



**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALDOSTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS
EM CONDIÇÕES NORMAIS DE INGESTÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO, APÓS
SOBRECARGA E DEPLEÇÃO SALINA, EM RELAÇÃO À POSTURA E
APÓS ESTÍMULO COM ACTH E ANGIOTENSINA II.
RADIOIMUNOENSAIO DE ALDOSTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS**

Helena Okada

**DISSERTAÇÃO E TESE IEA - 144
IEA - DT - 144**

AGOSTO/1979

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

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALDOSTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS
EM CONDIÇÕES NORMAIS DE INGESTÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO, APÓS
SOBRECARGA E DEPLEÇÃO SALINA, EM RELAÇÃO A POSTURA E
APÓS ESTÍMULO COM ACTH E ANGIOTENSINA II.
RADIOIMUNOENSAIO DE ALDOSTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS**

Helene Okada

Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências na Área de Fisiologia" – Orientador Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg. Apresentada e defendida em 02 de fevereiro de 1979, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

INIS Categories and Descriptors

C45

Aldosterone

Hydrocortisone

Blood plasma

Radioimmunoassay

Sodium

← **Intake**

ACTH

Angiotensin

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	2
2 – PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL	3
3 – MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1 – Aparelhos e Equipamentos	4
3.2 – Substâncias Químicas e Biológicas	5
3.3 – Preparação e Conservação das Soluções para Radioimunoensaio	10
3.4 – Técnica e Sequência Operacional da Dosagem de Cortisol e Aldosterona Plasmáticos para Radioimunoensaio	15
3.5 – Avaliação das Diferentes Etapas dos Métodos de Dosagem de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos para Radioimunoensaio	21
3.6 – Avaliação dos Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos para as Diversas Situações Experimentais Programadas para este Estudo: Postura, ACTH, Angiotensina II e Diferentes Dietas	22
4 – RESULTADOS	24
4.1 – Controle de Qualidade dos Hormônios Marcados com Trício Utilizados Neste Estudo .	24
4.2 – Curva Dose-Resposta para o Radioimunoensaio de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos .	24
4.3 – Sensibilidade do Método de Aldosterona e Cortisol	28
4.4 – Reprodutibilidade Interensaio de Cortisol e Aldosterona Plasmáticos	28
4.5 – Determinações de Cortisol Plasmáticos por Radioimunoensaio e Por Técnica de Competição à Proteína Transportadora (Transcortina)	28
4.6 – Estudos Fisiológicos	28
5 – DISCUSSÃO	50
6 – CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALDOESTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS
EM CONDIÇÕES NORMAIS DE INGESTÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO, APÓS
SOBRECARGA E DEPLEÇÃO SALINA, EM RELAÇÃO À POSTURA E
APÓS ESTÍMULO COM ACTH E ANGIOTENSINA II.
RADIOIMUNOENSAIO DE ALDOESTERONA E CORTISOL PLASMÁTICOS**

Helena Okada

RESUMO

apresentamos adaptados
Neste trabalho, foram empregados métodos para a quantificação de cortisol e aldosterona plasmáticos por radioimunoensaio, utilizando-se anti-soros altamente específicos.

Com a metodologia laboratorial estabelecida foi possível o estudo fisiológico da secreção de cortisol e aldosterona, em seis indivíduos normais, mantidos em uma dieta basal, de arroz ($<10 \text{ mEq Na}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$) + $100 \text{ mEq K}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$. *Realizaram-se* ~~Foram realizados~~ os estudos de postura e dos efeitos de corticosteroide e angiotensina II exógenas em condições de dieta basal e com aumento progressivo de Na^+ a 120 e $180 \text{ mEq} \cdot \text{dia}^{-1}$.

Os níveis basais de aldosterona caíram progressivamente com o aumento do conteúdo do sódio na dieta. Entretanto, não houve diferença significativa nos incrementos relativos aos basais desencadeados pela postura, nas três níveis de ingestão de sal.

O incremento da biossíntese e da aldosterona pela ação de ACTH foi similar, qualquer que fosse a taxa basal de aldosterona induzida pela variação dietética do sal. As respostas de secreção de aldosterona ao fator corticosteroide e à posição ereta foram semelhantes, independentemente de quantidade de sódio ingerido.

A infusão de Angiotensina II induziu a secreção de aldosterona, sendo que na vigência de dieta rica em sódio, o incremento relativo foi maior do que na de arroz.

O valor médio basal do cortisol em níveis diferentes de ingestão de Na^+ foi significativamente diferente. Após deambulação, houve decréscimo dos valores de cortisol nas três dietas em relação ao valor basal, não diferindo entre si.

A injeção de ACTH estimulou a secreção de cortisol independentemente do nível de ingestão de Na^+ , sendo a resposta do córtex similar nas três dietas.

A infusão de angiotensina II em doses não hipertensivas provocou uma queda anômala nos níveis de cortisol que se deve provavelmente ao desvio do substrato para a biossíntese de aldosterona, além do próprio efeito do ritmo nictemeral do cortisol.

Nota explicativa: A ortografia e a acentuação dos termos empregados no presente trabalho obedecem ao Novo Dicionário Brasileiro de Língua Portuguesa, de Aurélio Buarque de Holanda Ferreira, 1ª edição (quarta impressão), 1975.

Aprovada para publicação em Fevereiro/1978.

1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

O radioimunoensaio de hormônios esteróides tornou-se possível com a síntese de conjugados antigênicos proteína-esteróides⁽¹⁾. Com a preparação de anti-soros específicos para esses compostos e a utilização da metodologia básica desenvolvida por Yalow e Berson^(4,5), surgiram técnicas radioimunológicas capazes de quantificar adreno-hormônios em materiais biológicos.

A dosagem de hormônios esteróides que existem em concentrações relativamente baixas, em líquidos biológicos, apresentava sérias dificuldades. Os métodos analíticos até então utilizados, embora específicos, careciam de precisão, sensibilidade, exigindo muito tempo para sua feitura, além de envolver técnicas complexas para isolar os hormônios de outras substâncias com reatividade cruzada significativa.

Os princípios básicos do ensaio radioimunológico baseiam-se em reação de competição entre hormônio radiomarcado e o de referência, para os sítios de fixação da proteína específica e o resultado dependerá somente da interação dos reagentes, de acordo com a lei da ação das massas. São requisitos necessários de um radioimunoensaio: a substância a ser dosada nas formas marcada e não marcada ("fria"), um ligante específico e recursos para a separação das frações livre e conjugada do hormônio marcado.

Resolvidos os aspectos técnicos da dosagem de cortisol e aldosterona do plasma, foi possível estudar os fatores que regulam sua produção endógena e, em particular, a da interrelação entre estes esteróides e o equilíbrio eletrolítico.

No indivíduo normal, a secreção de aldosterona é automaticamente regulada ao nível necessário para conservar o volume do fluido extracelular, mantendo-se concentrações de sódio adequadas. Para tanto, a velocidade de secreção de aldosterona responde às alterações do volume extracelular e dos níveis de potássio sérico que afetam de modo antagônico a secreção de aldosterona pela sua interferência com teor de sódio do corpo.

A alteração do volume circulante efetivo, provavelmente captada pelos barorreceptores, determina a secreção de renina pelo aparelho juxtaglomerular. A renina induz a hidrólise do angiotensinogênio que dá origem a um decapeptídeo, angiotensina I e a outra fração peptídica. Uma enzima plasmática conversora por sua vez hidroliza a angiotensina I, liberando um octapeptídeo, a angiotensina II. A angiotensina II exerce um efeito direto na zona glomerulosa do córtex da supra-renal, determinando síntese de aldosterona que, por sua vez, vai determinar retenção de sódio e perda de potássio por sua ação sobre o túbulo renal. O ACTH e ions de potássio, por ação direta no córtex supra-renal (zona glomerulosa), também induzem a secreção de aldosterona.

Com efeito, os glicocorticóides contribuem sensivelmente na retenção de sódio. Embora suas atividades sejam 100 a 200 vezes menores do que a da aldosterona, suas secreções diárias atingem valores mais elevados do que a desta última (25 mg.dia⁻¹ para o cortisol e 5 mg.dia⁻¹ para corticosterona contra 0,25 mg.dia⁻¹ para a aldosterona). Em condições basais, a retenção de sódio é efetuada por efeito da ação do cortisol⁽¹⁵⁾. Quando há redução de volume circulante atividade mineralocorticóide adicional é determinada pela secreção de aldosterona induzida pelo sistema renina-angiotensina. Acredita-se, no entanto, que o mecanismo responsável pela secreção de aldosterona não seja exclusivamente regulado pelo sistema renina-angiotensina, devendo haver outros componentes não bem esclarecidos.

Face às dúvidas ainda reinantes, julgou-se oportuno colher, em indivíduos normais, dados esclarecedores quanto à regulação da secreção de aldosterona e cortisol na dependência de restrição e de sobrecarga alimentares de sódio, na de estímulos posturais e na de administração de ACTH e angiotensina II. Para tanto era mister ensaiar e estabelecer alguns critérios de controle de qualidade de métodos de dosagem de aldosterona e cortisol plasmáticos por técnicas de radioimunoensaio.

Esses serão, pois, os diferentes aspectos a serem estudados neste trabalho.

2 – PROGRAMAÇÃO EXPERIMENTAL

Para alcançar nossa proposição fez-se necessário:

- 1) ensaiar e estabelecer alguns critérios de controle de qualidade de métodos de dosagem de aldosterona e cortisol plasmáticos por radioimunoensaio;
- 2) determinação das variações dos níveis plasmáticos de aldosterona e cortisol em indivíduos normais submetidos a restrição e sobrecarga alimentares de sódio, a estímulos posturais e à administração de ACTH e angiotensina II.

2.1 – Radioimunoensaio

Em contraste com o radioimunoensaio de hormônios peptídicos em que técnicas de purificação de amostras biológicas são relativamente pouco necessárias, nas de esteróides sempre se deve recorrer ao menos algum grau de purificação do material, antes do ensaio propriamente dito.

Com efeito, os hormônios esteróides, em virtude de seus níveis plasmáticos baixos, tornam o sistema de dosagem sensível a interferentes a que se acresce a ausência de anti-soros com especificidade completa. Em atenção aos propósitos deste trabalho, a remoção destes interferentes é feita por extração com solventes orgânicos que os liberam das proteínas carreadoras, seguindo-se extração seletiva exaustiva ou por cromatografia em papel ou em coluna de celite ou gel de Sephadex lipofílico⁽¹⁾.

Os esteróides são adsorvidos pelo Sephadex lipofílico com diferentes afinidades devido a vários efeitos físico-químicos entre os quais a exclusão por peso molecular, interações do gel com funções químicas do soluto, polaridade da fase móvel, efeito adsorativo a partição^(8,23).

Utilizam-se várias técnicas para a obtenção de anti-soros contra esteróides, todas basicamente empregando técnicas de acoplar esteróides a proteínas carreadoras como descritas por Erlanger e outros e revisada por Abraham⁽¹⁾.

A completa especificidade do anti-soro é difícil de ser obtida e a reatividade cruzada ocorre com outras moléculas de esteróides com estrutura similar à do esteróide utilizado como hapteno.

Parece que o anti-soro possui especificidade principalmente contra radicais específicos do esteróide distais à porção fixada à proteína carreadora⁽¹⁸⁾. Isso levou a acoplar proteínas a átomos de carbono do núcleo ciclopentano-fenantreno numa tentativa de melhorar a especificidade.

Os hormônios esteróides uma vez acoplados adequadamente à proteína carreadora têm mostrado ser potencialmente antigênicos em animais de laboratório, sendo suficiente a imunização repetida com adjuvante de Freund associado a bacilos do tuberculose^(11,25,28). Existe porém, uma considerável variabilidade no grau de antigenicidade face a animais da mesma espécie e lote.

O requisito essencial para um radioimunoensaio sensível é a obtenção de anti-soro que reage com o hormônio com energia de ligação apreciável e constante de afinidade média próxima de concentração da substância no meio biológico, ao redor de 10^{-9} mole.litro⁻¹, refletindo-se essencialmente na queda inicial da curva dose-resposta.

A natureza hidrofóbica da ligação anticorpo-esteróide torna suscetível sistemas de radioimunoensaio a substâncias não polares. As modificações de resposta analítica, comumente encontrada na presença de resíduos sec. de solventes ("branco" de solventes) ou de extratos plasmáticos ("branco" de extratos plasmáticos) pode ser induzida por substâncias de origem não específicas deixadas pelos próprios solventes ou por moléculas lipofílicas coextraídas dos fluidos biológicos⁽¹⁸⁾.

Por fim, uma importante fase em qualquer imunoensaio é a separação das frações livres e conjugadas. Há uma variedade de técnicas, e a mais comumente utilizada consiste em um adsorvente seletivo, carvão ativado recoberto com dextrana, adsorvendo o esteróide livre e deixando a fração ligada em solução. Por outro lado, a alta velocidade de dissociação, característica dos imunocomplexos de esteróide, resultando numa mudança rápida da fração de esteróide conjugada em relação à forma livre, faz com que o carvão passe a causar dissociação do esteróide ligado ao anticorpo, além de poder adsorver a fração ligada, rompendo o equilíbrio dinâmico estabelecido entre os reagentes e o imunocomplexo⁽¹⁸⁾.

Nesta pesquisa, o uso do carvão recoberto com dextrana em concentrações relativamente baixas, da ordem de 10:1, e o controle do tempo de contacto hormônio-adsorvente, revelaram-se satisfatórios para uma separação eficiente do hormônio livre do imunocomplexo.

Para a avaliação das diferentes fases técnicas da dosagem de aldosterona e cortisol instituíram-se controles de qualidade que estimam a pureza do traçador e dos reagentes, a sensibilidade do método, a precisão interensaio das curvas de calibração e a reprodutibilidade do ensaio (entre ensaios).

A pureza do traçador e dos reagentes foram controladas pelas ligações não específicas causadas por impurezas do traçador e dos próprios solventes ou coextraídas durante o processamento do plasma e, ainda, mercê dos valores de "brancos" dos extratos plasmáticos simulados por "brancos" de água bidestilada.

Avaliou-se a sensibilidade do método a partir do relacionamento da dispersão dos valores de replicatas do "branco" de água bidestilada com o recuperável porcentual da estimativa de perdas durante o processamento da água bidestilada e pela fração do volume do extrato utilizado para a determinação do deslocamento da formação do imunocomplexo.

A precisão inter-ensaio das curvas dose-resposta foi examinada a partir da análise de dispersão de cada ponto da curva feitas com a mesma partida de anti-soro e reagentes, no decurso de seis meses.

A reprodutibilidade interensaio dos métodos foi avaliada partindo-se da análise de dispersão de três misturas de plasma de indivíduos normais com concentrações hormonais diferentes, aceitando coeficientes de variação menor ou igual a 10%⁽²⁰⁾.

2.2 - Fisiologia

Uma vez estabelecidas as condições para o radioimunoensaio de aldosterona e cortisol no plasma, eles foram aplicados para a elucidação da secreção dos dois esteróides, em indivíduos adultos normais, perante ingestões variáveis de sódio e constantes de potássio. Avaliaram-se as interferências agudas determinadas por alterações de postura e por hormônios que estimulam o córtex supra-renal (ACTH e angiotensina II) fornecidos exogenamente.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Aparelhos e Equipamentos

Agitador eletromagnético e imã (Magne-Matic Stirrer, Modelo 15, Arthur H. Thomas Co., Filadélfia, Estados Unidos da América).

Balança analítica (Mettler H20T, Zurique, Suíça).

Bomba de vácuo (Vectorr-S35. Precision Scientific Co., Chicago, Estados Unidos da América).

Evaporador analítico de nitrogênio N-Evap (Organomation Associates Inc, Mass, Estados Unidos da América).

Frascos de vidro de teor baixo de potássio (Value Vial II, 161650, Beckman, Estados Unidos da América).

Minicolunas cromatográficas de vidro com 1,0 cm de diâmetro interno e filtro de capilares (Instituto de Energia Atômica, São Paulo, Brasil).

Papel de filtro de vidro (Whatman GF/A).

Pipetadores semi-automáticos e ponteiros descartáveis (Schwarz/Mann, Nova York, Estados Unidos da América):

a) "Biopette" de 0,2 ml (0010-19) e adaptador (0010-18) para volumes de 25, 75 e 150 μ l e "Biotips" de 0,2 ml (0010-20).

b) "Biopette" e "Biotips" de 1,0 ml (0010-29 e 0010-30).

Refrigerador (Frigidaire, São Paulo, Brasil).

Sifões de vidro de 0,1 ml de capacidade (Siphon 3408-1/2, LKB—Produkter AB, Suécia).

Sistema de detecção com cintilador dotado de espectrômetro e troca automática de amostras (modelo LS-150, Beckman, Estados Unidos da América).

Tubos de ensaio de vidro 10 x 75 mm (Vidrolabor, São Paulo, Brasil).

Tubos cônicos de vidro com rolha esmerilhada de capacidade 5,0 e 15,0 ml (Quimax, São Paulo, Brasil).

3.2 – Substâncias Químicas e Biológicas

3.2.1 – Reagentes*

Acetona PA

Ácido acético glacial – Solução 0,1 N.

Ácido bórico PA.

Ácido clorídrico fumegante – solução 2N.

Ácido tricloroacético PA – solução a 10%

Álcool etílico absoluto (Merck).

Álcool metílico PA.

Ázida sódica PA.

(*) de Carlo Erba, Merck ou Baker quando a procedência não é citada.

Benzeno PA.

Carvão Norit "A" (Sigma).

Ciclohexano PA (Merck).

Cloreto de metileno PA (Merck).

Cloreto de sódio PA.

Cromatoplaças de sílica gel F₂₅₄ (Merck).

Dextrana T-70 (Pharmacia-Upsalla, Suécia).

Dimetil-POPOP, pureza cintilação (Sigma) *.

EDTA dissódico dihidratado PA **.

EDTA tetrassódico dihidratado PA **.

Éter etílico PA (Merck).

Fosfato de sódio monobásico, monohidratado PA.

Fosfato de sódio dibásico, anidro PA.

Gama globulina, Cohn fração II (Sigma).

Gelatina (Merck).

Hidróxido de sódio PA – soluções de 0,1N, 0,25N e 1,0N.

PPO, pureza cintilação (Sigma) ***.

Sephadex LH-20, lote nº 1077 (Pharmacia-Upsalla, Suécia).

Tolueno PA.

Triton X-100 PA (Sigma) ****.

3.2.2 – Anti-soros

3.2.2.1 – Anti-soro Liofilizado Contra Aldosterona, Obtido da Firma "Diagnostic Products Corporation", Califórnia, Estados Unidos da América.

* Dimetil-POPOP = p-bis[2-(4-metil-5-feniloxazolil)] benzeno. Pico de fluorescência máxima 4 300 Å. Ponto de fusão = 231 e 234°C.

** EDTA = Etileno-diamino-tetraacetato.

*** PPO = 2-S-fenil-oxazol. Pico de fluorescência máxima 3 630 Å. Ponto de fusão = 72 e 73°C.

**** Triton X-100 = Produto de condensação de octil-fenoxi-poliétox-etanol.

3.2.2 – Anti-soro Liofilizado para Cortisol Preparado em Coelho contra Conjugado 3-oxima-cortisol-soro Albumina Bovina no Laboratório Fleury S/C Ltda., São Paulo, Brasil, pelo Dr. José H. Vieira e Dr. Ewaldo Russo⁽²⁸⁾

3.2.3 – Hormônios de Referência

O padrão de cortisol foi obtido da firma Schwarz/Mann, Nova York, Estados Unidos da América e o de aldosterona da Ciba Pharmaceutical Co., Nova Jersey, Estados Unidos da América. Na Tabela I, temos os nomes químicos de hormônios citados neste trabalho de acordo com IUPAC e IUB⁽¹²⁾.

3.2.4 – Hormônios Radioativos

Todos os hormônios marcados com trítio e carbono-14 foram obtidos da firma New England Nuclear, Mass., Estados Unidos da América.

3.2.5 – Causística

Para os estudos de restrição e sobrecarga de sódio alimentar, mantendo-se constante a ingestão de potássio, foram selecionados seis voluntários adultos normais^o cujos característicos biométricos acham-se na Tabela II, e que receberam uma dieta basal, constante e pobre em sódio preparada e padronizada pelo Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo conforme a Tabela III. À dieta basal de arroz foram acrescidos 100 mEq de potássio por dia na forma de uma solução contendo:

Acetato de potássio	100 g
Citrato de potássio	100 g
Bicarbonato de potássio	100 g
Glicerina	200 ml
Xarope de groselha q.s.p.	1 litro

preparada sob a denominação de Triplex pelo Serviço de Farmacotécnica da Farmácia Hospitalar do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sendo cada ml da solução correspondendo a 2,5 mEq de potássio. Antes do uso, para cada lote da solução preparada era determinada a quantidade de potássio e a dose ajustada em função de sua concentração.

A prova consistiu nas seguintes fases:

1ª fase:

Dieta de arroz + 100 mEq de K^+ .dia⁻¹ (1,30 mEq de Na^+ .dia⁻¹)

2ª fase:

Dieta de arroz + 120 mEq de Na^+ .dia⁻¹ + 100 mEq de K^+ .dia⁻¹

(^o) Tendo conhecimento prévio dos experimentos de acordo com a Declaração de Helsinki adotada pela 18ª Assembléia Médica Mundial realizada em Helsinque, Finlândia, em 1964.

Tabela I

Nomes Químicos de Hormônios Esteróides Citados neste Trabalho

Nome comum	Identificação completa de acordo com as Comissões da IUPAC* e da IUB** ⁽¹²⁾
Aldosterona	d(+) 18,11-hemiacetal do 11 β ,21-dihidroxi-20-oxopregn-4-en-18-al
Corticosterona	11 β ,21-dihidroxi-4-pregneno-3,20-diona
Cortisol	11 β ,17 α ,21-trihidroxi-4-pregneno-3,20-diona
Cortisona	17 α ,21-dihidroxi-4-pregneno-3,11,20-triona
Desoxicorticosterona	21-hidroxi-4-pregneno-3,20-diona (ou seja, o derivado 11-desoxi da corticosterona)
17 β -Estradiol	1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol
11-desoxicortisol	17 α ,21,dihidroxi-4-pregneno-3,20-diona
17-hidroxi-progesterona	17 α -hidroxi-4-pregneno-3,20-diona
Testosterona	17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona

* International Union of Pure and Applied Chemistry.

** International Union of Biochemistry.

Tabela II

Dados Biométricos dos Indivíduos Normais Estudados como Controle

Paciente (iniciais)	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)
S.F.N.	M	38	59,8	163,5
F.R.S.	M	21	49,1	155,0
J.P.S.	M	40	76,4	168,0
R.G.O.	M	21	56,1	167,0
Z.P.S.	M	32	59,6	166,5
W.P.S.	M	19	55,1	161,0

Tabela III

Dieta Base de Arroz* e Tabela do Sherman

Composição:

437,40 g
 27,52 g
 23,20 g
 Valor calórico total - 2068,48 cal
 Na - 32mg (1,39 mEq)
 Cl - 92mg (2,59 mEq)
 K - 1313mg (33,66 mEq)

Refeições	Alimento	Quantidade em g	Substituições permitidas
Desjejum e 14 horas	Chá	200	Café
	Açúcar	20	-
	Maça	100	Ameixa fresca, abacaxi, figo, uva, laranja, banana, pera
	Mel	20	-
Almoço e Jantar	Arroz	150	Substituição proibida
	Tomate	50	Substituição proibida
	Pera	100	Ameixa fresca, abacaxi, figo, uva, laranja, banana, maça
Jantar	Suco Padrão	100	Suco de frutas acima citadas
	Óleo	10	Algodão, amendoim, oliva, milho
Merenda Noturna	Chá	200	Café
	Açúcar	20	-

Nota: A quantidade de alimento não pode ultrapassar a determinada, com exceção do açúcar e mel.

A dieta é preparada sem sal.

* Preparada e padronizada pelo Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

3ª fase:

Dieta de arroz + 180 mEq de $\text{Na}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$ + 100 mEq de $\text{K}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$

Para obtermos dieta de 120 mEq de $\text{Na}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$ e dieta rica em sal (180 mEq de $\text{Na}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$), foram adicionadas à dieta base de arroz, cápsulas gelatinosas de cloreto de sódio. A quantidade de sódio em cada estudo foi controlada pela excreção urinária medida por espectrometria de chama (Flame Photometer 143, Instrumentation Laboratory Inc., Mass., Estados Unidos da América). Para cada uma das fases, fizeram-se as provas a seguir discriminadas:

3.2.5.1 – Postura

Foi coletada amostra de sangue às 8h, basal, quando ainda em decúbito, após o repouso do indivíduo a partir das 22h da noite anterior. Após 4 horas de deambulação, foi colhida uma segunda amostra de sangue, às 12h.

3.2.5.2 – Teste do ACTH

(Cortrosina da firma Laboratórios Organon do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Foi realizado com o tetracosactídeo sintético correspondente aos primeiros 24 amino-ácidos (β -1-24-ACTH) do hormônio corticotrófico humano. O hormônio foi administrado por via intramuscular (0,25 mg dissolvidos em 2 ml de solução cloreto de sódio 0,9%) colhendo amostras: Basal (T=0, (8h) | quando ainda em decúbito, após pelo menos 10 horas de repouso do indivíduo, antes da injeção de ACTH e 60 minutos após a sua administração | T=60, (9h) |.

3.2.5.3 – Teste de Infusão de Angiotensina II

(Hypertensin^R do Laboratório Ciba). Foi administrada como uma infusão de 5 ng/kilo/minuto (dose não hipertensiva) durante 60 minutos. A infusão foi preparada a partir de uma ampola de 500 μg de angiotensina II sintética em soro glicosado a 5%. Os tempos de colheita de amostras de sangue foram: Basal (T=0 (8h) |, imediatamente antes da infusão e a seguir 30 minutos (T=30m, (8h 30m) | após o seu início e ao término da infusão aos 60 minutos (T=60m, (9h) |. Durante o período da prova controlaram-se os valores da pressão arterial que não se modificaram significativamente.

3.2.6 – Amostras de Sangue

Logo após a colheita do sangue em microgota de heparina, o plasma era separado por centrifugação e conservado a -20°C pelo prazo máximo de seis meses. No momento do uso, descongelavam-se as amostras, centrifugando-as, se necessário, para separar fibrina, e em cada uma das amostras mediram-se o cortisol e a aldosterona por radioimunoensaio.

3.3 – Preparação e Conservação das Soluções para Imunoensaio

3.3.1 – Soluções-Tampão

3.3.1.1 – Para Aldosterona

Tampão borato-cloreto de sódio (pH = 8,0 \pm 0,1)

Ácido bórico PA (H_3BO_3 , PM = 61,84)	6,20 g
Cloreto de sódio PA (NaCl, PM = 58)	8,50 g
EDTA dissódico hidratado PA ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$), PM = 372,24)	1,88 g
Azida sódica PA (Na_3N , PM = 65)	0,50 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

3.3.1.2 – Para Cortisol

Tampão fosfato-cloreto de sódio (PH = 7,0 ± 0,1)

Fosfato monobásico de sódio, monohidratado PA ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, PM = 138)	5,40 g
Fosfato bibásico de sódio anidro PA ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, PM = 141,96)	8,60 g
Azida sódica PA (Na_3N , PM = 65)	0,50 g
Cloreto de sódio PA (NaCl, PM = 58)	8,50 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Estas soluções foram conservadas a 4°C demonstrando-se utilizáveis por um mês.

3.3.2 – Suspensões de Carvão Norit "A" Recoberto com Dextrana T-70

3.3.2.1 – Para Cortisol

Carvão Norit "A"	0,6250 g
Dextrana T-70	0,0625 g
Tampão fosfato-cloreto de sódio 0,1% de gama globulina	100 ml

3.3.2.2 – Para Aldosterona

Carvão Norit "A"	1,0 g
Dextrana T-70	0,1 g
Tampão borato-cloreto de sódio 0,1% de gelatina	100 ml

Antes do uso, as suspensões de carvão foram agitadas por um minuto e conservadas a 4°C. Foram usadas durante um mês.

3.3.3 – Medida de Radioatividade

Utilizou-se para a contagem de amostras de hormônios marcados com trício, o sistema de detecção para soluções cintiladoras, dotado de espectrômetro e troca automática de amostras (Beckman, modelo LS-150). As medições foram feitas em série, segundo ciclo automático preestabelecido.

Para a preparação da solução cintiladora, utilizou-se como soluto primário PPO, com pico máximo de fluorescência em 3 630 Å. Para que o comprimento de onda coincidissem com a faixa de maior sensibilidade da fotomultiplicadora (4 000 a 4 500 Å) foi adicionado um soluto secundário, dimetil-POPOP, com pico máximo de fluorescência em 4 180 Å.

Para emulsificar soluções de amostras polares, utilizou-se Triton X-100.

3.3.3.1 – Solução Cintiladora Estoque

PPO	80 g
Dimetil-POPOP	1 g
Tolueno PA q.s.p.	1000 ml

3.3.3.2 – Solução Cintiladora de Uso.

Diluir 50 ml de solução cintiladora estoque para um volume de 666 ml com tolueno PA e completar até um litro com Triton X-100. Dez ml desta solução incorporavam de 0,6 a 1,4 ml de fase aquosa acidificada com 0,1 ml de ácido clorídrico 2N.

3.3.4 – Esteróides Triados

As especificações de esteróides triados foram:

(1,2-³H)-cortisol

Peso molecular = 362,5

Atividade específica = 52 Ci/mmol

Atividade total = 0,25 mCi/0,25 ml de solução benzeno:etanol (9:1, v/v).

Massa fria total associada = 0,0017 mg/0,25 mCi.

(1,2-³H)-aldosterona

Peso molecular = 380,4

Atividade específica = 57 Ci/mmol

Atividade total = 0,25 mCi/0,25 ml de solução benzeno:etanol (9:1, v/v).

Massa fria total associada = 0,0016 mg/0,25 mCi.

3.3.4.1 – Solução-Estoque de Traçadores

Evaporando-se de 50 µCi (50 µl) do material original até seca em corrente de nitrogênio. Dissolver em 5 ml de etanol absoluto e conservar a solução a -20°C.

3.3.4.2 – Estabilidade e Purificação de Aldosterona e Cortisol Radioativos

Como a estabilidade dos esteróides β -emissores depende primordialmente da auto-radiólise provocada durante o armazenamento⁽¹⁰⁾, a pureza e a atividade específica dos hormônios triciados foram examinados antes do uso. O controle da pureza era feita a cada 3 meses, recromatografando os hormônios radioativos em minicolunas de gel de Sephadex LH-20.

Se a quantidade de impurezas fosse acima do desejado (5% da radioatividade total aplicada) no perfil da eluição cromatográfica, processava-se a purificação em camada delgada para (1,2-³H)-cortisol⁽²¹⁾ e em minicolunas de Sephadex LH-20 para (1,2-³H)-aldosterona^(23,25).

3.3.4.2.1 – Determinação da Pureza dos Hormônios Triciados Através de Coluna de Gel de Sephadex LH-20

Tendo em vista a estrutura similar das diversas moléculas de esteróides, utilizou-se para o teste de pureza a coluna de gel de Sephadex lipofílico LH-20, por sua rapidez e simplicidade^(23,29), sendo adotado como um dos requisitos prévios do ensaio.

Para a separação de 3-oxo- Δ^4 -esteróides, utilizou-se como eluente uma mistura de solventes (ciclohexano:benzeno:metanol) que proporcionou uma resolução adequada, obtendo uma recuperação acima de 95% da atividade total aplicada, no pico correspondente ao hormônio puro.

Técnica:

Uma grama para aldosterona, e 850 mg para cortisol de gel de Sephadex lipofílico LH-20 eram intumescidos em aproximadamente 5 ml da mistura de solventes, benzeno:metanol (85:15, v/v), durante 12 a 16 horas. A seguir, foram "empacotados" em minicolunas de vidro de 1,0 cm de diâmetro interno, sendo o gel retido por filtro de capilares de vidro recoberto com disco de papel Whatman GF/A. Colocou-se outro disco na superfície do gel para evitar sua dispersão.

A coluna de Sephadex era inicialmente lavada com 300 a 400 ml da mistura de benzeno:metanol (85:15, v/v) para eliminar as impurezas do gel e a seguir lavada com 100 ml do sistema de eluição, ciclohexano:benzeno:metanol na proporção de 70:40:10, v/v/v, fluxo de 1,0 ml.min⁻¹ para aldosterona e de 60:40:10, v/v/v, fluxo de 0,5 ml.min⁻¹ para o cortisol.

Aplicou-se uma atividade correspondente a 4 000 \pm 500 cpm para 0,2 ml do solvente empregado na eluição do esteróide marcado a ser testado, à coluna para a verificação de pureza. Quando o hormônio era puro, obtinha-se uma recuperação acima de 95% da radioatividade total aplicada, no pico correspondente ao hormônio puro.

Se impuro, processava-se a purificação. O cortisol triciado era purificado por cromatografia em camada delgada como já descrito anteriormente⁽²¹⁾.

Para a aldosterona, cerca de 5 μ Ci de esteróide triciado eram evaporados até secura em corrente de nitrogênio. Dissolviam-se em 0,2 ml do eluente e aplicava-se no topo da coluna de Sephadex. Selecionavam-se as frações correspondentes ao hormônio puro, através do perfil cromatográfico. As frações correspondentes ao pico eram misturadas e evaporadas até secura e retomadas em etanol absoluto, para o ensaio.

3.3.4.2.2 – Determinação da Atividade Específica e Preparo do Esteróide Radioativo para o Radioensaio

Determinaram-se as atividades específicas do (1,2-³H)-cortisol e de (1,2-³H)-aldosterona por radioimunoensaio, utilizando o princípio de autodeslocamento, isto é, calculando-se a quantidade do hormônio marcado necessária para causar uma queda da fração ligada ao anti-soro, na ausência do hormônio frio, numa curva de referência⁽⁷⁾.

Fazia-se uma curva habitual. Em seguida, adicionavam-se a quadruplicatas do tubo de massa igual a zero (sem hormônio da curva padrão, atividade correspondente a 1,5 a 2 vezes a empregada comumente e os demais reagentes. Ao fazer-se a adição de hormônio marcado estava-se acrescentando a massa fria nos tubos.

A diferença entre o ponto 0 da curva-padrão convencional e o ponto 0 do ensaio enriquecido em atividade, lida na abscissa da curva-padrão, fornecerá a massa do hormônio da amostra enriquecida, o que permite o cálculo da atividade específica.

Após a verificação da pureza e da atividade específica preparou-se a solução para radioimunoensaio, transferindo-se cerca de 0,1 μ Ci a um frasco de contagem. Evaporou-se até secura, em corrente de nitrogênio. Adicionaram-se 10 ml de tampão e agitou-se até dissolução completa em "Vortex", deixando por uma hora à temperatura ambiente para atingir o equilíbrio.

Para a determinação de estimativas de perdas durante o processamento de plasma empregando-se 1000 ± 200 cpm para 10 μ l de tampão para cortisol e 1000 ± 200 cpm para 50 μ l de tampão para aldosterona e no ensaio propriamente dito, utilizou-se uma atividade correspondente a cerca de 50 pg de massa do esteróide triciado para 100 μ l de tampão correspondente a cada um dos hormônios.

3.3.5 – Anti-Soros

Dado o tempo prolongado que exige um programa de imunização para a obtenção de anti-soros adequados, utilizou-se para o desenvolvimento deste trabalho, um anti-soro contra cortisol produzido em coelhos com a injeção de um conjugado de cortisol-3-oxima-soro albumina bovina⁽²⁸⁾. O coeficiente de afinidade média foi de $0,9 \times 10^{-5}$ Mole⁻¹.litro a 4°C e especificidade medida em função da reação cruzada a 50% de deslocamento do (1,2-³H)-cortisol foi de:

Cortisol	100 %
Cortisona	26 %
11-desoxicortisol	14 %
Corticosterona	3 %
Desoxicorticosterona	0,4%
17-OH-Progesterona	< 0,1%
Progesterona	< 0,1%
Aldosterona	< 0,1%
Testosterona	< 0,1%
17- β -Estradiol	< 0,1%

O anti-soro contra aldosterona foi obtido da firma "Diagnostic Products Corporation", Califórnia, Estados Unidos da América e as porcentagens da reatividade cruzada medida a 50% de deslocamento de (1,2-³H)-aldosterona foram:

Aldosterona	100 %
Cortisona	10^{-2} %
Corticosterona	10^{-4} %
Desoxicorticosterona	10^{-4} %
Cortisol	10^{-5} %
Testosterona	10^{-5} %
Progesterona	10^{-5} %
17 β -Estradiol	10^{-5} %

A título dos anti-soros foi padronizado de modo a dar 50% de imunorreatividade com cerca de 50 pg de massa do hormônio triciado, quando o volume total de incubação utilizado era 0,9 ml para cortisol^(3,16) e 1,2 ml para aldosterona^(17,19,25,26,27).

Os anti-soros diluídos foram conservados a 4°C, demonstrando-se utilizáveis por um mês, como verificado previamente.

3.3.6 – Hormônios de Referência

A pureza dos hormônios de referência deve ser levada em consideração, uma vez que o resultado da reação depende somente da reatividade imunológica dos reagentes puros, de acordo com a lei da ação das massas^(4,13).

A partir das soluções-estoque de 1 mg de cortisol para 1 ml de etanol e 1 mg de aldosterona para 1 ml de etanol, prepararam-se soluções de 100 ng de hormônio para 1 ml de tampão. A partir destas soluções fizeram-se as diluições em série que foram utilizadas para as curvas dose-resposta, nos radioimunoensaios, de conformidade com a Tabela IV.

Tabela IV

Preparo das Soluções-Padrão para o Radioimunoensaio de Cortisol e Aldosterona

Solução	Alíquota (X ml)	Tampão (Y ml)	Concentração Final (X + Y) pg.ml ⁻¹
A	0,1 da solução 100 ng.ml ⁻¹	0,9	10 000
B	0,5 da solução A	0,5	5 000
C	0,5 da solução B	0,5	2 500
D	0,4 da solução C	0,6	1 000
E	0,5 da solução D	0,5	500
F	0,5 da solução E	0,5	250
G	0,4 da solução F	0,6	100
H	0,5 da solução G	0,5	50

3.4 – Técnica e Sequência Operacional da Dosagem de Cortisol e Aldosterona Plasmáticos para Radioimunoensaio

Todas as análises foram efetuadas em duplicata, tomando-se como resultado a média aritmética das duas dosagens e aceitando-se as somente que não difiríssem em mais de 10%.

3.4.1 – Preparação de Amostras de Plasma

Logo após a colheita do sangue em microgota de heparina, o plasma era separado por centrifugação e conservado a -20°C . No momento do uso, descongelavam-se as amostras, centrifugando-as, se necessário, para separar fibrina.

Com as amostras de plasma eram sempre quantificadas três misturas de plasma de indivíduos normais ("carrying-over") com níveis baixo, médio e alto de conteúdo hormonal, e quatro testemunhas ("brancos") de água bidestilada, sendo que duas serviram para avaliação da sensibilidade do método⁽²⁾ e as demais para controle de pureza dos reagentes⁽¹⁾.

3.4.1.1 – Cortisol

O método foi adaptado para $100\ \mu\text{l}$ de plasma cujos esteróides eram extraídos com $400\ \mu\text{l}$ de etanol absoluto a 4°C em agitação em "Vortex" por 60 segundos. Para o ensaio, utilizaram-se $5\ \mu\text{l}$ de extrato etanólico, pipetados diretamente em $500\ \mu\text{l}$ de tampão.

Para a determinação de perdas durante o processo de plasma, utilizou-se um padrão interno de $(1,2\text{-}^3\text{H})$ -cortisol, em quantidades suficientemente reduzida, para não interferir na fase de imunocompetição.

A Figura 1 representa, esquematicamente, a preparação de plasma para a quantificação de cortisol plasmático.

3.4.1.2 – Aldosterona

O método foi adaptado para 2 ml de plasma cujos esteróides eram extraídos exaustivamente com 3 ml (2 ml + 1 ml) de etanol absoluto a 4°C . A extração era feita por agitação em "Vortex" por 60 segundos. A seguir, precipitavam-se as proteínas séricas do extrato etanólico com 0,5 ml de ácido tricloroacético a 10% e processava-se a extração seletiva com cloreto de metileno a 4°C . A fase aquosa (camada superior) era desprezada por aspiração em vácuo. Alcalinizava-se a seguir o extrato de cloreto de metileno com soda 0,1N para eliminar traços de impurezas carregadas durante a extração e lavava-se a seguir com tampão.

O extrato lavado era evaporado em corrente de nitrogênio em banho de água a 40°C . Dissolve-se o extrato seco com 0,1 ml de tampão. Utilizavam-se $200\ \mu\text{l}$ para o ensaio e $200\ \mu\text{l}$ para a estimativa de perdas durante o processamento de plasma.

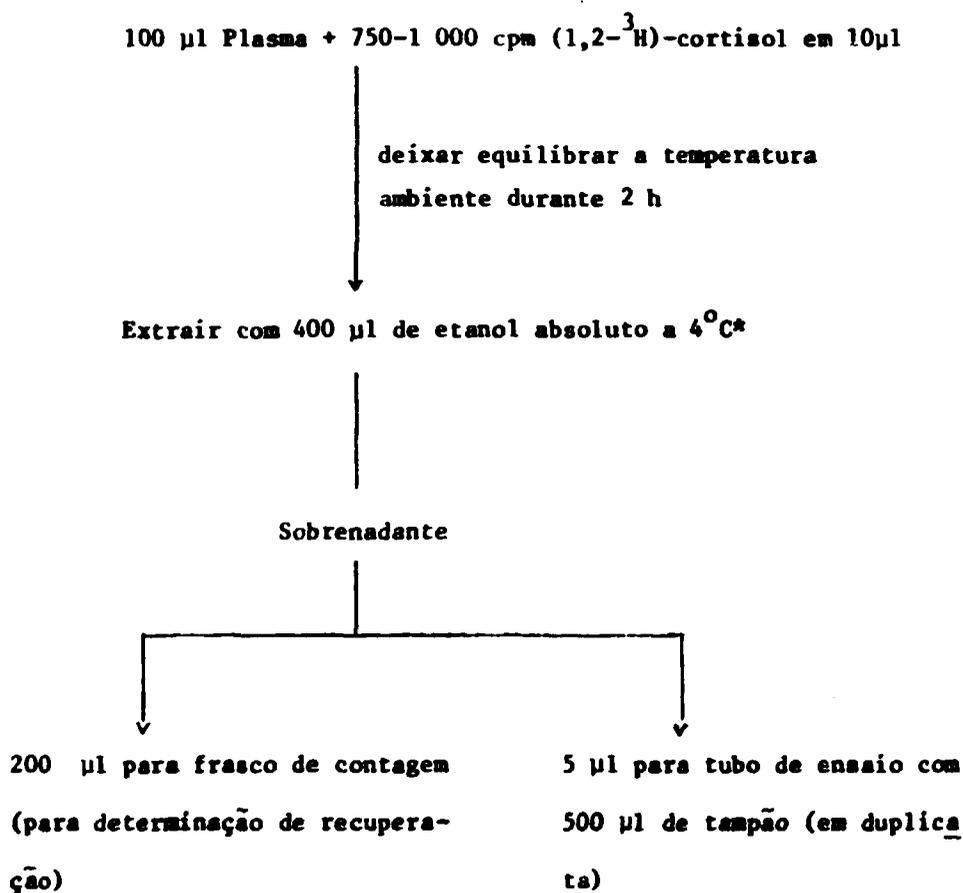
A Figura 2 representa, esquematicamente, a seqüência da preparação de plasma para a mensuração de aldosterona.

3.4.2 – Radioensaio

O ensaio propriamente dito foi realizado conforme Tabela V para o cortisol e Tabela VI para aldosterona.

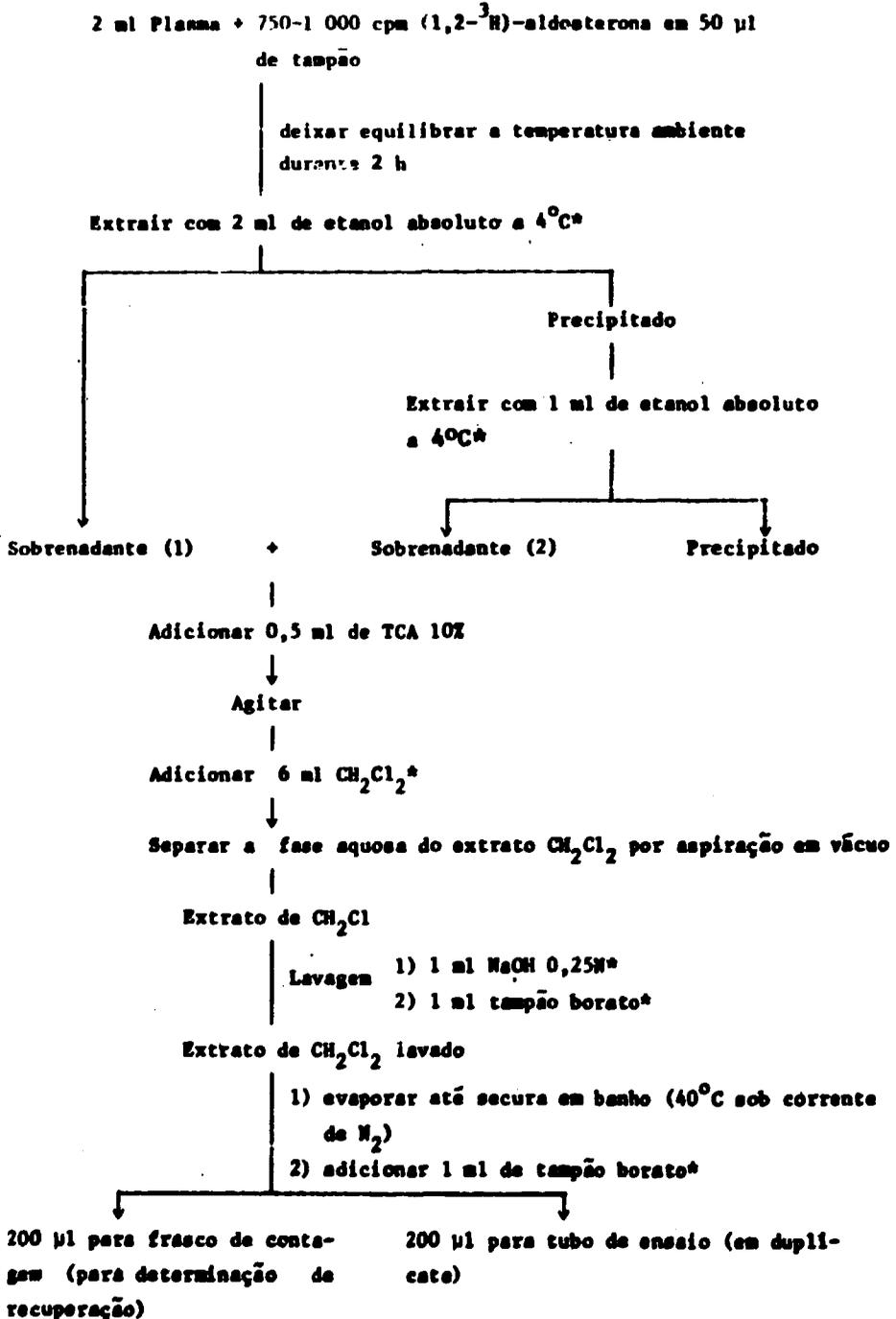
3.4.3 – Separação do Hormônio Livre do Ligado ao Anticorpo

Terminado o período de incubação, para o equilíbrio de reação antígeno-anticorpo, adicionava-se a cada tubo uma suspensão de carvão com o pipetador semi-automático. Durante a pipetagem, a homogenei-



* Agitar em "Vortex" por 60 segundos e centrifugar a 1 000g durante 3 minutos.

Figura 1 - Representação esquemática da preparação de plasma para radioimunoensaio de cortisol



* Agitar em "Vortex" por 60 segundos e centrifugar a 1 000 g durante 3 minutos.

Figura 2 - Representação esquemática da preparação de plasma para radioimunoensayo de aldosterona

Tabela V

Protocolo para o Radioimunoensaio de Cortisol

Tubo	Tampão (ml)	Padrão ou extrato da amostra [*] (μ)	Traçador [*] (ml)	Anti-soro ^{**} (ml)	Carvão ^{***} (ml)
Radioatividade total	0,8	—	0,1	—	—
Controle do traçador	0,6	—	0,1	—	0,2
"Zero" da curva	0,5	—	0,1	0,1	0,2
Padrões de "A" a "G" ^{****}	0,4	100	0,1	0,1	0,2
Extratos plasmáticos	0,5	5	0,1	0,1	0,2
Controle dos reagentes ^{*****}	0,6	5	0,1	—	0,2
Controle da sensibilidade (“branco”) ^{*****}	0,5	5	0,1	0,1	0,2

* Agitar em "Vortex" vigorosamente.

** Incubar por 16 a 20 horas a 4°C.

*** "Incubar" por 10 min em banho de gelo, centrifugar a 2 000 p durante 20 min e separar o sobrenadante.

**** Vide Tabela IV.

***** Extrato de água bidestilada.

Tabela VI

Protocolo para o Radioimunoensaio de Aldosterona

Tubo	Tampão (ml)	Padrão ou extrato da amostra [*] (μ)	Traçador [°] (ml)	Anti-soro ^{••} (ml)	Carvão ^{•••} (ml)
Radioatividade total	1,10	—	0,1	—	—
Controle do traçador	0,60	—	0,1	—	0,5
"Zero" da curva	0,50	—	0,1	0,1	0,5
Padrões de "B" e "H" ^{•••••}	0,40	100	0,1	0,1	0,5
Extratos plasmáticos	0,30	200	0,1	0,1	0,5
Controle dos reagentes ^{•••••}	0,40	200	0,1	—	0,5
Controle da sensibilidade ("branco")	0,30	200	0,1	0,1	0,5

- ° Agitar em "Vortex" vigorosamente
- Incubar por 30 min a temperatura ambiente, e a seguir por 25 min em banho de gelo.
- "Incubar" por 10 min em banho de gelo, centrifugar a 2 000 g durante 20 min e separar o sobrenadante.
- Vide Tabela IV.
- Extrato de água bidestilada.

dade da suspensão era mantida por agitação eletromagnética. Após a agitação, cada tubo era "incubado", por 10 min, em banho de gelo (0 - 4°C).

Após esse tempo, os tubos eram centrifugados a 2 000 g, durante 20 min a 4°C: o sobrenadante era transferido para um frasco de cintilação e o precipitado, contendo carvão ligado ao hormônio livre, era desprezado. Adicionavam-se 10 ml de solução cintiladora ao frasco de cintilação e após a homogeneização do conteúdo, determinava-se sua atividade no detector de cintilação líquido. O tempo de medição era prolongado o suficiente para o acúmulo de 10 000 contagens para garantir o erro percentual devido à aleatoriedade da desintegração radioativa, inferior a 2%.

3.4.4 - Cálculo e Correção de Resultados

A atividade do sobrenadante (padrões e amostras de plasma) medida no detector de cintilação líquido representa a fração do hormônio radiomarcado, complexada ao anticorpo, que não sofreu deslocamento pelo esteroide introduzido no sistema.

Há vários modelos teóricos estabelecidos para expressar a curva dose-resposta⁽²²⁾. Para a facilidade de manuseio e controle de qualidade em condições de rotina, adotou-se a projeção da curva de calibração em escala semilogarítmica.

A concentração hormonal no tubo de reação (pg/tubo) era determinada pela interpolação direta da razão percentual de atividade correspondente a cada tubo da reação em relação à atividade do tubo de massa zero (%B/B₀) observada na alíquota da fase líquida, em comparação às obtidas a partir das soluções-padrão.

A leitura direta da curva permitiu um intervalo de medida 10 a 500 pg de cortisol/tubo e 5 a 250 pg de aldosterona/tubo. Corrigindo o resultado pelas perdas durante o processamento do plasma (recuperação), pela alíquota utilizada do extrato e pelo volume inicial do plasma empregado na quantificação do esteroide, pode-se obter uma concentração final de até 80 µg de cortisol X dl⁻¹ de plasma e 650 pg de aldosterona.ml⁻¹ de plasma (65 ng de aldosterona.dl⁻¹).

3.5 - Avaliação das Diferentes Fases dos Métodos de Dosagem de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos por Radioimunoensaio

Para a avaliação das diferentes fases técnicas instituíram-se controles de qualidade que estimam a pureza do traçador e dos reagentes, a sensibilidade do método, a precisão interensaio das curvas-padrão e a reprodutibilidade do ensaio (entre ensaios).

3.5.1 - Pureza do Traçador e dos Reagentes

Foi estimada a partir da proporção de ligações não específicas causadas por impurezas do traçador e dos próprios solventes ou por eles extraídas no decorrer do processamento do plasma e, ainda, mercê dos valores de "brancos" dos extratos plasmáticos.

As ligações não específicas por impurezas traçadores e dos reagentes foram apreciadas, separadamente, pela alteração da adsorção do traçador ao carvão. Se a atividade remanescente for superior a 10% de radioatividade total, traçador ou reagentes devem ser purificados ou substituídos. O limite de aceitação para estes controles foi fixado arbitrariamente em 5%.

Quanto aos "brancos" dos extratos plasmáticos, foram eles simulados por "brancos" de água bidestilada e avaliados pelo deslocamento de formação de imunocomplexo, e foram menores do que o primeiro ponto da curva resposta.

3.5.2 – Sensibilidade do Método

Foi estimada a partir do relacionamento da dispersão dos resultados de replicatas (2σ) do “branco” de água bidestilada com o recuperável porcentual da estimativa de perdas durante o processamento da água bidestilada (R) e pela fração do volume do extrato utilizado para a determinação do deslocamento da formação do imunocomplexo (F)⁽¹¹⁾.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{2\sigma}{R \cdot F} \cdot 100$$

Obviamente, a sensibilidade será tanto menor quanto menor for o desvio-padrão da média das replicatas e quanto maior for o produto R.F., que dependerá da eficiência da extração e da magnitude da fração do extrato utilizado no ensaio.

3.5.3 – Precisão Interensaio das Curvas Dose-Resposta

Foi avaliada a partir da dispersão dos valores correspondentes a cada um dos pontos de 10 curvas de cortisol e 4 de aldosterona, utilizando a mesma partida de anti-soros e reagentes.

3.5.4 – Reprodutibilidade Interensaio dos Métodos

Foi controlada por meio da análise de dispersão de três misturas de plasmas de indivíduos normais com concentrações hormonais diferentes (baixa, média e alta), aceitando coeficientes de variação menor ou igual a 10%⁽²⁰⁾.

3.6 – Avaliação dos Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos para as Diversas Situações Experimentais Programadas para o Estudo: Postura, ACTH, Angiotensina II e Dietas Diferentes

Os níveis de cortisol e aldosterona plasmáticos foram avaliados a partir da análise de dispersão dos dados referentes a prova de estímulos posturais e na da administração de cortrosina em cada uma das dietas programadas com o objetivo de ter uma idéia da distribuição dos dados obtidos.

Inicialmente, foi feito um teste da igualdade das variâncias (teste de Bartlett) por meio da distribuição de X^2 . Como as variâncias resultaram ser diferentes, fez-se uma transformação nos dados ($\ln y$) para estabilizá-las.

A seguir, foram examinadas as seguintes hipóteses por meio de uma análise de variância (distribuição F):

3.6.1 – Aldosterona

Foi testada a igualdade em termos de aldosterona nos valores obtidos entre as provas de estímulos posturais e de cortrosina e entre as três dietas nas situações experimentais programadas.

Hipótese 1: Igualdade em termos de aldosterona nas situações experimentais de estímulos posturais (A_1) e da administração de ACTH (A_{11}).

$$H_0 : A_1 = A_{11} = 0$$

Hipótese 2: Igualdade em termos de aldosterona entre as três dietas:

(B_1 , B_2 e B_3) para cada condição experimental ou seja postura (I) e cortrosina (II):

$H_0: B_1(I) = B_2(I) = B_3(I) = 0$, isto é, igualdade em termos de aldosterona e entre as três dietas nas provas de postura e

$H_0: B_1(II) = B_2(II) = B_3(II) = 0$, isto é, igualdade em termos de aldosterona entre as três dietas nos testes de administração de ACTH.

3.6.2 – Cortisol

3.6.2.1 – foi testada igualdade em termos de cortisol entre as três dietas programadas.

$H_0: A_1 = A_2 = A_3 = 0$, sendo:

A_1 : Dieta de arroz + 100 mEq K^+ .dia⁻¹

A_2 : Dieta de arroz + 120 mEq Na^+ .dia⁻¹ + 100 mEq K^+ .dia⁻¹.

A_3 : Dieta de arroz + 180 mEq Na^+ .dia⁻¹ + 100 mEq K^+ .dia⁻¹.

3.6.2.2 – foi testada igualdade em termos de cortisol nos valores basais entre postura e cortrosina e entre três dietas nas situações experimentais programadas.

Hipótese 1: igualdade em termos de cortisol nas situações experimentais de estímulos posturais (A_1) e da administração de ACTH (A_{11}).

$H_0: A_1 = A_{11} = 0$

Hipótese 2: igualdade entre termos de cortisol entre as três dietas

(B_1 , B_2 e B_3) para condição experimental ou seja postura (I) e cortrosina (III):

$H_0: B_1(I) = B_2(I) = 0$, isto é, igualdade em termos de cortisol entre as três dietas nas provas de postura e

$H_0: B_1(III) = B_2(III) = B_3(III) = 0$, isto é, igualdade em termos de cortisol entre as três dietas nos testes de administração de ACTH.

Nos casos em que houve a rejeição da hipótese 2, fez-se uma partição de soma de quadrados (SQ) em duas somas de quadrados da forma SQB_1 para verificar se a diferença está na postura ou na cortrosina. Nos casos em que a hipótese de igualdade em termos de cortisol entre as três dietas foi rejeitada, foram testados contrastes para localizar a diferença, a partir da construção de um intervalo de confiança para o contraste de interesse, baseado na distribuição "t" de Student.

Quanto ao teste de infusão de angiotensina II não foi feita uma avaliação estatística dos resultados obtidos mas somente uma apreciação a partir dos níveis médios de concentrações hormonais e correspondentes desvios-padrão e desvios da média em virtude de haverem sido estudados apenas três pacientes (S.F.N., W.P.S. e J.P.S.) nas dietas de arroz acrescidos de 120 e 180 mEq de Na^+ .dia⁻¹ com 100 mEq de K^+ .dia⁻¹. Na condição de restrição de Na^+ , os dados obtidos de dois pacientes (S.F.N. e W.P.S.) foram submetidos apenas aos estudos de incrementos absoluto e relativo aos basais para aldosterona e decrementos absoluto e relativo aos basais para o cortisol.

4 – RESULTADOS

4.1 – Controle de Qualidade dos Hormônios Marcados com Trício Utilizados Neste Estudo

4.1.1 – Medida da Atividade Específica

As atividades específicas do (1,2-³H)-cortisol e (1,2-³H)-aldosterona foram medidas pela técnica de auto-deslocamento descrita.

Sabendo-se que o título do anti-soro foi fixado para um deslocamento de 50% e de que se adicionaram 50 pg de hormônio marcado, poder-se-á determinar a atividade específica do material empregado.

4.1.2 – Purificação de Esteróides Marcados

4.1.2.1 – Cromatografia em Minicoluna de Sephadex Lipofílico LH-20.

As Figuras 3 e 4 mostram a separação das frações de aldosterona e cortisol não danificadas, dos demais esteróides com polaridades diferentes.

4.1.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada com Sílica Gel F₂₅₄

Para a purificação do cortisol utilizou-se, preferencialmente, a cromatografia em camada delgada de sílica gel F₂₅₄⁽²¹⁾, em virtude da cromatografia de Sephadex apresentar adsorção mais firme devido a presença de duas hidroxilas na molécula, o que determina espalhamento maior como se pode observar nas Figuras 3 e 4.

4.2 – Curva Dose-Resposta para o Radioimunoensaio de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos

A Figura 5 reproduz a curva-padrão média de 10 ensaios realizados em seis meses para doseamento de cortisol. Para cada ponto da curva está registrado o valor do desvio-padrão. Para conveniência gráfica utilizou-se uma escala linear para os valores percentuais de B/B_0 e logarítmica para as massas de cortisol. A curva revelou-se utilizável para fins práticos, entre massas de 10 a 500 pg.

A Figura 6 representa a curva-padrão média de 4 ensaios para a aldosterona em sistema ortogonal análogo ao da Figura 5. A dosagem de aldosterona revelou-se útil entre os limites de 5 a 250 pg.

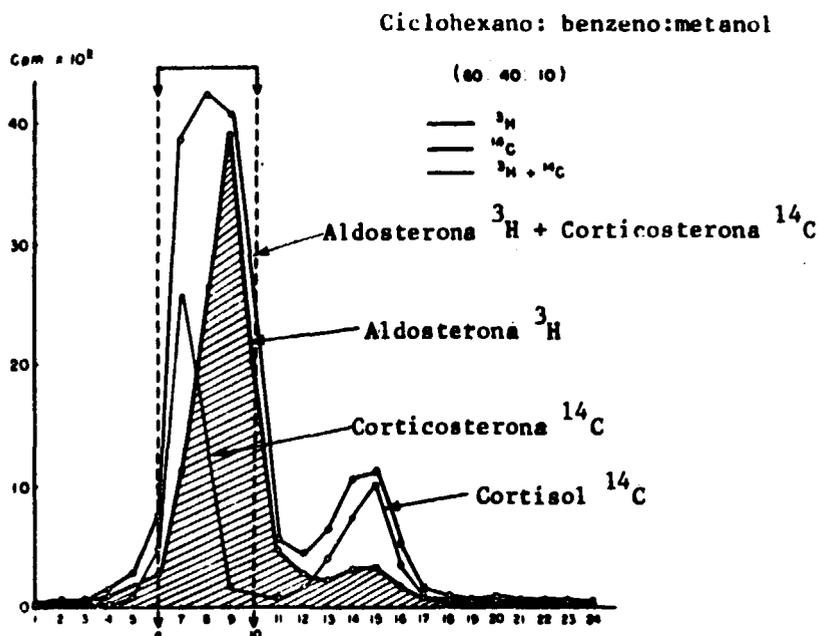


Figura 3 - Padrão de eluição de (1,2- ^3H)-aldosterona, C-14-corticosterona e C-14-cortisol em minicolumna cromatográfica de Sephadex LH-20.

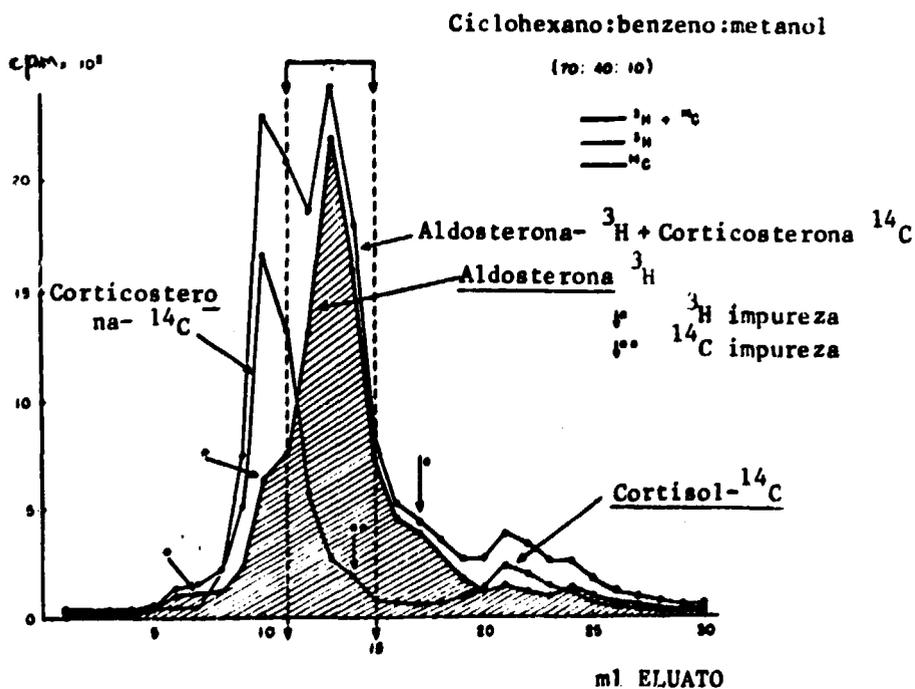


Figura 4 - Padrão de eluição de (1,2- ^3H)-aldosterona, C-14-corticosterona e C-14-cortisol em minicolumna cromatográfica de Sephadex LH-20.

$$I = (\bar{X} \pm \sigma, n = 10)$$

B = cpm fixadas ao anti-soro na presença de cortisol não marcado.

B₀ = cpm fixadas ao anti-soro na ausência do cortisol não marcado.

Título final do anti-soro = 1: 14 000

Quantidade do traçador = 4 000cpm/0,1 ml
4 000cpm=50 pg

Tempo de incubação = 16-20 horas a 4°C.

Coefficiente de afinidade média = $0,9 \times 10^{-9}$
litro.mol⁻¹ a 4°C.

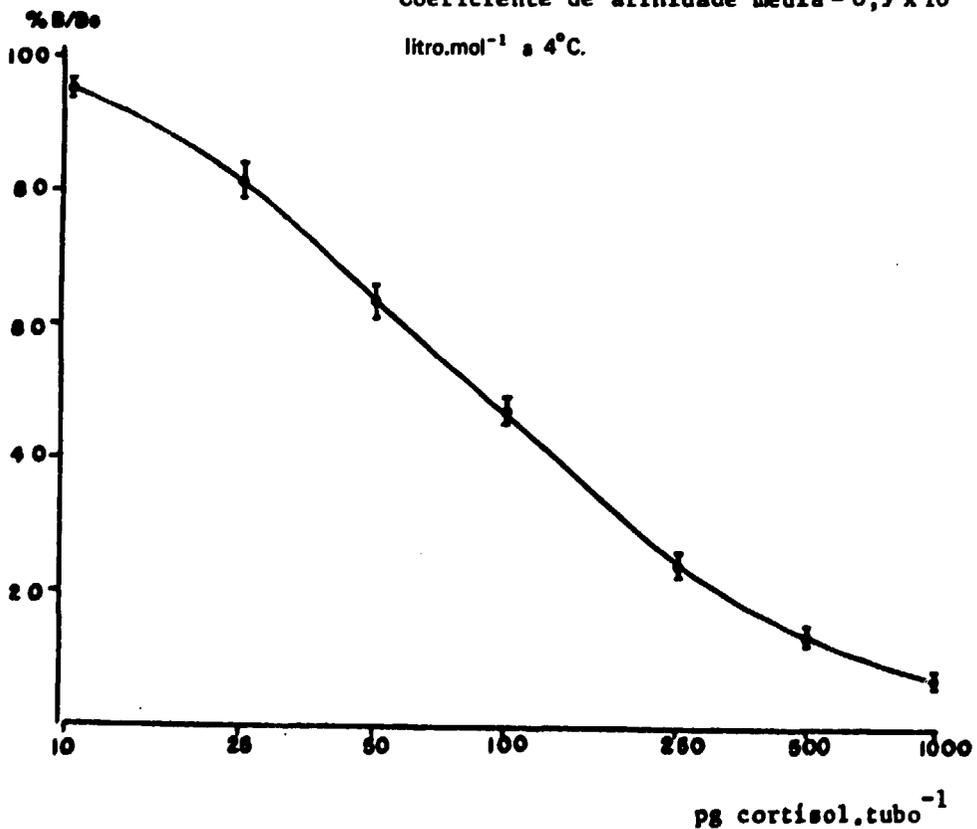


Figura 5 - Curva-padrão para o radioimunoensaio de cortisol plasmático. Projeção semilogarítmica das relações entre contagens por minuto (cpm) do cortisol marcado fixado ao anti-soro na presença e ausência do hormônio não marcado.

$$I = (\bar{X} \pm \sigma, n = 4)$$

B = cpm fixadas ao anti-soro na presença de aldosterona não marcada.

B₀ = cpm fixadas ao anti-soro na ausência de aldosterona não marcada.

Título final do anti-soro = 1:12 000.

Quantidade do traçador = 4 000 cpm/0,1ml

4 000 cpm = 50 pg

Tempo de incubação = 30min à temperatura ambiente.

↓
25min a 4°C

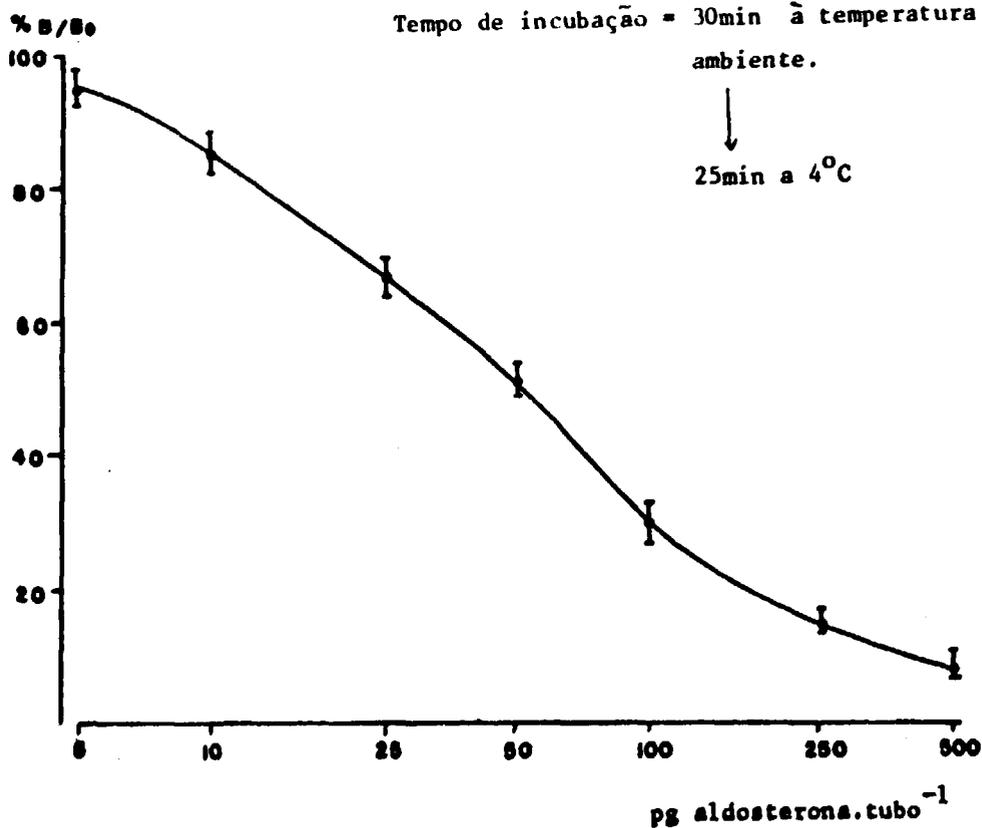


Figura 6 - Curva-padrão para o radioimunoensaio de aldosterona plasmática. Projeção semilogarítmica das relações entre contagens por minuto (cpm) de aldosterona marcada fixada ao anti-soro na presença e ausência do hormônio não-marcado.

4.3 – Sensibilidade do Método de Aldosterona e Cortisol

A sensibilidade do método avaliada através da equação:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{2\sigma}{R \cdot F} \times 100$$

sendo

σ = desvio-padrão das replicas de "branco" de água bidestilada.

R = porcentagem da atividade recuperada em relação à total introduzida na fase de processamento de amostra de plasma.

F = fração do volume do extrato utilizado no ensaio foi de $(5,2 \pm 1,3)$ pg para dez ensaios de cortisol e $(7,3 \pm 3,1)$ pg para quatro de aldosterona.

4.4 – Reprodutibilidade Interensaio de Cortisol e Aldosterona Plasmáticos

Nas Tabelas VII e VIII estão reunidos os resultados médios, os correspondentes desvios-padrão e os intervalos de confiança para $p=0,05$ das determinações de cortisol e aldosterona realizadas no intervalo de seis meses em três misturas de plasmas de indivíduos normais com três níveis médios de concentração hormonal.

4.5 – Determinações de Cortisol Plasmáticos por Radioimunoensaio e por Técnica de Competição à Proteína Transportadora (Transcortina)

Na Tabela IX encontram-se os resultados das dosagens de cortisol plasmático em dois indivíduos normais (R.G.O. e F.R.S.) determinados por radioimunoensaio e por técnica de competição à proteína transportadora (plasma obtido de indivíduos com insuficiência supra-renal primária ou secundária). A diferença entre as médias respectivas $(12,52 \pm 5,82 \mu\text{g.dl}^{-1}$ e $8,75 \pm 3,83 \mu\text{g.dl}^{-1})$ resultou em uma superestimação de 30,11% nos dados obtidos por competição, significativa ao nível de $p < 0,01$.

4.6 – Estudos Fisiológicos

4.6.1 – Observações Paradas nos Indivíduos Normais: Efeito da Postura

4.6.1.1 – Dieta de Arroz + $100 \text{ mEq K}^{\circ}.\text{dia}^{-1}$ (Tabela X)

A concentração de aldosterona plasmática em nível basal, na restrição alimentar de sal, partiu de um valor médio $44,64 \text{ ng.dl}^{-1}$ e se elevou, após deambulação para $85,65 \text{ ng.dl}^{-1}$ ou seja incrementos absoluto e percentual médios de $41,01 \text{ ng.dl}^{-1}$ e 98,40, respectivamente.

O nível basal de cortisol plasmático, na mesma condição experimental, sofreu um decréscimo médio de $9,76 \mu\text{g.dl}^{-1}$ para $7,34 \mu\text{g.dl}^{-1}$ correspondente a uma queda de $2,42 \mu\text{g.dl}^{-1}$ e relativa ao basal de 25,32%.

4.6.1.2 – Dieta de Arroz + $120 \text{ mEq Na}^{\circ}.\text{dia}^{-1}$ + $100 \text{ mEq K}^{\circ}.\text{dia}^{-1}$ (Tabela XI)

O valor basal médio de aldosterona plasmática, com dieta de arroz acrescida de 120 mEq

Tabela VII

Análise da Reprodutibilidade Interensaio de Determinações de Cortisol Efetuadas em Três Misturas de Plasma ("Pools") com Concentrações Hormonais Baixa, Média, Alta, Respetivamente em $\mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$

Ensaio N°	"Pool" baixo	"Pool" médio	"Pool" alto
1	4,10	7,47	14,41
2	3,20	6,79	15,54
3	3,96	6,35	14,32
4	3,38	6,93	15,70
5	3,68	6,18	15,71
6	3,80	6,80	13,60
7	3,95	6,08	14,15
\bar{X}	3,72	6,66	14,78
s	0,33	0,49	0,86
$s_{\bar{X}}$	0,12	0,18	0,32
% CV	8,84	7,33	5,81
$\pm t_{0,05} \cdot s$	$\pm 0,81$	$\pm 1,20$	$\pm 2,11$
$\pm t_{0,05} \cdot s_{\bar{X}}$	$\pm 0,29$	$\pm 0,44$	$\pm 0,78$

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média; CV = coeficiente de variação; $\bar{X} \pm t_{0,05} \cdot s$ = intervalo de confiança para valores individuais; $\bar{X} \pm t_{0,05} \cdot s_{\bar{X}}$ = intervalo de confiança da média de cada amostra.

Tabela VIII

Análise da Reprodutibilidade Interensaio de Determinações de Aldosterona Efetuada em Três Misturas de Plasma ("Pools") com Concentrações Hormonais Baixa, Média, Alta, Respetivamente em $\text{ng}\cdot\text{dl}^{-1}$

Ensaio N°	"Pool" baixo	"Pool" médio	"Pool" alto
1	7,53	15,16	26,58
2	7,54	16,78	24,25
3	8,23	13,62	25,26
4	8,55	13,02	28,81
5	7,90	14,30	27,36
\bar{X}	7,95	14,58	26,45
s	0,44	1,46	1,78
$s_{\bar{X}}$	0,20	0,65	0,79
% CV	5,57	9,99	6,73
$\pm t_{0,05} \cdot s$	$\pm 1,22$	$\pm 4,06$	$\pm 4,95$
$\pm t_{0,05} \cdot s_{\bar{X}}$	$\pm 0,66$	$\pm 1,81$	$\pm 2,20$

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média; CV = coeficiente de variação; $\bar{X} \pm t_{0,05} \cdot s$ = intervalo de confiança para valores individuais; $\bar{X} \pm t_{0,05} \cdot s_{\bar{X}}$ = intervalo de confiança da média de cada amostra.

Tabela IX

Determinação de Cortisol Plasmático por Radioimunoensaio e por Técnica de Competição à Proteína Transportadora (CBG), nas Diversas Situações Experimentais Programadas para os Estudos: Postura, ACTH e Dietas Diferentes, nos Pacientes R. G. O. e F. R. S.

Dieta 1 – Dieta de Arroz + 100 mEq K^+ . dia⁻¹;

Dieta 2 – Dieta de Arroz + 120 mEq Na^+ . dia⁻¹ + 100 meq K^+ . dia⁻¹;

Dieta 3 – Dieta de Arroz + 180 mEq Na^+ . dia⁻¹ + 100 meq K^+ . dia⁻¹.

Paciente	Postura	Dieta 1		Dieta 2		Dieta 3	
		CPB*	RIE**	CEP*	RIE**	CPB*	RIE**
R. G. O.	Deitado	9,89	9,52	9,82	9,90	7,34	6,69
	De pé	10,30	6,32	8,67	7,32	5,99	6,17
F. R. S.	Deitado	12,55	8,83	8,75	8,49	9,55	4,95
	De pé	13,55	6,86	9,75	6,19	9,72	3,28
Cortrosina							
R. G. O.	8h (basal)	8,08	7,32	8,18	5,44	6,69	6,62
	9h	18,79	17,89	14,82	11,98	15,03	15,44
F. R. S.	8h (basal)	12,38	9,02	14,23	5,70	11,48	6,66
	9h	25,50	13,28	24,41	13,18	24,93	13,10

* CPB = técnica de competição à proteína transportadora (CBG) (21). $X \pm s = 12,52 \pm 5,62$, N = 24

** radioimunoensaio. $X \pm s = 8,75 \pm 3,63$; N = 24.

$t_{0,05,23}^p = 5,88$, diferença de média significativa para $p < 0,01$.

Tabela X

Efeito da Postura sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais (N = 6), Mantidos em Dieta de Arroz + 100 mEq K⁺. dia⁻¹

	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Postura		Incremento	Incremento relativo	Postura		Decremento	Decremento relativo
	Deitado	De pé	Δ	Δ%	Deitado	De pé	∇	∇%
S. F. N.	48,62	113,56	64,94	133,57	9,41	5,41	4,00	42,50
F. R. S.	55,25	89,55	34,30	62,08	8,38	6,86	1,97	22,31
J. P. S.	21,26	42,59	21,33	100,33	11,62	10,18	1,44	12,39
R. G. O.	33,13	75,59	42,46	128,16	9,52	6,32	3,20	33,61
Z. P. S.	69,03	106,85	37,82	54,79	9,05	6,98	2,07	22,87
W. P. S.	40,56	85,78	45,22	111,49	10,15	8,30	1,85	18,22
\bar{X}	44,64	85,65	41,01	98,40	9,76	7,34	2,42	25,32
s	16,85	25,29	14,39	33,22	1,02	1,68	0,97	10,92
$s_{\bar{X}}$	6,88	10,32	5,87	13,56	0,41	0,69	0,40	4,46

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

Tabela XI

Efeito da Postura sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais
(N = 6), Mantidos em Dieta de Arroz + 120 mEq Na⁺ . dia⁻¹ + 100 mEq K⁺ . dia⁻¹

Paciente	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Postura		Incremento	Incremento relativo	Postura		Decremento	Decremento relativo
	Deitado	De pé	Δ	Δ%	Deitado	De pé	∇	∇%
S. F. N.	7,00	20,37	13,37	191,00	8,26	4,72	3,54	42,85
F. R. S.	7,06	13,19	6,03	85,41	8,49	6,16	2,33	27,44
J. P. S.	8,66	16,28	7,62	87,99	13,40	6,39	7,01	52,31
R. G. O.	5,74	15,15	9,41	163,94	9,90	7,32	2,58	26,06
Z. P. S.	7,81	16,26	8,41	108,19	10,71	7,97	2,74	25,58
W. P. S.	7,80	17,53	9,83	126,03	10,32	8,45	1,87	18,12
\bar{X}	7,35	16,48	7,45	127,09	10,18	6,84	3,35	32,01
s	0,99	2,41	2,41	42,58	1,86	1,36	1,88	12,81
$s_{\bar{X}}$	0,40	0,98	0,99	17,38	0,76	0,56	0,77	5,23

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

$\text{Na}^+.\text{dia}^{-1} + 100 \text{ mEq K}^+.\text{dia}^{-1}$, foi $7,35 \text{ ng.dl}^{-1}$ se elevou, após deambulação para $16,48 \text{ ng.dl}^{-1}$ com um incremento médio de $7,45 \text{ ng.dl}^{-1}$, correspondente ao percentual de 127,07.

A concentração média de cortisol plasmático, na mesma situação experimental, passou de $10,18 \mu\text{g.dl}^{-1}$ para $6,48 \mu\text{g.dl}^{-1}$ ou seja um decréscimo de $3,35 \mu\text{g.dl}^{-1}$, correspondente ao valor percentual de 32,01.

4.6.1.3 – Dieta de Arroz + $180 \text{ mEq Na}^+.\text{dia}^{-1} + 100 \text{ mEq K}^+.\text{dia}^{-1}$ (Tabela XII)

A concentração média de aldosterona, na dieta com sobrecarga de cloreto de sódio, foi de $4,11 \text{ ng.dl}^{-1}$ para $7,99 \text{ ng.dl}^{-1}$ após deambulação correspondendo a um incremento médio de $3,89 \text{ ng.dl}^{-1}$ ou seja um aumento relativamente ao basal de 110,43%.

O nível plasmático de cortisol na mesma condição experimental sofreu um decréscimo de $7,48 \mu\text{g.dl}^{-1}$ para $6,24 \mu\text{g.dl}^{-1}$ correspondente ao decréscimo de $1,25 \mu\text{g.dl}^{-1}$ ou seja ao percentual de 17,13.

4.6.1.4 – Interações Entre a Postura e as Diferentes Dietas (Tabelas XIII, XIV, XV, XVI, XVII, VXIII, XIX e XX).

Os níveis médios de aldosterona plasmática em relação à concentração de sódio na dieta, mostraram-se progressivamente menores com o conteúdo do cátion, sendo a queda estatisticamente significativa para cada dieta. Do mesmo modo, a elevação postural foi significativamente menor com o aumento da ingestão de sal, em valor absoluto e incremental. Todavia os incrementos corrigidos pelo valor médio basal não foram estatisticamente diferentes nas diversas dietas consideradas.

A concentração de cortisol plasmático às 8h mostrou um nível significativamente diferente para as três dietas consideradas. Porém, os valores após a deambulação não foram significativamente diferentes entre si. Entretanto, como seria de esperar, o decréscimo dos valores de cortisol plasmático observado às 12h não foi o mesmo para as três dietas. A partir dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença está na dieta mais rica em sal. Todavia, o decréscimo corrigido pelos basais (7 %) foi o mesmo para as três dietas.

4.6.2 – Observações Paradas nos Indivíduos Normais: Efeito da Cortrosina

4.6.2.1 – Dieta de Arroz + $100 \text{ mEq K}^+.\text{dia}^{-1}$ (Tabela XXI)

O nível plasmático médio de aldosterona às 8h foi $41,99 \text{ ng.dl}^{-1}$ e 60 minutos após a administração de cortrosina passou para $82,70 \text{ ng.dl}^{-1}$, correspondendo a um incremento de $40,72 \text{ ng.dl}^{-1}$ e relativamente ao basal de 112,40%.

A concentração plasmática média de cortisol, na mesma condição experimental, em nível basal de $9,70 \mu\text{g.dl}^{-1}$ se elevou a $18,93 \mu\text{g.dl}^{-1}$ após a injeção de cortrosina, ou seja um incremento de $9,23 \text{ ng.dl}^{-1}$ correspondente a um valor percentual de 97,27.

4.6.2.2 – Dieta de Arroz + $120 \text{ mEq Na}^+.\text{dia}^{-1} + 100 \text{ mEq K}^+.\text{dia}^{-1}$ (Tabela XXII)

A concentração de aldosterona plasmática em nível basal partiu de um valor médio de $8,17 \text{ ng.dl}^{-1}$ e se elevou, após o estímulo com ACTH para $21,11 \text{ ng.dl}^{-1}$ correspondendo ao incremento de $12,93 \text{ ng.dl}^{-1}$ ou seja, percentual de 167,04.

Tabela XII

Efeito da Postura sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais (N = 6), Mantidos em Dieta de Arroz + 180 mEq Na⁺ . dia⁻¹ + 100 mEq K⁺ . dia⁻¹

Paciente	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Postura		Incremento relativo Δ%	Incremento Δ	Postura		Decremento Δ	Decremento relativo ∇%
	Deitado	De pé			Deitado	De pé		
S. F. N.	2,48	8,60	6,12	8,12	5,22	4,84	0,58	11,11
F. R. S.	5,74	6,81	1,07	18,64	4,95	3,26	1,69	34,14
J. P. S.	4,58	8,35	3,77	82,31	9,41	7,82	1,59	16,89
R. G. O.	2,98	6,09	3,11	104,36	6,66	8,17	0,49	7,35
Z. P. S.	4,58	8,59	4,01	87,55	9,76	7,96	1,80	18,44
W. P. S.	4,27	9,52	5,25	122,95	8,89	7,57	1,32	14,84
\bar{X}	4,11	7,99	3,89	110,43	7,48	6,24	1,25	17,13
s	1,19	1,28	1,76	75,53	2,15	1,95	0,57	9,25
$s\bar{x}$	0,49	0,52	0,72	30,83	0,88	0,88	0,23	3,78

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s\bar{x}$ = desvio da média.

Tabela XIII

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Basais de Aldosterona Plasmática, nas Diversas Situações Experimentais Programadas para este Estudo: Postura, Cortrosina e Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	1	0,0084	0,0084	0,102	$p > 0,05$
B (I)	2	17,94	8,97	108,99	$p < 0,001$
B (II)	2	16,02	8,01	97,33	$p < 0,001$
B	4	33,98	8,49	103,228	$p < 0,001$
C	5	1,218	0,24	2,962	$0,01 < p \leq 0,05$
resíduo	25	2,057	0,082		
total	35	37,284			

F.V. = Fonte de variações; G. L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = entre situações experimentais: postura e cortrosina; B(I) = entre dietas (postura); B(II) = entre dietas (cortrosina); B = B(I) + B(II); C = entre indivíduos.

NOTA EXPLICATIVA: A diferença não foi significativa nos valores basais de aldosterona plasmática entre as provas de estímulos posturais e na da administração de cortrosina. No entanto, esses valores foram diferentes nas dietas dentro de cada situação experimental.

Tabela XIV

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Níveis Médios de Aldosterona Plasmática Após 4 horas de Deambulação e Após Administração de Cortrosina nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	1	0,206	0,206	4,49	$0,01 < p < 0,05$
B (I)	2	17,16	8,58	186,93	$p < 0,001$
B (II)	2	13,40	6,70	145,97	$p < 0,001$
B	4	30,74	7,686	167,37	$p < 0,001$
C	5	0,5748	0,115	2,503	$p > 0,05$
resíduo	25	1,148	0,0459		
total	35	32,673			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = entre situações experimentais: postura e cortrosina; B(I) = entre dietas (postura); B(II) = entre dietas (cortrosina); B = B(I) + B(II); C = entre indivíduos.

NOTA EXPLICATIVA: Houve diferença significativa nos valores médios de aldosterona plasmática entre situações experimentais: postura e cortrosina. Além disso esses valores foram diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições.

Tabela XV

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Incrementais de Aldosterona Plasmática nas Diversas Situações Experimentais Programadas para este Estudo: Postura, Cortrosina e Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	1	0,627	0,6277	5,922	0,01 < p < 0,05
B (I)	2	17,97	8,99	84,81	p < 0,001
B (II)	2	11,62	7,81	54,81	p < 0,001
B	4	29,585	7,396	69,77	p < 0,001
C	5	2,281	0,456	4,34	0,001 < p < 0,01
resíduo	25	2,650	0,106		
total	35	35,144			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = entre situações experimentais: postura e cortrosina; B(I) = entre dietas (postura); B(II) = entre dietas (cortrosina); B = B(I) + B(II); C = entre indivíduos.

NOTA EXPLICATIVA: Houve diferença significativa nos valores incrementais médios de aldosterona plasmática entre as situações experimentais: postura e cortrosina. Além disso esses valores foram diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições.

Tabela XVI

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Incrementais aos Basais de Aldosterona Plasmática, nas Diversas Situações Experimentais Programadas para este Estudo: Postura, Cortrosina e Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	1	0,4909	0,4909	2,611	$p > 0,05$
B	4	0,8827	0,2207	1,174	$p > 0,05$
C	5	4,5420	0,9084	4,833	$p < 0,001$
resíduo	25	4,6994	0,1880		
total	35	10,615			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = entre situações experimentais; postura: postura e cortrosina; B = entre dietas (postura e cortrosina); C = entre indivíduos.

NOTA EXPLICATIVA: A diferença não foi significativa nos incrementos relativos aos basais de aldosterona plasmática entre as provas de estímulos posturais e na da administração de cortrosina, e esses valores foram constantes nas dietas dentro das condições estudadas.

Tabela XVII

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Basais de Cortisol Plasmático, nas Diversas Situações Experimentais Programadas para este Estudo: Postura, Cortrosina e Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	1	0,1651	0,1615	8,405	$0,001 < p < 0,01$
B (I)	2	0,40	0,20	10,20	$p < 0,001$
B (II)	2	0,42	0,21	10,71	$p < 0,001$
B	4	0,8259	0,2065	10,513	$p < 0,001$
C	5	0,5421	0,1084	5,521	$p < 0,001$
resíduo	25	0,4910	0,0196		
total	35	2,0241			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = entre situações experimentais: postura e cortrosina; B(I) = entre dietas (postura); B(II) = entre dietas (cortrosina); B = B(I) + B(II); C = entre indivíduos.

NOTA EXPLICATIVA: Houve diferença significativa nos valores basais de cortisol plasmático entre as provas de estímulos posturais e na da administração de cortrosina. Além disso, esses valores foram diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições experimentais: postura e cortrosina. Essa diferença foi devido aos três tipos de dietas, na situação postura e também na situação cortrosina, ou seja a diferença foi devido às duas condições programadas para este estudo.

Tabela XVIII

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Níveis Médios de Cortisol Plasmático
Após 4 horas de Deambulação nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	0,1123	0,0562	1,518	$p > 0,05$
B	5	0,7385	0,1477	3,992	$0,01 < p < 0,05$
resíduo	10	0,3700	0,0370		
total	17	1,2208			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = dietas com 3 níveis de concentração de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

NOTA EXPLICATIVA: O valor médio de cortisol plasmático após 4 horas de deambulação foi o mesmo para os três tipos de dietas.

Tabela XIX

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores de Decrementos do Cortisol Plasmático
na Prova de Estímulos Posturais, nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	3,2362	1,6181	5,385	0,01 < p < 0,05
B	5	0,4365	0,0873	0,291	p > 0,05
resíduo	10	3,0049	0,3005		
total	17	6,6776			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = dietas com 3 níveis de concentração de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

Contrastes provados:

$H_{o_1} : C_1 : A_1 = A_2$ (não rejeitada). Intervalo de confiança para C_1 : | -1,00; 0,42 |

$H_{o_2} : C_2 : A_3 = \frac{A_1 + A_2}{2}$ (rejeitada). Intervalo de confiança para C_2 : | -1,47; -0,27 |

NOTA EXPLICATIVA: O valor médio de decremento do cortisol plasmático não foi o mesmo para as três dietas. Partindo dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença está na dieta mais rica em sal (dieta A

Tabela XX

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores de Decremento Relativo aos Basais de Cortisol Plasmático na Prova de Estímulos Posturais, nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	1,4000	0,7000	2,850	$p > 0,05$
B	5	0,5742	0,1148	0,468	$p > 0,05$
resíduo	10	2,4560	0,2456		
total	17	4,4301			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio; A = dietas com 3 níveis de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

NOTA EXPLICATIVA: O valor médio do decremento relativo aos basais do cortisol plasmático foi o mesmo para as três dietas consideradas.

Tabela XXI

Efeito da Cortrosina sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais
(N = 6) Mantidos em Dieta de Arroz + 100 mEq K⁺. dia⁻¹

Paciente	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Tempo		Incremento	Incremento relativo	Tempo		Incremento	Incremento relativo
	8.00	9.00	Δ	Δ%	8.00	9.00	Δ	Δ%
S. F. N.	49,88	107,78	57,90	116,08	10,05	17,40	7,35	73,13
F. R. S.	59,05	81,92	22,87	38,73	9,02	13,18	4,16	46,11
J. P. S.	19,05	59,99	40,94	214,91	10,05	26,92	16,87	167,86
R. G. O.	32,65	70,53	37,88	116,02	7,32	17,89	10,57	144,39
Z. P. S.	51,96	95,11	43,15	83,04	11,37	18,74	7,37	64,81
W. P. S.	39,33	80,88	41,55	105,64	10,39	19,46	9,07	87,29
\bar{X}	41,99	82,70	40,72	112,40	9,70	18,93	9,23	97,27
s	14,65	17,03	11,21	58,09	1,39	4,49	4,31	48,08
$s_{\bar{X}}$	5,98	6,95	4,58	23,71	0,57	1,83	1,76	19,62

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

Tabela XXII

Efeito da Cortrosina sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais
(N = 6), Mantidos em Dieta de Arroz + 120 mEq Na⁺ . dia⁻¹ + 100 mEq K⁺ . dia⁻¹

Paciente	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Tempo		Incremento	Incremento	Tempo		Incremento	Incremento
	8:00	9:00	Δ	relativo Δ%	8:00	9:00	Δ	relativo Δ%
S. F. N.	7,85	34,32	26,27	337,20	5,86	12,84	6,98	119,11
F. R. S.	7,07	19,86	12,80	181,30	5,70	13,18	7,48	131,22
J. P. S.	9,75	20,20	10,45	107,18	8,72	22,18	13,46	154,35
R. G. O.	5,76	15,49	9,73	168,92	5,44	11,98	6,54	120,22
Z. P. S.	10,93	18,29	7,36	67,34	7,17	14,77	7,60	105,99
W. P. S.	7,69	18,48	10,79	140,31	8,22	18,01	9,79	119,09
\bar{X}	8,17	21,11	12,93	167,04	6,85	15,49	8,64	125,00
s	1,87	6,68	6,86	93,17	1,40	3,91	2,61	16,46
$s_{\bar{X}}$	0,76	2,73	2,80	38,03	0,57	1,59	1,07	6,72

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

O nível médio de cortisol plasmático, às 8h foi de $6,85 \mu\text{g.dl}^{-1}$ e, uma hora após a administração de cortrosina passou para $15,49 \mu\text{g.dl}^{-1}$. O incremento observado foi $8,64 \mu\text{g.dl}^{-1}$ e o percentual 125,00.

4.6.2.3 – Dieta de Arroz + $180 \text{ mEq Na}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$ + $100 \text{ mEq K}^+ \cdot \text{dia}^{-1}$ (Tabela XXIII)

A concentração média de aldosterona plasmática, após a administração de cortrosina, apresentou uma elevação de $4,42 \text{ ng.dl}^{-1}$ para $10,27 \text{ ng.dl}^{-1}$ correspondendo a um incremento de $5,85 \text{ ng.dl}^{-1}$ ou seja ao percentual de 150,52.

A concentração de cortisol plasmático na mesma condição experimental, com valor basal médio de $7,28 \mu\text{g.dl}^{-1}$ passou para $16,32 \mu\text{g.dl}^{-1}$, correspondendo a um incremento de $9,34 \mu\text{g.dl}^{-1}$ ou seja relativo ao basal de 129,74%.

4.6.2.4 – Interações entre o Efeito da Cortrosina e as Diferentes Dietas (Tabelas XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XXIV, XXV e XXVI)

Após administração de cortrosina, as respostas de aldosterona plasmática foram significativamente diferentes para as três dietas consideradas, sendo progressivamente menores em relação ao aumento de sal. Os incrementos analisados pela distribuição "F", foram significativamente diferentes para cada tipo de dieta considerada. No entanto, não houve diferença significativa nos incrementos relativos aos basais entre as dietas dentro da condição experimental considerada.

Os níveis médios basais de aldosterona plasmática foram significativamente diferentes, decrescendo de depleção à sobrecarga de sal.

A concentração média de cortisol plasmático após administração de cortrosina não foi a mesma para as três dietas estudadas. A partir dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença está na dieta com restrição de sódio. No entanto, o valor médio incremental relativo ao basal do cortisol plasmático mostraram uma diferença significativa para as três dietas consideradas.

4.6.2.5 – Interações Entre os Efeitos da Postura, a Cortrosina e as Diferentes Dietas (Tabelas XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXIV, XXV e XXVI)

Os valores basais médios de aldosterona plasmática entre as provas de estímulos posturais e na administração de cortrosina não foram significativamente diferentes quando se compararam os níveis das 8h entre si. No entanto, esses valores são diferentes para cada situação experimental.

As concentrações plasmáticas de aldosterona ao término da deambulação e após o estímulo de ACTH foram diferentes e esses valores foram diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições consideradas.

Os incrementos de aldosterona entre as situações programadas para este estudo, isto é, postura e cortrosina foram diferentes e os valores obtidos diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições experimentais. Todavia, não foi verificada qualquer diferença significativa nos incrementos relativos aos basais entre as duas provas e os dados obtidos foram constantes nas dietas dentro das condições estudadas.

O valor médio dos basais do cortisol plasmático das duas provas, postural e efeito do ACTH, foram significativamente diferentes e os valores obtidos foram diferentes para cada tipo de dieta dentro das condições experimentais. No entanto, a concentração média de cortisol plasmático após deambulação

Tabela XXIII

Efeito da Cortrosina sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, em Indivíduos Normais
(N = 6), Mantidos em Dieta de Arroz + 180 mEq Na⁺. dia⁻¹ + 100 mEq K⁺. dia⁻¹

Paciente	Aldosterona em ng.dl ⁻¹				Cortisol em µg.dl ⁻¹			
	Tempo		Incremento	Incremento relativo	Tempo		Incremento	Incremento relativo
	8:00	9:00	Δ	Δ%	8:00	9:00	Δ	Δ%
S. F. N.	4,08	8,11	4,03	98,77	8,67	15,07	6,40	73,81
F. R. S.	44,61	7,88	3,27	70,93	6,86	13,10	6,44	96,69
J. P. S.	6,47	13,60	7,13	110,20	7,17	21,44	14,27	199,02
R. G. O.	2,35	9,21	6,86	291,91	6,82	15,44	8,82	133,23
Z. P. S.	5,78	12,92	7,14	123,53	6,88	15,47	8,59	124,85
W. P. S.	3,21	9,88	6,67	207,79	7,65	19,19	11,54	150,84
\bar{X}	4,42	10,27	5,85	150,52	7,28	16,62	9,34	129,74
s	1,55	2,44	1,73	83,23	0,78	3,08	3,07	43,59
$s_{\bar{X}}$	0,63	1,00	0,71	33,97	0,32	1,26	1,25	17,79

X = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

Tabela XXIV

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Níveis Médios de Cortisol Plasmático
Após Administração de Cortrosina nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	0,1245	0,0623	8,967	0,001 < p < 0,01
B	5	0,8327	0,1265	18,224	p < 0,001
resíduo	10	0,0694	0,0069		
total	17	0,8267			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio;

A = dietas com 3 níveis de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

$H_{01} : C_1 : A_2 = A_3$ (não rejeitada). Intervalo de confiança para C_1 : $[-0,187; 0,027]$

$H_{02} : C_2 : A_1 - \frac{A_2 + A_3}{2}$ (rejeitada). Intervalo de confiança para C_2 : $[0,068; 0,252]$

NOTA EXPLICATIVA: O nível médio de cortisol plasmático após administração de cortrosina não foi o mesmo para as três dietas. Partindo dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença está na dieta com restrição de sódio (dieta A_1).

Tabela XXV

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Incrementais de Cortisol Plasmático
Após Administração de Cortrosina nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	0,0161	0,0080	0,218	$p > 0,05$
B	5	1,5763	0,3153	8,565	$p < 0,001$
resíduo	10	0,3681	0,03681		
total	17	1,9605			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio;

A = dietas com 3 níveis de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

NOTA EXPLICATIVA: O valor médio incremental de cortisol plasmático foi o mesmo para as três dietas consideradas.

Tabela XXVI

Análise de Variância Relativa à Comparação dos Valores Incrementais aos Bases de Cortisol Plasmático Após a Administração de Cortrosina, nas Diferentes Dietas

F.V.	G.L.	SQ	QM	"F" obtido	Nível de significância
A	2	0,4696	0,2348	3,362	$p > 0,05$
B	5	1,1879	0,2376	3,402	$0,01 < p \leq 0,05$
resíduo	10	0,6984	0,0698		
total	17	2,3558			

F.V. = Fonte de variações; G.L. = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio;

A = dietas com 3 níveis de cloreto de sódio; B = Bloco com 6 níveis de dosagens.

NOTA EXPLICATIVA: O valor incremental relativo aos bases de cortisol plasmático foi o mesmo para as três dietas consideradas.

foi o mesmo para os três tipos de dietas programadas. Todavia, o valor médio do decréscimo do cortisol plasmático, na prova de estímulo postural não foi o mesmo para as três dietas. Partindo dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença está na dieta com sobrecarga de sal ($180 \text{ mEq Na}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$). Entretanto, o valor médio do decréscimo relativo aos basais foi o mesmo para as três dietas.

Após administração de cortrosina, as respostas de cortisol plasmático não foram as mesmas para as três dietas. Através dos testes de contrastes, verificou-se que a diferença estava na dieta com restrição de sódio. Todavia, os incrementos absoluto e relativo aos basais foram os mesmos para as três dietas consideradas.

4.6.3 – Teste de Infusão de Angiotensina II

4.6.3.1 – Dieta de Arroz + $100 \text{ mEq K}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Tabela XXVII)

Em virtude de haverem sido estudados apenas dois pacientes, não foi feita a análise estatística, mas observa-se que para a aldosterona plasmática, de um valor basal elevado houve aumento deste esteróide, particularmente no paciente W.P.S.

Por outro lado, foi evidente o decréscimo dos níveis plasmáticos de cortisol, atingindo valores similares desse hormônio ao término da prova, nos dois pacientes estudados.

4.6.3.2 – Dieta de Arroz + $120 \text{ mEq Na}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$ + $100 \text{ mEq K}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Tabela XXVIII)

O valor médio de aldosterona plasmática estudado nos 3 casos se elevou de 7,63 a 13,80 e $19,32 \text{ ng} \cdot \text{dl}^{-1}$ aos 30 e 60 minutos respectivamente, após a infusão de angiotensina II, sendo os decréscimos absoluto e relativo aos basais de $6,17 \text{ ng} \cdot \text{dl}^{-1}$ e 88,72% aos 30 minutos e $11,69 \text{ ng} \cdot \text{dl}^{-1}$ e 161,72% aos 60 minutos.

O valor basal médio de cortisol plasmático, na mesma condição experimental, foi $6,58 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$, sofrendo decréscimos progressivos, a partir do valor basal médio de 6,58 e 5,32 e $4,28 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$ aos 30 e 60 minutos, sendo os decréscimos absoluto e relativo aos basais de $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$ e 18,15% e 2,30 e 33,30%, respectivamente.

4.6.3.3 – Dieta de Arroz + $180 \text{ mEq Na}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$ + $100 \text{ mEq K}^{\cdot} \cdot \text{dia}^{-1}$ (Tabela XXIX)

A concentração média de aldosterona plasmática avaliada nos três casos se elevou de 4,52 e 10,14 e $13,57 \text{ ng} \cdot \text{dl}^{-1}$, após 30 e 60 minutos, respectivamente, equivalendo aos incrementos absoluto e relativo aos basais de $6,62 \text{ ng} \cdot \text{dl}^{-1}$ e 140,63% e 9,05 e 225,53%.

Na mesma condição experimental, a infusão de angiotensina provocou a queda do valor médio basal do cortisol plasmático de 6,78 e 6,08 e $4,44 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$, após 30 e 60 minutos respectivamente, correspondendo a um decréscimo absoluto de 0,70 e $2,34 \mu\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$ ou seja, relativo aos basais de 10,56 e 32,96%.

5 – DISCUSSÃO

A técnica de quantificação por radioimunoensaio tem por princípio fundamental as reações de inibição competitiva entre os hormônios marcado e não marcado ("frio") para os locais de fixação do

Tabela XXVII

Efeito da Angiotensina II sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, nos Indivíduos Normais (N = 2), Mantidos em Dieta de Arroz + 100 mEq K⁺ . dia⁻¹

Paciente	Tempo			Incremento	Incremento	Incremento	Incremento	
	8h	8h30m	9h	Δ $T_{8h30m} - T_{8h}$	relativo $\Delta_1\%$	Δ_2 $T_{9h} - T_{8h}$	relativo $\Delta_2\%$	
Aldosterona em ng.dl ⁻¹	S. N. F.	36,24	60,35	63,10	24,11	66,52	26,86	74,11
	W. P. S.	43,84	69,97	99,97	26,13	59,60	56,13	128,03
				Decremento ∇_2 $T_{8h} - T_{8h30m}$	Decremento relativo $\nabla_1\%$	Decremento ∇_2 $T_{8h} - T_{9h}$	Decremento relativo $\nabla_2\%$	
Cortisol em $\mu\text{g.dl}^{-1}$	S. F. N.	10,11	7,43	6,24	2,68	26,50	3,87	38,27
	W. P. S.	9,58	8,54	6,20	1,04	10,85	3,38	35,28

Tabela XXVIII

Efeito da Angiotensina II sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, nos Indivíduos Normais
(N=3), Mantidos em Dieta de Arroz + 120 mEq Na⁺. dia⁻¹ + 100 mEq K⁺. dia⁻¹

Paciente	Tempo			Incremento Δ_1	Incremento relativo $\Delta_1\%$	Incremento Δ_2	Incremento relativo $\Delta_2\%$
	8h	8h30m	9h	$T_{8h30m} - T_{8h}$		$T_{9h} - T_{8h}$	
Aldosterona em ng.dl ⁻¹	S. F. N.	6,60	16,56	21,79	9,96	150,90	230,15
	W. P. S.	6,98	13,55	19,41	6,57	94,12	178,08
	J. P. S.	9,32	11,29	16,77	1,97	21,13	79,93
	\bar{X}	7,63	13,80	19,32	6,17	88,72	162,72
s	1,47	2,64	2,51	4,01	65,05	3,92	76,28
$s_{\bar{X}}$	0,85	1,52	1,45	2,32	37,60	2,27	44,09
				Decremento ∇_1	Decremento relativo $\nabla_1\%$	Decremento ∇_2	Decremento relativo $\nabla_2\%$
				$T_{9h} - T_{8h30m}$		$T_{8h} - T_{9h}$	
Cortisol em μ g.dl ⁻¹	S. F. N.	4,57	4,01	3,51	0,56	12,25	23,19
	W. P. S.	7,44	5,92	4,97	1,52	20,43	33,19
	J. P. S.	7,72	6,04	4,36	1,68	21,76	43,52
	\bar{X}	6,58	5,32	4,28	1,25	18,15	33,30
s	1,74	1,14	0,73	0,61	5,15	1,16	10,17
$s_{\bar{X}}$	1,01	0,66	0,42	0,35	2,98	0,67	5,88

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

Tabela XXIX

Efeito da Angiotensina II sobre os Níveis de Aldosterona e Cortisol Plasmáticos, nos Indivíduos Normais
(N = 3), Mantidos em Dieta de Arroz + 180 mEq Na⁺. dia⁻¹ + 100 mEq K⁺. dia⁻¹

	Paciente	Tempo			Incremento Δ_1	Incremento relativo $\Delta_1\%$	Incremento Δ_2	Incremento relativo $\Delta_2\%$
		8h	8h30m	9h	$T_{8h30m} - T_{8h}$		$T_{9h} - T_{8h}$	
Aldosterona em ng.dl ⁻¹	S. F. N.	3,74	11,56	13,70	7,82	209,09	9,96	266,31
	W. P. S.	3,56	9,22	14,76	5,66	158,98	11,20	314,60
	J. P. S.	6,26	9,63	12,25	3,37	53,83	5,99	95,68
	\bar{X}	4,52	10,14	13,57	5,62	140,63	9,05	225,53
	s	1,50	1,25	1,26	2,23	29,40	2,72	115,02
	$s_{\bar{X}}$	0,87	0,72	0,73	1,29	16,99	1,57	66,48
					Decremento ∇_1	Decremento relativo $\nabla_1\%$	Decremento ∇_2	Decremento relativo $\nabla_2\%$
					$T_{8h} - T_{8h30m}$		$T_{8h} - T_{9h}$	
Cortisol em $\mu\text{g.dl}^{-1}$	S. F. N.	5,10	4,67	4,09	0,43	8,43	1,01	19,80
	W. P. S.	7,58	6,63	4,55	0,95	12,53	3,03	39,97
	J. P. S.	7,67	6,94	4,67	0,73	9,51	3,00	39,11
	\bar{X}	6,78	6,08	4,44	0,70	10,16	2,34	32,96
	s	1,46	1,23	0,31	0,26	2,13	1,16	11,41
	$s_{\bar{X}}$	0,84	0,71	0,18	0,15	1,23	0,67	6,59

\bar{X} = média; s = desvio-padrão; $s_{\bar{X}}$ = desvio da média.

anticorpo específico. Com efeito, pondo-se em contacto hormônio marcado e anti-soro, estabelecer-se-á um equilíbrio dinâmico entre o hormônio marcado-anticorpo e seus elementos constituintes. Se o hormônio não marcado é introduzido no sistema, este competirá com a forma livre do hormônio para os sítios de fixação do anti-soro, passando a formar complexo hormônio "frio" anticorpo. Se a concentração do anticorpo e do hormônio marcado forem constantes, a fração do hormônio marcado-anticorpo, no equilíbrio, corresponde a um nível de radioatividade que é inversamente proporcional à concentração do hormônio de referência, introduzido no meio de incubação, conforme a Figura 7⁽⁴⁾.

Os hormônios esteróides, em virtude de seus níveis plasmáticos baixos e similaridade estrutural entre si, apresentam sérias dificuldades de caracterização, tornando o sistema sensível a interferentes não específicos e à reatividade cruzada de esteróides afins. Para melhorar a especificidade do anti-soro e sensibilidade do método, estes interferentes devem ser removidos do meio de incubação.

Muitos métodos foram descritos para a quantificação do cortisol plasmático. Os de uso habitual são o fluorimétrico de Mattingly⁽¹⁴⁾ e por competição à proteína⁽²¹⁾.

Neste trabalho, a quantificação de cortisol plasmático utilizando transcortina não foi utilizado para as diversas situações experimentais programadas para este estudo, devido ao coeficiente de afinidade média de CBG * ser cerca de 1/100 menor em relação ao anti-soro de cortisol⁽⁶⁾. A sensibilidade do método é limitada a $3,81 \mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}$ e existindo esteróides com reatividade cruzada, conforme foi demonstrado anteriormente⁽²¹⁾. Além disso, a faixa útil da curva dose-resposta era de 1 a 15 ng enquanto no imunoensaio foi de 10 a 500 pg (Figura 5) e a curva obtida sendo mais sensível e precisa.

Neste estudo, foram analisados resultados de cortisol plasmático de duas séries de amostras de plasma (R.G.O. e F.R.S.) por radioimunoensaio e por competição à proteína transportadora (transcortina) mostrando uma superestimação dos dados medidos por técnica de competição em 30,11% em relação aos dados obtidos por radioimunoensaio, pelos motivos citados anteriormente.

Garza, R. & Abraham, G. E.⁽⁹⁾ fizeram o mesmo estudo obtendo uma superestimação dos resultados das amostras de plasma em cerca de 50% quando dosados por técnica de competição à transcortina.

Utilizando anti-soro de cortisol produzido em coelhos a partir de um conjugado 3-oxima-soro albumina bovina⁽²⁸⁾, foi possível desenvolver radioimunoensaio de cortisol em 100 μl de amostra de plasma após a precipitação de proteínas séricas com etanol absoluto sem necessidade de isolamento cromatográfico, devido à concentração relativamente alta de cortisol em relação a outros esteróides afins com reatividade cruzada ao anti-soro e à diluição pelo tampão, minimizando assim os interferentes não específicos de origem protéica e lipídica⁽¹⁾.

Quanto à aldosterona plasmática, devido à alta especificidade do anti-soro, foi necessário apenas uma extração exaustiva e seletiva do esteróide, para alcançar uma sensibilidade e precisão desejadas.

Quanto à precisão interensaio das curvas-padrão de aldosterona e cortisol, a reduzida dispersão dos resultados (Figuras 5 e 6) referente a cada ponto atestam a boa reprodutibilidade dos métodos e a estabilidade dos reagentes utilizados para o ensaio.

Neste estudo, a análise da reprodutibilidade interensaio de determinações do cortisol efetuadas em três misturas de plasmas de indivíduos normais com concentrações hormonais diferentes (baixa, média e alta) mostrou coeficiente de variação de 8,84, 7,33 e 5,81% respectivamente (Tabela VII), permitindo classificar a precisão do método como boa segundo o critério proposto por Melo⁽²⁰⁾.

(*) CBG = Corticosteroid binding globulin.

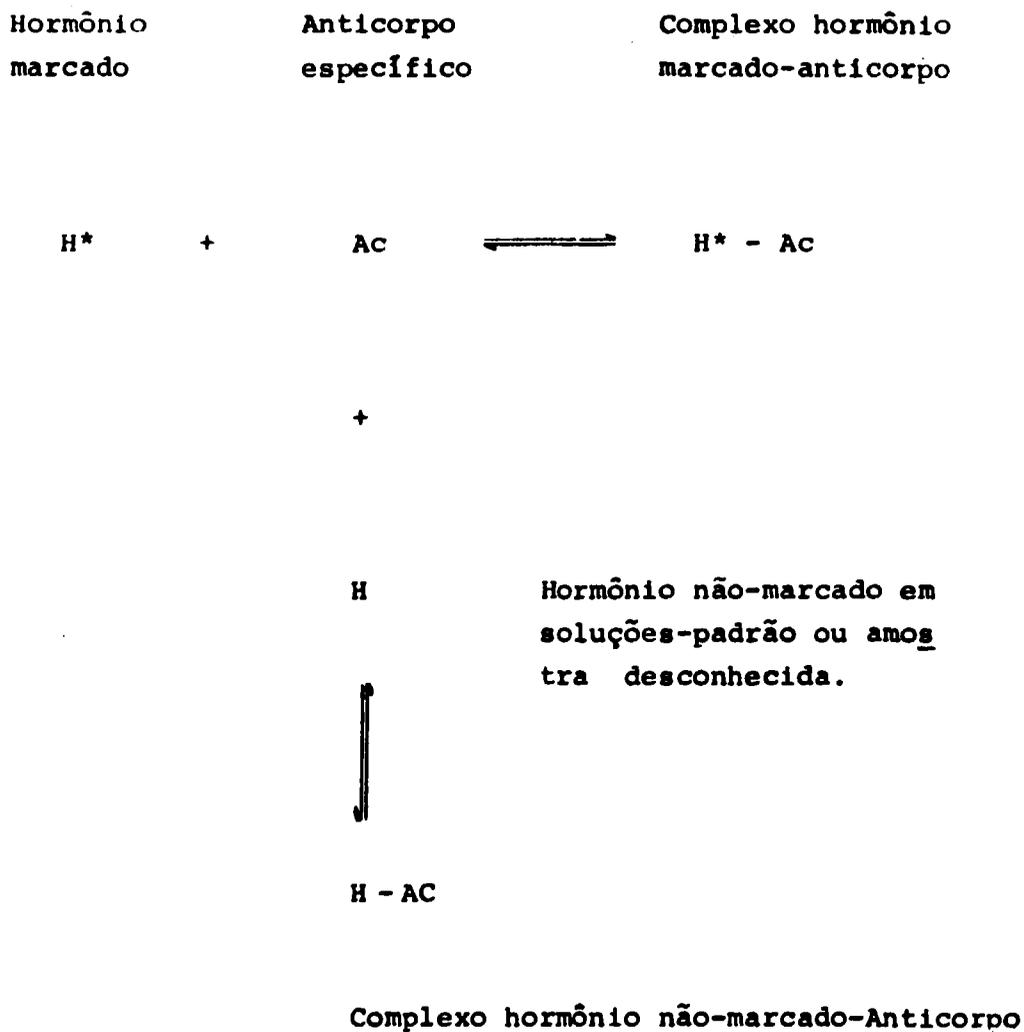


Figura 7 - Princípio geral da técnica de radioimunoensaio

Do mesmo modo, os coeficientes de variação das determinações interensaio de aldosterona, realizadas em três misturas de plasmas de indivíduos normais com níveis hormonais diferentes (baixo, médio e alto) foram respectivamente 5,57, 9,99 e 6,73%, permitindo também classificar como boa a precisão da técnica (Tabela VIII)⁽²⁰⁾.

Pela análise da avaliação das diferentes fases técnicas para a dosagem de aldosterona e cortisol plasmáticos instituídas por controles de qualidade que estimam a pureza do traçador e dos reagentes, a sensibilidade dos métodos, as precisões interensaio das curvas de referência e a reprodutibilidade do ensaio (entre ensaios), pode-se concluir que a medição dos dois hormônios esteróides pela técnica de imunoensaio foi um método específico e dotado de reprodutibilidade excelente.

Resolvidos os problemas técnicos da dosagem de aldosterona e cortisol por radioimunoensaio, estes métodos foram utilizados para o estudo da regulação da secreção de aldosterona e cortisol, variando a quantidade de sódio na dieta e mantendo fixa a de potássio, em relação à postura e administração de corticotropina e de angiotensina II.

Os fatores da regulação da secreção de aldosterona não estão totalmente esclarecidos, mas entre os mais importantes estão o sistema renina-angiotensina, um efeito estimulante direto adrenocortical da elevação do potássio plasmático, a ação do potássio sobre a renina, em sentido oposto ao seu efeito no córtex⁽²⁴⁾, o ACTH hipofisário e, possivelmente, uma queda dos níveis de sódio, atuando diretamente sobre o córtex adrenal.

Admite-se, atualmente que o ACTH estimula a produção de aldosterona bem como de glicocorticóides e dos esteróides sexuais.

Em indivíduos normais, o sistema renina-angiotensina e o potássio sérico regulam a secreção de aldosterona através de circuitos de retroação inibitória ("feedback" negativo) e, sob condições normais, é provável que os dois sistemas desempenhem papel similar para a manutenção da homeostase.

O potássio tem um efeito estimulatório indireto na secreção de aldosterona, por meio de alterações no balanço de sódio e conseqüentemente alteração do volume intra-vascular. O controle da secreção de aldosterona em decorrência da concentração plasmática de potássio, funciona em paralelo com o sistema renina-angiotensina. Quando este último sistema está bloqueado, como no estágio final de uma insuficiência renal crônica, o sistema potássio-aldosterona assume papel predominante na regulação do balanço eletrolítico.

O evento principal do controle pelo sistema renina-angiotensina é a estimulação da secreção de renina pelo aparelho juxta-glomerular, quando há diminuição de volume arterial efetivo como na posição ereta. A renina age como uma protease específica, desdobrando o angiotensinogênio, da fração α_2 -globulina do plasma de peso molecular 30 000, em um decapeptídeo, a angiotensina I e outra porção. Uma enzima conversor do plasma hidroliza a angiotensina I, transformando-a em um octapeptídeo, a angiotensina II. Esta última estimula o córtex adrenal induzindo a secreção de aldosterona, sendo seu efeito potenciado pela presença de ACTH e K^+ , em concentrações que, de outra forma, seriam ineficientes.

A posição ereta, reduzindo o volume intra-vascular total induz alterações na hemodinâmica renal diminuindo a pressão ao nível do aparelho juxta-glomerular e determinando a liberação de renina e conseqüente produção de angiotensina II e secreção de aldosterona.

Admite-se, atualmente que os fatores estimulantes de aldosterona atuam em dois sítios de sua via biosintética⁽³⁰⁾. Os estímulos agudos, como a infusão de angiotensina, a administração de ACTH e a postura agiriam na conversão do colesterol em pregnenolona (via metabólica inicial - "early pathway") enquanto os estímulos crônicos, por exemplo, alterações crônicas da concentração de sódio na dieta, afetam primariamente a conversão da corticosterona em aldosterona pelo aumento da atividade da 18-hidroxi-desidrogenase (via metabólica tardia - "late pathway").

Quanto à resposta de aldosterona em relação à quantidade de sódio na dieta, menor a ingestão de sódio mais elevado é o valor basal médio de aldosterona por aumento da atividade do sistema renina-angiotensina induzido pela queda do volume extracelular (ativação da via metabólica tardia). Nas Tabelas X, XI e XII, pode-se observar que com o aumento do teor de sódio na dieta, há diminuição da secreção de aldosterona por redução da atividade do sistema renina-angiotensina (dados não publicados).

A posição ereta afetaria também a secreção de aldosterona elevado em cerca de 1,5 a 2 vezes o nível de aldosterona plasmática em relação ao valor basal, pela já referida redução do volume circulante efetivo e ativação da via metabólica precoce.

A análise comparativa das Tabelas XIII, XIV, XV e XVI pode-se observar que a resposta de aldosterona ao estímulo agudo foi a mesma nas três dietas quando os incrementos corrigidos pelos valores basais foram analisados pela distribuição "F", apesar dos valores basais e incrementos absolutos distintos, evidenciando eficiência do sistema em diferentes níveis de ativação da via metabólica tardia pela alteração do conteúdo de sódio na dieta.

Quanto ao efeito do ACTH, qualquer que fosse a taxa basal de secreção de aldosterona induzida pela variação dietética do sal, houve estímulo da produção de aldosterona elevando-se de maneira análoga, nas 3 dietas, mostrando resposta semelhante do córtex ao ACTH, a diversos níveis de estimulação da via metabólica tardia (Tabelas XXI, XXII e XXIII).

Entretanto, pela análise de variância, pôde-se notar que a secreção de aldosterona ao fator ACTH exógeno foi semelhante ao da postura e independente da quantidade de sódio ingerido, sendo os incrementos relativos aos basais entre as duas provas os mesmos dentro das condições estudadas (Tabela XVI).

Por outro lado, a diferença significativa obtida em relação aos valores basais de cortisol plasmático entre as provas de postura e cortosina e para cada tipo de dieta (Tabela XVII) poderia ser atribuída à variação biológica da secreção de glicocorticóides no mesmo indivíduo.

A queda do nível plasmático de cortisol, após deambulação, deve-se ao ritmo nictemeral mostrando que a ativação da produção de aldosterona induzida pelos estímulos posturais não aceleraria a biossíntese de cortisol (Tabelas X, XI e XII).

Como se pode observar nas Tabelas XXI, XXII e XXIII, o ACTH estimula a secreção de cortisol independentemente da ingestão de sódio. O conjunto dos dados do efeito da injeção de cortosina poderia indicar que a secreção de aldosterona e cortisol determinada pelo ACTH seria independente do nível de ingestão de Na^+ .

A infusão de angiotensina II, em doses não hipertensivas (Tabelas XXVII, XXVIII e XXIX) elevou os níveis de aldosterona, e não influenciando de maneira paralela na secreção de cortisol nas três dietas estudadas. Com efeito, provocou uma diminuição acentuada nos valores de cortisol, mais do que seria esperado pelo ritmo nictemeral. Esta queda anômala verificada durante a infusão de angiotensina II, se deve provavelmente a um bloqueio da biossíntese de cortisol, com o desvio de substrato para a de aldosterona, além do próprio efeito do ritmo nictemeral do cortisol endógeno.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - As técnicas empregadas para o radiolimunoensaio de aldosterona e cortisol plasmáticos controladas pela estimativa da pureza do traçador e dos reagentes, a sensibilidade dos métodos, as precisões interensaio das curvas dose-resposta e as reprodutibilidades entre os ensaios foram adequadas para

quantificar níveis de aldosterona e cortisol nas condições basais e níveis elevados, após estímulos programados.

- 6.2 – A secreção de aldosterona plasmática em nível basal apresentou diferença significativa nas três dietas, elevando-se progressivamente com a restrição de sódio mostrando a dependência provável da redução do volume extracelular como só acontece nesta situação metabólica (ativação da via metabólica tardia).
- 6.3 – Quatro horas de deambulação provocaram um aumento dos níveis de aldosterona em relação ao valor basal por fatores hemodinâmicos, dependentes da postura (ativação da via metabólica precoce), sem haver diferença significativa no incremento relativo ao basal, dos níveis plasmáticos de aldosterona em função das dietas estudadas.
- 6.4 – A administração do ACTH exógeno provocou um estímulo na secreção de aldosterona (ativação da via metabólica tardia) independente de sua taxa basal induzida pela ativação dietética salina. A resposta do córtex avaliada pelo incremento relativo aos basais foi a mesma para as três dietas consideradas.
- 6.5 – A resposta da secreção de aldosterona ao ACTH e à posição ereta foi similar e não dependeu da quantidade de sódio dietético.
- 6.6 – A infusão de angiotensina II exógena provocou incremento na secreção de aldosterona nas três dietas (ativação da via metabólica precoce) sendo o incremento relativo aos basais maior na dieta rica em relação à pobre em sal.
- 6.7 – Nas mesmas condições experimentais de estímulos posturais e da injeção da cortrosina o nível basal de cortisol plasmático variou com a concentração de sódio nas dietas, sendo significativa a diferença detectada entre diversas dietas. Essa diferença poderia ser atribuída à variação biológica da secreção de hormônios, no mesmo indivíduo.
- 6.8 – A secreção de cortisol plasmático não sofreu alteração similar à da aldosterona com os estímulos posturais, observando-se um decréscimo nos valores paralelo ao esperado do ritmo nictemeral do esteróide.
- 6.9 – A injeção de ACTH estimulou a secreção de cortisol independentemente do nível de ingestão de Na⁺, sendo a resposta similar nas três dietas estudadas.
- 6.10 – A infusão de angiotensina II em doses não hipertensivas provocou um decréscimo anômalo nos valores de cortisol e se deve provavelmente ao desvio do substrato para a biossíntese de aldosterona associado ao próprio ritmo nictemeral do cortisol.

INFERÊNCIA: Na presença de níveis variados de ingestão de sal, estímulos agudos de postura e corticotrófico e angiotensina II induziram respostas similares de aldosterona plasmática devido à provável ativação da via metabólica tardia.

ABSTRACT

Methods for the determination of plasma aldosterone and cortisol, by radioimmunoassay, were performed utilizing highly specific antisera.

With this methodology it was possible to evaluate cortisol and aldosterone secretion, in six normal subjects,

submitted to a basal rice diet ($< 10 \text{ Na}^+ \text{ mEq.day}^{-1}$) + (100 mEq.day^{-1}) on standing and recumbent positions, the effects of exogenous cortrosyn ($\beta 1-24$ ACTH) and angiotensin II, and the same manoeuvres with the progressively increased Na^+ content of the diet (120 and 180 mEq.day^{-1}).

Aldosterone basal levels decreased with the increase of Na^+ content in the diet. However, there were no significant differences between the relative increments observed on the recumbent position, at the three levels of sodium intake.

The relative increase of plasma aldosterone after ACTH was similar for each basal level of aldosterone induced by different sodium intakes. The responsiveness of aldosterone secretion to cortrosyn and standing position was similar, with no relation to the sodium intake.

The infusion of Angiotensin II induced any increase in plasma aldosterone, and the relative increment in the levels of the hormone were higher with high sodium, than on the rice diet.

The average basal cortisol value at the different levels of sodium intake was significantly different being greater on the basal, rice diet, and there was a decrease in cortisol level after recumbency, with the three diets.

The injection of ACTH induced similar cortisol secretion with no relation to the sodium intake.

The infusion of non-hypertensive doses of angiotensin II resulted in an anomalous fall in cortisol level, probably because of "shunt" of substrates to biosynthesis with the added effect of cortisol diurnal rhythmicity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ABRAHAM, G. E. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 75 (Suppl. 183), 1974.
2. ABRAHAM, G. E. Reliability criteria for steroid radioimmunoassay. In: GUPTA, D., editor. *Radioimmunoassay of steroid hormones*. sem local, editor, 1975. p.9-17.
3. ABRAHAM, G. E.; BUSTER, J. E.; TELLER, R. C. Radioimmunoassay of plasma cortisol. *Analyt. Lett.*, 5(11):757-85, 1972.
4. BERSON, S. A. & YALLOW, R. S. General methodology. In: YALLOW, R. S., compilador. *Methods of radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.1-36.
5. BERSON, S. A. & YALLOW, R. S. General principles of radioimmunoassay. *Clin. chim. Acta*, 22:51-69, 1968.
6. BURTON, R. M. & WESTPHAL, U. Steroid hormone-binding protein in blood plasma. *Hormonol.*, 21(3):253-76, 1972.
7. CHERVU, L. R. & MURTY, D. R. L. Radiolabeling of antigens: procedures and assessment of properties. *Semin. Nucl. Med.*, 5(2):157-72, 1975.
8. ENEROTH, P. & NYSTROM, E. A study on liquid-gel partition of steroids and steroid derivatives on lipophilic saphadex gels. *Biochim. biophys. Acta*, 144:149-61. 1967.

(* As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas no NS-66 do ABNT.

9. GARZA, R. & ABRAHAM, G. E. Comparison between two assays for plasma cortisol. *Analyt. Lett.*, 5(11):767-71, 1972.
10. GELLER, L. E. & SILBERMAN, N. Stability of labeled compounds after storage. In: BRANSOME JR., E. D., editor. *The current status of liquid scintillation counting*. New York, N. Y., Grune and Shatton, 1970. p.137-41.
11. HANING, R.; McCRAKEN, J.; CYR, M. S.; UNDERWOOD, R.; WILLIAMS, G.; ABRAHAM, G. The evolution of titer and specificity of aldosterone binding antibodies in hyperimmunized shepp. *Steroids*, 20:73-88, 1972.
12. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY AND INTERNATIONAL UNION BIOCHEMISTRY. COMMISSION OF BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Revised tentative rules for nomenclature of steroids. *Biochim. biophys. Acta*, 164:54-82, 1968.
13. JAMES, V. H. T. Basic concepts of steroid radioimmunoassay. In: GUPTA, D. editor. *Radioimmunoassay of steroid hormones*. sem local, editor, 1975. p.1-7.
14. JENKINS, J. S. The estimation of cortisol in blood. In: JENKINS, J. S. *An introduction to biochemical aspects of the adrenal cortex*. London, Arnold, 1968. p.87-92.
15. KAPLAN, N. N. Adrenal causes of hypertension. *Arch. Intern. Med.*, 133:1001-6, 1974.
16. KLEMM, W. & GUPTA, D. A routine method for radioimmunoassay of plasma cortisol without chromatography. In: GUPTA, D., editor. *Radioimmunoassay of steroid hormones*. sem local, editor, 1975. p.143-51.
17. LANGAN, J.; JACKSON, R.; ADLIN, E. V.; CHANNICK, B. A simple radioimmunoassay for urinary aldosterone. *J. clin. Endocr. Metab.*, 38(2):189-93, Feb. 1974.
18. MALVANO, R. & ROLLERI, E. Methodological aspects of steroid radioimmunoassay. In: GUPTA, D. editor. *Radioimmunoassay of steroid hormones*. sem local, editor, 1975. p.27-53.
19. MAYES, D.; FURUYAMA, S.; KEM, D. C.; NUGENT, C. A. A radioimmunoassay for plasma aldosterone. *J. clin. Endocr. Metab.*, 30(5):682-5, May, 1970.
20. MELO, E. H. L. *Padronização laboratorial dos lípidos séricos, em especial dos adultos normais*. Goiania, 1970. (Tese de livre docência).
21. OKADA, H. *Padronização da técnica de medida do cortisol no plasma humano por competição à proteína fixadora (transcortina)*. São Paulo, 1975. (Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).
22. RODBARD, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassay and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.*, 20:1265-70, 1974.
23. SETCHELL, K. D. R. & SHACKLETON, C. H. L. The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on sephadex LH-20. *Clin. chim. Acta*, 47:381-8, 1973.
24. VANDER, A. J. Control of renin release. *Physiol. Rev.*, 47:359, 1967.
25. VARŞANO-AHARON, N. & ULICK, S. Further simplifications in the immunoassay of plasma aldosterone. *J. clin. Endocr. Metab.*, 39(2):375-9, Aug. 1974.

26. VETTER, H.; VETTER, W.; SIEGENTHALER, W. Preparation of an antiserum specific to aldosterone and its application in radioimmunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radioimmunoassay and relat procedures in medicine: proceedings of a symposium on... held in Instambul, 10-14 September 1973, v.2. Vienna, 1974. p.87-96. (Proceedings series).*
27. VETTER, W.; SIEGENTHALER, W.; VETTER, H. Non chromatographic radioimmunoassay for aldosterone antissera, assay and application of the method. In: GUPTA, D. editor. *Radioimmunoassay of steroid hormones. sem local, editor, 1975. p.153-63.*
28. VIEIRA, J. G. H. *Radioimunoensaio do cortisol sérico: metodologia e aplicações clínicas.* São Paulo, 1977. (Dissertação de mestrado).
29. WALDHAUSL, W.; HAYDL, H.; FRISCHAUF, H. Determination of aldosterone by Sephadex LH-20 chromatography and radioimmunoassay. *Steroids*, 20(6):727-36, 1972.
30. WILLIAMS, G. H. & DLUHY, R. G. Aldosterone biosynthesis. *Am. J. Med.*, 53:595-605, 1972.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 - Pinheiros
CEP 05508
01000 - São Paulo - SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telefônico - IEATOMICA
Telex - 011-23592 IENA BR