relativas a la suma de las otras dos fracciones. También se observó una buena correlación entre las variaciones de los estrógenos y las de la temperatura basal.

4. En un caso de feminización testicular, las tasas de estrógenos guardaron buena correlación con los hallazgos anatómicos, los de otras pruebas de laboratorio y el grado de feminización observable clínicamente.

5. No creemos que el costo elevado, el consumo de tiempo, el entrenamiento especial del personal técnico requerido, ni los resultados de este método, justifiquen su empleo en la práctica rutinaria en la cual lo aventajan otros métodos más sencillos y eficaces. Pensamos en cambio, que su aplicación a casos seleccionados donde el diagnóstico resulta oscuro por la negatividad o la falta de correlaciones mutuas entre los otros métodos, pueda dar óptimos resultados.

RESUMEN

El método de Brown, basado en la cromatografía de absorción en columnas de alúmina, fue aplicado para determinar, por primera vez en nuestro medio, las variaciones de la excreción urinaria de estrona, 17B-estradiol y estriol, en un grupo de 8 mujeres normales, entre los 18 y 38 años de edad, en tres momentos del ciclo menstrual: fase folicular, pico ovulatorio y fase luteínica.

Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con los comunicados por varios autores, usando el mismo método o métodos similares.

Se demostró las variaciones cíclicas de la excreción de los tres estrógenos, obteniéndose evidencia de ovulación en 6 casos; en los dos restantes no se pudo descartar, aunque tampoco se comprobó definitivamente la posibilidad de ciclos anovulatorios.

Se observó buena correlación entre las variaciones estrogénicas y las curvas de temperatura basal, así como entre la excreción de estriol y el peso corporal.

En un caso de feminización testicular, los dosajes de estrógenos se correlacionaron muy bien con el grado de feminización detectable clínicamente, con otras pruebas de laboratorio y con los hallazgos anatómicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, J. B.: A chemical method for the determination of estriol, oestrone and oestradiol in human urine. *Biochem. J.* 60: 185-193, 1955.
2. Marrian, G. F.: The determination of steroids in blood and urine, in *Congreso Internacional de Biochimie*, 3º, Bruxelles, 1955, Liege. H. Vaillant-Carmanne, 1955, pp. 205-209.
3. Ginsburg, J. y Brown, J. B.: Increased oestrogen excretion in hypertrophic pulmonary osteoarthropathy. *Lancet*, 2: 1274-1276, 1961.
4. Nocke, W. y Breuer, H.: Eine chemische Methode für Bestimmung von 16-epi-Oestriol im Urin des Menschen. *Acta Endocr. (Kbh.)* 44: 47-66, 1963.
5. West, C. D.; Kumagai, L. F.; Simons, E. L.; Dominguez, O. V. y Berliner, D. L.: Adrenocortical carcinoma with feminization and hypertension associated with a defect in 11B-hydroxylation. *J. Clin. Endocr.* 24: 567-569, 1964.
6. Person, B. H. y Risholm, L.: Oophorectomy and cortisone treatment as a method of eliminating oestrogen production in patients with breast cancer. *Acta Endocr. (Kbh.)* 47: 15-26, 1964.
7. Brown, J. B. y Strong, J. A.: The effect of nutritional status and thyroid function on the metabolism of oestradiol. *J. Endocr.* 32: 107-115, 1965.
8. Preedy, J. R. K. y Aitken, E. H.: Plasma-oestrogen levels in late pregnancy, in the normal menstruating female, and in the male. *Lancet*, 1: 191-192, 1957.
9. Svendsen, R. y Sorensen, B.: The plasma concentration of unconjugated oestrone and 17B-oestradiol during the normal menstrual cycle. *Acta Endocr. (Kbh.)*, 47: 245-254, 1964.
10. Roy, E. J.; Harkness, R. A. y Kerr, M. G.: The concentration of oestrogens in the peripheral blood of women during the normal menstrual cycle and the first trimester of pregnancy. *J. Endocr.* 31: 177-178, 1965.
11. Schrepfer, R. y Nicholas, H. J.: Chemical determination of plasma estrogens. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 92: 755-761, 1965.
12. Naveda y Naveda, M.: Dosificación biológica de la hormona folicular en la orina. Tesis (Br.), U.N.M.S.M. Facultad de Medicina, Lima, 1939.
13. Codina, E. J.: Estrogenemia en el aborto uterino incompleto. Tesis (Br.) U. N.M.S.M., Facultad de Medicina, Lima, 1955.
14. Meza Bedroni, J. M.: Niveles de estriol urinario en gestantes normales. Tesis (Br.), U.N.M.S.M. Facultad de Medicina, Lima, 1966.

15. Queirolo Maglio, G.: Estriol urinario en algunos estados patológicos del embarazo. Tesis (Br.), U.N.M.S.M. Facultad de Medicina, Lima, 1966.
16. Phillips, F.: Creatinine, in *Clinical Methods for Coleman Junior Spectrophotometer*, ed. 3, Illinois, 1961, p. 25.
17. 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.
18. Brown, J. B.: Urinary excretion of oestrogens during the menstrual cycle. *Lancet*, 1: 320-323, 1955.
19. Loraine, J. A. y Bell, E. T.: Hormone excretion during the normal menstrual cycle. *Lancet*, 1: 1340-1342, 1963.
20. Fotherby, K. y Brown, J. B.: Pregnatriol, pregnanediol and oestrogen excretion during anovulatory menstrual cycle in a premenopausa adrenalectomized woman. *J. Endocr.* 29: 55-60, 1964.