

# ESTRIOL URINARIO

## (ESTUDIO COMPARATIVO DE UN METODO COLORIMETRICO DE ESTRIOL URINARIO CON EL DE $I^{125}$ POR RADIOINMUNOENSAYO)

Walter Contreras Vargas\*

María Elena Fernández Angón\*

### INTRODUCCION

El estriol es el estógeno que en mayor cantidad se elimina por la orina durante el embarazo por lo que su determinación cuantitativa de un índice significativo e importante de la interrelación madre, feto, placenta como evaluación de la salud fetal (7, 10, 14). Debido a la interacción entre estos tres compartimentos, se produce como resultado la formación de estriol en el embarazo, cuyos niveles se elevan marcadamente. Este se produce y excreta de la siguiente manera: la glándula suprarrenal fetal produce dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) que es convertida vía adrenal e hígado fetal a 16-alfa-hidroxidehidroepiandrosterona (16 OH-DHEA-S), la que se aromatiza en la placenta para formar estriol. Este pasa por la circulación materna como estriol no conjugado y en el hígado materno es conjugado con el ácido glucurónico y con el sulfato para ser excretado en la orina. Parte de la DHEA-S materna y fetal es aromatizada a estrona y 17-betaestradiol en la placenta; estos son metabolizados por el hígado materno, se conjugan y excretan como estriol conjugado. La mayor parte de los estrógenos excretados en la ori-

na corresponden a estriol, por lo tanto su cuantificación es reflejo de la producción estrogénica. (18).

Los niveles de estriol, resultan usualmente bajos o descienden antes de la muerte fetal. Por esta razón se recomienda la determinación seriada de estriol en embarazos de alto riesgo, pues un cambio en los valores de esta hormona tiene gran importancia diagnóstica; así, un incremento semanal de estriol sugiere un crecimiento fetal normal, mientras una caída de los niveles puede deberse a retardo del crecimiento fetal o hipoxia. A su vez, una caída diaria de estriol significa amenaza de muerte a muerte intrauterina. Han sido descritos varios métodos para la determinación de estriol en orina y suero: fluorométricos (8), colorimétricos (16), de cromatografía de gases en fase líquida (4), radioinmunoensayo (13). En este trabajo nos propusimos estudiar el método para estriol urinario de Rourke et al (16) modificado (3), ampliamente utilizado en nuestro medio, pero aún no evaluado. Utilizamos el método inmunológico de estriol por  $I^{125}$  radioinmunoensayo (17) como método de referencia, por su alta sensibilidad, precisión y especificidad (5).

### MATERIAL Y METODOS

#### Muestras

Se obtuvieron 40 orinas de mujeres embarazadas sin medicación, recolectadas en 24 horas,

\* *Laboratorio de Hormonas, Hospital San Juan de Dios Caja Costarricense de Seguro Social, San José-Costa Rica.*

con edades gestacionales de 25 a 40 semanas. Se les midió el volumen, se separaron alícuotas y se guardaron en congelación a  $-15^{\circ}\text{C}$ , por un período no mayor de 30 días. Se analizaron por duplicado por el método colorimétrico y por triplicado por radioinmunoanálisis. Se prefirió la orina de 24 horas para la determinación de estriol por ambos métodos, porque los niveles obtenidos son más confiables que los que se obtienen en orinas al azar (10, 11). Para corregir posibles errores en la obtención de la muestra se efectuaron análisis de creatininuria.

#### Aparatos

En la determinación de estriol por radioinmunoensayo se utilizó una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-3 Ivan Sorvall Inc. New Town, Connecticut 06470, U.S.A.), y las lecturas se efectuaron en un contador Bio-Gamma II Beckmann (Scientific Instruments Division Campus DR. At Jamboree Blvd. Irvine C.A.). Para el método colorimétrico, las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 124 (Coleman Instruments División Maywood, Illinois, 60153, U.S.A.)

#### Métodos

La determinación de estriol por radioinmunoensayo se realizó según las instrucciones de la Casa Clinical Assays CAT N° CA-595 (6). Para el análisis de estriol por el método colorimétrico se agregaron en tubos de ensayo 2,5g de cloruro de sodio puro cristalizado (Merck, E. Merck, Darmstadt Germany), seguido de 2 ml de orina de 24 horas filtrada, y 2 ml de agua destilada. Se agregaron dos gotas de ácido clorhídrico 10,1 mol/L (Merck, E. Merck, Darmstadt Germany). Para extraer se adicionaron 5 ml de acetato de etilo puro (Merck, E. Merck, Darmstadt Germany) y se agitó durante 30 segundos en vortex. Se centrifugó por tres minutos y se pasó 1 ml de la capa superior del solvente a otro tubo. En otro tubo se agregó 0.5ml de solución estandar de trabajo de estriol 100 ug/ml (1, 3, 4, (10) -estra- tiene- 3,16 17- triol), (Sigma, St. Louis, MO. 63178) diluída en etanol absoluto. A todos los tubos se agregó 0.2 ml de solución alcohólica de hidroquinona purificada y cristalizada (Mallinckrodt Chemical Works St. Louis MO 6316. El contenido de los tubos se secó mediante una corriente de nitrógeno, manteniéndolos en baño de agua a  $46^{\circ}$ . Para el desarrollo del color se agregó a cada tubo 2 ml de solución de hidroquinona en ácido sulfúrico 7,7 mol/L. Los tubos destapados

se colocaron en baño a ebullición por 20 minutos, agitándolos dos veces en los primeros 10 minutos. Se colocaron en baño de hielo por 3 minutos. Se agregó 1 ml de agua destilada a cada tubo, agitándolos por 15 segundos. Se pusieron en baño ebullición por 10 minutos y se colocaron en baño de hielo por 3 minutos. Se agregó 1 ml de ácido tricloroacético 2 mol/L a cada tubo se agitó vigorosamente por 15 segundos en vortex y se pusieron en baño de hielo por 3 minutos. Para extraer el color se agregó a cada tubo 5 ml de cloroformo puro (Merck, E. Merck, Darmstadt Germany), se tapó y se agitó con la mano por 15 segundos. Se centrifugaron los tubos tapados por 5 minutos a 3000 r.p.m. descartándose la capa superior. Se trasvasó la capa inferior a cuvetas y se leyó en espectrofotómetro a 505, 535, y 565 nm contra blanco de cloroformo.

La concentración de estriol presente en la muestra se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{A_{535\text{nm}} - A_{505\text{nm}} + A_{565\text{nm}}}{2}$$

Concentración del desconocido (ug/2 ml orina) =  $\frac{CA \text{ Desconocido} \times \text{concentración del estandar}}{CA \text{ estandar}}$

Concentración del desconocido (mg/24 horas) =  $\frac{\text{g/2ml orina} \times \text{F.C.} \times \text{V}}{1000}$

A: Absorvancia

CA: Coeficiente de absorción

1000: Factor de Conversión de ug a mg

V: Volumen de orina de 24 horas en mililitros

FC: Factor de corrección. Varía de acuerdo al volumen tomado del extractante.

1 ml = F.C. 2,5 (mayor de 30 semanas de embarazo)

2 ml = F.C. 1,25 (de 20 a 30 semanas de embarazo)

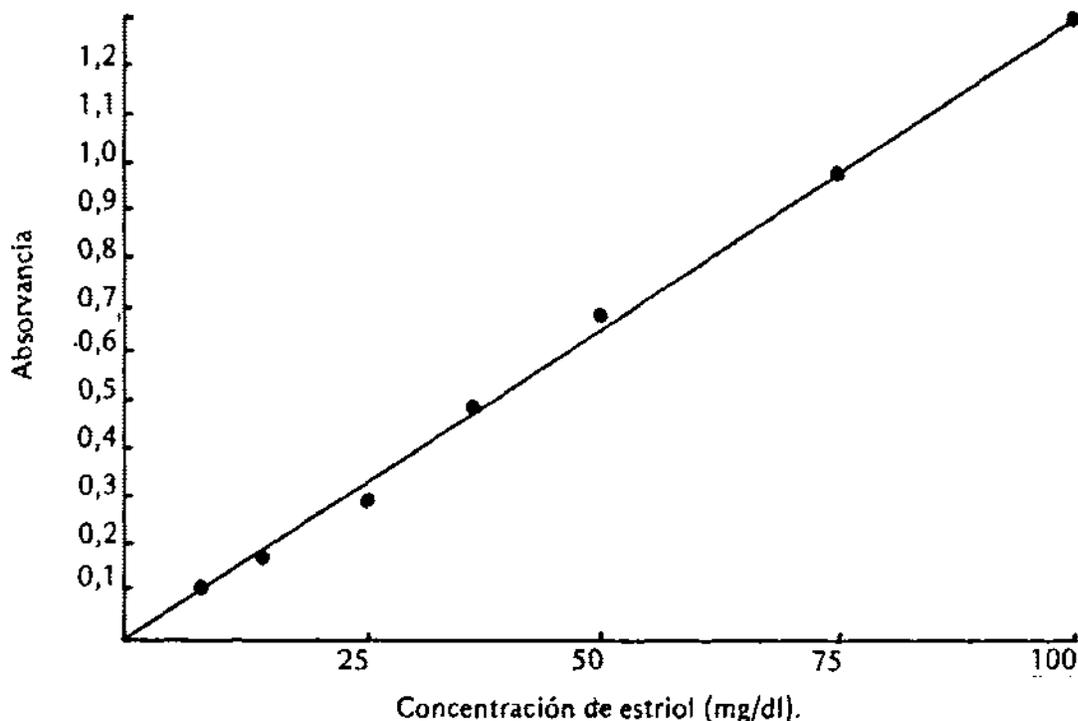
3 ml = F.C. 0,83 (menos de 20 semanas de embarazo).

## RESULTADOS

### Curva de calibración

La curva de calibración de estriol para el método colorimétrico se efectuó a partir de un patrón de estriol de 100mg/dl, (figura 1). Se efectuaron diluciones en etanol del patrón concentrado para obtener valores intermedios. Se observó linealidad hasta 100mg/dl, y muestras con valores superiores no son lineales.

**FIGURA 1**  
**CURVA DE CALIBRACION DE ESTRIOL**  
**POR EL METODO COLORIMETRICO**



**Recuperación**

Como se muestra en el cuadro 1 por el método colorimétrico se agregaron cuatro diferentes concentraciones de estriol a una orina de embarazada que contenía 0.52 mg/dl de estriol. Se obtuvo una recuperación promedio de 97 por ciento. Por el método por radioinmunoensayo se obtuvo una recuperación promedio de 101,4 por ciento, agregando seis concentraciones conocidas a partir de un patrón de estriol de 400ng/ml a una orina de mujer no embarazada.

**CUADRO 1**  
**PRUEBAS DE RECUPERACION DE ESTRIOL**  
**POR LOS METODOS COLORIMETRICO E**  
**INMUNOLOGICO**

Muestra	Colorimétrico (mg/dl)*		Recuperación (°/o)***
	Valor obtenido	Valor esperado	
orina	0,52	-	-
orina - 10mg/dl	8,80	10,52	83,6
orina - 20mg/dl	19,63	20,52	95,7
orina - 30mg/dl	33,10	30,52	108,5
orina - 40mg/dl	40,56	40,52	100,1

Muestra	Inmunológico (ng/ml)**		Recuperación (°/o)***
	Valor Obtenido	Valor Esperado	
orina - 40ng/ml	36	36	90
orina - 60ng/ml	62	60	103,3
orina - 120ng/ml	118	120	98,3
orina - 180ng/ml	168	180	93,3
orina - 240ng/ml	258	240	107,5
orina - 300ng/ml	348	300	116

\* Promedio de valores obtenidos por duplicado.

\*\* Promedio de valores obtenidos por triplicado.

\*\*\* Valor obtenido x 100

Valor esperado

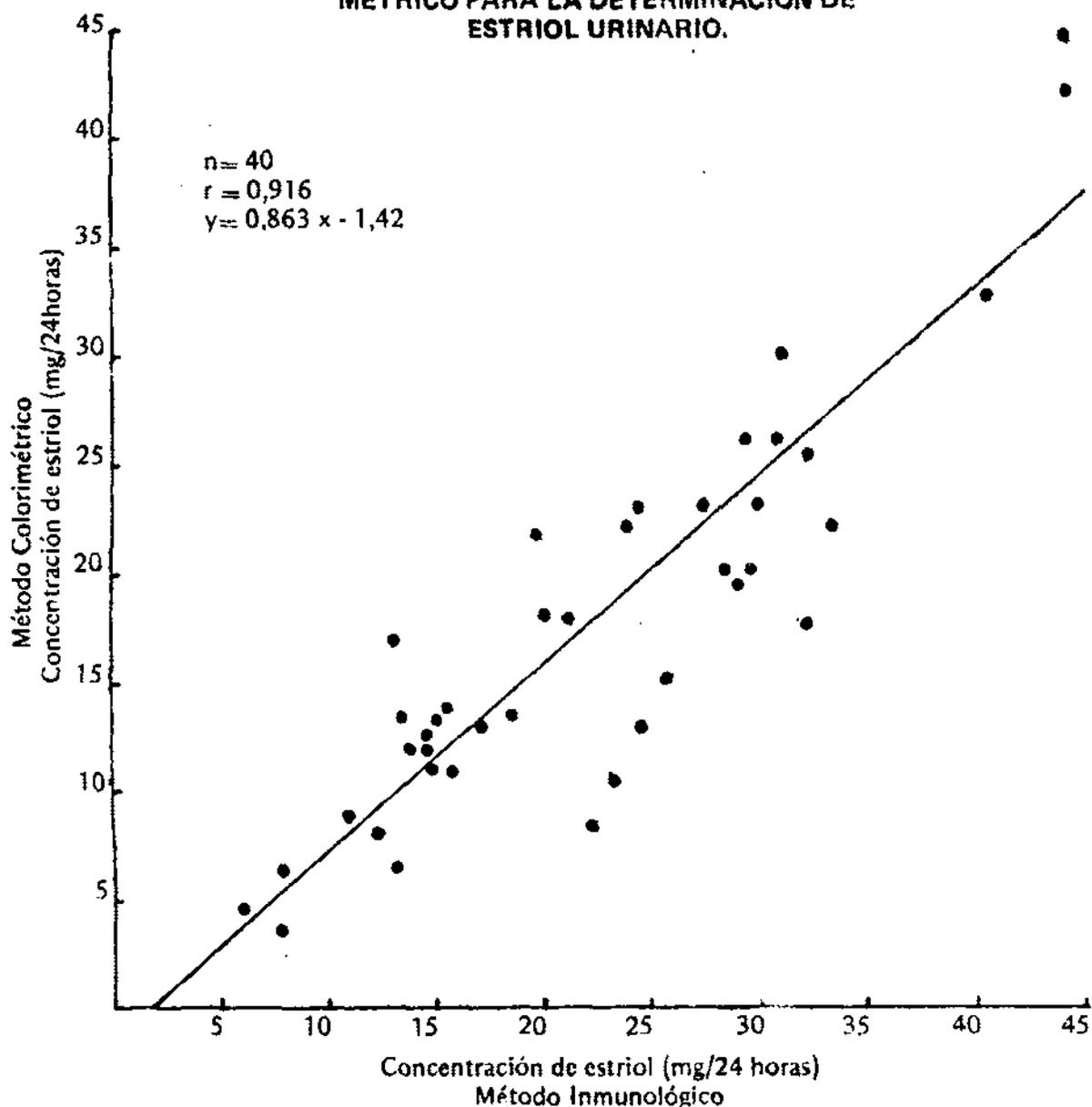


**Comparación con el método de referencia**

Se efectuó un estudio de correlación entre el método colorimétrico para estriol de Rouke et al (16) modificado (3) y el método inmunológico de estriol con  $I^{125}$ , como método de referen-

cia. Se analizaron 40 muestras de orina de mujeres embarazadas con diferentes edades gestacionales por ambos métodos. La figura 2 muestra la curva de regresión lineal obteniéndose los datos siguientes:  $r = 0.916$   $y = 0,863x - 1,42$

**FIGURA 2**  
CORRELACION DE LOS RESULTADOS DE  
LOS METODOS INMUNOLOGICO Y COLORI-  
METRICO PARA LA DETERMINACION DE  
ESTRIOL URINARIO.

**Precisión**

El cuadro 2 muestra los valores obtenidos de las pruebas de precisión en un mismo día y día día, en tres muestras de orina de mujer em-

barazada con diferentes concentraciones de estriol, para el método colorimétrico. Para el método inmunológico se efectuó la precisión en un mismo día.

**CUADRO 2**  
**PRECISION DEL ANALISIS DE ESTRIOL POR LOS METODOS**  
**COLORIMETRICO E INMULOGICO**

Muestra	Precisión en un mismo día			Muestra	Precisión día a día		
	X (mg/24 hrs)	D.S. (mg/24 hrs)	Colorimétrico* C.V. (%)		X (mg/24 hrs)	D.S. (mg/24 hrs)	C.V. (%)
Valor bajo	5,6	0,3	5,3	Valor bajo	5,1	0,36	5,9
Valor alto	55,2	3,0	5,4	Valor alto	55,8	3,56	6,3
			Inmunológico**				
Valor bajo	8,9	0,6	6,7	-	-	-	-
Valor intermedio	33,7	2,3	7,0	-	-	-	-
Valor alto	69,4	5,3	7,6	-	-	-	-

\* Se realizaron 20 análisis de cada muestra.

\*\* Se realizaron 24 análisis de cada muestra.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra en la curva la calibración del método colorimétrico linealidad hasta 100mg/dl, ya que a concentraciones mayores se pierde la linealidad. Es importante señalar que, aún en embarazos gemelares no se obtienen valores tan elevados. La recuperación de estríol obtenida por el método colorimétrico fue de 83,6 por ciento y 108,5 por ciento, con un promedio de 97 por ciento, lo que indica una buena recuperación. Se observa que se obtiene menor recuperación a menor concentración de estríol, lo que concuerda con Mejía y col (12). A pesar de que la recuperación por el método inmunológico es ligeramente superior en los valores bajos, no consideramos que esta pequeña diferencia justifique la sustitución del método colorimétrico por el inmunológico. En el estudio de comparación de los dos métodos se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,916 el cual consideramos aceptable. Aún cuando se observa dispersión de los valores en la línea de regresión, los resultados concuerdan con los valores normales establecidos por ambos métodos. Al evaluar la precisión del método de estríol colorimétrico, obtuvimos coeficientes de variación de 5,3 y 5,4 por ciento para valores bajos y altos de estríol respectivamente en un mismo día, y coeficientes de variación de 5,9 y 6,3 por ciento para valores bajos y

altos de estríol día a día, resultados que indican la buena precisión del método. Por el método inmunológico de precisión en un mismo día fue de 6,7 y 7,6 por ciento para valores bajos y altos respectivamente. En este método sólo se efectuó la precisión en un mismo día ya que la precisión día a día, resultaba de muy alto costo. Según Abraham G. E., y col. con un método por radioinmunoensayo obtienen C.V. de 8,6 y 18 ciento en un mismo día y día a día respectivamente, demostrando que la variación día a día es más alta que la obtenida en un solo día, (1), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por la casa Clinical Assays (5). Puede observarse que la precisión obtenida por el método colorimétrico fue mejor que la obtenida por el método inmunológico. No evaluemos en este trabajo el estríol en suero como otro parámetro de comparación con respecto al estríol presente en orina, porque se ha demostrado variación en los resultados obtenidos en un mismo día (2); dicha variabilidad en la concentración obtenida de estríol en suero depende de diversos factores como son el ritmo circadiano, intervalo de toma de la muestra y la fracción de estríol a determinar (5, 9, 15, 17). Se pudo comprobar que el método colorimétrico para estríol de Rouke et al (16) modificado (3), a pesar de ser un método clásico, tiene buena correlación con el método por radioinmunoensayo que es más sofisticado, sensible y específico (5). Además, con el método colorimétrico, por ser de

menor costo, se puede realizar un exámen aislado en cualquier momento, lo cual es muy importante para evaluar a la paciente embarazada, pues así se obtiene el resultado el mismo día; por lo tanto su aplicación tiene mayores posibilidades prácticas en nuestro país, dada la infraestructura económica actual.

## RESÚMEN

Se evaluó un método colorimétrico para la determinación de estriol urinario usando como método de referencia el radioinmunoensayo. Al analizar 40 orinas de 24 horas de mujeres embarazadas por ambos métodos se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.916 con una ecuación de regresión lineal de  $y=0,863x-1,42$ . Se comprobó que el método es lineal hasta 100mg/dl. La recuperación promedio obtenida fue de 97 por ciento por el método colorimétrico y de 101,4 por ciento por el método inmunológico. La precisión del método (C.V.) en un mismo día fue de 5,3 por ciento y 5,4 por ciento para valores bajos y altos respectivamente, y C.V. día a día de 5,9 por ciento y 6,3 por ciento para valores bajos y altos de estriol por el método colorimétrico. Por el inmunológico el C.V. fue de 6,7 por ciento y 7,6 por ciento para valores bajos y altos. Comprobamos que el método colorimétrico es exacto, reproducible, y de bajo costo, por lo que sigue siendo útil.

## Abstract

A colorimetric method using hidroquinone in acid medium for the determination of urinary estriol, was evaluated against a radioimmunoassay method as reference. Analyzing 40 twenty-four hour urines of pregnant women by both methods a 0,916 correlation coefficient and  $y=0.863x-1,42$  regression equation was obtained. Linearity was proved up to 100 mg/dl. The colorimetric method gave a mean recuperation of 97 per cent and the immunologic one 101,4 per cent. In the colorimetric method the within day precision analysis showed a 5,3 per cent C.V. for low values and 5,9 per cent for high values, while the day to day precision showed a 5,9 per cent C.V. for low values and 6,3 per cent C.V. for high values. By the immunologic method a 7,5 per cent C.V. for low values and 6,7 per cent for high values was obtained in the day to day precision. We proved that the colorimetric method is exact, reproducible and low cost, being still very usefull.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abraham, G.E.; Swerdoloff, R. S., Tulchinsky D., et al, Radioimmunoassay of plasma progesterone J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 619-624, (1971).
- 2.- Bashore, R. A., and Westlake, J. R., Plasma unconjugated estriol values in high risk pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 128, 371-373 (1977).
- 3.- Boletín Informativo, Total pregnancy estrogen determination, Stambio Laboratory, Inc., (1970).
- 4.- Bryan, R.M.; Florendo P. T.; Elliot, J. R., et al, Random urine estriol by gas liquid chromatography. Am. J. Med. Technol., 38 250-254, (1972).
- 5.- Buster, J. E., and Abraham, G. E., The applications of steroid hormone radioimmunoassays to clinical obstetrics. Obs. Gyn., 46, 489 (1975).
- 6.- Catálogo informativo, GammDab<sup>(R)</sup> Free/total<sup>125</sup>I Estriol radioimmunoassay kit, cat. N° CA-595, Clinical Assays, (1981).
- 7.- Green, J. W.; Touchstone J. C., Urinary estriol as an index of placental function. Am. J. Obs. Gyn., 85, 1-9, (1963).
- 8.- Hanning, R. V.; Satin K. P.; Lysnskey, M. T., et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 128, 793-802 (1977).
- 9.- Klopper, A. I.; Wilson; G. R. and Masson, G. M., Observations on the variability of plasma estriol. Obstet. Gynecol. 49, 459-461, (1971).
- 10.- Lockwood, G. F. and Newman R. L., Estriol determination in random urine samples, Obs, Gyn. 43-343 (1974).
- 11.- M.F. Jayle et al. European review of endocrinology. Suppl. I., pp. 77, (1965).
- 12.- Mejía, G; Castillo, R., Estriol urinario como parámetro de bienestar fetoplacentario en embarazo normal. Presentado a congreso en 1972.

- 13.- Miller, C. A. and Fetter M. C., *Lab. Clin Med.* A rapid radioimmunoassay for serum unconjugated estriol with a directly iodinated estriol radioligand 89, 1125 (1977).
  - 14.- Pariente, C.; Goberg, S.; Lewthal, H.; Measurement of estriol excretion in pregnancy. *Lancet* 1, 79, (1971).
  - 15.- Penney, L. L., and Klenke, W. J. Variability in unconjugated and total estriol in serum during normal third trimester pregnancy *Clin. Chem.*, 26, 1800-1802 (1980).
  - 16.- Rourke, J. E.; Marschall, L.D. Shelley, T. F., A simple rapid assay of strogens in pregnancy, *Am. J. obst. Gynec.*, 100, 331-335 (1968).
  - 17.- Unnerus, H. A., Maternal plasma free estriol and 24-hour urinary oestriol excretion in the assesment of foetal outcome. *Acta Endocrinol. Suppl.* 226, 1-80, (1979).
  - 18.- Wohherr, H., and Messer, R. H., Breast Cancer: Potencially predisponing and protecting factors, *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 130, 335, (1978).
-