

BR 9432169

INIS - BR -- 3360

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

PADRONIZAÇÃO DA DOSAGEM DE DIIDROTESTOSTERONA POR
RADIOIMUNOENSAYO APÓS CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELITE.

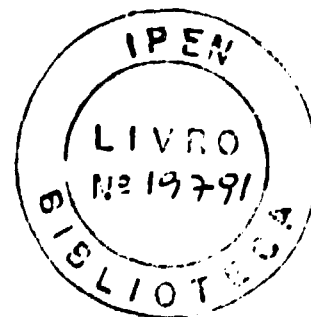
Valéria Samuel Lando.

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre
em Tecnologia Nuclear

Orientador Dr. William Nicolau

São Paulo

1972



Esta dissertação é dedicada:

à memória de meus pais: Waldemar Samuel e
Therézinha F. dos Santos Samuel.

ao Roberto e aos nossos filhos Marcos e Felipe

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IP

Dissertação realizada no Laboratório de Pesquisas da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Em especial :

Ao Dr. Wilian Nicolau pela colaboração e amizade, que tornaram possível a elaboração desta dissertação;

À Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça pela calorosa acolhida, dedicada orientação técnica e teórica, pela longa amizade e pelo apoio constante.

E à todos os colegas de área, pelas suas colaborações espontâneas, apoio e respeito

ABREVIATURAS

DHT	- Diidrotestostereona
T	- Testosterona
PHM	- Pseudo-hermafroditismo masculino.
LH	- Hormônio luteinizante
hCG	- Gonadotrofina coriônica humana
NADPH	- Fosfato Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
rpm	- Rotações por minuto
ml	- Mililitro
NSB	- Ligação inespecífica
cpm	- Contagem por minuto
mCi	- MiliCurie $3,7 \times 10^7$ desintegrações por minuto.
C.L.	- Capacidade de ligação
DMD	- Dose mínima detectável.
mm	- Milímetro
P.M	- Pool médio (mistura de soros)
P.B	- Pool baixo (mistura de soros)
C.V	- Coeficiente de Variação

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	9
3	Casuística.....	10
4	Material e Métodos.....	11
4 1	Equipamentos.....	11
4 2	Reagentes.....	12
4 3	Soluções.....	13
4 3 1	Líquido Extrator.....	13
4 3 2	Tampão fosfato.....	14
4 3 3	Líquido de Cintilação.....	15
5	Procedimento.....	16
5 1	Obtenção das amostras de soro ou plasma.....	16
5 2	Preparo do tracador.....	16
5 3	Caracterização do Antisoro.....	17
6	Preparação das amostras.....	18
6 1	Extração.....	20
6 2	Recuperação da Extração.....	20
6 3	Preparação das amostras.....	22
6 4	Preparação da coluna de celite.....	23
6 5	Preparação dos controles.....	24
6 6	Sistema de cintilação líquida.....	24
7	Ensaio de Dihidrotestosterona.....	27
8	Ensaio de Testosterona.....	29

9 .	Cálculos.....	33
10.	Resultados.....	34
11.	Discussão.....	45
12.	Conclusões.....	49
13.	Refêrencias Bibliográficas.....	50

PADRONIZAÇÃO DA DOSAGEM DE DIIDROTESTOSTERONA POR
RADIOIMUNOENSAIO APÓS CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELITE.

VALÉRIA SAMUEL LANDO

RESUMO

Padronizou-se o método de dosagem de diidrotestosterona após cromatografia em coluna de celite. Um mililitro de soro contendo 1000 contagens por minuto de Diidrotestosterona triciada foi extraída com hexana: acetato de etila (2:3), seco, diluído com isooctana não saturada e aplicado na coluna previamente lavada com 3,5 ml de isooctana pura. O soro foi eluído da coluna com isooctana pura (3,5 ml) seguida de isooctana com acetato de etila à 5%. A recuperação da diidrotestosterona triciada variou de 50% à 80% em todos os ensaios. A sensibilidade do método foi de 4 ng/dl. A variação intra-ensaio foi menor que 9% e a inter-ensaio menor que 9,7%. Avaliou-se a relação testosterona/didrotestosterona em quatro grupos distintos: Grupo 1 - Quarenta e um homens adultos normais em condições basais; Grupo 2 - Seis homens adultos normais em condições basais e após estímulo com 6000 Unidades Internacionais de Gonadotrofina Coriônica

humana , Grupo 3 - Seis crianças pré-puberes portadoras de criptorquirdia unilateral e Grupo 4 - Dito pacientes com pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase em condições basais e pós-hCG. Obtiveram-se os seguintes resultados: Grupo 1- Diidrotestosterona $49,3 \pm 23,5$ ng/dl, testosterona de 521 ± 132 ng/dl e a relação testosterona/ diidrotestosterona de $12,6 \pm 5,3$; Grupo 2 - Diidrotestosterona de $44,2 \pm 10,2$ ng/dl, em condições basais e $68,5 \pm 22,2$ ng/dl após estímulo; testosterona de 610 ± 200 ng/dl em condições basais e 1276 ± 563 ng/dl após estímulo. A relação testosterona/diidrotestosterona basal foi de $14,6 \pm 5,6$ e após estímulo foi de $18,6 \pm 7,9$. Grupo 3 - Em condições basais a diidrotestosterona foi abaixo da sensibilidade do método (<4 ng/dl) e após estímulo foi $29,9 \pm 8,0$. Os valores da testosterona em condições basais foram abaixo da sensibilidade (<8 ng/dl) e após estímulo foram 437 ± 136 ng/dl. Grupo 4- Os valores de diidrotestosterona em condições basais foi de $12,5 \pm 6,3$ ng/dl e após estímulo $20,5 \pm 8,4$. Os valores de testosterona em condições basais foram de $482 \pm 112,4$ ng/dl e após estímulo foram de $1206,7 \pm 257,9$ ng/dl. Conclui-se que a relação testosterona/diidrotestosterona obtida por meio da dosagem de diidrotestosterona após cromatografia em coluna de celite permitiu identificar pacientes com pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase. Neste trabalho estabeleceu-se valores normais para homens adultos e crianças que poderão servir de referência para o método.

MEASUREMENT OF DIHYDROTESTOSTERONE BY RADIOIMMUNOASSAY
AFTER CELITE COLUMN CHROMATOGRAPHY.

VALÉRIA SAMUEL LANDO

SUMMARY

It was developed a method for measuring dihydrotestosterone after celite column chromatography. One milliliter of serum containing 1000 cpm of tritiated dihydrotestosterone was extracted with hexane: ethyl acetate (2:3) : dried, diluted with non saturated isooctane and injected in the column previously washed with 3.5 ml of pure isooctane. The serum was eluted from the column with pure isooctane (3.5 ml) followed by 5% ethyl acetate in isooctane. The quantity of tritiated dihydrotestosterone which was recovered ranged from 50% to 80% in all assays. The sensitivity of the method was 4 ng/dl. The intra-assay variation was less than 9% and the inter-assay variation was less than 9,7%. It was measured dihydrotestosterone, testosterone and testosterone/dihydrotestosterone ratio in the following groups: Group 1- Forty-one normal adult subjects in basal conditions; Group 2 - Six normal adult subjects, evaluated in basal conditions and after stimulus with 6000 International Unity of human Corionic Gonadotrofin; Group 3 - Six pre-puberal children with unilateral cryptorchidism. Group 4 -Eight patients with male pseudohermaphroditism due to 5-alfa-reductase deficiency in basal conditions and after hCG. It was obtained the following results: Group 1 - Dihydrotestosterone values of $49.3 \pm$

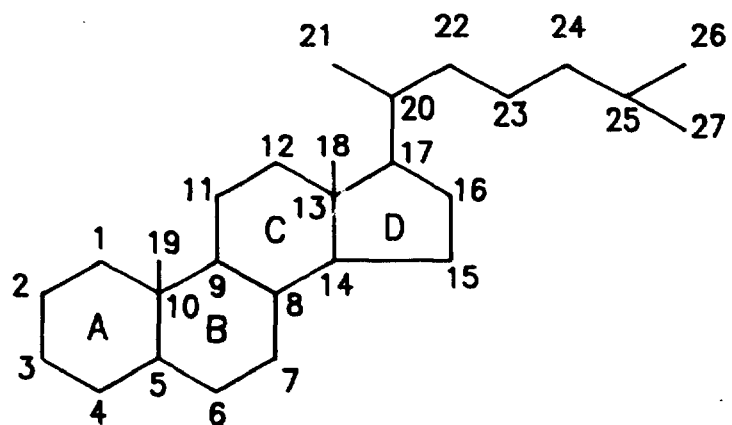
23.5 ng/dl, testosterone values of 521 ± 132 ng/dl and testosterone/dihydrotestosterone ratio of 12.6 ± 5.3 ; Group 2 - DHT values of 44.2 ± 10.2 ng/dl in basal conditions and 68.5 ± 22.2 ng/dl after stimulus; the basal testosterone/dihydrotestosterone ratio was 14.6 ± 5.6 and after stimulus the ratio was 18.6 ± 7.9 . Group 3 -In basal conditions DHT values were below the sensitivity of the method (<4 ng/dl) and after stimulus they were 29.9 ± 8.0 ng/dl ; testosterone values in basal conditions were below the method sensitivity (<8 ng/dl) and after stimulus they were 437 ± 136 ng/dl. Group 4 - It was obtained the dihydrotestosterone values of 12.5 ± 6.3 ng/dl in basal conditions and 20.5 ± 8.4 ng/dl after stimulus; testosterone values 482 ± 112.4 ng/dl for basal and $1206,7 \pm 257,9$ ng/dl after stimulus; the basal testosterone/dihydrotestosterone ratio was 42.7 ± 18.9 and 64 ± 20 after stimulus. It was concluded that the testosterone/dihydrotestosterone ratio was able diagnose patients with male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency in adult in basal conditions as well as after stimulus. In this work it was established the normal values for adults and children and these values will be useful as a reference for the method.

1 - INTRODUÇÃO

As células intersticiais de Leydig localizadas nos testículos, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) ou da gonadotrofina coriônica humana (hCG), secretam, a partir do colesterol, compostos que apresentam o núcleo do ciclopentanoperidrofenantreno como característica comum de suas moléculas (Fig.1), como por exemplo os andrógenos.

Os andrógenos são compostos de 19 átomos de carbono e estrutura androstano. Para que os mesmos tenham uma ação androgênica potente, é necessário a presença na molécula de um radical oxidrila na posição 17, assim como de um grupamento cetônico na posição 3. Havendo uma oxidação na posição 17 com formação de um grupamento cetônico, o composto originado, um 17-cetoesteróide, tem sua atividade androgênica diminuída (18). Os 17-cetoesteróides por sua vez, podem ser convertidos em 17-hidroxiesteróides, dando origem portanto, ao andrógeno de maior atividade biológica, a testosterona (T) (29,31,50,60). A T sob a ação da 5-alfa-reductase é convertida periféricamente em outro andrógeno importante, a diidrotestosterona (4,13,23) (Fig.2). Esta reação requer NADPH como cofator e é biologicamente irreversível(32).

Durante a vida intrauterina, a T é responsável pela diferenciação sexual do hipotálamo e dos ductos de Wolff, que dão origem aos vasos deferentes, epidídimo e vesícula seminal, e a DHT pela masculinização da genitália externa e desenvolvimento da próstata (12,51).



ESTRUTURA COMUM DOS ESTERÓIDES: NOTE NÚCLEO DO
CICLOPENTANO (D) FUSIONADO COM FENANTRENO (A, B, C).

Figura 1

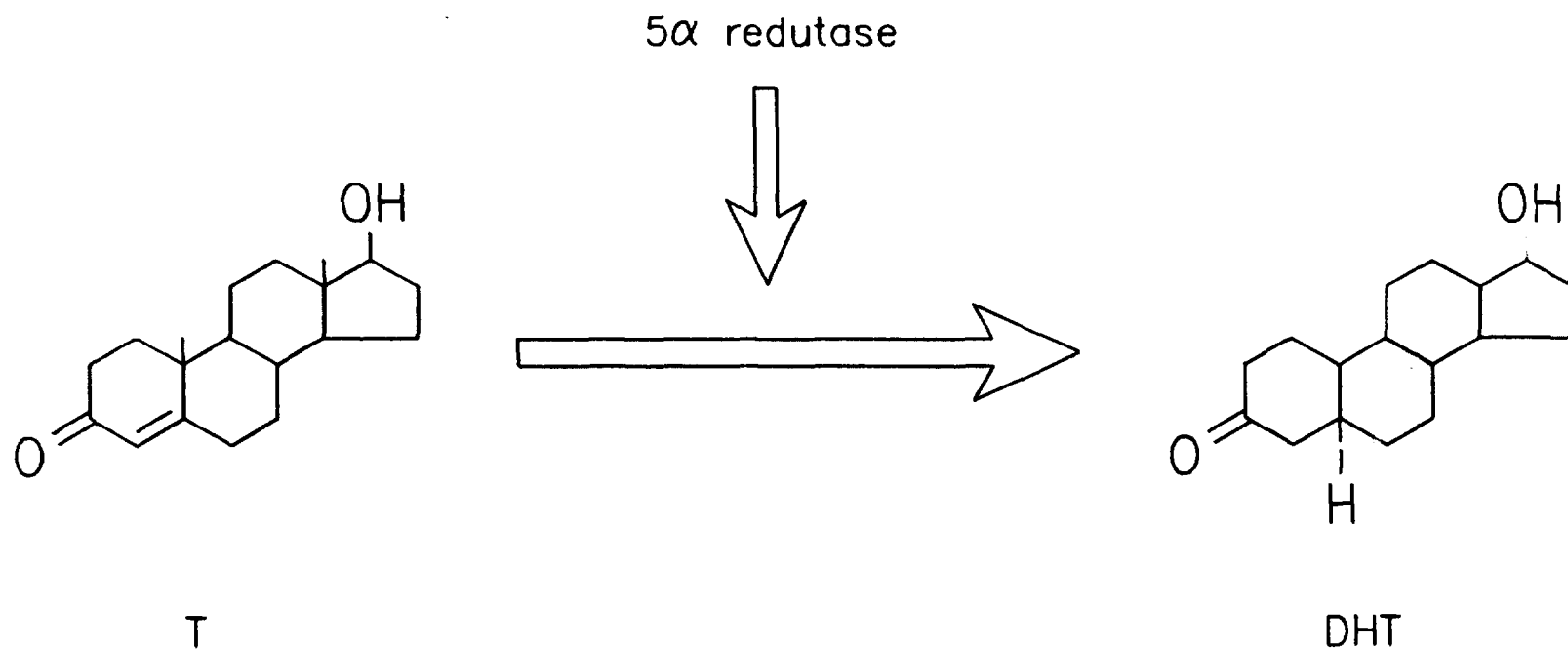


Fig. 2 -

Conversão da Testosterona em Diidrotestosterona pela 5 α redutase

Na vida pós natal, a T é responsável pelo efeito androgênico em tecidos onde a atividade da 5-alfa-redutase é baixa, atuando no desenvolvimento muscular, engrossamento de voz, crescimento peniano, e na indução da espermatogenese. Entretanto, nos tecidos onde a atividade da 5-alfa-redutase é alta, a DHT age induzindo o desenvolvimento de pelos corporais, calvície, o desenvolvimento da próstata e vesículas seminais(16,20,34,43 65,66).

Tanto a T como a DHT se ligam a proteínas carreadoras (globulina carreadora de hormônios esteróides, SHBG) só que a DHT se liga com afinidade duas vezes maior à SHBG do que a T (28) e age através da ligação aos seus receptores específicos (57,58).

O pseudohermafroditismo masculino, condição em que indivíduos 46,XY apresentam ambiguidade da genitália externa, causado por deficiência da enzima 5-alfa-redutase, foi descrita pela primeira vez em 1974 (21). Este e outros estudos subsequentes, descreveram 38 homens afetados de 23 famílias na República Dominicana (48). Desde então, foram reportados casos de deficiência de 5-alfa-redutase em uma área isolada na Turquia e em casos esporádicos em outras partes do mundo (11,12,17,30,47,51,53,63).

A herança da deficiência da 5-alfa-redutase é autossômica recessiva, e os homens com essa deficiência demonstram fenótipo heterogêneo (8) com níveis hormonais variando significativamente, com uma redução nos níveis de DHT, níveis normais ou elevados de T (55), níveis de estradiol normal e níveis aumentados ou normais de gonadotrofina. (7,37,38,39,40,41)

Os pacientes portadores de deficiência da 5-alfa-redutase se prestam de modelo para análise da atividade androgênica, específica da T e DHT. Os homens afetados nascem com genitália externa ambigua, caracterizada por hipospádia perineal, microfalo, bolsa escrotal bifida geralmente testículos criptorquídicos, epidídimo, vaso deferente e vesícula seminal normais e próstata pouco desenvolvida. Na puberdade, entretanto, os níveis séricos de T se elevam, induzindo o quadro de virilização e libido masculina. (22)

A avaliação da secreção hormonal foi a princípio realizada através de medidas dos metabólitos dos hormônios esteróides excretados na urina por métodos colorimétricos. Essas informações, entretanto, foram obtidas através de métodos indiretos, sujeitos a influências decorrentes de alterações das funções hepática e renal que afetam significativamente a excreção urinária desses metabólitos(3). Por essa razão, a dosagem sérica de hormônios esteróides tanto na forma livre como na ligada, nos oferece condição melhor para avaliarmos tanto a produção quanto os níveis de concentração nos tecidos alvos. A maior dificuldade nessa época era a inexistência de técnicas dotadas de suficiente sensibilidade para avaliação de pequenas concentrações hormonais.

Com advento do radioimunoensaio (RIA), tornou-se possível a dosagem destes hormônios presentes em pequenas concentrações nos fluidos orgânicos, utilizando menor volume de material e permitindo determinações rápidas em muitas amostras.

Enquanto que o RIA para a dosagem de hormônios peptídeos foi utilizado pela primeira vez por YALOW & BERSON em (1959) (67)

Para dosagem de insulina, a determinação de esteróides por RIA defrontava-se com a dificuldade de obtenção de anticorpos antiesteróides. Ao contrário dos hormônios polipeptídeos, dotados de peso molecular acima de 5.000 e com satisfatória imunogenicidade, os esteróides tem um peso molecular bem menor, entre 250 e 350 desprovidos, portanto, de atividade imunogênica.

Somente 10 anos após foi realizada a dosagem de esteróides através de RIA, por ABRAHAM (1), que conjugou o estradiol a uma macromolécula, a albumina bovina. Assim, possibilitou ao hapteno adquirir propriedades imunogênicas, estimulando a produção de anticorpos específicos. Este recurso descrito anteriormente por ERLANGER e cols. (15), havia também sido utilizado por OLIVER e cols. (45). Posteriormente BAUMINGER e cols. (6), registraram o desenvolvimento de anticorpos contra esteróides o que serviu de base para a determinação dos níveis plasmáticos desses hormônios androgênicos, pelo método de RIA.

O RIA, baseia-se na competição entre o antígeno marcado isotópicamente (Ag*) e não marcado (Ag) pelos sítios de ligação de seus anticorpos específicos (Ac) formando complexo antígeno-anticorpo. Esta reação obedece à lei de ação das massas e está ilustrada na Fig.3.

A quantidade de antígeno marcado e de anticorpo são mantidas constantes e constroem-se curvas de calibração adicionando-se concentrações variáveis de antígeno padrão ao sistema de incubação. Nesse sistema, a proporção de complexo radioativo formado (Ag*-Ac) é inversamente proporcional à quantidade de antígeno não marcado.

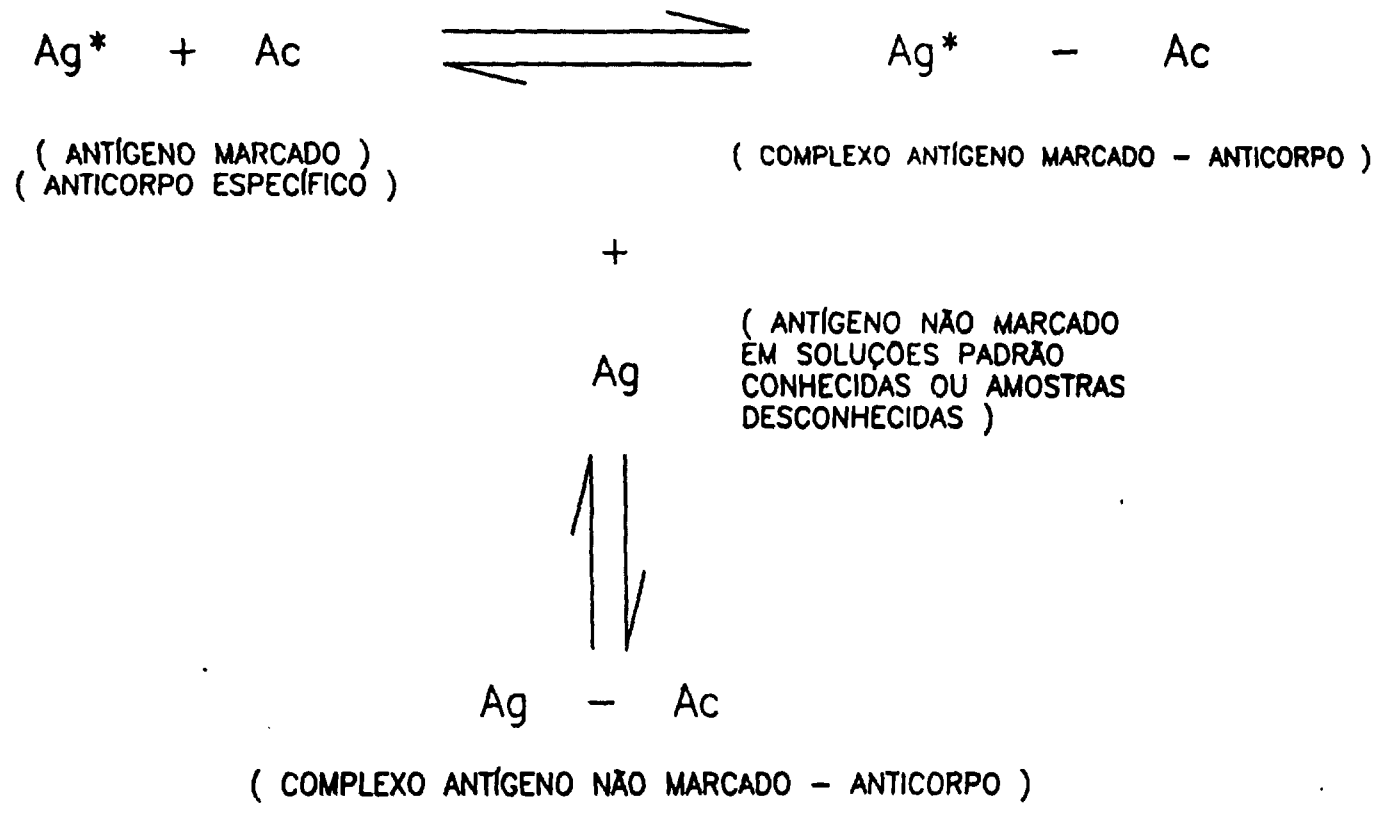


Fig. 3 - REAÇÃO DE COMPETIÇÃO QUE CARACTERIZA O RADIOIMUNOENSAIO

A dosagem de DHT por RIA, vem sendo utilizada desde 1972 (3). A maioria dos antisoros existentes apresentam grande reação cruzada com a T, cuja concentração plasmática em homens adultos normais é de 7 a 20 vezes os níveis de DHT (20,24,33 54).

Para o diagnóstico diferencial dos pseudohermafroditismo masculino é fundamental a dosagem de DHT isoladamente, já que estes pacientes apresentam níveis normais ou elevados de T e níveis baixos de DHT.

2 - OBJETIVO

- 1) Montagem do método para dosagem da DHT sérica.
- 2) Relacionar valores de DHT obtidos com valores de T total.
- 3) Estabelecer valores normais de T, DHT e relação T/DHT basais e após estímulo com hCG em indivíduos do sexo masculino em idade pré-puberal e adulta.
- 4) Avaliar níveis de T, DHT e relação T/DHT em portadores de PHM por deficiência da 5-alfa-redutase.

3 - CASUÍSTICA

GRUPO 1:

Quarenta e um indivíduos adultos normais do sexo masculino em condições basais, com idade cronológica de 19 a 40 anos.

GRUPO 2:

Seis crianças pré-púberes com criptorquidia unilateral com idade cronológica de 2 a 8 anos, antes e após estímulo com hCG.

GRUPO 3:

Seis homens adultos normais com idade cronológica entre 21 e 33 anos avaliados em condições basais e após estímulo com 6000 UI im., de hCG

GRUPO 4:

Dito pacientes com idade cronológica entre 13 e 33 anos, com PHM. Todos os pacientes apresentavam genitália ambígua ao nascimento, caracterizada por microfalo, hipospádia perineal, bolsa escrotal bífida e vagina em fundo cego. Todos os casos foram registrados no sexo social feminino ao nascimento, em decorrência da ambiguidade genital e apresentavam quadro de virilização na puberdade com mudança de sexo social para masculino.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Equipamentos

- Balança analítica
- Agitador magnético Fanem modelo 257
- Contador de Cintilação Líquida. Beckman
- Centrifuga refrigerada. Beckman
- Agitador de tubos tipo Vortex, Fanem
- Pipetas automáticas MLA de volumes: 10, 100, 100, 500 e 1000ul.
- Banho-maria , Faett
- Frascos apropriados para contador de cintilação líquida -Vidro-labor, São Paulo
- Tubos de cultura 4X15cm com capacidade de 20 ml com tampa rosqueada. Vidrolex - São Paulo
- Freezer - Congelador doméstico (à 20°C)
- Geladeira de uso doméstico (à 4°C)
- Estantes para tubos 12 X 75mm com 72 lugares de 1,5 cm X 1,5cm
- Estantes de arame pintado, para tubos 15 X 150 mm com 72 lugares
- Dissecador de vidro com dispositivo na tampa de entrada e saída de ar, para vácuo. FUNBEC - São Paulo.
- Sistema de entrada de ar para várias colunas ao mesmo tempo, com uma entrada principal de ar comprimido e várias saídas (mangueiras de borracha) com regulagem de fluxo de ar.
- Estufa para 800° C.
- Bolinhas de vidro para das colunas, diâmetro 1 a 2 mm.
- Pipetas graduadas de 5 ml de vidro, cortadas em 5 cm. Vidrolabor.

4.2 - REAGENTES

- T marcada, fornecida pela Amersham International plc., [1,2,6,7-H³]Testosterona, código TRK 402. Atividade Específica de 10.3 GBq/mg (279 mCi/mg)
- Padrão de T - Sigma Chemical Company, St. Louis, nº T- 1500
- Antisoro T, desenvolvido no Laboratório de Pesquisa da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP (36).
- DHT tetratricida, Amersham International plc. New England, código TRK 395 (5 ALPHADIHIDRO[1 ALPHA,2 ALPHA (N)-H³]TESTOSTERONA) embalagem contendo 250 microCurie (9.25 MegaBq), diluído em solução tolueno/etanol (3:2) com atividade específica de 50 a 60 Ci/Mol.
- Antisoro de DHT de procedência Radioassay Systems Laboratories Inc., frascos contendo 1ml do antisoro, suficiente para 1000 tubos.
- Padrão de DHT - Sigma Chemical Company, St. nº B380.
- Fosfato de sódio monobásico, P.A. Merck, São Paulo
- Fosfato de sódio bibásico, P.A. Merck, São Paulo.
- Sódio Azida, Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A
- Sódio Cloreto, Merck, São Paulo
- Carvão ativado Pró-Analysi N°2186, Merck, São Paulo.
- Dextran T 70, Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A
- Tolueno, P.A., Merck, São Paulo
- Etanol, P.A., Merck, São Paulo
- P.P.O., 2,5-diphenyloxazole, Sigma Chemical Company, E.U.A
- Hexana P.A., Merck, São Paulo
- Acetato de Etila P.A., Merck.

- Etileno Glicol P.A., Merck
- Isooctana P.A. Merck.
- Metanol, P.A. Merck
- Hidróxido de Sódio P.A., Sigma Chemical Company
- Gelatina, Merck
- Celite - Oeel, 545

4.3 - SOLUÇÕES

Solução orgânica para extração dos esteróides do soro:

- LÍQUIDO EXTRATOR

Acetato de etila.....600ml
Hexana.....400ml

Esta solução de acetato de etila - hexana 3:2, é utilizada na proporção 10 vezes o volume da amostra. Esta solução é estocada à temperatura ambiente mantendo-se estável por 1 mês.

- TAMPÃO FOSFATO 0,1M pH 7,0

Fosfato de Sódio bibásico32,7 g
Fosfato de Sódio monobásico.....10,8 g
Azida Sódica.....2,0 g
Cloreto de Sódio.....18,0 g
Gelatina.....0,1 %
Água destilada.....2000 ml

Tomamos 1000 ml de água destilada à 37°C e adicionamos gelatina até a dissolução e acrescentamos aos poucos os reagentes, em último lugar a azida sódica. Acerta-se o pH em 7,0 com NaOH 0,1M. Este tampão pode ser estocado à temperatura ambiente por um mês.

- SOLUÇÃO DE CARVÃO

Carvão P.A.....0,625 g
 Dextran-70.....0,0625 g
 Tampão fosfato.....100 ml

Antes do uso ,esta solução é deixada sob agitação em agitador magnético à 4° C por uma noite. é estável por 1 mês à 4°C.

- LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO

Solução mãe:

P.P.O.....50 g
 Metanol.....100 ml
 Tolueno.....900 ml

Solução de uso:

Solução mãe.....100 ml
 Tolueno.....900 ml

Como nossas amostras são de pequeno volume e contém certa quantidade de água, preferimos usar como solvente tolueno-metanol (14,26,27,46 e 56) por minimizar o "efeito quenching" (perda de contagem).

Para cada amostra colocamos 5 ml de solução uso, volume este, padronizado após teste de volume x contagem, no qual estimamos vinte vezes a mesma amostra radioativa, com volumes de 2,5 ml, 5 ml e 10 ml. Com volume de 2,5 ml obtivemos perda na eficiência de contagem, porém com 10 ml as contagens não se mostraram diferentes das estimadas com 5 ml, justificando o uso desta última.

5 - PROCEDIMENTO

5.1 - Obtenção das amostras de soro

Para a determinação de DHT, as amostras foram obtidas dos diferentes indivíduos, após jejum de uma noite e em condições basais e após estímulo com hCG. O sangue foi colhido em tubo seco, colocados à temperatura ambiente até retração do coágulo e centrifugado à 3000 rpm durante 10 minutos. Os soros assim obtidos foram estocados à -20° C para posterior dosagem.

5.2 - Preparo dos traçadores

Devido a longa vida média (12 anos) o trício tem a vantagem de poder ser utilizado nos ensaios por longo período. Os fatores limitantes de seu uso são: a radiólise sofrida na ligação do hormônio-marcado e quebra da molécula do esteróide em questão.

Para evitar que estes efeitos afetem o ensaio, purifica-se o marcado em coluna de celite, a cada 6 meses (2). Ao frasco original contendo 250 u) de solução tolueno/etanol (9:1) é acrescentado 5 ml da mesma mistura, para evitar a evaporação; 0,5 ml da nova solução triciada foi seca em capela e resuspendida com 1 ml de isooctana pura e aplicada em coluna de celite.

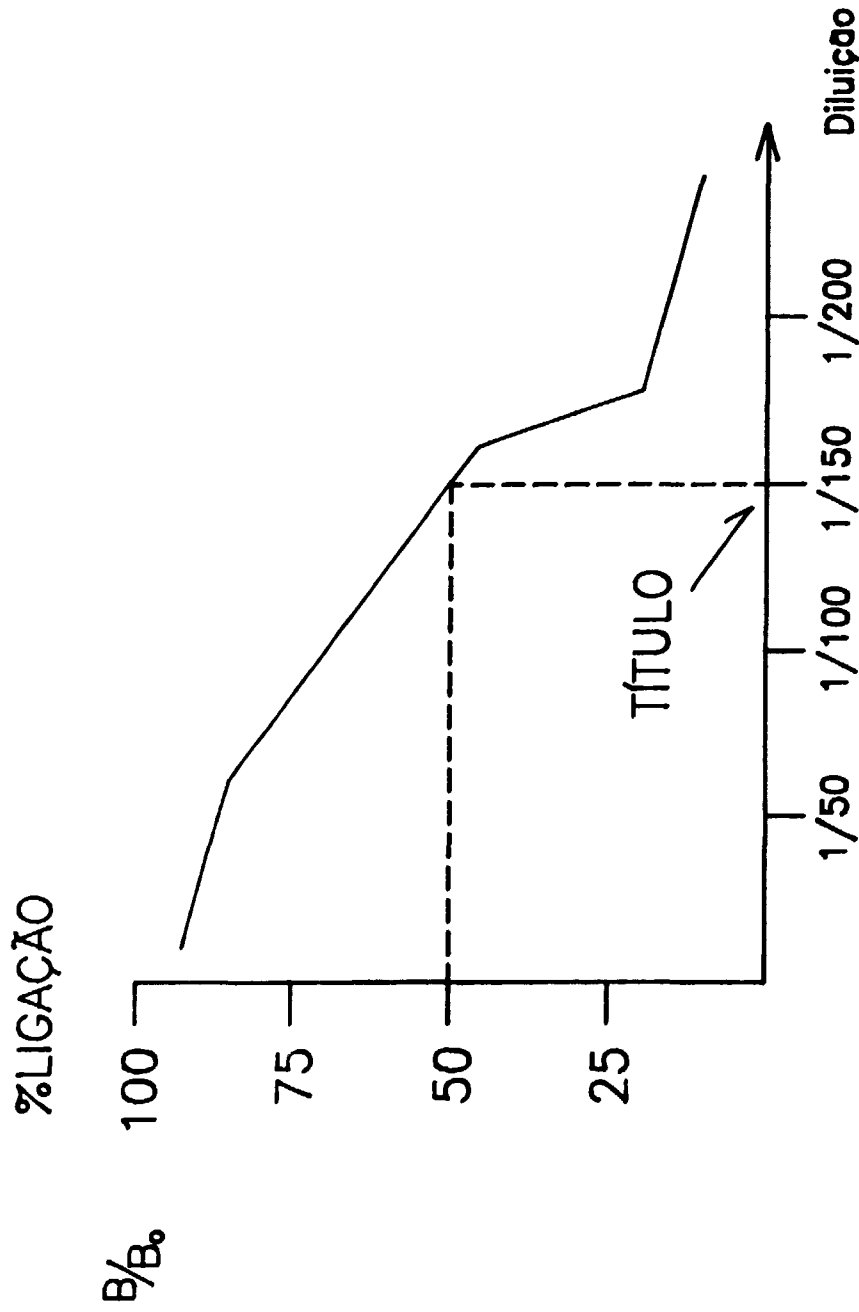
Quando 0,1 ml do volume aplicado estiver impregnado no celite, colocamos 5 ml de isooctana pura seguida de 5 ml de isooctana e acetato de etila à 5%, fração esta que é recolhida, seca e resuspendida com álcool etílico absoluto (0,5 ml) e colesterol (1 ug/uCi de hormônio marcado). Essa solução é estocada à -20°C e uma pequena parte (0,02 ml) foi diluída em tampão fosfato, o suficiente para se obter 5000 cpm em 0,1 ml a ser utilizado no ensaio.

5.3 - Caracterização dos antisoros

O antisoro da DHT, de procedência Radioassay Systems Laboratories Inc., que foi obtido através do antígeno 15B-Carboxyethylmercapto-5alpha-DHT:BSA para imunização em coelhos, fornecido em frascos contendo 1 ml do antisoro liofilizado (com título inicial 1:280), foi resuspendido em 1 ml de tampão do ensaio e ali-quotado em tubos de 0,1 ml e conservado à -20°C. Uma dessas ali-quotas diluída com 5 ml de tampão do ensaio (diluição 1/50), seguido de diluições seriadas: 1/100, 1/150 e 1/200. (Fig. 4).

A diluição que permitiu a ligação de 50% do hormônio tri- ciado (definida como título do antisoro) foi utilizado nos en- saios subsequentes (44). A especificidade do antisoro anti-DHT está apresentada na Tabela 1.

O antisoro da T foi obtido através de inoculação em coe- lhos do antígeno 4-androsten-17B-01-3-one-3-CMO:BSA diluído em 1 ml de adjuvante de Freund; o título foi de 1/3080 e a maior rea- ção cruzada foi com a DHT de 69%. (36)



DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DO ANTISORO DA DHT

Tabela 1 - ESPECIFICIDADE DO ANTISORO UTILIZADO NA DOSAGEM
DE DHT LOTE: R-140-3

ESTERÓIDE	% REAÇÃO CRUZADA
5-alfa-dihidrotestosterona	100.00
Testosterona	7.78
5-beta-dihidrotestosterona	1.45
6-beta-dihidrotestosterona	1.95
Androstenediona	0.42
6-alfa-androstane-3,17-diona	2.92
Epiandrosterona	0.77
Progesterona	0.00
Estrona	0.00
Estradiol	0.00
Estriol	0.00

5.4 - Extração das amostras.

Antes de submetermos a amostra ao radioimunoensaio, realizamos a extração prévia do soro para separar os esteróides das proteínas e lipídeos que interferem com o sistema de contagem líquida. A extração foi feita com hexana:acetato de etila na proporção 1:3, num volume dez vezes superior ao da amostra. (2).

Utilizamos o solvente hexana:acetato de etila, que por sua polaridade faz com que os hormônios menos polares, tal como androstenediona e progesterona, permaneçam no plasma, que é descartado junto com as proteínas e lipídeos após seu congelamento.

A determinação do tempo ideal de agitação no vortex para extração do esteróide para a fase orgânica foi obtido pela comparação das cpm de 24 amostras submetidas a agitação durante 1, 2 e 3 minutos (Tabela 2).

5.5- Recuperação da extração

Para controle da extração dos esteróides, 0,1 ml do marcado contendo 1000 cpm foi colocada em contato com a amostra durante 30 minutos para atingir o equilíbrio. A seguir foi adicionado o líquido extrator e agitado no vortex por 1 minuto. Após 10 minutos em repouso as amostras foram congeladas (gelo seco ou colocadas à -20°C por 6 à 12 horas). A seguir o sobrenadante foi transferido para outro frasco, onde foi evaporado. Depois de seco o extrato foi diluído em 1 ml de isooctana pura, ao invés de ser diluído em isooctana saturada com etileno glicol, como no método original de Abraham (2).

Tabela 2 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DAS CPM OBTIDAS APÓS EXTRAÇÃO EM DIFERENTES TEMPOS.

AMOSTRA	1 min	2 min	3 min
01	283	288	290
02	280	235	246
03	295	279	289
04	301	309	282
05	321	266	302
06	337	314	261
07	265	295	264
08	253	253	289
09	280	263	286
10	193	269	244
11	249	249	242
12	256	250	300
13	259	216	252
14	211	257	252
15	256	243	269
16	304	282	274
17	299	278	278
18	255	302	239
19	253	235	272
20	286	307	202
21	277	325	252
22	295	295	241
23	280	253	239
24	295	257	282
Média e D. P.	274±32	268±31	264±24

A análise de variancia mostrou $p > 0,05$

Esta modificação foi introduzida pelo fato de termos obtido baixas porcentagens de recuperação, quando utilizamos isooctana saturada ($30 \pm 10\%$) conforme método originalmente descrito. Verificamos que a umidade relativa do ar em nosso meio oscila entre 70 a 80%, enquanto que na Califórnia, onde o método foi desenvolvido, é de 20 a 40%. Passamos então a transferir o extrato seco com isooctana pura na tentativa de obter as condições de polaridade ideal e observamos uma melhora significativa da porcentagem de recuperação ($70 \pm 10\%$).

5.6 - Preparo da curva padrão:

O padrão da T e DHT foi preparado uma vez por ano e estocado em duas concentrações : 1 ug/ml (solução uso) e 10 ug/ml (solução estoque) à -20°C .

A curva padrão foi obtida utilizando as diluições:

Solução I: 50 ul da sol. 1 ug/ml + 5 ml de tampão (5000 pg/tubo)

Solução A: 1,0 ml de sol. I + 4,0 ml de tampão (1000 pg/tubo)

Solução B: 2,5 ml de sol. A + 2,5 ml de tampão (500 pg/tubo)

Solução C: 2,5 ml de sol. B + 2,5 ml de tampão (250 pg/tubo)

Solução D: 2,0 ml de sol. C + 3,0 ml de tampão (100 pg/tubo)

Solução E: 2,5 ml de sol. D + 2,5 ml de tampão (50 pg/tubo)

Solução F: 2,5 ml de sol. E + 2,5 ml de tampão (25 pg/tubo)

Solução G: 2,0 ml de sol. F + 3,0 ml de tampão(10 pg/tubo)

Estas soluções são estáveis por 4 semanas quando mantidas na geladeira à 4°C .

Cada solução de A à G foi usada num volume de 0,5 ml, por tubo, em duplicata para cada ensaio.

5.7 -Preparação da coluna de celite

Utilizamos microcolunas de celite pelas seguintes razões:

- 1 - São fáceis de preparar
- 2 - São de baixo custo
- 3 - O celite tem alto poder de resolução.

A técnica de cromatografia em celite baseou-se no sistema II do método descrito por ABRAHAM (1977) (2). Após permanecer 18 horas em estufa à 800°C o celite foi misturado com etileno glicol(2:1), isto é, 20g de celite foram misturados com 10ml de etileno-glicol.

O aquecimento é importante para a dessorção da água e de componentes orgânicos, que possam interferir na polaridade da fase estacionária alterando significativamente a recuperação do hormônio.

Utilizamos pipetas de vidro de 5 ml (Vidrolabor) para empacotar o celite depois de cortada a parte superior da pipeta em 5 cm. Por intermédio de um micro funil, introduzimos o celite para dentro da pipeta e com um bastão forçamos o conteúdo, compactando o celite dentro da coluna. Enchemos novamente a pipeta até a marca zero e com leves toques ajeitamos a massa interna, socando com o bastão o celite até que se estabeleça na marca 4,5 da pipeta. Sempre em posição vertical, lavamos a coluna 2 vezes com 3,5 ml de isooctana pura, sob pressão de ar comprimido. As colunas podem ser estocadas à temperatura ambiente em isooctana, por uma semana antes do uso.

5.8 - Preparação dos Controles:

Os ensaios foram realizados em duplicata, com os tubos controles, misturas de soro com concentração média e baixa (pools), NSB (ligação específica) e tubo zero (antígeno marcado + anticorpo). Os pools foram preparados do seguinte modo: à 500ml de plasma, fornecido pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, foram adicionado 50 g. de carvão-dextran por litro mantidos sob agitação à 45°C por 2 horas, para retirada de todos os hormônios contido no plasma. Separamos metade do plasma onde colocamos o padrão de cada hormônio (250 ng/dl para T e 130 ng/dl para DHT - pool médio) e no restante 250 ml (pool baixo) colocamos concentração baixa 60 ng/dl para T e 25 ng/dl para DHT. Esses pools médios e baixo foram aliquotados e armazenados à -20°C e foram utilizados em todos os ensaios.

Com os controles determinamos o coeficiente de variação intra e inter-ensaio, estabelecendo a variação correspondente à media e os desvios padrão de 5 ensaios como critério de aceitação dos ensaios.

5.9 - Sistema de Contagem em Cintilação Líquida.

Como a DHT e T são marcadas com trício, que é um beta emissor, tornou-se necessário um sistema especial para contagem da baixa energia liberada pela partícula beta que é transformada em sinal elétrico e posteriormente em contagem num determinado intervalo de tempo.

O sistema de contagem em cintilação líquida é um método de detecção de radiação que utiliza uma solução de flúor e uma fotomultiplicadora.

A contagem de cintilação líquida é um método de contagem proporcional, isto é, a amplitude do sinal elétrico obtido no detector é proporcional à energia emitida pela partícula primária.

A solução cintiladora utilizada nos ensaios é constituída de uma mistura de solventes tolueno-metanol e um soluto primário (flúor).

A energia emitida pela partícula beta excita as partículas do solvente, que por sua vez transmite a energia de excitação para o soluto, tornando-o instável. As moléculas excitadas do flúor, quando retornam ao estado inicial perdem a energia recebida emitindo quanta de luz de comprimento de onda próximo ao do ultra violeta (27,56). Quando a luz interage com a fotomultiplicadora, originam elétrons que são multiplicados no seu interior, resultando em um pulso de tensão. Após sofrer grande amplificação transforma-se num pulso elétrico de grande amplitude, que é lido em um registrador de cpm (contagem por minuto).

Em qualquer método de detecção de radiação, a eficiência de contagem (a razão entre taxa de contagem observada pela taxa de desintegração radioativa na amostra) é maior quando o número máximo de partículas emitidas atinge o detector e interage com ele. Perda na eficiência pode ocorrer quando as partículas emitidas são desviada da direção do detector ou são capturadas por algum mecanismo, por exemplo: volume insuficiente da solução cintiladora, coloração ou turvação da amostra.

6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A comparação entre os valores de DHT com e sem purificação do extrato em coluna foi realizada por meio do teste de t-Student pareado. Estabelecemos como significante os valores de $p < 0.05$.

7 - ENSAIO DA DIIDROTESTOSTERONA

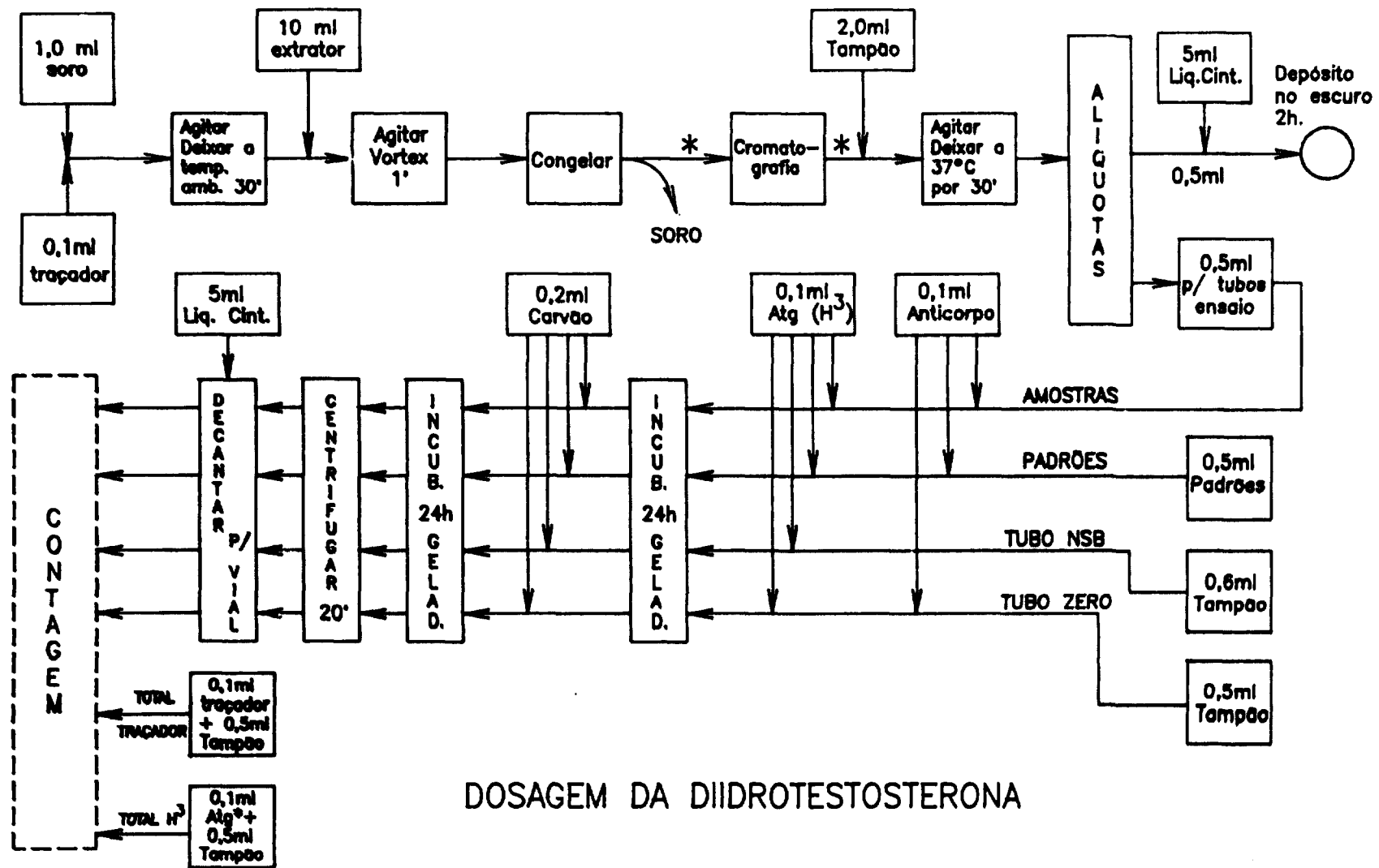
O método utilizado baseia-se no descrito por Abraham (2) ligeiramente modificado.

O primeiro passo para se dosar DHT é a incubação de 1 ml de soro ou plasma com 0,1 ml de DHT marcada (1000 cpm) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A seguir adicionamos 10 ml de líquido extrator e agitamos em agitador de tubos tipo Vortex durante 1 minuto. Deixamos em repouso durante 10 minutos, para que ocorra a separação das duas fases (soro/extrator). Em seguida congelamos as amostras e decantamos o sobrenadante em frascos de secagem. Após a evaporação, o extrato seco foi eluído com 1,0 ml de isooctana pura, e aplicada na coluna de celite pré-montada. A eluição foi efetuada sob pressão de ar comprimido mantendo o fluxo da coluna de 6 a 8 gotas/minuto. Após a passagem da amostra, lavou-se o frasco com 0,5 ml de isooctana pura que também foi transferido para a coluna. Em seguida, adicionou-se 3,5 ml de isooctana pura que foi descartada. Quando colocamos 3,5 ml de isooctana à 5% de acetato de etila, obtemos a DHT. Esta amostra foi recolhida da coluna em frascos, evaporada e resuspendida com 2 ml do tampão do ensaio, sendo depois mantida em banho-maria à 37°C por 30 minutos antes de ser incubada.

A preparação dos padrões foi feita com tampão, utilizando uma solução estoque de DHT em metanol contendo 1 ug/ml. Diluições seriada, foram realizadas para obtenção de concentração de DHT fria que variaram de 1000 - 10 pg/0,5ml. Aliquotas de 0,5 ml de cada uma das soluções padrão foram adicionadas em duplicata, nos respectivos tubos de ensaio, devidamente identificados. Tanto nos tubos NSB e Zero colocamos 0,5 ml de tampão do ensaio.

As amostras contendo 2,0 ml de tampão foram agitadas no vortex, para resuspender o extrato seco, sendo que: 0,5 ml destas amostra foram colocadas em frascos contendo líquido de cintilação para posterior cálculo da porcentagem de recuperação. Outros 0,5 ml em duplicata foram pipetados em tubos de ensaio de vidro (12x75mm) que acompanharam os controles e a curva padrão. Cem microlitos de DHT triciada foi pipetada em todos os tubos seguida de 0,1 ml de antisoro anti- DHT foi também pipetado em todos os tubos, exceto em dois deles, que serviram como controle da eficiência de remoção da DHT triciada não ligada pela solução de carvão-dextran (10) (tubos de *Non Specific Binding*: NSB). Após agitação em vortex, os tubos foram incubados em geladeira à 4°C e após 6 a 24 horas, colocados em banho de gelo, adicionou-se rapidamente a cada um deles, 0,2 ml de solução de carvão-dextran para separação. Em seguida os tubos foram agitados no vortex e incubados à 4°C por 20 minutos e centrifugados por 20 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi então decantado em frascos de cintilação contendo 10 ml de líquido de cintilação, agitados manualmente e deixados por 18 horas em repouso antes da determinação da sua atividade no contador de cintilação líquida.



* Evaporar

Figura 6

8 - ENSAIO DE TESTOSTERONA

As dosagens de T foram realizadas por radioimunoensaio onde utilizamos como marcador a T marcada com trício (Fig. 5)

As amostras de soro ou plasma foram extraídas com o mesmo líquido extrator utilizado para a DHT. Em homens normais utilizamos 0,1 ml de soro e em crianças 0,5 ml de soro que foram extraídas com 5 ml do líquido extrator através de agitação em vortex, durante 1 minuto cada amostra. Após 10 minutos em repouso para separação das duas fases, as amostras foram congeladas e em seguida decantadas em frasco de secagem. Depois de evaporadas foram resuspendidas em 2 ml de tampão do ensaio, agitadas em vortex e deixadas em banho-maria à 37° C.

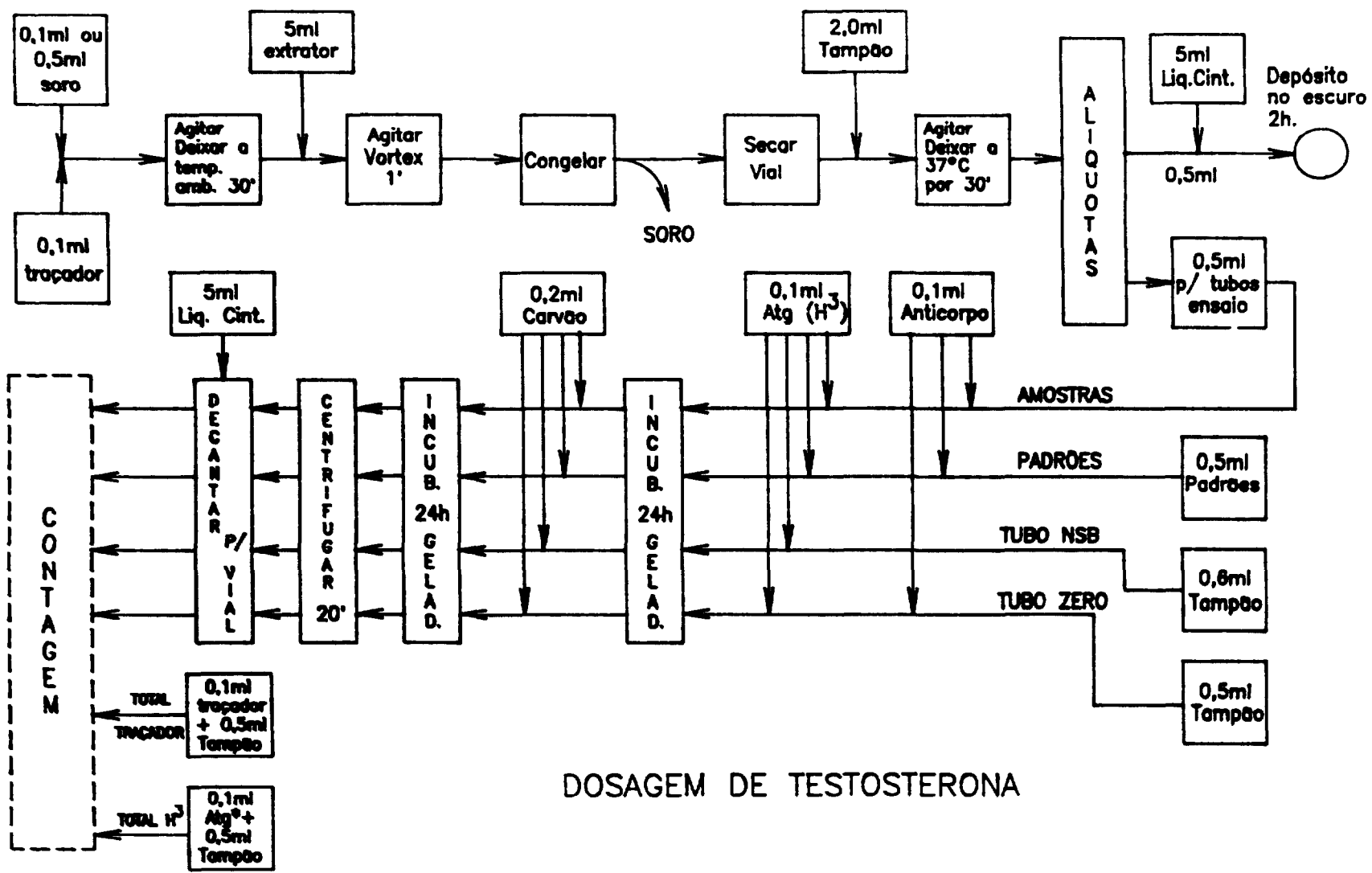
A curva padrão foi realizada da mesma maneira que descrito para DHT, só que neste caso utilizamos o padrão de T (1 ug/ml) para diluições seriadas de 1000 à 10 pg em 0,5 ml.

O ensaio foi realizado utilizando 0,5 ml de cada ponto da diluição da curva e 0,5 ml de cada extrato de soro ressuspenido em tampão, além de 0,5 ml de tampão nos tubos NSB e 0,5 ml de tampão nos tubos zeros, sempre realizados em duplicata

Em seguida, colocamos 0,1 ml de antisoro anti-testosterona (36), seguido de 0,1 ml de testosterona triciada (5000 cpm/0,1ml). Agitamos os tubos e incubamos à 4°C por 18 à 24 horas. Como método de separação, empregamos a solução de carvão-dextran, mantida em agitação à 4°C durante a pipetagem.

Desta solução 0,2 ml são pipetados em todos os tubos, menos nos totais, e, após agitação seguida de repouso por 20 minutos à 4° C, procede-se à centrifugação por 20 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi decantado diretamente no frasco de contagem contendo 5 ml de líquido de cintilação.

O método de cálculo utilizado baseia-se no programa CL1-15A que acompanha a calculadora HP-97, corrigindo-se os valores pela % de recuperação da extração.



DOSAGEM DE TESTOSTERONA

9 - CÁLCULOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS.

$$\begin{array}{l} \text{Capacidade} \\ \text{de Ligação} \end{array} = \frac{\text{Contagem do tubo 0} - \text{BG} \quad \times 100}{\text{Contagem tubo total} - \text{BG}}$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ de} \\ \text{Recuperação} \end{array} = \frac{\text{CPM amostras} - \text{BG} \quad \times 4 \quad \times 100}{\text{Contagem tubo total} - \text{BG}}$$

$$\text{Resultado final} = \frac{\text{pg lida na curva} \quad \times \quad t \quad \times 100}{1000 \quad \times \quad \text{RA}} = \text{ng/dl}$$

RA = cpm da recuperação das amostras.

BG = Background do aparelho

t = cpm obtidas para controle da extração

Os cálculos da curva dose-resposta e da concentração das amostras desconhecidas também podem ser efetuadas por programa em computador RIAKALC (1982), que se baseia na transformação logito-log (49).

10 - RESULTADOS

10.1 - Parâmetros relativos aos ensaios de DHT e T.

Os ensaios foram analisados em computador PC utilizando o programa RJAKALK desenvolvido em linguagem Basic, na Unidade de Diabetes e Adrenal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que além dos resultados parciais de DHT, nos forneceu vários parâmetros de controle dos 5 ensaios como mostra a Tabela 3.

Após avaliação dos 5 ensaios de DHT realizados para este estudo, obtivemos um coeficiente de variação inter-ensaio para valores médios de $5,28 \pm 2,2\%$ e para valores baixos de $6,7 \pm 1,0\%$.

A mesma avaliação foi feita para dosagem de T, como mostra a Tabela 4 e obtivemos um coeficiente de variação inter-ensaio para valores médios $6,0 \pm 1.35\%$ e para os baixos de $8.1 \pm 1.9\%$.

10.2 - Dosagens hormonais.

Comparando os resultados das dosagens de DHT com coluna e sem coluna (Tabela 5), observamos que os valores com coluna foram significativamente menores do que os sem coluna ($30,7 \pm 21.4$ X $89,87 \pm 47,9$ ng/dl). A análise estatística entre esses dois grupos (com e sem coluna) mostrou haver diferença estatisticamente significativa, $p < 0.05$

Tabela 3 - CARACTERÍSTICAS DOS ENSAIOS DE DHT.

Ensaio:	1	2	3	4	5
C.L.%	34,5	51,2	47,2	37,1	48,2
NSB%	1,3	1,7	2,0	1,5	2,2
DMDng/dl	4,3	4,1	4,3	4,2	4,3
P.M.	134 ± 6,4	127 ± 6,4	125 ± 5,7	138 ± 4,2	130 ± 12
Média ± DP	130 ± 5,26				
C.V.i.	4,8%	5%	4,6%	3%	9%
C.V.e	4,0%				
P.B.	21 ± 1,3%	25 ± 2,0%	26 ± 2,0	27 ± 1,7	28 ± 1,6
Média ± DP	25,40 ± 2,70				
C.V.i	6,2%	8%	7,7%	6,3%	5,7%
C.V.e	10,6%				

C.L. = % de ligação do tubo zero com o total.

NSB = % de ligação não específica.

MDD = Mínima dose detectável (sensibilidade)

C.V.i. = Coeficiente de Variação intra-ensaio.

C.V.e = Coeficiente de Variação inter-ensaio.

P.M. = Pool Médio.

P.B. = Pool Baixo.

Tabela 4 - CARACTERÍSTICAS DOS ENSAIOS DE T.

Ensaio:	1	2	3	4	5
C.L.	46,0	52,0	47,0	50,0	49,0
NSB	1,7	1,8	1,9	1,3	5,0
DMD	7,8	8,8	8,1	8,6	8,0
P.M.	220 ± 16,9	215 ± 14	210 ± 12	240 ± 9,9	250 ± 15
Média ± DP	227 ± 17,2				
C.Vi.	7,7%	6,5%	5,7%	4%	6,4%
C.Ve.	7,57%				
P.B.	64 ± 4,4	67 ± 6,5	63 ± 6,4	62 ± 5,2	65 ± 3,6
Média ± DP	64,20 ± 1,92				
C.Vi.	6,9%	9,7%	10%	8,4%	5,5%
C.Ve.	3,0%				

C.L. = % de ligação (antígeno e anticorpo)

NSB = % ligação não específica.

MDD = Mínima dose detectável

C.Vi. = Coeficiente de variação intra-ensaio

C.Ve. = Coeficiente de variação inter-ensaio.

P.M. = Pools médios

P.B. = Pools baixos.

Observamos também, que pacientes com níveis baixos de T, apresentavam níveis mais elevados de DHT medidos sem cromatografia prévia. Em vista disto, abandonamos a dosagem de DHT sem cromatografia e determinamos os valores normais dos grupos controles após cromatografia.

Valores basais:

Os valores basais de T e DHT do grupo de homens adultos normais se encontram na Tabela 6. Obtivemos valores de T de 521 ± 132 ng/dl e de DHT $49,6 \pm 23,8$ ng/dl e relação T/DHT de $12,4 \pm 5,3$.

Teste com hCG (Tabelas 7, 8, 9 e Fig.7)

Homens adultos: Como podemos observar na Tabela 7, os valores basais de T foram de 610 ± 200 ng/dl e após hCG de 1276 ± 563 ; os valores basais de DHT foram de $44,2 \pm 10,2$ ng/dl, e após hCG de $68,5 \pm 22,2$ ng/dl. Notamos que houve um aumento significativo da relação T/DHT após estímulo de hCG, com valores basais de $14,6 \pm 5,6$ e pós-hCG de $18,6 \pm 7,9$.

Em crianças pré-púberes (Tabela 8), observamos valores baixos de T e DHT indicativos da não atividade das células de Leydig característica desta faixa etária. Entretanto após estímulo com hCG observamos um incremento significativo de T (437 ± 136 ng/dl) e DHT ($29,8 \pm 8,0$ ng/dl) e da relação T/DHT que foi de $15,0 \pm 2,6$ ng/dl).

Tabela 5 - COMPARAÇÃO DE VALORES DE T E DHT REALIZADO COM E SEM CROMATOGRAFIA.

Individuos controles	T (ng/dl)	DHT (ng/dl)	
		C/COLUNA	S/COLUNA
01	08,0	04,0	36,3
02	09,0	05,3	36,8
03	19,8	14,0	17,7
04	49,9	11,5	39,5
05	50,5	04,4	47,3
06	56,6	04,0	37,6
07	66,8	12,4	22,0
08	74,0	22,0	52,4
09	90,2	16,8	37,5
10	112,0	19,2	57,4
11	138,9	18,5	73,1
12	148,0	11,0	64,4
13	330,0	22,4	78,9
14	330,0	27,8	94,4
15	350,0	19,7	101,3
16	366,0	22,8	61,0
17	410,0	57,3	140,0
18	420,0	40,9	40,9
19	420,0	45,5	146,1
20	472,0	21,5	74,3
21	475,0	36,3	92,4
22	510,0	28,9	129,4
23	510,0	40,9	116,0
24	515,0	42,0	114,0
25	517,0	37,7	137,5
26	600,0	65,6	142,8
27	605,0	44,4	171,0
28	630,0	56,3	172,3
29	630,0	70,5	165,4
30	645,0	40,0	117,9
31	930,0	79,9	172,0
32	945,0	67,5	083,0
Média	357,3	31,6	89,8
±	±	±	±
D. P.	265,5	21,1	47,7

Tabela 6 - VALORES BASAIS DE T, DHT E RELAÇÃO T/DHT DE INDIVÍDUOS NORMAIS.

Individuos	I.C.	T (ng/dl)	DHT(ng/dl)	T/DHT
01	36	475	36,3	13,1
02	24	930	79,9	11,6
03	34	330	22,4	14,7
04	31	645	40,0	16,0
05	19	517	37,7	13,7
06	25	510	40,9	12,5
07	26	410	57,3	07,1
08	33	605	44,4	13,6
09	32	472	21,5	21,9
10	34	630	70,5	08,9
11	22	420	40,9	10,2
12	25	330	27,8	11,8
13	30	515	50,3	10,2
14	35	630	56,3	11,2
15	40	350	19,7	17,7
16	36	510	28,9	17,6
17	34	230	24,9	09,2
18	26	570	80,3	07,1
19	30	634	74,6	08,5
20	26	556	93,7	05,9
21	28	716	63,7	11,2
22	29	429	59,7	07,2
23	27	572	74,2	07,7
24	31	637	77,9	08,2
25	26	516	70,9	07,4
26	27	535	66,6	08,0
27	26	629	59,7	10,5
28	25	536	93,0	05,8
29	30	653	104,0	06,3
30	27	342	50,5	06,8
31	24	329	22,1	14,9
32	25	524	18,6	28,1
33	25	545	23,2	23,5
34	24	570	28,2	20,2
35	26	503	35,5	14,8
36	25	722	40,0	18,1
37	26	508	29,9	16,9
38	25	410	19,3	21,2
39	24	385	24,5	15,6
40	31	420	45,5	15,6
41	27	600	65,5	09,2
Média±		521±	49,3±	12,6±
D P		132	23,5	5,3

* I.C. = Idade cronológica, em anos

Os pacientes com PHM, tiveram seu diagnóstico de deficiência da 5-alfa-redutase, já sugerido pelos dados clínicos, confirmados pela determinação dos metabólitos urinários beta e alfa reduzidos, através da cromatografia à gás. Todos os pacientes apresentaram níveis elevados da relação androsterona/etio-colonolona, > 4 sendo o normal $< 1,3$, indicativo de deficiência da atividade da 5-alfa-redutase. Como podemos observar na Tabela 9, os valores de T estão normais tanto basais ($482 \pm 112,4$ ng/dl) basal quanto após estímulo com hCG ($1206,7 \pm 257,9$ ng/dl); os valores basais de DHT estavam abaixo do normal ($12,5 \pm 6,3$ ng/dl) em condição basal e assim se mantiveram após estímulo com hCG ($20,5 \pm 8,4$ ng/dl). A relação T/DHT ficou bem acima do normal ($42,7 \pm 18,9$) em condições basais e após estímulo com hCG (64 ± 20 ng/dl), confirmando o diagnóstico. A Fig.7 nos mostra os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 7 - VALORES DE DHT, T E CORRELAÇÃO T/DHT EM HOMENS
ADULTOS PRÉ E PÓS HCG

INDIVIDUO	I C	T (ng/dl)		DHT (ng/dl)		T/DHT	
		Basal	Pico*	Basal	Pico*	Basal	Pico*
1	26	410	702	57	79	7,2	8,9
2	33	554	1180	27	41	20,5	21,0
3	23	556	1589	44	82	12,6	19,0
4	26	441	638	47	58	9,4	11,0
5	28	775	2123	40	100	19,4	21,3
6	21	925	1425	50	51	18,5	31,0
MEDIA		610	1276	44,2	68,5	14,6	18,6
±		±	±	±	±	±	±
D P		200	563	10,2	22,2	5,6	7,9

* Após hCG (6000 UI dose única)

I C = Idade Cronológica em anos.

Tabela 8 - VALORES DE DHT, T E CORRELAÇÃO T/DHT EM CRIANÇAS
PRÉ-PUBERES EM CONDIÇÃO BASAL E PÓS-hCG

INDIVÍDUO	I.C. (anos)	T (ng/dl)		DHT (ng/dl)		T/DHT	
		Basal	Pico*	Basal	Pico*	Basal	Pico*
1	2,3	<8,0	411	<4,0	32,0	--	12,8
2	5,8	<8,0	283	<4,0	24,5	--	11,3
3	3,5	<8,0	683	<4,0	43,0	--	15,8
4	7,0	<8,0	354	<4,0	19,3	--	18,6
5	2,0	<8,0	427	<4,0	32,5	--	15,2
6	3,0	14,2	465	<4,0	28,0	--	16,3
MÉDIA	=	----	437	--	29,9	--	15,0
±			±		±		±
D.P.	=	----	136	--	8,0	--	2,6

* Após hCG (100U/Kg por dose x 4 doses).

I.C. = Idade Cronológica.

**Tabela 9 - VALORES DE DHT, T E RELAÇÃO T/DHT DE PACIENTES
COM PSEUDHERMAFRODITISMO MASCULINO POR
DEFICIÊNCIA DE 5-ALFA-REDUTASE**

Individuo	T (ng/dl)		DHT (ng/dl)		T/DHT	
	Basal	Pico*	Basal	Pico*	Basal	Pico*
01	476	1366	19	35	25	38
02	443	1029	11	18	40	57
03	666	1500	24	30	27	50
04	559	1453	14	16	39	91
05	443	1288	09	24	34	54
06	575	1180	10	17	57	69
07	362	708	09	12	37	59
08	332	1130	04	12	83	94
MÉDIA	482	1206,7	12,5	20,5	42,7	64
±	±	±	±	±	±	±
SD	112,4	257,9	6,3	8,4	18,9	20

VALORES NORMAIS (Tabela 7)

MÉDIA	610	1276,7	44,2	68,5	14,6	18,7
±	±	±	±	±	±	±
SD	201	562,1	10,2	22,2	5,6	7,9

* Após hCG (6000 UI im. dose única).

- PHM POR DEFICIÊNCIA DA 5 α REDUTASE
- ▨ HOMENS NORMAIS ($\bar{X} \pm IDP$) n = 6
- * CRIANÇAS NORMAIS ($\bar{X} \pm IDP$) n = 6

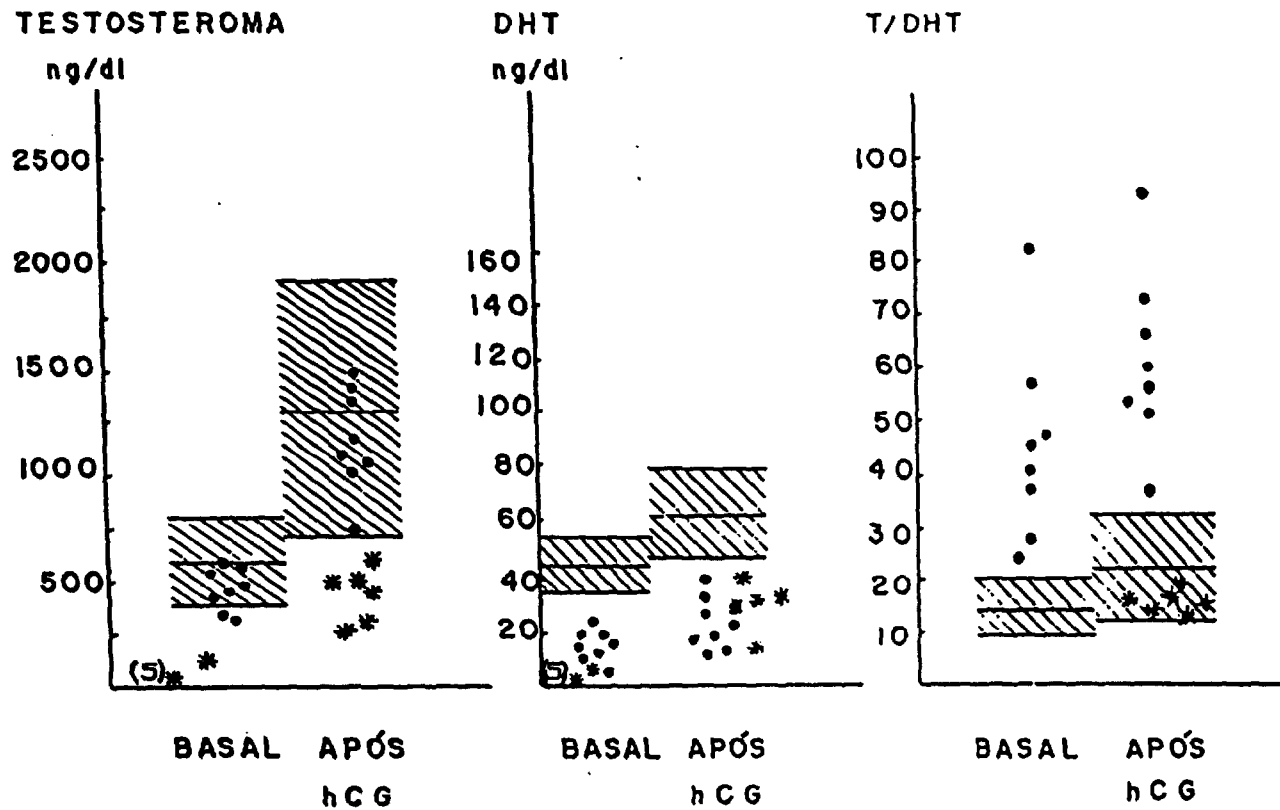


Fig.7 - NÍVEIS DE T, DHT E DA RELAÇÃO T/DHT BASAIS, APÓS hCG EM HOMENS NORMAIS, CRIANÇAS PRÉ-PUBERES E EM PACIENTES COM PHM POR DEFICIÊNCIA DA 5 α REDUTASE.

11 - DISCUSSÃO

A dosagem de DHT por radioimunoensaio vem sendo realizada desde a década de 70, (24,48, 54,59,61). Desde então diferentes métodos tem sido descritos utilizando técnicas de extração do soro com solvente orgânico seguido de cromatografia na tentativa de reduzir as interferências presentes no sistema. Estes métodos, além de trabalhosos e dispendiosos requerem grandes volumes de soro (1,5 - 5 ml) em vista da baixa sensibilidade dos antisoros empregados e das perdas do hormônio nas várias fases de dosagem (Tabela 10).

O método de cromatografia em coluna de celite é um método de baixo custo, simples, que não exige instrumentação esmerada, no qual a DHT é separada por diferença da polaridade da fase móvel dos demais esteróides, contra os quais seu anticorpo apresenta reação cruzada mais expressiva, entre eles a T e androsterediona.

Com o advento de antisoros mais específicos, testamos neste trabalho a possibilidade de simplificar ainda mais o método de dosagem de DHT descrito por ABRAHAM (1977)(2), realizando a dosagem diretamente após extração da DHT com solvente orgânico, sem cromatografia prévia.

Entretanto observamos que os níveis de DHT obtidos sem cromatografia prévia foram significativamente superiores aos obtidos após cromatografia em coluna de celite. Este fato ficou mais evidente quando correlacionamos os valores de DHT com os de T dos pacientes que apresentavam valores baixos de T.

Tabela 10 - COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DESCRITOS
PARA DOSAGEM DA DMT.

Parame- tros	T. ITO (1970)	ABRAHAM (1972)	VERMEULEN (1976)	IMPERATO (1977)	TOSCANO (1980)	SETSUKO (1980)	Presente trabalho
Volume amostra ml	5,0	0,5	1,5	1,0	1,4	1,0	1,0
Tipo de cromato grafia	Papel Bush	Celite Cell	Papel Bush	Papel Whatman	Celite 535	Sephadex LH-20	Celite 545
C.V.i	9,4%	15,0%	13,6%	9,9%	9,8%	10,6%	19,7%
Sensibi- lidade	V.N.C.	4ng	10ng/dl	5ng/dl	3,2ng/dl	1,5ng/dl	4ng/dl
Valores Normais	53 ± 19,0	49 ± 23,0	66 ± 4,0	46 ± 12,0	48 ± 9,4	26 ± 15,0	49,6 ± 23,8
							ng/dl

C.V.i = Coeficiente de Variação inter-ensaio

V.N.C. = Valor não citado.

Em alguns destes casos os níveis de DHT foram superiores aos de T, o que do ponto de vista biológico é inaceitável já que 90% da DHT circulante deriva da conversão periférica da T.

Outros fatores de interferência provável na determinação da DHT sem cromatografia prévia, além da inespecificidade do antisoro é a presença de proteínas plasmáticas no sistema de cintilação, já que o volume de soro necessário para determinação do DHT em nosso trabalho foi de 1ml e quanto maior o volume do soro, mais provável é a transferência de proteínas para o solvente orgânico na fase de decantação. As proteínas presentes no sistema de cintilação líquida, contribuem para um efeito "quenching" que resulta em valores hormonais falsamente elevados.

Utilizando o método proposto por ABRAHAM (1977) (2), por suas características já expostas, tivemos a princípio um problema de baixa recuperação da DHT das colunas de celite. Esta dificuldade foi sanada com redução da polaridade da solução de transferência. As amostras passaram a ser transferidas em isooctana pura e a recuperação da DHT marcada passou a ser maior que 50%

Os níveis normais do nosso método realizados após cromatografia em celite, foram semelhante aos métodos descritos por outros autores (Tabela. 10) que também utilizaram algum tipo de cromatografia (2,24,48,59,61).

Sugerimos que a dosagem de DHT seja realizada sempre após cromatografia prévia até que se desenvolvam antisoros altamente específicos e de grande afinidade, que tornará possível a determinação da DHT em menores volumes de soro e sem necessidade de cromatografia prévia.

Utilizando este método, fomos capazes de confirmar o diagnóstico de deficiência de 5-alfa-redutase em um grupo de pacientes com PHM (37,38,39,40,41)

Além disso, determinamos os valores normais de homens adultos e de crianças normais em condições basais e após estímulo com hCG. Estes valores serão úteis como referência para níveis normais de DHT, para este método.

12 - CONCLUSÃO

- 1 - A dosagem de DHT não pode ser realizada sem cromatografia prévia. O método de dosagem após cromatografia em coluna de celite, mostrou-se rápido, eficaz, confiável e com valores normais semelhantes à métodos mais trabalhosos e dispendiosos.
- 2 - Determinamos os valores normais de T, DHT e da relação T/DHT em homens adultos e crianças pré-puberes antes e após hCG que serão úteis como referência para este método.
- 3 - O método desenvolvido mostrou-se eficaz no diagnóstico do PHM por deficiência de 5-alfa-redutase.

13 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 - ABRAHAM, G.E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17Beta. J. Clin. Endocrinol. 29: 866 - 70, 1969.
- 2 - ABRAHAM, G.E.; DEKKER M. Handbook of Radioimmunoassay 5: 591 - 656, Clinical and Biochemical Analysis, 1977.
- 3 - ABRAHAM, G.G.; MARSHALL, J.R. AND DAANE, T.A. in Pathophysiology of gestation (N.S.Assali, ed); Academic Press, New York. 1: 1 - 61, 1972.
- 4 - ANDERSON, S.; BERMAN, D.M.; JENKINS, E.P.; RUSSEL, D.W. Deletion of steroids 5-alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature 354 : 6349, 1991.
- 5 - BARDIN, C.W.; CATTERALL, J. Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. Science 211: 1285, 1981
- 6 - BAUMINGER, S.; KOHEN, F.; LINDNER, H.R. Steroids as haptens. Optimal design of antigens for the formation of antibodies to steroid hormones. J. Steroid Biochem 5: 739, 1974
- 7 - BOON, D.A.; KEENAN, R.E.; SHAUNWHITE, JR. Conjugated and unconjugated plasma androgens in normal children. Pediat. Res. 6: 111-B, 1972.

- 8 - BROOKS J.R., BERMEN C., PRIMKA R.L., et al: 5-alpha-reductase inhibitory and anti-androgenic activities of some 4 -azasteroids in the rat. Steroids 47: 1, 1986.
- 9 - BRUCHOVSKY N.; WILSON J.D. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17beta-ol-3one by rat prostata in vivo and in vitro. J Biol. Chem. 243: 2012, 1968.
- 10 - BRYANT, M.G. Plasma artefacts in radioimmunoassay. In: BLOOM, S.R. ed Gut hormones. New York Churchill Livingstone, 1978.
- 11 - CANTU, J.M.; CORONA-RIVERA E.; DIEZ, M. et al. Post-puberal female psychosexual orientation in incomplete male pseudohermaphroditism type 2. Acta Endocrinol. 94: 273, 1980.
- 12 - CARPENTER, T.O.;, IMPERATO, MCGINLEY J.; BOULWARE, S.D., et al: Variable expression of 5-apha-reductase deficiency: Presentation with male phenotype in a child of greek origin. J Clin. endocrinol. metab. 71: 318, 1990.
- 13 - DEVKIN, D.; BALBO, C. :Recent studies on the mechanism of action of testosterone. N.Engl. J. Med 287: 1284, 1972.
- 14 - DYER, A.; FAWCETT, J.M. and POTTS D.U. "The Measurement of Aqueous Solutions of Metallic Radioisotopes by Liquid Scintillation Methods". Int J. App. Radiation and isotopes 15, 377, 1964.

- 15 - ERLANGER, B.F.; BOREK, F.; BEISER, S.M.; LIEBERMAN, S.
Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of
conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with
cortisone. J. Biol. Chem. 228: 713-27, 1957
- 16 - FARNSWORTH, W.E.; BROWN JR.: Metabolism of testosterone by
human prostate. J. Am. Med. Assoc. 189: 43, 1963.
- 17 - FISHER, L.K.; KOGUT, M.D.; MOORE, R.J.; et al: Clinical, en-
docrinological and enzymatic characterization of two patients
with 5- alpha-reductase deficiency: Evidence that a single enzyme
is responsible for the 5-alpha-reduction of cortisol and testos-
terone, J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 653, 1978.
- 18 - GOWER, D.B.; BICKNELL, D.C. - Steroid excretion and biosyn-
thesis with special reference to 16-unsaturated-C19 steroids in
cases of testicular feminization and in a male pseuhermaphodite.
Acta Endoc. 70: 561-81, 1972.
- 19 - HANING, R.V.; CARLSON, I.M.; FLOOD, A.C.; HACKETT, R.J.;
LONGCOPE, C. Metabolism of Dehydroepiandrosterone Sulfate (DS) in
Normal Women and Women with High DS Concentrations. J. Clin. Endo-
crinol. Metab. 73: 1210-1215, 1991.
- 20 - HORTON, R. Benign prostatic hyperplasia: A disorder of an-
drogen metabolism in the male. J. Am. Geriatr. 32: 380, 1984

- 21 - IMPERATO-McGINLEY, J.; GURRERO, L.; GAUTIER, T.; et al. Steroid 5-alpha-reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. Science **186**: 1213, 1974
- 22 - IMPERATO-MACGINLEY J.; GAUTIER, T.; PICHARDO, M.; SCACKLETON, C. The diagnosis of 5-alpha-reductase deficiency in infancy. J. Clin. Endocr. Metab. **63**: 1313, 1986.
- 23 - ISHIMARU, T.; EDMISTON, W.A.; PAGES, L.; et al. Splanchnic extraction and conversion of testosterone and dihydrotestosterone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. **46**: 528, 1978.
- 24 - ITO, T.; HORTON, R. Dihydrotestosterone in Human Peripheral Plasma. J. Clin. Endocr. **31**: 362, 1970.
- 25 - ITO, T.; HORTON, R. The Source of Plasma Dihydrotestosterone in man. J. Clin. Invest. **50**: 1621-1627, 1971.
- 26 - JENNER, H.; OBRINK, K.J. Determination of Fe55 and Fe59 Mixtures in Blood by "Liquid Scintillation Counting" Scandinavian. J. Clin. and Lab. Investigation **14**: 466, 1962.
- 27 - KALLMANN, H.; FURST, M. "The Basic Processes Occurring in the Liquid Scintillator", in Bell and Hayes ed. **3**: 22, 1957
- 28 - KATO, T.; HORTON, R. Studies of testosterone binding globulin. J. Clin. Endocrinol. Metab. **28**: 1160, 1968

29 - KIRSCHNER, M.A.; SINHAMAHAPATRA, S; ZUCKER, F.R.; LORIAUX, L.; NIESCHLAG E. The production, origin and role of dehydroepiandrosterone and delta 5-androstenediol as androgen prehormones in hirsute women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37 : 183 -9, 1973.

30 - KUTTENN, F., MOWSZOWICZ, I., WRIGHT F., et al: Male pseudohermaphroditism: A comparative study of one patient with 5-alpha-reductase deficiency and three patients with complete form of testicular feminization. J. Clin. Endocrinol. Metab. 49 : 861, 1979.

31 - MACDONALD, P. C.; CHAPDELAIN, A.; GONZALES, O; GURPIDE, E.; VANDE WIELE, R.L.; LIEBERMAN, S. Studies on the secreção and interconversion of the androgens. III Results obtained after the injection of several radioactive C19 steroids singly or as mixtures. J. Clin. Endocr. 25: 1557 - 68. 1965.

32 - MACGUIRE, J.S.Jr., HOLLIS, V.N.Jr ; TOMKINS G.M. Some characteristics of the microsomal steroid reductases of rat liver, J. Biol. Chem. 235 :3112. 1960

33 - MAHOUDEAU, J.A.; BARDIN, C.W.; LIPSETT, M.B. The Metabolic clearance rate and origin of plasma dihydrotestosterone in man and its conversion to the 5-alpha-androstenediols. J. Clin. Invest. 50: 1338, 1971.

34 - MARTINI, L ;The 5-alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures Biochemical and physiological implication Endocr. Rev. 3 :1, 1982.

35 - MONLIMOS, F.S.; ABRAHAM, E. Chromatographic purification of steroids prior to use in radioimmunoassay. Anal. Letters, **8** (6) 403 - 410, 1975.

36 - MENDONÇA, B.B.; NICOLAU, W. et al.; Obtenção de antisoro em Coelhos. Arg. Bras. Endocrinol. Metabol **29** :2, 1985.

37 - MENDONÇA, B.B.; BLOISE, W.; ARNHOULD, I.J.P.; BATISTA, M.C.; TOLEDO, S.P.A.; DRUMMOND, M.C.F.; NICOLAU, W.; MATTAR, E.; Male pseudohermaphroditism due to nonsaltlosing 3-beta-HSD deficiency: gender role change and absence of gynecomastia at puberty. J. Steroid Biochem **28**: 669 - 675, 1987.

38 - MENDONÇA, B.B.; BATISTA, M.C.; ARNHOULD, I.J.P.; NICOLAU,.; MADUREIRA, G.; LANDO, V.S.; KOHEK, M.B.F.; CARVALHO, D.G.; BLOISE, W. Male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency associated with gynecomastia. Rev. hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, **42**: 66-68, 1987.

39 - MENDONÇA, B.B.; DAINASE, S.M.; ARNHOULD, I.J.P.; VILLARES, S.M.; LANDO, V.S.; KOHEK, M.B.F.; INÁCIO, M.; QUEIROZ, E. SILVA, F.A.; NICOLAU, W.; BLOISE, W. Pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase. Efeito da terapêutica com testosterona e diidrotestosterona. Arg. Bras. Endocrinol. Metab. **32**: 48-50, 1988.

40 - MENDONÇA, B.B.; ARNHOLD, I.J.P.; COSTA, E.M.F.; RIGON, A.C.; MADUREIRA, G.; LANDO, V.S.; KOHEK, M.B.F.; VILLARES, S.; NICOLAU, W.; BLOISE, W. Effect of high dose testosterone and dihydrotestosterone therapy in male pseudohermaphroditism (PHM) due to 5-alpha-reductase (5-alpha-R) deficiency. International Symposium Sexual Differentiation: Basic and Clinical Aspects Montpellier, 1989 (Abstract).

41 - MENDONÇA, B. B. Pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase. Tese de Livre-Docência apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - 1990.

42 - MILEWICH, L.; PARKER, P.S.; MacDonald, P.C. Testosterona metabolism by Human lung tissue. Journal of Steroid Biochemistry 9: 29-32, 1978

43 - MOORADIAN, A. D.; MORLEY, J. E.; KORENMAN, S.G. Biological actions of androgens. Endocr. Rev. 8: 1, 1981.

44 - ODELL, W.; SKOWSKY, R.; ABRAHAM, G.; HESCOX, M.; FISCHER, D.; GROVER, P.K.; Production of Antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassays. Biol. Reprod. 6: 427-42, 1972.

45 - OLIVER, J.R.; PARKER, B.M.; BRASFIELD, D.L.; PARKER, C.W. The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. J. Clin. Invest. 47: 1035 - 42, 1968.

46 - PERRY, S.W.; WARNER, G.T. "A Method of Sample Preparation for the Estimation of Fe55 in whole Blood by the Liquid Scintillation Counting Technique" Int. J. App. Radiation and Isotopes 14, 397, 1963.

47 - PRINCE, P.; WASS, J.A.H.; GRIFFIN, J.E.; et al. High dose androgen therapy in male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency and disorders of the androgen receptor. J. Clin. Invest. 74:1496, 1984.

48 - PETERSON, R.E.; IMPERATO-McGINLEY, J.; GAUTIER, T.; et al: Male pseudohermaphroditism due to steroid 5-alpha-reductase deficiency. Am. J. Med. 62:170, 1977.

49 - ROABARD, D.; HUSTON, JR.; MUNSON, J.J. Basria : RIA data processing Basic programs. Nashville, In. Biom.Comp. Tech. Inf. Center 1980.

50 - RODENFIELD, R.L. Relationship of androgens to female hirsutism and infertility. J. Repro. Med. 11: 87-95, 1973.

51 - SAENGER, P.; GOLDMAN, A.S.; LERINE, L.H.; et al: Prepuberal diagnoses of steroid 5-alpha-reductase deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab. 46: 627, 1978.

52 - SARNAT, M.; JEFFAY, H. "Determination of Radioactive Calcium by Liquid Scintillation Counting". Anal. Chem. 34:643, 1962.

53 - SAVAGE, M.D.; PREECE, M.A.; JEFFCOATE, S.L.; et al: Familial male pseudohermaphroditism due to deficiency of 5-alpha-reductase. Clin. Endocrinol. 12 : 397, 1980.

54 - SETSUKO S.A. & WAJCHEMBERG B.L. Determinação de técnicas de medidas dos andrógenos plasmáticos - Testosterona T, Diidrotestosterona DHT, Androstenediona A e Diidroepiandrosterona DHEA por radioimunoensaio e sua avaliação em adultos normais de ambos os sexos. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 24, 2 pg.65 - 78, 1980.

55 - SIITERI, P.; WILSON, J.D; Testosterone formation and Metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. J. Clin. Endocrinol. Metabo. 38:113, 1974.

56 - SWANK, R.K.; "Characteristics of Scintillators". Ann. Rev. Nuc. Sci. 4:111, 1954.

57 - TENDOVER, J.S. Prostate, Pates and Pimples, "The Potential Medical uses of Steroids 5-alpha-reductase Inhibitors. Endocrinol and Metabol. Clinics of North America. 2:4 893-909, 1991

58 - Toscano, V. Dihydrotestosterone Metabolism. Clinics in Endocrinology and Metabolism. 15 : 2, 1980.

59 - TOSCANO, V.; PETRANGELI, E.; ADAMO, M.V.; FOLI, S.; CAIOLA, S.; SCIARRA, F. Simultaneous Determination of 5-alpha-reduced metabolites of testosterone in human plasma. J. Steroid Biochemistry 14: 574-578, 1981.

60- VAITUKAITIS, J.L.; DALE, S.L; MELBY, J.C. Role of ACTH in the secretion of free dehydroepiandrosterone and its sulfate ester in man. J. Clin. Endocr. 29:1443-7, 1969.

61 - VERMEULEN, A. Testosterone and 5-alpha-androstan-17beta-ol-3-one (DHT). Levels in man. Acta Endocrinol. 83, 651-664. 1976

62 - VERMEULEN, A.; VERDONCK, L. The endocrine function of the human testis. J. Steroid Biochem. 6: 1975.

63 - WALSH, P.C.; MADDEN, J.D.; HARROD, M.J. et al: Familial incomplete male pseudohermaphroditism type 2: Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. N. Engl. J. Med. 291:944, 1977.

64 - WEINSTEIN, A.; LINDNER, H.R.; FRIEDLANDER, A.; BAUMINGER, S. Antigenic complexes of steroid hormones formed by coupling to protein through position 7. Preparation from D4-3-oxosteroids and characterization of antibodies to testosterone and androstenedione. Steroids 20:789, 1972.

65 - WILSON, J.D.: The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. Am. J. Med. 68: 745, 1980.

66 - WILSON, J.D. WALKER J.D. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17beta-ol-3-one (Dihydrotestosterone) by skin slices in man. J. Clin. Invest. 48: 371. 1969

67 - YALLOW, R.S. & BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, Nature (Lond.) 184 (suppl. 21):1648 - 9, 1959.