

SEICO HANADA

MEDIDA DA TAXA DE SECREÇÃO DE CORTISOL NO HOMEM

(UTILIZAÇÃO DE CORTISOL-1,2-³H)

cortisol-1,2-tritio



*Tese apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de "Mestre em Ciências"*

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg

A

meus pais
meus irmãos
minha avó
Kazuyoshi

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Najchenberg, pela orientação desta tese, estímulo e amizade que sempre dedicou.

Ao Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni, Diretor do Instituto de Energia Atômica e Chefe da Divisão de Radiobiologia que, pelo constante apoio e interesse, tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, Professor Catedrático do Departamento de Bioquímica e Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P., pela orientação no decorrer do curso de pós-graduação em Bioquímica e valiosas sugestões referentes a inúmeros aspectos desta tese.

Ao Prof. José Carlos Barbério, Professor da disciplina de Radioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P., por nos ter introduzido no campo das aplicações de radioisótopos e úteis sugestões.

Ao Dr. Júlio Kieffer, pelo contínuo interesse demonstrado na feitura deste trabalho.

Ao Dr. Evaldo Hermínio de Lucía Melo, Chefe do Laboratório Central do Hospital do Servidor Público, pelas úteis discussões referentes à análise estatística.

Ao Acadêmico Carlos Henrique Mesquita, pelos ensinamentos das técnicas de cintilador líquido e auxílio prestado no tratamento estatístico utilizado.

Ao Físico Paulo Roberto Leme, pelas valiosas sugestões referentes às técnicas de cintilador líquido.

À Colega Takeko S. Kiyari, pela desinteressada colaboração prestada nas fases iniciais do trabalho.

Aos Médicos da Unidade de Diabetes e Suprarrenal da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P., pelo auxílio desinteressado e gentil nas infusões do hormônio e coleta de urina.

Aos pacientes constituintes da nossa casuística somos sumamente gratos, pelo alto espírito de colaboração.

A todos que involuntariamente omitimos, e que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização do presente.

ABREVIATURAS

- F - 11 β , 17 α , 21-trihidroxipregnan, 3,20-diona (cortisol)
- THE - 3 α , 17 α , 21-trihidroxipregnan 11,20-diona (tetra-hidrocortisona)
- THF - 3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahidroxipregnan 20-ona (tetra-hidrocortisol)
- PPO - 2,5 difeniloxazol
- POPOP - (p-bis [2-(5-feniloxazol)]benzeno)
- V - volt(s)
- cpm - contagens por minuto
- dpm - desintegrações por minuto

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. Introdução.	1
2. Material e Métodos.	4
2.1. Material Biológico	4
2.2. Extração e Hidrólise Enzimática.	4
2.3. Cromatografia em Camada Delgada.	5
2.4. Colorimetria	7
2.5. Medida da Radioatividade	10
2.6. Medida da Taxa de Secreção de Cortisol	12
3. Resultados.	15
3.1. Valores de R _f	17
3.2. Excreção Urinária de THE nos Pacientes Estudados	18
3.3. Valores da Percentagem da Dose Excretada na Uri- na e da Atividade Específica de THE.	19
3.4. Taxa de Secreção de Cortisol.	20
4. Discussão	23
5. Conclusões.	29
6. Resumo (Summary).	30
7. Referências Bibliográficas.	32

1. INTRODUÇÃO

No terreno da medicina, cada vez mais sente-se a necessidade de poder apreciar o aspecto dinâmico dos fenômenos biológicos que estão na base dos processos fisiológicos ou fisiopatológicos. Daí a constante procura de métodos analíticos que permitam surpreender e definir características dinâmicas de processos básicos como a absorção, secreção, eliminação, etc.

No âmbito da endocrinologia, após se terem estabelecido e comprovado posteriormente, técnicas capazes de determinar a concentração dos diferentes hormônios no sangue e em tecidos diversos, verificou-se que esta informação, de caráter essencialmente estático, nem sempre era suficiente para uma adequada definição do problema funcional. Era mister conhecer a maneira e, principalmente, o ritmo com que os diferentes hormônios são produzidos e postos à disposição do consumo periférico. Havia, pois, a necessidade de criar novas metodologias capazes de medir as quantidades de determinadas substâncias que são produzidas na unidade de tempo, constituindo-se essa informação, em verdadeiro parâmetro de competência funcional do tecido específico, de um lado, e, em expressão da conservação de mecanismos da homeostase, de outro.

Decisiva nesse sentido foi a contribuição das técnicas radioativas que permitiram abordar praticamente a medida de parâmetros da dinâmica das substâncias dotadas de ação hormonal.

Dentro de nossa formação e levados pela particular inclinação ao estudo dos métodos analíticos associados às técnicas gerais bioquímicas, interessamo-nos pela determinação dos ritmos de produção de hormônios, em particular do cortisol, hormônio produzido pelo tecido cortical da glândula suprarrenal, por meio de traçadores radioativos.

Antes do advento das técnicas que empregam traçadores radioativos, os métodos utilizados para a medida da taxa de secreção de cortisol, envolviam a administração de grandes quantidades do esteróide, induzindo um estado de desequilíbrio dinâmico. Esse fato foi posteriormente confirmado, dentre outros pesquisadores, por SAMUELS e col. (33) e

nio.

Com base na literatura e diante da possibilidade de associarmos técnicas colorimétricas e radiométricas de medida, pudemos estabelecer um plano de trabalho, que fôsse capaz de informar as taxas de secreção(*) de cortisol em indivíduos normais e com disfunção adrenocortical.

(*) Embora ainda não tenha sido divulgada qualquer nomenclatura oficial relativa ao glosário empregado em análise compartimental e em cinética de substâncias biológicas, são mais frequentemente utilizadas as expressões seguintes, que foram usadas, no decorrer desta exposição, como equivalentes das correspondentes palavras em língua inglesa:
pool = fase
turnover rate = taxa de renovação
secretion rate = taxa de secreção (quantidade total de substância em estudo secretada na unidade de tempo).

nio.

Com base na literatura e diante da possibilidade de associarmos técnicas colorimétricas e radiométricas de medida, pudemos estabelecer um plano de trabalho, que fôsse capaz de informar as taxas de secreção(*) de cortisol em indivíduos normais e com disfunção adrenocortical.

(*) Embora ainda não tenha sido divulgada qualquer nomenclatura oficial relativa ao glossário empregado em análise compartimental e em cinética de substâncias biológicas, são mais frequentemente utilizadas as expressões seguintes, que serão usadas, no decorrer desta exposição, como equivalentes das correspondentes palavras em língua inglesa:
pool - fase
turnover rate - taxa de renovação
secretion rate - taxa de secreção (quantidade total da substância em estudo secretada na unidade de tempo).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

a) Preparação da dose de cortisol-1,2-³H

O cortisol-1,2-³H a ser infundido foi previamente purificado por cromatografia. Para tanto, alíquotas do cortisol-1,2-³H (Schwarz Bioresearch Inc., New York) foram aplicadas em cromatoplaças recobertas com a pasta de silicagel G, e desenvolvidas no sistema cloroformio-etanol (90:10 v/v). A mancha correspondente ao esteróide foi extraída com etanol redestilado e esterilizada por filtração em "millipore", a volumes de 3 ml por dose e correspondente a um valor médio de 3,5 µCi.

b) Coleta do material

As urinas de pacientes da Primeira Clínica Médica (Serviço do Prof. A. B. Ulhôa Cintra) do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P., foram coletadas durante o período de 24 horas antes e após administração endovenosa aguda (5 minutos) de 2,5-4,5 µCi de cortisol-1,2-³H; as urinas foram conservadas em congelador, com timol, a fim de evitar a destruição dos esteróides a serem analisados.

2.2. Extração e Hidrólise Enzimática

a) Reagentes

Diclorometano destilado: tratar 1.000 ml de diclorometano com 50 ml de H₂SO₄ conc. Repetir a operação até que a camada sulfúrica não mais apresente coloração amarelada com o reagente de "Porter-Silber". Lavar com água destilada, agitar com Na₂SO₄ anidro e filtrar em papel. Destilar e utilizar o terço médio.

β-glicuronidase: Ketodase^(R), da Warner-Chilcott Lab., contendo 5.000 U-

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

a) Preparação da dose de cortisol-1,2-³H

O cortisol-1,2-³H a ser infundido foi previamente purificado por cromatografia. Para tanto, alíquotas do cortisol-1,2-³H (Schwarz Bioresearch Inc., New York) foram aplicadas em cromatoplaças recobertas com a pasta de silicagel G, e desenvolvidas no sistema clorofórmio-etanol (90:10 v/v). A mancha correspondente ao esteróide foi extraída com etanol redestilado e esterilizada por filtração em "millipore", a volumes de 3 ml por dose e correspondente a um valor médio de 3,5 µCi.

b) Coleta do material

As urinas de pacientes da Primeira Clínica Médica (Serviço do Prof. A. B. Ulhôa Cintra) do Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P., foram coletadas durante o período de 24 horas antes e após administração endovenosa aguda (5 minutos) de 2,5-4,5 µCi de cortisol-1,2-³H; as urinas foram conservadas em congelador, com timol, a fim de evitar a destruição dos esteróides a serem analisados.

2.2. Extração e Hidrólise Enzimática

a) Reagentes

Diclorometano destilado: tratar 1.000 ml de diclorometano com 50 ml de H₂SO₄ conc. Repetir a operação até que a camada sulfúrica não mais apresente coloração amarelada com o reagente de "Porter-Silber". Lavar com água destilada, agitar com Na₂SO₄ anidro e filtrar em papel. Destilar e utilizar o terço médio.

β-glicuronidase: Ketodase^(R), da Warner-Chilcott Lab., contendo 5.000 U-

nidades Fishman/ml.

Tampão acetato-acético pH 4,5 ou 0,1 M.

Acetato de etila redestilado; acetato de etila.....1.000 ml; anidrido acético.....100 ml; H₂SO₄ conc.....10 gôtas. Submeter a refluxo durante 4 horas. Destilar. Agitar o destilado com 20-30 g de carbonato de potássio anidro, filtrar e redestilar. Utilizar o terço médio.

Hidróxido de sódio.

Sulfato de sódio anidro.

Etanol redestilado: Submeter a refluxo 1.000 ml de etanol com 4 g de cloreto de m-fenilenodiamina. Destilar. Agitar o destilado com Na₂SO₄ anidro, filtrar em papel e redestilar; utilizar o terço médio.

b) Técnica

Alíquotas da urina de 24 horas, correspondentes a 1/20 do volume total, foram extraídas com 3 vezes 3 volumes de diclorometano destilado, a fim de remover os esteróides livres e os materiais interferentes (36). A seguir, a fase aquosa foi tamponada com 0,1 volume de tampão acetato-acético e adicionou-se β-glicuronidase para uma concentração final de 1.000 Unidades Fishman/ml. Após incubação a 47°C, durante 15 horas, os esteróides liberados foram extraídos com 3 vezes 3 volumes de acetato de etila redestilado (13). Os extratos combinados foram submetidos a lavagem alcalina com 3 vezes 0,5 volume de NaOH 0,5 N, seguida de uma lavagem com 0,05 volume de água destilada (23). Após adição de sulfato de sódio anidro, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman I, e evaporado à secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 40-43°C. A seguir, foi retomado com, aproximadamente, 20 ml de etanol redestilado e transferido quantitativamente para um tubo de ensaio (25 ml de capacidade), onde o extrato etanólico foi evaporado à secura, sob corrente de ar e aquecimento a 45°C. O resíduo seco foi retomado com 1,0 ml de etanol. Uma alíquota deste extrato foi aplicada na cromatoplaça, através de uma microbureta.

2.3. Cromatografia em Camada Delgada

a) Reagentes

nidades Fishman/ml.

Tampão acetato-acético pH 4,5 ou 0,1 M.

Acetato de etila redestilado; acetato de etila.....1.000 ml; anidrido acético.....100 ml; H₂SO₄ conc.....10 gôtas. Submeter a refluxo durante 4 horas. Destilar. Agitar o destilado com 20-30 g de carbonato de potássio anidro, filtrar e redestilar. Utilizar o terço médio.

Hidróxido de sódio.

Sulfato de sódio anidro.

Etanol redestilado: Submeter a refluxo 1.000 ml de etanol com 4 g de cloreto de *m*-fenilenodiamina. Destilar. Agitar o destilado com Na₂SO₄ anidro, filtrar em papel e redestilar; utilizar o terço médio.

b) Técnica

Alíquotas da urina de 24 horas, correspondentes a 1/20 do volume total, foram extraídas com 3 vezes 3 volumes de diclorometano destilado, a fim de remover os esteróides livres e os materiais interferentes (36). A seguir, a fase aquosa foi tamponada com 0,1 volume de tampão acetato-acético e adicionou-se β-glicuronidase para uma concentração final de 1.000 Unidades Fishman/ml. Após incubação a 47°C, durante 15 horas, os esteróides liberados foram extraídos com 3 vezes 3 volumes de acetato de etila redestilado (13). Os extratos combinados foram submetidos a lavagem alcalina com 3 vezes 0,5 volume de NaOH 0,5 N, seguida de uma lavagem com 0,05 volume de água destilada (23). Após adição de sulfato de sódio anidro, o extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman I, e evaporado à secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 40-43°C. A seguir, foi retomado com, aproximadamente, 20 ml de etanol redestilado e transferido quantitativamente para um tubo de ensaio (25 ml de capacidade), onde o extrato etanólico foi evaporado à secura, sob corrente de ar e aquecimento a 45°C. O resíduo seco foi retomado com 1,0 ml de etanol. Uma alíquota deste extrato foi aplicada na cromatoplaça, através de uma microbureta.

2.3. Cromatografia em Camada Delgada

a) Reagentes

Silicagel G, Merck

Clorofórmio

Etanol

Diclorometano

Metanol

Solução reveladora de azul de tetrazólio: 2 partes de solução aquosa de azul de tetrazólio a 0,2% para uma parte de solução de NaOH 10%.

Solução padrão de tetra-hidro cortisona (THE): 2 mg de THE dissolvidos em etanol redestilado q.s.p. 20 ml.

b) Técnica

Placas de vidro 200×200×4 mm, planas e lapidadas, convenientemente lavadas, foram recobertas com a pasta de silicagel G (silicagel G + água destilada, na proporção de 1:2 peso/volume), através de um aplicador Desaga (Applicator Model S-II; Desaga/Brinkmann), na espessura de 250 μ . As placas foram deixadas em repouso até a pasta se solidificar (aproximadamente 10 minutos), sendo então ativadas a 105°C, durante 1 hora e imediatamente transferidas a um dessecador a vácuo contendo CaCl₂, como agente dessecante.

Aliquotas de 150 μ l, do extrato urinário foram aplicadas nas cromatoplasmas, através de microburetas (Micrometer Buret, cat.nº s-1100-RGI Incorporated), a 1,5 cm da extremidade. A linha de frente da mistura de desenvolvimento foi marcada a 15 cm da linha de base. As cromatoplasmas, assim preparadas, foram transferidas às cubas de desenvolvimento (8 1/2 × 4 1/2 × 8 1/2 polegadas), providas de papel de filtro, convenientemente colocado, a fim de proporcionar saturação uniforme nas cubas. Utilizou-se a técnica de desenvolvimento cromatográfico bidimensional, sendo a fase móvel constituída de dois sistemas desenvolvedores (21) (30);

sistema I = clorofórmio-etanol (90:10 v/v)

sistema II = diclorometano-metanol (150:10 v/v)

O tempo de eluição foi de 35 a 40 minutos, no sistema I e 20 a 25 minutos, no sistema II.

Cromatoplasmas contendo 100-150 μ l da solução padrão de tetra-hidro cortisona foram desenvolvidas simultaneamente com as cromatoplasmas

contendo alíquotas do extrato urinário. A seguir, as placas com a solução de THE, foram nebulizadas com a solução reveladora de azul de tetrazólio, a fim de visualizar o esteróide. Com os valores dos R_f s obtidos, a região correspondente à tetra-hidro cortisona, na cromatoplaça contendo o extrato urinário, foi demarcada, raspada e coletada através de um coletor a vácuo provido de filtro de placa porosa. O adsorvente foi agitado com 4 porções de 5 ml de etanol redestilado. O extrato etanólico, contendo a tetra-hidro cortisona, foi evaporado à secura, sob corrente de ar e suave aquecimento. O resíduo seco foi retomado com 1,0 ml de etanol redestilado e alíquotas foram tomadas para determinação da massa e da radioatividade do esteróide.

2.4. Colorimetria

a) Reagentes

Solução padrão de tetra-hidro cortisona: 2 mg de THE dissolvidos em etanol redestilado q.s.p. 20 ml.

Cloridrato de fenilhidrazina: recristalizado em etanol e dessecado sobre CaCl_2 anidro.

Reagente "branco": duas partes de H_2SO_4 a 64% para uma parte de etanol redestilado.

Reagente de "Porter-Silber": 1 mg de cloridrato de fenilhidrazina para 1 ml do reagente "branco".

b) Técnica

A avaliação quantitativa da tetra-hidro cortisona, do extrato urinário, foi obtida pela aplicação do método colorimétrico de PORTER e SILBER⁽²⁷⁾ (36). O extrato etanólico, contendo a tetra-hidro cortisona, foi dividido em duas alíquotas de igual volume. Após evaporação à secura, adicionou-se a um dos tubos 3,0 ml de reagente "branco" e a outro, igual volume de reagente de "Porter-Silber". Paralelamente, foi preparada uma série de diluições da solução padrão de tetra-hidro cortisona (THE), para obtenção da curva padrão. Os tubos, assim preparados, foram deixados em reação, à temperatura ambiente, e ao abrigo da luz, durante 15 horas. As

TABELA I

Concentrações de THE empregadas na colorimetria.

Tubos (nº)	Tetra-hidro cortisona (µg)	Absorbância a 410 mµ
1	1	0,0137
2	3	0,0399
3	5	0,0651
4	8	0,1045
5	10	0,1295
6	15	0,1927
7	20	0,2544
8	25	0,0132

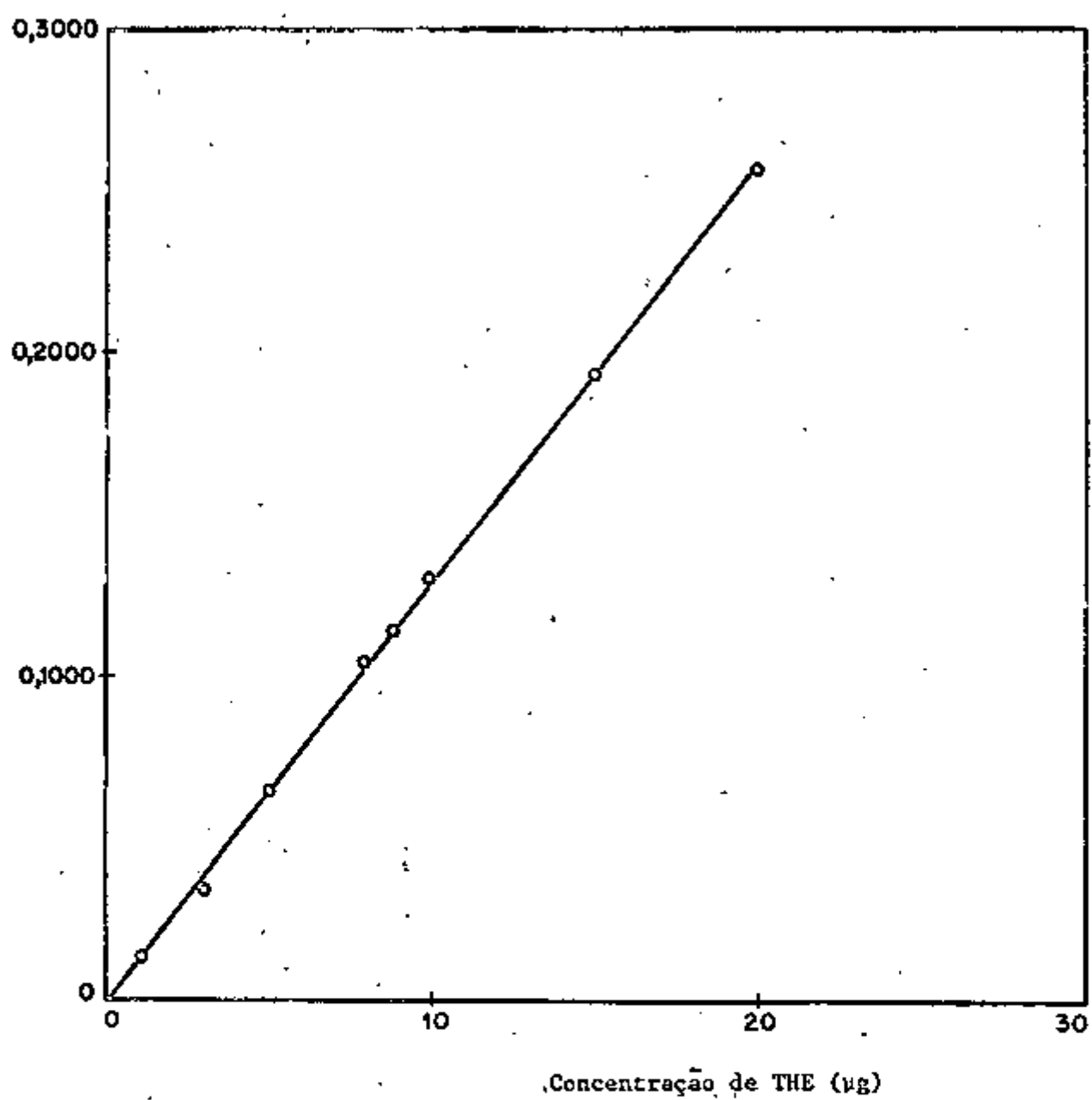


FIGURA 1. Curva padrão de tetra-hidro cortisona (THE), obtida com as seguintes concentrações de THE, a 410 mµ:

Tetra-hidro cortisona (µg)	Absorbância a 410 mµ
1	0,0137
3	0,0399
5	0,0651
7	0,1045
10	0,1295
15	0,1927
20	0,2544
25	0,0132

leituras foram realizadas no espectrofotômetro Coleman Jr., em comprimento de onda $\lambda = 410 \text{ m}\mu$.

Para a feitura da curva padrão de tetra-hidro cortisona (THE) foram utilizadas as concentrações indicadas na Tabela I, bem como, as absorbâncias medidas a $410 \text{ m}\mu$.

A Figura 1 mostra a curva padrão obtida a partir dos valores referidos na Tabela I.

2.5. Medida da Radioatividade

a) Reagentes

Solução cintiladora: 2,5 difeniloxazol (PPO).....4 g; {p-bis[2-(5 - feniloxazol)]benzeno} (POPOP).....50 mg; Naftaleno.....120 g; 1,4 Dioxano.....1.000 ml.

Solução etanólica de cortisol-1,2-³H: o cortisol-1,2-³H foi purificado por cromatografia em camada delgada, unidimensional no sistema de desenvolvimento constituído de clorofórmio:etanol (90:10 v/v).

Padrão interno: uma alíquota da solução de cortisol-1,2-³H, cromatograficamente pura, foi diluída em solução cintiladora e a seguir utilizada como padrão interno.

b) Técnica

A radioatividade das amostras de urina e dos extratos urinários foi determinada por técnica de cintilador líquido (Liquid Scintillation System 725, Nuclear Chicago Corporation), adequada para detecção de partículas β de baixa energia, utilizando-se o método da padronização interna⁽⁶⁾⁽⁸⁾.

A atividade da solução etanólica de cortisol-1,2-³H foi determinada no sistema cintilador líquido, pelo método da razão de canais⁽²⁹⁾, pelo uso de um conjunto de padrões de trítio (Tritium unquenched and quenched standards set; Nuclear Chicago Corporation, order nº 180040-180050).

TABELA II

Ajuste da voltagem superior de discriminação do sistema cintilador líquido

Discrimina- dor superior (V)	Radiação de fundo \overline{Bg} (cpm)	Ritmo de contagem da amostra (cpm)	S^2 $\overline{[Amostra-Bg]}$ (cpm)	S^2/Bg (cpm)
1,0	8	149	141	2485
2,0	21	441	420	8400
3,0	39	635	596	9108
4,0	46	771	725	11427
5,0	55	893	838	12768
6,0	66	902	836	10589
7,0	68	910	842	10426
8,0	70	946	876	10962
9,0	76	976	900	10658
9,9	82	988	906	10010

Bg = radiação de fundo, obtida com 1,0 ml de urina não radioativa

Amostra = 1,0 ml de urina radioativa (aliquota da urina total de 24 horas de um dos pacientes estudados).

Os discriminadores de voltagem do analisador de altura de pulsos do sistema cintilador líquido foram ajustados no intervalo de 0,5 a 5,0 volts, quando ocorre o valor máximo para a relação sinal-ruído $(S^2/Bg)^{(19)(28)}$, como está indicado na Tabela II.

As amostras foram preparadas para contagem em frascos de vidro, de baixo teor de potássio(*) de 20 ml de capacidade, pela adição de solução cintiladora até completar 15 ml à alíquotas de 1,0 ml do lote de urina coletada em 24 horas ou 2,0 ml de extrato urinário⁽⁸⁾. A urina coletada, durante 24 horas, antes da administração de cortisol-1,2-³H, foi utilizada para a determinação da radiação de fundo ("background").

As amostras, em duplicata ou triplicata, foram contadas até acumular 10.000 contagens, para garantir um erro estatístico menor que 1%. Após adição de 1,0 ml de padrão interno, foram novamente submetidas à contagem. Através dos valores obtidos, determinaram-se as atividades das amostras, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (dpm)} = \frac{(A - Bg) \times P}{B - A}$$

onde:

- A = ritmo de contagem da amostra (cpm), antes da adição do padrão interno;
- P = atividade do padrão (dpm)
- B = ritmo de contagem da amostra (cpm), após adição do padrão interno;
- Bg = radiação de fundo, obtida com a urina não radioativa.

Do que foi exposto, para maior facilidade de entendimento, a Figura 2 representa esquematicamente o processo analítico de extração do glicuronato de THE urinário.

2.6. Medida da Taxa de Secreção de Cortisol

(*) (Spectravial I, order nº 3326, Nuclear Chicago Corporation).

Os discriminadores de voltagem do analisador de altura de pulsos do sistema cintilador líquido foram ajustados no intervalo de 0,5 a 5,0 volts, quando ocorre o valor máximo para a relação sinal-ruído $(S^2/Bg)^{(19)(28)}$, como está indicado na Tabela II.

As amostras foram preparadas para contagem em frascos de vidro, de baixo teor de potássio(*) de 20 ml de capacidade, pela adição de solução cintiladora até completar 15 ml à alíquotas de 1,0 ml do lote de urina coletada em 24 horas ou 2,0 ml de extrato urinário⁽⁸⁾. A urina coletada, durante 24 horas, antes da administração de cortisol-1,2-³H, foi utilizada para a determinação da radiação de fundo ("background").

As amostras, em duplicata ou triplicata, foram contadas até acumular 10.000 contagens, para garantir um erro estatístico menor que 1%. Após adição de 1,0 ml de padrão interno, foram novamente submetidas à contagem. Através dos valores obtidos, determinaram-se as atividades das amostras, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (dpm)} = \frac{(A - Bg) \times P}{B - A}$$

onde:

- A = ritmo de contagem da amostra (cpm), antes da adição do padrão interno;
- P = atividade do padrão (dpm)
- B = ritmo de contagem da amostra (cpm), após adição do padrão interno;
- Bg = radiação de fundo, obtida com a urina não radioativa.

Do que foi exposto, para maior facilidade de entendimento, a Figura 2 representa esquematicamente o processo analítico de extração do glicuronato de THE urinário.

2.6. Medida da Taxa de Secreção de Cortisol

(*) (Spectravial I, order nº 3326, Nuclear Chicago Corporation).

A partir dos resultados obtidos, a taxa de secreção de cortisol foi determinada num total de 11 indivíduos, sendo 6 normais, 3 com síndrome de Cushing, 1 com hiperplasia congênita virilizante adrenal com hipocortisolismo e 1 com adrenalectomia total, bilateral, mantido com 20 mg de cortisol oral, por dia, pelo emprêgo das fórmulas que se seguem:

$$S.C_1 = \frac{D}{A.E} \times 10^{-3}$$

$$S.C_2 = \frac{T}{A.E} \times 10^{-3}$$

onde:

S.C = taxa de secreção de cortisol (mg/24 horas), onde S.C₁ é o valor obtido a partir da dose injetada e S.C₂ o valor resultante da fração eliminada na urina;

D = atividade de cortisol-1,2-³H administrado (dpm);

A.E = atividade específica de THE (dpm/μg);

T = atividade total na urina de 24 horas (dpm).

O verdadeiro valor da secreção de cortisol^{(1) (9)}, situar-se-á entre os valores obtidos por S.C₁ e S.C₂.

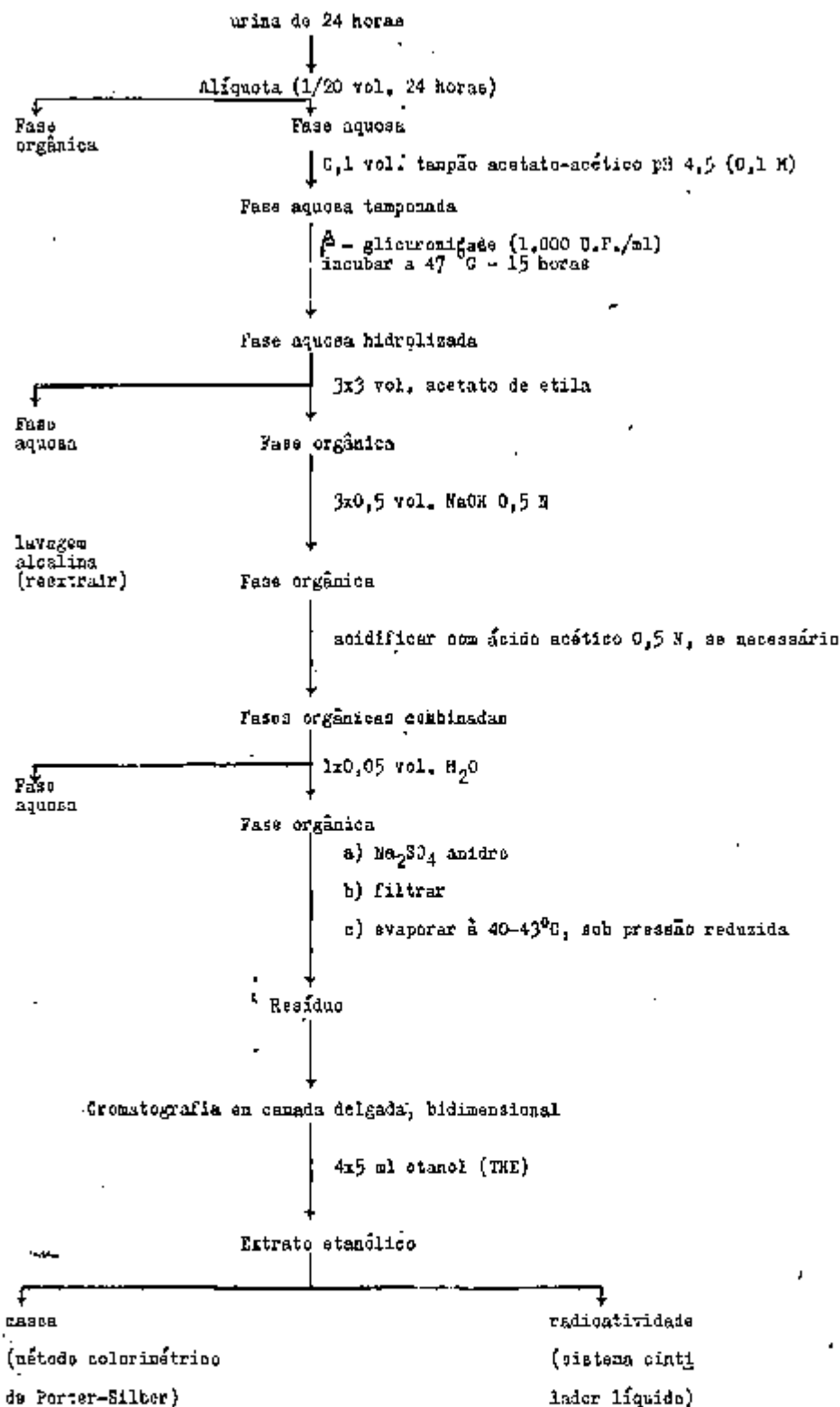


FIGURA 2. Representação esquemática do processo analítico para extração do glicuronato de THE urinário.

3.4. Taxa de Secreção de Cortisol

Na Tabela VI, estão indicados os valores da taxa de secreção de cortisol nos pacientes estudados, onde se verificam os resultados seguintes: a) para os indivíduos normais, obtiveram-se $23,5 \pm 5,8$ mg de cortisol/dia, a partir da dose administrada e $17,0 \pm 5,8$ mg de cortisol/24 horas, quando resultante da fração eliminada na urina. Aplicando-se o teste U⁽³⁴⁾, verifica-se, na comparação das taxas de secreção de cortisol, que os portadores de síndrome de Cushing apresentam valores significativamente mais altos do que os normais ($p_{1/2}$ obtido = 0,012; $p_{1/2}$ crítico = 0,025); b) para o paciente com hiperplasia congênita virilizante adrenal com hipocortisolismo, os valores obtidos foram baixos; c) para o paciente com adrenalectomia total bilateral, obtiveram-se 19,6 e 14,7 mg de cortisol/dia, valores estes compatíveis com a quantidade de cortisol administrado (20 mg/dia).

TABELA III

Valores de $R_f \times 100$ para padrão de THE, nos sistemas de desenvolvimento I e II.

Pacientes	Valores de $R_f \times 100$	
	I (*)	II (**)
GAM	25	19
RER	33	32
GSL	30	17
PR	40	20
VBF	37	30
HMG	31	18
HGM	30	24
LES	33	17
LCB	33	17
NMG	40	20
ICG	35	20
Média	33,4	21,3
s	±4,5	±5,2

(*) sistema I = clorofórmio: etanol (90:10 v/v)

(**) sistema II = diclorometano: metanol (150:10 v/v)

TABELA IV

Valores de excreção urinária de THE(*) nos pacientes estudados.

Indivíduos normais		
Caso nº	Paciente	Excreção de THE em 24 horas (mg)
1	GAM	3,1
2	RBR	3,3
3	GSL	3,3
4	PR	4,3
5	VBF	5,2
6	LES	1,9
Média		3,5
s		±1,1
Pacientes com síndrome de Cushing		
7	HGM	10,0
8	LCB	8,0
9	NMG	7,6
Pacientes com hipoadrenalismo		
10(**)	HMO	1,9
11(***)	ICG	1,4

(*) THE liberado por hidrólise enzimática de glicuronato de THE
 (**) Hiperplasia congênita virilizante adrenal com hipocortisolismo
 (***) Adrenalectomia total, bilateral, seguida com 20mg de corti-
 sol/dia.

TABELA V

Dose injetada de cortisol-1,2-³H, porcentagem excretada em 24 horas, e atividade específica de THE(*) urinário, nos pacientes estudados.

Caso nº	Paciente	Dose (dpm)	Excreção em 24 horas (%)	Atividade específica de THE (dpm/µg)
1	GAM	5,87.10 ⁶	81,7	210,0
2	RBR	5,87.10 ⁶	71,1	226,0
3	GSL	5,87.10 ⁶	76,0	328,6
4	PR	5,87.10 ⁶	68,2	310,5
5	VBF	9,77.10 ⁶	76,3	307,8
6	LES	9,77.10 ⁶	52,7	524,8
7	HGM	9,77.10 ⁶	62,2	85,2
8	LCB	9,77.10 ⁶	70,8	150,0
9	NMG	9,77.10 ⁶	75,8	184,8
10	HMO	9,77.10 ⁶	81,6	744,5
11	ICG	12,10.10 ⁶	75,0	618,2
Média			71,9	
s			±8,5	

(*) THE liberados por hidrólise enzimática do glicuronato de THE.

TABELA V

Dose injetada de cortisol-1,2-³H, percentagem excretada em 24 horas, e atividade específica de THE(*) urinário, nos pacientes estudados.

Caso nº	Paciente	Dose (dpm)	Excreção em 24 horas (%)	Atividade específica de THE (dpm/µg)
1	GAM	5,87.10 ⁶	81,7	210,0
2	RBR	5,87.10 ⁶	71,1	226,0
3	GSL	5,87.10 ⁶	76,0	328,6
4	PR	5,87.10 ⁶	68,2	310,5
5	VBF	9,77.10 ⁶	76,3	307,8
6	LES	9,77.10 ⁶	52,7	524,8
7	HGM	9,77.10 ⁶	62,2	85,2
8	LCB	9,77.10 ⁶	70,8	150,0
9	NMG	9,77.10 ⁶	75,8	184,8
10	HMO	9,77.10 ⁶	81,6	744,5
11	ICG	12,10.10 ⁶	75,0	618,2
Média			71,9	
s			±8,5	

(*) THE liberado, por hidrólise enzimática de glicuronato de THE.

TABELA V

Dose injetada de cortisol-1,2-³H, percentagem excretada em 24 horas, e atividade específica de THE(*) urinário, nos pacientes estudados.

Caso nº	Paciente	Dose (dpm)	Excreção em 24 horas (%)	Atividade específica de THE (dpm/µg)
1	GAM	5,87.10 ⁶	81,7	210,0
2	RBR	5,87.10 ⁶	71,1	226,0
3	GSL	5,87.10 ⁶	76,0	328,6
4	PR	5,87.10 ⁶	68,2	310,5
5	VBF	9,77.10 ⁶	76,3	307,8
6	LES	9,77.10 ⁶	52,7	524,8
7	HGM	9,77.10 ⁶	62,2	85,2
8	LCB	9,77.10 ⁶	70,8	150,0
9	NMG	9,77.10 ⁶	75,8	184,8
10	HMO	9,77.10 ⁶	81,6	744,5
11	ICG	12,10.10 ⁶	75,0	618,2
Média			71,9	
s			±8,5	

(*) THE liberado por hidrólise enzimática do glicuronato de THE.

TABELA VI

Valores da Taxa de Secreção de Cortisol nos pacientes estudados.

Indivíduos normais						
Caso nº	Pacientes	Idade e sexo	Peso (kg)	Altura (cm)	Taxa de secreção de cortisol	
					Dose admin. (dpm/A.E)	Excr. urin. 24h (dpm/A.E)
1	GAM	23a,M	50,6	166,5	27,9	22,8
2	RBR	33a,F	53,7	158,0	26,0	18,5
3	GSL	47a,M	79,4	164,0	17,9	13,6
4	PR	46a,M	54,1	171,5	18,9	12,9
5	VBF	28a,M	49,0	169,0	31,7	24,2
6	LES	32a,M	48,0	148,0	18,6	9,8
Média					23,5	17,0
s					±5,8	±5,8
Pacientes com síndrome de Cushing						
7	HGM	50a,F	54,9	155,5	109,7	68,2
8	LCB	20a,F	63,1	157,0	62,3	44,1
9	NMG	27a,F	57,0	145,0	52,9	40,1
Pacientes com hipoadrenalismo						
10(*)	HMO	18a,F	48,0	154,0	12,5	10,2
11(**)	ICG	25a,F	51,3	155,0	19,6	14,7

(*) Hiperplasia congênita virilizante adrenal com hipocortisolismo

(**) Adrenalectomia total, bilateral, mantida com 20 mg de cortisol/dia.

TABELA VIII

Taxa de secreção de cortisol em indivíduos normais - Comparação dos resultados obtidos com os relatados na literatura.

Autor(es)	Método	Taxa de secreção de cortisol (mg/24 horas) S.C1
Hanada, S.	atividade específica de THE	17,9-31,7 ($\bar{X} = 23,5$)
Cope e Black ⁽⁹⁾	atividade específica de THE urinário	4,9-24,0 ($\bar{X} = 14,5$)
Flood e cols. ⁽¹²⁾	atividade específica de THE e allo-THF	12,2-20,5
Romanoff e cols. ⁽³¹⁾	atividade específica de THE	15,5-31,4
Mlynaryk e col. ⁽²⁾	atividade específica de THE e THF	9,9-28,7 ($\bar{X} = 16,1 \pm 6,5$)
Layne e col. ⁽¹⁷⁾	atividade específica de THE e allo-THF	16,1 \pm 0,8
Biglieri e col. ⁽⁴⁾	atividade específica de THE e allo-THF	9-31 ($\bar{X} = 18,8$)
Van Der Straeten e col. ⁽³⁸⁾	atividade específica de THE, THF e allo-THF	15,9-30,9 ($\bar{X} = 21,4$)
Albuquerque e Wajchenberg ⁽¹⁾	atividade específica de THE	8,5-14,8
Bailey e West ⁽²⁾	atividade específica dos metabolitos conjugados com ácido glicurônico	16,4-18,5

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho, cujo interesse foi o de determinar a taxa de secreção de cortisol, utiliza o princípio da diluição isotópica (26) (39).

Administrando-se endovenosamente uma quantidade "traço" de cortisol radioativo, êle se distribuirá, como o esteróide endógeno, igualmente entre todos os metabolitos conhecidos e desconhecidos e irá aparecer na urina. O esteróide marcado e seus metabolitos são diluídos pelo correspondente esteróide não marcado e seus metabolitos, e o fator dessa diluição pode ser determinado medindo-se o conteúdo isotópico do próprio esteróide ou de um ou vários dos seus metabolitos. Conhecendo-se a quantidade e a atividade específica do esteróide administrado, a atividade específica do metabolito isolado e o tempo de coleta da urina (após administração do esteróide radioativo), a taxa de secreção de cortisol será fornecida pela expressão:

$$S.C = \left(\frac{A_o E_i}{A_o E} - 1 \right) a \times d \times 10^{-3} \quad (I)$$

onde:

- S.C = taxa de secreção de cortisol (mg/dia);
- A.E = atividade específica do metabolito isolado;
- A.E_i = atividade específica do esteróide injetado;
- a = quantidade de esteróide administrado;
- d = número de dias.

No presente trabalho, a expressão (I), resume-se a:

$$S.C_1 = \frac{D}{A_o E} \times 10^{-3} \quad (II)$$

onde:

- S.C₁ = taxa de secreção de cortisol (mg/dia);

A.E = atividade específica do esteróide isolado (THE);
D = atividade do esteróide administrado (dpm).

Uma vez que, o período de coleta da urina foi de 24 horas (portanto, $d=1$) e a massa do esteróide administrado, infinitamente pequena (\bar{a} = desprezível).

O valor da taxa de secreção de cortisol será fornecido pela expressão (II), se toda a dose injetada for eliminada na urina de 24 horas. Entretanto, como isto não ocorre (Tabela V), o verdadeiro valor da taxa de secreção de cortisol situar-se-á entre os valores obtidos por $S.C_1$ e $S.C_2$, evidentemente.

A expressão (III) dá o valor da taxa de secreção de cortisol resultante da fração de dose excretada na urina:

$$S.C_2 = \frac{T}{A.E} \times 10^{-3} \quad (III)$$

onde:

$S.C_2$ = taxa de secreção de cortisol (mg/24 horas);
T = atividade total na urina de 24 horas (dpm);
A.E = atividade específica do metabolito isolado (THE).

Todavia, a taxa de secreção calculada em paciente adrenalectomizado, mantido com 20 mg diários de cortisol (F), forneceu um valor de 19,6 mg F/dia, quando obtido a partir da dose administrada e 14,7 mg F/dia, (Tabela VI), quando derivado da fração eliminada na urina, sugerindo que o valor real da taxa de secreção de cortisol, calculado pela técnica em uso, está mais próximo do obtido com a fórmula $S.C_1$, relacionada com a dose injetada (Tabela VI).

É importante notar que, como em todos os ensaios de diluição isotópica, os resultados não são invalidados pelas perdas que possam ocorrer em quaisquer etapas do método, exceto o cuidado da coleção urinária que deve ser completa no período em estudo. Este detalhe é importante considerando que interessa apenas a atividade específica (relação radioatividade/massa correspondente). A fim de que a validade desse método

seja preservada, os seguintes itens devem ser observados⁽²⁾⁽⁹⁾:

- a) a administração das moléculas do esteróide radioativo não deve afetar o equilíbrio entre as moléculas endógenas livres e as ligadas à proteína;
- b) a via de metabolização do esteróide em estudo deve permanecer constante durante o período de coleta da urina. A circunstância em que este requisito não é preenchido é quando ocorre aumento repentino na secreção de cortisol, durante o tempo de coleta do material, de tal forma que o equilíbrio cortisol-cortisona é rompido. No presente trabalho, esse requisito foi preenchido pela coleta da urina no intervalo de 0 a 24 horas após administração do cortisol, pois é sabido que ocorre variação nictemeral na taxa de secreção de cortisol⁽²⁵⁾; além disso, os pacientes estavam em condições clínicas de equilíbrio dinâmico ("steady state");
- c) após a filtração glomerular do esteróide radioativo, o rim não deverá discriminar entre cortisol marcado e não marcado. Assim sendo, a reabsorção tubular não deverá ser diferente para o cortisol radioativo e não-radioativo;
- d) o metabolito utilizado para o cálculo deve provir somente do esteróide "pai" em estudo. Portanto, no estudo da taxa de secreção de cortisol, a tetra-hidro cortisona (THE) excretada deve ser totalmente derivada do cortisol secretado, no qual o traçador radioativo injetado se distribuiu uniformemente.

O método aqui apresentado, envolve, pois, os seguintes estágios: a) determinação da massa de um dos metabolitos urinários (THE) do cortisol; b) determinação da atividade específica desse metabolito; c) determinação da radioatividade injetada e da fração excretada na urina no período de 24 horas após a infusão aguda de cortisol.

A via endovenosa foi utilizada para administrar o cortisol- $1,2-^3\text{H}$, a fim de eliminar quaisquer dúvidas quanto à completa absorção do mesmo, embora COPE e BLACK⁽⁹⁾ e HANADA e WAJCHENBERG⁽¹⁵⁾ tenham encontrado boa correspondência entre os valores da taxa de secreção obtidos pelas vias oral e endovenosa.

seja preservada, os seguintes itens devem ser observados⁽²⁾⁽⁹⁾:

- a) a administração das moléculas do esteróide radioativo não deve afetar o equilíbrio entre as moléculas endógenas livres e as ligadas à proteína;
- b) a via de metabolização do esteróide em estudo deve permanecer constante durante o período de coleta da urina. A circunstância em que este requisito não é preenchido é quando ocorre aumento repentino na secreção de cortisol, durante o tempo de coleta do material, de tal forma que o equilíbrio cortisol-cortisona é rompido. No presente trabalho, esse requisito foi preenchido pela coleta da urina no intervalo de 0 a 24 horas após administração do cortisol, pois é sabido que ocorre variação nictemeral na taxa de secreção de cortisol⁽²⁵⁾; além disso, os pacientes estavam em condições clínicas de equilíbrio dinâmico ("steady state");
- c) após a filtração glomerular do esteróide radioativo, o rim não deverá discriminar entre cortisol marcado e não marcado. Assim sendo, a reabsorção tubular não deverá ser diferente para o cortisol radioativo e não-radioativo;
- d) o metabolito utilizado para o cálculo deve provir somente do esteróide "pai" em estudo. Portanto, no estudo da taxa de secreção de cortisol, a tetra-hidrocortisona (THE) excretada deve ser totalmente derivada do cortisol secretado, no qual o traçador radioativo injetado se distribuiu uniformemente.

O método aqui apresentado, envolve, pois, os seguintes estágios: a) determinação da massa de um dos metabolitos urinários (THE) do cortisol; b) determinação da atividade específica desse metabolito; c) determinação da radioatividade injetada e da fração excretada na urina no período de 24 horas após a infusão aguda de cortisol.

A via endovenosa foi utilizada para administrar o cortisol -1,2-³H, a fim de eliminar quaisquer dúvidas quanto à completa absorção do mesmo, embora COPE e BLACK⁽⁹⁾ e HANADA e WAJCHENBERG⁽¹⁵⁾ tenham encontrado boa correspondência entre os valores da taxa de secreção obtidos pelas vias oral e endovenosa.

seja preservada, os seguintes itens devem ser observados⁽²⁾⁽⁹⁾:

- a) a administração das moléculas do esteróide radioativo não deve afetar o equilíbrio entre as moléculas endógenas livres e as ligadas à proteína;
- b) a via de metabolização do esteróide em estudo deve permanecer constante durante o período de coleta da urina. A circunstância em que este requisito não é preenchido é quando ocorre aumento repentino na secreção de cortisol, durante o tempo de coleta do material, de tal forma que o equilíbrio cortisol-cortisona é rompido. No presente trabalho, esse requisito foi preenchido pela coleta da urina no intervalo de 0 a 24 horas após administração do cortisol, pois é sabido que ocorre variação nictemeral na taxa de secreção de cortisol⁽²⁵⁾; além disso, os pacientes estavam em condições clínicas de equilíbrio dinâmico ("steady state");
- c) após a filtração glomerular do esteróide radioativo, o rim não deverá discriminar entre cortisol marcado e não marcado. Assim sendo, a reabsorção tubular não deverá ser diferente para o cortisol radioativo e não-radioativo;
- d) o metabolito utilizado para o cálculo deve provir somente do esteróide "pai" em estudo. Portanto, no estudo da taxa de secreção de cortisol, a tetra-hidrocortisona (THE) excretada deve ser totalmente derivada do cortisol secretado, no qual o traçador radioativo injetado se distribuiu uniformemente.

O método aqui apresentado, envolve, pois, os seguintes estágios: a) determinação da massa de um dos metabolitos urinários (THE) do cortisol; b) determinação da atividade específica desse metabolito; c) determinação da radioatividade injetada e da fração excretada na urina no período de 24 horas após a infusão aguda de cortisol.

A via endovenosa foi utilizada para administrar o cortisol -1,2-³H, a fim de eliminar quaisquer dúvidas quanto à completa absorção do mesmo, embora COPE e BLACK⁽⁹⁾ e HANADA e WAJCHENBERG⁽¹⁵⁾ tenham encontrado boa correspondência entre os valores da taxa de secreção obtidos pelas vias oral e endovenosa.

O método consiste, inicialmente, na separação de um metabólito urinário de cortisol, o THE. O cortisol presente na urina não é adequado para esse estudo, pois encontra-se em concentração inferior a 50 µg/dia, na urina de indivíduos normais⁽¹⁰⁾. Foi separado o THE (tetra-hidro cortisona), pois este é encontrado na urina em quantidades relativamente grandes, cerca de 3,5 mg/dia na urina de indivíduos normais (Tabela IV). Essa substância é eliminada principalmente na forma conjugada com ácido glicurônico, sendo isolada por técnica cromatográfica em camada delgada, depois de sofrer hidrólise enzimática com β-glicuronidase (15 horas, 47°C, 1.000 Unidades Fishman/ml), conforme GLENN e NELSON⁽¹³⁾.

Após extração com acetato de etila, a fase orgânica foi submetida a lavagem alcalina com solução diluída de NaOH, a fim de remover a grande maioria das substâncias (ácidos, pigmentos, estrógenos) que, eventualmente, poderiam interferir nos ensaios químicos do adrenocorticosteroide. De acordo com estudos realizados por ROMANOFF e col.⁽³²⁾, 98 a 108% de THF e THE adicionados à urina são recuperados após a lavagem alcalina dos extratos urinários.

Foi utilizada a técnica cromatográfica bidimensional por apresentar melhor separação para o THE, do que os métodos cromatográficos unidimensionais relatados por outros pesquisadores⁽¹⁾⁽³⁰⁾.

Para a determinação da radioatividade da urina e do extrato urinário, foram preparadas amostras obedecendo as proporções ótimas de volumes de urina para a solução cintiladora (1 ml de urina: 14 ml de solução cintiladora), estabelecidas por BUTLER⁽⁸⁾, visando obter melhor eficiência de contagem no sistema cintilador líquido.

As experiências anteriormente realizadas por diversos pesquisadores sobre a taxa de secreção de cortisol, estão indicadas na Tabela VII. Assim, BONDY e ALTROCK⁽⁵⁾, GRANT e col.⁽¹⁴⁾ e HARDY e TURNER⁽¹⁶⁾ obtiveram 20-30 mg de cortisol/dia, a partir da análise do sangue da veia adrenal. Esse processo apresenta, como já indicado, o inconveniente de induzir, de modo inevitável, uma condição de "stress", estimulando a atividade adrenal. SAMUELS e col.⁽³³⁾ obtiveram 37 mg F/dia para indivíduos normais, pelo estudo da velocidade de desaparecimento de doses farmacológicas de cortisol (F) endovenoso. WAJCHENBERG e col.⁽⁴⁰⁾, empregando a

mesma técnica, obtiveram valores de 34 a 46 mg em 3 indivíduos normais. DOREMAN⁽¹¹⁾ e SILBER⁽³⁵⁾, pelo estudo de determinados grupos de metabólitos urinários do cortisol, obtiveram 18-21 mg e 30-60 mg de cortisol/dia, respectivamente. MOXHAM e NABARRO⁽²²⁾, relacionaram a dose administrada com a excreção urinária dos 17-ceto e 17-hidrocorticosteróides, tendo obtido 5,5-49 mg e 9,5-45 mg F/dia, respectivamente.

PETERSON e WYNGAARDEN⁽²⁵⁾ determinaram a taxa de secreção de cortisol pela injeção de cortisol-4-¹⁴C e análise da redução da atividade específica do cortisol sanguíneo, em indivíduos normais, em condições clínicas estáveis (17-29 mg de cortisol/dia) e quando submetidos a estímulos da adrenal (154 mg de cortisol/dia). Em virtude da atividade rítmica nictemeral do cortex adrenal, esse método é indicado apenas para estudos de secreção do hormônio durante um intervalo de tempo relativamente curto.

Os valores da taxa de secreção de cortisol, em indivíduos normais, obtidos pelo método aqui apresentado (Tabela VI), com a média de 23,5 mg (a partir da dose injetada) e 17,0 mg de cortisol/dia (a partir da fração de dose eliminada na urina de 24 horas), podem ser comparados com os apresentados por COPE e BLACK⁽⁹⁾, FLOOD e col.⁽¹²⁾, ROMANOFF e col.⁽³¹⁾, MLYNARYK e col.⁽²⁰⁾, LAYNE e col.⁽¹⁷⁾, BIGLIERI e col.⁽⁴⁾, VAN DER STRAETEN e col.⁽³⁸⁾, ALBUQUERQUE e WAJCHENBERG⁽¹⁾ e BAILEY e WEST⁽²⁾, que determinaram a taxa de secreção de cortisol (mg/24 horas) baseando-se na atividade específica de um ou mais metabólitos do hormônio. A Tabela VIII apresenta os resultados por nós obtidos, em indivíduos normais, para efeito de comparação com os resultados da literatura. Os valores estão referidos para S.C₁ (taxa de secreção de cortisol relacionada com a atividade injetada) por ter sido esta a forma de expressão dos resultados, utilizada pelos autores.

O método da cromatografia em papel foi o utilizado por COPE e BLACK⁽⁹⁾, ROMANOFF e col.⁽³¹⁾, MLYNARYK e col.⁽²⁰⁾, BIGLIERI e col.⁽⁴⁾ e VAN DER STRAETEN e col.⁽³⁸⁾ para separação de THE ou também THF do extrato urinário. O inconveniente desse processo é o tempo gasto para o desenvolvimento da cromatografia, variando de um a vários dias (4-5 dias ou mais). A cromatografia em coluna de silicagel foi a técnica de escolha para LAZARUS⁽¹⁸⁾, enquanto que ALBUQUERQUE e WAJCHENBERG⁽¹⁾ e BAILEY e

WEST⁽²⁾ utilizaram a cromatografia em camada delgada, unidimensional. Estes últimos pesquisadores empregaram, paralelamente, a cromatografia a gás.

Pelos valores indicados na Tabela V, verifica-se que apenas 71,9% (52,7-81,7%) da radioatividade injetada foi eliminada na urina de 24 horas. Esta percentagem é inferior à média obtida por outros pesquisadores (Tabela VII). Tendo em vista a finalidade do presente trabalho, que é o de informar as taxas de secreção de cortisol em indivíduos normais e com disfunção adrenocortical, podemos dizer que, para fins clínicos, ele se aplica convenientemente.

Pela Tabela VI, verifica-se na comparação das taxas de secreção de cortisol que, os pacientes com síndrome de Cushing apresentam valores significativamente mais altos do que os normais (109,7; 62,3 e 52,9 mg de cortisol/dia); do mesmo modo, em paciente com hipocortisolismo, o resultado (12,5 mg) está abaixo do intervalo da normalidade (17,9-31,7mg de cortisol/dia).

5. CONCLUSÕES

- 1) A separação da tetra-hidrocortisona (THE) por técnica cromatográfica bidimensional em camada delgada, permite medir a taxa de secreção de cortisol.
- 2) A técnica cromatográfica bidimensional em camada delgada, mostrou-se adequada, tendo em vista seu desenvolvimento rápido.
- 3) A técnica de diluição isotópica, mostrou ser, igualmente neste trabalho, um valioso subsídio para a medida da taxa de secreção de cortisol.
- 4) Os valores relatados para indivíduos normais e portadores de disfunção adrenocortical, são estatisticamente diferentes, permitindo distingui-los para fins diagnósticos.

6. RESUMO

Foi desenvolvido um método de medida da taxa de secreção diária de cortisol, pela adrenal do homem, injetando-se cortisol-1,2-³H e determinando-se a atividade específica de tetra-hidro cortisona (THE) excretada na urina de 24 horas. A técnica da cromatografia em camada delgada, bidimensional, foi utilizada para separação e identificação desse esteroide. A massa de tetra-hidro cortisona (THE) foi determinada através de reação colorimétrica de Porter-Silber e a radioatividade pelo sistema cintilador líquido.

A taxa de secreção de cortisol foi calculada a partir da relação D/A.E (radioatividade injetada/atividade específica) $\overline{[S.C_1]}$ e T/A.E (radioatividade total na urina de 24 horas/atividade específica) $\overline{[S.C_2]}$.

Em 11 indivíduos, a recuperação do cortisol-1,2-³H administrado, em 24 horas, variou de 52,7 a 81,7%, com a média de 71,9%. Em um paciente com adrenalectomia total bilateral, mantido com 20 mg de cortisol/dia, por via oral, o $\overline{[S.C_1]}$ forneceu 19,6 mg de cortisol/dia e o $\overline{[S.C_2]}$, 14,7 mg de cortisol/dia. Isto sugere que, o valor real da taxa de secreção de cortisol, calculado pela técnica em uso, está mais próximo do obtido a partir da atividade injetada $\overline{[S.C_1]}$, do que o obtido a partir da atividade excretada na urina $\overline{[S.C_2]}$.

Em 6 indivíduos normais, a taxa média de secreção (média \pm 1 desvio padrão) foi 23,5 \pm 5,8 mg de cortisol/dia, quando determinado pelo $\overline{[S.C_1]}$ e 17,0 \pm 5,8 mg de cortisol/24 horas, pelo $\overline{[S.C_2]}$. Em 3 pacientes com síndrome de Cushing os valores obtidos foram 109,7; 62,3 e 52,9 mg de cortisol/dia, pelo $\overline{[S.C_1]}$ e, respectivamente, 68,2; 44,1 e 40,1 mg de cortisol/dia, pelo $\overline{[S.C_2]}$. Esses valores são significativamente mais altos do que os dos normais.

Em um paciente com hiperplasia congênita virilizante adrenal com hipocortisolismo, foram obtidos 12,5 mg e 10,2 mg de cortisol/24 horas, pelos $\overline{[S.C_1]}$ e $\overline{[S.C_2]}$, respectivamente. Esses valores são inferiores aos normais, confirmando a aplicabilidade da técnica para valores baixos.

SUMMARY

A method has been developed for measuring the daily secretion rate of cortisol by the adrenal in man, using cortisol-1,2-³H and determining the specific activity of tetrahydrocortisone (THE) excreted in the 24-hour urine. This steroid identification and separation has been carried out by two-dimensional, thin-layer chromatographic technique. The amount of THE has been determined by the colorimetric reaction of Porter-Silber and its radioactivity using a liquid scintillation spectrometry.

The cortisol secretion rate has been estimated by the ratio D/S.A. (injected radioactivity/urinary S.A.) $\overline{[S.R_1]}$ and by U/S.A._g (total radioactivity in 24-hour urine/urinary S.A.) $\overline{[S.R_2]}$.

In 11 subjects, the recovery of the administered cortisol-1,2-³H in first 24 hours, ranged between 52.7 and 81.7%, with mean of 71.9%. In one patient with bilateral total adrenalectomy, maintained with 20 mg cortisol/daily, by oral route, $\overline{[S.R_1]}$ gave 19.6 mg cortisol/day and $\overline{[S.R_2]}$ 14.7 mg cortisol/day. This suggests that the actual value of cortisol secretion rate is more closely approximated by obtained from injected radioactivity $\overline{[S.R_1]}$.

In 6 normal subjects, the mean secretion rate (mean value \pm 1 standard deviation) was 23.5 \pm 5.8 mg cortisol/day, when estimated by $\overline{[S.R_1]}$ and 17.0 \pm 5.8 mg cortisol/24 hours by $\overline{[S.R_2]}$. In 3 patients with Cushing's syndrome, the values were 109.7, 62.3 and 52.9 mg cortisol daily by $\overline{[S.R_1]}$ and 68.2, 44.1 and 40.1 mg cortisol/day, respectively by $\overline{[S.R_2]}$. The values in these patients are significantly higher than those of normal.

In one patient with congenital virilizing adrenal hyperplasia with hypocortisolism the values obtained by $\overline{[S.R_1]}$ and $\overline{[S.R_2]}$ were respectively, 12.5 mg and 10.2 mg cortisol/24 hours. These values indicate the applicability of the technique to low secretion rates.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Albuquerque, R. H. and Wajchenberg, B. L. - "A simple technique for separation of cortisol metabolites by thin-layer chromatography and its application for the measurement of cortisol secretion rate".
Archos. Bras. Endocr. Metab. 16, 183-190 (1967)
- (2) Bailey, E. and West, H. F. - "The secretion, interconversion and catabolism of cortisol, cortisone and some of their metabolites in man".
Acta Endocr. 62, 339-359 (1969)
- (3) Bertrand, J.; Laros, B. and Cautenet, B. - "Cortisol secretion rate determination in children by an isotope dilution method".
Acta Endocr. Suppl. 89, 16-17 (1964)
- (4) Biglieri, E. G.; Jane, S.; Slaton, P.E. and Forsham, P. H. - "'In vivo" and "in vitro" studies of adrenal secretions in Cushing's syndrome and primary aldosteronism".
J. Clin. Invest. 42, 516-524 (1963)
- (5) Bondy, P. K. and Altrock, J. R. - "Estimation of the rate of release of adrenal 17-hydroxycorticosteroids in the human being by the venous catheter technique with a method for determining plasma 17 - hydroxycorticosteroids".
J. Clin. Invest. 32, 703-710 (1953)
- (6) Bransome Jr., E. D. - "The Current Status of Liquid Scintillation Counting".
Grune & Stratton, Inc., 1970
- (7) Brooks, R. V. and Prunty, F. T. G. - "Studies on the estimation of cortisol production".
J. Endocr. 20, xiii-xiv (1960)

- (17) Layne, D. S.; Meyer, C. J.; Walshwarrar, P. S. and Pincus, G. - "The secretion and metabolism of cortisol and aldosterone in normal and in steroid-treated women".
J. Clin. Endocr. Metab. 22, 107-108 (1962)
- (18) Lazarus, L. - "Factors influencing the accuracy of cortisol secretion rate estimations".
J. Chromat. 9, 581-586 (1962)
- (19) Low, F. H. - "Statistics of radioisotope measurements", in Instrumentation in Nuclear Medicine, vol. I, 34-36 - Academic Press - Ed. Gerald J. Hine, 1967
- (20) Mlynaryk, P.; Gillies, R. R.; Murphy, B. and Pattee, G. J. - "Cortisol production rates in obesity".
J. Clin. Endocr. Metab. 22, 587-591 (1962)
- (21) McCarthy, J. L.; Brodsky, A. L.; Mitchell, J. A. and Herrscher, R. F. "Thin-layer chromatography of adrenal corticoids - Observations on change in Mobilities".
Analyt. Biochem. 8, 164-170 (1964)
- (22) Moxham, A. and Nabarro, J. D. N. - "Urinary glucocorticoid excretion".
J. Clin. Pathol. 9, 351-357 (1956)
- (23) Péron, F. G. - "Adrenocorticosteroids", in Methods in Hormone Research, 1, 212 - Academic Press, Ed. Ralph I. Dorfman, 1962.
- (24) Peterson, R. E. - "The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man", Recent Prog. Horm. Res. 15, 231-261 (1959)
- (25) Peterson, R. E. and Wyngaarden, J. B. - "The miscible pool and turnover rate of hydrocortisone in man".
J. Clin. Invest. 35, 552-561 (1956)

- (17) Layne, D. S.; Meyer, C. J.; Waishwarrar, P. S. and Pincus, G. - "The secretion and metabolism of cortisol and aldosterone in normal and in steroid-treated women".
J. Clin. Endocr. Metab. 22, 107-108 (1962)
- (18) Lazarus, L. - "Factors influencing the accuracy of cortisol secretion rate estimations".
J. Chromat. 9, 581-586 (1962)
- (19) Low, F. H. - "Statistics of radioisotope measurements", in Instrumentation in Nuclear Medicine, vol. I, 34-36 - Academic Press - Ed. Gerald J. Hine, 1967
- (20) Mlynaryk, P.; Gillies, R. R.; Murphy, B. and Pattee, G. J. - "Cortisol production rates in obesity".
J. Clin. Endocr. Metab. 22, 587-591 (1962)
- (21) McCarthy, J. L.; Brodsky, A. L.; Mitchell, J. A. and Herrscher, R. F. "Thin-layer chromatography of adrenal corticoids - Observations on change in Mobilities".
Analyt. Biochem. 8, 164-170 (1964)
- (22) Moxham, A. and Nabarro, J. D. N. - "Urinary glucocorticoid excretion".
J. Clin. Pathol. 9, 351-357 (1956)
- (23) Péron, F. G. - "Adrenocorticosteroids", in Methods in Hormone Research, 1, 212 - Academic Press, Ed. Ralph I. Dorfman, 1962.
- (24) Peterson, R. E. - "The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man", Recent Prog. Horm. Res. 15, 231-261 (1959)
- (25) Peterson, R. E. and Wyngaarden, J. B. - "The miscible pool and turnover rate of hydrocortisone in man".
J. Clin. Invest. 35, 552-561 (1956)

- (26) Pieroni, R. R. - "Metodologia Y Aplicaciones Clinicas de los Radioisotopos", 129-139, Curso dado na Universidade Nacional de Assunção, Paraguai, julho de 1959, Publicação IEA-35.
- (27) Porter, C. C. and Silber, R. H. - "A quantitative color reaction for cortisone and related 17, 21-dihydroxy-20-ketosteroids".
J. Biol. Chem. 185, 201-207 (1950)
- (28) "Procedure for counting samples of one isotope only", in Operating Instructions for Liquid Scintillation Systems 724 and 725, 78-80 Nuclear Chicago Corporation, Des Plaines, Illinois, 1964.
- (29) "Procedure for channels ratio counting of tritium samples only", in Operating Instructions for Liquid Scintillation Systems 724 and 725, 84-86, Nuclear Chicago Corporation, Des Plaines, Illinois, 1964.
- (30) Quesenberry, R. O. and Ungar, F. - "Thin-layer chromatographic systems for adrenal corticosteroids"
Analyt. Biochem. 8, 192-199 (1964)
- (31) Romanoff, L. P.; Morris, C. W.; Welch, P.; Rodriguez, R. M. and Pincus, G. - "The metabolism of cortisol-4-¹⁴C in young and elderly men. Secretion rate of cortisol and daily excretion of tetra-hydrocortisol, allotetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone and cortolone (20 α and 20 β)".
J. Clin. Endocr. Metab. 22, 587-591 (1962)
- (32) Romanoff, L. P.; Rodriguez, R. M.; Seelye, J. M. and Pincus, G. - "Determination of tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone in the urine of normal and schizophrenic man".
J. Clin. Endocr. Metab. 17, 777-785 (1957)
- (33) Samuels, L. T.; Brown, H.; Eiknes, K.; Tyler, F. H. and Dominguez, O. V. - "Extra-adrenal factors affecting the levels of 17-hydroxycorticosteroids in plasma".
CIBA Foundation Colloq. on Endocr. 11, 208-230, (1957)

- (34) Siegel, S. - "Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences" 116-127, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., 1956
- (35) Silber, R. H. - "Estimation of hydrocortisone secretion - Method of calculation from urinary excretion data".
Clin. Chem. 1, 234, (1955)
- (36) Silber, R. H. and Porter, C. C. - "Determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma", in Methods of Biochemical Analysis 4, 159-161, Interscience Publishers, Inc., New York, Ed. David Glick, 1957.
- (37) Tait, J. R. - "The use of isotopic steroids for the measurement of production rates "in vivo"".
J. Clin. Endocr. Metab. 23, 1285-1297 (1963)
- (38) Van Der Straeten, M.; Vermeulen, A. and Orie, N. - "The determination of cortisol and corticosterone production rates by an isotope dilution method".
Acta Endocr. 43, 430-438 (1963)
- (39) Veall, N. and Vetter, H. - "Radioisotope Techniques in Chemical Research and Diagnosis", 175-188, London, Butterworths, 1963.
- (40) Wajchenberg, B. L.; Quintão, E. R.; Liberman, B. e Melo, E. H. L. - "Emprego de métodos não isótopos para a determinação da velocidade de produção de cortisol "in vivo", no homem".
Archos. Bras. Endocr. Metab. 14, 237-248 (1965)

ERRATA

MEDIDA DA TAXA DE SECREÇÃO DE CORTISOL NO HOMEM
(UTILIZAÇÃO DE CORTISOL-1,2-³H)

pág.	linha	onde se lê	leia-se
Abreviaturas	5	p-bis [2-(5-feniloxa zol)] benzeno	p-bis [2-(5-feniloxa zolil)] benzeno
10	11	idem	idem
22	15	Mlynaryk e col. (2)	Mlynaryk e col. (20)