

LA DETERMINACION DE ESTROGENOS URINARIOS DURANTE EL EMBARAZO POR CROMATOGRAFIA DE GAS Y CAPA FINA*

Drs.: LUIS A. SOBREVILLA, IRMA ROMERO Y PABLO MELGAREJO (**)

Instituto de Investigaciones de la Altura, Universidad Peruana Cayetano Heredia y
Centro Médico Naval

Desde que Zondek en 1954 demostró que la determinación de la excreción urinaria de estrógenos durante el embarazo es un medio de establecer la viabilidad fetal (1), numerosos estudios han confirmado y extendido sus observaciones (2), (3) y el valor clínico de las determinaciones de estrógenos, especialmente de estríol, para el obstetra ha quedado definitivamente establecido.

El desarrollo de los procedimientos analíticos basados en la cromatografía en capas finas de adsorbente que usan como soporte placas de vidrio, que reintrodujera Stahl, (4), y de Cromatografía en Columnas de Partición Gas-Líquido que desarrollaran Martin y Synge (5) han permitido contar con técnicos que a la precisión unen la rapidez, permitiendo que los métodos basados en la Cromatografía como principio de separación de mezclas que descubriese Tswett en 1906 (6) se conviertan en procedimientos de uso clínico.

En el presente trabajo, presentamos los valores de excreción urinaria de estrona, estradiol 17 beta y estríol en 15 gestantes normales a término y en una paciente portadora de Mola hidatiforme estudiadas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Naval que dirige el Dr. José Lozano Pardo, correlacionando los valores de excreción de estrógenos con el peso del recién nacido y de la placenta, y además se describe con algún detalle el Método de Wotiz y Chatteraj (7) con las modificaciones en uso en nuestro laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Gestantes normales.— A gestantes normales a término residentes en Lima que acudían al Centro Médico Naval se les pidió que colectaran una muestra de orina de 24 horas, de la que se guardó una alícuota en congela-

(*) Estudio realizado con apoyo del Grant GMS-08576 del NH.

(**) P.M. presentó datos de este trabajo como parte de su Tesis de Bachiller a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

ción después de tomar el volumen. Producido el parto se pesó al niño en la Nursería, se separó los coágulos retroplacentarios, se seccionó las membranas en su borde de inserción placentario y el cordón a 1 cm. de su implantación, para luego pesar la placenta.

Mola hidatiforme.— M.E.V. de I., de 19 años, ingresó al Servicio el 9-XI-66 con "gestación de 3 meses", por náuseas, vómitos incoercibles y sangrado vaginal. Menarquía a los 12 años, Catamenia: 5/30. Ha tenido un parto previo. U.R.: 16-VI-66. El examen clínico muestra un útero aumentado de tamaño que parecía corresponder a una gestación de 14 semanas, blando, con un cérvix sangrante. Ex. Auxiliares: Hgb.: 12 gms.%, Hematocrito: 39%, Gonadotrofinas coriónicas: 100.000 u/24 hs. Estrógenos urinarios: Estrona: 0.12 mgm.; Estradiol: 0.11 mgm., Estriol 0.12 mgm./24 hs.

Se practicó legrado uterino, que evacúa formación de aspecto vesicular no embrionario.

Examen anatomopatológico: Mola hidatiforme benigna.

Determinación de estrógenos.— El Gráfico N° 1 presenta el procedimiento de manera esquemática. Las siguientes notas se refieren a los pasos del método. (Una descripción detallada del mismo en español puede encontrarse en la ref. 8).

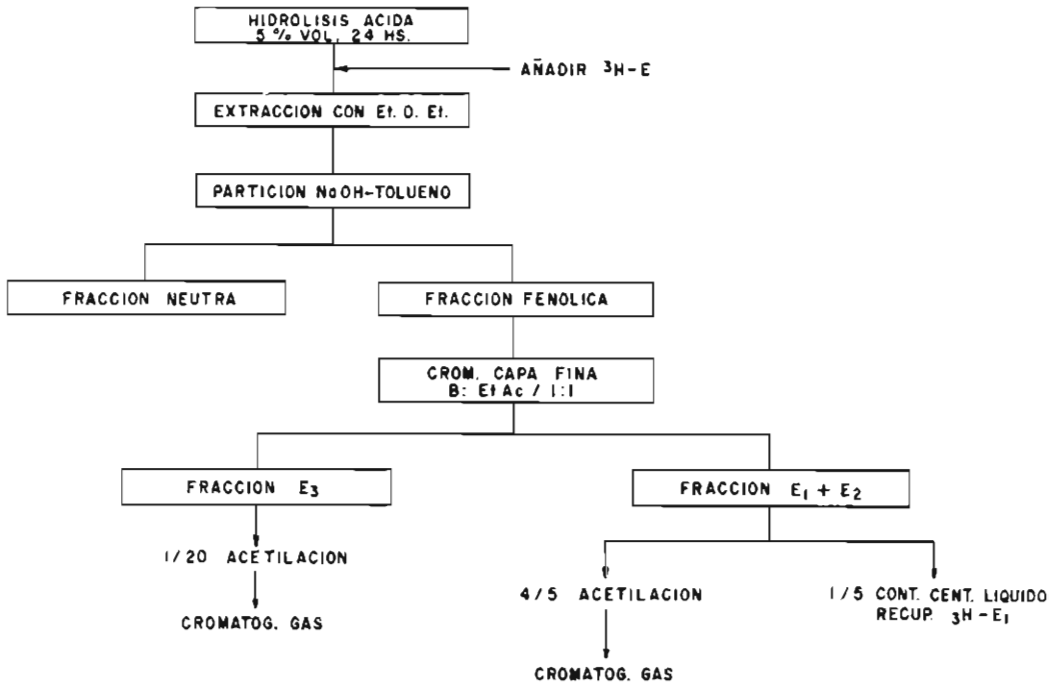
CUADRO N° 1

VALORES DE EXCRECION URINARIA DE ESTROGENOS EN GESTANTES DE LA COSTA
PESO RECIÉN NACIDO Y PESO PLACENTA

Nombre Paciente	Vol. Orina ml./24 hrs.	Peso R. Nacido	Peso Placenta gramos	Estrona mgrs./24 h.	Estradiol mgrs./24 hrs.	Estriol mgrs./24 hrs.
B. de C.	1480	3410	555	1.47	0.46	26.1
N. de C.	1080	2905	460	0.85	0.40	16.6
S. de A.	1740	3820	510	2.08	0.49	25.6
L. de C.	1460	4120	600	2.46	0.55	29.2
M. de S.	1440	3180	630	2.45	0.55	35.3
I. de T.	1620	2950	580	2.13	0.89	25.2
M. de G.	1760	4470	650	2.58	0.61	45.6
D. de C.	1150	3675	635	2.49	0.50	36.6
O. de R.	1270	3950	445	0.92	0.18	34.5
M. de H.	1110	3140	410	2.90	0.84	34.8
L. de P.	1270	3560	575	1.93	0.79	20.4
D. de R.	1020	3630	440	1.83	0.38	10.2
A. de P.	1950	2807	450	1.72	0.68	24.4
R. de B.	855	2835	470	0.30	0.32	27.1
F. de C.	1475	2608	460	2.33	0.74	16.2

ESTROGENOS EN EL EMBARAZO
ESQUEMA DEL METODO

(WOTIZ & CHATTORAJ, AN. CHEM. 36:1466(1964))



1. Hidrólisis. La hidrólisis ácida de un 5% del volumen de 24 horas es adecuada para obtener cantidades suficientes de estrógenos.

2. Extracción. Previa adición de patrón radioactivo (H^3 -Estrona, 0.05 uc., 500 m.C/mM.), se extrae 4 veces con 50 ml. de Eter purificado libre de peroxidos recientemente redistilado. Añadimos el patrón radioactivo después de la hidrólisis, dado que Preedy ha demostrado que la adición de estrógeno radioactivo no conjugado antes de la hidrólisis no refleja de manera precisa las pérdidas de este paso.

3. Cromatografía en Capa fina de la fracción fenólica. Esta permite dos ventajas: (1) Acetilar por separado estriol y estrona-estradiol; (2) Inyectar al cromatógrafo independientemente el estriol. Dado que el estriol se encuentra presente en la fracción fenólica en cantidad dos órdenes de magnitud mayor, dificulta la acetilación de la estrona y el estradiol. Resulta también ventajoso inyectar por separado para la cromatografía de gas, que debe realizarse en condiciones de temperatura diferentes.

4. Cromatografía de Gas. Utilizamos el Cromatógrafo de Gas Perkin-Elmer, Modelo 801, con detector de llama y una columna de 6 pies de SE-30 al 3% en Diatoport de tamiz 100. La temperatura de operación para estrona-estradiol fue de 230° C y para estriol de 250° C. Después de acetilar en mezcla de anhídrido acético- piridina se disuelve el residuo que contiene los acetatos en 100 microlitros de Disulfuro de Carbono y de esta solución se inyecta de 1 a 2 microlitros con una microjeringuilla Hamilton. La cuantificación se hizo por medición de la altura del pico y comparación con patrones acetilados de concentración conocida cromatografiadas en la misma sesión.

RESULTADOS

El cuadro N° 1 muestra los resultados individuales en todas las pacientes.

Determinación de estrógenos.

- Estrona: 1.9 ± 0.20 mgm./24 horas (Promedio \pm error standard).
Rango: 2.9 — 0.30, Des. Standard: 0.73.
- Estradiol: 0.56 ± 0.05 mgm./24 horas (Promedio \pm E.S.).
Rango: 0.89 — 0.18. D.S.: 0.20.
- Estriol: 27.2 ± 2.5 mgm./24 horas (Promedio \pm E.S.).
Rango: 45.6 — 10.2 D.S.: 9.2.

Peso de recién nacidos. $3,410 \pm 129$ gms. (Prom. \pm E.S.).

Rango: 4470 — 2608 gms. D.S.: 483.

Peso placenta. 524 ± 22 gms. (Prom. \pm E.S.).

Rango: 650 — 410. D.S.: 82.

Correlación entre pesos de recién nacidos-estriol. (Gráfico N° 2).

Gamma (Spearman) 0.5 $T = 1.58$, $P > 0.1$.

Correlación entre pesos de placenta — estriol. (Gráfico N° 3).

Gamma (Spearman) -0.51 $T = 1.99$, $P > 0.05$.

DISCUSION

Durante el embarazo normal, se incrementa grandemente la excreción urinaria de estrógenos, debido a la contribución de los elementos ovulares, la placenta y el feto. La biosíntesis de estrógenos presenta peculiaridades que han sido objeto de revisión reciente por Dicsfaluz y (9), Solomon (10). Nosotros hemos presentado una breve revisión de este tema en español (11).

El estriol urinario, que los estudios pioneros de Zondek mostraron como un buen indicador de "sufrimiento fetal", se excreta al término del embarazo en cantidades considerables, y se biosintetiza a partir del sulfato de dehidroepiandrosterona fundamentalmente (10). Este precursor de origen predominantemente fetal debe ser hidroxilado en posición 16 alfa por los tejidos fetales, dado que la placenta no posee una 16-hidroxilasa eficiente (12) (9). Estos factores bioquímicos determinan que cuando existe "sufrimiento fetal", la excreción de estriol urinario se reduce considerablemente, al no llevarse a cabo la hidroxilación en posición 16 alfa de manera satisfactoria y probablemente al disminuir también la síntesis de precursores.

Los métodos clásicos para la determinación de estrógenos generalmente requieren de la cromatografía de partición líquido-líquido en columna, como los de Brown (13), Bauld (14), Aitken y Preedy (15), o en papel, como el de Finkelstein (16). Esto impone que se trate de procedimiento lentos, que si bien son adecuados para la investigación, no responden a las necesidades de la clínica. Los métodos de cromatografía en capa fina y de cromatografía de partición Gas-Líquido permiten una separación cromatográfica rápida y se adecúan mejor a sus requerimientos.

Los resultados que hemos obtenido con el método que se describe, tienen un rango similar a los clásicos reportados por Brown (17), aunque los valores promedio son algo menores. Esto es seguramente debido a que la cromatografía de gas permite una mejor cuantificación que la que se obtiene con las reacciones de color que emplean los otros métodos. La correlación existente entre el peso del recién nacido y la excreción de estriol fue observada por Frandsen y Stakemen (18) y por Coyle y Brown (19). Las gráficas 2 y 3 muestran los hallazgos en nuestra serie, demostrando que cuanto mayor es el peso del recién nacido o de la placenta, es mayor la excreción urinaria de estriol. La correlación con el peso de la placenta que describimos no sorprende dado que hay una alta correlación entre el peso del recién nacido y el de ésta. Este es un dato de utilidad clínica para estimar el peso probable del feto "in útero", de mediar un embarazo normal. Cuando existe un embarazo complicado, de otro lado, la experiencia de laboratorios en Europa y los Estados Unidos (2) (3) ha señalado que niveles de excreción de estriol urinario por debajo de 4 mgm./24 horas, generalmente indican muerte fetal. Entre 4 y 12 mgm./24 horas, señalan "peligro fetal".

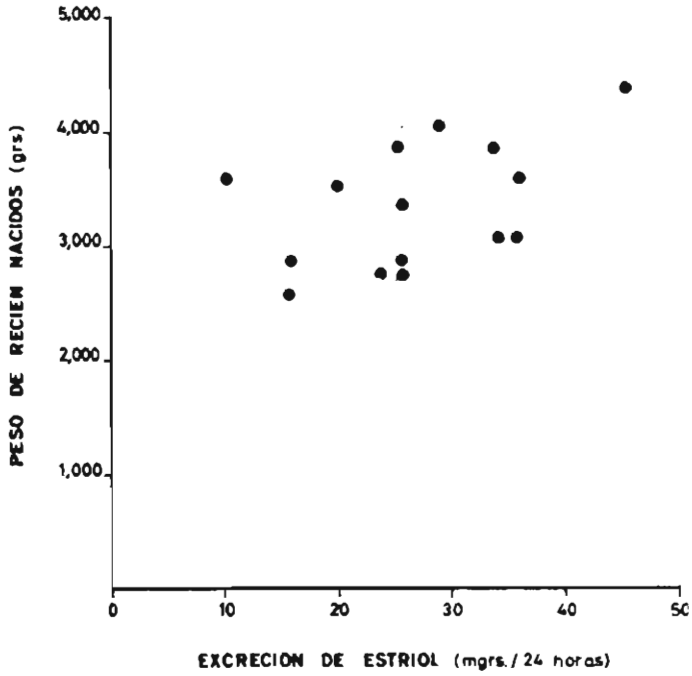
Wallace y Michie (20) han estudiado un grupo de 14 niños que nacieron de madres que excretaron bajas cantidades de estriol durante el embarazo, de los que 6 presentaron alteraciones neurológicas importantes en los dos primeros años de vida.

Nosotros hemos reportado recientemente que la gestante a término de la altura excreta menores cantidades de estriol (21) que correlacionan con el menor peso del recién nacido de altura (22) (23). Tenemos en estudio el significado clínico de este hallazgo y su mecanismo en relación a la hipoxia de altura.

La patente de excreción de hormonas de la mola hidatiforme no está definitivamente aclarada. Si bien se conoce de antiguo que los niveles plasmáticos y urinarios de gonadotropina coriónica se encuentran elevados (24), la excreción de estrógenos se ha reportado como normal (25) o disminuída (26). En el caso que presentamos, las gonadotropinas coriónicas se encontraban elevadas para el tiempo de gestación, con una disminuída excreción de estrógenos, predominantemente debida a una menor excreción de estriol. Estos hallazgos se han descrito también en las gestaciones con feto anencefálico (27). En ambas situaciones, la falta de desarrollo de tejido suprarrenal fetal sería el determinante de los hallazgos bioquímicos. La disociación entre gonadotropinas coriónicas elevadas y estrógenos bajos con estriol predominantemente disminuído señala la posibilidad de un embarazo molar. Si los hallazgos de estrógenos se acompañan de gonadotropinas coriónicas normales, podría tratarse también de un embarazo con feto anencefálico.

GRAFICO Nº 2

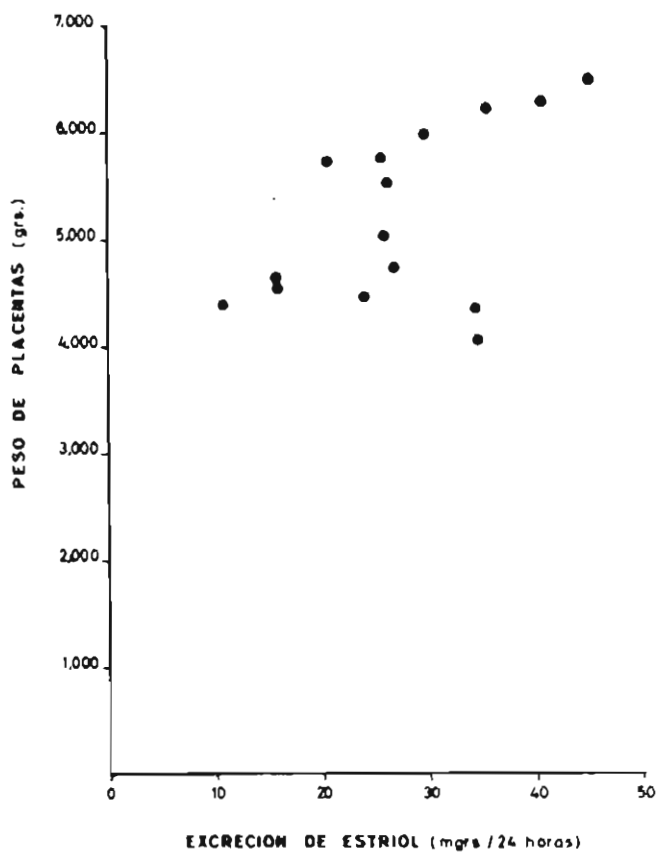
CORRELACION ENTRE PESO RECIEN NACIDOS
Y
EXCRECION DE ESTRIOL



r (Esppearman) = ± 0.5

$T = 1.58 (P > 0.10)$

GRAFICO Nº 3

CORRELACION ENTRE PESO DE PLACENTAS
Y
EXCRECION DE ESTRIOL

r (Espearman) = 2 0 51
T = 1 99 (P > 0.05)

RESUMEN

Hemos estudiado la excreción urinaria de estrógenos en 15 gestantes normales a término por el método de Cromatografía de gas y capa fina de Wotiz y Chatteraj, con los siguientes resultados: Estrona: 1.90 ± 0.73 mgm./24 h.s Estradiol: 0.56 ± 0.20 mgm./24 hs. Estriol: 27.2 ± 9.2 mgm./24 horas. (Promedio \pm Desviación standard). Se describe el método empleado y se discute la aplicación clínica de las determinaciones de estrógenos durante el embarazo.

En un caso de Mola hidatiforme, se encontró gonadotropinas coriónicas elevadas con baja excreción urinaria de estrógenos, estando el estriol muy disminuído.

SUMMARY

We have studied the urinary estrogen excretion of 15 normal females at term pregnancy by the TLC-GLC method of Wotiz and Chatteraj. Mean values \pm 1 S.D. were: Estrone: 1.90 ± 0.73 mgm./24 hs., Estradiol: 0.56 ± 0.20 mgm./24 hs., Estriol: 27.2 ± 9.2 mgm./24 hs. The clinical applications of estrogen determinations during pregnancy are discussed.

A case of Molar pregnancy had high levels of corionic gonadotropin excretion and decreased estrogen excretion, with estriol values being the most significantly affected.

AGRADECIMIENTOS

1. El Cromatógrafo de Gas Perkin-Elmer 801 y el Contador de Centelleo Líquido son donativos que agradecemos, de la Rockefeller Foundation al Instituto de Investigaciones de la Altura.
2. Agradecemos al Dr. José Lozano Pardo, Director del Centro Médico Naval y del Servicio de Ginecología y Obstetricia por habernos permitido desarrollar este estudio y por su aliento y colaboración durante el mismo; al Dr. Abelardo Temache, por la realización de los cálculos estadísticos y a la Srta. Gladys Silva por haber mecanografiado gentilmente el trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. ZONDEK, B., *Recent Progress in Hormone Research*, 10: 414, 1954.
2. FRANSEN, V. A. and G. STAKEMAN, *Danish Med. Bull.* 7: 98, 1960.
3. GREENE, J. W. and J. C. TOUCHSTONE, *Am. J. Obst. & Gyn.* 85: 1, 1963.
4. STAHL, E. *PHARMAZIE*, 11: 633, 1956.
5. MARTIN, A. J. P. and R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* 35: 1358, 1941.
6. AMBROSE, D. and B. A. AMBROSE, en *Gas Chromatography*, Ed. Van Nostrand, Londres, 1962.
7. WOTIZ, H. H. and S. CHATTORAJ, *Anal. Chem.* 36: 1466, 1964.
8. MELGAREJO, P. *Tesis de Bachiller*. Univ. de San Marcos, Fac. de Medicina, 1967.
9. DICSFALUZY, E., VII Conf. Mundial de la FIPF, Santiago, Chile, abril 1967.
10. SOLOMON, S., *J. Clin. Endoc.* 26: 762, 1966.
11. SOBREVILLA, L. A., *Rev. del Viernes Med.*, 1969, *Viernes Med.*, en prensa.
12. SOBREVILLA, L. A., D. Hagerman. C.A. Villee, *Biochem. & Biophysica Acta*, 93: 665, 1964.
13. BROWN, J. B., *Biochem. J.*, 60: 185, 1955.
14. BAULD, W. S., *Biochem. J.*, 63: 488, 1956.
15. PREEDY, J. R. K. and E. H. AITKEN, *J. Biol. Chem.* 236: 1297, 1961.
16. FINKELSTEIN, M. et al. in *Prenatal Care*. Ed. Noordhoff, Neth. 1960.
17. BROWN, J. B., *J. Endocr.* 16: 202, 1957.
18. FRANSEN, V. A. and G. STAKEMAN, *Danish Med. Bull.* 7: 95, 1960.
19. COYLE, M. G. and J. B. BROWN, *J. Obst. Gyn. Brit. Comm.* 70: 225, 1963.
20. WALLACE, S. and E.A. MICHIE, *Lacent*, 2: 560, 1966.
21. SOBREVILLA, L. A., I. ROMERO, F. KRUGER, F. MONCLOA, J. WHITTEMBURY, 2ª Reunión de la ALIRH, Chile, 1966.
22. LICHTY, J. A., R. TING, P. BRUNS, and E. DYAR, *J. Dis. Children*, 93: 666, 1957.
23. ALZAMORA, O., *Rev. Asoc. Med. Yauli*, 3: 75, 1958.
24. HAMBURGER, C., *Acta Obst. Gynec. Scand.* 24: 45, 1944.
25. HINGLAIS, H. and M. HINGLAIS, *Compt. Rend. Soc. Biol.* 143: 61, 1949.
26. FRANSEN, V. A. and G. STAKEMAN, *Acta Endoc. (Kbh)*, *Supp.* 90, 81, 1964.
27. FRANSEN, V. A. and G. STAKEMAN, *Acta Endoc. (Kbh)*, 38: 383, 1961.