

DOSIFICACIÓ DE LA TESTOSTERONA EN ORINA. ASPECTES BIOLÒGICS I CLÍNICS

Comunicació presentada el dia 18 de març de 1965 pel doctor

F. MORER i FARGAS

Metge Auxiliar al Servei d'Endocrinologia
de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau,
Barcelona

Ens honora de poder presentar avui a la SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA un tema que creiem de gran interès i també de gran actualitat en el camp de les hormones esteroïdals. Les dades que hem utilitzat en la present comunicació provenen d'estudis realitzats a la 2.^a Clínica Mèdica Universitària d'Hamburg-Eppendorf, on tinguérem l'oportunitat de col·laborar amb VOIGT¹³ i NOWAKOWSKI¹⁴ en els preparatius i en l'aplicació clínica d'un nou mètode no isotòpic per al dosatge de la testosterona en orina. D'altres investigadors de l'esmentat centre^{2, 16, 19} han tingut la gentilesa de proporcionar-me algunes dades d'estudis actualment en curs, per tal d'enriquir aquesta comunicació.

Desglossarem el tema en els aspectes següents:

- 1) Metodologia del dosatge de la testosterona en orina.
- 2) Què és el que hem après en poder mesurar els nivells de testosterona en l'organisme humà contemplant-ho des de l'angle biològic, i finalment,
- 3) La utilitat pràctica que se'n desprèn, exemplaritzada amb alguns casos clínics.

INTRODUCCIÓ A LA METODOLOGIA

La testosterona, l'hormona pròpia del sexe masculí i l'androgen de més potència biològica, fou aïllada del testicle de brau i obtinguda en forma cristal·lina l'any 1935 per DAVIQ i LAQUEUR⁴. Durant molt de temps s'ignorava si la testosterona s'eliminava o no per l'orina. Fins l'any 1950, que LIERERMAN i col·laboradors¹² van isolar-la de l'orina d'un pacient sotmès a sobrecàrrega exògena amb aquest esteroide, hom no acceptà la possibilitat de la seva eliminació urinària.

Fins fa poc temps, quan ja en feia molt que existia la possibilitat del dosatge de les altres hormones esteroïdals, el mesurament directe de la testosterona no era encara possible. Aquest fet constituïa una sorprenent limitació de la metodologia en el camp de les hormones esteroïdals. En efecte, per a l'objectivació de la funció endocrina del testicle o bé de la

producció de testosterona en l'organisme humà, hom només disposava de la simptomatologia clínica, dels *tests* biològics i de la mesura indirecta mitjançant el dosatge de 17-cetosteroides en orina o bé la dosificació de l'anomenada «fracció androgènica» (androsterona i eticolanolona), obtinguda per separació cromatogràfica dels esmentats catabolits. Un altre criteri bioquímic, també indirecte, molt utilitzat per a valorar la producció de testosterona en l'home, era la dosificació quantitativa de la fructosa en el plasma espermàtic. Com més endavant veurem, cap dels procediments citats no representa un paràmetre específic de la producció orgànica de testosterona.

L'any 1960, SCHUBERT i WEHRBERGER¹⁷ reportaren per primera vegada la dosificació quantitativa de testosterona en l'orina de l'home. Al llarg dels anys 1963 i 1964, un crescut nombre d'investigadors anaren publicant diferents mètodes per al dosatge quantitatiu de la testosterona en l'orina^{3, 5, 7, 15, 18, 20 i 21}. Un cop més, el perfeccionament metodològic de l'anàlisi hormonal, pedra de toc de l'endocrinologia, permeté de donar un tomb radical a la situació. Llevat dos mètodes, un d'ells el que avui comentarem, tots els altres es basen en la utilització de testosterona marcada i ofereixen nombroses dificultats tècniques. Per aquest motiu no és d'estranyar que gairebé no existeixin dades en la literatura sobre valors d'eliminació normals i patològics en l'home i en la dona, així com tampoc la necessària experiència clínica. D'una banda, la utilització d'isòtops presuposa rigoroses reglamentacions i de més a més, laboratoris utilitats per a treballar amb material radioactiu. D'altra banda, la complexitat, el cost elevat i la llarga duració de molts dels mètodes descrits els han circumscrits a laboratoris de tipus experimental poc vinculats a la problemàtica de tipus clínic.

1) METODOLOGIA

Pels motius descrits era molt de desitjar un mètode tècnicament i econòmicament assequible i que oferís alhora unes condicions de sensibilitat, especificitat i precisió comparables a les dels mètodes tècnicament més complexos. El mètode de VOIGT i col·laboradors²¹, al qual farem referència en aquesta comunicació i amb el qual hem obtingut tots els nostres resultats, sembla posseir, després d'un suficient període d'assaig, els avantatges indicats i, per tant, una doble utilitat en problemes de tipus experimental i clínic.

Ens sembla adient de presentar en forma esquemàtica les parts fonamentals d'aquest mètode (Fig. 1), que, malgrat ésser un dels més senzills, presenta encara una indubtable complexitat. Per aquest motiu es comprèn que es tracti d'una tècnica que cal reservar, en clínica, per a casos estric-

tament escollits. Aquest mètode aconsegueix sobradament els criteris d'exactitud, precisió, sensibilitat i especificitat exigibles a tot mètode físico-químic de dosificació quantitativa d'una substància i ofereix un marge de confiança igual al del mètode no isotòpic de SCHUBERT i FRANKENBERG¹⁸

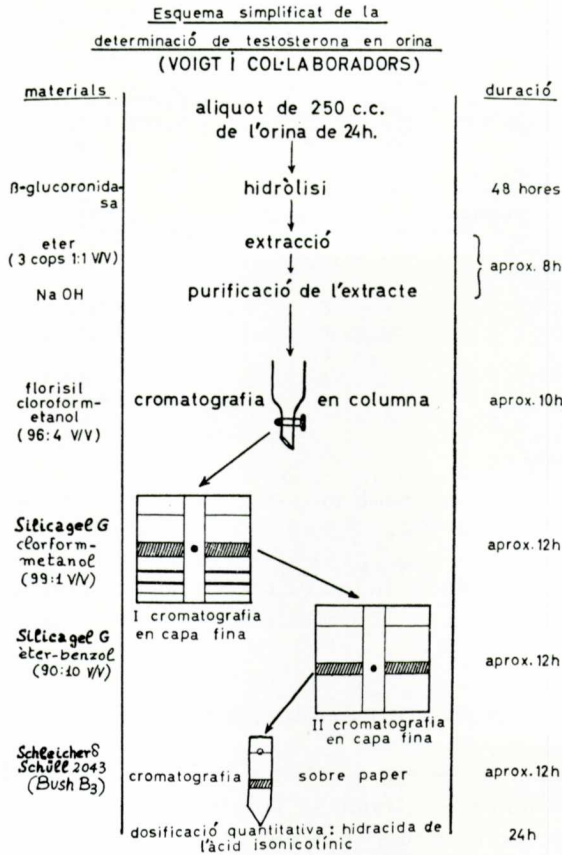


FIG. 1

i comparable a l'isotòpic de VERMEULEN i VERPLANCKE²⁰, procediments que considerem dels més acurats entre els que ens semblen assequibles dels fins ara descrits en la literatura.

El mètode de VOIGT i col·laboradors no permet una separació satisfactòria de la testosterona i de l'epitestosterona. Malgrat això, tenint en compte que aquest isòmer és també una substància amb activitat hormonal, sembla que el mesurament global d'ambdues testosterones no representa

un inconvenient de cara al diagnòstic clínic o davant una determinada situació biològica. D'altra banda, retocs actuals del mètode permeten una separació adequada emprant papers més llargs i prolongant el temps de l'última cromatografia. Aleshores, les dues testosterones, amb diferents R_f , se separen distintament en tenir un major espai de migració.

TAULA 1

Edat (anys)	Nombre investigat	Excreció mitjana de testosterona i marge quadràtic (Sd) en $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$
1) Homes		
10-13 (nens)	4	3,4
14 (pubertat)	2	34,6
15-20	5	37,9 \pm 9,0
21-30	10	71,7 \pm 21,9
31-40	10	60,0 \pm 26,9
41-50	8	46,1 \pm 11,6
51-60	8	37,0 \pm 7,8
61-70	6	31,2 \pm 7,6
71-80	5	37,6 \pm 13,4
81-90	2	28,5
2) Dones		
20-45 (maduresa sexual)	10	9,7
45-65 (menopausa)	4	6,2

Els valors d'eliminació urinària de testosterona en l'home i en la dona, obtinguts per nosaltres amb aquest mètode, els hem resumits a la Taula I.

2) ASPECTES BIOLÒGICS I BIOQUÍMICS

La testosterona se segrega en el testicle i, tal com les darreres investigacions ens demostren ^{6, 8}, també a l'ovari i a la suprarenal. En el curs del metabolisme perifèric dels esteroides se sintetitzen igualment petites quantitats de testosterona. És un fet conegut que en el fetge pot ocórrer la conversió de DHEA a testosterona ⁹. Investigacions molt recents ^{6, 10} xifren la producció total de testosterona en l'home adult en uns 6,5 mg/dia, dels quals aproximadament 6 mg/dia corresponen al testicle, 0,5 mg/dia a la suprarenal i una petita resta a les estructures perifèriques. Els fets clínics evidencien que la secreció testicular de testosterona en l'home és l'única que té una autèntica significació biològica. En els dèficits severes de la funció testicular endocrina, ni la producció extragonadal de testosterona ni la secreció global d'altres esteroides andrògens mai no són suficients per a compensar la manca de l'hormona fonamental. És possible que existeixi

un lligam funcional entre el parènquima testicular i la zona androgènica de l'escorça suprarenal, i que aquestes dues fonts productores de testosterona solament quedin abolides en certs estats patològics on s'afecti globalment l'eix testicle-suprarenal (exemple: síndrome de castració funcional prepuberal). En d'altres casos, el dèficit secretor es limita al testicle (exemple: castració quirúrgica o traumàtica). Aquest fet ens podria explicar la diferent repercussió biològica i àdhuc els diferents graus de la simptomatologia deficitària, en els casos d'abolició de la funció testicular incretora.

En la dona, la producció total de testosterona es xifra aproximadament en 1 mg/dia, de la qual més o menys la meitat, 0,5 mg/dia, és segregada per la suprarenal (igual que en l'home). Un augment de més del 50 % de la producció total pot donar lloc a severos signes de virilització. Aquest punt té, amb vista a la clínica, una extraordinària transcendència, car ens fa comprendre molts dels quadres d'hirsutisme de la dona als quals fins ara no trobàvem una explicació plausible. El ritme d'eliminació de la testosterona té una estreta dependència del cicle menstrual, tal com s'esdevé amb els estrògens¹⁹. S'observen distintament dos pics, l'un al final de la fase fol·licular, i l'altre al final de la fase luteínica. Les xifres d'eliminació de testosterona en aquests períodes doblen les xifres dels dies postmenstruals o dels de la meitat del cicle i atenyen valors de quasi la meitat de les xifres d'excreció mitjana de testosterona en l'home. El mesurament de l'eliminació de testosterona en els dies postmenstruals de dones hirsutes evidencia xifres elevades, estadísticament significants, respecte a les dones normals¹. Si els pics fisiològics cíclics sofreixen també una elevació proporcional, es torna fàcilment comprensible la simptomatologia clínica. Tenint en compte que també en l'home, tant en el testicle com a la suprarenal, se segreguen estrògens, podem establir, de fàcil, un xic grollera, que la proporció testosterona/estrògens totals és de 5-6/1 en l'home i d'1/5-6 en la dona. Aquesta proporció entre les dues hormones correspon als nivells mesurats en l'acmè de la maduresa sexual de l'home i en la fase postmenstrual de dones també sexualment madures.

L'existència de les hormones pròpies de cada sexe en el sexe oposat confirma la hipòtesi formulada molts anys enrera per MARAÑÓN de la realitat d'una intersexualitat bioquímica dels sexes i la suposició que en les alteracions fenotípiques de nombrosos quadres endocrins provocats per trastorns del metabolisme de les hormones sexuals, existeix un desequilibri de l'harmonia del *milieu* hormonal. Creiem que davant trastorns d'aquest ordre, caldria investigar sempre el quocient testosterona/estrògens, tant en l'home com en la dona.

Segons LIEBERMAN i col·laboradors¹², aproximadament la meitat de la testosterona endògena i també de l'administrada exogenament, s'elimina

per l'orina en forma de catabolits identificables. La fracció androsterona/etiocolanolona de l'orina representa el 90 % dels 17-cetosteroides urinaris d'origen testicular. Per aquest motiu, la investigació dels nivells urinaris de la dita fracció era considerada un bon criteri per a l'objectivació de la funció endocrina del testicle. Tenint en compte, però, que aquests dos catabolits provenen, en xifres no gens menyspreables, de precursors dels corticosteroides en els processos biosintètics de l'escorça suprarenal ultra dels andrògens, llurs nivells urinaris no representen un índex fidel de la funció testicular. En clínica hom observa sovint discrepàncies entre la simptomatologia i les xifres d'eliminació d'androsterona i d'etiocolanolona.

ESQUEMA SIMPLIFICAT DEL CATABOLISME DE LA TESTOSTERONA

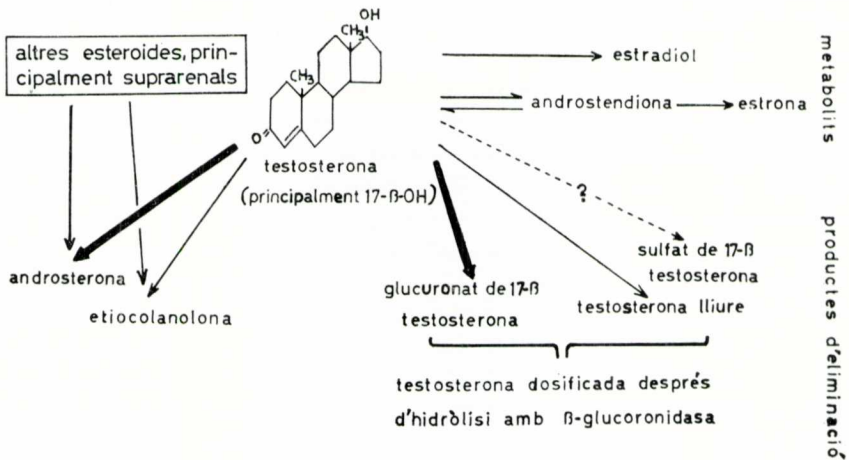


FIG. 2

A la Fig. 2 hem esquematitzat en forma senzilla les vies catabòliques de la testosterona. La major conversió de testosterona a androsterona, la remarquem amb un major gruix de la fletxa. A la figura es veu clarament la ja esmentada font suprarenal d'androsterona i d'etiocolanolona, quantitativament important; això fa d'aquests metabolits un mal paràmetre de la funció testicular hormonal. La testosterona és eliminada immodificada però inactivada per conjugació, en forma de glucuronat. L'eliminació quantitativament major de glucuronat, la remarquem també amb el gruix de la fletxa. L'eliminació de sulfat de testosterona és encara dubtosa, i la

representem amb una fletxa de traç discontinu i interrogant. Una mínima quantitat de testosterona s'elimina en forma immodificada i lliure.

Creiem que l'índex més exacte que reflecteix els nivells de producció orgànica de testosterona és l'anomenat pels anglo-saxons *testosteron production rate*, o sigui les xifres secretores totals. Aquest índex és investigat mitjançant un complicat procediment de doble dilució isotòpica¹¹. De tota manera, com que en circumstàncies normals existeix una correlació entre els nivells de producció i els d'eliminació, el mesurament de la testosterona urinària constitueix un criteri acurat, el qual permet en clínica diagnòstics molt subtils.

No ha estat investigat encara el ritme de la secreció de testosterona en l'home, bé que cal suposar que és relativament uniforme. En canvi, les xifres d'eliminació presenten una marcada dependència cronològica. Representem aquest fet en forma gràfica a la Fig. 3. Com veiem en la corba, les xifres d'eliminació de testosterona en la prepubertat són de l'ordre de les 3 $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ i augmenten ràpidament en iniciar-se la pubertat fins a atènyer valors de l'ordre de les 35 $\mu\text{g}/24\text{ h.}$ Les mateixes xifres d'eliminació es troben durant l'adolescència. L'excreció màxima de testosterona s'esdevé entre els 15 i els 35 anys, amb valors mitjanes d'unes 70 $\mu\text{g}/24\text{ h.}$, valors que a partir d'aquesta edat van disminuint lentament i progressivament.

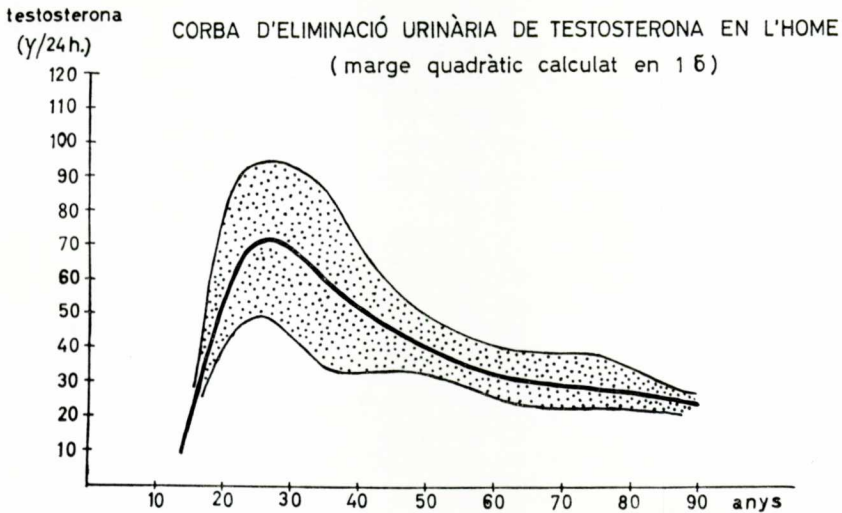


FIG. 3

En les nostres investigacions¹⁴ observarem en el vuitè decenni de la vida, un discret augment de les xifres d'eliminació. En conjunt podem dir que l'excreció de testosterona a l'edat senil, del sisè al setè decenni approxi-

madament, és gairebé la mateixa que a l'edat puberal i que a la de l'adolescència. D'aquest fet es deriven suggestives especulacions; per exemple: ¿per què durant els anys de maduresa sexual les xifres d'eliminació de testosterona són més elevades que durant un període del desenvolupament, en què per a atènyer aquesta maduresa les necessitats orgàniques de l'hormona han d'ésser lògicament molt més crescudes?

L'excreció decreixent de testosterona amb l'augment de l'edat s'explica sens dubte per la disminució de la capacitat hormonal del testicle. Si aquest apagament funcional representa un veritable estat d'hipofunció endocrina amb el qual la tan discutida síndrome del climateri viril estaria estretament vinculada, és un interrogant que ha de quedar obert mentre no disposem de les dades d'un major nombre d'investigacions en aquest respecte.

3) ASPECTES CLÍNICS

Com a resum final de tot el que hem exposat hem escollit entre les nostres dades i entre les d'altres investigadors ^{1, 16, 19}, aquelles que demostren d'una manera més evident la importància pràctica de la dosificació de la testosterona urinària en el judicament o en el diagnòstic de la patologia androgènica, tant en l'home com en la dona.

Citarem en primer lloc el cas de tres castrats, en els quals les xifres d'eliminació dels 17-cetosteroides i de l'androsterona es trobaven dins els límits de la normalitat. Les xifres d'eliminació d'etiocolanolona, en dos dels casos eren baixes; en el tercer eren normals. En canvi, la dosificació de la testosterona urinària dóna en tots tres casos xifres clarament per sota del límit inferior de la normalitat. (Taula II.)

TAULA II

Resultats comparatius de l'eliminació urinària de diferents esteroides en sis casos d'hipogonadisme masculí. (Les xifres entre parèntesis són les valors mitjanes d'eliminació dels esteroides corresponents a l'edat dels pacients.)

	Diagnòstic	Edat	17-Cetosteroides	Androsterona	Etiocolanolona	Testosterona
Cas núm. 1	castrat	40	15 mg/24 h. (10,5)	4,5 mg (3,8)	7,5 mg (4,8)	17,5 µg (55)
Cas núm. 2	castrat	48	10 mg/24 h. (10)	2,6 mg (3,4)	2,0 mg (4,5)	25,6 µg (48)
Cas núm. 3	castrat	56	9 mg/24 h. (9,6)	2,8 mg (3,0)	2,0 mg (4,3)	15,0 µg (42)
Cas núm. 4	Hip. prim.	32	7 mg/24 h. (11,2)	2,5 mg (3,9)	2,4 mg (5,0)	20,0 µg (68)
Cas núm. 5	Hip: prim.	50	9 mg/24 h. (9,8)	2,5 mg (3,2)	2,8 mg (4,4)	14,0 µg (49)
Cas núm. 6	Hip. prim.	54	11 mg/24 h. (9,7)	3,7 mg (3,1)	3,5 mg (4,3)	12,0 µg (44)

Hip. prim. = Hipogonadifine primari

En altres tres casos d'hipogonadisme primari, en els quals els signes de dèficit hormonal eren clínicament segurs, es demostrà així mateix el poc

valor diagnòstic dels 17-cetosteroides i de l'androsterona, ja que solament en un cas hi havia xifres d'eliminació baixes d'aquests catabolits. La dosificació de l'etiocolanona urinària permeté de perfilar millor els signes d'insuficiència, però no donà, ni de bon tros, dades tan precises com la determinació de la testosterona, els valors de la qual es trobaven en tots els casos, clarament per sota del límit inferior de la normalitat. (Vegeu la Taula II.)

TAULA III

Comparació de les xifres d'eliminació de testosterona en la dona, entre col·lectius normals i patològics. (Les determinacions corresponen totes a la mateixa fase del cicle menstrual: inicis de la fase folicular.)

<i>14 dones normals</i>	<i>Testosterona</i>	<i>Estrona</i>	<i>Estriol</i>	<i>Estradiol</i>
10 en la maduresa sexual	9,7 µg/24 h.	—	—	—
4 en la menopausa	6,2 »	—	—	—
<i>30 dones amb alopecìa difusa</i>				
24 en la maduresa sexual	17,2 µg/24 h.	4,7 µg/24 h.	10,0 µg/24 h.	3,4 µg/24 h.
6 en la menopausa	16,0 »	3,2 »	6,5 »	2,8 »
<i>7 dones amb hirsutisme</i>				
Edat, entre els 20 i els 30 anys	19,5 µg/24 h.	—	—	—

Pel que fa referència a la dona, hem evidenciat diferències estadísticament significatives entre els valors d'eliminació normals de testosterona i els valors d'eliminació de dues entitats clíniques molt freqüents en la patologia androgènica femenina: l'alopecìa difusa i l'hirsutisme. A la Taula III hem resumit els resultats en aquest respecte.

BIBLIOGRAFIA

1. APOSTOLAKIS, M.; LUDWIG, E., i VOIGT, K. D. — *Testosteron-, Oestrogen- und Gonadotropinausscheidung bei diffusser weiblicher Alopecie*. «Klin. Wschr.», 43: 9, 1965.
2. APOSTOLAKIS, M. — Comunicació personal, 1965.
3. CAMACHO, A. i MIGEON, C. J. — *Isolation, identification and quantitation of testosterone in the urine of normal adults and in patients with endocrine disorders*. «J. clin. Endocr.», 23: 301, 1963.
4. DAVID, K. E.; DINGEMANSE, E.; FREUND, J., i LAQUEUR, E. — *Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron) wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron*. «Z. physiol. Chem.», 233: 281, 1935.
5. FUTTERWEIT, T. W.; MC. NIVEN, N. L.; NARCUS, L.; LANTOS, C.; DRODOWSKY, M., i DORFMAN, R. I. — *Gas chromatographic determination of testosterone in human urine*. «Steroids», 1: 628, 1963.
6. HORTON, R.; ROSNER, J., i FORSHAM, P. M. — *Testosterone production rate: studies on the adrenal cortex*. Proc. Endocr. Soc. 46th Meeting, 1964. (extracte).
7. IBAYASHI, H.; NAKAMURA, N.; MURAKAWA, S.; TANIUCA, T., i NAKAO, K. — *The determination of urinary testosterone using thin-layer chromatography and gas chromatography*. «Steroids», 3: 559, 1964.

8. KASE, N., i KOWAL, J. — *In vitro* production of testosterone in a human adrenal homogenate. «J. clin. Endocr.», 22: 925, 1962.
9. KLEMPIEN, E.; VOIGT, K. D., i TAMM, J. — *Umsatz von Dehydroisoandrosteron in der Hundeleber*. «Acta endocr.» (Kbh), 36: 498, 1961.
10. KORENMAN, S. G.; WILSON, H., i LIPPSET, M. B. — *Testosterone production rates in normal adults*. «J. clin. Invest.», 42: 1753, 1963.
11. KORENMAN, S. G.; DAVIS, T. E.; WILSON, H., i LIPPSET, M. B. — *A simplified procedure for the estimation of testosterone production rates*. «Steroids», 3: 203, 1964.
12. LIEBERMAN, S.; FUKUSHIMA, D. K., i DOBRINER, K. — *Studies on steroid metabolism: VII) Identification and characterization of additional ketosteroids isolated from urine of healthy and diseased persons*. «J. biol. Chem.», 182: 299, 1950.
13. MORER-FARGAS, F., i VOIGT, K. D. — *Die Testosteronbestimmung im Urin*. 63. Journades de la Societat Alemanya del Nord-est de Medicina Interna, Bremen, juny, 1964. «Llibre del Congrés».
14. MORER-FARGAS, F., i NOWAKOWSKI, H. — *Die Testosteronausscheidung im Harn bei männlichen Individuen*. «Acta endocr.» (Kbh), 49: 443, 1965.
15. ROSNER, J. M.; CHAO, P. I.; SUDMAN, E., i FORSHAM, P. H. — *A colorimetric determination of urinary free and conjugated testosterone*. Proc. Endocr. Soc., 45th Meeting, 78, 1963 (extracte).
16. SCHMIDT, H. — Comunicació personal, 1965.
17. SCHBBERT, K., i WEHRBERGER, K. — *Isolierung von Testosteron aus Normalharn*. «Naturwissenschaften», 47: 281, 1960.
18. SCHUBERT, K., i FRANKENBERG, G. — *Die Bestimmung von Testosteron und Delta-4-Androstendion im Harn*. «Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.», 366: 91, 1964.
19. STARCEVIC, Z. — Comunicació personal, 1965.
20. VERMEULEN, A., i VERPLANCKE, C. M. — *A simple method for the determination of urinary testosterone excretion in human urine*. «Steroids», 2: 453, 1963.
21. VOIGT, K. D.; TAMM, J., i VOLKWEIN, U. — *Eine Methode zur Bestimmung der Testosteronausscheidung im Urin*. «Klin. Wschr.», 13: 642, 1964.