

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE MEDIDA DE ANDRÓGENOS
PLASMÁTICOS TESTOSTERONA (T), DIHIDROTESTOSTERONA (DHT),
ANDROSTENEDIONA (A) E DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA),
POR RADIOIMUNOENSAIO E SUA APLICAÇÃO AO
ESTUDO DE UM DEFEITO DE SÍNTESE
ADRENOCORTICAL (21-HIDROXILASE)**

Setuko Soto AchenJ

**DISSERTAÇÃO E TESE - IPEN 6
IPEN - DT - 6**

MARÇO/1990

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Dr. Luiz Cirne do Prado – Presidente
Dr. Edgardo Azevedo Soares Júnior – Vice-Presidente

CONSELHEIROS

Dr. Hécio Modesto de Costa
Dr. Ivano Humbert Marchesi
Dr. Admar Carvellini
Dr. Waldyr Muniz Olive

REPRESENTANTES

Dr. Jacob Charcot Pereira Rios
Dr. Paolo Enrico Maria Zaghen

SUPERINTENDENTE

Hernani Augusto Lopes de Amorim

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE MEDIDA DE ANDRÓGENOS
PLASMÁTICOS TESTOSTERONA (T), DIHIDROTESTOSTERONA (DHT),
ANDROSTENEDIONA (A) E DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA),
POR RADIOIMUNOENSAIO E SUA APLICAÇÃO AO
ESTUDO DE UM DEFEITO DE SÍNTESE
ADRENOCORTICAL (21-HIDROXILASE)**

Setsuko Sato Achando

**Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências
– Área de Fisiologia" – Orientador Prof. Dr. Bernardo
Léo Wajchenberg. Apresentada e defendida em 01
de agosto de 1979, no Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO – BRASIL**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IPEN

INIS Categories and Descriptors

C45

ANDROGENS: Radioimmunoassay

TESTOSTERONE: Radioimmunoassay

ANDROSTENEDIONE: Radioimmunoassay

HYDROXYANDROSTENONE: Radioimmunoassay

STEROIDS: Radioimmunoassay

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	1
2 – MATERIAL	8
2.1 – Reagentes, Soluções e Aparelhagem	8
3 – MÉTODOS	11
3.1 – Preparo do Plasma para o Radioimunoensaio	11
3.2 – Extração	11
3.3 – Purificação da Testosterona e Dihidrotestosterona	13
3.4 – Purificação de Dehidroepiandrosterona	13
3.5 – Separação Cromatográfica	16
3.6 – Eluição da Dehidroepiandrosterona	16
3.7 – Diluição do Anti-Soro e Cálculo da Porcentagem de Ligação do Hormônio Radioativo na Ausência da Massa Fria	16
3.8 – Protocolo da Curva-Padrão de Testosterona (T)	17
3.9 – Protocolo da Curva-Padrão de Androstenediona (A)	17
3.10 – Protocolo da Curva-Padrão de Dehidroepiandrosterona (DHEA)	17
3.11 – Separação do Hormônio Marcado Livre do Hormônio Ligado ao Anti-Soro	17
3.12 – Protocolo do Radioimunoensaio das Amostras Plasmáticas	25
3.13 – O Protocolo Geral do Radioimunoensaio de X Amostras de Plasma e um Controle (B1) “BRANCO”, Está Indicado no Quadro 4	25
3.14 – Avaliação das Perdas de Esteróides no Processamento do Plasma (Recuperação)	26
3.15 – Cálculo do Radioimunoensaio	26
3.16 – Avaliação da Sequência Operacional para o Ensaio de “Andrógenos” em Plasma	28
4 – RESULTADOS DO ESTUDO ESTATÍSTICO DA METODOLOGIA	29
5 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AO ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA FISIOLOGIA ADRENAL	39
6 – DISCUSSÃO	39
7 – CONCLUSÕES	50
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ABREVIATURAS

T	=	Testosterona
DHT	=	Dihidrotestosterona
A	=	Androstenediona
DHEA	=	Dehidroepiandrosterona
F	=	Cortisol
Pr	=	Progesterona
17OHP_r	=	17-hidroxiprogesterona
mg	=	miligrama
ml	=	mililitro
ng	=	nanograma
pg	=	picograma
μl	=	microlitro
cpm	=	contagem por minuto
rpm	=	rotação por minuto
\bar{X}	=	média
DP	=	desvio padrão
r	=	coeficiente de correlação
DPM	=	desvio padrão médio
CV	=	coeficiente de variação

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE MEDIDA DE ANDRÓGENOS
PLASMÁTICOS TESTOSTERONA (T), DIHIDROTESTOSTERONA (DHT),
ANDROSTENEDIONA (A) E DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA),
POR RADIOIMUNOENSAIO E SUA APLICAÇÃO AO
ESTUDO DE UM DEFEITO DE SÍNTESE
ADRENOCORTICAL (21-HIDROXILASE)**

Setsuko Sato Achando

RESUMO

O autor padronizou métodos para dosagens dos esteróides androgênicos (T, DHT, A e DHEA) por radioimunoensaio, usando pequenos volumes de plasma: T(0,2 e 0,5 ml), DHT(1,0 ml) A e DHEA(0,5 ml) para homens e mulheres respectivamente.

A extração é feita com éter etílico, o extrato sendo aplicado em mini coluna de vidro com SEPHADEX LH-20 para separação de T e DHT e em alumina para purificação de DHEA.

Após a eluição e incubação com os anti-soros respectivos (T, DHT, A e DHEA), o radioimunoensaio era processado à temperatura de 4°C por 12 e 16 horas, seguido de separação das formas livres e ligadas ao anti-soro, com carvão dextrana T-70. As contagens foram realizadas em cintilador líquido.

A metodologia mostrou-se específica pela prova de diluição. A sensibilidade foi de 5 pg para A e DHEA e 6 pg para T e DHT. A precisão mostrou-se boa, com coeficiente de variação de 5-10% para reprodutibilidade intra-ensaio e de 10-15%, adequada, para a reprodutibilidade inter-ensaio. A exatidão foi de 98,52 ± 7,96% para (T e DHT), 98,34 ± 10,05% para (T), 98,04 ± 8,74% para (DHT), 104,82 ± 9,41% para (A) e 103,66 ± 5,71% para (DHEA).

Os valores obtidos em indivíduos normais foram respectivamente em ng/ml: para homens média ± DP: T: 5,2 ± 1,3; DHT: 0,26 ± 0,18; A: 0,9 ± 0,4; e DHEA: 4,6 ± 1,7 e para mulheres T: 0,5 ± 0,2; DHT: 0,4 ± 0,2; A: 0,8 ± 0,5 e DHEA: 4,8 ± 1,7.

A metodologia aplicada em sangue colhido simultaneamente em veia periférica e adrenais, em condições basais, após depresso com dexametasona e estímulo com ACTH, permitiu demonstrar diretamente a secreção (presença de gradiente adrenal/perif) dos andrógenos pelo córtex, na deficiência de 21-hidroxilase.

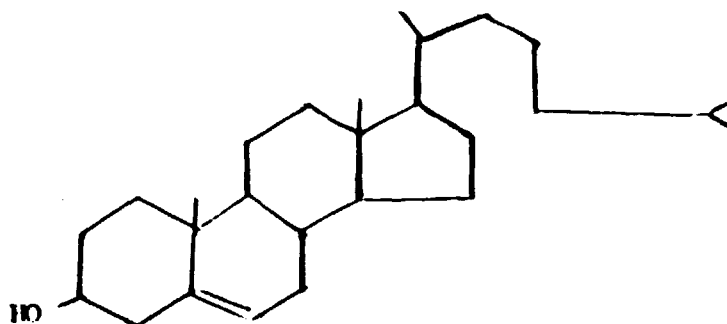
1 - INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

Os esteróides são compostos orgânicos pertencentes a uma classe com o núcleo ciclopentano perhidrofenantreno⁽⁴⁾.

As células do corpo sintetizam o colesterol (C₂₇), contudo, somente células especializadas podem degradar a cadeia lateral tornando-se precursoras dos esteróides da série pregnana, androstana e estrana.

Aprovada para publicação em Agosto/1979.

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do Autor.



Colesterol

Os andrógenos são compostos esteróides da série androstana que apresentam 19 átomos de carbono. São substâncias capazes de estimular, especificamente, o desenvolvimento das características sexuais secundárias, tipo masculino, apresentando pois, atividade androgênica⁽²⁶⁾.

Estas substâncias também afetam outros sistemas do corpo e em alguns casos o efeito pode ser de maior significância do que a ação sobre a estrutura sexual.

Os andrógenos são secretados pelas gônadas e córtex adrenal.

No testículo são secretados a testosterona e em menor grau a dihidrotestosterona, sendo que pela gônada feminina são produzidas a testosterona e androstenediona.

Os principais andrógenos secretados pela córtex adrenal parecem ser a dehidroepiandrosterona e seus conjugados sulfatados e androstenediona e seus derivados 11 β -hidroxilados.

Os métodos analíticos clássicos para dosagem dos andrógenos nos fluidos orgânicos em técnicas isotópicas e de cromatografia de gás são muito laboriosos e necessitam um grande volume plasmático, além de carecerem de precisão e sensibilidade, reduzindo sua praticabilidade e limitando seu uso.

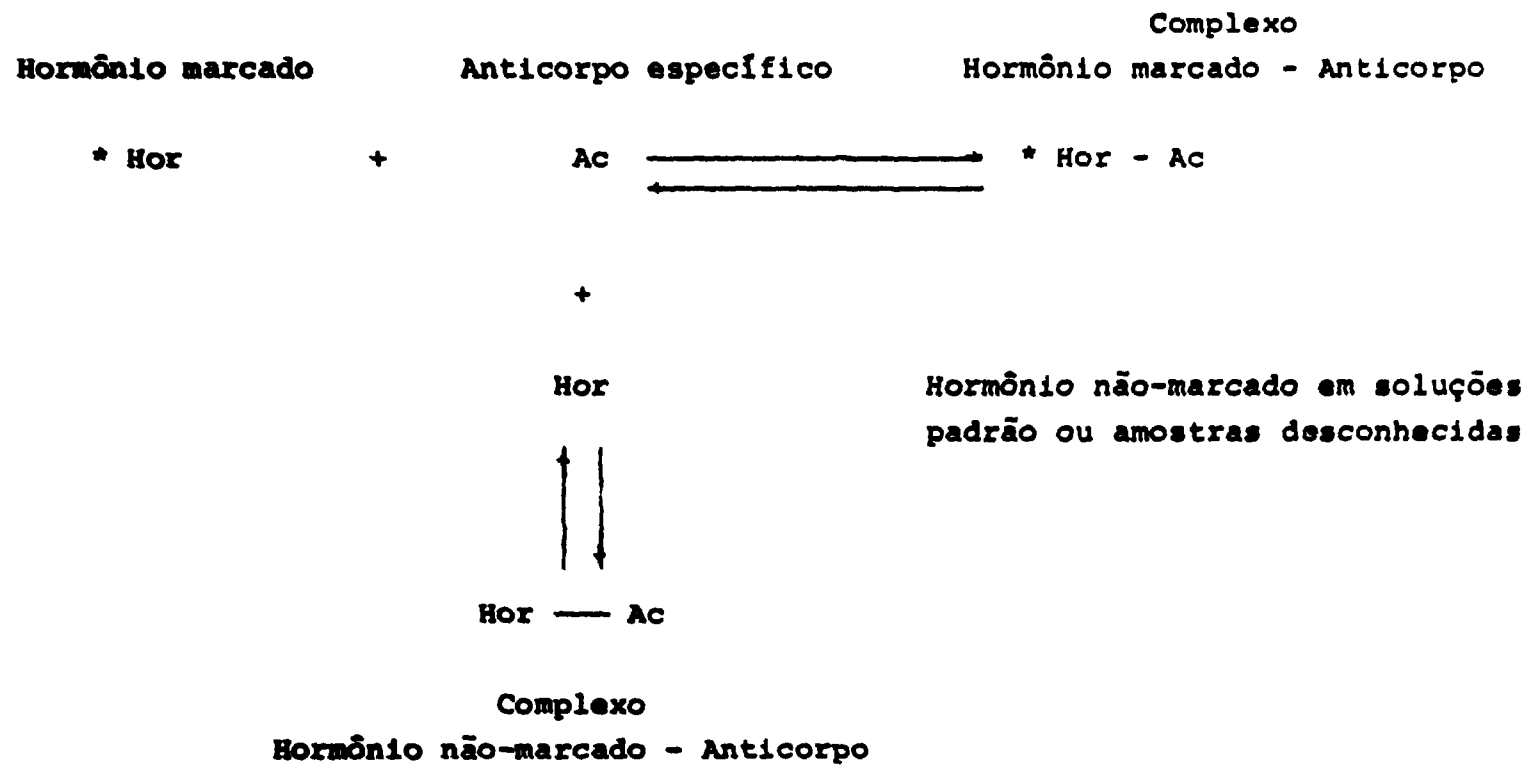
Durante a última década, diversos métodos físico-químicos, por exemplo, técnica da diluição de dupla marcação isotópica e, mais recentemente, ligação e proteínas transportadoras do plasma⁽⁷⁾, foram desenvolvidos para os ensaios dos baixos níveis de andrógenos (T e A) em plasma periférico. Entretanto a sensibilidade desta tecnologia era também pequena, além de necessidade de separação prévia dos esteróides dos demais circulantes obtida, geralmente por cromatografia em coluna ou camada delgada.

Posteriormente, o radioimunoensaio foi aplicado na mensuração de muitos compostos orgânicos⁽¹⁾ de interesse biológico. Esta mensuração baseia-se, essencialmente, na reação de um antígeno marcado com um anticorpo específico, como indicado no esquema abaixo.

Recentemente, Furuyama e colaboradores⁽¹⁴⁾ desenvolveram o método de radioimunoensaio para a determinação de testosterona plasmática, utilizando coluna de alumina. Ismail e seus colaboradores⁽²⁰⁾ não utilizam a cromatografia, seu método sendo muito mais simples, direto e econômico. A sensibilidade e precisão provaram ser satisfatória embora não fosse seu anti-soro específico, como aliás nenhum o é para a testosterona.

Quando Berson e Yalow publicaram o primeiro trabalho sobre aplicação dos princípios do radioimunoensaio, em 1959, eles estudaram um hormônio polipeptídico de peso molecular não muito elevado, a insulina.

Os hormônios polipeptídicos, apresentando peso molecular acima de 5000, são imunogênicos



em animais de espécie diferente, quando associados ao adjuvante de Freund, e não foram encontrados obstáculos no que refere à produção de anticorpos específicos para uso em radioimunoensaio. Entretanto, os hormônios esteróides apresentam peso molecular de 250 a 350 e não são imunogênicos pois o menor hormônio peptídico que se mostrou imunogênico foi a vasopresina, de peso molecular 1080.

Erlanger e colaboradores, em 1957 e 1959, já haviam demonstrado ser possível a produção de anticorpos específicos contra os esteróides, desde que eles fossem usados como haptenos, ou seja, incorporados a macromoléculas, em geral albumina sérica bovina.

Como os esteróides naturais contêm grupos OH^- e O^- , que não se ligam às proteínas em que estes grupos se tornam reativos, ou seja, transformados em radicais carboxílicos ou aminícos. Assim, preparam-se derivados contendo grupos carboxílicos livres que são acoplados a grupos aminícos dos resíduos da lisina⁽¹⁾, na albumina humana ou bovina sérica, pelo uso da condensação carbodimida.

Os reagentes para preparar os derivados esteróidicos variam caso se utilizam os grupos OH^- ou cetônicos como locais de ancoradouros da proteína.

Assim, são utilizados mais freqüentemente a esterificação do grupo OH^- por anidrido succínico e para os grupos cetônicos preparam-se derivados oxima, usando a carboximetil-hidroxi-aminina. A reatividade dos grupos alcoólicos e cetônicos dependerá de sua localização na molécula dos esteróides.

Os esteróides, covalentemente ligados à carreadores protéicos são imunogênicos contra os resíduos livres da molécula de esteróide. Como os resíduos livres são às vezes comuns para diferentes esteróides, isto explicaria a reatividade cruzada entre eles.

Mais recentemente, Lindner e colaboradores⁽²⁴⁾ conseguiram ligar diretamente o esteróide ao carreador protéico sem a necessidade de formação de um derivado e os anticorpos resultantes são específicos.

Em 1969, Abraham⁽³⁾ publicou uma técnica de dosagem de estricl sérico por radioimunoensaio, com anticorpo relativamente específico. A partir de 1970, as publicações se multiplicaram muito, de tal sorte que atualmente não se conhece nenhum esteróide de importância fisiológica que não seja mensurável por técnica radioimunológica.

Neste trabalho, propomo-nos a estudar a técnica do radioimunoensaio para a mensuração dos andrógenos em plasma humano visando à sua padronização de modo a torná-la aplicável nas medidas desses hormônios em condições normais, patológicas e experimentais, além da sua utilidade no diagnóstico de diversas disfunções gonadais e adrenais. Tendo a possibilidade de medir estes hormônios diretamente nos efluentes adrenais e compará-los com a mensuração simultânea no sangue periférico, resolvemos aplicar a metodologia a uma condição de defeito enzimático, "in anima nobile" e assim avaliar, pelos gradientes (periferia e veia adrenal) a secreção direta destes andrógenos pela adrenal, pela primeira vez na literatura.

Para melhor compreensão dos resultados que obtivemos, apresentaremos um sumário da biossíntese dos andrógenos nos indivíduos normais e no defeito a ser apresentado nesta tese.

Biossíntese dos Principais Esteróides Adrenais

O precursor de todos os hormônios da córtex adrenal, como já indicado, é o colesterol que pela ação da 20,22 desmolase dá origem à pregninolona.

A conversão da pregninolona para a progesterona envolve a desidrogenase do grupo 3 β -hidroxil e

Δ^5 -4 oxocosteróide isomerase. A progesterona é convertida em 17-hidroxiprogesterona pela ação da 17-hidroxilase.

A 17-hidroxiprogesterona (11-deoxicortisol ou "substância S" de Reichstein) pela ação da 21-hidroxilase. Finalmente a substância S é convertida em cortisol (composto F) pela ação de 11 β -hidroxilase.

A zona fasciculada também forma uma pequena quantidade de corticosterona (composto B) como subproduto da síntese do cortisol. A biosíntese é idêntica exceto pelo fato da progesterona sofrer diretamente a ação da 21-hidroxilase e posteriormente da 11 β -hidroxilase.

A conversão da progesterona em aldosterona na zona glomerulosa envolve uma série de enzimas similares àquelas da síntese do cortisol, mas com três diferenças importantes.

Na zona glomerulosa, pela ausência de 17 α -hidroxilase, falta a capacidade para formar 17 α -hidroxiprogesterona, não se produzindo o cortisol.

Por outro lado, forma-se a corticosterona (composto B) que pela ação da 18-hidroxiesteróide desidrogenase origina a aldosterona.

Além dos hormônios principais, o cortisol e aldosterona, a adrenal produz também como subprodutos, os andrógenos e estrógenos.

Quantitativamente, o andrógeno mais importante é o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), que é derivado da pregninolona e que por sua vez é convertido em DHEA e vice-versa.

A DHEA, em parte é também derivada da 17-hidroxipregnenolona pela ação da 17-desmolase. Uma fração importante da DHEA é convertida em androstenediona e esta, por sua vez, em 11 β -hidroxiandrostenediona ou reduzida a testosterona.

A androstenediona também poderá ser derivada de 17-hidroxiprogesterona conforme se poderá ver no esquema da Figura 1.

O defeito de síntese a ser analisado corresponde ao bloqueio da 21-hidroxilase que pode ser parcial e total. É parcial quando compromete apenas a síntese do cortisol (e total com o comprometimento também da produção de aldosterona).

No bloqueio, havendo diminuição da produção do cortisol, resultará um aumento da secreção de ACTH hipofisário que estimulará as glândulas supra-renais, levando a uma hiperplasia e hipersecreção de andrógenos, como subproduto do acúmulo do substrato a montante, para normalizar os níveis de cortisol.

A enzima atua na conversão da progesterona em DOC (deoxicorticosterona) e na passagem de 17-hidroxiprogesterona em 11-deoxicortisol (composto S). Na incapacidade de realização desta última das reações, os compostos precursores se acumulam particularmente a 17-hidroxiprogesterona que por ser o principal precursor dos andrógenos nos supra-renais, estes produzem em excesso levando à masculinização do feto feminino ou macrogênitossomia do masculino.

O bloqueio progesterona-DOC somente se observa no defeito total da 21-hidroxilase.

Inte: Relação dos Andrógenos

Os andrógenos secretados pela córtex adrenal e gônadas estão indicados na Figura 2 bem como sua inter-conversão após secreção.

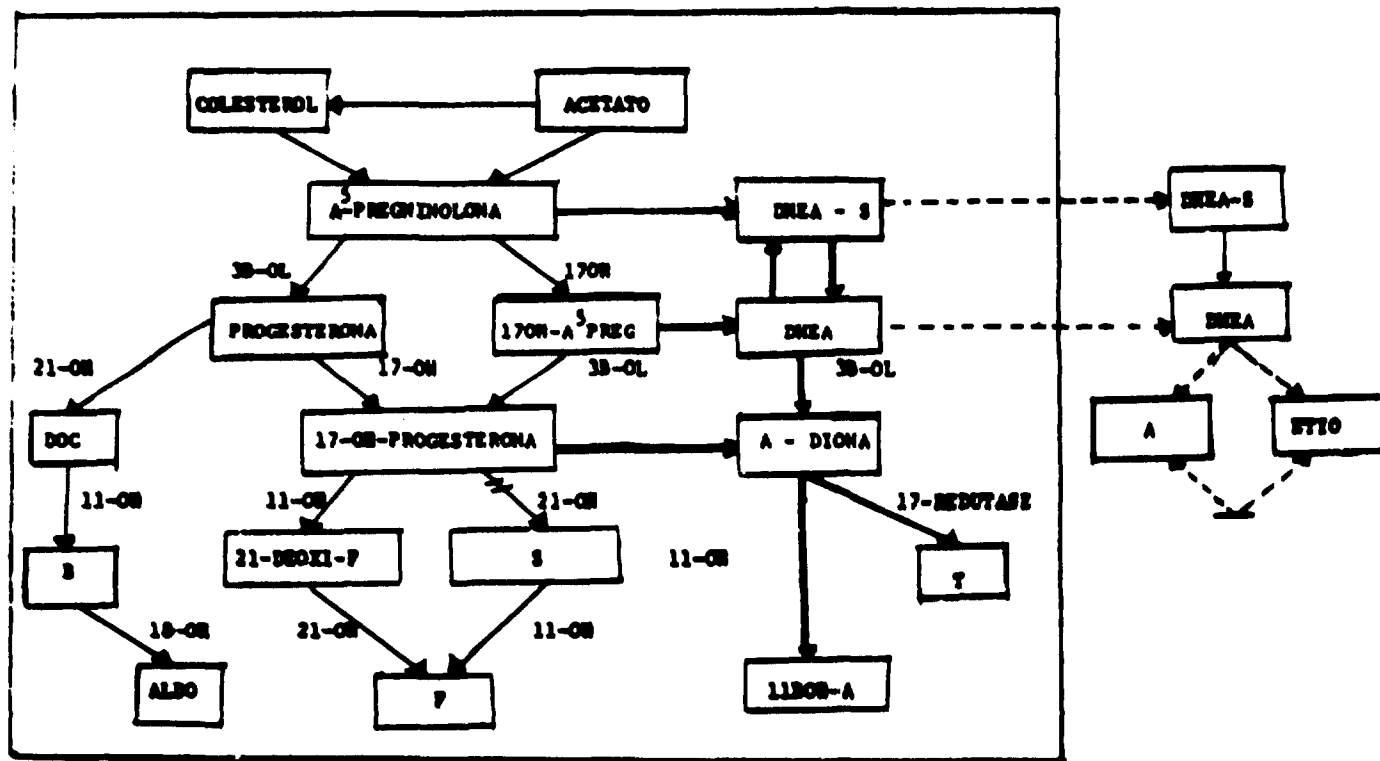


Figura 1 - Biosíntese dos principais andrógenos adrenais - figura segundo "Migeon C. J. The Biological basis of pediatric practice (Cooke R.E., ed.) New York, MacGraw-Hill, 1968, modificado.

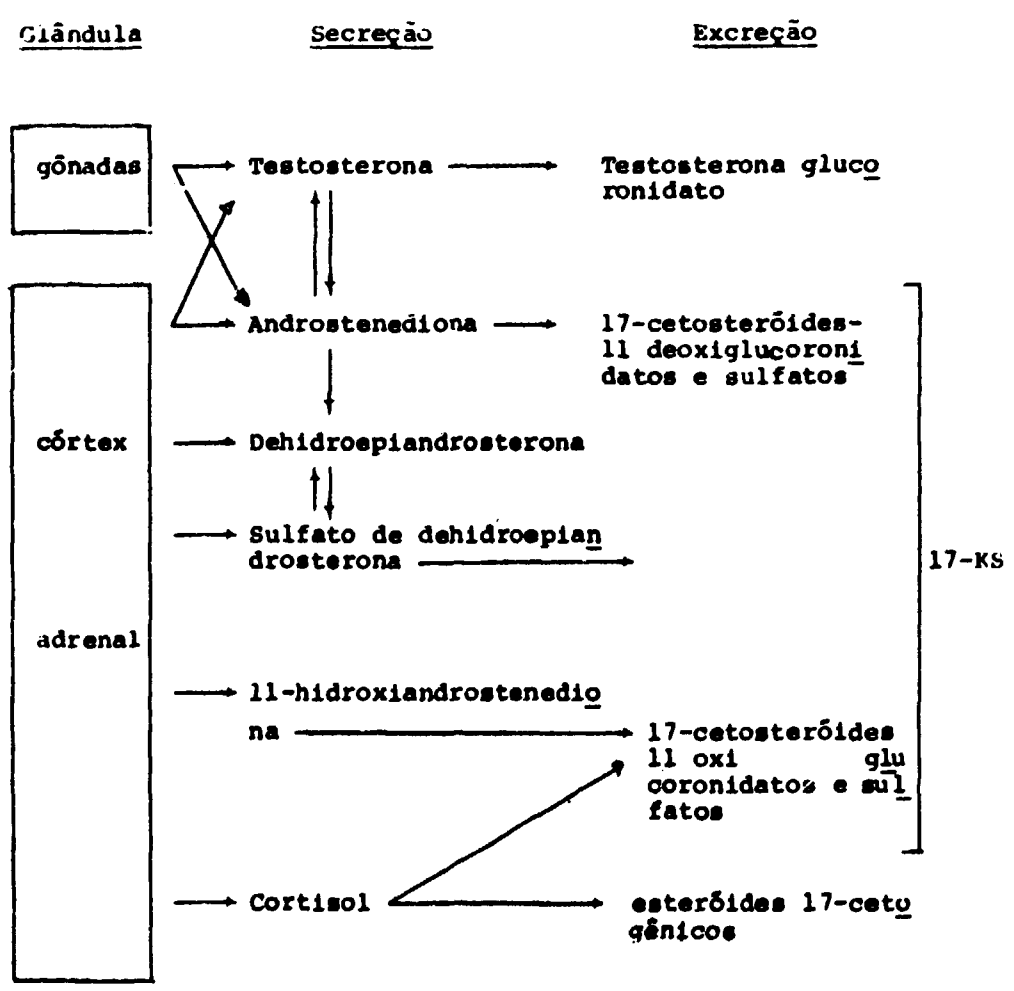


Figura 2 - Principais C₁₉ esteróides secretados, interconversão e excreção

No homem as interconversões indicadas na Figura 2 são de pouca importância devido à grande quantidade de T secretada pelos testículos. Na mulher, contudo, somente cerca de 150µg de T são secretados diretamente comparada com cerca de 20 mg de andrógenos pouco potentes⁽¹⁰⁾, do homem.

A androgenicidade desses andrógenos pode ser devida, total ou parcialmente, à sua conversão em T após secreção.

Na mulher, a taxa de secreção de A é cerca de vinte vezes maior do que a da T. Embora somente uma pequena proporção da A seja convertido em T, aproximadamente metade da concentração da T encontrado no sangue das mulheres é resultado de conversão da A.

Os metabolitos de todos estes esteróides são excretados na urina, principalmente com 17-cetosteróides. Parte da DHEA-S (sulfato de dehidroepiandrosterona) é excretada sem modificação, mas parte é metabolizada via A em 17-cetosteróides 11 deoxi, androsterona e etioolanolona na forma de seus sulfatos e conjugados glucurônicos. A maior parte da A e T é também metabolizada por esta última via, mas uma pequena fração da T, cerca de 1%, é excretada como testosterona glucuronidato.

2 – MATERIAL

2.1 – Reagentes, Soluções e Aparelhagem

2.1.1 – *Padrões dos Hormônios Esteróides*: T, DHT, A e DHEA; utilizados sem repurificação, foram obtidos da "Sigma Chemical Corporation" (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América). As soluções estoque foram preparadas em etanol bidistilado⁽⁵⁾ a 1 mg/ml e mantidas a -20°C. Destas, foram feitas as diluições seguintes:

Solução (B), tomando de (M) 100µl e completando o volume para 10 ml com tampão, obtendo-se uma concentração de 10µg/ml e tomando de B 5µl e completando o volume para 10 ml com tampão, obtendo-se uma concentração de 0,1 ng/20µl para T, DHT, e DHEA, correspondendo à solução de uso. Para a androstenediona, tomamos de (B) 50µl e completamos para 10 ml com tampão, obtendo-se solução de uso de uma concentração de 5 ng/ml.

2.1.2 – Hormônios Radioativos

Foram empregados os seguintes:

Testosterona (1,2,3H(N) – 40Ci/mmol-cat.NET-187)

Dihidrotestosterona (1,2,3H(N) – 40Ci/mmol-cat.NET-302)

Androstenediona (1,2,3H(N) – 40Ci/mmol-cat.NET-181)

Dehidroepiandrosterona (1,2,3H(N) – 40-60Ci/mmol-cat.NET-479).

Obtidos da (New England Nuclear Corp., Boston, Massachusetts, Estados Unidos da América) em solução de benzeno-etanol 9:1. Tomamos uma pequena alíquota correspondendo de 500.000 a 1.500.000 cpm, dependendo do esteróide marcado.

2.1.3 – Anti-soros Liofilizados

- a) Para a medida de testosterona, utilizamos a obtida de coelhos imunizados com testosterona-3-oxima albumina bovina, adquirido da New England Nuclear Corporation,

Boston, Massachusetts, Estados Unidos da América. Este anti-soro, por ter 100% de imunorreatividade cruzada para DHT, foi também utilizado para o ensaio deste esteróide.

- b) Para ensaio da androstenediona empregamos o anti-soro preparado em coelho no qual foi injetado o androstenediona 7 α -soro albumina bovina, obtido da Miles-Yeda Ltd. (Kiyat Weizmann, Rehovot, Israel).
- c) Para a medida de dehidroepiandrosterona utilizamos o anti-soro preparado em coelhos após imunização com dehidroepiandrosterona-17-oxima-soro albumina bovina, obtida da "Endocrine Science", Tarzana, Califórnia, Estados Unidos da América.

2.1.4 – Sephadex LH-20(25-100 mesh) – Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.

2.1.5 – Alumina (óxido de alumínio Al₂O₃ ativada, neutro para cromatografia em coluna (E, Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.6 – P.P.O. (2,5-difeniloxazole) – Amersham/Searle, Illinois, Estados Unidos da América.

2.1.7 – P.O.P.O.P. (p-bis(2-(5-feniloxazolil) – benzeno – Amersham/Searle, Illinois, Estados Unidos da América.

2.1.8 – Dimetil P.O.P.O.P. (1,4-bis(2(4 – metil-5-feniloxazolil) – benzeno – Amersham/Searle, Illinois, Estados Unidos da América.

2.1.9 – Triton X-100(iso-octil-fenoxipolietoxietanol) – Rohn and Haas, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos da América.

2.1.10 – Tolueno – J. T. Baker Produtos Químicos, Ltda., São Paulo, SP – Brasil.

2.1.11 – Líquido de Cintilação

a) Para uso no radioimunoensaio de T, DHT e DHEA:

- 1) Solução concentrada – 20 g de P.P.O., 0,25 g de dimetil P.O.P.O.P. dissolvidos em 500 ml de tolueno.
- 2) Mistura de Triton X-100: Tolueno(1:2).
- 3) Solução de uso – Mistura de uma parte da solução (1) e dez partes da solução (2).

b) Para o radioimunoensaio de A:

4 g de P.P.O.

200 mg de P.O.P.O.P.

667 ml de Tolueno.

333 ml de Triton X-100.

2.1.12 – Solventes orgânicos foram utilizados todos de alta pureza (PA ou equivalentes) da firma Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha. Éter etílico, Isooctano para cromatografia, benzeno para cromatografia, N-Hexano, Diclorometano, Acetato de etila, Álcool metílico, Álcool etílico absoluto, Ácido clorídrico, Ácido sulfúrico.

2.1.13 – **Dextran T-70** Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Suécia.

2.1.14 – **Azida sódica** – Merck Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.15 – **Albumina bovina fração V em pó**, fornecida pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

2.1.16 – **Fosfato monobásico – Na H₂PO₄H₂O** – E. Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.17 – **Gelatina** – E. Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.18 – **Trizma HCl(Tris(hidroximetil) cloreto de aminometano** – “Sigma Chemical Corporation” (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

2.1.19 – **Trizma Base(Tris(hidroximetil)aminometano** – “Sigma Chemical Corporation” (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

2.1.20 – **Cloreto de sódio** – E. Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.21 – **Solução Tampão**

a) Tampão fosfato 0,1M pH 7,4, preparado da maneira seguinte: 13,8 g NaH₂PO₄H₂O acrescido de 2 g de azida sódica, 5 g de albumina bovina fração V dissolvidos em 1 litro de água destilada para T e DHT.

b) Tampão fosfato pH 8,0 – 4,44 g de Trizma HCl, 2,65 de Trizma Base, acrescidos de 1,0 g de gelatina, 1,0 de azida sódica, 5,844 g de NaCl, dissolvidos em 1 litro de água destilada para A.

c) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 – 13,8 g de fosfato monobásico, acrescidos de 9,0 g de NaCl, 1,0 g de azida sódica, 1,0 g de gelatina, dissolvidos em 1 litro de água destilada para DHEA.

2.1.22 – **Carvão ativado** – “Sigma Chemical Corporation” (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

2.1.23 – **Solução de Dextrana**, preparada no tampão de ensaio (a e b), pela adição de 0,25 g de carvão ativado e 0,025 g de dextrana T-70 a 100 ml de tampão. Esta solução é estável a 4°C, até 30 dias, sendo que por ocasião do seu uso a solução é mantida em contínua agitação magnética, sendo empregada para o radioimunoensaio de T, DHT e DHEA.

2.1.24 – **Suspensão de 0,5 g de carvão**, 0,05 g de Dextrana T-70, a 100 ml de tampão fosfato pH 8,0 (b), estável a 4°C no máximo de 30 dias, para o radioimunoensaio de A.

2.1.25 – **Material Biológico**

Plasma humano obtido por colheita venosa em tubos contendo um microlitro de heparina sódica. Imediatamente após a colheita, os sangues eram centrifugados, o plasma separado e estocado a -20°C até no máximo 6 meses. Os materiais foram obtidos de indivíduos normais e com bloqueio parcial de 21-hidroxilase (hiperplasia congênita da supra renal), diagnosticado pelos métodos clínico-laboratoriais clássicos.*

* Virilização precoce, avanço de idade óssea, defeitos congênitos dos genitais externos no sexo feminino, elevação dos 17-cetosteróides urinários e do pregnanetriol urinário, com bloqueio por dexametazona exógena.

2.1.26 – Equipamentos

- Vortex Mixer Genio-Scientific Industrie Inc., Springfield, Massachusetts, Estados Unidos da América, 01103 Model K-550 – G.
- Pipetador automático Oxford de 100, 200, 250, 500 e 1000 μ L
- Pipetador A. H. Thomas (1-10 ml).
- Cintilador líquido Beckman(LS-150) – dotado de espectrômetro e troca automática de amostras.
- N-Evap(Evaporador analítico) – Organomation Associates Inc. TPK Sta Shrewbury, MA. Model 106.
- Dubnoff Metabolic Shaking incubator – Precision Scientific, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América.
- Centrífuga refrigerada – Damon IEC tipo PR-600 – International Equipment Company, Boston, Massachusetts, Estados Unidos da América.
- Congelador.
- Refrigerador.

3 – MÉTODOS

A técnica seguida baseou-se em termos gerais nas indicações de Auletta⁽⁹⁾, com modificações que introduzimos durante seu desenvolvimento e consistiu nas fases seguintes: (Figura 3)

3.1 – Preparo do Plasma para o Radioimunoensaio

Foram utilizadas as seguintes alíquotas do plasma, dependendo do andrógeno a ser medido:

- a) Testosterona: 0,2 e 0,5 ml para homem e mulher, respectivamente,
- b) Dihidrotestosterona: 1,0 ml para homem e mulher, respectivamente,
- c) Androstenediona: 0,5 ml para homem e mulher respectivamente,
- d) Dehidroepiandrosterona: 0,5 ml para homem e mulher, respectivamente,

completando o volume para 1,0 ml com tampão fosfato (a, b ou c) e adicionamos 0,1 ml de hormônio tritiado(\pm 1000cpm). Agitamos, em "Vortex", por um minuto e deixamos em repouso a 4°C por 12-16 horas para estabelecer o equilíbrio entre o hormônio contido no plasma e o hormônio tritiado. Este hormônio radioativo se constitui em padrão interno para a estimativa da recuperação.

3.2 – Extração

Adicionam-se 4 ml de éter etílico, agita-se por um minuto e separa-se a fase orgânica após a

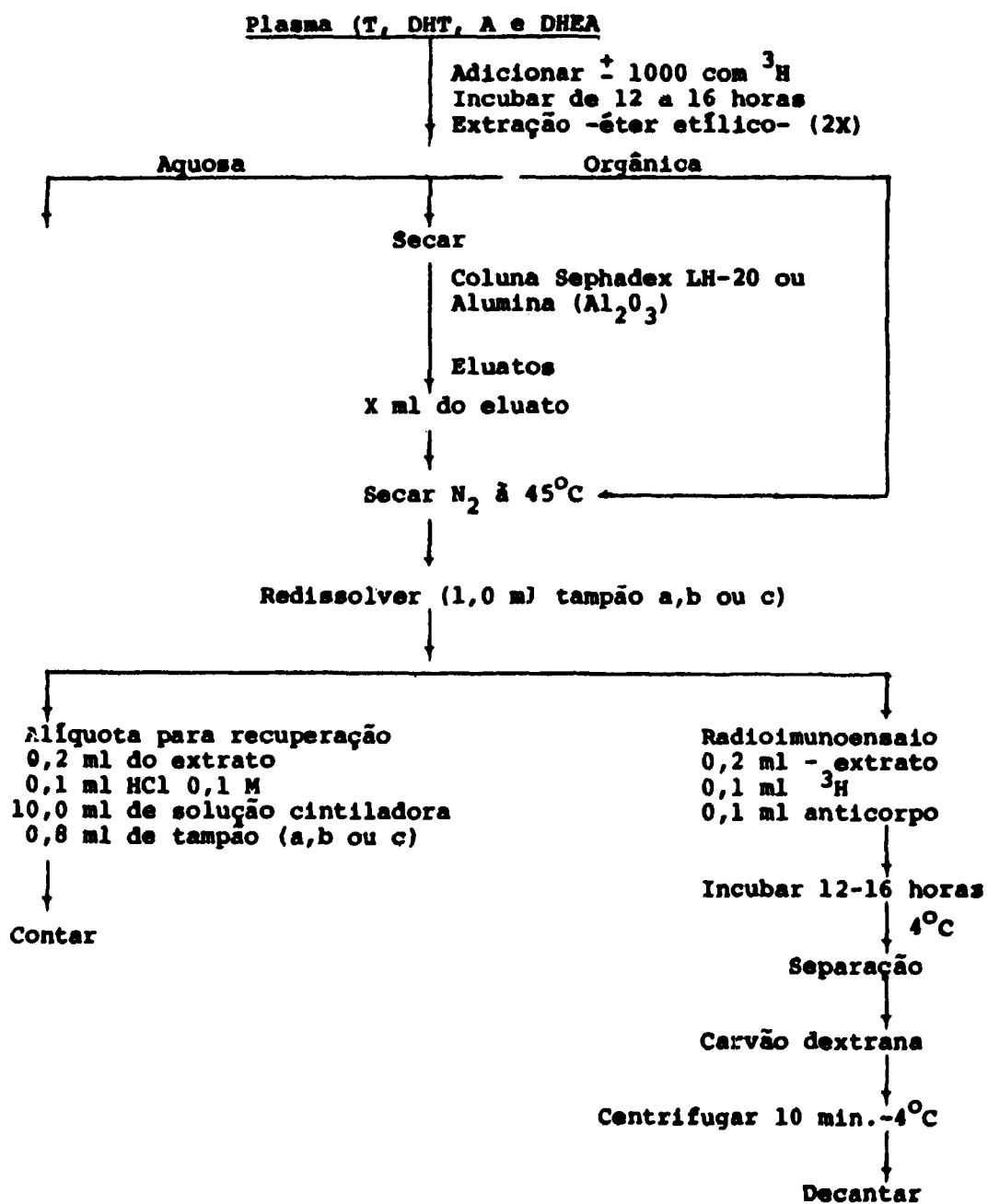


Figura 3 - Representação esquemática da técnica para quantificação dos hormônios andrôgenos (T, DHT, A e DHEA).

centrifugação por 10 minutos, à velocidade de 1500 rpm. À fase aquosa acrescentam-se novamente, 4 ml de éter etílico e repete-se a operação acima. Despreza-se por fim a fase aquosa final e conserva-se a orgânica, adicionada à obtida inicialmente. Esta é evaporada sob corrente de nitrogênio, em banho-maria, à temperatura de aproximadamente 45°C, sendo o resíduo seco dissolvido em tampão fosfato (a, b ou c) 1,0 ml. No caso de necessitar-se de purificação cromatográfica, 0,5 ml devem ser dissolvidos em eluente específico, a ser descrito adiante.

3.3 – Purificação da Testosterona e Dihidrotestosterona

3.3.1 – Preparo da Coluna de Sephadex LH-20

2,5 g de Sephadex LH-20⁽³³⁾ são previamente entumescidos com 10 ml do solvente I (Benzeno:metanol 85:15 V:V) durante 12-18 horas. A seguir este material é colocado em uma coluna de vidro de 15 x 1 cm. A coluna assim preparada é lavada com o solvente I até completar um volume final de eluição de 100 ml. Em seguida, percolam-se cerca de 50 ml do solvente II (isooctano:benzeno:metanol 90:5:5 V:V:V) para saturar o Sephadex.

3.3.2 – Calibração da Coluna

Adicionamos 100µl de DHT radioativo, de atividade específica conhecida, ao topo do Sephadex. Em seguida fizemos eluição da DHT com solvente II, coletando-se frações de 1,5 ml em frasco de cintilação líquida, que eram evaporadas em placa aquecedora, acrescentando-se, a seguir, 5 ml de solução cintiladora e levadas ao cintilador líquido para a identificação do pico de radioatividade. Posteriormente, lavamos a coluna com 100 ml de solvente II e a seguir adicionamos 100µl de T radioativa de atividade específica conhecida e procedemos da maneira idêntica à DHT (Figura 4).

3.4 – Purificação de Dehidroepiandrosterona

3.4.1 – Preparo da Coluna de Alumina

Pesamos 2,0 g de alumina e colocamos em coluna de vidro de 15 X 1 cm, procedendo da seguinte maneira:

Lavagem com os solventes orgânicos na ordem seguinte:

- a) 2 vezes com 25 ml de metanol a 95%
- b) 2 vezes com 25 ml de metanol a 100%
- c) 2 vezes com 25 ml de metanol:diclorometano (1:1)
- d) 5 vezes com 25 ml de diclorometano
- e) 2 ou mais vezes com 25 ml 10% de acetato de etila em hexano
- f) Finalmente, lavamos com 50 ml do solvente do uso 0,75% de etanol absoluto em hexano.

3.4.2 – Calibração da Coluna

A calibração é feita de maneira idêntica para T e DHT em Sephadex LH-20 (Figura 5).

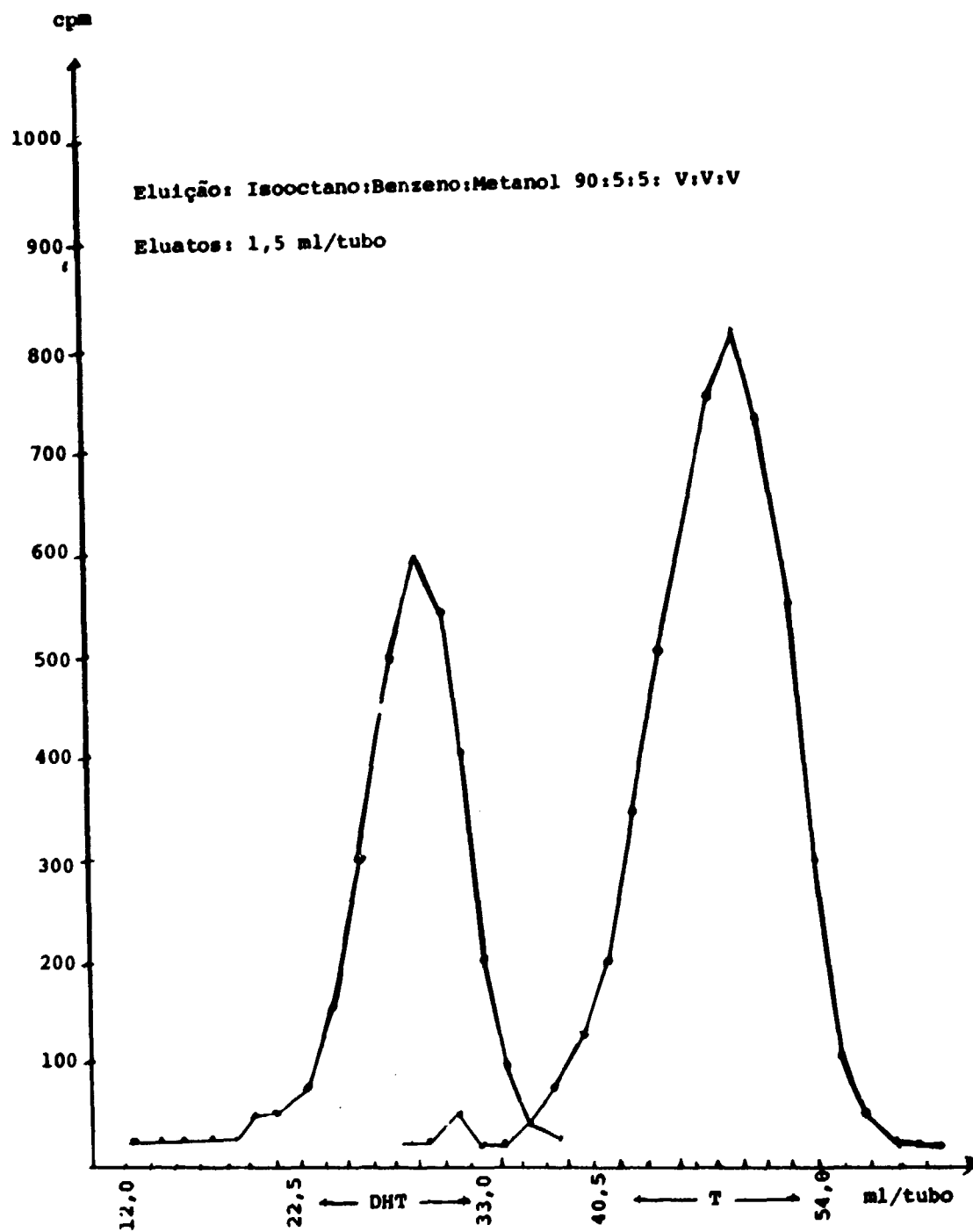


Figura 4 - Separação da Testosterona-³H e Dihidrotestosterona-³H em coluna de Sephadex LH-20 (2,5 g).

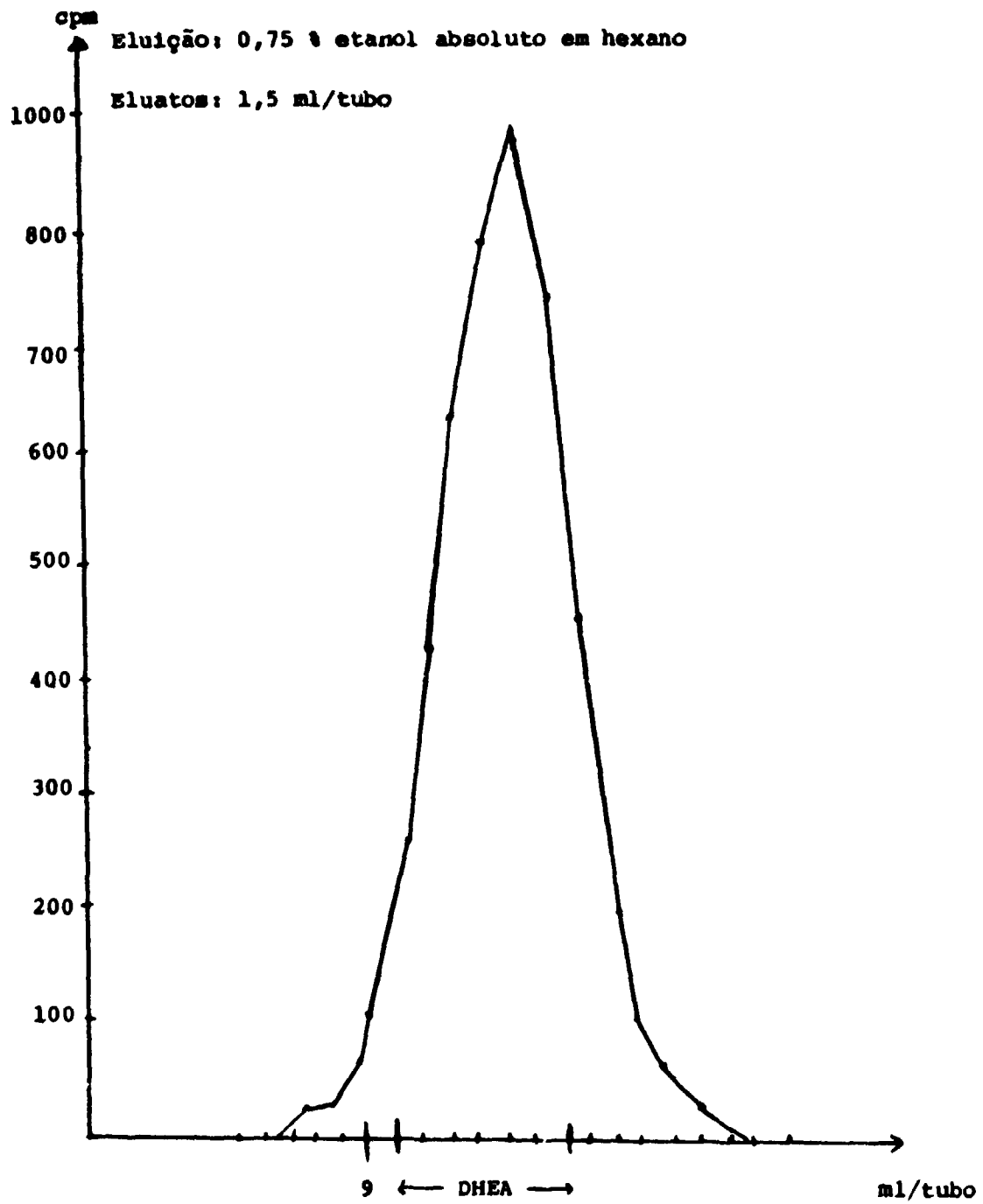


Figure 5 - Identificação da DHEA-³H após cromatografia em coluna de alumina (2,0g)

3.5 – Separação Cromatográfica

Os extratos secos do plasma T e DHT foram dissolvidos no solvente II (0,5 ml) e pipetados no topo da coluna de Sephadex, os eluatos coletados em tubos de ensaio e evaporados em correntes de nitrogênio, em banho-maria, à temperatura de 45°C.

O perfil de eluição da T e DHT está indicado no Quadro 1 e Figura 4.

Quadro 1

Solvente II adicionado (ml)	Total solvente adicionado (ml)	Fração
22,5	22,5	desprezar
10,5	33,0	DHT
40,5	40,5	desprezar
13,5	54,0	T

3.6 – Eluição da Dehidroepiandrosterona

Aos extratos secos do plasma adicionamos 0,5 ml do solvente de eluição apropriada e colocamos no topo da coluna de alumina. Os eluatos foram coletados em tubo de ensaio e evaporados em corrente de nitrogênio, à temperatura de 45°C, segundo o Quadro 2 e Figura 5.

Quadro 2

Solvente adicionado (ml)	Total solvente adicionado (ml)	Fração
9,0	9,0	desprezar
10,5	19,5	DHEA

Com efeito, os 9 ml iniciais da eluição da coluna são desprezados, recolhendo-se os 10,5 ml seguintes onde se coloca o pico da DHEA, conforme se observa na Figura 5.

3.7 – Diluição do Anti-Soro e Cálculo da Porcentagem de Ligação do Hormônio Radioativo na Ausência da Massa Fria

Reconstituímos os anti-soros liofilizados, para T e A, com 5 ml de tampão (a e b) e 1,0 ml do tampão (c) para anti-soro de DHEA, constituindo-se assim as soluções concentradas.

Destas soluções concentradas fizemos as várias diluições, com a finalidade de chegar a uma porcentagem de ligação em torno de 50%, com uma massa fixa do "hormônio marcado".

O protocolo para a determinação da diluição do anti-soros utilizados para a obtenção da porcentagem de ligação apropriada com o hormônio marcado, está no Quadro 3.

onde:

RT = radioatividade total

C* = anticorpo concentrado

a*, b* e c* = diluições utilizadas

Usamos as seguintes diluições:

T – 1:1, 1:2, 1:3

A – 1:10, 1:12, 1:14

DHEA – 1:10.000, 1:12.000, 1:15.000

A todos os tubos adicionamos 100µl do hormônio marcado, com 4000 cpm e seguimos como indicado no parágrafo 3.11.

O cálculo da porcentagem de ligação do anti-soro está indicado a seguir

$$\frac{C^*}{RT} = \frac{\text{cpm na presença do anticorpo concentrado ligado ao hormônio marcado}}{\text{Radioatividade total}}$$

$$\frac{a^*, b^* e c^*}{RT} = \frac{\text{cpm na presença do anticorpo diluído}}{\text{Radioatividade total}}$$

Escolhemos a diluição do anticorpo em que a relação com Radioatividade total fosse em torno de 50%.

3.8 – Protocolo da Curva-Padrão de Testosterona (T) (Tabela I) (Figura 6)

3.9 – Protocolo da Curva Padrão de Androstenediona (A) (Tabela II) (Figura 7)

3.10 – Protocolo da Curva Padrão de Dehidroepiandrosterona (DHEA) (Tabela III) (Figura 8)

3.11 – Preparação do Hormônio Marcado Livre do Hormônio Ligado ao Anti-Soro

Faz-se a separação após repouso do tubo de reação por uma noite a 4°C, com a adição de 1,0 ml (T, DHT) ou 0,2 ml (A e DHEA) da suspensão de carvão dextrana em todos os tubos, com exceção dos de nºs 1 e 2. Agita-se cada tubo por 15 segundos e deixa-se em repouso por 15 minutos. Centrifuga-se a 2500 rpm, por 10 minutos a 4°C, e separa-se o sobrenadante, por decantação, em frasco de cintilação líquida. Adicionam-se 100µl de HCl 0,1 M e 10 ml de solução cintiladora, contendo

Quadro 3

Tubo nº	Código	(T)		(A)		(DHEA)	
		Tampão µl	Anti-soro µl	Tampão µl	Anti-soro µl	Tampão µl	Anti-soro µl
1 2	RT	1000	---	1000	---	1000	---
3	c*	200	100	200	500	200	200
4 5	a*	200	100	200	500	200	200
6 7	b*	200	100	200	500	200	200
8 9	c*	200	100	200	500	200	200

Tabela 1

Tubo nº	Código	Padrão esteroide (0,1ng/20µl)		Tempo (s) µl	Anticorpo µl	Hormônio 3H µl
		µl	pg			
1 2	RT	—	—	1000	—	100
3 4	N	—	—	300	—	100
5 6	Bo	—	—	200	100	100
7 8	Ponto 1	1	5	199	100	100
9 10	Ponto 2	2	10	198	100	100
11 12	Ponto 3	5	25	195	100	100
13 14	Ponto 4	10	50	190	100	100
15 16	Ponto 5	20	100	180	100	100
17 18	Ponto 6	30	150	170	100	100
19 20	Ponto 7	50	250	150	100	100
21 22	Ponto 8	100	500	100	100	100

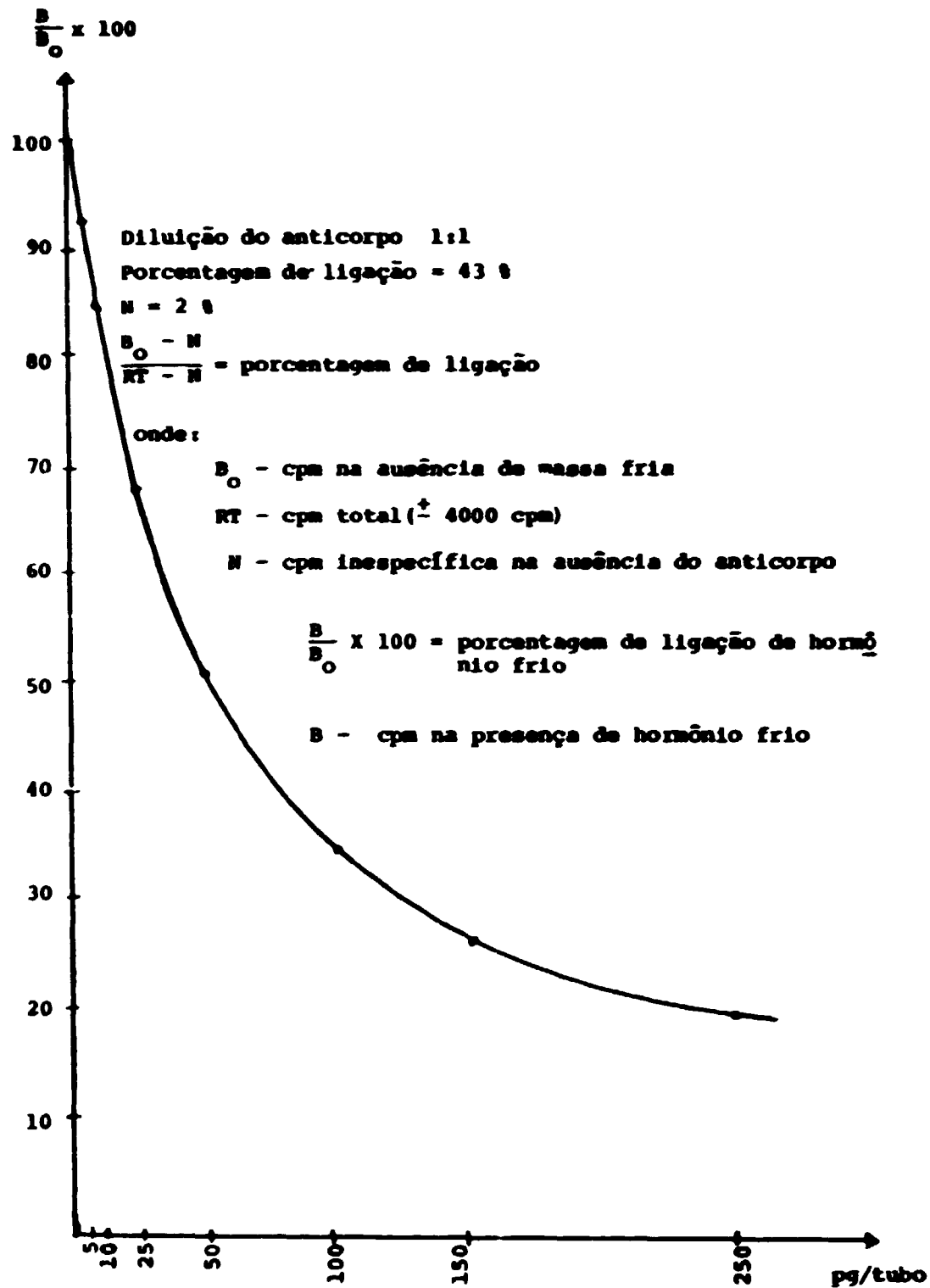


Figura 6 - Curva padrão para o ensaio de Testosterona (T), e Dihidrotestosterona (DHT)

Tabela II

Tubo nº	Código	Padrão esteroide (5ng/ml)		Tampão (a) μ l	Anticorpo μ l	Hormônio 3H μ l
		μ l	pg			
$\frac{1}{2}$	RT	—	—	1000	—	100
$\frac{3}{4}$	N	—	—	700	—	100
$\frac{5}{6}$	Bo	—	—	200	500	100
$\frac{7}{8}$	Ponto 1	1	5	199	500	100
$\frac{9}{10}$	Ponto 2	2	10	198	500	100
$\frac{11}{12}$	Ponto 3	5	25	195	500	100
$\frac{13}{14}$	Ponto 4	10	50	190	500	100
$\frac{15}{16}$	Ponto 5	20	100	180	500	100
$\frac{17}{18}$	Ponto 6	30	150	170	500	100
$\frac{19}{20}$	Ponto 7	50	250	150	500	100
$\frac{21}{22}$	Ponto 8	100	500	100	500	100

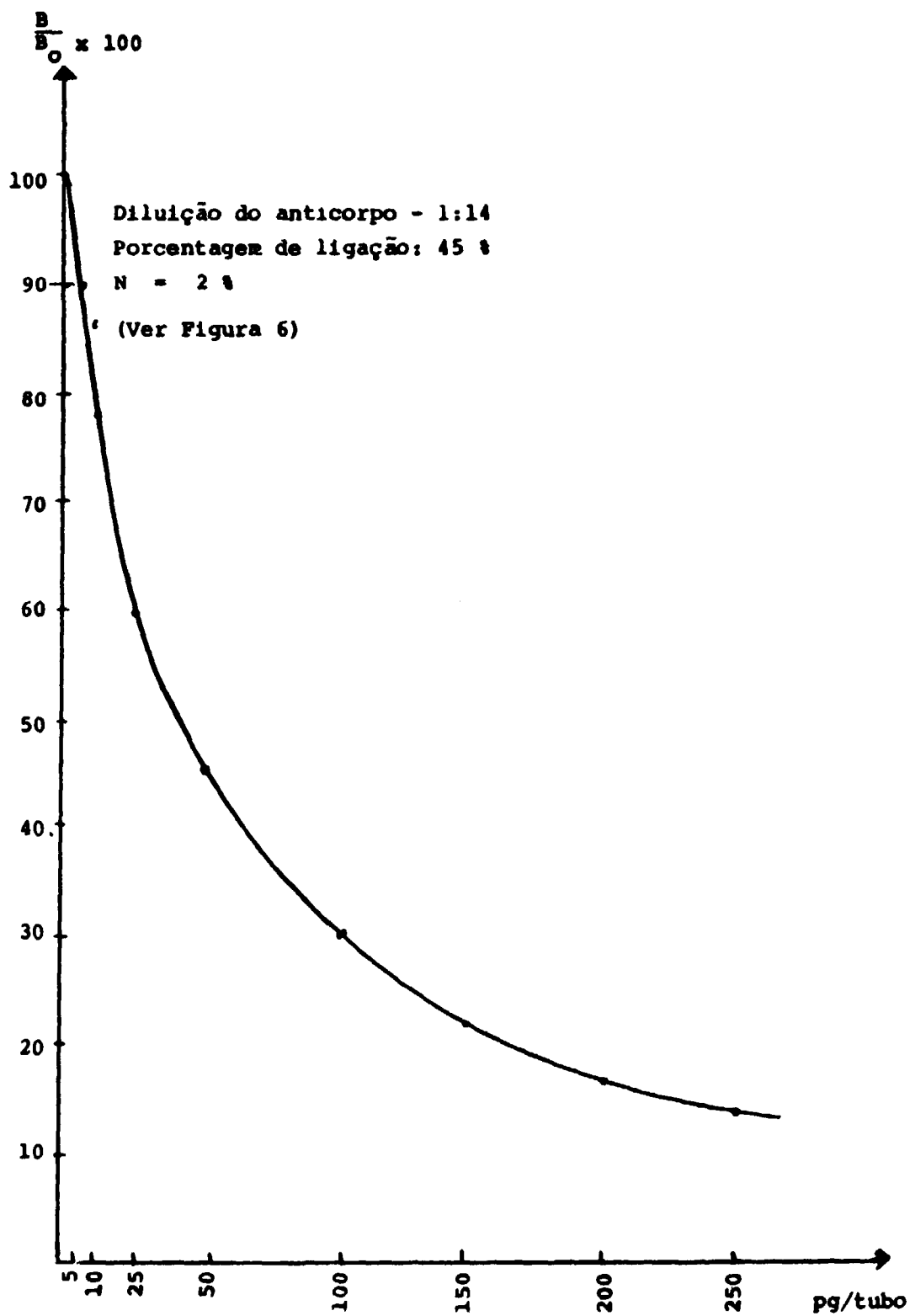


Figura 7 -- Curva padrão para o ensaio de Androstenediona (A)

Tabela III

Tubo nº	Código	Padrão esteróide (0,1ng/20µl)		Tampão µl	Anti-soro µl	Hormônio 3H µl
		µl	pg			
1 2	RT	---	---	1000	---	100
3 4	N	---	---	400	---	100
5 6	Bo	---	---	200	200	100
7 8	Ponto 1	1	5	199	200	100
9 10	Ponto 2	2	10	198	200	100
11 12	Ponto 3	5	25	195	200	100
13 14	Ponto 4	20	100	180	200	100
15 16	Ponto 5	50	250	150	200	100
17 18	Ponto 6	60	300	140	200	100
19 20	Ponto 7	80	400	120	200	100
21 22	Ponto 8	100	500	100	200	100

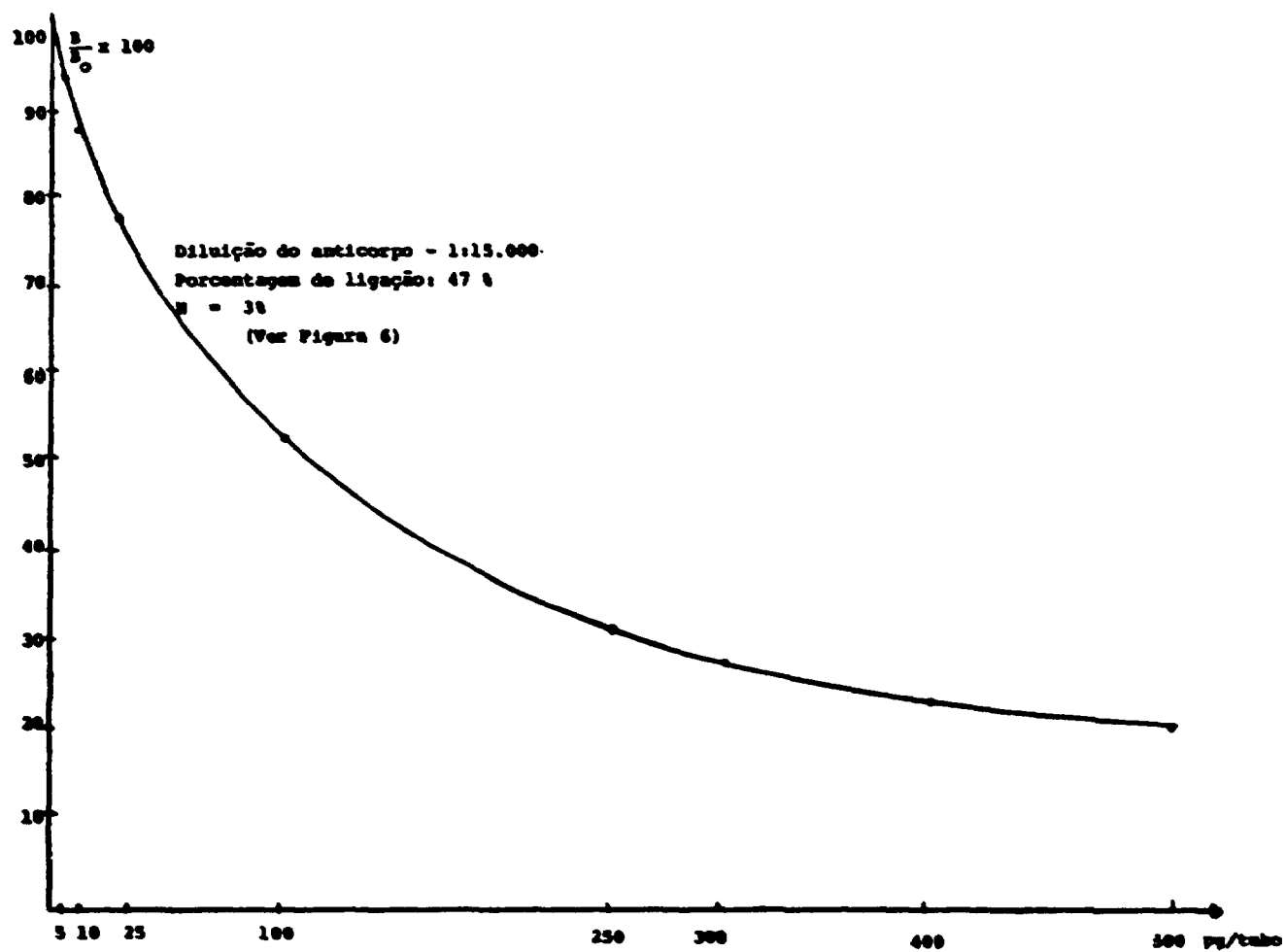


Figura 8 - Curva padrão para o ensaio de Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Triton X-100. As contagens foram realizadas após a homogeneização do conteúdo dos frascos, as atividades sendo determinadas com detector de cintilação líquida, com trocas automáticas de amostras, com eficiência de 55% para trítio, durante 10 minutos, com erro teórico de 1,5%.

3.12 – Protocolo do Radioimunoensaio das Amostras Plasmáticas

O extrato seco com ou sem purificação, dependendo do esteroide a ser medido, foi dissolvido em 1,0 ml de tampão (a, b, ou c), agitando-se intensamente por um minuto em "Vortex" e continuando em agitação contínua lentamente a 37°C, por 4 horas, para a completa dissolução do extrato preparado, como indicado na Figura 3.

3.13 – O Protocolo Geral do Radioimunoensaio de X Amostras de Plasmas e um Controle(B1) "Branco", está indicado no Quadro 4

Quadro 4

Amostra	Extrato	Tampão	Anti-soro	Hormônio 3H
	dissolvido	μ l	μ l	μ l
a	100	100	100(200)	100
	200	---	" "	"
b	100	100	100(200)	100
	200	---	" "	"
c	100	100	100(200)	100
	200	---	" "	"

Como se poderá observar no Quadro 4, nos tubos de ensaio colocamos 100 μ l e 200 μ l do extrato dissolvido. Apenas ao tubo contendo 100 μ l do tampão, para um volume final de reação igual para todos os tubos; 100 μ l do anticorpo (T) e 200 μ l para (DHEA) e 100 μ l de hormônio tritado (\pm 4000 cpm). Agitamos em "Vortex" durante 15 segundos e incubamos por 12 a 16 horas, à temperatura de 4°C. A seguir adicionamos o carvão-dextrana, nas proporções de acordo com o hormônio a ser medido. Centrifugamos e decantamos para um frasco de cintilação, conforme está indicado em 3.11.

Para androstenediona procedemos da maneira seguinte:

- 1 – Apesar de utilizarmos anti-soros específicos fizemos sua purificação prévia em coluna de Alumina, procedendo de maneira idêntica à da DHEA.
- 2 – O extrato, após dissolução em tampão (b), foi distribuído nas quantidades de 100 e 200 μ l para tubos de ensaio. Em seguida adicionamos 0,5 ml de anti-soro, exceto para os tubos 1, 2, 3 e 4, aos quais acrescentamos o tampão. Incubamos por 30 minutos, à temperatura ambiente e adicionamos 0,1 ml de hormônio marcado aproximadamente (4000 cpm) para todos os tubos. Incubamos por 90 minutos, à temperatura de 37°C, seguidos de 15 minutos a 4°C. Adicionamos 0,2 ml de carvão-dextrana, com exceção dos tubos 1 e 2. Agitamos os tubos por 15 segundos em Vortex e incubamos a 4°C por

10 minutos, e seguido de centrifugação a 2500 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante é separado por decantação, em frasco de cintilação, e em seguida procede-se à leitura.

3.14 – Avaliação das Perdas de Esteróides no Processamento do Plasma (Recuperação)

Mediu-se a recuperação colocando-se 200µl do “extrato dissolvido” em frasco de cintilação e adicionando-se 100µl de HCl 0,1 M, 800µl do tampão (a, b ou c) e 10,0 ml de solução cintiladora para a estimativa das contagens por meio das quais se fará a correção para o número de contagens adicionadas inicialmente ao plasma.

A Tabela IV mostra a recuperação no processamento do plasma em porcentagens, sendo menor quando a extração é seguida da purificação cromatográfica.

3.15 – Cálculo do Radioimunoensaio

Para o cálculo das porcentagens de ligação do hormônio marcado, em cada tubo, as atividades dos sobrenadantes obtidos dos tubos 3 e 4 (Tabelas I, II e III) representando as contagens não específicas*⁽³²⁾, foram subtraídas das contagens em cada tubo (curva e amostra) como segue:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{B - N}{B_0 - N} \times 100$$

onde,

B – contagens por minuto do sobrenadante de cada tubo (curva-padrão e amostra)

B₀ – contagens por minuto do hormônio marcado ligado ao anticorpo

N – contagens não específicas.

* “ausência do anticorpo correspondentes a um branco da radioatividade no tampão de ensaio”.

Para a construção da curva padrão projetamos as concentrações do padrão em abscissas e em ordenadas as relações $\frac{B}{B_0} \times 100$.

As concentrações hormonais do tubo de reação massa/tubo são determinadas pela comparação direta das leituras (cpm) observadas nos frascos de cintilação em comparação àquela obtida a partir das soluções-padrão. Da leitura direta da curva obtemos a massa da amostra plasmática segundo a fórmula seguinte:

$$\text{pg}^{\circ} \times \frac{\text{cpm}}{\text{cpm}_r} \times \text{Fator de diluição} = \text{pg/ml de plasma}$$

onde

pg^o – massa da amostra lida diretamente na curva

cpm – contagens por minuto do hormônio tritiado adicionado ao plasma (± 1000 cpm)

cpm_r – contagens por minuto obtidas da recuperação de 0,2 ml do extrato dissolvido em tampão (a, b ou c).

Tabela IV
Recuperação Porcentual do Esteróide Radioativo

Esteróide radioativo	Recuperação após extração do plasma		Recuperação após extração e purificação cromatográfica	
	\bar{X} (%)	Intervalo	\bar{X} (%)	Intervalo
T + DHT	92	87 – 97	-----	-----
T	-----	-----	70	60 – 87
DHT	-----	-----	55	50 – 70
A	94	84 – 98	61	58 – 70
DHEA	91	83 – 97	61	52 – 80

3.16 – Avaliação da Sequência Operacional para o Ensaio de “Andrógenos” em Plasma

A – Especificidade

Avaliou-se a especificidade do radioimunoensaio de duas maneiras:

1) **Reatividade Cruzada com outros Esteróides:**

Admitindo que o anticorpo submetido a exame é produzido contra o esteróide X e se deseja avaliar as porcentagens de reação cruzadas do esteróide Y, a porcentagem de reação cruzada do esteróide⁽³⁰⁾ é definida pela relação:

$$\frac{\text{dose de X necessário para deslocar 50\% de X-}^3\text{H}}{\text{dose de Y necessário para deslocar 50\% de Y-}^3\text{H}} \times 100$$

- a) As reações da antitestosterona com outros esteróides foram determinadas pela incubação direta de diversas quantidades dos diferentes esteróides a estudar com o anticorpo e o hormônio tritiado em proporções fixas (Tabela V). Dos compostos ensaiados, a DHT apresentou reação análoga ao anticorpo, sendo para os demais esteróides pouco significativos.
- b) Reações da antiandrostenediona com outros esteróides seguindo o esquema geral acima (Tabela VI) observando que o anti-soro empregado foi de especificidade alta.
- c) Reações do anti-soro contra DHEA com os outros esteróides (Tabela VII), verificando-se apenas grau discreto de reatividade cruzada com pregninolona.

2) **Reatividade Comparada do Esteróide Plasmático e do Padrão (ensaio da diluição).**

Para provar que a reatividade do hormônio plasmático e a do padrão são análogas, fizemos uma mistura plasmática com elevado teor de T, DHT, A e DHEA, conforme Quadro 5.

Quadro 5

Tubo nº	Plasma μl	Padrão μl	Diluição Final
1 e 2	10	990	1:100
3 e 4	20	980	1: 50
5 e 6	25	975	1: 40
7 e 8	33	967	1: 30
9 e 10	50	950	1: 20

B – Sensibilidade

Definimos a sensibilidade com a menor quantidade de hormônio não marcado que pode ser distinguida do traçador e que foi avaliada pela inclinação da curva padrão. Avaliou-se esta propriedade

pela análise de variância de cinco determinações do ponto zero sem massa fria, e do primeiro e segundo pontos da curva padrão, correspondentes às menores massas de T, DHT, A e DHEA diferentes de zero.

C – Precisão

Avaliou-se a precisão do método por meio da reprodutibilidade da medida de uma mistura de plasmas, com quantidades variáveis de esteróides ("pool"), quantificando os hormônios T, DHT, A e DHEA, no mesmo ensaio-reprodutibilidade intra-ensaio, e em ensaios diferentes – reprodutibilidade interensaio.

D – Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas dos hormônios T, DHT, A e DHEA (250, 500 e 1000 pg) adicionadas a uma mistura de plasma (0,2 ml) com teor conhecido, com valores baixos de T, DHT, A e DHEA, respectivamente.

4 – RESULTADOS DO ESTUDO ESTATÍSTICO DA METODOLOGIA

A – Especificidade

- a) As Tabelas V, VI e VII mostram as reações cruzadas de vários esteróides com os anti-soros utilizados para T, A e DHEA, indicando os resultados em porcentagens de reação cruzada ao nível de 50% de ligação.
- b) As Tabelas VIII e IX reúnem as médias das concentrações obtidas em cinco diluições diferentes, de uma mesma amostra^o, expressas em ng/ml. Verificamos que a concentração média do hormônio, multiplicada pelo fator de diluição, permaneceu relativamente constante⁽²⁵⁾, com um coeficiente de correlação r (entre a diluição e concentração final) bem significativo.

B – Sensibilidade

Na Tabela X estão indicadas cinco determinações do ponto zero (ausência de massa fria), do ponto 1 (5 pg)P₁, do ponto 2 (10 pg)P₂ das curvas padrão de T, A e DHEA. Por utilizar o mesmo anti-soro e traçador da T para o radioimunoensaio de DHT, a sensibilidade da curva de T é aplicável para a de DHT.

C – Precisão

Na Tabela XI estão reunidos os dados de reprodutibilidade intra e interensaios de uma mesma amostra, de plasma com as médias, coeficiente de variação e desvios-padrão, respectivos.

Estimou-se a precisão intra-ensaio no mesmo ensaio em 10 alíquotas para T, DHT, DHEA e seis alíquotas para A. A precisão interensaio foi avaliada pelas dosagens da mesma mistura de plasma realizadas em diferentes ensaios, no período de doze meses.

^o Exceção de Tabela IX (DHT) que foram feitas apenas em três diluições.

Os coeficientes de variação foram, como era de esperar, menores na reprodutibilidade intra-ensaio do que interensaio, observando-se que para a DHT os coeficientes de variação foram os maiores.

D – Exatidão

A Tabela XII mostra os valores percentuais obtidos para recuperação de cada hormônio (padrão adicionado a uma mistura de plasma), o desvio padrão, a média e o intervalo de valores extremos.

Na Tabela XIII encontram-se as médias, variações e intervalos de valores extremos de concentrações hormonais obtidos do plasma normal do sexo masculino e feminino.

Tabela V

Reações Cruzadas de Vários Esteróides com Q Anti-Soro para Testosterona

Composto	Reação Cruzada (%)
Testosterona	100
Dihidrotestosterona	100
5- β -Androstan-3 β -17-diol	3,1
5- α -Androstan-3 β -17 β -diol	2,9
5- α -Androstan-3 α -17 α -diol	1,3
Androstenediona	1,1
Androstanediona	0,6
Progesterona	0,4
Epitestosterona	0,12
DOC, DHEA	0,07
Adrenosterona	0,05

Tabela VI
Reações Cruzadas de Vários Esteróides com o
Anti-Soro para Androstenediona

Composto	Reação Cruzada (%)
Androstenediona	100
Testosterona	1
DHEA	< 0,01
11-Deoxicorticosterona	< 0,01
Progesterona	< 0,01
Estrona	< 0,01
Estradiol	< 0,01

Tabela VII

Reatividade Cruzada dos Esteróides com o Anti-Soro Nº D17-113
para Dehidroepiandrosterona

Composto	Reação cruzada (%)
Pregnilona	17
Epiandrosterona	3,8
5- α -Androstan-3 β -17 β -diol	1,7
Testosterona	0,8
Dihidrotestosterona	0,2
Androstenediona	0,2
Androsterona	0,2
Etiocolanona	0,1
11-OH-Androsterona	< 0,1
17-OH-Progesterona	< 0,1
Adrenosterona	< 0,1
Cortisol	< 0,1
Corticosterona	< 0,1
Progesterona	< 0,1

Tabela VIII

Especificidade do Radioimunoensaio de A, T, T + DHT e DHEA. Avaliada pela Prova de Diluição

Androsterona		Testosterona		Testosterona + Dihidrotestosterona		Deidroepiandrosterona	
Concentração de A diluída	Concentração de A fator X a diluição	Concentração de T diluída	Concentração de T fator X a diluição	Concentração de T + DHT diluída	Concentração de T + DHT fator X a diluição	Concentração de DHEA diluída	Concentração de DHEA fator X a diluição
ng/ml		ng/ml		ng/ml		ng/ml	
0,32	32,00	0,063	6,30	0,070	7,00	0,36	36,00
0,31	31,00	0,069	6,90	0,065	6,50	0,36	36,00
0,67	33,50	0,114	5,70	0,118	5,90	0,84	32,00
0,66	33,50	0,110	5,50	0,114	5,70	0,80	30,00
0,85	34,00	0,150	6,00	0,117	7,08	0,78	31,20
0,83	33,20	0,147	5,88	0,162	6,48	0,78	30,40
1,03	31,50	0,196	5,88	0,200	6,00	1,10	33,00
1,02	30,60	0,206	6,18	0,252	7,56	1,15	34,00
1,74	34,80	0,292	5,84	0,282	5,72	1,55	31,00
1,71	34,20	0,282	5,72	0,297	5,94	1,80	32,00

$\bar{x} = 32,83$
 $r = 0,996$

$\bar{x} = 5,89$
 $r = 0,997$

$\bar{x} = 6,39$
 $r = 0,971$

$\bar{x} = 32,36$
 $r = 0,995$

Tabela IX

Especificidade do Radiotmunoensaio de DHT Avaliada pela Prova de Diluição

Nº	Plasma μ l	Diluyente μ l	Diluição final	Concentração de DHT diluída	Concentração de DHT fator x a diluição
1	1000	---	1:1	0,280	0,280
2	1000	---	---	0,283	0,283
3	1000	---	---	0,278	0,278
4	500	500	1:2	0,145	0,290
5	500	500	---	0,135	0,270
6	500	500	---	0,147	0,294
7	400	600	1:2,5	0,115	0,312
8	400	600	---	0,120	0,288
9	400	600	---	0,125	0,300

 $\bar{X} = 0,288$ $r = 1,0$

Tabela X

Sensibilidade da Curva Padrão dos Esteróides Andrógenos

nº	Androstenediona			Dehidroepiandrosterona			Testosterona		
	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg) cpm	P ₂ (10 pg)	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg) cpm	P ₂ (10 pg)	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg) cpm	P ₂ (10 pg)
1	2037	1860	1745	1889	1879	1729	1980	1727	1497
2	2060	1820	1772	1933	1735	1750	1853	1929	1488
3	2032	1890	1692	1982	1898	1760	1958	1728	1450
4	1975	1870	1688	1936	1975	1730	1831	1890	1551
5	1919	1810	1701	1956	1901	1630	1630	1823	1582
	$\bar{X} = 2005$	$\bar{X} = 1850$	$\bar{X} = 1719$	$\bar{X} = 1939$	$\bar{X} = 1878$	$\bar{X} = 1720$	$\bar{X} = 1913$	$\bar{X} = 1819$	$\bar{X} = 1514$
	DP = 57,17	DP = 33,91	DP = 37,07	DP = 34,22	DP = 87,73	DP = 51,92	DP = 66,37	DP = 92,06	DP = 52,57
	CV = 2,85%	CV = 1,83%	CV = 2,16%	CV = 1,76%	CV = 4,67%	CV = 3,02%	CV = 3,47%	CV = 5,06%	CV = 3,47%

$F_{\text{observado}} = 83,02$ significativo
para $\alpha = 0,05$

$F_{\text{observado}} = 25,26$ significativo
para $\alpha = 0,05$

$F_{\text{observado}} = 41,77$ significativo
para $\alpha = 0,05$

$F_{\text{crítico}}(2,12) = 3,89$

Tabela XI

Precisão – Avaliação da Reprodutibilidade do Radioimunoensaio

Hormônio	Intra-ensaio			Interensaio		
	$\bar{X} \pm DP$ ng/ml	CV(%)	η	$\bar{X} \pm DP$ ng/ml	CV(%)	η
T + DHT	4,21 ± 0,23	5,4	10	4,72 ± 0,56	11,9	10
T	4,51 ± 0,27	5,9	10	4,21 ± 0,42	10,0	10
DHT	0,20 ± 0,02	10,6	6	0,22 ± 0,04	16,0	6
A	6,26 ± 0,40	6,4	10	5,32 ± 0,60	11,3	10
DHEA	5,65 ± 0,47	8,4	10	7,48 ± 1,06	14,2	10

Tabela XII
Exatidão - Recuperação

Hormônio	Média ± DP (%)	Intervalo (%)	n	r
T + DHT	98,52 ± 7,95	88 - 115	23	1,0
T	96,34 ± 10,05	72 - 109	13	1,0
DHT	98,04 ± 8,74	86 - 117	10	0,967
A	104,82 ± 9,41	77,7 - 119,3	15	0,997
DHEA	103,66 ± 5,71	92,2 - 113	10	0,995

Tabela XIII

Valores Normais de Andr6genos, Varia76es Et6rias e Intervalos dos Valores Extremos Obtidos
em Plasma de Homens e Mulheres

HOMENS					
Ester6ides	Idade (anos)	N6mero de amostras	Intervalos dos valores extremos ng/ml	M6dia \pm DP ng/ml	
T + DHT	20 - 70	26	3,09 — 9,77	5,9 \pm 2,0	
T	26 - 70	13	3,24 — 7,36	5,2 \pm 1,3	
DHT	26 - 70	15	0,12 — 0,72	0,26 \pm 0,15	
A	24 - 58	13	0,4 — 1,9	0,9 \pm 0,4	
DHEA	24 - 60	10	2,8 — 7,5	4,6 \pm 1,7	
MULHERES					
T + DHT	25 - 71	24	0,21 — 0,93	0,5 \pm 0,2	
T	20 - 60	14	0,20 — 0,88	0,4 \pm 0,2	
DHT	20 - 60	22	0,07 — 0,53	0,2 \pm 0,13	
A	23 - 70	12	0,2 — 2,1	0,8 \pm 0,5	
DHEA	21 - 60	10	2,6 — 7,2	4,8 \pm 1,7	

5 - APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AO ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA FIOIOLOGIA ADRENAL

Foram submetidos a estudo cinco indivíduos com deficiência parcial da 21-hidroxiase (hiperplasia congênita virilizante das supras renais) sendo um do sexo masculino e quatro do feminino, com idades cronológicas entre 4^{1/2} e 28 anos (Tabela XIV).

Os pacientes ou seus familiares, quando os indivíduos eram menores, após explicação minuciosa da prova a ser realizada (cateterismo nas veias adrenais), forneceram a autorização devida para sua feitura que por sua vez era aprovada pela Chefia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas, seguindo os princípios de experimentação humana estabelecidos em Helsinki.

Todos os indivíduos, em dieta geral (2000 calorias), permaneceram em jejum por 12 horas, antes da realização do cateterismo.

O estudo da dinâmica dos esteróides foi efetuado mediante cateterização percutânea das veias adrenais, colhendo-se amostras simultâneas das duas veias de uma periférica, após fixação dos cateteres, sob controle radiológico. Eram colhidas duas amostras basais, 30 minutos após a injeção endovenosa em veia periférica, de 4 mg de dexametasona. Em seqüência, injetou-se B¹⁻²⁴ ACTH (250µg) através de veia periférica, colhendo-se novas amostras de sangue, 5 minutos após.

Os resultados das concentrações plasmáticas dos diversos esteróides nas veias periféricas e adrenais, em condições basais, durante a prova de supressão e estímulo, são apresentados na Tabela XV. Nesta tabela também, estão indicados os resultados das dosagens de cortisol, nas amostras de plasma, servindo de referência para a localização dos cateteres, por se tratar de esteróide exclusivamente produzido no córtex adrenal.

Os valores plasmáticos do cortisol nas veias periféricas não sofrem variação significativa, quer em resposta às provas de supressão, quer após estímulo. Contudo, as concentrações nas veias adrenais, muito mais elevadas do que na periferia, caíram significativamente com a supressão, voltando aos valores basais após o estímulo.

Os níveis plasmáticos periféricos dos andrógenos (T, DHT, A e DHEA) não se alteraram significativamente durante as provas de supressão e de estímulo. Os valores basais encontrados nas veias adrenais, mais altos do que os do sangue periférico, reduziram-se com a supressão e aumentaram com o estímulo, sendo que A e DHEA chegaram a valores mais elevados do que o basal.

Ao contrário dos andrógenos, os níveis periféricos de Pr e 17OH-Pr diminuíram significativamente, 30 minutos após dexametasona, aumentando após a administração de ACTH a níveis mais elevados do que os valores basais.

6 - DISCUSSÃO

Antes de avallarmos a aplicação da tecnologia a um defeito de síntese adrenocortical, discutiremos o radioimunoensaio e suas características operacionais.

A determinação dos hormônios androgênicos: T, DHT, A e DHEA, após sua extração com o éter etílico, com o método proposto, oferece sensibilidade, precisão e exatidão (Tabelas X e XII).

O principal fator que isoladamente condiciona as qualidades de especificidade, sensibilidade e simplicidade de um radioimunoensaio é representado pelas características do anti-soro.

Tabela XIV

Dados Clínicos dos Cinco Indivíduos com a Deficiência Parcial de 21-Hidroxilase

Indivíduos	Sexo	Idade cronológica (anos)	Altura (cm)	Peso (kg)	Idade óssea (anos)
MLF*	F	4½	106	13,9	10 – 11
PR*	F	9	131,6	36,2	15 – 16
CNA*	F	14	148	56,4	18
MJPS*	F	28	151	51,6	adulto
ACA*	M	12	143	47,5	adulto

* Cateterismo veias adrenais.

Tabela XV

Cortisol e Andr6genos Plasmáticos dos Cinco Indivídúos com Deficiência Parcial de 21-Hidroxilase Adrenal, Colhidas Simultaneamente das Veias Adrenais Direita (VAD), Esquerda (VAE) e Periférica (P), em Situação Basal (B), Após Supressão (DEXA) e Estímulo (ACTH)

Nome	Amostras	Período	F	T	DHT	A	DHEA
PR	P	B	5,0	1,80	0,62	5,4	8,0
		Dex.	4,4	1,09	0,46	4,9	7,7
		ACTH	5,4	2,28	0,96	5,4	6,7
	VAD	B	15,8	8,33	3,82	168,5	324,9
		Dex.	7,4	4,47	0,60	19,8	14,5
		ACTH	16,5	6,41	1,46	148,9	241,7
	VAE	B	17,5	7,82	2,96	150,9	322,9
		Dex.	9,0	2,96	1,03	32,8	13,2
		ACTH	22,5	7,71	2,52	126,8	256,7
CNA	P	B	3,3	1,87	0,89	5,7	5,2
		Dex.	2,8	0,98	1,30	4,4	6,7
		ACTH	3,2	1,83	1,06	5,8	7,9
	VAD	B	11,9	4,46	2,30	262,1	62,2
		Dex.	4,8	2,08	0,77	11,4	7,3
		ACTH	10,8	7,29	2,38	257,0	160,2
	VAE	B	12,7	2,72	2,40	220,1	60,4
		Dex.	2,3	1,77	0,81	10,2	6,9
		ACTH	11,0	2,99	1,65	120,1	164,8
MJPS	P	B	5,1	0,96	0,55	7,8	5,7
		Dex.	4,9	0,66	0,30	1,8	4,4
		ACTH	5,4	3,58	0,84	4,5	8,9
	AVD	B	26,6	6,56	1,19	167,2	63,9
		Dex.	4,5	2,17	0,85	4,5	5,5
		ACTH	22,0	8,11	2,90	151,2	126,9
	AVE	B	26,7	7,14	1,07	103,7	45,3
		Dex.	9,5	4,03	0,85	12,5	14,4
		ACTH	23,9	12,23	2,21	115,7	248,7

continua...

continuação

Nome	Amostras	Período	F	T	DHT	A	DHEA
ACA	P	B	4,2	7,91	1,16	40,3	22,2
		Dex.	3,8	5,22	1,02	32,1	13,9
		ACTH	5,9	7,00	1,20	44,3	18,5
	VAD	B	7,7	18,61	3,78	478,1	178,5
		Dex.	7,4	9,67	3,58	123,4	25,8
		ACTH	10,2	12,26	7,82	814,9	748,1
	VAE	B	8,0	18,80	2,41	603,6	94,5
		Dex.	6,9	15,08	2,77	238,6	38,2
		ACTH	10,5	20,06	3,26	587,6	408,2
MLE	P	B	3,1	2,0	----	5,9	----
		Dex.	1,0	1,3	----	4,2	----
		ACTH	2,2	1,3	----	6,6	----
	VAD	B	9,5	7,4	----	134,2	----
		Dex.	2,7	2,4	----	24,06	----
		ACTH	10,4	6,2	----	160,6	----
	VAE	B	7,5	7,0	----	94,1	----
		Dex.	2,4	2,5	----	18,2	----
		ACTH	9,8	7,8	----	131,6	----
Média ± DPM	P	B	4,1 ± 0,4	2,9 ± 1	0,80 ± 1	13 ± 7	10 ± 4
		Dex.	3,3 ± 0,7	1,8 ± 0,8	0,77 ± 0,2	9 ± 6	7 ± 2
		ACTH	4,4 ± 0,7	3,2 ± 1	0,96 ± 0	13 ± 8	10 ± 6
	VAD	B	14 ± 5	9,1 ± 2,4	2,7 ± 0,6	241 ± 62	164 ± 63
		Dex.	6 ± 1	4,1 ± 1,4	1,4 ± 0,7	38 ± 21	13 ± 4
		ACTH	13 ± 2	8,1 ± 1,4	3,8 ± 1,4	304 ± 129	318 ± 144
	VAE	B	14 ± 3	8,7 ± 2,7	2,2 ± 0,4	212 ± 76	153 ± 68
		Dex.	6 ± 1	5,2 ± 2,5	1,3 ± 0,5	62 ± 44	19 ± 6
		ACTH	15 ± 3	10,0 ± 2,8	2,4 ± 0,3	216 ± 92	289 ± 80

O uso de anti-soros não totalmente específicos para hormônios esteróides exige a separação e a purificação cromatográfica do esteróide a ser medido; contudo, se o hormônio a ser medido no fluido biológico apresentar níveis muito maiores do que o dos interferentes, é possível mensurá-lo sem cromatografia.

Assim, no caso da T, foi necessário fazer uma purificação inicial do extrato, em coluna cromatográfica, usando Sephadex LH-20, em virtude de anti-soro usado apresentar um cruzamento de 100% com a DHT (Tabela V). Entretanto, em circunstâncias normais de rotina, dosamos a T sem a purificação prévia (T+DHT) pois sua concentração comparada com o da DHT é muito elevada, e havendo, portanto, pouca interferência desta última. Entretanto, como na mulher a proporção da DHT chega a ser de 35% em relação à concentração de testosterona, como descrito por Auletta⁽⁹⁾, torna-se então necessária uma purificação prévia cromatográfica para melhor avaliação dos níveis de T.

A extração com éter etílico oferece uma recuperação considerada ótima, sempre acima de 84% (Tabela IV). A recuperação após a purificação variou em torno de 50 a 80% considerando as perdas durante a extração e purificação.

Tentamos, inicialmente, utilizar outros solventes, como a hexana mas a recuperação foi muito baixa, por ser o coeficiente de partição entre o plasma e o solvente, melhor para o éter do que para os demais solventes relativamente aos andrógenos.

A extração dos esteróides é de importância fundamental porque apesar do anti-soro poder ser específico haverá sempre interferentes naturais, que alteram a medida das concentrações do hormônio a ser dosado⁽¹³⁾.

Assim, no caso de A, tentamos fazer a dosagem direta sem a extração do plasma, por se utilizar um anti-soro específico, à semelhança do que é feito para radioimunoensaio de hormônios protéicos, mas os resultados obtidos foram baixos, quando comparados aos ensaios realizados com extração prévia, o que indica existir fatores interferentes. Além disso, a especificidade não tornou obrigatória a purificação do extrato em coluna, como se verificou com amostras de plasma de valores variáveis dosadas com e sem purificação em coluna. Entretanto, a observação dos dados (Tabela XVI) indica a necessidade de purificação cromatográfica quando os valores de A são muito elevados e não quando os valores são normais ou pouco elevados.

Por outro lado, para a DHFA, embora o anti-soro seja também específico torna-se necessária a purificação cromatográfica pelos interferentes, provavelmente não esteróides (Tabela XVII).

Quanto à avaliação do método em relação à especificidade vemos (Tabelas VIII e IX) que as concentrações dos hormônios T, DHT, A e DHEA, medidas em cinco diluições diferentes, forneceram os mesmos resultados quando utilizamos fator de diluição ou seja caíram ao longo da curva padrão indicando que o padrão utilizado tem a mesma reatividade com o anti-soro e o esteróide que se está medindo no plasma.

Avaliando a reatividade cruzada dos anti-soros utilizados para os ensaios com diferentes esteróides (Tabelas V, VI e VII), concluímos que há necessidade de cromatografia para medida apenas da T, pois o anti-soro empregado apresentou reatividade igual a DHT. Além disso, para DHEA, embora o anti-soro seja específico, foi necessário o emprego de coluna de alumina como já analisado.

Quanto à sensibilidade, esta foi de 5 pg para A e DHEA e 6 pg para T e DHT. Estes resultados são análogos aos descritos por Abraham⁽¹¹⁾.

A análise de reprodutibilidade (Tabela XI) permitiu avaliar a precisão do método empregado que mostrou ser boa (5-10%), com coeficiente de variação de 5,4% para (T+DHT), 5,9% para (T), 10,6% para (DHT), 6,4% para A e 8,4% para DHEA, relativamente à reprodutibilidade intra-ensaio, sendo que para a

reprodutibilidade interensaio o coeficiente de variação foi de 11,9% para (T+DHT), 10% para (T), 16,0% para (DHT), 11,3% para A e 14,2% para DHEA, consideradas adequadas (Coeficiente de variação de 10 a 15%).

Tabela XVI

Comparação do Radioimunoensaio de Androstenediona com e sem Purifica o do Extrato em Coluna Cromatográfica de Alumina

Com coluna	Sem coluna
ng/ml	
1,72	1,79
2,90	2,84
1,96	2,19
1,52	2,39
2,05	1,71
3,36	3,53
9,31	6,74
9,06	7,88
10,70	8,05
11,03	7,90
26,96	33,12
27,17	28,15

$\bar{X} = 8,98$

$\bar{X} = 8,96$

$$T_{\text{cal.}} = 2,058 < t_{\text{crit.}} = 2,201$$

Não houve diferença significativa ao nível de significância

$\alpha = 0,05$ entre a média das dosagens sem e com coluna.

Tabela XVII

Comparação do Radioimunoensaio de Dehidroepiandrosterona com e sem
Purificação do Extrato em Coluna Cromatográfica de Alumina

Com coluna	Sem coluna
ng/ml	
678,00	738,52
17,47	188,94
10,15	72,38
9,54	101,85
2,53	8,86
6,14	9,62
3,60	14,04
3,54	20,44
144,76	372,37
5,54	11,04
5,27	7,68

$$\bar{X} = 80,59$$

$$\bar{X} = 140,52$$

$$T_{\text{calc.}} = 2,599 > t_{\text{crit.}} = 2,228$$

Houve diferença significativa ao nível de significância α 0,05 entre as médias das dosagens feitas sem e com coluna cromatográfica.

Para efeito de comparação, nossos dados e os correspondentes (com extração e coluna cromatográfica) estão indicados na Tabela XVIII.

A exatidão do método pode ser considerada excelente pois o coeficiente de correlação (r) foi de 1,0 para (T+DHT) e (T); 0,967 para (DHT); 0,997 para (A) e 0,995 para (DHEA). (Tabela XII).

A técnica empregada foi portanto específica, comparável à descrita pelos autores mais experientes no campo, apresentando reprodutibilidade boa (intra-ensaio), adequada (interensaio), com exatidão excelente. Nestas condições, os valores obtidos em indivíduos normais (Tabela XIII) foram comparáveis aos descritos por outros autores para métodos equivalentes (Tabela XIX).

A hiperplasia congênita virilizante da supra-renal que utilizamos como modelo para aplicação da metodologia desenvolvida nesta pesquisa, resulta de um defeito enzimático na biossíntese dos esteróides da córtex adrenal⁽²⁶⁾.

De todos os tipos de defeito, o mais freqüente é o da deficiência parcial da 21-hidroxilase responsável pela entrada do grupo OH no carbono 21 da cadeia lateral do anel D do núcleo do esteróide, transformando a 17 OH-Pr em 21-deoxicortisol (composto S). Nestas condições, resultará em queda de secreção do S e do seu produto o cortisol, com elevação subsequente de ACHT (mecanismo da regulação retrógrada), e assim excesso de produção dos substratos, em particular 17 OH-Pr, tentando vencer o bloqueio resultando em produção normal ou quase do cortisol. Esta hipersecreção de ACTH pelo seu efeito trófico adrenal, levará à sua hiperplasia e como subproduto o aumento de síntese e produção dos andrógenos levando ao aspecto clínico de virilização.

O aumento da concentração dos andrógenos e de seus precursores, na deficiência parcial de 21-hidroxilase, encontra-se relatada na literatura. Assim, o nível plasmático dos precursores do cortisol em crianças com deficiência de 21-hidroxilase, tem sido mencionado estar aumentada de 50-200 vezes para 17 OH-Pr e 6-10 vezes para Pr, em relação ao homem normal⁽³⁵⁾.

No que diz respeito aos andrógenos, Horton e Frazier⁽¹⁶⁾, estudando sete crianças com deficiência parcial de 21-hidroxilase, mostraram que a concentração plasmática e a velocidade de produção sanguínea de A e T eram muitas vezes mais elevadas do que em indivíduos não tratados pelo ACHT. Considerando suas taxas de conversão, esses Autores sugeriram que a origem mais importante de T é a partir da conversão periférica de A, secretada pelo córtex adrenal. Resultados semelhantes foram apresentados por Rivarola e outros⁽³¹⁾.

Analisando os resultados dos estudos dinâmicos, realizados nos cinco indivíduos com deficiência parcial de 21-hidroxilase, verificamos que as glândulas adrenais responderam tanto à supressão aguda por corticóide como estímulo exógeno-corticotrófico, como era de esperar.

Embora estes efeitos fossem intensos nos efluentes venosos adrenais, com variações significativas na concentração dos diversos esteróides, as alterações nas veias periféricas foram menos aparentes.

A média do valor basal de cortisol, na veia periférica, nos limites inferiores do intervalo da normalidade, diminuiu, porém não significativamente, com a dexametasona voltando ao valor basal após o estímulo com ACTH. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Spark e outros⁽³⁴⁾ em pacientes sem alteração da secreção dos glicocorticóides, com a diferença de que o nível de cortisol foi muito mais baixo em nossos indivíduos⁽¹⁵⁾.

A concentração basal de cortisol nas veias adrenais em nossos indivíduos foi também mais baixa do que a descrita por Spark e outros⁽³⁴⁾ bem como as respostas ao B¹⁻²⁴ ACTH. Em nossos casos, com o estímulo, a concentração do cortisol voltou aos valores basais, diferindo dos indivíduos estudados por Spark e outros⁽³⁴⁾, cujos níveis estimulados de cortisol, nas veias adrenais, aumentou muitas vezes em relação ao basal. Nossos valores estão provavelmente relacionados com a deficiência da 21-hidroxilase, sugerindo que as glândulas adrenais, estavam em sua máxima capacidade para a produção do cortisol.

Tabela XVIII

Precisão – Avaliação da Reprodutibilidade do Radioimunoensaio Comparada com os outros Autores

Hormônio	Intra	Coeficiente de variação		Referência
		% Interensaio		
T	6,8	13,2		Abraham, G. E. (1)
"	8,0	12,0 – 17,0		Schutz, S. K.; Levine, L. S.; New, M. I. (22)
"	5,0	11,0		Ducharme, J. R.; Forest, M. G.; Peretti, E.; Sempé, M.; Collier, R.; Bertrand, J. (13)
"	5,9	10,0		Presente estudo
DHT	9,4	15,6		Abraham, G. E. (1)
"	14,0	20,0 – 35,0		Schutz, S. K.; Levine, L. S.; New, M. I. (22)
"	5,0	5,0		Ducharme, J. R.; Forest, M. G.; Peretti, E.; Sempé, M.; Collier, R.; Bertrand, J. (13)
"	10,6	16,0		Presente estudo
A	8,6	14,5		Abraham, G. E. (1)
"	6,0	11,0 – 17,0		Schutz, S. K.; Levine, L. S.; New, M. I. (22)
"	7,0	9,0		Ducharme, J. R. (13)
"	6,4	11,3		Presente estudo
DHEA	9,9	12,6		Abraham, G. E. (1)
"	5,0	18,0 – 23,0		Schutz, S. K.; Levine, L. S.; New, M. I. (22)
"	10,0	10,0		Ducharme, J. R. (13)
"	8,4	14,2		Presente estudo

Tabela XIX

Valores Normais de Andr6genos Plasmaticos Comparada com outros Autores

Andr6genos	M6dia \pm DP ng/ml HOMEM	M6dia \pm DP ng/ml MULHER	Refer6ncias
T	5,59 \pm 1,5	0,48 \pm 0,2	Rivarola, M. A.; Migeon, C. J. (29,30)
"	4,90 \pm 1,6	0,22 \pm 0,07	Coyotupa, J.; Parlov, A. F.; Abraham, G. E. (12)
"	5,00 \pm 1,49	0,54 \pm 0,22	Anderson, P. H.; Fukushima, K.; Schieler, H. S. (6)
"	5,95 \pm 0,39	0,41 \pm 0,11	Attanasio, A.; Gupta, D. (8)
"	5,20 \pm 1,30	0,40 \pm 0,20	Presente estudo
DHT	0,50 \pm 0,14	0,22 \pm 0,04	Tremblay, R. R.; Beintin, I. Z.; Kowarski, A.; Migeon, C. J. (36)
"	-----	0,19 \pm 0,08	Abraham, G. E.; Manlimos, F. S. (4)
"	0,57 \pm 0,06	0,14 \pm 0,018	Attanasio, A.; Gupta, D. (8)
"	0,26 \pm 0,15	0,20 \pm 0,13	Presente estudo
A	1,14 \pm 0,21	-----	Rivarola and Migeon (29)
"	0,6 \pm 0,20	1,0 \pm 0,3	Leon, C.; Coronado, V. M.; Migeon, A.; Mateos, J. L.; Bermudez, J. A. (23)
"	-----	0,53 \pm 0,12	Abraham, G. E. (4)
"	0,90 \pm 0,40	0,80 \pm 0,50	Presente estudo
DHEA	5,53 \pm 1,78	5,34 \pm 1,57	Rivarola and Migeon (29,30)
"	3,20 \pm 1,50	3,60 \pm 1,60	Buster, J. E.; Abraham, G. E. (1)
"	6,42 \pm 1,12	5,15 \pm 1,07	Attanasio, A.; Gupta, D. (8)
"	-----	4,20 \pm 1,60	Abraham, G. E. (4)
"	5,32 \pm 1,34	4,03 \pm 2,16	Nieschlag, E.; Loriaux, D. L.; Lipsett, M. B. (27)
"	4,60 \pm 1,70	4,80 \pm 1,70	Presente estudo

Em relação aos precursores, Pr e 17 OH-Pr, os níveis basais, periféricos confirmam a observação prévia de valores aumentados em casos de indivíduos com deficiência de 21-hidroxilase não tratados e em relação aos normais para a idade e o sexo dos indivíduos^(13,17 e 18).

É interessante observar que, diferentemente do cortisol, ocorreu diminuição significativa da concentração periférica destes dois esteróides, após dexametasona. Como a supressão da produção adrenal pareceu ter sido drástica, pela diminuição acentuada de sua concentração nos efluentes adrenais, após o glicocorticóide exógeno e estes por serem a única fonte significativa dos esteróides mencionados, a queda da progesterona em sangue periférico poderia estar relacionada a sua taxa de depuração muito mais alta (aproximadamente 15 vezes) quando comparada à do cortisol⁽¹⁵⁾.

Durante o estímulo com ACHT, as concentrações destes esteróides se elevaram a valores acima do basal, tanto na veia periférica como nas adrenais, sugerindo que as glândulas adrenais, embora estejam em sua máxima capacidade de produzir cortisol, ainda não lograram esta condição em relação aos seus precursores. Isso poderia sugerir, também que os níveis do ACHT endógeno, em nossos indivíduos, ainda não estavam em nível máximo.

Confrontando a concentração periférica de T e DHT das quatro mulheres com deficiência parcial de 21-hidroxilase, com os valores normais obtidos por métodos semelhantes aos nossos⁽¹³⁾, podemos dizer que, para T, os resultados estavam dentro e um acima de 95% do intervalo de confiança para valores isolados normais de meninos acima de 14 anos. Se compararmos estes resultados com os de mulheres normais adultas (Tabela XIII), todos dos valores estavam aumentados, acima do valor mais alto de 95% do limite de confiança. No paciente do sexo masculino, ACA, os valores de T nas mesmas condições, estavam acima do intervalo da normalidade para adultos do sexo masculino.

Considerações semelhantes se aplicam para a DHT. Estas observações confirmam a elevação destes andrógenos na deficiência de 21-hidroxilase. Embora a concentração periférica destes esteróides não fosse alterada significativamente pela supressão, provavelmente refletindo uma taxa metabólica de depuração mais baixa quando comparada à progesterona⁽¹⁵⁾, as concentrações nos efluentes venosos diminuíram com a dexametasona, retornando aos níveis basais após o ACHT sugerindo que a produção de T e DHT pelas adrenais, nesta patologia, são influenciadas pelos níveis de ACTH circulante.

Em relação a A e DHEA, podem ser feitas considerações semelhantes. Os níveis periféricos elevados de A são várias vezes maiores do que os valores encontrados em adultos normais de ambos os sexos (Tabela XIII). Para DHEA os valores observados estavam dentro do intervalo de normalidade para adultos normais de ambos os sexos, exceto para o indivíduo ACA que estavam bem mais acentuados.

No sangue periférico também não houve variação expressiva dos valores de A e DHEA após dexametasona, ao contrário dos observados nos efluentes adrenais, onde os efeitos de estímulo e de depressão foram evidentes.

Como todos os esteróides medidos apresentaram concentrações mais elevadas nas veias adrenais em relação à periferia, tal situação prova sua secreção pelo córtex adrenal, no déficit de 21-hidroxilase.

Confrontando estes resultados com os valores descritos por Kirschener e outros⁽²¹⁾, no hirsutismo idiopático, verificamos que, enquanto o gradiente de cortisol é mais baixo na hiperplasia, os gradientes de A e T eram mais altos nos indivíduos por nós estudados, caracterizando o defeito enzimático observado.

Embora nossas observações em indivíduos com defeito da 21-hidroxilase sejam sugestivas de secreção adrenal dos andrógenos analisados: A, DHEA, T e DHT, tais fatos não implicam em se negar a interconexão periférica destes esteróides, que já fora descrita na condição em estudo⁽¹⁶⁾.

Nossas observações sobre a deficiência da 21-hidroxilase confirmam e ampliam os estudos de outros pesquisadores com a vantagem de que estudamos a dinâmica dos esteróides pela medida destes

hormônios em sangue coletado diretamente das veias adrenais. Este método permitiu a identificação direta dos hormônios produzidos na glândula, diferentemente dos estudos anteriores baseados na colheita do sangue periférico, em que as evidências de produção adrenal eram sempre indiretas.

7 – CONCLUSÕES

- 1 – Padronizamos os métodos para as dosagens dos andrógenos (T, DHT, A e DHEA) no plasma humano pela técnica do radioimunoensaio: extração com éter etílico, purificação em coluna cromatográfica para DHEA e separação da T e DHT em coluna de Sephadex LH-20; separação das formas livres e ligadas ao anti-soro específico com carvão dextrana T-70, as atividades determinadas em cintilador líquido, com eficiência de 55% para o trítio.
- 2 – As técnicas empregadas, avaliadas a partir de suas características: especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão, permitiram quantificar níveis dos andrógenos em condições normais e patológicas.
- 3 – As técnicas foram utilizadas para estudo da secreção adrenal da deficiência da 21-hidroxilase, mostrando que o córtex adrenal produz todos os andrógenos medidos: T, DHT, A e DHEA.

Tabela XX

Nomes Comuns de Esteróides Usados no Presente Estudo e seus
Nomes Sistemáticos Correspondentes

Nome comum	Nome sistemático
Cortisol	Pregn-4-ene-11 β , 17 α 21-triol-3, 20-dione
Progesterona	Pregn-4-ene-3, 20-dione
Testosterona	Androst-4-ene-17 β -0 α -3 α -one
17-OH-Progesterona	Pregn-4-ene-17 α -0 α -3, 20-dione
Dihidrotestosterona	5 α -androstan-17 α -0 α -3-one
Dehidroepiandrosterona	Androst-5-ene-3 β -0 α -17-one
Androstenedione	Androst-4-one-3, 17-dione

ABSTRACT

Radioimmunoassay methods have been developed for plasma T, DHT, A and DHEA. Plasma volumes usually employed were: 0,2 ml and 0,5 ml for men and women, respectively for T: 1,0 ml from DHT and 0,5 ml to A and DHEA.

After preliminary extraction with diethyl ether, the extracts were applied to Sephadex LH-20 microcolumns to separate T from DHT and to Al_2O_3 microcolumns purification of DHEA.

Following elution, the dried, purified extracts were incubated with specific antisera at temperature $4^{\circ}C$ overnight, the separation of antibody bound and free fractions being done on activated charcoal-dextrana T-70. The counting was done in liquid scintillations.

Specificity studies have shown that the assays for all steroids were specific. The sensitivity was 5 pg for A and DHEA, 6 pg for T and DHT. The interassay coefficient of variation was 5-10% and the interassay precision was 10-15%. The accuracy was satisfactory with a recovery $98,5 \pm 7,95\%$ for T and DHT, $96,34 \pm 10,05\%$ for T, $98,04 \pm 8,74\%$ for DHT, $104,82 \pm 9,41\%$ for A and $103,66 \pm 5,71\%$ for DHEA.

The mean \pm SD of plasma T, DHT, A and DHEA concentrations in normal men and women determined by these methods were as follows: in men, T: $5,2 \text{ ng/ml} \pm 1,3$, DHT: $0,26 \pm 0,18$, A: $0,9 \pm 0,4$ and DHEA: $4,6 \pm 1,7$ and in females: T: $0,5 \text{ ng/ml} \pm 0,2$, DHT: $0,4 \pm 0,2$, A: $0,8 \pm 0,5$ and DHEA: $4,8 \pm 1,7$.

The methodology applied for blood collected simultaneously from peripheral and left and right adrenal vein effluents in basal conditions, after dexamethasone suppression and ACTH stimulation clearly demonstrated direct secretion (presence of a steroid gradient Peripheral/Adrenal vein) of the androgens studied in congenital deficiency of cortical 21-OH'ase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABRAHAM, G. E. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta endocr. (Copeni:agen)*, 75(Suppl.183):7-41, 1974.
2. ABRAHAM, G. E. Reliability criteria for steroid radioimmunoassay. *Path. Biol.*, 23(10):885-8, 1975.
3. ABRAHAM, G. E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J. Clin. Endocr. Metab.*, 29:866-70, 1969.
4. ABRAHAM, G. E.; MANLINS, F. S.; GARZA, R. *Radioimmunoassay of steroids*. Carson, Calif., Radioassay systems Laboratories, sem data. p.591-656.
5. ACHANDO, S. S. *Avaliação do método de dosagem de pregnandiol urinário por cromatografia de gás*. São Paulo, 1975. (Dissertação de mestrado).
6. ANDERSON, P. H.; FUKUSHIMA, K.; SCHILLER, H. S. Radioimmunoassay of plasma testosterone, with use of polyethylene glicol to separate antibody bound and free hormone. *Clin. Chem.*, 6:708-14, 1975.
7. ANDRÉ, C. M. & JAMES, V. H. T. A method for the assay of testosterone and androstenedione in human female plasma by competitive protein binding. *Clin. chim. Acta*, 40:325-33, 1972.
8. ATTANASIO, A. & GUPTA, D. Simultaneous radioimmunoassay of estrogens and androgens in plasma of prepubertal children. In: GUPTA, D., ed. *Radioimmunoassay of steroids hormones*. Weinheim, Chemie, 1975. p.91-100.
9. AULETTA, F. J.; CALDWELL, B. V.; HAMILTON, G. L. Androgens: testosterone and dihydrotestosterone. In: JAFFE, B. M. editor. *Methods of hormone radioimmunoassay*. New York, N. Y., Academic, 1974. p.359-70.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IPEN foram revistas e enquadradas na NB-66 da ABTN.

10. BROOKS, R. V. Androgens: physiology and pathology. In: MAKIN, H. L. J., editor. *Biochemistry of steroids hormone*. Oxford, Scientific, 1975. p.289-311.
11. BUSTER, J. E. & ABRAHAM, G. E. Simultaneous measurement of plasma dehydroepiandrosterone and 16 α -hidroxi dehydroepiandrosterone by radioimmunoassay. *Analyt. Lett.*, 5:597-603, 1972.
12. CAYOTUPA, J.; PARLOW, A. F.; ABRAHAM, G. E. Simultaneous radioimmunoassay of plasma testosterone and dihydrotestosterone. *Analyt. Lett.*, 5(6):329-40, 1972.
13. DUCHARME, J. R.; FOREST, M. G.; PERETTI, E.; SEMPE, M.; COLLIER, R.; BERTRAND, J. Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development. *J. clin. Endocr. Metab.*, 42:468-76, 1976.
14. FURUYAMA, S.; MAYES, D. M.; NUGENTE, A. A radioimmunoassay for plasma testosterone. *Steroids*, 16:415-28, Jul. 1970.
15. GOWEER, D. B. Catabolism and excretion of steroids. In: MAKIN, H. L. J., editor. *Biochemistry of steroids hormone*. Oxford, Scientific, 1975. p.149-84.
16. HORTON, R. & FRASIER, S. D. Androstenedione and its conversion to plasma testosterone in congenital adrenal hyperplasia. *J. clin. Invest.*, 46(6):1003-9, jun. 1967.
17. HUGHES, I. A. & WINTER, J. S. D. The application of a serum 17 OH-progesterona radioimmunoassay to the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *J. Pediat.*, 88(5):766-73, May 1976.
18. HUGHES, I. A. & WINTER, J. S. D. The relationships between serum concentrations of 17 OH-progesterona and other serum and urinary steroids in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 46(1):98-104, 1978.
19. HUI, H.; SHIH, W.; CHUNG, A.; CASTRO, A. *A simple radioimmunoassay of plasma testosterone without column chromatography*, sem local, editor, data.
20. ISMAIL, A. A. A.; NISWENDER, G. D.; MIDGLEY JR., A. R. Radioimmunoassay of testosterone without cromatography. *J. clin. Endocr. Metab.*, 34(1):177-84, Jan. 1972.
21. KIRSCHNER, M. A.; ZUCKER, I. R.; JESPERSEN, D. Idiopathic hirsutism-An ovarian abnormality. *New Engl. J. Med.*, 294:637-40, 1976.
22. KORTH-SCHUTZ, S.; LEVINE, L. S.; NEW, M. I. Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche. *J. clin. Endocr. Metab.*, 42(1):117-24, Jan. 1976.
23. LEON, C.; CORONADO, V. M.; MIJARES, A.; MATEOS, J. L.; BERMUDEZ, J. A. Medición em plasma de androstenedione por radioimmunoanálisis utilizando anticuerpos obtenidos com um hapteno conjugado en el carbono 19. *Archas invest. Med.*, 5(2):75-88, 1974.
24. LINDNER, H. R.; PEREL, E.; FRIEDLANDER, A.; ZEITLIN, A. Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. *Steroids*, 19:357-75, 1972.
25. MIDGLEY JR., A. R.; NISWENDER, G. D.; REBAR, R. W. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta Endocr. (Copenhagen)*, 142(Suppl.):163-84, 1969.

26. MIGEON, C. J. Adrenal androgens in man. *Am. Med.*, 53:606-25, 1972.
27. NIESCHLAG, E.; LORIAUX, D. L.; LIPSETT, M. B. Radioligand assay for A⁵-3 β -hydroxysteroids. 1-3 β -hydroxi-5-androsterone-17-one and its 3-sulfate. *Steroids*, 19(5):669-79, May 1972.
28. PERETTI, E. de & FOREST, M. G. Radioimmunoassay method for unconjugated plasma dehydroepiandrosterone. In: GUPTA, D., editor. *Radioimmunoassay of steroids hormones*. Weinheim, Chemie, 1975. p.63-72.
29. RIVAROLA, M. A. & MIGEON, C. J. Determination of testosterone and androst-4-ene-e, 17-dione concentration in human plasma. *Steroids*, 7:103-17, 1966.
30. RIVAROLA, M. A.; FOREST, M. G.; MIGEON, C. J. Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at deliver: concentration and protein binding. *J. clin. Endocr. Metab.*, 28:34-40, 1968.
31. RIVAROLA, M. A.; SAEZ, J. M.; MIGEON, C. J. Studies of androgens in patientes with congenital adrenal hyperplasia. *J. clin. Endocr. Metab.*, 27:624-30, 1967.
32. RODBARD, D. & FRAZIER, G. R. Statistical analysis of radioligand assay data. *Meth. Enzym.*, 37:3-22, 1975.
33. SETCHELL, K. D. R. & SHACKLETON, C. H. L. The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on sephadex LH-20. *Clin. chim. Acta*, 47:381-8, 1973.
34. SPARK, R. F.; KETTYLE, W. R.; ERSEBERG, H. Cortisol dynamics in adrenal venous effluent. *J. clin. Endocr. Metab.*, 39:305-10, 1974.
35. STROTT, C. A.; YOSHIMIE, T.; LIPSETT, M. B. Plasma progesterona and 17-hydroxyprogesterona in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia. *J. clin. Invest.*, 48:930-9, 1969.
36. TREMBLAY, R. R.; BEITINS, I. Z.; KOWARSKI, A.; MIGEON, C. J. Measurement of plasma dihydrotestosterone by competitive protein-binding analysis. *Steroids*, 16:29-40, 1970.
37. WIEGMAN, T.; WOLDING, M. C.; PRATT, J. J. A new cocktail for liquid scintillation counting of aqueous radioimmunoassay samples. *Clin. chim. Acta*, 59(3):347-56, 1975.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal, 11 049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IPENUCLEAR
Telex – (011) 23592 - IPEN - BR