

TEST CORTO DE METOPIRONA CON DETERMINACION SIMULTANEA DE CORTISOL Y 11- DESOXICORTISOL EN SUERO

C.A. TAFURT, R. DE ESTRADA, M. BARRERA, G. RAMIREZ

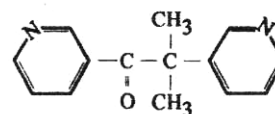
En este trabajo se buscó el mejor método de análisis de 11—desoxicortisol por competencia proteica partiendo del trabajo de Murphy. Se estudiaron como fuentes de transcortina: suero humano normal, suero de embarazada y suero de mujer ovariectomizada tratada con estrógenos y dexametasona. Las proteínas se caracterizaron por el método de Scatchard encontrándose: para suero normal, una constante de afinidad de $4.2 \times 10^8 M^{-1}$ y la concentración de sitios ligadores de $7.5 \times 10^{-7} M$; para suero de embarazada la misma afinidad y una concentración de $12.0 \times 10^{-7} M$; para el de mujer ovariectomizada la afinidad fué de $6.7 \times 10^8 M^{-1}$ y la concentración de $13.0 \times 10^{-7} M$. Las fuentes de transcortina más ade-

cuadas para el análisis fueron los sueros de embarazada y de mujer ovariectomizada a una concentración de 2% en ambos casos.

Se aplicó la técnica a un test corto de metopirona en 11 sujetos normales. Los valores basales de 11—desoxicortisol fueron de 0 a $2 \mu g./100$ ml. de suero y se elevaron hasta $11-24 \mu g./100$ ml. después de una dosis única de 2 g. de metopirona.

INTRODUCCION

El test de la metopirona se emplea para estudiar la reserva funcional hipofisiaria de secreción de corticotropina (1). La metopirona es un compuesto sintético con propiedades adrenocorticotásticas cuya fórmula estructural es:



2 metil, 1,2 bis (3—piridil), 1 — propanona

Este compuesto inhibe en forma específica la biosíntesis de cortisol, corticosterona y aldosterona, al bloquear la acción en-

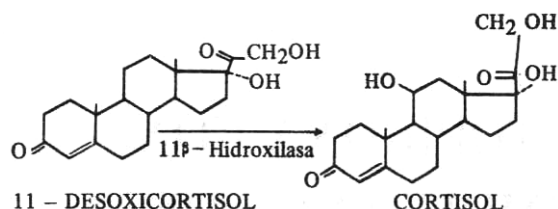
Este trabajo se realizó en el Instituto de Asuntos Nucleares.

Carlos Alberto Tafurt: Jefe del Servicio de Endocrinología, Hospital Militar Central; Dra. Ruth de Estrada Profesora del Departamento de Química, Universidad Nacional; Srta. Martha Barrera y Sr. Guillermo Ramírez: Estudiantes del Departamento de Química, Universidad Nacional, Bogotá.

Solicitud de separatas al Dr. Tafurt.

zimática de la 11-hidroxilasa, existente en la corteza adrenal.

En el caso de la biosíntesis de cortisol, el preparado inhibe la siguiente reacción:



Esta inhibición produce el descenso del nivel sanguíneo de cortisol, lo cual por el mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por esta hormona a nivel hipotalámico—hipofisario, induce la secreción de una mayor cantidad de corticotropina. El aumento de la concentración de ACTH en el plasma va a estimular la corteza suprarrenal, que al estar bloqueada en su producción de cortisol por efecto de la metopirona, va a producir mayores cantidades del precursor 11-desoxicortisol; este incremento no ocurre o se produce de una manera defectuosa cuando existe cualquier proceso patológico que afecte la integridad funcional del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.

De lo expuesto se deduce la gran importancia clínica de este test de reserva de ACTH para casos de insuficiencia hipofisaria incompleta, cuyo diagnóstico clínico no es posible y en los cuales los valores hormonales basales suelen ser normales.

El método más difundido y el único empleado en algunos centros hospitalarios de Colombia, es el basado en el trabajo original de Liddle (2), en el cual se determinan 17-hidroxicorticoides (por el método de Porter-Silber), en orina de 24 horas durante tres días consecutivos, administrando la metopirona durante el segundo día a razón de 750 mg. cada cuatro horas, hasta completar 4.5 g.

En este trabajo se describe una técnica para determinar 11-desoxicortisol en suero por un método de competencia proteica y se practica en 11 sujetos sanos un test corto

de metopirona, con determinación simultánea de cortisol y 11-desoxicortisol.

MATERIAL Y METODOS

1.— Material Clínico. A 11 personas sanas que asistieron a la consulta externa del Hospital Militar se les tomó muestra de sangre a las 8:00 horas del primer día. A las 24:00 se les administró ocho cápsulas de 250 mg. de metopirona y a las 8:00 del segundo día se les tomó muestra de sangre. No se usó anticoagulante al tomar las muestras y los sueros se guardaron a -15° C. hasta el momento de procesarlos.

2.— Método de competencia proteica para determinar 11—Desoxicortisol. El método original de Murphy (3) fué adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio mediante modificaciones que permitieron obtener los mejores resultados. Para el análisis se deben realizar dos pasos fundamentales:

a.— Preparación de la muestra: A 0.5 ml. de suero se agregan 6 ml. de CCl_4 , se agita por un minuto el tubo de ensayo en un vortex y se centrifuga durante cinco minutos; por medio de una trompa de vacío se elimina la fase acuosa. De la fase orgánica se toma una alícuota de 4 ml. que se evapora a sequedad por medio de una corriente de aire y en un baño a 45° C.

b.— Cuantificación: Se efectúa una curva de calibración de la siguiente manera: en tubos de ensayo se adicionan 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml. de un patrón de 11-desoxicortisol en alcohol etílico que contiene 80ng./ml. El solvente se evapora por medio de una corriente de aire en un baño de agua a 45° C.

A todos los tubos con patrones y con los extractos de las muestras se les agrega 1 ml. de solución de transcortina al 2%, que contiene aproximadamente 40.000 dpm de 11-desoxicortisol- $1,2\text{-}^3$ H. Los tubos se dejan en incubación por 10 minutos a 45° C. y luego a 4° C. por una hora.

A cada tubo se le adicionan 40 mg. de florisil (60-100 mallas) y se agita por dos

minutos. Se dejan en reposo por 20 minutos a 40°C., se toma una alícuota de 0.5 ml. de cada uno de los sobrenadantes la cual se lleva a un frasco de centelleo que contiene 5 ml. de solución centelladora compuesta por 4g. de 2,5- difenil oxazole (PPO), 0.04 g. de p - bis - [2- (4- metil - 5 - fenil oxazoil)] benceno (dimetil - POPOP), 20 ml. de etanol absoluto y tolueno para llevar a un litro. El conteo de la radioactividad se efectúa por 200 segundos en un contador de centelleo líquido Tricarb, modelo 3320 de la Packard.

Los patrones así como las muestras se procesan por duplicado.

El cortisol se determinó por un método de competencia proteica ya estandarizado

en nuestro laboratorio y que no difiere fundamentalmente del establecido por Murphy (3).

RESULTADOS

En este trabajo se estudiaron los parámetros más importantes que afectan el análisis de 11-desoxicortisol por competencia proteica, hallándose que las condiciones óptimas de trabajo fueron las informadas en la sección anterior.

Se ensayaron varias fuentes de transcortina humana para el análisis:

1.— Transcortina normal: pool de suero normal de 10 personas sin enfermedad endocrina.

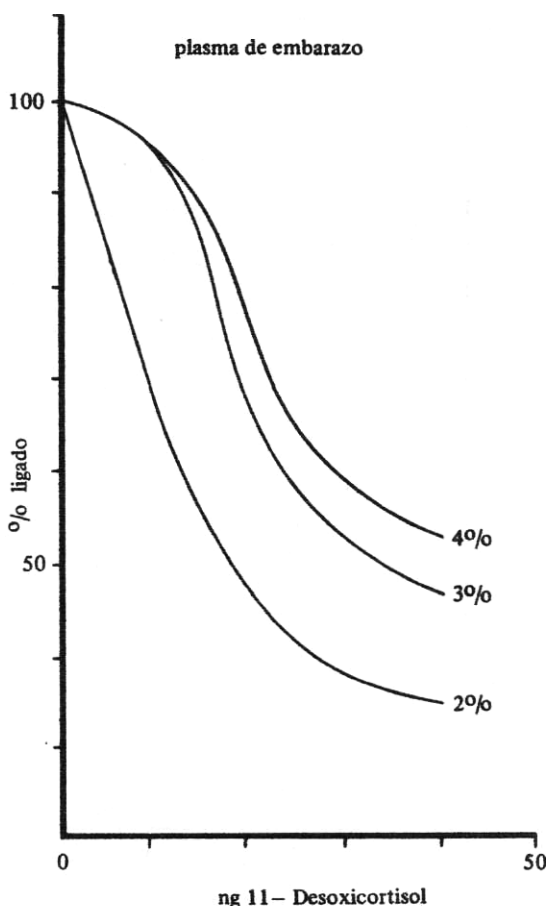


Figura 1 - Curvas de calibración con diferentes concentraciones de transcortina.

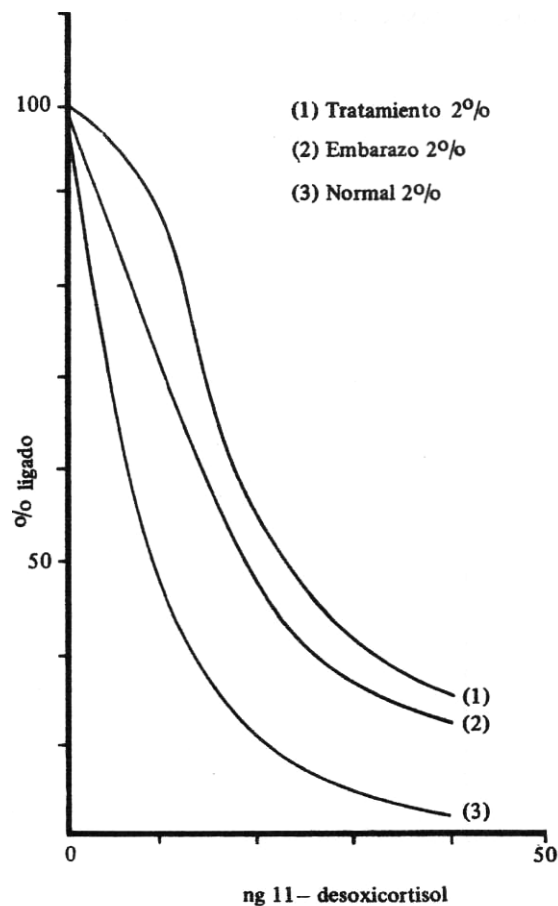


Figura 2 - Curvas de calibración con diferentes fuentes de transcortina.

2.— Transcortina de embarazo: pool de suero de 30 mujeres sanas en el último trimestre de embarazo.

3.— Transcortina de tratamiento: pool de suero de tres mujeres ovariectomizadas, estimuladas con estrógeno y tratadas con dexametasona.

Se observó que las curvas de calibración se ven afectadas tanto por el origen como por la concentración de la proteína empleada. Esto puede verse en las Figuras 1 y 2.

Se hicieron estudios de reproducibilidad tanto para la curva de calibración hecha con una misma fuente de transcortina (Figura 3), como para sueros que se analizaron varias veces en una misma curva de calibración y varias veces en diferentes curvas; los resultados se anotan en la Tabla 1.

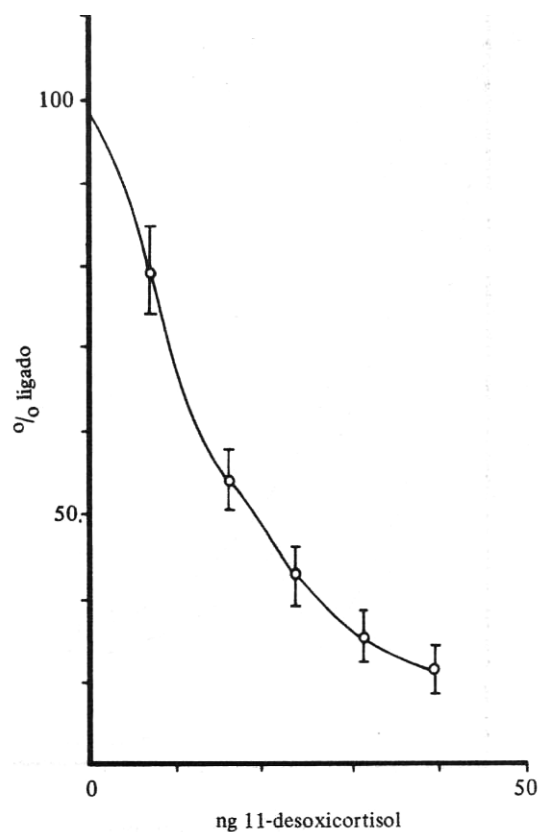


Figura 3- *Reproducibilidad de la curva de calibración (n=10).*

Tabla 1 - *Reproducibilidad.*

| Promedio µg/100 ml. | DE µg/100 ml. | % variación | n |
|------------------------|------------------|-------------|-----------------------|
| 8.4 | 0.8 | 9.5 | 10 En un ensayo |
| 15.4 | 1.2 | 7.8 | 10 |
| 8.6 | 0.9 | 10.5 | 10 Diferentes ensayos |

Por método descrito por Scatchard (4), se determinó la constante de afinidad de la transcortina por el 11-desoxicortisol así como la concentración de sitios ligadores en la proteína con gran afinidad por el esteroide. Las curvas se muestran en la Figura 4 y los resultados en la Tabla 2. El valor de la constante de afinidad se obtiene de la pendiente de la curva de Scatchard y la concentración de los sitios ligadores de la intersección de esta con la absisa.

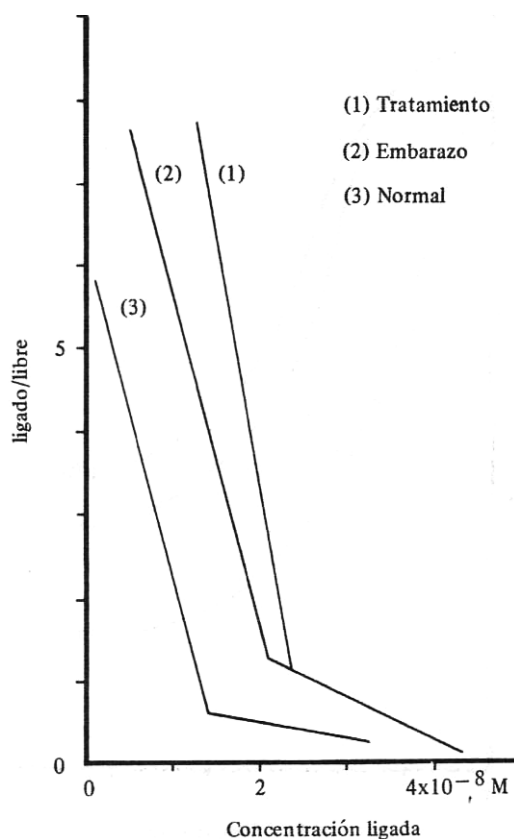


Figura 4- *Curvas de Scatchard.*

Tabla 2 — Constante de afinidad de transcortina por 11-desoxicortisol y concentración de sitios ligadores de alta afinidad.

| Transcortina | Constante de afinidad | Concentración de sitios ligadores |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Tratamiento | $6.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ | $2.41 \times 10^{-8} \text{ M}$ |
| Embarazo | $4.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ | $2.14 \times 10^{-8} \text{ M}$ |
| Normal | $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ | $1.42 \times 10^{-8} \text{ M}$ |

Los análisis de sueros de pacientes tratados con metopirona fueron efectuados con transcortina de tratamiento y de embarazo empleando el suero fuente de transcortina diluido al 2% en ambos casos ya que esta concentración se encontró como la más adecuada para el rango del análisis. Los resultados de las determinaciones de 11-desoxicortisol y de cortisol en dichos pacientes se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3— Valores de 11-desoxicortisol y cortisol antes y después de Metopirona.

| | 11-desoxicortisol | cortisol | (n- 11) |
|-----------------|---|--|---------|
| Pre-metopirona | 0.7 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ - 0.4 D.E. | 11.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ - 1.5 DE | |
| Rango | 0 - 2 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. | 8.5- 19.6 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. | |
| Post-metopirona | 17.5 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ - 4.2 DE | 4.9- 1.8 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. | |
| Rangó | 11- 24 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. | 2.1- 7.0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. | |

DISCUSION

La constante de afinidad y la concentración de sitios ligadores son criterios importantes en la evaluación de la calidad de las proteínas transportadoras, receptores citoplasmáticos y anticuerpos destinados a los análisis por saturación.

De la Figura 4 y de la Tabla 2 se deduce que las transcortinas de embarazo y normal muestran una constante de afinidad igual, mientras que la transcortina de tratamiento presenta una mayor afinidad por el esteroide 11-desoxicortisol. La diferencia de la calidad de la proteína inducida con estrógenos en mujeres ovariectomizadas y la que se encuentra en personas sanas y en el embarazo, había sido observada por otros investigadores, aunque sin especificar el tipo de comportamiento.

Se encontró que la concentración de sitios ligadores aumenta durante el embarazo posiblemente por los altos niveles de estrógenos y lo mismo ocurre al inducirlos iatrogénicamente en mujeres ovariectomi-

zadas, lo cual está de acuerdo con otros autores (5). En suero normal el nivel de sitios ligadores es cercano a la mitad del valor observado durante el embarazo.

Cuando se trata de escoger una fuente de transcortinas adecuada para el análisis de 11-desoxicortisol utilizando proteínas transportadoras de diferentes especies la utilidad de los dos parámetros mencionados antes: afinidad y concentración de sitios de enlace, es evidente. Pero cuando se quieren establecer las condiciones de trabajo usando proteínas transportadoras de una misma especie, como en este trabajo, es de mayor utilidad comparar la concentración, ya que la constante de afinidad varía poco. Para la determinación de 11-desoxicortisol en las condiciones establecidas en este estudio, empleando transcortina humana, es recomendable tener una concentración de sitios ligadores entre 2.0 y $2.5 \times 10^8 \text{ M}$, la cual permite obtener una buena pendiente en la curva de calibración. En la Figura 1 se observa el efecto del aumento de la concentración de transcortina. Cuando se emplea el suero fuente de transcortina a concentraciones de

3 y 4%, se obtiene menor sensibilidad que con una concentración de 2%, y por tanto su utilidad disminuye notablemente.

La reproducibilidad del método es buena y los coeficientes de variación menores de 10% garantizan un resultado confiable. En la Tabla 1 se observa que el coeficiente de variación entre ensayos es ligeramente mayor que el que se encuentra dentro de un mismo análisis.

Se estudió la reproducibilidad de la curva de calibración procesando los patrones en diferentes días y con la misma fuente y concentración de transcortina. Estos ensayos se hicieron con el fin de verificar la estabilidad de la proteína congelada durante cierto tiempo, y además para tener una idea del error que se introduce en las medidas por la variación del enlace en los diferentes puntos de la curva. En las muestras se presenta mayor variación que en los patrones ya que en estos no se efectúa extracción con solvente.

El factor limitante de la exactitud del método es la extracción del 11-desoxicortisol de las muestras de suero con tetracloruro de carbono. Se obtuvieron extracciones de 45.6% y 47.6% usando dos lotes diferentes de solvente. Esto hace ver la necesidad de determinar la recuperación en cada caso.

Los resultantes del test corto de metopirona realizados en los 11 sujetos sanos muestran que la elevación del 11-desoxicortisol tanto en el valor promedio como en el intervalo de variación, permite diferenciar claramente los niveles basales de los post-metopirona, ya que no se presentan entrecruzamientos entre los datos; esta ventaja hace que el método expuesto pueda considerarse más preciso que el que emplea la determinación de 17-hidroxicorticoides en orina, puesto que en este caso sí puede ocurrir superposición de los valores pre y post-metopirona (6,7).

Otras ventajas del método descrito en este trabajo son: la reducción de la dosis de metopirona que evita molestias al paciente

y disminuyé el costo; se elimina la recolección larga, tediosa y muchas veces incompleta de orina de 24 horas durante tres días; se hace determinación directa en plasma o suero de 11-desoxicortisol, cuyo incremento es la respuesta directa a la inhibición inducida por la metopirona, superando de esta manera técnicas inespecíficas como la de 17-OHCS. Por último, se requieren solo dos muestras pequeñas de sangre de 2 ml. cada una, para determinar simultáneamente cortisol y 11-desoxicortisol. La determinación de cortisol permite ver si hay un descenso en el nivel de esta hormona, lo cual indica que la metopirona se absorbió debidamente y ha producido el bloqueo suprarrenal deseado. Se evitan así falsas interpretaciones en el comportamiento del 11-desoxicortisol.

SUMMARY

In this optimal conditions the determination of 11-desoxycortisol by the competitive protein binding method of Murphy, were studied. Three sources of transcortin were analyzed: Serum from normal subjects, serum from pregnant women and serum from ovariectomized women treated with estrogens and dexamethasone. The proteins were characterized by the Scatchard method and the following values were found: for sera from normal subjects, an affinity constant of $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and a concentration of binding sites of $7.5 \times 10^{-7} \text{ M}$; for sera from pregnant women, the same affinity constant and a concentration of $12.0 \times 10^{-7} \text{ M}$; for sera from ovariectomized women an affinity constant of $6.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and a concentration of $13 \times 10^{-7} \text{ M}$.

The best sources of transcortin for the analysis were the sera from pregnant women and ovariectomized women at a concentration of 2% in both cases.

A short test of Metopirone was applied to 11 normal subjects. Basal values of 11-Desoxycortisol were from $02 \mu\text{g./100 ml.}$ of serum and were elevated to $11-24 \mu\text{g./100 ml.}$ after a single dose of 2 g. Metopirone.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bruton, J., Ting Kai Li and Smith, G.D.: Comparison of results by four different procedures for determination of 17 - hydroxycorticoids. *Clin. Chem.* 19: 748, 1973.
- 2.- Butt, W.R.: *Hormone Chemistry*, 324. D. Van Nostrand Co. L., London, 1967.
- 3.- Murphy, B.E.P.: Some studies of protein binding of steroids, and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J.Clin. Endocr.* 27: 973, 1967.
- 4.- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660, 1949.
- 5.- Coe.R.P., Fernandez, R. and Seal, U.S.: Measurement of corticosteroid binding globulin in men. *J. Clin. Endocr.* 24: 1029, 1964.
- 6.- Jubiz, W., Meikle, A., West, C. and Tyler, F.: Single dose metyrapone. *Arch. Intern. Med.* 125: 472, 1970.
- 7.- Spark, R.F.: Simplified assesment of pituitary-adrenal reserve. *Ann. Intern. Med.* 75: 717, 1971.