

ES 72-132



**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DO CORTISOL NO PLASMA
HUMANO POR COMPETIÇÃO À PROTEÍNA FIXADORA (TRANSCORTINA)**

Helena Okada

DISSERTAÇÃO E TESE IEA 040

JANEIRO/1978

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DO CORTISOL NO PLASMA
HUMANO POR COMPETIÇÃO À PROTEÍNA FIXADORA (TRANSCORTINA)**

Helena Okada

Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em Fisiologia" – Orientador Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg. Apresentada e defendida em 20 de junho de 1975, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

APROVADA PARA PUBLICAÇÃO EM JUNHO/1977

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach - Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal 11.049 (Pinheiros)
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
SÃO PAULO - BRASIL

ÍNDICE

	Página
1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	1
2 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	4
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 – Fonte de Proteína Conjugadora	8
3.2 – Cortisol Radioativo	8
3.3 – Estabelecimento da Diluição Adequada da Proteína Conjugadora	9
3.4 – Solução de Transcortina-Cortisol Tritiado	9
3.5 – Solvente de Extração	9
3.6 – Solução de Cortisol de Referência	9
3.7 – Medida de Radioatividade	9
3.8 – Técnica e Seqüência Operacional da Dosagem de "Cortisol" por Competição em Amostras de Plasma Humano	10
3.9 – Preparação de Amostras de Plasma	10
3.10 – Curva-Padrão	12
3.11 – Competição	13
3.12 – Separação do Hormônio Mercado Livre Daquela Fração Ligada à Proteína Conjugadora	13
3.13 – Cálculo e Correção dos Resultados	13
3.14 – Avaliação da Seqüência Operacional para o Ensaio de "Cortisol" em Plasma	14
4 – RESULTADOS	15
4.1 – Determinação da Diluição Adequada da Proteína Conjugadora	15
4.2 – Obtenção das Curvas de Dose-Resposta	17
4.3 – Avaliação das Características do Método	17
4.4 – Amostras de Plasma	29
5 – DISCUSSÃO	31
6 – CONCLUSÕES	33
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ABREVIATURAS

F	11 β , 17 α , 21-trihydroxipregnan, 3,20-dione-(cortisol)
Composto S	11-deoxicortisol
PPO	2,5 difeniloxazol
Dimetil-POPOP	{ 1,4-bis[2-(4-metil-5-feniloxazolil)] } benzeno
cpm	contagens por minuto
rpm	rotações por minuto
\bar{X}	Média
D.P.	Desvio padrão
E.P.M.	Erro padrão da média
C.V.	Coefficiente de variação
I.C.	Intervalo de confiança
r	Coefficiente de correlação
α	Nível de significância
CBG	Iniciais de corticosteroid Binding Protein
17-OHC	17-hidroxi-corticosteróides
(1,2- ³ H)-F	cortisol tritiado
Å	Angstrom

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MEDIDA DO CORTISOL NO PLASMA HUMANO POR COMPETIÇÃO À PROTEÍNA FIXADORA (TRANSCORTINA)

Helena Okada

1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

A dosagem de hormônios adrenais em líquido biológico, até a década de 60, era feita através de processos analíticos que exploravam a configuração química de grupos específicos. Por se apresentarem os referidos hormônios em concentrações relativamente baixas no plasma, os métodos químicos, embora específicos, carecem de precisão, sensibilidade e requerem muito tempo na sua feitura^(15,16,17,18).

Recentemente, introduziram-se técnicas ditas de saturação ou de deslocamento dependentes da competição de duas formas da mesma molécula (uma radioativa e outra não radioativa) por locais reativos de uma segunda molécula de concentração menor.

Uma das formas da análise de saturação é a chamada "análise de competição à fixação proteica" em que uma molécula da reação é uma proteína com elevada afinidade e especificidade para a outra, que se pretende medir. A proteína mencionada pode ser um anticorpo (radioimunoensaio), uma enzima (ensaio radioenzimico) ou uma proteína circulante que tem especificidade e afinidade para a substância a ser analisada, fornecendo locais específicos de fixação.

A quantificação de hormônios adrenais somente se tornou mais acessível à rotina quando se associaram às propriedades fixadoras específicas de determinadas proteínas plasmáticas, com alta afinidade para os esteróides, a extrema sensibilidade das medidas radioativas.

Foi introduzida, inicialmente por Ekins (1960)⁽⁶⁾, para a determinação de tiroxina plasmática e adaptada por Murphy, Engelberg e Pattee, em 1963, para os esteróides⁽¹⁹⁾. Subsequentemente, Murphy (1967, 1969) aumentou a sensibilidade da técnica, utilizando hormônio tritiado como traçador^(17,18).

A técnica por competição à proteína fixadora tem por princípio fundamental as reações de equilíbrio entre o hormônio livre com complexo proteína conjugadora-hormônio, esquematicamente representadas na Figura 1. Colocando em contacto hormônio marcado e proteína fixadora específica, estabelecer-se-á um equilíbrio dinâmico entre o complexo hormônio marcado-proteína conjugadora e seus elementos constituintes. Se hormônio não-marcado (hormônio "frio") é introduzido no sistema, este competirá com a forma livre do hormônio marcado para os locais específicos de fixação, passando a formar complexo hormônio não-marcado-proteína fixadora. Se a concentração da proteína fixadora e do hormônio marcado forem constantes, a fração de hormônio marcado-proteína, no equilíbrio, corresponde a um nível de radioatividade que é inversamente proporcional à concentração do hormônio "frio", introduzido no meio de incubação.

A dosagem de hormônio, em amostras de concentração desconhecida, é realizada comparando-se o deslocamento competitivo produzido pelo hormônio que se quer medir com o determinado por igual hormônio não-radioativo, introduzido no sistema em quantidades conhecidas, progressivamente crescentes de modo a estabelecer curvas de calibração.

Hormônio marcado		Proteína fixadora específica		Complexo hormônio marcado-proteína fixadora
---------------------	--	---------------------------------	--	---

Hor*	+	Prot.	\rightleftharpoons	Hor*-Prot.
------	---	-------	----------------------	------------

+

Hor.	Hormônio não-marcado em solu- ções-padrão ou amostra desco- nhecida
------	---

 \updownarrow

Hor-Prot.

Complexo hormônio-não marcado-
-proteína fixadora

Figura 1 - Princípio Geral da Técnica de Competição à Proteína Fixadora

As interações hormônio Δ^4 -3-cetosteróide-proteína sérica envolvem forças de ligações fracas tais como de van der Waals e pontes de hidrogênio permitindo uma rápida associação e dissociação do complexo esteróide-proteína. A interação esteróide-proteína depende não só da especificidade do local de fixação na globulina específica como da temperatura e do pH do meio da reação^(3,4).

Para a determinação de hormônios não-antigênicos, pela técnica de competição à proteína fixadora não é necessário que uma forma marcada do hormônio a ser determinado seja disponível. É suficiente que uma substância química diferente que possa se ligar à proteína "específica" seja disponível numa forma radioativa e que padrão e o desconhecido tenham comportamento similar perante o sistema reagente marcado com proteína⁽¹⁷⁾.

Um sistema como o descrito, no entanto, somente será útil se for possível separar, de maneira prática e eficiente, as frações livre e combinada de hormônio marcado, indicador da reação de competição que é a base do método.

Para alcançar este fim, recorre-se ao uso de suspensão de carvão ativado recoberto com dextrana T-70, para a separação da fração livre do hormônio marcado.

Desde a introdução dos métodos de fixação competitiva à proteína fixadora para a determinação de hormônios esteróides, grande variedade de ensaios foram desenvolvidos, sendo as maiores diferenças metodológicas relativas à fonte de obtenção da proteína conjugadora e à separação da forma livre de hormônio daquela ligada à proteína.

Esta técnica permite que esteróides adrenais sejam quantificados em conjunto, tal como cortisol-corticosterona-desoxicortisol, ou medidos individualmente⁽¹⁸⁾.

O ensaio de determinado esteróide usualmente requer uma extração com solvente próprio ou também uma etapa de purificação e isolamento, normalmente em cromatografia por camada delgada ou por partição entre solventes.

Eneroth e Nyström⁽²⁰⁾ sugeriram o uso de um "Sephadex lipófilo, LH-20", para isolar esteróides, mostrando várias vantagens sobre outros meios de separação.

Na presente investigação propusemos a quantificação de 17-OH-corticosteróides plasmáticos baseada na elevada afinidade destes para a transcortina humana. Como mais de 90% dos 17-OH-corticosteróides plasmáticos são representados pelo cortisol, do ponto de vista prático a medida destes esteróides é índice fiel dos níveis de cortisol plasmático que, aliás, é empregado como padrão no ensaio⁽²⁵⁾.

Assim sendo, não é usualmente empregada a etapa de purificação por cromatografia. No entanto, esta suposição não é válida em condições nas quais aumentam outros corticosteróides plasmáticos que não o cortisol, como na síndrome adrenogenital e na realização de teste de metopirona, em que se elevam os níveis de 11-deoxicortisol.

Como não há etapa de purificação, a especificidade do ensaio é principalmente devido à transcortina e a sensibilidade não se torna um problema em função das concentrações de cortisol no plasma⁽²⁴⁾.

Como a importância clínica na determinação global dos 17-OH-corticosteróides é grande, este trabalho visa substituir o método químico de dosagem de 17-OH-corticosteróides (baseada na reação de fenilhidrazina com o agrupamento 17-21-dihidroxi-20-ceto de cadeia lateral dos corticosteróides). Este método requer grandes volumes de plasma, além de não apresentar sensibilidade para concentrações inferiores a 5 µg/100 ml de plasma e de estar sujeito à interferência de numerosas substâncias na dosagem. O método proposto utiliza, ao contrário, volumes de plasma extremamente pequenos, tem sensibilidade muito maior e especificidade, e não sofre a interferência das substâncias que não apresentam afinidade pela transcortina.

Quanto ao método fluorimétrico de Mattingly que mede cortisol e corticosterona em meio sulfúrico, existe a necessidade de reagentes de elevada pureza, nem sempre disponíveis em nosso meio⁽¹¹⁾.

2 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para alcançar a meta proposta era mister solveir alguns aspectos específicos, a saber:

- eleger e obter fonte de proteína fixadora (CBG) adequada para o sistema;
- selecionar técnica satisfatória para a separação dos esteróides livres dos complexados;
- preparar convenientemente a amostra a ser analisada;
- escolher métodos estatísticos adequados ao problema.

Devido a importância de cada tópico o bom êxito do nosso trabalho, cada um deles será analisado separadamente, visando principalmente a justificação fundamental das escolhas tomadas.

A – FONTE DE PROTEÍNA FIXADORA

A globulina fixadora específica dos corticosteróides (CBG)^(18,19), também chamada de transcortina⁽¹⁵⁾, é uma α_1 -glicoproteína com alta afinidade e baixa capacidade de fixação para os hormônios corticosteróides. Está presente no plasma sanguíneo de todos os vertebrados^(15,16,17), ligando mais fortemente o cortisol e corticosterona, em menor grau progesterona e 17- α -hidroxi-progesterona. Fixa, também, mas em grau menor, a aldosterona, testosterona e alguns esteróides conjugados⁽¹⁵⁾. As proteínas plasmáticas de alta afinidade parecem fixar esteróides com propriedades metabólicas similares, na ordem de sua eficácia biológica⁽⁴⁾. Assim o cortisol e corticosterona são muito mais fortemente ligados do que seus metabolitos tetrahydroderivados, inativos, enquanto a progesterona e 17- α -hidroxi-progesterona, são mais fortemente ligados do que o pregnanediol e pregnanetriol.

Explorando esta capacidade fixadora, a CBG passou a ser usada para a quantificação de hormônios corticosteróides⁽¹⁹⁾.

Como a especificidade relativa varia de acordo com as espécies animais, uma seleção adequada de fonte de plasma torna-se vantajosa, como veremos posteriormente^(15,17,18).

A afinidade fixadora entre os hormônios corticosteróides e CBG depende da concentração hidrogenionica do meio de incubação sendo máxima para pH próximo de 8⁽²⁶⁾. Depende também da temperatura, tendo-se verificado que as constantes de associação a 4°C são cerca de vinte vezes maiores que a 37°C⁽³⁾.

Os corticosteróides são também fixados pela albumina sérica, que tem afinidade muito menor, mas capacidade fixadora muito maior que a globulina específica.

As proteínas plasmáticas fixadoras de esteróides são largamente usadas para ensaios quantitativos de substâncias não antigênicas, apresentando as empregadas na dosagem de esteróides as vantagens seguintes:

- a) são estáveis, quando não diluídas, podendo permanecer congeladas por vários anos sem alteração das propriedades fixadoras. Como o congelamento e descongelamento repetidos resultam em rápida degradação da proteína específica, para o nosso trabalho, o plasma foi diluído com glicerol 1:1 e conservada a -16°C sem perda de potência e interferência do diluente.
- b) facilidade na preparação; para uso, geralmente, simples diluição com água ou tampão.
- c) rápida velocidade de reação, via de regra alcançando-se equilíbrio, em minutos. As constantes de associação para a maioria das reações esteróides-proteína são da ordem de $10^7 - 10^{10}$ l/mol a 4°C ⁽¹⁶⁾.
- d) quanto a suas propriedades fixadoras são invariáveis dentro de espécies afins, muitas sendo de fácil disponibilidade.

A sensibilidade potencial de qualquer ensaio de fixação competitiva depende primariamente da constante de associação da proteína utilizada com o ligante a ser medido. Na prática, contudo, a sensibilidade é grandemente afetada, nas condições de ensaio (pH, qualidade do tampão, temperatura) e particularmente do volume de reação pela presença de outras proteínas fixadoras⁽²¹⁾.

A fixação do cortisol à CBG é virtualmente instantânea e é limitada na prática somente pelas velocidades de solubilização e de difusão. A 37°C , a velocidade de difusão é rápida (tempo médio cerca de 10 segundos) de modo que somente um curto tempo de incubação é necessário (5-15 minutos)⁽²⁴⁾.

Um dos fatores interferentes no plasma fixador é a concentração de esteróides endógenos e que podem ser reduzidos por supressão da função adrenal dos indivíduos cujo plasma servirá de fonte. A supressão pode ser feita por administração de um glicocorticóide sintético antes da coleta do plasma fixador. Por outro lado, os esteróides podem ser removidos por adsorção em *ca.vão*⁽¹⁰⁾, sem alterar a transcortina.

No presente trabalho, demos a preferência a plasmas de pacientes com hipofunção adrenal primária ou secundária, que atenderam perfeitamente ao fim colimado.

B – SEPARAÇÃO DO HORMÔNIO LIVRE DO COMPLEXO FORMADO

Um requisito fundamental para qualquer radioensaio satisfatório é encontrar um método simples para separar o hormônio marcado livre daquele fixado à globulina específica. O método ideal deve fornecer não somente uma separação nítida destes componentes mas também que não fosse influenciada por substâncias outras inespecíficas do meio de incubação. O processo deve ser também reprodutível, tecnicamente simples, principalmente em relação ao trabalho despendido e ao tempo gasto e adaptável às condições de cada laboratório.

Em se tratando da separação do esteróide livre do conjugado à proteína, é um aspecto crítico dos métodos de competição à proteína fixadora.

Murphy e seus colaboradores, em 1963⁽¹⁹⁾, utilizaram um método baseado na diálise e em 1964, através de cromatografia em gel de "Sephadex". Em 1964, Herbert e seus colaboradores noticiaram um método rápido e fácil para separar moléculas grandes e pequenas usando carvão revestido com dextrana. O carvão ativado assim recoberto passa a adsorver somente componentes de configuração e tamanho molecular menores do que aqueles do material de revestimento⁽⁹⁾. Posteriormente, Murphy (1967, 1969, 1970)^(18,17,16) estudando vários aspectos concernentes ao uso do adsorvente, conclui que a adsorção do hormônio livre a uma substância insolúvel é o método mais conveniente para a sua separação.

Dos adsorventes de fase sólida podem ser utilizados vários sendo o carvão o mais largamente difundido por ser capaz de adsorver a maioria dos hormônios, inclusive hormônios polipeptídicos⁽²³⁾.

Todos os adsorventes de fase sólida são capazes de adsorver esteróides livres quase que instantaneamente. Entretanto, estas substâncias adsorptivas também apresentam alguma afinidade para com os complexos formados. Esta propriedade é diminuída com um pré-tratamento do adsorvente, recobrando-o com substância do tipo da dextrana. Nestas condições, o hormônio unido à proteína tem menor afinidade do que o livre para os locais de adsorção.

Um critério para o uso do carvão ativado para radioensaio de hormônios esteróides é a adsorção do hormônio livre na presença de concentração relativamente elevada de carvão revestido com dextrana e a exclusão da fração conjugada à proteína, nas mesmas condições.

Muitos autores indicam o uso do Florisil como adsorvente de fase sólida, pois para a separação do adsorvente do meio de incubação não requer centrifugação. Entretanto, preferimos o uso do carvão revestido com dextrana como agente separador pois em apenas alguns segundos o hormônio livre é adsorvido pelo carvão e rejeitado o hormônio ligado. A remoção do carvão é feita por centrifugação.

O tempo de contato hormônio-adsorvente é fator crítico, uma vez que a reação entre adsorvente e ligante é essencialmente irreversível, ao contrário do que ocorre entre a proteína e ligante cuja reação é rapidamente reversível. Como o adsorvente remove a fração não ligada o equilíbrio da reação proteína-ligante se desloca no sentido de liberar fração livre o que faz cair gradualmente a percentagem do traçador ligado.

Em nosso experimento, o uso do carvão recoberto com dextrana em concentrações relativamente baixas, revelou ser satisfatório para uma separação eficiente do hormônio livre do complexo hormônio-proteína.

A quantidade ótima do adsorvente foi selecionada com base na obtenção de maior precisão da curva-padrão (% do complexo CBG-(1,2-³H)F em relação à radioatividade total adicionada ao sistema versus cortisol adicionado) e ocorre quando a diferença entre o valor "zero" e o "plateau" for máxima⁽¹⁸⁾. Verifica-se este fato quando há adsorção máxima do hormônio livre e da exclusão do complexo proteína-hormônio.

C – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA A SER ANALISADA

O grau de purificação alcançado pelos 17-OH-corticosteróides depende da concentração relativa dos esteróides que competem na fixação à proteína fixadora, o que por sua vez, está na dependência da doença em estudo.

Na prática, a dosagem do 17-OH-corticosteróides dispensa ulteriores purificações, em virtude de ser geralmente realizada, em relação ao cortisol, a concentração de corticosterona, cortisona e outros hormônios adrenais só pode tornar-se significativa em raras condições patológicas.

D – MÉTODO ESTATÍSTICO APLICADO AOS DADOS

Em função da confiabilidade do ensaio em estudo, planejaram-se métodos estatísticos adequados, abrangendo a verificação das condições e graus de especificidade, exatidão, sensibilidade e precisão.

a) Especificidade

A especificidade do método depende da capacidade de poder discriminar o hormônio a ser dosado (cortisol) de outros corticosteróides com alta afinidade com respectiva globulina conjugadora

(CBG) por estes não competirem ou inativarem significativamente locais de fixação de CBG ou porque suas concentrações são relativamente baixas no fluido biológico em relação ao hormônio a ser quantificado.

Para avaliar esta propriedade do método ensaiamos a presença de substâncias que por qualquer mecanismo pudessem interferir na reação.

Para tanto, diferentes volumes, de uma mistura plasmática, foram dosados, com o objetivo de verificar a constância na concentração do teor de hormônios quando corrigido pelo fator de diluição.

A existência de qualquer substância estranha capaz de reagir no meio de incubação necessariamente levaria a uma ausência de linearidade entre as concentrações obtidas e os volumes utilizados.

Foi testada também, a competição de 11-deoxicortisol, corticosterona, progesterona e testosterona por (1,2-³H)-F por locais de conjugação da proteína no sistema de ensaio para a determinação de cortisol.

b) Sensibilidade

A sensibilidade do método depende essencialmente da inclinação da curva-padrão e dos valores do testemunho ("Blank").

Esta propriedade foi testada através da análise de variância da medida do ponto de massa zero e do 1º e 2º pontos da curva de calibração correspondentes às menores massas de cortisol.

A verdadeira sensibilidade do método, contudo, é dada pela correção das perdas durante o processamento do plasma, pela alíquota do extrato e do volume inicial de plasma utilizado na quantificação do hormônio.

c) Exatidão

Esta propriedade foi determinada através da recuperação de quantidade conhecidas de hormônio cromatograficamente puro (cromatografia líquido-líquido) adicionadas ao meio no qual se procede à dosagem, no caso particular o plasma com baixo teor de esteróides endógenos. A quantidade medida do hormônio é então, correlacionada com a quantidade adicionada ao meio.

Para tanto, analisamos a recuperação em cinco níveis diferentes de hormônios, e aceitando como limite valores de coeficiente de correlação r significativo para $\alpha = 0,05$.

De acordo com Melo (1970)⁽¹⁴⁾, a recuperação pode ser considerada:

- Excelente : para $r = 0,98$ ou mais;
- Boa : para $r = 0,941$ a $0,98$;
- Adequada : para $r = 0,871$ a $0,94$

d) Precisão

Um método é preciso quando é compatível com a obtenção de resultados muito próximos em diversas alíquotas de um mesmo material. Mede ela, conseqüentemente, a propagação dos erros experimentais e dos inerentes à técnica (especificidade, sensibilidade, exatidão).

Em condições de rotina, a estimativa da precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação de medidas em duplicata e aceitamos como coeficiente de variação valores iguais ou inferiores a 10% para uma série de 20 determinações no mesmo ensaio (reprodutibilidade intra-ensaio). De acordo com o critério proposto por Melo (1970)⁽¹⁴⁾ os coeficientes de variação permitem classificar a precisão do método: ótimo, quando menor que 5%; aceitável, quando menor que 10%; é necessário realizar mensurações em duplicata quando maior que 10%. O ideal seria também dosarmos em diferentes dias de trabalho (reprodutibilidade inter-ensaio) mas devido à degradação de esteróides endógenos, com a estocagem, medimos a percentagem de esteróides danificados, nas condições de rotina.

Fixamos o coeficiente de variação 10% para a precisão em condições ideais por estarmos lidando com um parâmetro cujas variações patológicas são suficientemente amplas para absorverem as oscilações incluídas entre os limites fixados.

A precisão intra-ensaio da curva-padrão foi avaliada através da análise de dispersão de replicatas de cada nível de hormônio adicionado ao sistema, em condições ideais de trabalho.

A precisão inter-ensaio da curva-padrão foi testada através da análise de dispersão das curvas de calibração feitas durante um período de seis meses, usando a mesma fonte de proteína fixadora.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Fonte de Proteína Fixadora

A mistura de plasmas convenientemente colhidos de indivíduos com hipofunção adrenal foi utilizada como fonte de transcortina para o ensaio. Após a separação da fibrina, a mistura de plasmas é diluída na proporção 1:1 com glicerol e conservada a -16°C . Antes do uso, cada mistura é testada quanto à concentração de esteróides endógenos.

3.2 – Cortisol Radioativo

A atividade específica do (1, 2-³H)-F utilizado foi de 40.000 mCi/mole com atividade total de 1 mCi (Schwarz Bioresearch, New York, EE.UU.). Antes do uso foi feita uma purificação através de cromatografia em camada delgada, por causa da autoradiólise de esteróides tritiados durante a estocagem a 4°C ⁽⁸⁾.

Técnica de Purificação

A cromatoplaça de Sílicagel G F₂₅₄ (Merck, nº 5.717), foi lavada convenientemente, em uma solução metanólica 95%, 0,03 M de sal de tetrassódico de etilendiamino tetra-acético dihidratado (sal tetrassódico do EDTA) e a seguir com éter etílico p.a.

Uma alíquota do cortisol radioativo e duas alíquotas de aproximadamente 50 ng de cortisol de referência (50 ng/5 µl de etanol) foram transferidas para a placa previamente lavada à direita e à esquerda do esteróide marcado. A placa foi, então, desenvolvida por cromatografia ascendente em cuba de vidro, na qual o solvente clorofórmio-metanol (90:10, v/v), se achava em condições de equilíbrio.

A mancha correspondente ao esteróide tritiado demarcada por comparação com o hormônio não-radioativo com o uso de luz ultra-violeta (lâmpada UV "Chromatolux" – Plenger Ltda.) foi raspada

e coletada num tubo de centrifugação. A sílica onde estaria o cortisol tritiado purificado, era extraído por três vezes com álcool etílico, medindo-se a radioatividade das eluições. O cortisol radioativo purificado foi conservado a -15 a -20°C sem haver alteração detectável por vários meses⁽⁸⁾.

A quantidade de radioatividade no ensaio não sendo fator crítico em virtude da elevada atividade específica do esteróide marcado, escolhemos uma alíquota correspondente a 11.000 cpm por tubo de reação com a finalidade de minimizar o erro decorrente da aleatoriedade do fenômeno radioativo^(11,19).

3.3 – Estabelecimento da Diluição Adequada da Proteína Fixadora

O título pode ser determinado por diferentes diluições de plasma (fonte de transcortina) com tampão fosfato-cortisol tritiado, escolhendo-se aquele que melhor atende aos requisitos de sensibilidade estipulados para a faixa de quantidade de esteróide a ser analisada. A diluição do plasma aumenta a sensibilidade do método mas, por outro lado, diminui a faixa em que os corticosteróides podem ser medidos. Como a sensibilidade do ensaio é dependente da curva de calibração, é importante obter uma curva com queda inicial suficientemente acentuada, como já indicado anteriormente.

Com a diluição do plasma, a interferência de albumina e de outras proteínas não-específicas é minimizada bem como a influência de esteróides competidores⁽²¹⁾.

3.4 – Solução de Transcortina-Cortisol Tritiado

A solução de transcortina-cortisol tritiado foi preparada adicionando-se a um volume pré-determinado da solução plasma-glicerol (fonte de transcortina), uma certa quantidade de tampão fosfato-cortisol tritiado (11.000 cpm/ml de tampão fosfato, 0,01M, pH 7,4).

3.5 – Solvente de Extração

Para a extração, foi utilizado diclorometano p.a. (Merck) sem purificação prévia. Antes do uso, cada lote do solvente foi testado quanto a impurezas inespecíficas que possam competir com os sítios de fixação da proteína, introduzindo um testemunho ("blank") de diclorometano nas dosagens da curva-padrão e verificando a sua eventual interferência.

3.6 – Solução de Cortisol de Referência

Foram dissolvidos exatamente 20 miligramas de cortisol cromatograficamente puro (cromatografia líquido-líquido) em 100 ml de etanol absoluto bidestilado (fração correspondente ao terço médio). A solução é conservada a -16°C .

No momento do uso, dilui-se a "solução-estoque" com etanol para uma concentração de cortisol 0,5 ng/μl. Usa-se esta solução para preparar curva de calibração.

O cortisol foi obtido da "Schwarz Bioresearch, New York", lote nº V 4789.

3.7 – Medida de Radioatividade

Para a contagem de amostras de cortisol tritiado, usou-se sistema de detecção com cintilador dotado de espectrometro e troca automática de amostras (Beckman, modelo LS-150). As mensurações foram feitas em série, segundo programa automático pré-estabelecido.

Utilizaram-se frascos de vidro de baixo teor de potássio (Value Vial II, 161650, Beckman) de 20 ml de capacidade.

Para a preparação da solução cintiladora, foi utilizado como soluto primário PPO com pico máximo de fluorescência de 3.600 Å. Para que o comprimento de onda coincida com a faixa de maior sensibilidade da fotomultiplicadora (4.000 a 4.500 Å) foi adicionado um soluto secundário deslocador de comprimento de onda, dimetil-POPOP com o pico máximo de fluorescência de 4.180 Å.

Para emulsificar soluções de amostras polares, foi usado Triton-X 100 (produto de condensação de iso-octil-fenoxipoliétoxiol) p.a. (Sigma).

a) Solução cintiladora-estoque

PPO.	80 g
Dimetil-POPOP.	1 g
Toluol p.a. (q.s.p.).	1000 ml

b) Solução cintiladora para a fase aquosa

Usou-se a diluição de uma parte de Triton-X 100 para duas partes de toluol com solutos primários e secundário dissolvidos (50 ml de solução cintiladora-estoque para volume final de 1000 ml de solução cintiladora).

c) Solução cintiladora para extrato plasmático em diclorometano

Foi preparada tomando-se 50 ml de solução cintiladora-estoque e completando o volume a 1000 ml com toluol.

3.8 – Técnica e Seqüência Operacional da Dosagem de "Cortisol" por Competição em Amostras de Plasma Humano

Todas as análises foram efetuadas em duplicata tomando-se como resultado a média aritmética das duas dosagens, desde que entre elas não houvesse diferença maior que 10%.

O método de quantificação de "cortisol" plasmático por fixação competitiva à proteína, consta das etapas apresentadas na Tabela I.

A Figura 2 representa esquematicamente a seqüência operacional para a quantificação de "cortisol" plasmático.

3.9 – Preparação de Amostras de Plasma

Logo após a coleta do sangue em heparina, o plasma é separado por centrifugação e conservado na geladeira por prazo máximo de seis dias. No momento do uso, centrifuga-se, se necessário, para separar fibrina.

O ensaio foi desenvolvido para 100 µl de plasma extraídos com 3 ml de diclorometano em tubo cônico de 15 ml de capacidade. Esta relação plasma/diclorometano é admitida como suficiente para a extração quase completa dos esteróides plasmáticos⁽²²⁾. A extração foi feita por agitação em agitador "Vortex", por sessenta segundos. Para o ensaio utilizaram-se 1000 a 1500 µl do extrato, evaporado em corrente de nitrogênio em banho-maria a 45°C.

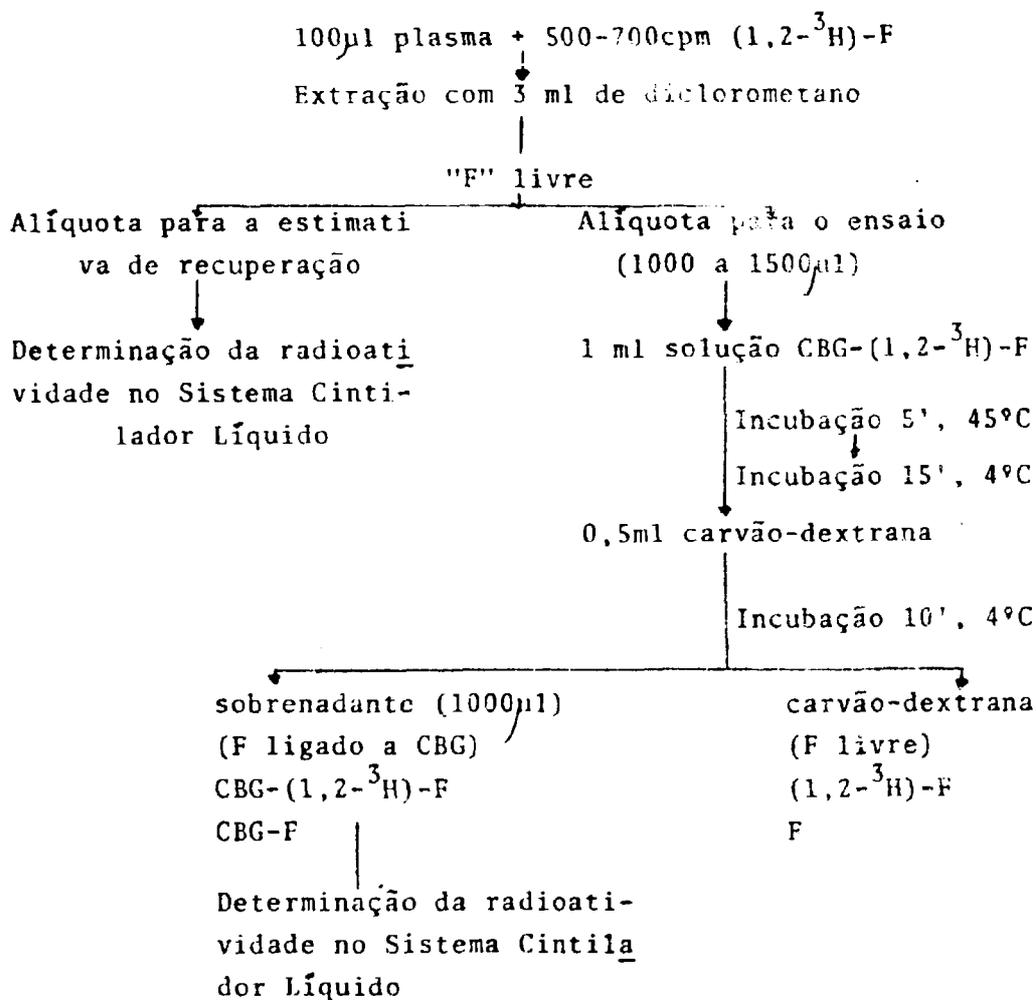


Figura 2 - Representação Esquemática da Técnica para a Quantificação do "Cortisol" (17-Hidroxi-Corticosteróides) Plasmático por União Competitiva à Proteína Conjugadora (CBG)

Tabela I
Etapas do Método de Dosagem do "Cortisol" (17-Hidroxicorticosteróides)
Plasmático por Competição à Proteína Conjugadora (CBG)

ETAPAS	PROPÓSITOS	MEIOS
1. Preparação da amostra: desproteinização e extração.	Destruir ou remover a proteína conjugadora e transferência do esteróide livre para solvente orgânico.	Diclorometano
2. Quantificação a) Equilíbrio com CBG-(1,2- ³ H)F	Reação da amostra e traçador com CBG	Incubação sob agitação em banho a 4°C.
b) Separação do F livre daquele unido a CBG.	Determinar a distribuição da radioatividade.	Adsorção por carvão-dextrana.

Para a determinação de perdas durante o processamento do plasma utilizou-se um padrão interno de (1, 2-³H)-F em quantidade suficientemente reduzida para não interferir na fase de competição do ensaio ("pulso" de cortisol marcado").

3.10 – Curva-Padrão

A partir da solução etanólica de cortisol 0,5 ng/μl mediram-se as quantidades relacionadas na Tabela II.

Tabela II
Protocolo da Curva-Padrão do Ensaio de Cortisol Plasmático

Nº do tubo	Padrão de cortisol volume da solução: (0,5 ng F/μl)	Quantidade de cortisol (ng/tubo)
1 – 2	–	0
3 – 4	2 μl	1,0
5 – 6	5 μl	2,5
7 – 8	7 μl	3,5
9 – 10	10 μl	5,0
11 – 12	15 μl	7,5
13 – 14	20 μl	10,0
15 – 16	30 μl	15,0
17 – 18	40 μl	20,00
19 – 20	2 μl sol. 0,2 μg/μl	400,00

As soluções foram evaporadas sob corrente de nitrogênio em banho maria a 35°C

3.11 Competição

A cada tubo, adicionou-se 1 ml da solução de "transcortina cortisol tritiado" com pipeta automática de ponteiros descartáveis (Biopet e Biotip da Schwarz Bioresearch, 0010 e 0010 30). Os tubos eram agitados em agitador "Vortex" e incubados por cinco minutos em banho-maria a 45°C, sob agitação, para a dissolução de esteróides do extrato previamente evaporados. A seguir os tubos eram incubados por quinze minutos em banho a 4°C, sob agitação para alcançar equilíbrio competitivo entre o cortisol adicionado ao sistema e o complexo "transcortina cortisol tritiado".

3.12 -- Separação do Hormônio Marcado Livre do Ligado à Proteína Conjugadora

A cada tubo, adicionou-se 0,5 ml da suspensão de carvão com a pipeta "Biopet". Durante a pipetagem a homogeneidade foi mantida por agitação eletromagnética. Depois de agitar cada tubo em "Vortex", incubou-se por dez minutos em banho a 4°C, sob agitação horizontal lenta (Dubnoff Metabolica Shaking Incubator da Precision PS Scientific, EE.UU.)

Após a incubação, os tubos são centrifugados a 1.500 rpm, por vinte minutos a 4°C. Um ml do sobrenadante é transferido com pipeta "Biopet" para um frasco de cintilação. O precipitado, contendo carvão com o hormônio livre, é desprezado. Adicionam-se 10 ml de solução cintiladora contendo Triton-X 100. Após homogeneização do conteúdo dos frascos, determina-se a atividade com detector de cintilação líquida, com troca automática de amostras. O tempo de mensuração é prolongado o suficiente para o acúmulo de aproximadamente 10.000 contagens.

Suspensão de Carvão

Carvão "Norit A", neutro.	250 mg
Dextran T-70	25 mg
Tampão fosfato pH 7,4-0,01M (q.s.p).	100 ml

3.13 – Cálculo e Correção dos Resultados

A atividade da fase líquida (padrões e plasmas) representa a fração do hormônio marcado, complexado à CBG, que não sofreu deslocamento pelo esteróide introduzido no sistema na etapa de incubação

Entre as alternativas para expressar a curva de dose-resposta, são mais utilizadas as seguintes:

a) Escala linear

- transferindo na ordenada a atividade da fase líquida em contagens por minuto e, na abscissa, as quantidades conhecidas e crescentes do hormônio de referência,
- transferindo na ordenada as percentagens das relações B/B_0 ; $(B-N)/(B_0-N)$ e B/T sendo:
 - B = contagens da fração do hormônio unida à proteína em presença de hormônio não-marcado,
 - B_0 = contagens da fração do hormônio unida à proteína na ausência de hormônio não-marcado,

N = contagens não específicas,

T = radioatividade total

e na abscissa, as quantidades conhecidas e crescentes do hormônio de referência;

- b) Escala semi-logarítmica: as porcentagens das relações B/B_0 , $(B-N)/(B_0-N)$ e B/T são projetadas linearmente contra quantidades conhecidas e crescentes do padrão, em escala logarítmica;
- c) Escala logítmica (transformação linear): a porcentagem da relação $(B-N)/(B_0-N)$ é projetada em escala logítmica contra quantidades conhecidas e crescentes do padrão, em escala logarítmica.

Em condições de rotina, a concentração hormonal no tubo de reação (ng/tubo) é determinada pela comparação direta da leitura (cpm) observada na alíquota da fase líquida em comparação àquelas obtidas a partir das soluções padrão. A leitura direta da curva permite um intervalo de medida 0-15 ng de cortisol e corrigindo o resultado pelas perdas durante o processamento do plasma (recuperação) pela alíquota do extrato e pelo volume inicial do plasma utilizado na quantificação do esteróide, pode-se obter uma concentração final de até 45 $\mu\text{g}/100$ ml de plasma.

3.14 – Avaliação da Sequência Operacional para o Ensaio de “Cortisol” em Plasma

a) Especificidade

A especificidade foi controlada apreciando:

1) Reatividade do esteróide plasmático e do padrão

Para testar a reatividade do esteróide plasmático e do padrão, foram dosados de acordo com a técnica descrita, 20, 40, 60, 80 e 100 μl de uma mistura de plasmas com alto teor de hormônio endógeno. Os valores numéricos das médias das dosagens ($n = 5$) correspondente a cada diluição foram calculadas e transferidas para a ordenada de gráfico linear contra os valores dos volumes utilizados.

Na hipótese de não existirem na mistura de plasmas materiais inespecíficos capazes de competir com os locais de fixação da proteína, dever-se-ia obter uma reta com inclinação de 45° .

O coeficiente de correlação foi calculado para $\alpha = 0,05$.

Para uma melhor apreciação dos dados, as médias de cada diluição foram submetidas a análise de variância.

2) Reatividade cruzada com outros esteróides

Avaliou-se a reatividade cruzada com os esteróides: progesterona, 11-deoxicortisol, testosterona e corticosterona pelo deslocamento de $(1,2\text{-}^3\text{H})$ -cortisol do complexo “CBG-cortisol tritiado”. Para cada esteróide utilizaram-se 5 dosagens ($n = 5$). Os resultados foram expressos como porcentagem de material deslocado e ao final, caracterizamos pelas médias e respectivos desvios padrão.

b) Sensibilidade

Como já indicado, avaliou-se esta propriedade através da análise ($n = 8$) do ponto zero de massa e do primeiro e segundo pontos da curva-reposta, correspondentes às menores massas de cortisol.

No entanto, pelo fato da extração do hormônio no plasma ser de $78,23 \pm 5,31\%$ ($X \pm D.P.$) para $n = 10$, e por se utilizar a terça parte do volume total do extrato e $100 \mu\text{l}$ de plasma, a verdadeira sensibilidade do método é determinada corrigindo o resultado obtido para estas condições.

c) Exatidão

Para a verificação da exatidão, avaliou-se em quintuplicata, a recuperação de quantidades conhecidas de padrão de cortisol adicionadas a uma mistura de plasmas com teor conhecido e baixo de cortisol ($5,52 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de plasma).

d) Precisão

A precisão do método foi avaliada através do estudo de reprodutibilidade intra-ensaio de 20 determinações de uma mesma mistura de plasmas conservada a 4°C .

A reprodutibilidade inter-ensaio não foi realizada por ser conhecida a degradação do esteróide no plasma congelado por período de tempo longo (Brausberg⁽²⁾).

Por outro lado, verificamos a percentagem de esteróides danificados com a estocagem a 4°C comparando-se os resultados de ensaio realizados nas mesmas condições e espaçados no intervalo de uma semana, cobrindo um total de 21 dias.

A precisão intra-ensaio da curva-padrão foi testada através de análise de dispersão de 10 curvas realizadas nas mesmas condições.

A precisão inter-ensaio da curva-padrão foi determinada através de análise de dispersão de 10 curvas feitas ao longo de seis meses, usando a mesma fonte de proteína fixadora.

4 – RESULTADOS

Para cada uma das etapas fundamentais da técnica de dosagem de cortisol plasmático, serão apresentados os resultados obtidos através dos diferentes esquemas experimentais descritos e justificados no capítulo próprio.

4.1 – Determinação da Diluição Adequada da Proteína Fixadora

O título da solução da proteína fixadora foi determinado por diferentes diluições de plasma (fonte de CBG) com tampão fosfato-cortisol tritiado, escolhendo-se aquele que melhor atende aos requisitos de sensibilidade estipulados para o nível de esteróide a ser analisado.

A Figura 3 ilustra a influência da diluição de transcortina humana no deslocamento de $(1,2\text{-}^3\text{H})\text{-F}$, produzido por $7,5 \text{ ng}$ de cortisol, no complexo $(\text{CBG}\text{-}(1,2\text{-}^3\text{H})\text{-F})$.

Para o ensaio, com esta fonte, escolheu-se a diluição 1,2%, obtendo-se um valor % B/BO em torno de 45% valor médio para a quantidade de $7,5 \text{ ng}$ de F (intervalo útil da curva-padrão 0-15 ng de F) sendo:

Bo – contagens da fração de cortisol fixada à proteína em ausência de hormônio não-marcado

B – contagens da fração de cortisol fixada à proteína em presença de cortisol não-marcado

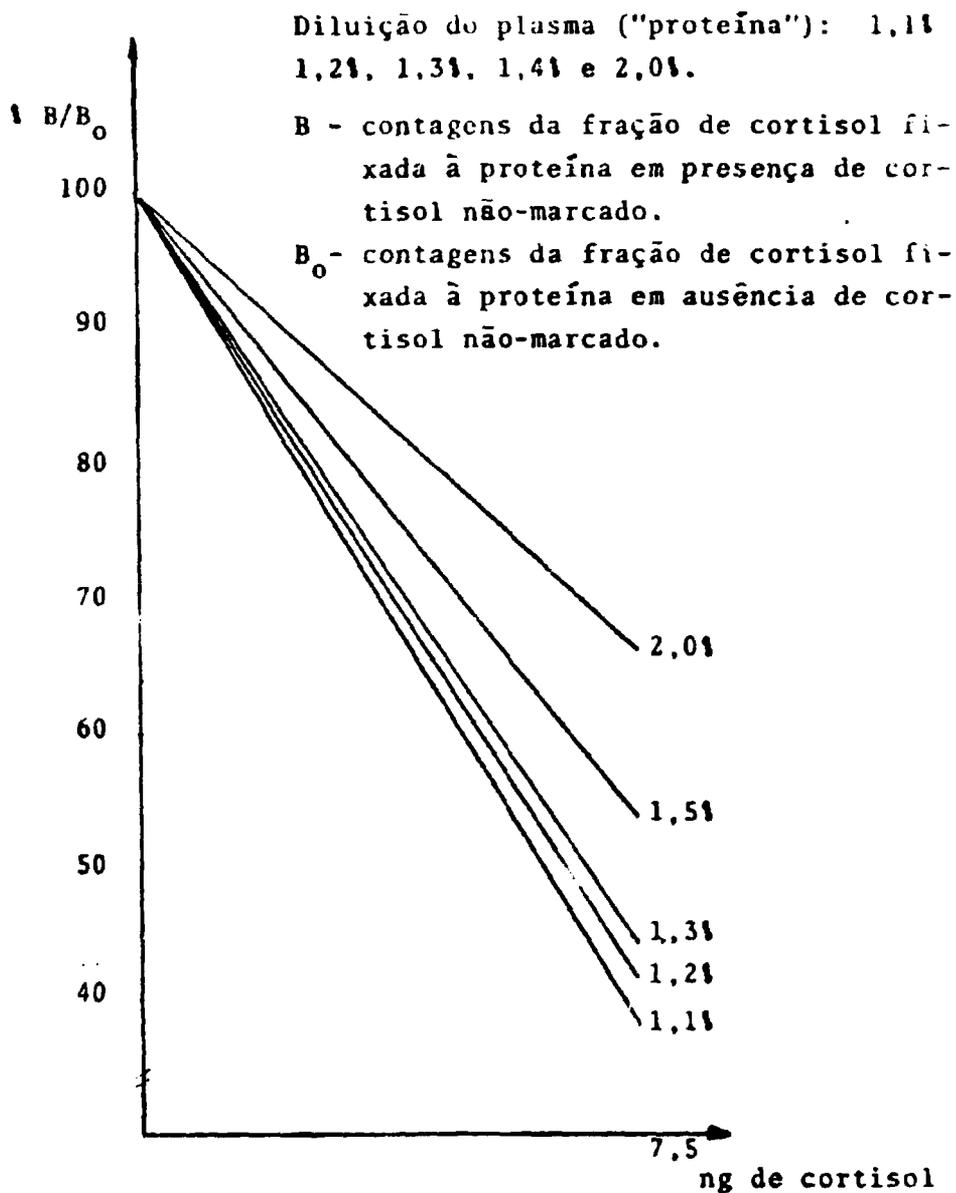


Figura 3 -- Influência da Diluição da Proteína (Transcortina) sobre o Deslocamento de (1,2-³H)-Cortisol, do Complexo CBG-(1,2-³H)-Cortisol, por 7,5 ng de Cortisol

4.2 – Obtenção das Curvas de Dose-Resposta

As diferentes alternativas para a representação da porcentagem do hormônio marcado ligado à proteína em função da quantidade de esteróide (vide 3.13) podem ser apreciadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7. Os respectivos gráficos expressam os resultados numéricos de uma curva-padrão de cortisol cujos dados numéricos estão reunidos na Tabela III

Tabela III
Curva-Padrão para o Radioensaio de Cortisol Plasmático

Diluição do plasma ("proteína"): 1,2%

B – contagens da fração de cortisol unida à proteína em presença de cortisol não-marcado.

B₀ – contagens da fração de cortisol unida à proteína na presença de cortisol não-marcado.

N – contagens não-específicas.

T – radioatividade total.

F (ng)	cpm (média das du- plicatas)	% B/T	% B/B ₀	B-N	% (B-N/B ₀ -N)
Controle	8.135	100,0	—	—	—
0	5.372	66,0	100,0	4.941	100,0
1,0	5.076	62,4	94,5	4.645	94,0
2,5	4.440	54,6	82,6	4.001	81,1
3,5	3.942	48,4	73,4	3.511	71,0
5,0	3.291	40,4	61,2	2.859	57,9
7,5	2.441	30,0	45,4	2.010	40,7
10,0	1.944	23,9	36,2	1.513	30,6
15,0	1.537	18,9	28,6	1.106	22,4
20,0	1.288	15,8	24,0	856	17,3
400,0	431	5,3	8,0	—	—

4.3 – Avaliação das Características do Método

a) Especificidade

A Tabela IV reúnem as médias e desvios-padrão de 5 determinações de cinco diferentes volumes do mesmo plasma. O coeficiente de correlação r entre os volumes e os resultados obtidos foi 0,9785 (Figura 8), altamente significativo.

Na Tabela V estão os resultados dos estudos de especificidade da solução CBG em relação a corticosterona, 11-deoxicortisol, progesterona e testosterona, obtidos por técnica de deslocamento a nível de 10 ng para cada um dos esteróides. O efeito destes esteróides é expresso em porcentagem de deslocamento do (1, 2-³H)-F no sistema de ensaio. Os dados experimentais mostram que a CBG não apresenta especificidade adequada para a quantificação de cortisol, pois 11-deoxicortisol e corticosterona apresentam afinidade praticamente igual à transcortina.

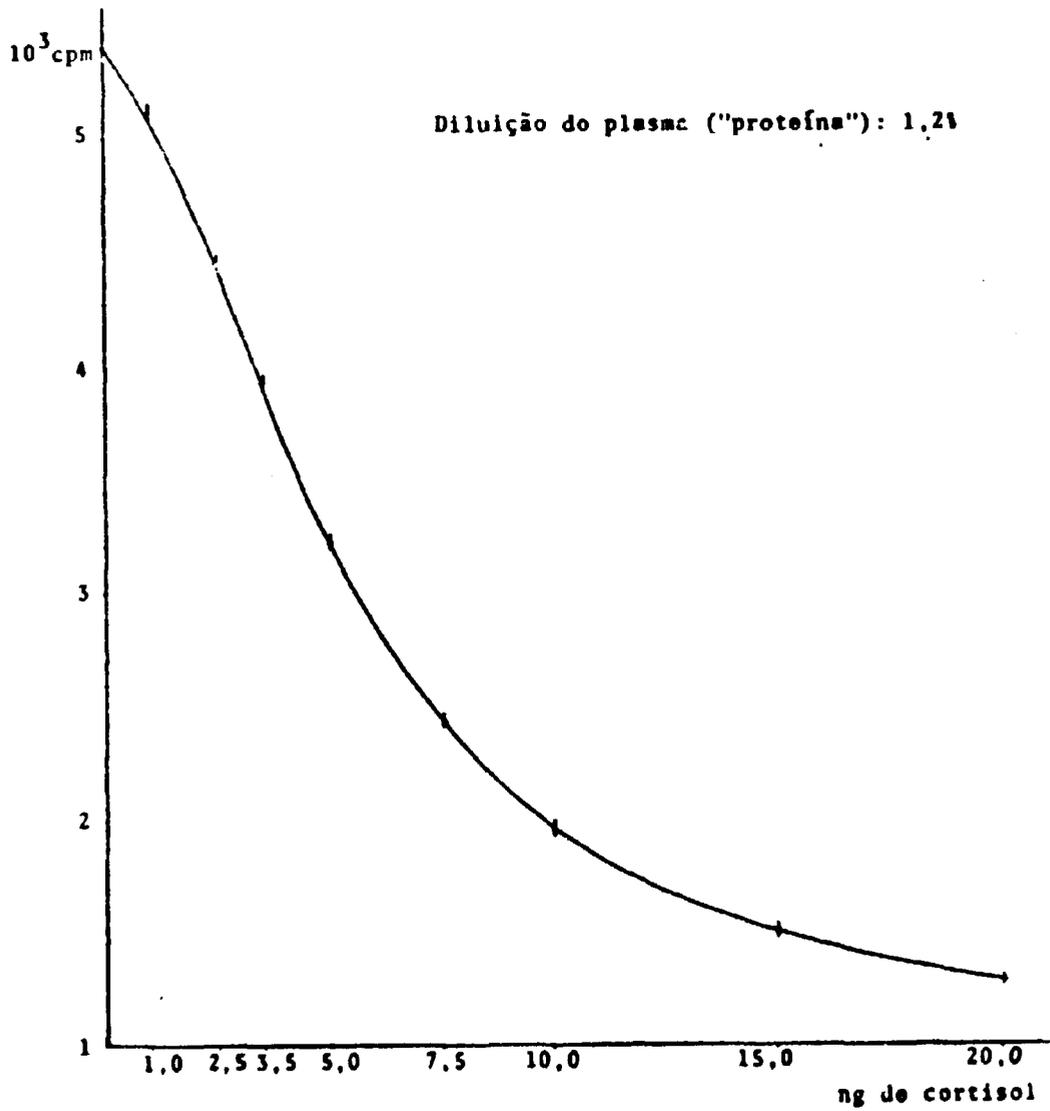


Figura 4 - Curva-Padrão de Cortisol. Projeção das Contagens por Minuto (cpm), Correspondentes à Fração de "Cortisol" Fixada à Transcortina, em Ordenada, Versus Dose, em Abscissas

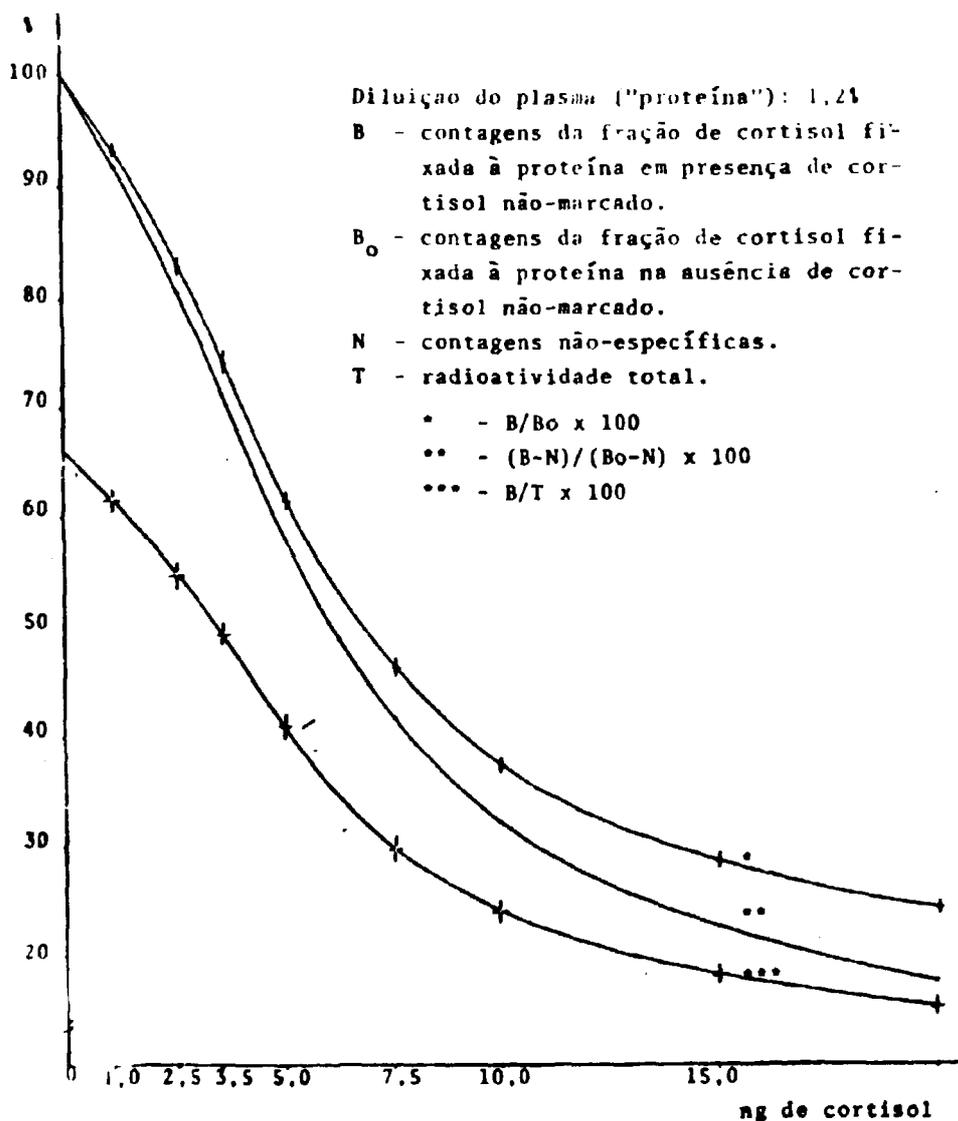


Figura 5 - Curva-Padrão de Cortisol. Projeção Linear das Relações entre Contagens por Minuto (cpm) do Cortisol Marcado Fixado à Proteína na Presença e Ausência do Hormônio Não-Marcado (sem e com Correção pelas Ligações Não-Específicas)

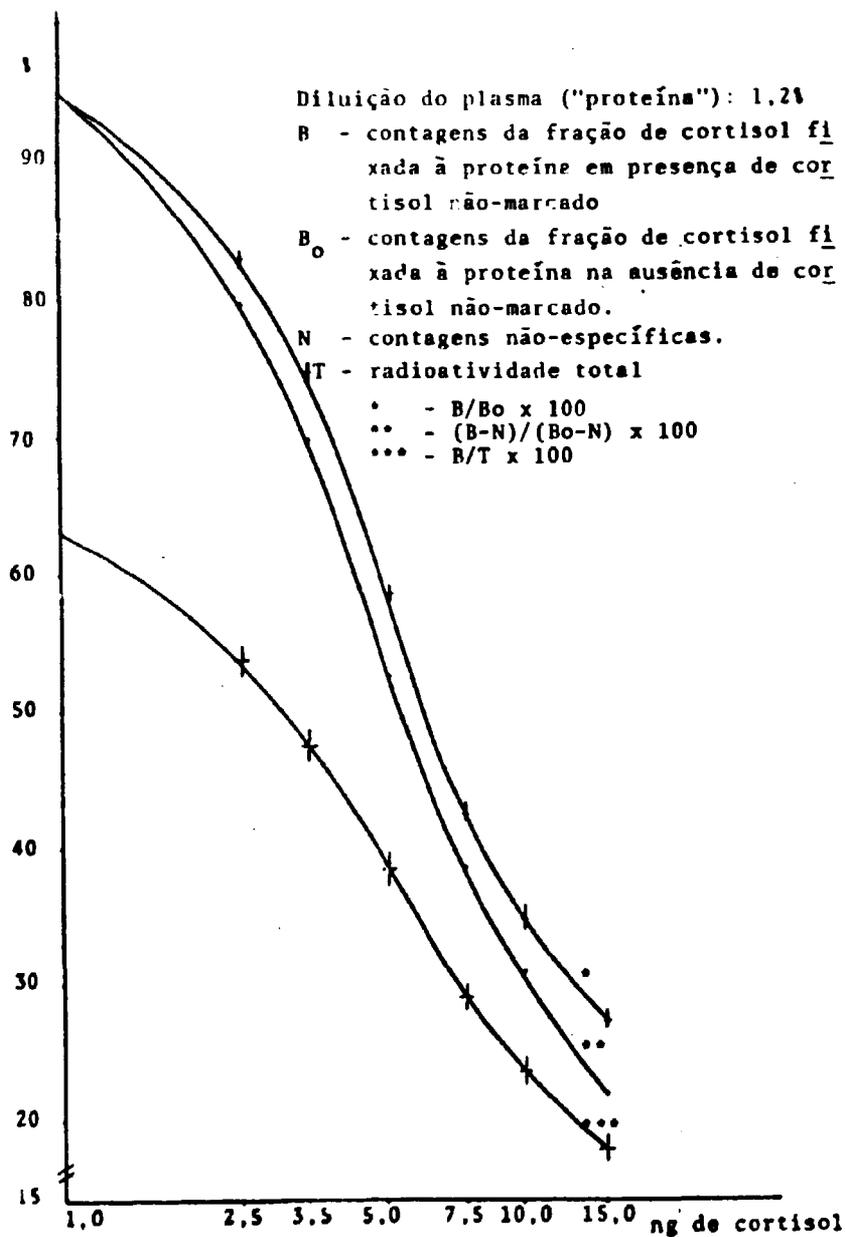


Figura 6 - Curva-Padrão de Cortisol. Projeção Semi-Logarítmica das Relações entre Contagens por Minuto (cpm) do Cortisol Marcado Fixado à Proteína na Presença e Ausência do Hormônio Não-Marcado (sem e com Correção pelas Ligações Não-Específicas)

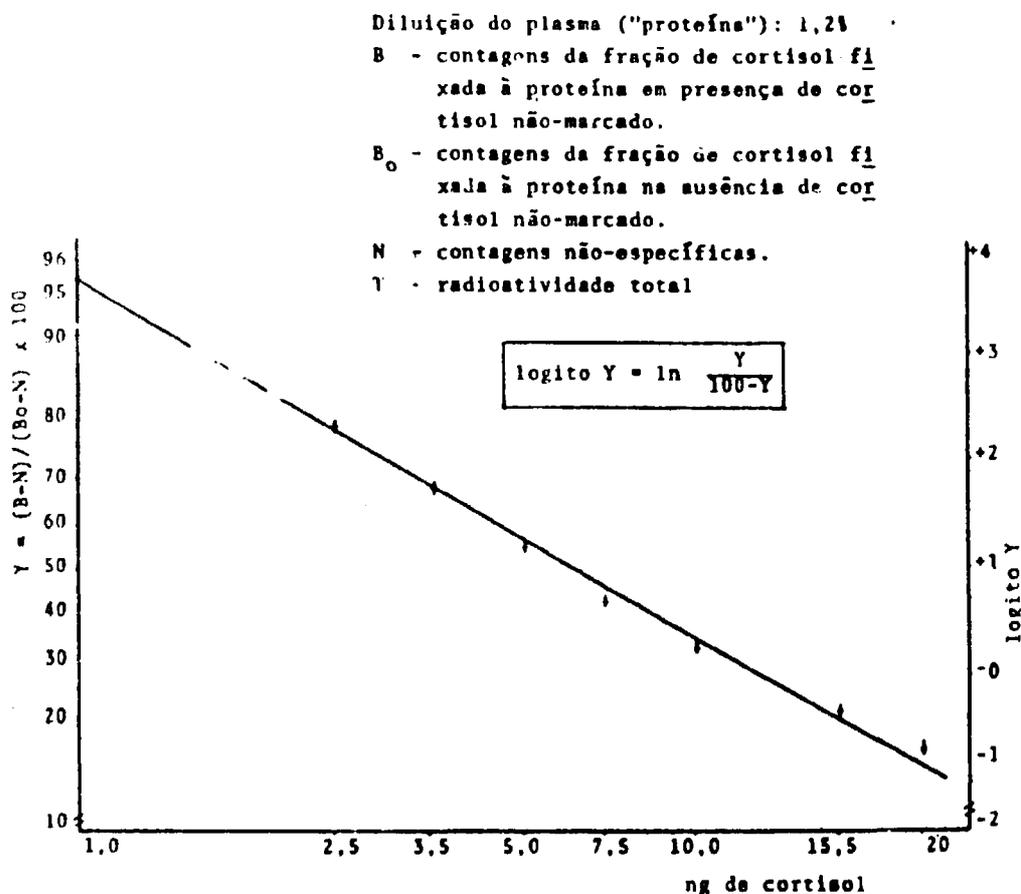


Figura 7 - Curva-Padrão de Cortisol. Projeção em Logito das Relações entre Contagens por Minuto (cpm) do Cortisol Marcado Fixado à Proteína e Ausência do Hormônio Não-Marcado Corrigidas pelas Ligações Não-Específicas Versus o Logaritmo da Dose de Cortisol, em Abcissa

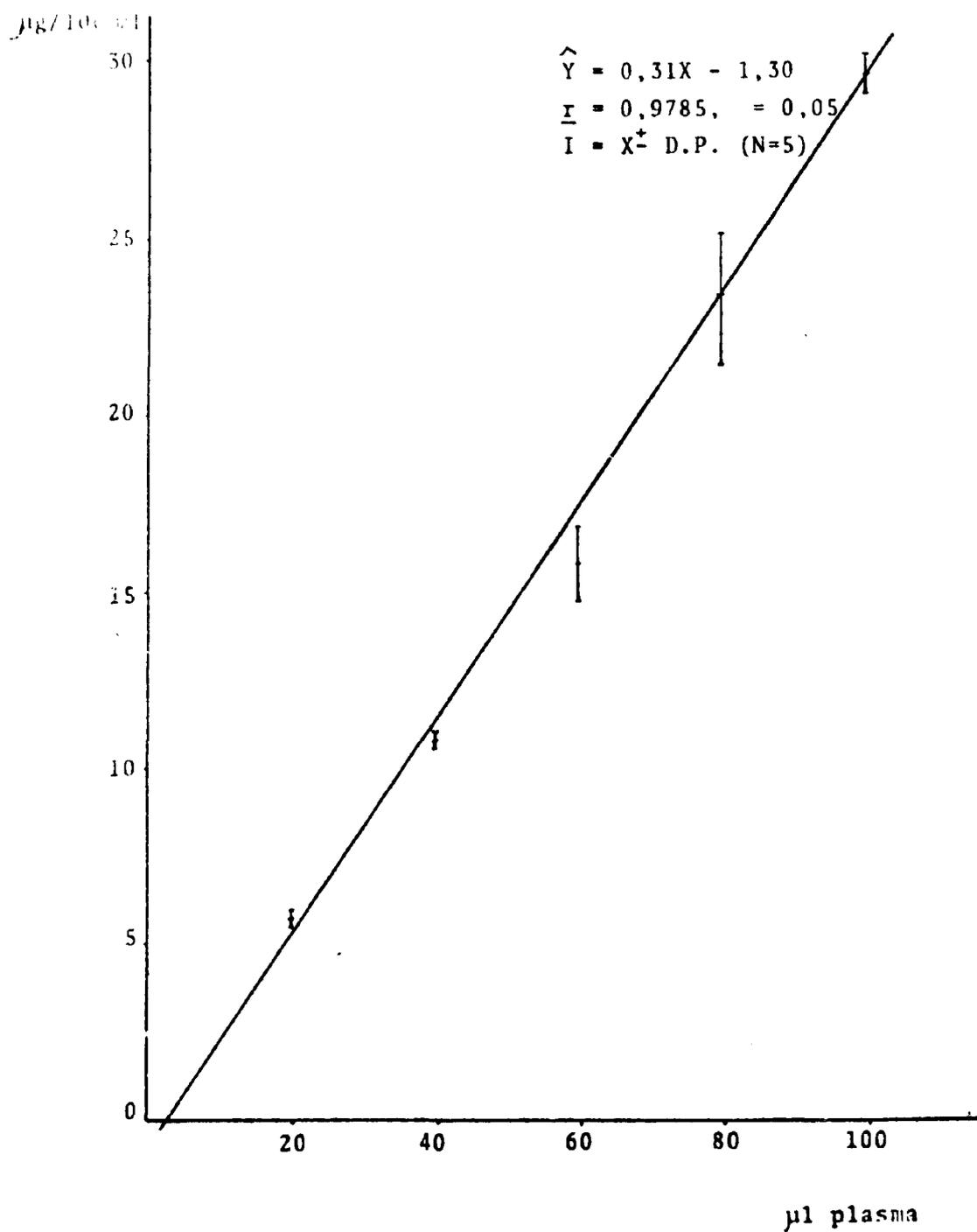


Figura 8 - Efeito da Diluição do Plasma sobre a Concentração Hormonal Endógena Medida.
Regressão Linear

Tabela IV
Controle da Especificidade

Quantidade plasma (em μ l)	n. ^o análises (n)	Resultado Obtido $\bar{X} \pm D.P.$ (μ g/100 ml)	Resultado Teórico (μ g/100 ml)
20*	5	5,66 \pm 0,15	4,85
40*	5	10,75 \pm 0,33	11,01
60*	5	15,75 \pm 1,20	17,16
80*	5	23,65 \pm 2,08	23,32
100	5	29,99 \pm 0,58	29,49

Coefficiente de correlação $r = 0,9785$

Reta de regressão $\hat{Y} = 0,31X - 1,30$, $\alpha = 0,05$

* Volume completado a 100 μ l com tampão

Tabela V
Efeito de 11-Deoxicortisol, Corticosterona, Progesterona e Testosterona
em Relação ao Cortisol no Deslocamento de (1,2-³H)-Cortisol
dos Sítios de Conjugação da Proteína (CBG) no
Sistema de Ensaio, para a Determinação de Cortisol

Esteróides Testados (10 ng)	% de competição ^a $\bar{X} \pm D.P.$	N. ^o de análises (n)
11-deoxicortisol	93,33 \pm 4,24	4
Corticosterona	95,46 \pm 3,68	4
Progesterona	30,87 \pm 2,26	4
Testosterona	13,56 \pm 3,12	4

10 ng cortisol: 100% de deslocamento

Cumpra lembrar, no entanto, que as concentrações relativas de F e dos demais corticosteróides não são de igual magnitude. Desde que a diferença seja grande dispensa-se fase de purificação.

b) Sensibilidade

Na Tabela VI estão indicadas 8 determinações do traçador (ausência de massa fria) H_0 , do ponto 1 (1 ng) da curva-padrão, H_1 , e do ponto 2 (2,5 ng) da mesma curva, H_2 . Foram calculados o coeficiente de variação, as médias, e também os desvios-padrão. A análise de variância indica que o ponto 1 (H_1) é estatisticamente diferente de zero para o intervalo de confiança de 95%.

Tabela VI
Sensibilidade

Nº do tubo	% B/T		
	H_0 (0 ng)	H_1 (1,0 ng)	H_2 (2,5 ng)
1	61,68	54,93	48,31
2	62,30	55,79	47,87
3	66,62	57,53	49,54
4	67,14	57,38	46,69
5	67,45	54,33	43,47
6	61,77	56,53	51,11
7	61,93	55,60	52,74
8	61,56	56,07	55,81
	$\bar{X} = 63,80$	$\bar{X} = 56,02$	$\bar{X} = 49,44$
	D.P. = 2,72	D.P. = 1,23	D.P. = 3,80
	C.V. = 4,26%	C.V. = 2,19%	C.V. = 7,68%

F = 53,72, significativo para $\alpha = 0,05$

$D_1 = 2$ (graus de liberdade do numerador – intragrupos)

$D_2 = 21$ (graus de liberdade do denominador – intergrupos)

* Indicando significativo para $\alpha = 0,05$

Como a sensibilidade da curva-padrão é de 1,0 ng, sendo a extração do cortisol plasmático é de $X \pm D.P.$: $(78,23 \pm 5,31)\%$, ($n = 10$), e por outro lado apenas a terça parte do volume total do extrato é utilizado para a quantificação do hormônio, a verdadeira sensibilidade média do método será de = 3,81 $\mu\text{g}/100$ ml de plasma.

c) Exatidão

A Tabela VII reúne no lado das quantidades conhecidas de cortisol plasmático de cada tubo, as adicionadas, os valores obtidos e as recuperações percentuais. O coeficiente de correlação r foi de 0,995, $\alpha = 0,05$.

Na Figura 9 apresentamos a reta de regressão do estudo de exatidão ($Y = 0,992 X + 0,02$).

Tabela VII

Provas de Recuperação, Adicionamento Quantidades Crescentes de uma Solução com Concentração de Cortisol Constante e Conhecida a uma Mistura de Plasma de Teor Cortisólico Conhecido $\bar{X} \pm D.P.$: $5,52 \pm 0,23 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, ($n = 10$)

Nº do tubo	A **	B ***	Resultados		
			Valor Obtido ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Valor Obtido Calculado ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	Recuperação Percentual
1	5,52	7,50	12,52	7,00	93,33
2	5,52	7,50	11,90	6,38	85,05
3	5,52	7,50	11,98	6,46	86,13
4	5,52	7,50	12,34	6,82	90,93
					$6,66 \pm 0,29^*$
5	5,52	15,00	20,40	14,88	99,20
6	5,52	15,00	20,57	15,05	103,33
7	5,52	15,00	20,47	14,93	99,53
8	5,52	15,00	20,66	15,09	100,60
					$14,98 \pm 0,09^*$
9	5,52	22,50	27,30	21,73	96,57
10	5,52	22,50	27,12	21,55	95,77
11	5,52	22,50	27,28	21,76	96,71
12	5,52	22,50	27,35	21,83	97,01
					$21,71 \pm 0,11^*$
13	5,52	30,00	35,86	30,34	101,13
14	5,52	30,00	34,98	24,46	81,53
15	5,52	30,00	34,87	29,35	97,83
16	5,52	30,00	35,48	29,96	99,86
					$28,52 \pm 2,74^*$
17	5,52	45,00	48,92	43,40	98,44
18	5,52	45,00	50,96	45,44	100,97
19	5,52	45,00	50,07	44,55	99,00
20	5,52	45,00	49,61	44,09	97,97
					$44,37 \pm 0,87^*$

* = $\bar{X} \pm D.P.$

** = Concentração média de cortisol: $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ plasma.

*** = Concentração de cortisol adicionado: $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ Etanol.

Coefficiente de correlação entre valor teórico e valor calculado, $r = 0,9955$, $\alpha = 0,05$

Reta de regressão: $\hat{Y} = 0,992X + 0,02$

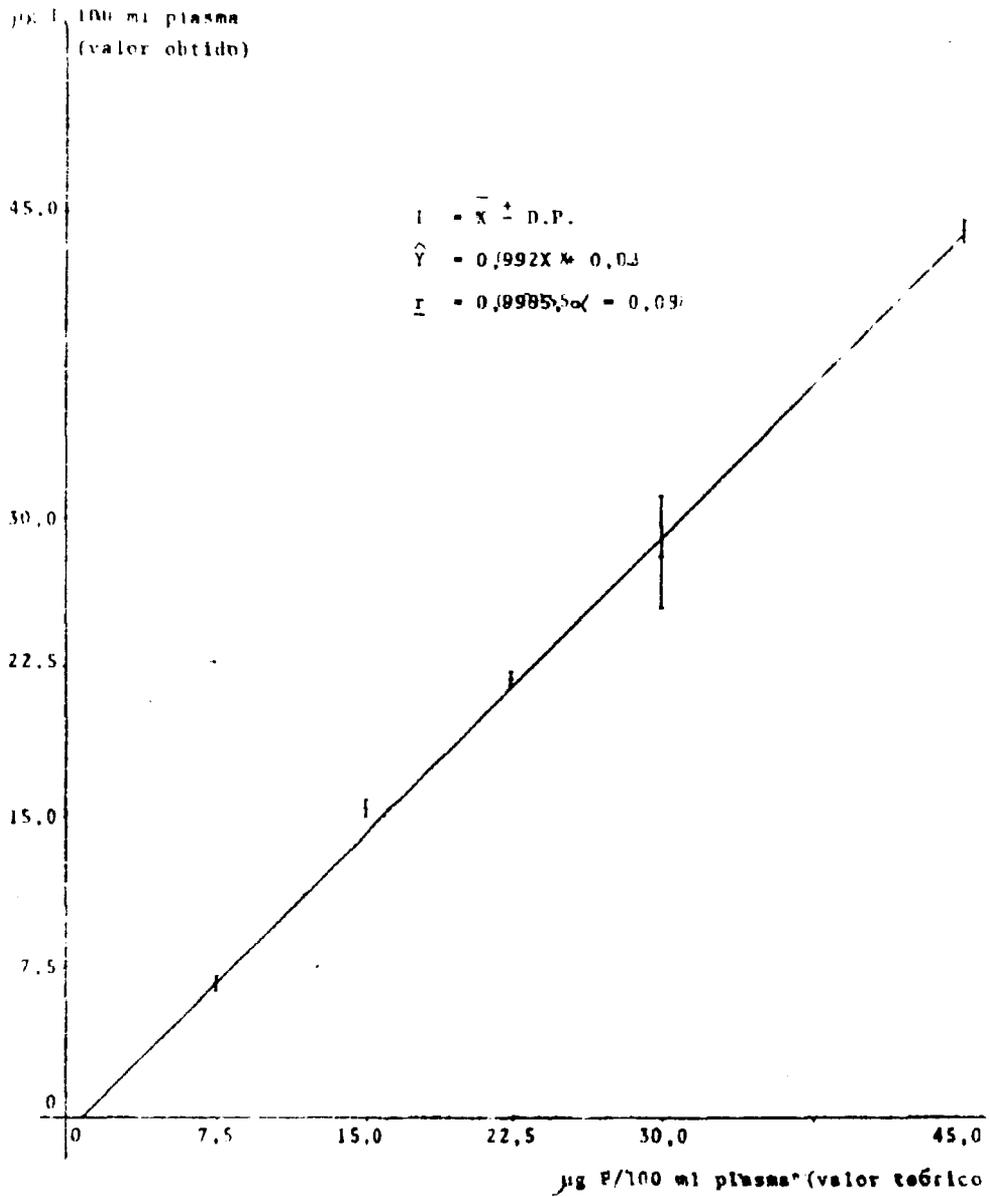


Figura 9 -- Provas de Recuperação. Regressão Linear

d) Precisão

Na Tabela VIII estão reunidos os dados intra-ensaio de 20 determinações de uma mesma amostra de plasma com a respectiva média, coeficiente de variação, desvio-padrão e intervalo de confiança, cujos valores numéricos são: 19,3 $\mu\text{g F}/100\text{ ml}$, 0,94, 4,87%, (19,31 \pm 1,96) $\mu\text{g F}/100\text{ ml}$.

Tabela VIII
Precisão Intra-Ensaio. Análise da Reprodutibilidade de 20 Determinações de "Cortisol", Efetuadas em Plasma, perante Condições Ideais de Trabalho

Nº de Tubo	Concentração de Cortisol
	($\mu\text{g F}/100\text{ ml}$)
1	18,68
2	19,71
3	18,60
4	18,72
5	19,42
6	19,85
7	21,45
8	19,66
9	18,69
10	19,02
11	18,54
12	18,18
13	20,53
14	19,46
15	20,63
16	20,27
17	18,17
18	18,67
19	19,88
20	18,02

$\bar{X} = 19,31 \mu\text{g F}/100\text{ ml}$
D.P. = 0,94
E.P.M. = 0,21
C.V. = 4,78%
Intervalo de confiança = (19,31 \pm 1,96) $\mu\text{g F}/100\text{ ml}$

Na Figura 10, podemos apreciar a precisão intra-ensaio da curva-padrão de 0 a 20 ng de cortisol, representando a média de 10 determinações.

Na Tabela IX, apresentamos os dados das determinações inter-ensaio, realizadas no período de três semanas consecutivas. Observamos que há uma queda, estatisticamente significativa, dos valores obtidos com o decorrer do tempo.

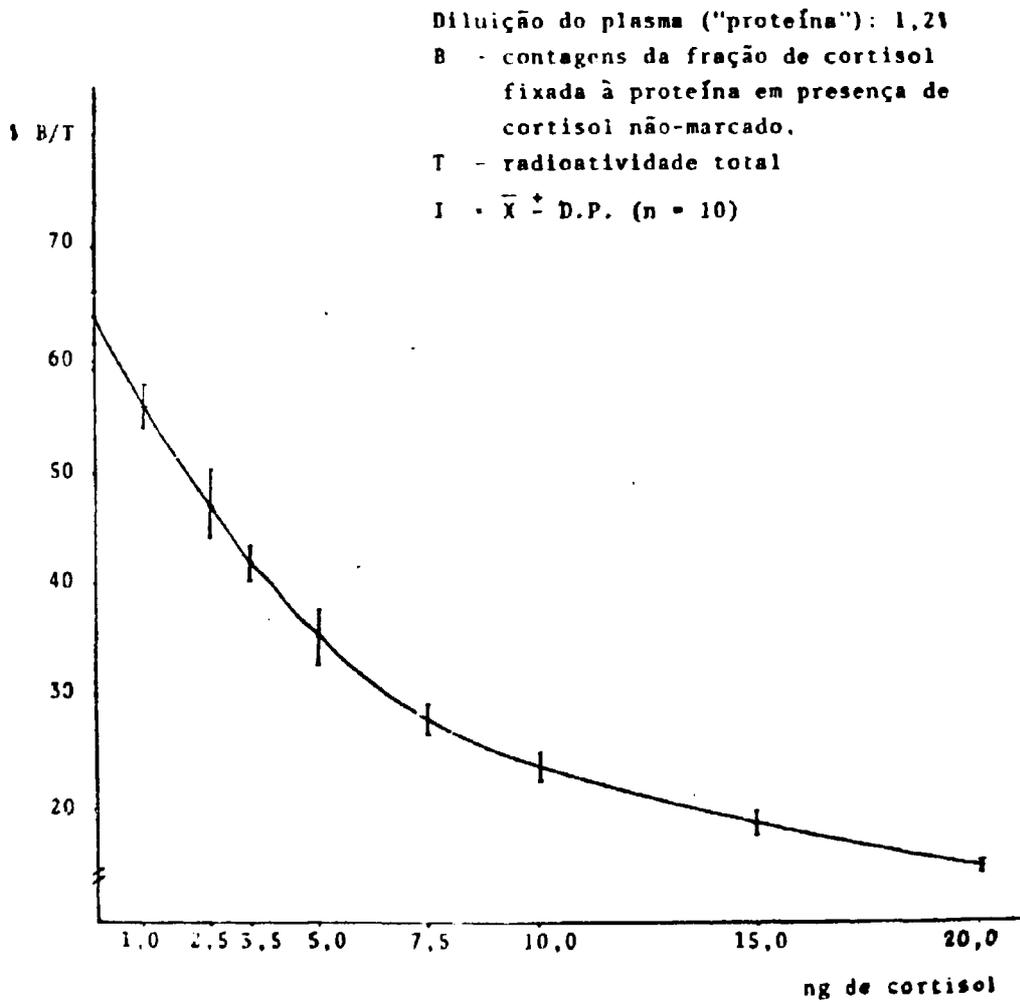


Figura 10 - Precisão Intra-Ensaio da Curva de Calibração, sendo 10 Determinações em cada Ponto da Curva

Tabela IX
Precisão Inter-Ensaio

Nº de Tubo	1a. semana	2a. semana	3a. semana
	($\mu\text{g F}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g F}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g F}/100\text{ ml}$)
1	12,44	10,94	9,61
2	12,02	10,19	9,43
3	12,40	10,86	8,48
4	12,66	10,04	8,56
5	12,60	10,74	9,01
	$\bar{X} = 12,42$	$\bar{X} = 10,55$	$\bar{X} = 9,02$
	D.P. = 0,25	D.P. = 0,41	D.P. = 0,50
	C.V. = 2,01%	C.V. = 3,89%	C.V. = 5,59%

$F = 10,1617$, significativo para $\alpha = 0,05$

$D_1 = 2$ (graus de liberdade do numerador – intragrupos)

$D_2 = 10$ (graus de liberdade do denominador – intergrupos)

* Indicando significativo para $\alpha = 0,05$

A precisão inter-ensaio da curva-padrão de 0 a 20 ng, no intervalo de tempo de 6 meses, e realizados com a mesma fonte de proteína fixadora (transcortina), levou a resultados cujas médias e desvios padrão estão representados na Figura 11. A reduzida dispersão dos resultados referentes a cada ponto atestam mais uma vez a boa reprodutibilidade do método e a conservação das características de fixação da transcortina.

1.4 – Amostras de Plasma

Na Tabela X, temos o intervalo de valores normais para o "cortisol" plasmático, em jejum às 8:00 h da manhã, dosados através desta técnica ($\bar{X} \pm 1 \text{ E.P.M.}$), tendo sido feitas 61 determinações. Na mesma tabela estão indicados os resultados da literatura usando técnica similar.

Os valores normais de cortisol plasmático não serão apreciados neste trabalho; indicando na Tabela X, a média e o E.P.M. exclusivamente para o efeito comparativo de trabalhos citados na literatura.

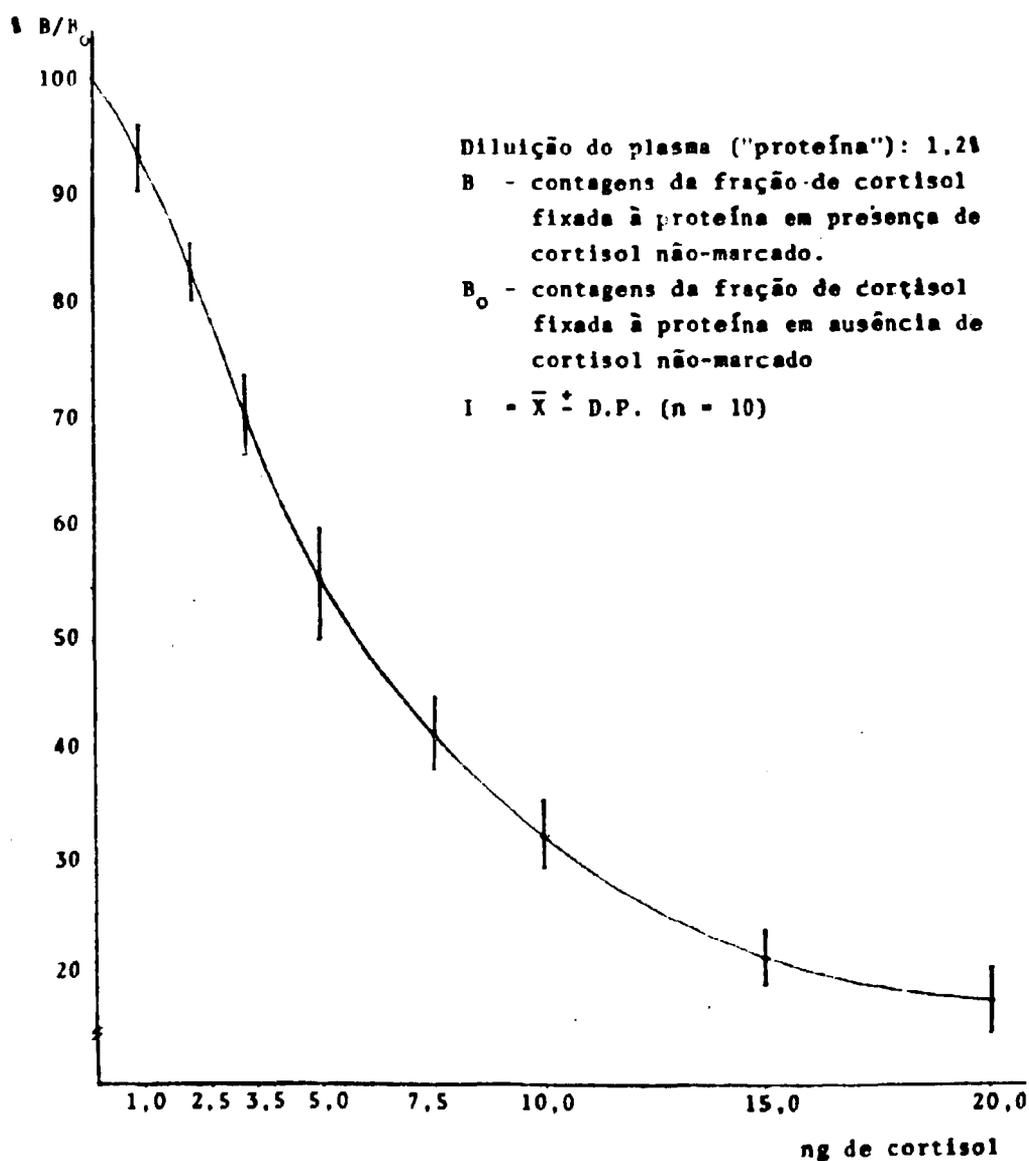


Figura 11 - Curva-Padrão Obtida com as Médias de 10 Curvas Realizadas num Período de Tempo de 6 meses com a mesma Fonte de Proteína Fixadora

Tabela X
Níveis de Cortisol Plasmático por Competição à Proteína Fixadora, em Indivíduos Normais, às 8,00 H. da Manhã ($\bar{X} \pm E.P.M.$) (n = 61)

$\mu\text{g F}/100 \text{ ml Plasma}$ $(\bar{X} \pm E.P.M.)$	Referência
13,6 \pm 0,7	presente estudo
12,3 \pm 0,8	Newsome Jr et alii ⁽²³⁾
12,8 \pm 0,5	Hamanaka et alii [*]
11,7 \pm 3,7	Iturzaeta et alii [*]
16,0 \pm 3,0	Jubiz et alii [*]
9,8 \pm (3,1 - 20,2)	Fraser and James [*]
14,8 \pm 0,6	Leclercq et alii ⁽¹⁴⁾

* Referência citada por Newsome Jr et alii⁽²³⁾

5 - DISCUSSÃO

Os métodos para determinação de cortisol no sangue foram criticamente revistos por Braunsberg e James⁽¹⁾, tendo sido analisados na introdução.

Entre as vantagens do método utilizado neste trabalho, devemos assinalar: a) pequeno volume (100 μl) de plasma empregado, tornando-o útil para determinações em série; b) sua sensibilidade que lhe permite apreciar valores de 3,81 μg de cortisol/100 ml de plasma e, c) ausência de interferência de substâncias que, em condições habituais, comprometem os métodos calorimétrico e fluorimétrico.

Podemos ainda aumentar a sensibilidade da técnica diminuindo a concentração de solução de proteína conjugadora e do traçador.

Entretanto, existem materiais não-específicos no plasma que reagem com a globulina específica no método em discussão⁽²²⁾. Outrossim, outros esteróides que não o cortisol podem interferir na reação, tais como a cortisona, 11-deoxicortisol, corticosterona, 11-deoxicorticosterona, 11-dihidro-corticosterona, progesterona e 17-alfa-progesterona se as suas concentrações forem 1:1 em relação ao cortisol⁽³⁰⁾. Como podemos verificar na tabela V, os mais importantes quanto à interferência são deoxicortisol e corticosterona em menor grau, a progesterona e os demais.

Com efeito, os valores médios de corticosterona, cortisona e 11-deoxicortisol nos indivíduos normais variam de 0,4 a 1,0 μg de corticosterona/100 ml, 1,6 a 3,9 μg de cortisona/100 ml e 0,18 a 1,0 μg de 11-deoxicortisol/100 ml (referências citadas por Newsome, Clements and Borum⁽²³⁾). Portanto os extratos contêm de 3 a 5 vezes mais cortisol do que os outros esteróides que também deslocam cortisol. As percentagens de deslocamento de corticosterona, cortisona e 11-deoxicortisol em relação ao cortisol são:

- corticosterona: 2,94 a 7,35%

- cortisona: 11,76 a 28,67%

deoxicortisol: 1,32 a 7,35%

Podemos, nestas condições, concluir que o método analisado no nosso trabalho tem suficiente especificidade para avaliar os níveis de cortisol plasmático humano⁽³⁰⁾. Uma separação cromatográfica destes esteróides não é assim pré-requisito para a especificidade em condições habituais do ensaio. Apenas quando um dos esteróides interferentes está desproporcionalmente elevado, como nos defeitos de síntese da esteroidogênese adrenal espontâneos ou induzidos (metopirona) ou nas biossínteses anormais de esteróides (carcinomas adrenais) é que se torna necessário uma purificação prévia dos extratos.

Do ponto de vista prático, estamos pois medindo o nível do cortisol plasmático através da técnica descrita, com os resultados já indicados.

A dosagem de "cortisol" plasmático por união competitiva à proteína conjugadora é portanto, altamente específica (dentro dos limites comentados) e precisa.

Quanto a avaliação do método em relação à especificidade, apreciada pela técnica da diluição (em que é condição necessária mas não suficiente, de que as medidas da diluição do hormônio plasmático endógeno estejam ao longo de uma linha reta se o hormônio endógeno e o padrão são similares quanto à reatividade com a transcortina), vemos na **tabela VII** que as concentrações de "cortisol" plasmático, medidas em cinco diferentes volumes em relação à curva-padrão, através de análise de variância e cálculo de reta de regressão, apresentam uma relação linear entre o volume utilizado e a concentração obtida. A reta de regressão obtida não é estatisticamente diferente da reta de regressão teórica sugerindo que a reação é específica.

No presente estudo, o resultado numérico das replicatas de uma mesma mistura de plasma (20 determinações) em condições ideais do trabalho foi de 4,87% (coeficiente de variação), considerado excelente, segundo Melo (1970)⁽¹⁷⁾. Quanto à estocagem de amostras a serem quantificados a 4°C, as dosagens feitas em três semanas consecutivas — precisão inter-ensaio — nos mostraram que realmente há uma progressiva degradação, significativa em qualquer das combinações (**Tabela VIII**), fato já observado por Braunsberg e James⁽¹⁾.

Quanto à precisão inter-ensaio das curvas-padrão, a reduzida dispersão dos resultados referentes a cada ponto atestam a boa reprodutibilidade do método e a conservação das propriedades de fixação da transcortina.

Quanto à sensibilidade, definida como a menor quantidade de hormônio não-marcado que pode ser distinguida do traçador (cortisol tritiado) dependerá do erro da determinação das menores concentrações de hormônio não-marcado e do declive da curva-resposta e foi 3,81 µg de cortisol/100 ml de plasma (**Tabela VI e Figura 9**).

Um aspecto importante e crítico na técnica de união competitiva à proteína conjugadora é a obtenção de uma fonte de proteína adequada, isto é, com taxas de hormônio endógeno e sítios de união disponíveis para que em grandes diluições de proteína possamos obter uma curva de calibração suficientemente sensível e precisa para o intervalo desejado.

A pureza do hormônio tritiado que irá ser utilizado como traçador é fator importante e que deve ser controlado, pois devido à auto-radiólise, a atividade específica vai diminuindo com o tempo.

Quanto à separação do hormônio livre daquele ligado à proteína específica, escolhemos entre as várias técnicas de separação⁽²⁶⁾, a do carvão ativado (Norit "A") recoberto com dextrana, como

adsorvente específico do hormônio, e que se mostrou satisfatório para uma separação eficiente entre hormônio livre e complexo "transcortina cortisol". Em face dos excelentes resultados obtidos em provas de especificidade, sensibilidade e precisão, dispensamo-nos de ensaiar especificamente este aspecto do método.

A Tabela X nos dá uma relação dos valores normais encontrados em vários laboratórios utilizando técnica similar a do presente trabalho.

6 – CONCLUSÕES

- 1) Neste trabalho, padronizamos método para a dosagem de "cortisol" plasmático (17-hidroxicorticosteróides), pela técnica de união competitiva à proteína conjugadora, utilizando como elementos de separação das formas livre e fixada carvão ativado (Norit "A") revestido com dextrana para a separação do complexo hormônio-proteína e hormônio marcado livre.
- 2) A fonte de proteína escolhida – plasmas de indivíduos com insuficiência adrenal demonstrou-se excelente para o fim desejado.
- 3) A técnica empregada, avaliada através de suas especificidade, exatidão, sensibilidade e precisão, permitiu quantificar níveis de cortisol no plasma, desde condições basais até níveis elevados, obtidos geralmente após estímulo adequado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKMAN INSTRUMENTS INC., Fullerton, Calif. *Beckman Instructions 1963-A – LS-133 and LS-150 – Liquid scintillation systems: solbeta counting spectrometers*. FULLERTON, Calif. 1967.
2. BRAUNSBURG, H. & JAMES, V. H. T. The determination of cortisol and corticosterone in blood: a review. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 21:1146-88, 1961.
3. BURTON, R. M. & WESTPHAL, U. Steroid binding proteins in blood plasma. *Metabolism*, Baltimore, 21(3):253-76, 1972.
4. DAUGHADAY, W. H. La fijación de los corticosteroides por las proteínas plasmáticas. In: EISENSTEIN, A. B., ed. *La corteza suprarrenal*. Barcelona, Ed. Toray, 1970. p. 389-407.
5. EIK-NES, K. Determination of 17-21-dihydroxyketosteroids in blood plasma. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 17:502-11, 1957.
6. EKINS, R. P. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clinica Chim. Acta*, Amsterdam, 5:453-9, 1960.
7. FAZEKAS, A. T. A. et alii. Determination of cortisol in various peripheral tissues and adrenals of guinea pigs by competitive protein-binding method. *Steroids Lipids Res.*, Basel, 3:328-38, 1972.

8. GELLER, L. E. & SILBERMAN, N. Stability of labeled compounds after storage. In: BRANSOME JR., E. D. ed. *The current status of liquid scintillation counting*. New York, Grune and Shatton, 1970. ch. 13, p. 137-41.
9. HERBERT, V. Coated charcoal separation of free labelled hormone bound to antibody. In: MARGOULIES, M., ed. *Protein and polypeptide hormones: proceedings of the international symposium, Liège, May 19 25, 1968*. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1969.
10. HEYNS, W. et alii. Study of steroid-protein binding by means of competitive adsorption: application to cortisol binding in plasma. *Clinica Chim. Acta*, Amsterdam, 18:361-70, 1967.
11. JENKINS, J. S. The estimation of cortisol in blood. In: *An introduction to biochemical aspects of the adrenal cortex*. London, Arnold, 1968. Ch.11, 87-92.
12. LECLERC, O. et alii. Le dosage par compétition du cortisol plasmatique: modification de la méthode de Murphy. *Revue fr. Etud. clin. biol.*, Paris, 14:815-9, 1969.
13. MARKS, L. J. & LEFTIN, J. H. A note of caution for the lack of specificity of the Porter-Bilber reaction for 17-21-dihydroxy-20-ketosteroids. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 14:1263-5, 1954.
14. MELO, E. H. L. *Padronização laboratorial dos lipídios séricos, em especial dos adultos normais*. Goiânia, Faculdade de Medicina, EFG, 1970. (Tese de livre docência).
15. MURPHY, B. E. P. Hormone assay using binding proteins in blood. In: ODELL, W. D. & DAUGHADAY, W. H. eds. *Principles of competitive protein-binding assays*. Philadelphia, Lippincott, 1971. p. 108-27.
16. Methodological problems in competitive protein-binding techniques; the use of sephadex column chromatography to separate steroids. *Acta endocr.*, Copenhagen (suppl. 147):37-60, 1970.
17. Protein binding and the assay of nonantigenic hormones. *Recent Progr. Horm. Res.*, New York, 25:563-610, 1969.
18. Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 27:973-90, 1967.
19. et alii. Simple method for determination of plasma corticoids. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 23:293-300, 1963.
20. NEWSOME JR, H. H. et alii. The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-deoxy-cortisol, and cortisone in human plasma. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 34:473-83, 1972.
21. NUGENT, C. A. & MAYES, D. Reliability of plasma testosterone assays by competitive protein binding methods. *Acta endocr.*, Copenhagen (suppl. 147): 257-74, 1970.
22. PETERSON, R. E. et alii. Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone. *Analyt. Chem.*, Easton, Pa., 29:144-9, 1957.

23. RATCLIFFE, J. G. Separation techniques in saturation analysis. *Br. med. Bull.*, London, 30(1):32-7, 1974.
24. SLAUNWHITE JR, W. R. & SANDBERG, A. A. Analysis of corticosteroids. *Acta endocr.*, Copenhagen (suppl. 147):144-54, 1970.
25. WAJCHENGERG, B. L. et alii. Effect of strogen administration on plasma cortisol fractions in normal and panhypopituitary females. *Metabolism*, Baltimore, 23(4):337-42, 1974.
26. WESTPHAL, U. Preparation and characteristics of corticosteroid-binding globulin (CBG, transcortin). *Acta endocr.*, Copenhagen (suppl. 147):122-43, 1970.

