

Estriol: Estandarización del Radioinmunoanálisis Valores en el Embarazo

Dra. Gladys de Arbeláez*

Dr. Carlos A. Tafurt**

Introducción

La medición de estriol (E.) en fluidos corporales se ha usado para evaluar la unidad fetoplacentaria en el curso de embarazo de alto riesgo (1, 2, 3); inicialmente el interés se enfocó hacia su excreción urinaria (4).

Con el desarrollo de nuevas técnicas más específicas y sensibles se ha dado gran importancia a su determinación en el suero (1, 3, 5). En la formación del estriol materno intervienen el feto, la placenta y la madre (fig 1), constituyéndose así en un magnífico parámetro para valorar la función de esta unidad biológica en el embarazo.

El sulfato de dihidroepiandrosterona (DHAS) es el mayor andrógeno producido por la glándula adrenal del feto. La DHAS sufre una 16 hidroxilación principalmente en el hígado del feto dando origen al sulfato de 16 hidroxidihidroepiandrosterona (16 - OH - DHAS) que luego en la placenta por acción de sulfatasas pierde su cadena lateral de sulfato quedando el compuesto no conjugado que finalmente se aromatiza para formar el estriol, el cual pasa a la circulación materna y en el hígado se conjuga para formar sulfato de estriol, glucosiduronato de estriol y una mezcla conjugada estriol-sulfoglucosi-

duronato y en estas formas se excreta en la orina materna (6).

Las determinaciones de estriol total, exceden a las del esteroide no conjugado por cerca de 11-14 veces. No está claro cuál de las fracciones refleja mejor la secreción de estriol por la placenta, aunque es posible que el nivel del no conjugado sea mejor indicador debido a que la placenta no secreta estriol conjugado en gran cantidad (5). Bashore y Wetlake, encontraron que la medida de estriol no conjugado, puede ser más importante en la valoración de preclampsia severa, hipertensión crónica y retardo de crecimiento intrauterino (3).

Distler y colaboradores estudiando pacientes diabéticas encontraron que el estriol no conjugado es un mejor índice para detectar sufrimiento fetal (7).

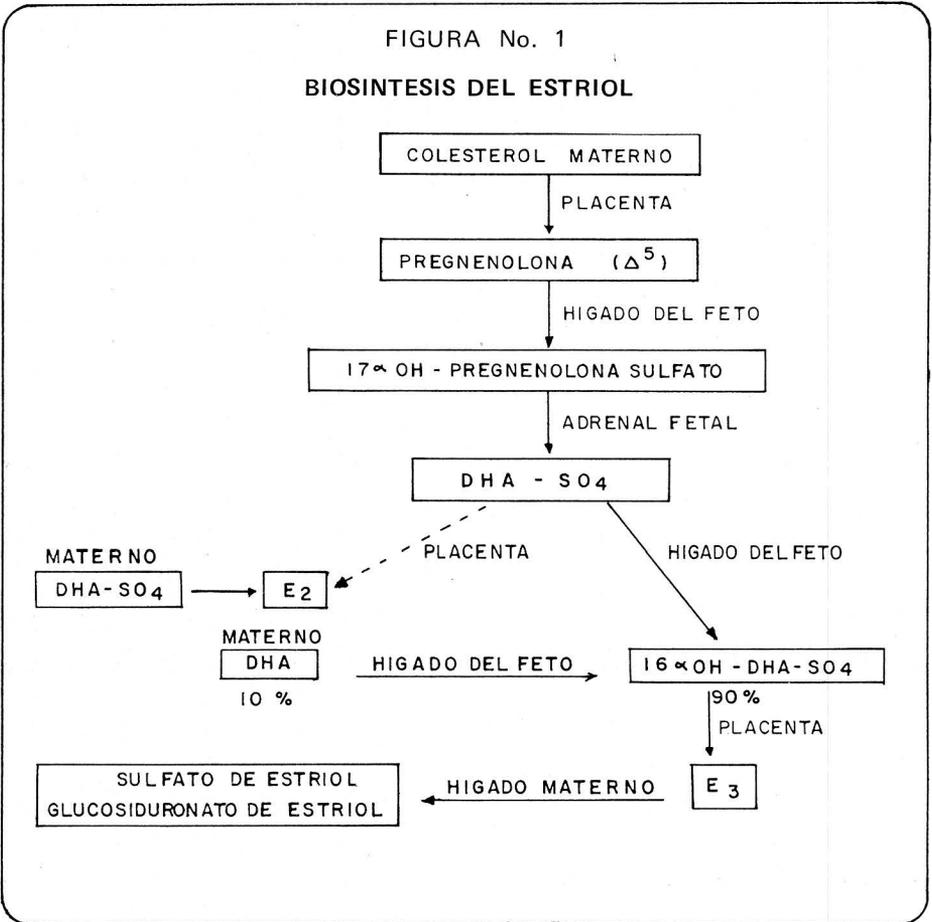
Las determinaciones de estriol en el suero en comparación con las realizadas en orina de 24 horas tienen las siguientes ventajas: evita las dificultades de una buena recolección de orina de 24 horas, y un descenso de estriol se detecta más precozmente en el suero (1, 4).

El objeto de este trabajo es presentar la estandarización del radioinmunoanálisis de estriol libre en suero por un método rápido que nos permite dar resultados en un mismo día y establecer los valores normales durante el tercer trimestre de embarazo.

* Bacterióloga, Servicio de Endocrinología del Hospital Militar Central.

** Médico jefe del Servicio de Endocrinología del Hospital Militar Central.

FIGURA No. 1
BIOSINTESIS DEL ESTRIOL



Materiales y métodos

Las muestras fueron obtenidas de 30 mujeres con embarazos normales, valorados como tales por el Servicio de Obstetricia del Hospital Militar Central quienes se sangraron hasta donde fue posible quincenalmente entre las semanas 28 y 38 de gestación. Se separaron los sueros manteniéndolos a -20°C hasta el momento del análisis.

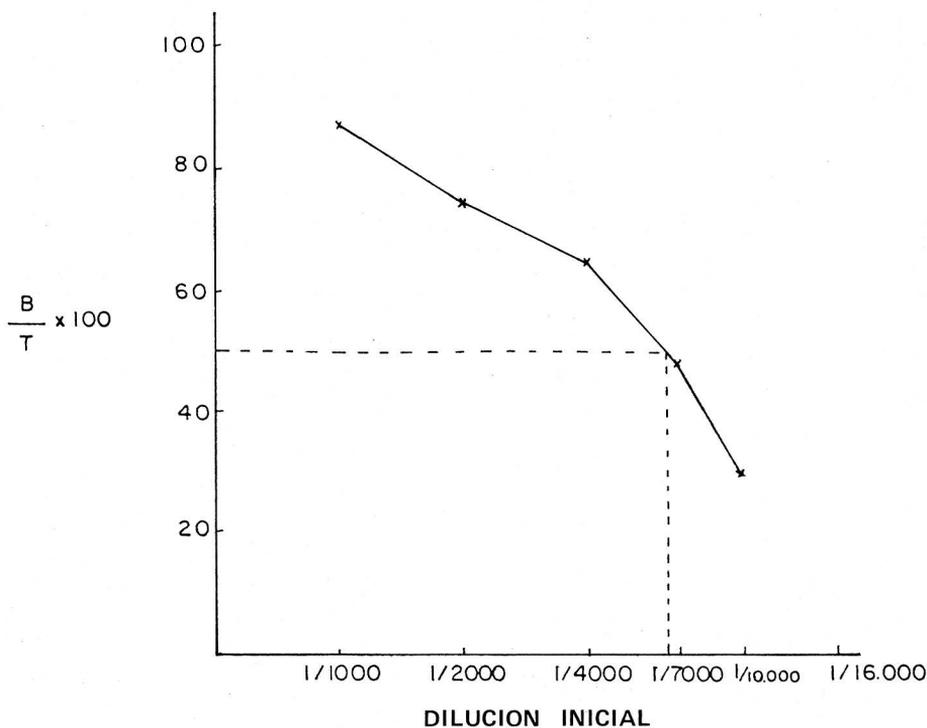
Los reactivos empleados fueron:

Estriol marcado (6, 7-3H estriol) actividad específica 55 Ci/mm obtenido de la New England Nuclear. Se empleó en una concentración de 10.000 cpm/ 0.1 ml/tubo.

Antisuero anti E₃, obsequiado por el Dr. Lynn Loreaux de los Institutos Nacionales de Salud USA. Se empleó a una dilución inicial de 1/7.000, 0.1 ml/tubo, que produce un enlace del 50% de la cantidad de trazador empleado, fig. 2. Este antisuero es de gran

FIGURA No. 2

CURVA DE TITULACION DEL ANTI - ESTRIOL



especificidad. Su reacción cruzada con estrona es de 0.25% y con estradiol de 0.01%.

El estriol usado como patrón se obtuvo de Calbiochem grado analítico. Las concentraciones de la curva de calibración fueron: 0-12.5-25-50-100-200-400 y 800 pg/0.1 ml.

Eter etílico reactivo analítico de Merck, Darmstad, Alemania Carbón-

dextrano en relación 2/1 (p/p), 1 mgr en 0.3 ml de agua destilada/tubo.

Líquido de centelleo: PPO (2,5 difeniloxazona) 4 gr, POPOP (1,4 bis 2,5 Feniloxazoil) 0,04 gr, etanol 20 ml, dioxano 200 ml y tolueno comercial hasta 1 litro. Se emplearon 5 ml por frasco de centelleo.

Buffer de fosfatos (PBS-Gel) 0.1M, pH 7.0, 088%.

NaCl, 0.1% de NaN₃, 0.1% gelatina.

El método empleado no difiere fundamentalmente del propuesto por Stafford y Watson (5) y sus pasos son los siguientes:

Extracción del estriol con éter etílico. El procedimiento se efectuó tanto en los patrones como en las muestras a fin de igualar las pérdidas en esta etapa. En los tubos de la curva de calibración se colocaron 0.1 ml de las diferentes concentraciones del patrón y en los de las muestras 25 μ l de los sueros. El volumen de cada tubo se completa a 0.5 ml PBS-Gel efectuando luego la extracción con 5 ml de éter etílico durante 1 minuto de agitación con vortex. Después de un reposo de 5 minutos, se congeló la fase acuosa en una mezcla de etanol-hielo seco, decantando el éter en tubos, que luego se evaporaron a sequedad en baño María a 34°C.

Incubación. A los extractos se les agregó 0.3 ml de PBS-Gel, se agitó en vortex, adicionando luego el antisuero y el trazador, se efectuó una incubación por 1 hora a temperatura ambiente seguida de 1/4 de hora a 4°C.

Fuera de los puntos de la curva de calibración y de las muestras se colocaron 2 tubos, (tubos blanco), que contienen solamente PBS-Gel y trazador, que sirven para valorar el enlace no específico.

Separación: a fin de separar el estriol libre del ligado a su antisuero se agregó 0.3 ml de carbón-dextrano, el cual absorbe el esteroide libre, se agitó rápidamente, dejando luego en reposo 10 minutos y centrifugando a 3.500 r.p.m. por 10 minutos. Todo el proceso debe hacerse a 4°C.

Medición: se decantó el sobrenadante en frascos con líquido de centelleo agitando con vortex y midiendo luego la radioactividad en un contador Beta (Beckman modelo LS 3133 T).

Cálculos: se empleó el sistema Logit-Log de Rodbard (8) que proporciona una curva de calibración prácticamente recta (fig. 3).

En este sistema la ordenada es el Logit de la respuesta y la abscisa, el logaritmo de la dosis.

El Logit se calcula así:

$$\text{Logit } Y = 1n \frac{Y}{1 - y}$$

$$\text{en donde } Y = \frac{B - NS}{Bo - NS}$$

- B = Cuentas (cpm) de cada patrón.
Bo = Cuentas promedio de los tubos que tienen 0 de concentración de patrón.
NS = Cuentas promedio de los tubos blancos.

En la curva se interpolan los Logit de cada muestra de suero y se obtiene la concentración correspondiente expresada en este caso en ng/ml.

Resultados

La pendiente de la curva de estriol en la transformación Logit, fue -2.404 valor cercano al teórico -2.303 (8) indicando una alta afinidad entre el antígeno y el antisuero.

La alícuota de 25 μ l de suero permite el empleo del segmento más reproducible de la curva Logit-Log, 25 a 400 pg/0.1 ml, para concentraciones altas de estriol lográndose así más precisión en el análisis.

En la tabla 1 se observa la variación intra-análisis expresada en términos del coeficiente de variación (C.V) que fue de 7.72% (n = 14). La variación inter-análisis obtenida fue < 14% (n = 17) lo que demuestra la buena reproducibilidad del método.

FIGURA No. 3

**CURVA DE CALIBRACION PARA EL RIA DE ESTRIOL
(REPRESENTADA EN EL SISTEMA LOGIT-LOG)**

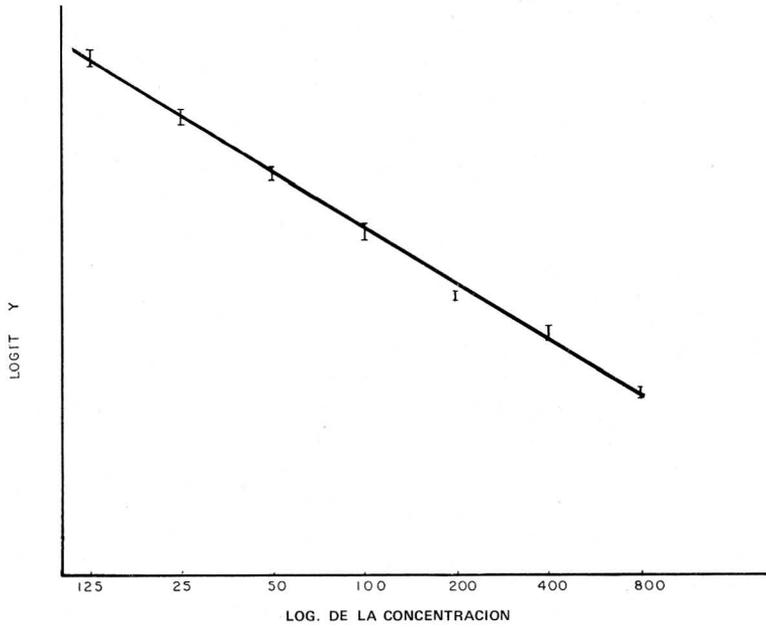


TABLA No. 1

**PRECISION Y REPRODUCTIBILIDAD DEL RIA. EXPRESADO EN
TERMINOS DE COEFICIENTE DE VARIACION**

SUERO CONTROL	ESTRIOL PROMEDIO ng/ml	C.V. INTRA-ANALISIS n = 14	C.V. INTER-ANALISIS n = 17
1	7.33	7.72	
2	2.71		14.06
3	6.96		9.10
4	9.85		8.40
5	19.90		12.05

La dosis mínima detectable en la curva de calibración (9) fue de 0.25 ng/ml.

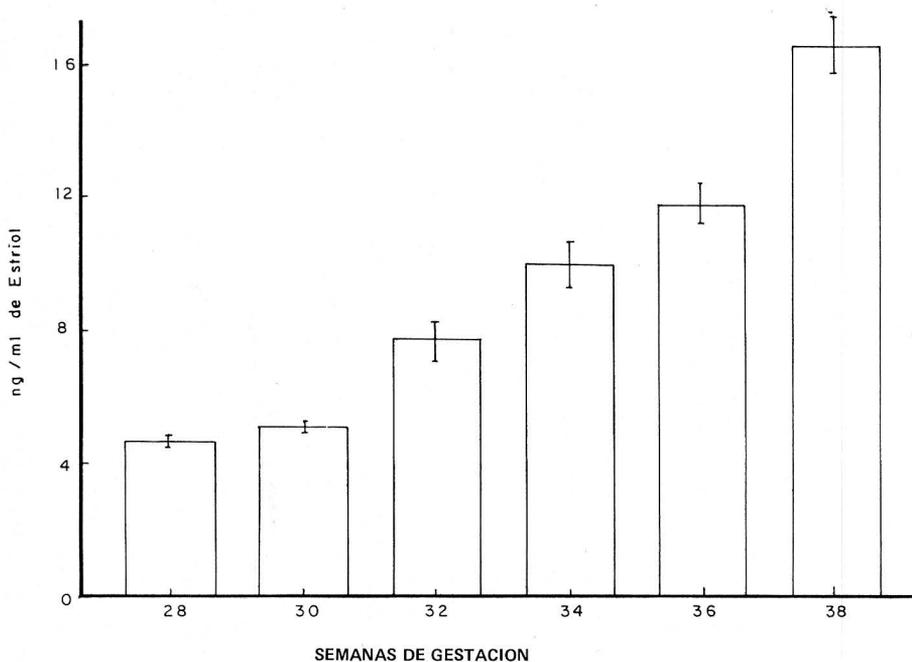
error estándar de la media, ESM. Los resultados obtenidos para las diferentes semanas fueron:

En la figura 4, se pueden observar los valores promedio \bar{X} de estriol con su

Semanas	\bar{X} ng/ml	Rango
28	4.61 ± 0.95	3.71 7.87 u = 20
30	5.17 ± 1.08	3.46 7.70 n = 19
32	7.81 ± 2.71	5.43 14.26 n = 30
34	10.43 ± 4.52	5.33 18.85 n = 25
36	11.79 ± 3.21	6.71 17.76 n = 26
38	16.65 ± 3.76	9.46 25.81 n = 18

FIGURA No. 4

VALORES NORMALES DE ESTRIOL EN DIFERENTES SEMANAS DE EMBARAZO (VALOR PROMEDIO ± E. S. M.)



Discusión

La presente técnica de dosificación de estriol por radioinmunoanálisis en suero permite obtener resultados en 5 horas.

Su buena precisión y reproducibilidad se deducen del coeficiente de variación de 7.72% intraanálisis y de < 14% interanálisis. El comportamiento del estriol fue similar en todas las pacientes aumentando progresivamente con el embarazo, sin embargo los rangos obtenidos para las diferentes semanas presentan entrecruzamiento lo cual se debe al comportamiento individual del estriol en cada embarazo, de allí que en cuanto sea posible es conveniente relacionar valores seriados en la misma paciente con embarazo de alto riesgo.

En la tabla 2 se comparan nuestros valores en las últimas semanas del em-

barazo con los reportados por otros autores (5-10-11-12), encontrándose una buena concordancia. Las diferencias en los promedios se deben a las características del antisuero, tiempo de incubación y método empleado en la separación.

En conclusión hemos estandarizado un test rápido de estriol en suero de gran precisión y reproducibilidad que constituye una magnífica ayuda en la valoración y conducta del embarazo de alto riesgo.

STRIOL: STANDARIZATION OF RADIOIMMUNOANALYSIS VALUES IN PREGNANCY

Summary

The existing striol dosification techniqe through radioimunoanalysis in serum allows to obtain results in 5 hours.

TABLA No. 2

COMPARACION DE LOS VALORES NORMALES DE ESTRIOL CON LOS REPORTADOS POR OTROS AUTORES

AUTORES	VALORES PROMEDIO DE ESTRIOL (ng / ml) SEMANAS DE EMBARAZO					
	2 8	3 0	3 2	3 4	3 6	3 8
GITSCH Y SPONA HORMON LABORATORIUM	5.3	5.9	6.6	6.8	7.65	14.30
BASHORE Y WESLAKE	—	5.4	6.0	6.7	8.0	10.0
STAFFORD Y WATSON	—	—	—	7.49	10.47	13.75
NICHOLS Y NELSON	—	6.5	10.8	12.9	14.9	17.5
TULCHINSKY ET AL	5.5	6.6	7.0	7.6	8.8	10.0
ARBELAEZ Y TAFURT (ESTE METODO)	4.61	5.17	7.81	10.43	11.79	16.65

Its accuracy and reproductiveness are deducted from the variation coefficient of 7.72% intra-analysis and 14% interanalysis. The striol behavior was similar in all patients, progressively increasing with pregnancy; however, the ranges obtained for the different weeks show intercrossing due to the individual behavior of striol in pregnancy. Therefore, whenever possible, it is convenient to relate values in series to the same patient with high risk pregnancy.

Table 2 compares our values in the last weeks of pregnancy with those reported by other authors (5-10-11-12), showing a good concordance. The average differences are due to the antiserum features, the incubation period and the method applied in the separation.

In conclusion, we have standardized a quick, accurate and reproducible striol test in serum, which is of great help in the assessment and behavior of high risk pregnancy.

Bibliografía

- 1 NACHTIGALL, L., BASSETT, M., HOGSANDER, U., and LEVITZ, M.: A Rapid Method for the assay of plasma estriol in pregnancy, *J. clin. Endocrinol. Metab.*, 26: 941, 1966.
- 2 GURPIDE, E., GIEBENHAIN, M., TSENG, L., KELLY, W.: Radioimmunoassay for Estrogens in human pregnancy urine, plasma, and amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109: 897, 1971.
- 3 BASHORE, R. A., WESLAKE, J. R.: Plasma unconjugated estriol values in high-risk pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 128: 371, 1977.
- 4 GOEBELSMANN, U.; FREEMAN, R.; MESTAMAN JH.; NAKAMURA, R. M.; WOODLING, B. A.: Estriol in pregnancy. II Daily urinary estriol assays in the management of the pregnant diabetic Woman. *Am J. Obstet Gynecol.*, 115: 795, 1973.
- 5 STAFFORD, WATSON.: "Total and unconjugated serum estriol Levels as a test of foeto-placental function"; in RIA and related procedures in Medicine, Vol. II, IAEA, Vienna, 1979. pp. 57.
- 6 JAFFE, B. R., The endocrinology of pregnancy in reproductive Endocrinology, W. B. Saunders Company Philadelphia, 1978, pp. 521.
- 7 DISTLER W., GABBE SG, FREEMAN RK, MESTAMAN JH, GOENELSMANN U.: Estriol in pregnancy. V unconjugated and total plasma estriol in the management of diabetic pregnancies. *Am J. Obstet Gynec* 130: 424, 1978.
- 8 RODBARD, D.; FRAZIER, G.: "Statistical analysis of radioligand assay data" in Mallely B. W. J. G. Hordman, Eds. "Methods in enzymology", Vol. 37 Hormone action, part B, peptide hormones.
- 9 RODBARD, D., Statistical estimations of the minimal detectable concentrations ("Sensitivity") for radioligand assays. *anal. Biochem* 90: 1-12, 1978.
- 10 WHANG JOE, Estriol in: "Radionunoassay manual" Edited by Nichols Institute California, 1977, pg. 59-63.
- 11 TULCHINSKY, D.; HOBEL C., YEARGER E., MARSHALL J., "Plasma Estrone, Estradiol, Progesterona and 17 Hidroyprogesterone in human pregnancy" *Am J. Obstet Gynecol.*: 112, 8, 1972, p. 1095.
- 12 SPONA, J.; Universidad Frauenklinik. Vienna, comunicación personal.