

BR 790 1590



**"DOSAGEM DE CORTISOL PLASMÁTICO POR COMPETIÇÃO  
À PROTEÍNA FIXADORA (CBG)"**

**Helena Okada, Marcos Antonio Tambascia, Bernardo Léo Wajchenberg e  
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**PUBLICAÇÃO IEA 482  
CABRR-AAMRR 5**

**AGOSTO/1977**

**"DOSAGEM DE CORTISOL PLASMÁTICO POR COMPETIÇÃO  
À PROTEÍNA FIXADORA (CBG)"**

**Helena Okada, Marcos Antonio Tambescia, Bernardo Léo Wajchenberg e  
Rômulo Ribeiro Pieroni**

**CENTRO DE APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE RADIOISÓTOPOS E DE RADIAÇÕES**  
**Área de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e de Radiações**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
**SÃO PAULO - BRASIL**

## **CONSELHO DELIBERATIVO**

### **MEMBROS**

Klaus Reinach - Presidente  
Roberto D'Uva Vot  
Heico Modesto da Costa  
Ivano Humbert Marchesi  
Admar Carvethini

### **PARTICIPANTES**

Pygma Erubesc Assovado Barotto  
Flávio Gott

## **SUPERINTENDENTE**

R. P. A. Ribeiro Piresoni

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal 11 045 (Pinheiros)  
Cidade Universitária "Armando de Barros Oliveira"  
SÃO PAULO - BRASIL

---

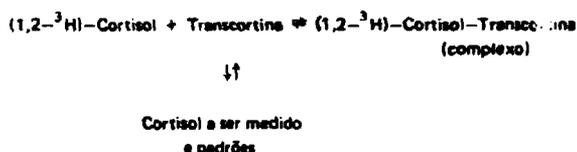
**NOTA:** Este trabalho foi conferido pelo autor (depois de composto e sua redação está conforme o original), sem qualquer correção de manuseio.

# "DOSAGEM DE CORTISOL PLASMÁTICO POR COMPETIÇÃO À PROTEÍNA FIXADORA (CBG)"<sup>1</sup>

Helena Okada, Marcos Antonio Tambascia, Bernardo Léo Wejchenberg e  
Rômulo Ribeiro Pironi

## RESUMO

A concentração de cortisol plasmático foi medida por competição à proteína fixadora de origem humana (transcortina), perante o sistema:



após a extração da amostra com diclorometano, sem purificação do extrato.

É um método inteiramente aplicável na rotina clínica, sendo utilizados 100  $\mu\text{l}$  de plasma por análise.

A média  $\pm$  EPM<sup>2</sup> de valores normais em indivíduos em jejum foi de (13,62  $\pm$  5,43)  $\mu\text{g}/100$  ml de plasma.

## I - INTRODUÇÃO

A quantificação de cortisol plasmático pode ser feita pelo método químico baseada na reação de fenil-hidrazina com agrupamento 17-21-dihidroxi-20-ceto da cadeia lateral dos corticosteróides<sup>(10)</sup>, pelo método fluorimétrico de Mattingly<sup>(4)</sup> e pela técnica de competição à proteína fixadora<sup>(7)</sup>.

A dosagem de cortisol por competição à proteína fixadora é baseada nas várias reações de equilíbrio entre o hormônio livre (não ligado à proteína + liberado após a extração com solvente orgânico, ambos não conjugados a ácido glucurônico) e complexo proteína fixadora-hormônio radioativo<sup>(9)</sup>. A proteína fixadora, neste sistema, tem função idêntica ao anticorpo usado em radioimunoensaio, apresentando elevada afinidade, alta especificidade relativa e baixa capacidade fixadora para a substância a ser analisada, fornecendo locais específicos de fixação.

## II - MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 - Reagentes Químicos e Soluções

Para a extração de 17-hidroxi-corticosteróides plasmáticos foi utilizado diclorometano p.a. sem purificação prévia. Como fonte de proteína fixadora foi utilizado para o ensaio, uma mistura de

(1) Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e de Radiações; Área de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e de Radiações (AAMRR); Instituto de Energia Atômica, São Paulo, SP.

(2) EPM = erro padrão de média

plasmas convenientemente colhidos de indivíduos com hipofunção adrenal primária da Primeira Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Cada mistura é testada quanto a concentração de esteróides endógenos e quanto a percentagem de deslocamento do hormônio não marcado, sob condições do ensaio.

A solução transcortina-traçador é preparada, no momento do uso, tomando-se quantidade necessária do tampão fosfato pH 7,4-0,01M e adicionando-se cortisol tritiado e fonte de proteína testada.

Para separação de hormônio livre do ligado à transcortina utilizou-se suspensão de carvão dextrana T-70, em que o hormônio livre se fixa ao carvão ativado, permanecendo complexo hormônio-transcortina no supernadante.

O cortisol radioativo antes de ser utilizado como traçador nos ensaios, foi submetido a uma purificação por cromatografia em camada delgada.

Para a contagem de radioatividade, usou-se espectrômetro de cintilação líquida (Liquid Scintillation System LS-150, Beckman), onde se mede apenas supernadante.

## 2 – Representação Esquemática da Metodologia

A Figura 1 mostra em linhas gerais a metodologia para a quantificação de cortisol onde 100  $\mu$ l de amostra são adicionados a um tubo contendo de 500 a 700 cpm (contagens por minuto) de cortisol tritiado, que servem como "pulso" para verificar as perdas de hormônio durante o processamento do material. A extração é feita com diclorometano e toma-se uma alíquota da fase orgânica para a estimação de perdas e outra para a mensuração de cortisol adicionando-se uma solução de transcortina-cortisol tritiado e separando a fração livre por adsorção em carvão.

## 3 – Método:

### Preparação de Amostra de Plasma:

O plasma colhido em condições baseais de uma veia periférica, após trinta minutos de manutenção de cateterização, é centrifugado imediatamente, e guardado a 4°C.

A etapa da extração é feita usando 100  $\mu$ l de plasma adicionados a 500-700 cpm de cortisol tritiado em 3,0 ml de diclorometano, por agitação durante 60 segundos no agitador "Vortex".

Despreza-se a fase protéica por aspiração a vácuo e tomam-se de 500 a 1000  $\mu$ l da fase orgânica para o ensaio e 1000  $\mu$ l para a determinação de perdas durante o processamento da amostra de plasma. Estas alíquotas são evaporadas à temperatura ambiente.

### Quantificação:

#### a) COMPETIÇÃO:

Os 17-hidroxi-corticosteróides plasmáticos extraídos e evaporados são incubados com 1000  $\mu$ l de solução de transcortina-cortisol tritiado em banho-maria a 45°C, sob agitação, para a completa dissolução dos mesmos. A seguir, são incubados a 4°C por 15 minutos, sob agitação, para a competição dos esteróides introduzidos no meio de reação com o cortisol tritiado ligado como complexo à transcortina.

## b) SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO LIVRE:

Os 17-hidroxi-corticosteróides livres são adsorvidos com 0,5 ml de suspensão de carvão ativado recoberto com dextrane T-70 (125 mg% de carvão Norit "A" e 12,5 mg% de dextrane T-70). Após dez minutos o adsorvente do meio de incubação é removido por centrifugação a 4°C.

## c) CONTAGEM DA RADIOATIVIDADE:

Mil microlitros do sobrenadante são transferidos para um frasco de contagem e são dissolvidos em 10 ml de solução cintiladora para a fase aquosa.

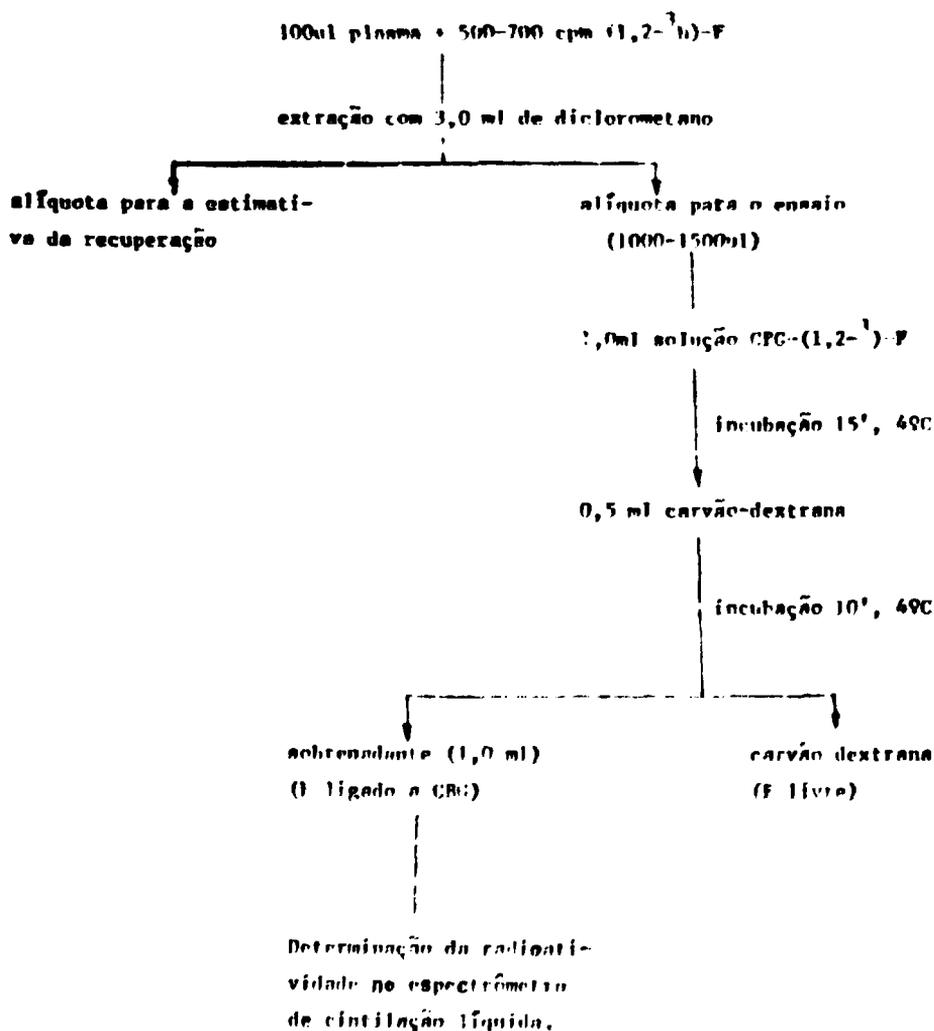


Figura 1 - Representação Esquemática da Metodologia para a Quantificação do Cortisol (17-hidroxi-corticosteróides) plasmático por Competição à Proteína Fixadora (CBG).

#### Obtenção das Curvas de Dose-Resposta:

A contagem por minuto dos 17-OH-corticosteróides conjugados a CBG é colocada em ordenada diretamente contra quantidades progressivamente crescentes (nanograma) de cortisol de referência em abscissa, num papel de escala linear (Figura 2). Pode-se também utilizar a relação % B/T ou % B/B<sub>0</sub> (Figura 3) onde:

- B — cpm de cada nível de cortisol de referência;
- B<sub>0</sub> — cpm na ausência de cortisol de referência;
- T — cpm da radioatividade total introduzido no sistema.

### III — RESULTADOS

Foram feitas 61 determinações de cortisol em amostras de plasma de indivíduos normais em jejum

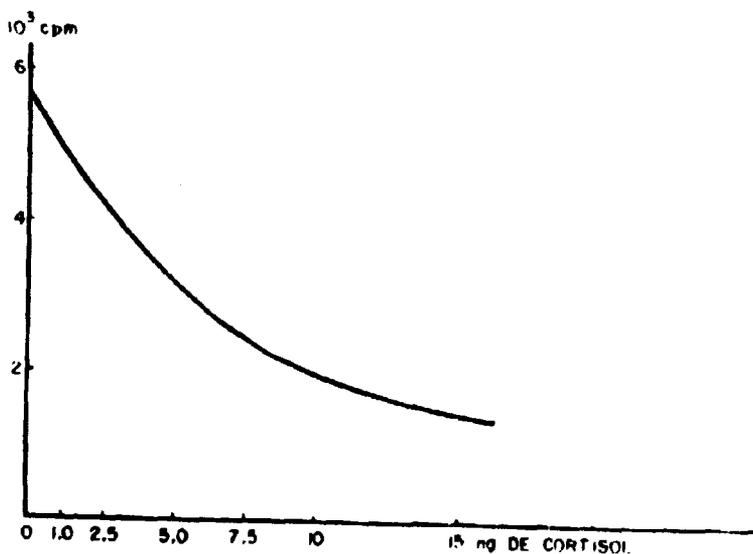
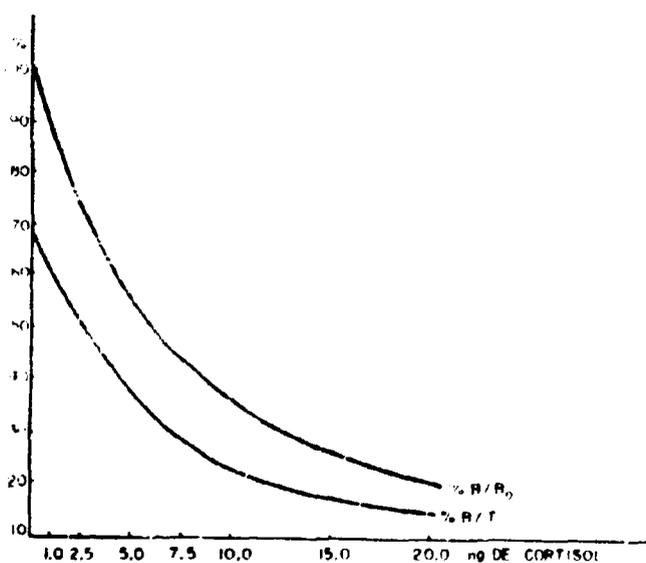


Figura 2 — Curva Padrão para o Ensaio de Cortisol (17-hidroxicorticosteróides) Plasmáticos. As contagens por minuto (cpm) do sobrenadante da solução-padrão são projetadas como uma função da concentração conhecida do cortisol. Diluição do plasma: 1,2%.



**Figura 3** - Curva Padrão para o Ensaio de Cortisol (17-hidroxi-corticosteróides) Plasmático.  
 As percentagens B/B<sub>0</sub> e B/T na solução-padrão são projetadas como uma função da concentração conhecida de cortisol.  
 B<sub>0</sub> - contagens da fração de cortisol unido à proteína na ausência do hormônio não-marcado  
 B - contagens da fração de cortisol unido à proteína na presença do hormônio não-marcado.  
 T - Radioatividade  
 Diluição da proteína: 1,2%

Na Tabela 1, temos os valores (média ± E.P.M.) das dosagens de cortisol. São computados também os valores de outros laboratórios.

Tabela I

Níveis de Cortisol Plasmático, em Indivíduos normais,  
às 8:00h da manhã (média  $\pm$  E.P.M.)

$\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de plasma (média $\pm$ E.P.M.)	referência
13,6 $\pm$ 5,4	presente trabalho
12,3 $\pm$ 0,8	Newsome Jr. et alii (8)
12,8 $\pm$ 0,5	Hamanaka et alii (2)
11,7 $\pm$ 3,7	Iturzaeta et alii (3)
16,0 $\pm$ 3,0	Jubiz et alii (5)
9,8 $\pm$	Fraser and James (1)
14,8 $\pm$ 3,6	Leclercq et alii (6)

#### IV – DISCUSSÃO

Devido a grande importância clínica na determinação global de 17-hidroxi-corticosteróides plasmáticos para diagnóstico de moléstias adrenais e hipofunção hipofisária, a medida de cortisol circulante por fixação competitiva à proteína veio substituir método químico que necessita de volumes grandes de plasma e com sensibilidade a níveis nunca inferiores a 5  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  de plasma e método fluorimétrico que necessita de reagentes de elevada pureza de difícil obtenção<sup>(10)</sup>.

Como mais de 90% de 17-hidroxi-corticosteróides normalmente circulante são representados pelo cortisol<sup>(11)</sup>, do ponto de vista prático, a medida destes esteróides é índice fiel dos níveis de cortisol plasmático. Assim sendo, a etapa de purificação do extrato plasmático é normalmente suprimida.

Esta suposição não é válida em condições em que aumentam outros corticosteróides plasmáticos que não o cortisol, como no síndrome adrenogenital e na realização de teste de metapirona (metirapone) em que estão aumentados os níveis de 11-Jesoxicortisol e corticosterona.

#### ABSTRACT

The concentration of plasmatic cortisol was measured by competition to the binding protein (transcortin), according to the system:



↓↑

Cortisol to be measured  
and standards

after extracting the samples with dicloromethane.

It's a suitable method for clinical routine; being used 100  $\mu\text{l}$  of plasma in each analysis.

The normal mean  $\pm$  standard error mean in 8:00 A.M. fasting subjects was 13,82  $\pm$  5,43  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  of plasma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRASER, R. & JAMES, V.H.T. *J. Endocrinol.* 40:59, 1968 apud NEWSOME JR., H.H. et alii. The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisone in human plasma. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 34:482, 1972.
2. HAMANAKA, Y. et alii. Effects of surgery on plasma levels of cortisol, corticosterone and non-protein-bound-cortisol. *Acta endocr.*, Kovenhavn, 64:439-51, 1970.
3. ITURZAETA, N.F. et alii. Measurement of plasma cortisol in children and adults: a comparison of the double isotope derivative assay, competitive protein-binding analysis and the modified competitive protein-binding analysis. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 30:185-9, 1970.
4. JENKINS, J.S. The estimation of cortisol in blood. In: \_\_\_\_\_. *An introduction to biochemical aspects of the adrenal cortex*. London, Arnold, 1968. Cap.11, p.87-92.
5. JUBIZ, W. et alii. Plasma metyrapone, adrenocorticotrophic hormone, cortisol, and deoxycortisol levels: sequential changes during oral and intravenous metyrapone administration. *Archs. intern. Med.*, Chicago, 125:468-71, 1970.
6. LECRERO, Q. et alii. Le dosage par compétition du cortisol plasmatique: modification de la méthode de Murphy. *Revue fr. Etud. clin. biol.*, Paris, 14:815-9, 1969.
7. MURPHY, B.E.P. Methodological problems in competitive protein-binding techniques; the use of Sephadex column chromatography to separate steroids. *Acta endocr.*, Kopenhagen (suppl. 147): 37-60, 1970.
8. NEWSOME, JR., H.H. et alii. The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisone in human plasma. *J. clin. Endocr. Metab.*, Springfield, Ill., 34..
9. OKADA, H. et alii. Medida de cortisol plasmático por técnica de união competitiva à proteína conjugadora. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 25(6) supl.:151, 1973. [25a. reunião anual da SPBC, Julho de 1973].
10. PETERSON, R.E. et alii. Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone. *Analyt. Chem.*, Easton, Pa., 30(1):32-7, 1974.
11. WAJCHENBERG, B.L. et alii. Effect of estrogen administration on plasma cortisol fractions in normal and panhypopituitary females. *Metabolism*, Baltimore, 23(4):337-42, 1974.

