



AVALIAÇÃO CRÍTICA DA RADIOIODAÇÃO DOS HORMÔNIOS LUTEINIZANTE  
E FOLÍCULO ESTIMULANTE HIPOFISARIOS HUMANOS COM  
LACTOPEROXIDASE E SUA COMPARAÇÃO COM O  
MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T:

APLICAÇÃO NA MEDIDA DAS GONADOTROFINAS SÉRICAS, NO CICLO  
MENSTRUAL, APÓS ESTÍMULO COM FATOR LIBERADOR HIPOTALÂMICO

Heidi Pinto

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 085  
IEA - DT - 085

OUTUBRO/1978

**CONSELHO DELIBERATIVO**

**MEMBROS**

Klaus Reinach — Presidente

Roberto D'Utra Vaz

Helcio Modesto da Costa

Ivano Humbert Marchesi

Admar Cervellini

**PARTICIPANTES**

Regina Elisabete Azevedo Beretta

Flávio Gori

**SUPERINTENDENTE**

Rômulo Ribeiro Pieroni

**AVALIAÇÃO CRÍTICA DA RADIOIODAÇÃO DOS HORMÔNIOS LUTEINIZANTE  
E FOLÍCULO ESTIMULANTE HIPOFISÁRIO HUMANOS COM  
LACTOPEROXIDASE E SUA COMPARAÇÃO COM O  
MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T:**

**APLICAÇÃO NA MEDIDA DAS GONADOTROFINAS SÉRICAS, NO CICLO  
MENSTRUAL, APÓS ESTÍMULO COM FATOR LIBERADOR HIPOTALÂMICO**

**Heidi Pinto**

**Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências" –  
Orientador Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg.  
Apresentada e defendida em 28 de dezembro de 1977,  
no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.**

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

**Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA**

---

**Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.**

## SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO.....	1
2 – MATERIAL.....	3
2.1 – Aparelhos.....	3
2.2 – Substâncias Químicas e Biológicas.....	3
3 – MÉTODOS.....	4
3.1 – Radioiodação dos Hormônios.....	4
3.2 – Caracterização do Hormônio Marcado.....	5
3.3 – Purificação do Hormônio Marcado.....	5
3.4 – Imunoensaio.....	6
3.5 – Curvas Dose-Resposta para o Ensaio das Gonadotrofinas.....	6
4 – RESULTADOS.....	6
4.1 – Radioiodação.....	6
4.2 – Purificação do Hormônio Marcado.....	9
4.3 – Imunoreatividade do Hormônio Marcado.....	9
4.4 – Métodos de Separação do Hormônio Radioativo Não Reativo.....	14
4.5 – Curvas Dose-Resposta para o Radioimunoensaio.....	14
4.6 – Fisiologia.....	14
5 – DISCUSSÃO.....	21
6 – CONCLUSÕES.....	38
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

**AVALIAÇÃO CRÍTICA DA RADIOIODAÇÃO DOS HORMÔNIOS LUTEINIZANTE  
E FOLÍCULO ESTIMULANTE HIPOFISÁRIOS HUMANOS COM  
LACTOPEROXIDASE E SUA COMPARAÇÃO COM O  
MÉTODO CLÁSSICO DA CLORAMINA-T:**

**APLICAÇÃO NA MEDIDA DAS GONADOTROFINAS SÉRICAS, NO CICLO  
MENSTRUAL, APÓS ESTÍMULO COM FATOR LIBERADOR HIPOTALÂMICO**

Heidi Pinto

**RESUMO**

A comparação entre as duas técnicas de marcação das gonadotrofinas hipofisárias humanas, lactoperoxidase e Cloramina-T, mostrou a vantagem da utilização do método enzimático na reação de substituição de  $^{125}$ I ao radical tirosila. A oxidação química com Cloramina-T, apresentou o inconveniente da degradação molecular, bem como a diminuição da imunorreatividade desses hormônios glicoprotéicos.

Após obtida a gonadotrofina  $^{125}$ I, desenvolveu-se a técnica do polietilenoglicol (PEG) 4000 a 16%, em substituição ao método clássico de precipitação com o segundo anticorpo, para separação do hormônio livre daquele ligado ao anticorpo.

Com a metodologia laboratorial estabelecida passamos ao estudo fisiológico da liberação de LH e FSH hipofisários pelo fator liberador das gonadotrofinas (FLG), em oito mulheres normais, nas duas fases do ciclo menstrual. Fizemos duas provas, uma aguda (injeção de 25 µg de FLG) e outra prolongada (infusão de 100 µg de FLG por 8 horas) seguida de uma aguda, tanto na metade da fase folicular como da correspondente na fase lútea. Observou-se resposta significativamente maior do LH na fase lútea, ao passo que não houve diferença significativa na resposta do FSH nas duas fases do ciclo menstrual, na prova aguda isolada. Nas provas prolongada e aguda pós-crônica a resposta não foi significativamente diferente para os dois hormônios, nas duas fases do ciclo menstrual. Os possíveis efeitos moduladores dos esteróides sexuais, são discutidos.

**1 - INTRODUÇÃO E PROPÓSITO**

O desenvolvimento de métodos radioimunológicos para a mensuração dos hormônios glicoprotéicos, a saber, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), teve por finalidade sua caracterização imunológica e a investigação do mecanismo de sua secreção em condições normais e patológicas.

É reconhecido que há muitos grupos reativos imunológicos nos hormônios protéicos e que estes grupos podem ser diferentes da área da molécula responsável pela atividade biológica. Modificações na estrutura do hormônio por métodos químicos, enzimáticos ou outros podem resultar em mudanças nas atividades imunológicas ou também biológicas<sup>(4)</sup>.

Aprovada para publicação em janeiro/1978.

O radioimunoensaio de hormônios glicoprotéicos segue os princípios gerais descritos por YALOW e BERSON<sup>(48)</sup>. Entretanto, numerosos problemas tiveram de ser resolvidos e entre eles sobressaiu a qualidade do traçador obtido pela introdução de radioiodo, após a oxidação a "iodo ativo" na molécula protéica. Um problema habitual, a superiodação que influi diretamente na qualidade imunológica, foi obtida pela tendência em se trabalhar com elevada atividade específica do traçador.

De fato, estudos recentes<sup>(17,21)</sup> reconheceram que o comportamento imunológico das gamaglobulinas iodadas nos resíduos tirosila muda progressivamente com o aumento do conteúdo de iodo, o que torna essencial um controle para se obter marcação adequada.

O fenômeno químico que pode ocorrer durante a iodação tem sido amplamente estudado, o iodo podendo ser envolvido em reações de substituição no anel benzênico das tirosilas<sup>(43)</sup>, nos grupos imidazólicos das histidinas e nos grupos indólicos dos triptofanos<sup>(20)</sup> ou podendo também oxidar resíduos de cistina e cisteína<sup>(9)</sup>.

Outras reações de oxidação e substituição podem ocorrer devido a outros resíduos de aminoácidos normalmente presentes nas proteínas<sup>(20,9)</sup>. Para obtermos proteínas radioiodadas não modificadas biologicamente, foi necessário não somente evitar alterações na estrutura molecular por processos oxidativos de per si, mas também introduzir o mínimo possível de átomos de iodo na molécula protéica<sup>(18)</sup>, idealmente um átomo de iodo por molécula de hormônio.

O controle desses fenômenos nas gonadotrofinas é difícil, uma vez que são moléculas glicoprotéicas em que estas reações químicas ocorrem afetando tanto a parte protéica como a glicídica.

A radioiodação das gonadotrofinas utilizando o agente oxidante clássico Cloramina-T (p-tolueno sulfonamida N-monoclorada), apresentou maiores problemas para o FSH do que para o LH. Os FSH-<sup>125</sup>I, preparados com a Cloramina-T, apresentaram anomalias físico-químicas e imunoquímicas, com elevado grau de degradação molecular<sup>(29)</sup>.

Outros métodos podem ser usados para a radioiodação das gonadotrofinas e entre eles podemos citar: a) Iodação com cloreto de iodo (ICI) que se apresenta como menos danificante à proteína<sup>(16,24)</sup>, mas a presença de iodo não radioativo limita a possibilidade de se obter um hormônio com a atividade específica desejada (100  $\mu$ Ci/ $\mu$ g); b) Iodação eletrolítica<sup>(34)</sup>, tem a vantagem de não afetar as proteínas e também ser o único em que há possibilidades de se controlar a reação de substituição do halogênio à tirosila, apresentando o inconveniente da dificuldade técnica, bem como a necessidade de trabalharmos com concentrações de hormônio cerca de 100 vezes maiores do que as habituais; c) Radiiodação enzimática, utiliza o fato do iodeto poder ser enzimaticamente oxidado a "iodo ativo" pela lactoperoxidase<sup>(33,43)</sup>. A especificidade desta reação enzimática é de tal ordem a não introduzir mudanças significantes na estrutura do polipeptídeo a ser marcado<sup>(14)</sup>. Assim sendo, optamos pela técnica de MARCHALONIS<sup>(22)</sup>, feita em meio levemente alcalino<sup>(29)</sup>, sendo as radiogonadotrofinas preparadas por oxidação mais branda com a lactoperoxidase (peroxidase do leite) físico - quimicamente mais estáveis por um período maior de tempo, além de possuírem grande afinidade pelo anti-soro específico<sup>(29,31)</sup>. Com efeito, a degradação do hormônio radioiodado foi também uma das dificuldades encontradas no decorrer do radioimunoensaio das gonadotrofinas. O método clássico da oxidação pela Cloramina-T, combinando uma alta eficiência de incorporação de iodo ao hormônio com uma grande simplicidade, apresentou, entretanto, o inconveniente de induzir mudanças na estrutura da molécula protéica<sup>(18,30)</sup>.

Assim sendo, descreveremos nesta pesquisa a técnica desenvolvida para a marcação das gonadotrofinas utilizando os dois métodos, Cloramina-T e lactoperoxidase, fazendo sua comparação. Uma vez feita a escolha do método de marcação, desenvolvemos o radioimunoensaio para o LH e FSH no soro e sua aplicação a um problema de fisiologia humana, liberação induzida das gonadotrofinas hipofisárias no ciclo menstrual normal, pela infusão do hormônio liberador hipotalâmico de LH e FSH (FLG = fator liberador das gonadotrofinas).

## 2 - MATERIAL

### 2.1 - Aparelhos

- 2.1.1. Contador Gama Automático (Searle, Chicago, Estados Unidos da América).
- 2.1.2. "Ultrac" 7000, coletor de frações refrigerado (LKB, Estocolmo, Suécia).
- 2.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (BioRad, Los Angeles, Estados Unidos da América).

### 2.2 - Substâncias Químicas e Biológicas

2.2.1. Hormônios: FSH humano purificado hipofisário (LER-1575-c e LER-1801-3) e LH humano purificado hipofisário (LER 960) obtido para marcação da "National Pituitary Agency" por intermédio do "Hormone Distribution Office" do National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, Bethesda, Estados Unidos da América. Padrões de FSH e LH humanos (LER-907) também obtidos da fonte acima mencionada, foram diluídos em tampão fosfato pH 7,5, 0,01 M, contendo NaCl 0,15 M (PBS) numa concentração de 5 µg/µl e guardados a -20°C.

2.2.2. Lactoperoxidase (Calbiochemical Co., Los Angeles, Estados Unidos da América) foi preparada como solução estoque de 1 mg/ml em tampão fosfato 0,5 M, pH 7,4. No momento do uso a solução estoque era diluída de 1:200.

2.2.3. Peróxido de hidrogênio a 30% (Merck A. G. Darmstadt, República Federal da Alemanha) foi diluído em água desionizada (1:15000), antes do uso.

2.2.4. Cloramina-T (Merck A. G. Darmstadt, República Federal da Alemanha) foi preparada na diluição de 1 mg/ml em tampão fosfato 0,05 M pH 7,5.

2.2.5. Metabissulfito de sódio (Carlo Erba, Milão, Itália) foi preparado na concentração de 2,5 mg/ml, em tampão fosfato 0,05 M pH 7,5.

2.2.6. Acrilamida (BioRad Labs, Los Angeles, Estados Unidos da América) na forma de monômero e dímero<sup>(11)</sup>.

2.2.7. Material Radioativo: Na<sup>125</sup> foi adquirido da Behringwerke A. G. (República Federal da Alemanha) preparado especialmente para radiiodação de proteínas, em meio levemente alcalino e totalmente livre de agentes redutores e carreadores, com uma atividade específica sempre maior do que 700 mCi/ml.

2.2.8. BioGel P-60 (100-200 mesh) (BioRad, Los Angeles, E.U.A.).

2.2.9. Anti-soros para FSH e LH foram preparados em coelhos, sendo pré-adsorvidos com HCG e ambos obtidos da "National Pituitary Agency"<sup>(13,27)</sup>.

2.2.10. Amostras de sangue. Para os estudos fisiológicos foram selecionadas oito mulheres voluntárias, com idade média de 27 anos e períodos menstruais normais 25-35 dias. Preliminarmente, foram colhidas amostras de sangue, em jejum, cada dois dias, entre 8 e 9 horas da manhã (separando-se o soro que foi estocado a -20°C, até a dosagem), determinando-se os níveis de LH e FSH durante o ciclo menstrual (Figura 1), para cálculo das fases lútea e folicular, em que se fizeram as provas discriminadas abaixo.

2.2.10.1. "Prova aguda". Na Tabela IV, encontramos a época do ciclo em que esta prova foi

realizada e em que após cateterismo e manutenção de uma veia anticubital, de pelo menos uma hora antes do início da prova, foram colhidas amostras de sangue 5 minutos antes e durante 60 minutos, após a administração aguda de 25 µg de F.L.G. endoflebicamente (cada 5 minutos nos primeiros 30 e a seguir cada 10 minutos, até o fim da prova, num total de 11 amostras).

2.2.10.2. "Prova prolongada ou crônica", realizada de 2 a 3 dias após a "prova aguda" (Tabela IV). Após os cuidados de manutenção da veia anticubital, cateterizada, foram colhidas amostras, 15 minutos antes do início da infusão crônica de F.L.G. (100 µg diluídos em 1000 ml de solução salina a 0,9%, durante 8 horas na velocidade de fluxo de 0,21 µg/minuto) no braço contra-lateral e colhendo-se amostras horárias, até o fim da infusão, quando foram injetados, agudamente, 25 µg do hormônio liberador (F.L.G.), obtendo-se a seguir amostras sanguíneas cada 5 minutos nos 20 minutos iniciais e a cada 10 minutos nos 40 minutos finais (total de 16 amostras).

2.2.11. Antigama globulina de coelho. Para a técnica de separação do complexo "gonadotrofina humana-antigonadotrofina humana" (Ag-Ab) da "gonadotrofina humana livre" (Ag) em radioimunoensaio, utilizamos um segundo anticorpo, uma antigama globulina de coelhos, obtida em carneiros, após 4-5 imunizações quinzenais com gama globulina total do sangue de coelhos emulsionadas com adjuvante de Freund<sup>(10)</sup>.

2.2.12. Polietilenoglicol 4000 (Sigma, E.U.A.). Utilizado no desenvolvimento do radioimunoensaio como substituinte químico do segundo anticorpo. Preparamos uma solução de PEG-4000 a 16% em água destilada contendo 0,1% de gamaglobulina bovina.

2.2.13. F.L.G. ou fator hipotalâmico de liberação das gonadotrofinas<sup>(23,25,37)</sup>. É um decapeptídeo sintético idêntico ao hormônio hipotalâmico que ocorre naturalmente e estimula a liberação das gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH, sintetizado pelo Dr. ANDREW SCHALLY<sup>(37,39,40,41)</sup> no Polypeptide Research Laboratory, University of Tulane, New Orleans, E.U.A., diluído em solução salina 0,9%, pH 5,6-6,2 em duas concentrações, 25 µg/ml e 100 µg/2 ml, autoclavados a 1 atmosfera (110-120°C) por 20 minutos. O material foi guardado em temperaturas baixas, porém não inferior a 4°C.

### 3 - MÉTODOS

#### 3.1 - Radiolodação dos Hormônios

##### 3.1.1 - Iodação Enzimática

Executaram-se as reações em pequenos tubos plásticos descartáveis (11 x 68 mm) à temperatura ambiente, os reagentes sendo colocados na ordem seguinte:

- 2,5 µg de LH ou FSH em 25 µl de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4
- 30 µl de tampão fosfato 0,5 M pH 7,4
- 500 a 1000 µCi de Na-<sup>125</sup>I (1-3 µl)
- 10 µg (FSH) e 20 µg (LH) de Lactoperoxidase (6 µg/µl)
- 300 ng (FSH) e 500 ng (LH) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µl)
- Agitar 2' (FSH) e 5' (LH)
- 300 ng (FSH) e 500 ng (LH) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µl)

Agitar 2' (FSH) e 5' (LH)

- Interrompeu-se a reação por adição de 500  $\mu$ l de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5.

### 3.1.2 – Iodação com Cloramina-T (p-Tolueno Sulfonamida N-Monoclorada)

Este método baseia-se na técnica clássica de HUNTER e GREENWOOD<sup>(15)</sup> com redução da quantidade de oxidante para 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de hormônio, sendo a reação realizada em pequenos tubos plásticos descartáveis<sup>(29,30)</sup>. Os reagentes foram colocados na seqüência seguinte:

- 2,5  $\mu$ g de LH ou FSH em 25  $\mu$ l de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4
- 25  $\mu$ l de tampão fosfato 0,5 M pH 7,4
- 500 a 1000  $\mu$ Ci de Na-<sup>125</sup>I (1-3  $\mu$ l)
- 2,5  $\mu$ g de Cloramina-T (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) em tampão fosfato 0,05 M pH 7,4)

Agitar alguns segundos

- 25  $\mu$ g de Metabissulfito de sódio (5  $\mu$ g/ $\mu$ l de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4)
- 100  $\mu$ l de plasma de Banco de Sangue.

### 3.2 – Caracterização do Hormônio Marcado

Utilizou-se sempre uma alíquota da mistura de iodação para avaliar as características físico-químicas do hormônio marcado ou por meio da cromatoelektroforese em papel (Whatmann 3MC, tensão de 200V, tempo de corrida de 1 hora, tampão fosfato 0,01 M pH 7,6)<sup>(28)</sup>, ou por meio da prova "teste de adsorção ao talco"<sup>(28,30)</sup>. Após a corrida eletroforética determinaram-se os picos de radioatividade, o hormônio indene permanecendo na origem e os componentes danificados acompanhando a albumina humana corada com azul de bromofenol, usada como referência, e o <sup>125</sup>I não reativo migrando bem à frente, em direção ao ânodo. Na "prova de adsorção ao talco", onde uma alíquota do tubo de reação era diluída em 2 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4, o hormônio indene foi adsorvido por 200 mg de talco recoberto com 100  $\mu$ l de plasma de Banco de Sangue. Após completa homogeneização, o tubo foi centrifugado a 1500 g por 20 minutos e o sobrenadante decantado, sendo determinadas as radioatividades do sobrenadante e precipitado em contador gama de poço e a porcentagem de hormônio radioiodado indene (precipitado).

### 3.3 – Purificação do Hormônio Marcado

Como no processo de marcação existem sempre frações marcadas danificadas e iodo livre, qualquer que seja o método empregado, torna-se necessário proceder-se a uma purificação prévia, antes de se empregar o hormônio radioiodado, no radioimunoensaio. Utilizou-se, para tal, uma coluna de BioGel P-60 (100-200 mesh) de 20 x 1 cm, previamente entumescido em água desionizada, preparada 24 horas antes da utilização e "recoberta" com 2 ml de BSA-PBS a 2% (tampão fosfato 0,05 M pH 7,5 contendo 0,14 M de NaCl e 2% de soro albumina bovina) e "equilibrada" com PBS. Coletaram-se eluatos de 1 ml, em tubos contendo 50  $\mu$ l de BSA-PBS a 2%, com velocidade de fluxo de 3 ml/hora, no coletor de frações LKB refrigerado. Alíquotas de cada eluato (5 a 10  $\mu$ l) foram levadas ao contador gama de cintilação (Searle Nuclear) para a identificação dos picos de radioatividade (Figuras 2 e 3).

### 3.4 – Imunoensaio

Após a marcação e purificação, as gonadotrofinas séricas foram quantificadas pela técnica de radioimunoensaio, utilizando segundo anticorpo<sup>(10,28,30)</sup> ou pelo PEG 4000<sup>(12,19)</sup>. A padronização do PEG 4000 (Polietilenoglicol 4000) como método de separação do complexo hormônio-anti-hormônio do hormônio livre mostrou que para uma solução de polietilenoglicol a 16% contendo 0,1% de gamaglobulina bovina, o volume ideal foi de 1 ml para 0,5 ml de mistura de incubação. Para o radioimunoensaio, a 100 µl de soro humano desconhecido ou quantidades conhecidas de padrão gonadotrófico (LER 907) adicionávamos 100 µl de anti-LH ou anti-FSH, numa diluição suficiente para ligar 25-45% das radioiodogonadotrofinas, na ausência do hormônio marcado. A todos os tubos colocávamos 100 µl de tampão BSA-PBS 0,01% (contendo EDTA se o método utilizado era do 2º Ab) e incubávamos por 24 horas a 4°C (a esta temperatura a energia de ligação do complexo Ag-Ab é bem maior<sup>(6)</sup>), e então eram colocados 100 µl de gonadotrofina-<sup>125</sup>I (10000 cpm ou 50 pg do hormônio marcado). Realizava-se nova incubação por 24 horas a 4°C e a seguir adicionávamos 100 µl de uma diluição adequada de antigama globulina de coelho (segundo anticorpo) ou 1 ml de uma solução de PEG 4000 a 16% recoberto com 100 µl de tampão fosfato 0,01 M pH 7,5 contendo 1% de soro albumina bovina. Quando utilizávamos o segundo anticorpo, era necessário uma terceira incubação a 4°C por 24 horas, e os tubos eram centrifugados a 4°C por 30 minutos a 2000 g. A ligação antígeno-anti-soro era expressa em porcentagem da radioatividade total recuperada no precipitado.

### 3.5 – Curvas Dose-Resposta para o Ensaio das Gonadotrofinas

No desenvolvimento da metodologia, foram feitas curvas-padrão tanto para LH como para FSH, mantendo-se constante a concentração de padrão: 0 a 1000 ng/ml para o LH e 0 a 1750 ng/ml para o FSH (LER 907); a diluição do anti-soro foi de 1:25000 para o LH e 1:10000 para o FSH; o tempo de incubação foi de 72 horas a 4°C, e o método de separação o mesmo, ou 2º Ab ou PEG 4000. A única variável era o hormônio radioativo obtido ou pela Cloramina-T ou pela lactoperoxidase, purificado em coluna de BioGel P-60, com uma concentração de "traçador" de 10000 cpm por 0,1 ml.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Radioiodação

Na Tabela I, relativa ao FSH, observamos que o rendimento da marcação (porcentagem de <sup>125</sup>I incorporado à molécula protéica), pureza (porcentagem de hormônio radioiodado indene avaliado pela adsorção ao talco<sup>(28,30)</sup>) e imunorreatividade (porcentagem de FSH-<sup>125</sup>I ligado ao anti-soro) do hormônio marcado foi similar para os dois agentes oxidantes quando o tempo de exposição à lactoperoxidase foi de 15 minutos. A pureza, discretamente maior do hormônio obtido com Cloramina-T em contraposição à sua menor imunorreatividade, em relação à lactoperoxidase, é uma indicação de que o hormônio aparentemente "puro" era menos imunorreativo<sup>(42)</sup>, após Cloramina-T, do que o resultante da marcação enzimática.

Por outro lado, a redução do tempo de incubação do hormônio "frio" com lactoperoxidase, embora reduzisse o rendimento, resultou em produto com maior pureza e melhor imunorreatividade (Figura 4).

Na Tabela II e Figura 4, referentes à radioiodação do LH, não foram observadas diferenças importantes com o emprego quer da Cloramina-T quer da lactoperoxidase, mesmo com redução do tempo de exposição a este último agente oxidante, avaliando-se os três parâmetros mencionados para o FSH, em particular a imunorreatividade.

Tabela I

## Radiiodação do Hormônio Folículo Estimulante Humano (hFSH)

DATA	Rendimento da marcação (%)		Tempo de incubação		Provável Ativ. espec. hormonal ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )		Eficiência após purificação***			
	Clor. •	Lac. ••	Clor.	Lac.	Clor.	Lac.	Cloram.	Lacto.	Cloram.	Lactop.
26/11	60	55	30"	15'	120	100	78	68	18	26
21/12	60	47	30"	10'	90	80	85	70	18	22
16/01	55	51	30"	15'	80	75	80	69	10	17
30/01	50	38	30"	5'	105	100	69	79	18	36
13/02	50	30	30"	2'	110	105	81	85	19	50
06/05	48	28	30"	2'	118	108	78	90	38	48

• 1  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  FSH•• 5  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  FSH\*\*\* % do FSH- $^{125}\text{I}$  indene

Tabela II

## Radioiodação do Hormônio Luteinizante (LH)

DATA	Rendimento da marcação (%)		Tempo de incubação		Atividade específica ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )		Eficiência após purificação*** (%)			
	Clor.	Lac.	Clor.	Lac.	Clor.	Lac.	Adsorção ao talco (200 mg)	Ligação com excesso Ab	Cloram.	Lactop.
15/02	61	60	30''	15'	105	95	70	67	31	30
06/05	62	58	30''	15'	98	106	74	70	32	32
02/06	58	50	30''	10'	95	90	80	74	30	30
15/07	55	42	30''	5'	100	80	78	81	30	35
12/12	60	40	30''	5'	101	80	75	84	34	37
16/01	54	35	30''	5'	95	80	80	92	38	40

\* 1  $\mu\text{g}$  cloram. T/ $\mu\text{g}$  LH

\*\* 10  $\mu\text{g}$  Lactoperoxidase/ $\mu\text{g}$  LH

\*\*\* % do LH- $^{125}\text{I}$ .

#### 4.2 - Purificação do Hormônio Marcado

As gonadotrofinas marcadas com lactoperoxidase e purificadas em BioGel P-60 apresentam dois componentes radioativos, após a exclusão inicial dos componentes danificados (Figura 2). As gonadotrofinas-<sup>125</sup>I purificadas, correspondentes a 25% da radioatividade total, foram eluídas nas frações 3-5, coincidindo com o volume de eluição descrito por ANDREWS<sup>(2,33)</sup>, para FSH não marcado. Nos eluatos 1 e 2 encontramos componentes de peso molecular maior (agregados moleculares) correspondentes às frações danificadas. Para uma melhor caracterização do produto radioiodado, em relação à sua integridade molecular e homogeneidade, os efluentes da coluna de BioGel P-60 eram examinados por cromatoelektroforese em papel<sup>(28)</sup>. A fração 3, embora com maior porcentagem de radioatividade, era entretanto a menos "pura" do que o eluato 4, para ambas as gonadotrofinas. Aliás, a fração 4 foi utilizada para o radioimunoensaio.

O perfil de eluição das gonadotrofinas-<sup>125</sup>I marcadas com Cloramina-T (Figura 3) diferia do perfil obtido com a lactoperoxidase (Figura 2), sendo a incorporação de <sup>125</sup>I maior para o primeiro método. Com efeito, os eluatos 5 a 10 representando de 70 a 80% da radioatividade total, após a marcação com lactoperoxidase, correspondiam ao <sup>125</sup>I livre; as frações 7 a 14 (<sup>125</sup>I livre), com a Cloramina-T, representavam apenas 40 a 50% de radioatividade. Entretanto, a observação das Figuras 2 e 3 mostra claramente a concentração do material de maior pureza, correspondendo ao hormônio radioativo indene, em menor número de eluatos da coluna com o material obtido por iodação enzimática.

#### 4.3 - Imunorreatividade do Hormônio Marcado

A imunorreatividade do hormônio marcado, determinada pela adição de excesso de anticorpo, ou seja, diluição final de 1:1000 (reação rápida) ao sistema do anticorpo duplo ou PEG 4000, mostrou ser a fração 4, obtida da coluna de exclusão molecular de BioGel P-60, a melhor para o radioimunoensaio (Tabela III). Entretanto, pudemos observar que a imunorreatividade era sempre maior com o produto obtido com a lactoperoxidase. As gonadotrofinas-<sup>125</sup>I purificadas foram diluídas para uma concentração de 500 pg/ml<sup>(29)</sup> e guardadas a 4°C em solução tampão contendo Iorezin (adsorver <sup>125</sup>I liberado durante a estocagem). As soluções diluídas de hormônio radioiodado diminuem o dano causado por congelamento e consequente perda da sensibilidade da curva-padrão. Assim, observamos cerca de 10% de perda da integridade molecular (adsorção ao talco ou cromatoelektroforese) e 20% na imunorreatividade após 15 dias de marcação enzimática. Por outro lado, quando pertimos com o hormônio obtido com Cloramina-T, houve uma perda de cerca de 25% na integridade molecular e 33% na imunorreatividade após 7 dias de marcação.

Tabela III

Imunorreatividade das Gonadotrofinas-<sup>125</sup>I Eluídas da Coluna de BioGel P-60,  
Após Marcação pela Cloramina-T e Lactoperoxidase

FRAÇÕES	LIGAÇÃO COM EXCESSO DE ANTI-SORO (%)			
	LH		FSH	
	Cloramina-T	Lactoperox.	Cloramina-T	Lactoperox.
3	20	34	16	30
4	26	48	19	43

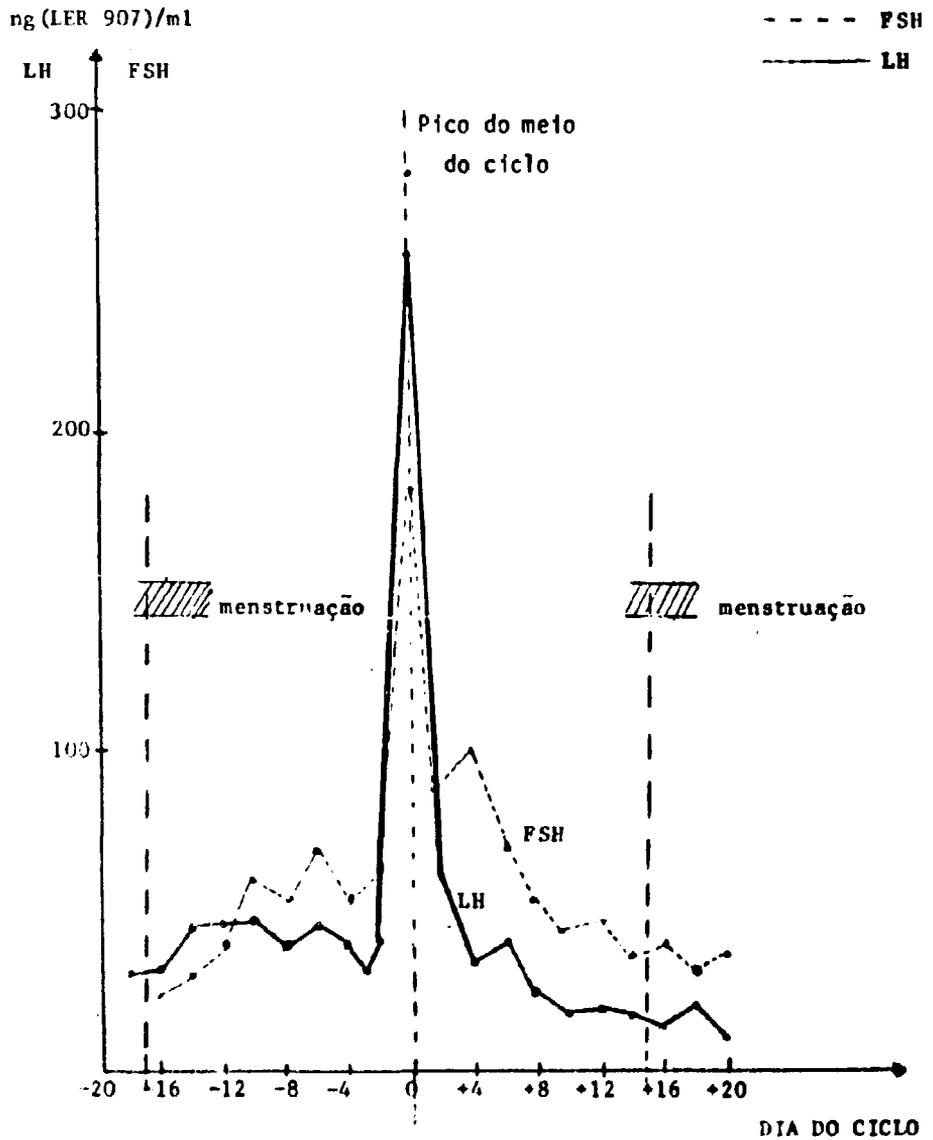


Figura 1 - Médias dos Níveis Séricos de LH e FSH nas Amostras de Sangue de Oito Mulheres Normais, Sincronizadas em Torno do Pico do Meio Ciclo

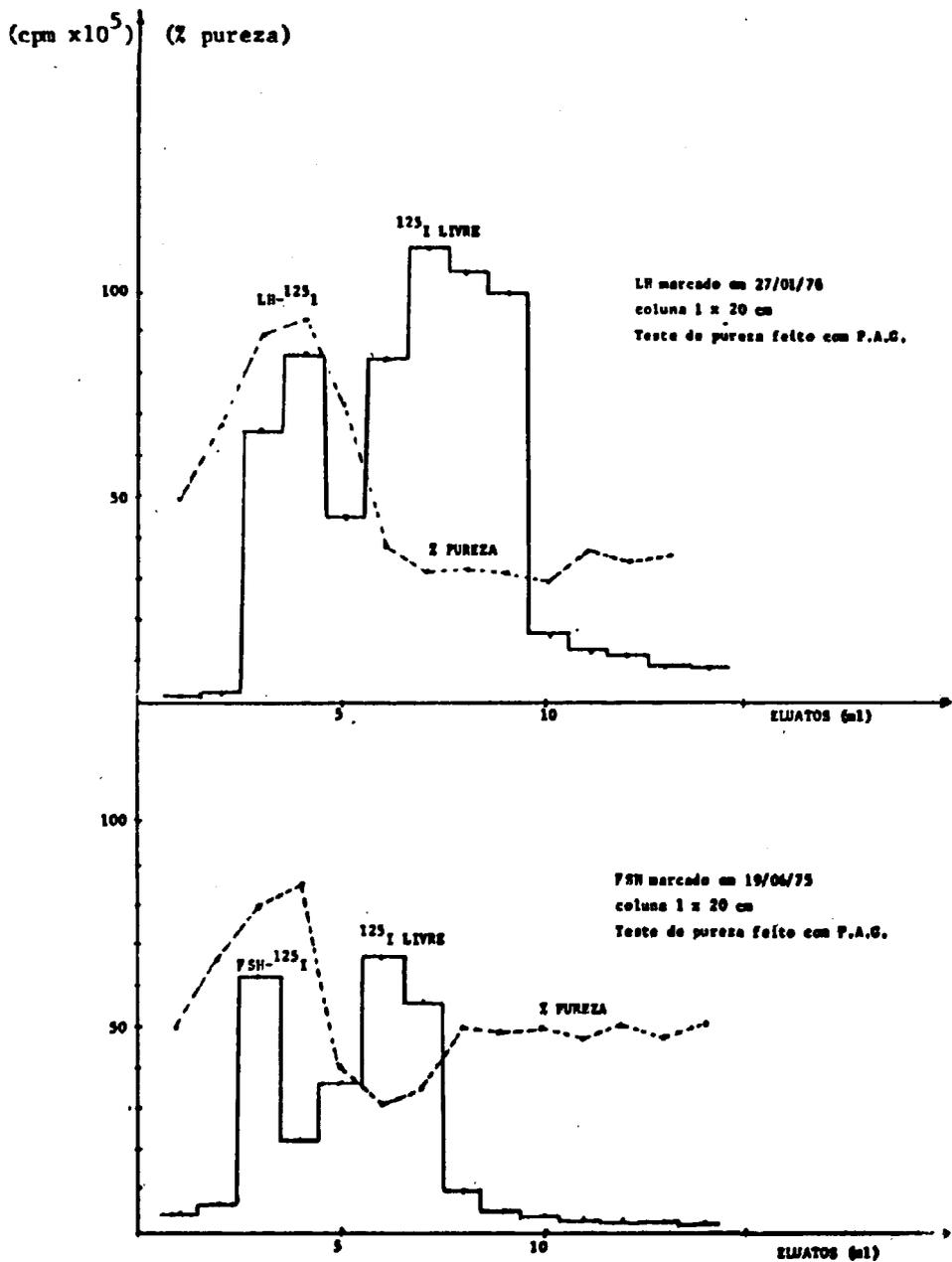


Figura 2 - Purificação das Gonadotrofinas- $^{125}\text{I}$ , Marcadas com Lactoperoxidase, em Biogel P-80 (100-200 MESH)

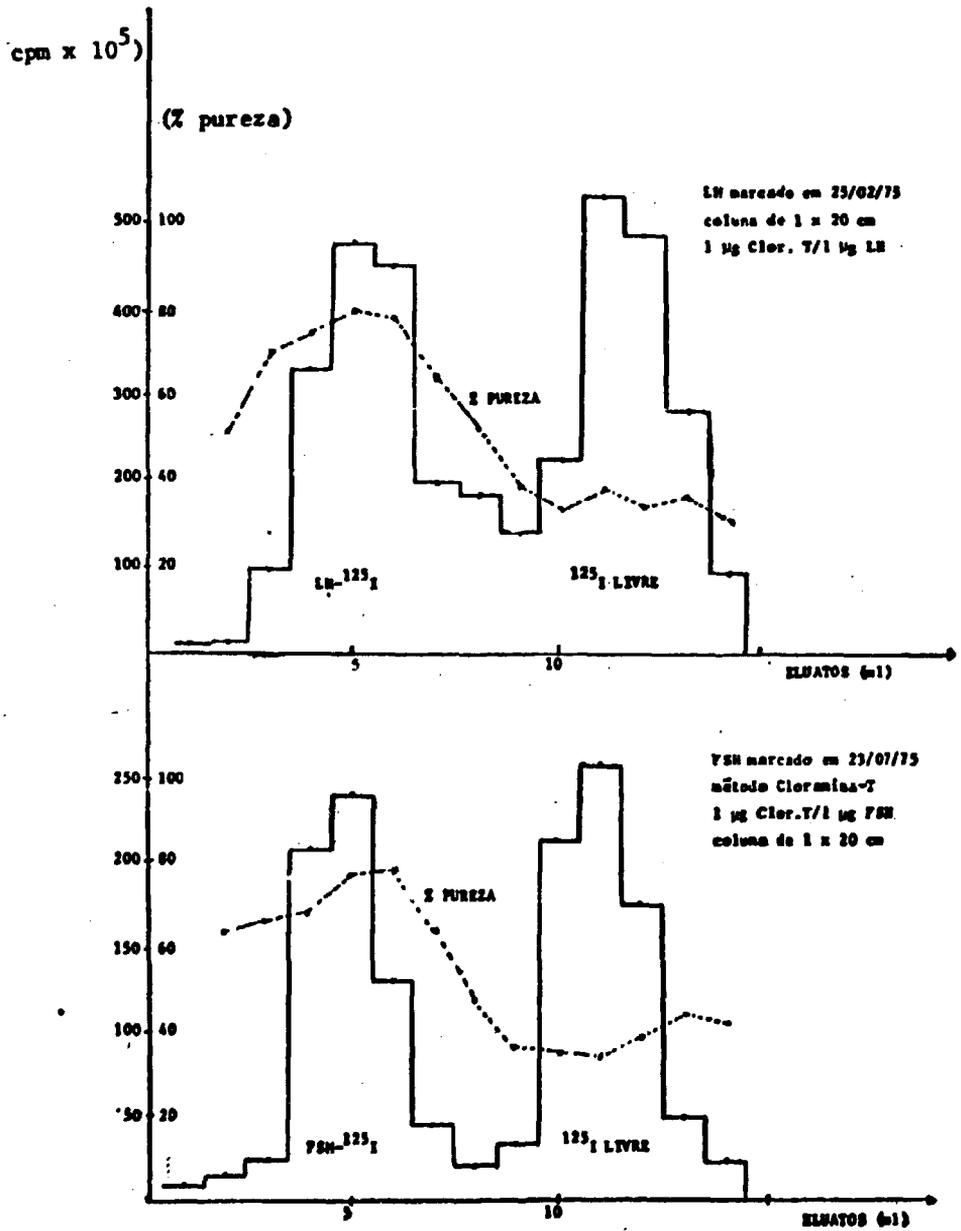


Figura 3 - Purificação das Gonadotrofinas-<sup>125</sup>I, Marcadas com Cloramina-T, em Coluna de Biogel P-60

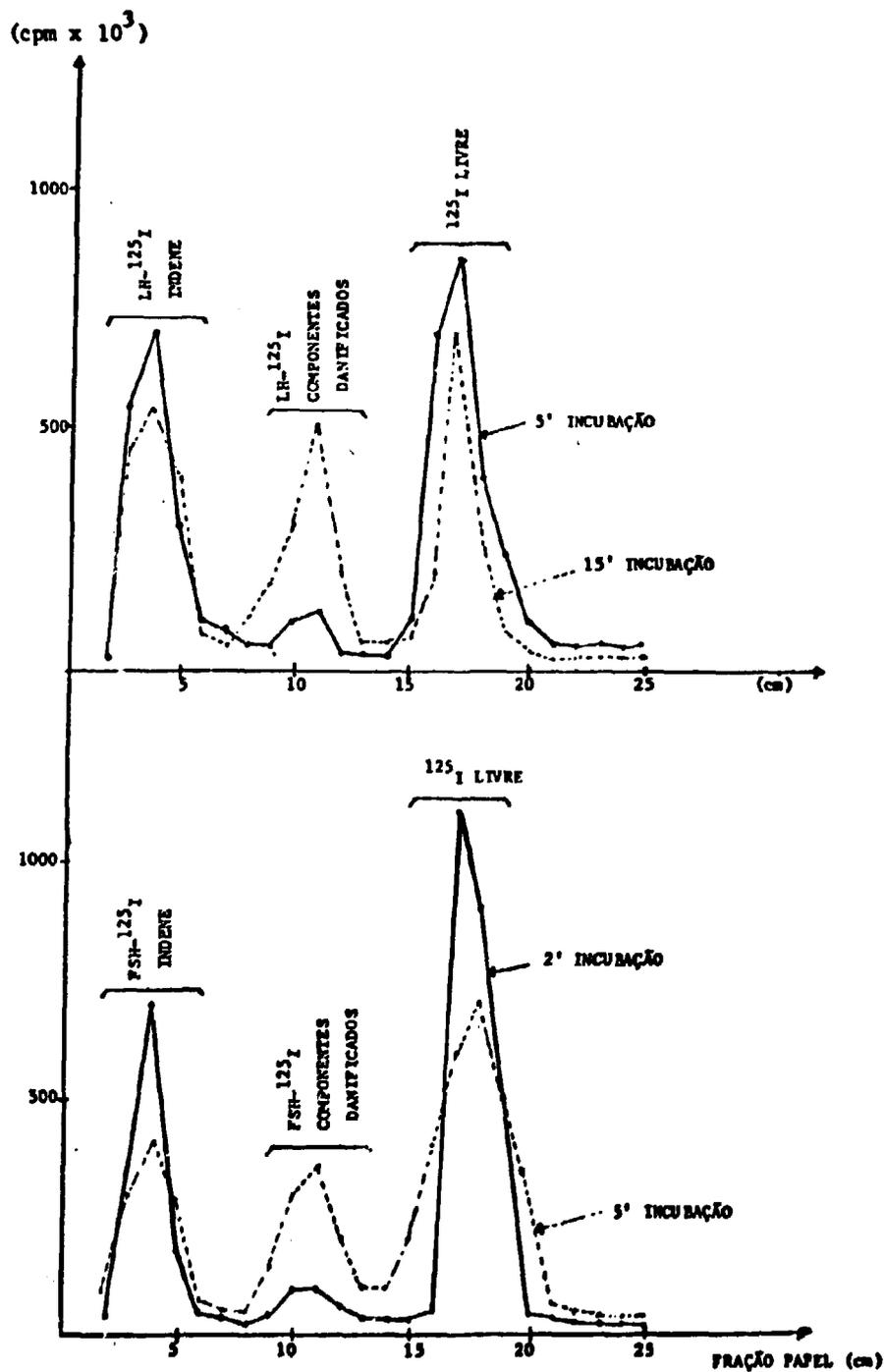


Figura 4 - Cromatoeletoforeses de  $\text{FSH-}^{125}\text{I}$  e  $\text{LH-}^{125}\text{I}$  após Mercapto com Lactoperoxidase

#### 4.4. – Métodos de Separação do Hormônio Radioativo Não Reativo

Utilizando-se como técnica de separação o segundo anticorpo, antigama globulina de coelho<sup>(28,30)</sup>, obtivemos curvas-padrão sensíveis, embora a precisão não alcançasse índices tão bons. Ao introduzirmos o método, utilizando polietilenoglicol 4000<sup>(12)</sup> recoberto com soro albumina bovina a 1%, os resultados se uniformizaram, proporcionando sensibilidade e precisão equivalentes (Figura 7). Fez-se necessário estabelecer a concentração ótima de PEG 4000 a ser utilizada, notando-se que há necessidade de uma concentração mínima para a completa precipitação do complexo Ag-Ab (Tabela XVII), concentração esta que foi de 16% m/v. Por outro lado, não houve aumento considerável de radioatividade no precipitado quando aumentamos a concentração acima de 20% m/v. Observa-se na Tabela XVII que o volume ideal de PEG 4000 foi de 1 ml, ou seja, o dobro do volume de incubação do radioimunoensaio.

#### 4.5 – Curvas Dose-Resposta para o Radioimunoensaio

Na Figura 5, indicamos as curvas-padrão de FSH e LH usando como traçadores LH-<sup>125</sup>I e FSH-<sup>125</sup>I, preparados pelo método da Cloramina-T e lactoperoxidase. Notamos que, em ambos os casos, a curva obtida com o hormônio radiiodado enzimaticamente era mais sensível\* e também mais precisa\*\*, indicando a melhor qualidade do traçador.

Por outro lado, a curva padrão obtida com Cloramina-T, revelou-se menos sensível, não permitindo discriminar quantidades pequenas de hormônio (parte inicial da curva), enquanto que a precisão pode ser considerada razoável para o LH e não para o FSH (Figura 5).

#### 4.6 – Fisiologia

A observação das Tabelas V e VI mostrou que na fase folicular os níveis de LH e FSH sobem progressivamente, atingindo o pico médio aos 15 e 20 minutos, respectivamente, após a injeção do fator liberador das gonadotrofinas (FLG). Na fase lútea, embora os níveis basais não sejam diferentes, a resposta foi mais intensa para os dois hormônios gonadotróficos, sendo atingido o pico médio aos 30 minutos para o LH e aos 25 minutos para o FSH. A comparação das respostas de LH nas fases lútea e folicular (Tabelas IX e XIV) mostrou, como já prevíamos, valores significativamente mais elevados do pico, bem como dos incrementos máximos, percentual relativo e área total de secreção, na fase lútea relativamente à folicular. Por outro lado, a resposta do FSH (Tabelas X e XV) sérico à injeção aguda do fator liberador, foi maior quanto ao valor do pico, entretanto quando este acme era corrigido pelo valor basal, significativamente mais elevado na fase lútea, os incrementos máximo e relativo não foram significativamente diferentes nas duas fases do ciclo menstrual, bem como a área secretória acima do valor basal.

Quanto à infusão "crônica" do F.L.G.<sup>(7)</sup> (Tabelas VII e VIII) observamos uma elevação progressiva dos níveis de LH até a quarta hora da infusão e qued; nas duas amostras subsequentes (sexta e oitava horas), o mesmo observando-se em relação ao FSH (Tabela VII). Entretanto, à injeção de uma dose de 25 µg do liberador, ao término da infusão prolongada, os níveis quer de LH quer de FSH se elevaram intensamente, atingindo valores iguais ou superiores aos maiores valores obtidos na "prova crônica". Tal situação foi observada nas duas fases do ciclo menstrual.

Na que diz respeito à avaliação da resposta do LH sérico, durante a infusão "crônica" do F.L.G. (Tabelas XI e XV), não houve diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, a análise de resposta do FSH (Tabelas XII a XV) mostrou que embora os níveis basais de

(\*) Sensibilidade: definida como a maior queda da porção inicial da curva dose-resposta.<sup>(28,32)</sup>

(\*\*) Precisão: definida pela capacidade de medir concentrações elevadas do hormônio.<sup>(6,32)</sup>

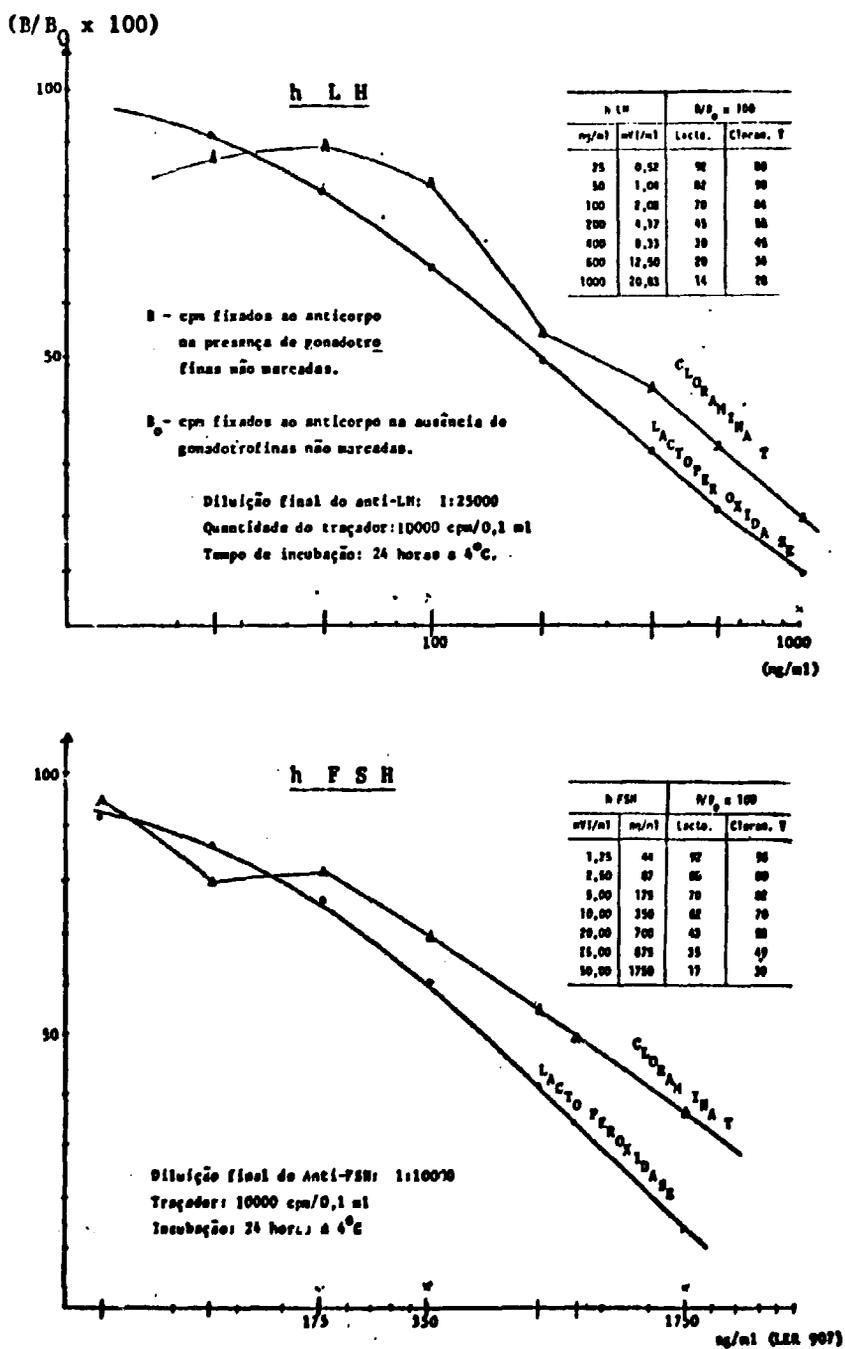


Figura 6 - Curvas Dose-Resposta para Radioimunoenssio de Gonadotrofinas

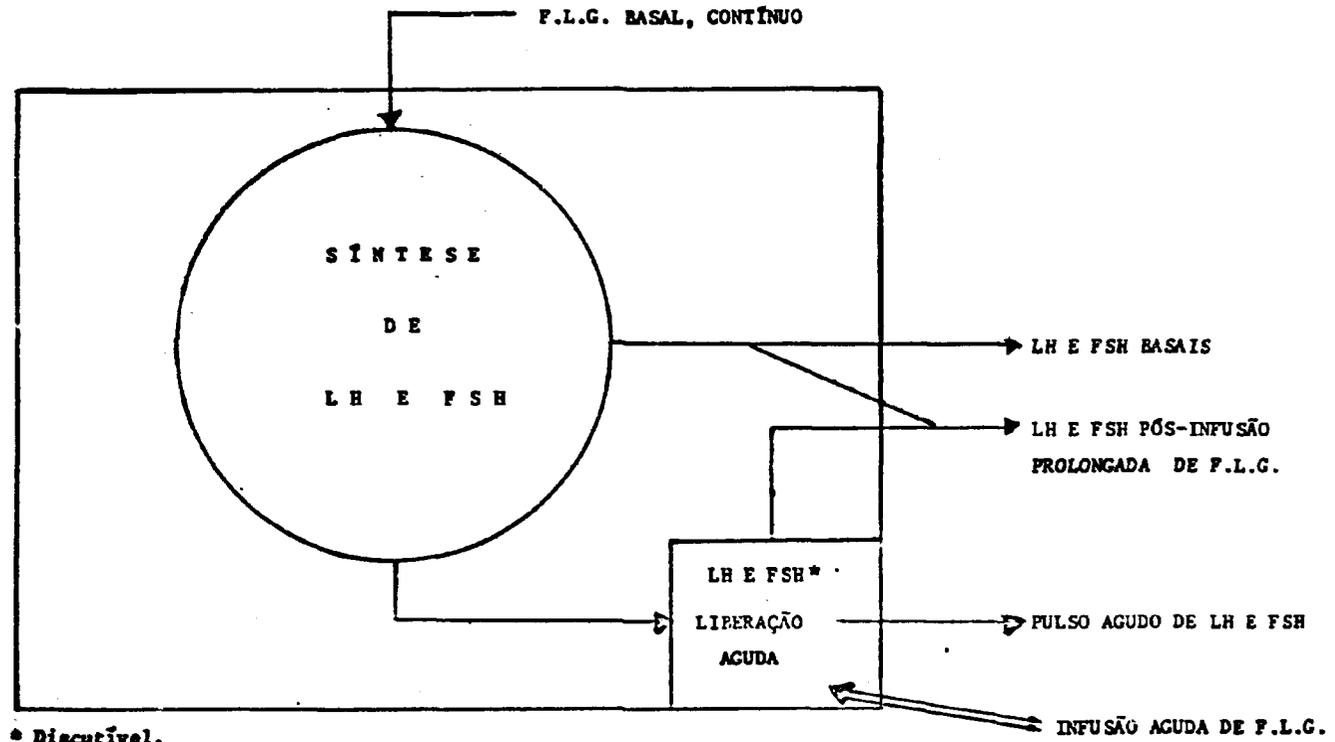


Figura-8 — Esquema Teórico da Liberação de LH e FSH pelo Gonadotrofo Hipofisário

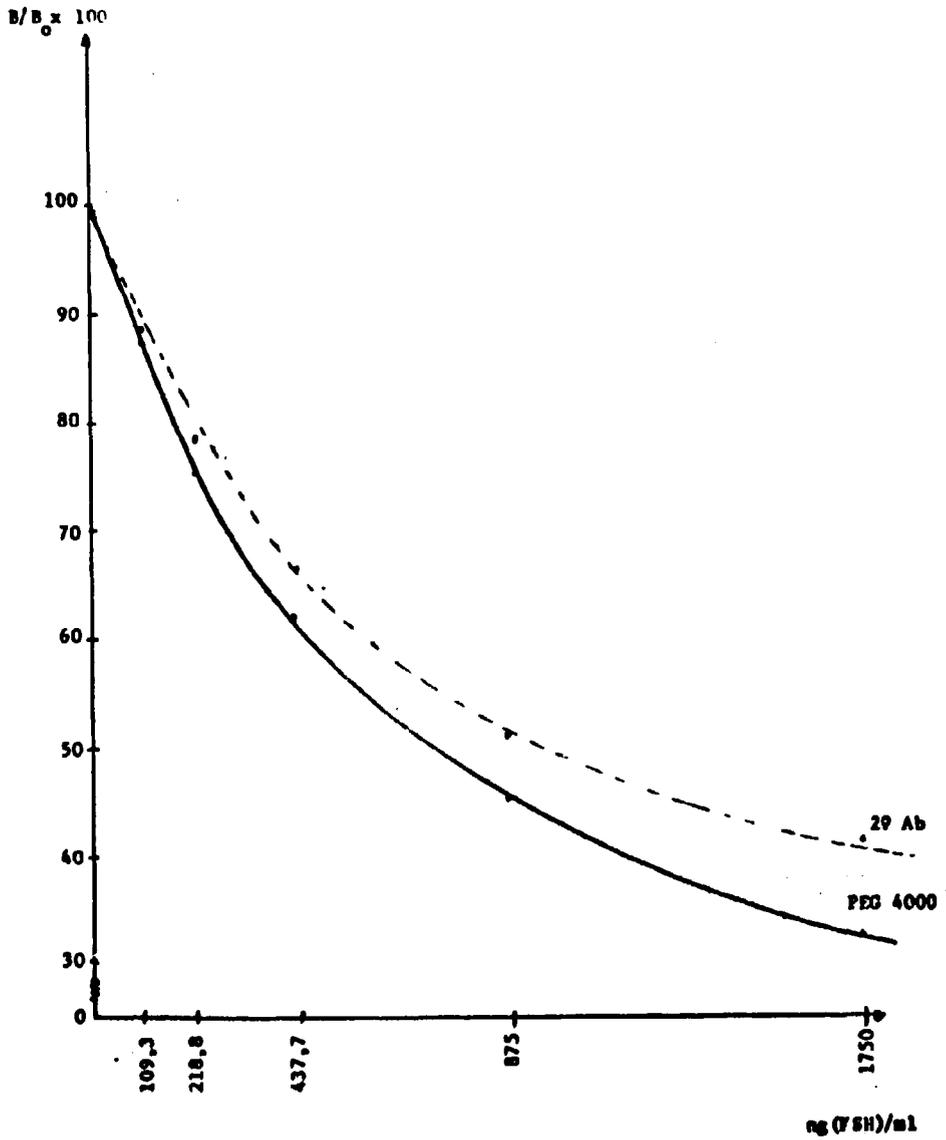


Figura 7 - Curvas Dose-Resposta de FSH Utilizando Segundo Anticorpo e PEG-4000 como Agentes Precipitantes do Complexo "Ag-Ab"

Tabela IV

Dias do Ciclo Menstrual em que Foram Feitas as "Provas Agudas e Prolongadas"  
(Crônicas) de Liberação Induzida do LH e FSH Hipofisários

MULHERES NORMAIS NORMAIS	IDADE (ANOS) (ANOS)	DURAÇÃO		PROVAS			
		DO	CICLO	AGUDA		PROLONGADA	
				DIAS DO CICLO			
L.G.A.	26	31	8º	23º	19º	25º	
N.A.S.	28	29	8º	19º	10º	21º	
M.P.S.	27	30	9º	20º	11º	22º	
G.F.	18	27	6º	20º	8º	23º	
M.J.S.	32	26	6º	20º	9º	24º	
M.I.A.	24	25	5º	20º	8º	22º	
T.Z.V.	36	35	10º	24º	12º	26º	
J.C.C.	21	28	6º	18º	8º	22º	
<b>Médias</b>	27,0	28,8	7,3	20,8	9,6	23,1	
<b>± s</b>	6,0	3,2	1,8	1,8	1,6	1,7	

Tabela V

Respostas do LH e FSH Sêricos à Infusão Aguda de F.L.G. na Fase Folículo do Ciclo Menstrual

Tempo Paciente	LH (ng/ml)											FSH (ng/ml)											
	-5'	0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	50'	60'	-5'	0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	50'	60'	
G.F.	40	75	75	85	110	120	103	160	180	150	130	228	217	354	365	386	354	328	312	326	326	326	305
L.G.A.	21	34	50	62	86	90	90	106	90	48	-	256	274	263	340	393	491	481	491	533	481	481	481
N.A.S.	54	54	74	92	122	160	180	114	106	130	82	424	417	509	456	498	551	551	589	541	561	561	541
M.P.S.	40	35	58	78	120	122	123	108	106	99	75	319	319	364	568	400	674	645	626	512	456	-	-
M.J.S.	12	18	35	53	54	54	50	70	48	45	45	334	365	350	334	428	442	365	407	365	350	350	358
M.I.A.	26	20	30	34	-	40	40	36	46	43	34	280	210	210	288	344	414	446	586	386	379	379	386
T.Z.V.	29	26	34	44	75	58	75	75	51	58	48	312	340	579	702	856	856	881	905	905	786	786	744
J.C.C.	47	29	47	95	173	181	165	149	141	101	113	298	298	333	333	351	351	386	398	316	382	382	333
Médias	33,6	38,4	50,4	67,9	105,7	103,1	103,3	102,3	96	84,3	75,3	306,4	305,0	369,0	423,3	457,0	516,6	511,4	526,8	425,5	465,1	465,1	451,1
± s	14,0	19,2	22,0	23,0	38,8	51,5	54,6	41,2	48,0	41,7	36,1	58,8	71,1	120,9	143,7	168,2	173,9	182,2	180,8	192,9	150,3	150,3	154,7

Tabela VI

Respostas do LH e FSH Séricos à Infusão Aguda de F.L.G. na Fase Lútea do Ciclo Menstrual

Tempo Paciente	LH (ng/ml)												FSH (ng/ml)											
	-5'	0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	50'	60'	-5'	0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	40'	50'	60'		
G.F.	40	20	100	192	340	396	424	692	484	508	396	246	239	246	249	316	421	509	523	568	638	656		
L.G.A.	37,5	37,5	79	246	412	560	472	494	412	355	246	333	410	488	558	709	863	888	817	842	768	888		
N.A.S.	54	54	74	329	590	680	680	710	680	680	650	386	414	414	400	431	561	579	688	667	758	688		
M.P.S.	28	50	62	160	548	548	618	642	642	594	482	-	477	496	533	617	575	645	687	680	702	582		
M.J.S.	35	30	50	70	156	184	213	205	191	198	156	407	379	424	603	593	702	744	686	656	670	421		
M.I.A.	20	14	34	95	115	121	133	133	111	99	80	351	344	407	491	624	688	737	631	674	596	526		
T.Z.V.	12	16	34	57	80	108	116	95	80	72	52	302	337	509	649	842	842	786	900	688	688	706		
J.C.C.	50	43	75	189	334	296	272	272	205	205	141	449	544	491	670	754	726	754	670	670	642	628		
Médias	34,6	33,1	63,5	167,3	321,9	361,6	366,0	405,4	350,6	338,8	275,4	353,4	393,0	434,6	519,1	610,8	672,3	705,3	687,9	680,7	682,8	630,8		
±s	14,2	15,5	23,1	92,8	192,9	218,7	215,7	258,4	236,7	232,0	213,4	67,9	92,6	86,6	139,6	170,4	148,4	121,2	100,0	81,4	59,4	137,7		

gonadotrofina fossem significativamente menores na fase folicular, não houve diferença quanto ao valor do pico, nem em relação ao incremento máximo, o que não se observou com o incremento porcentual que, como era de se esperar, foi significativamente maior na fase lútea.

Quanto à injeção aguda de 25 µg, ao término da infusão "crônica", de fator liberador (Tabelas VII e VIII), a avaliação da resposta do LH sérico (Tabelas XIV e XVI) não mostrou diferença marcante entre as fases folicular e lútea, em nenhum dos parâmetros analisados, ao contrário do que se havia observado na infusão aguda simples. Do mesmo modo, a resposta do FSH sérico à infusão "aguda pós-crônica" não mostrou diferenças significativas, em nenhum dos parâmetros estudados, entre as fases folicular e lútea.

A comparação entre a prova "aguda" e a mesma após a infusão "prolongada" do F.L.G. (Tabelas V a VIII e XIII a XVI), mostrou que relativamente aos valores de LH sérico, como era de esperar, os níveis basais e os picos foram mais elevados após infusão crônica do fator de liberação na fase folicular. Os demais parâmetros da Tabela XVI foram avaliados para a prova aguda pós-crônica, considerando-se como  $t = 0$  os 480 minutos e os valores individuais subtraídos desse resultado. Nestas condições, observou-se que o tempo em que se atingiu o acme foi menor na infusão aguda pós-crônica ( $t_{\text{médio}} = 17,1$  minutos) em relação à aguda ( $t_{\text{médio}} = 30,0$  minutos); o incremento máximo foi significativamente maior após a infusão crônica, em relação à prova aguda isolada; o incremento porcentual relativo apresentou resposta contrária, ou seja, maior na infusão aguda pós-crônica; a área de secreção foi significativamente maior na "prova aguda pós-crônica".

A mesma análise para os níveis de FSH sérico, na fase folicular, mostrou a semelhança do LH, valores mais elevados do basal ( $t = 480$  minutos) e do acme pós-infusional, na prova aguda pós-crônica, em relação à prova aguda. Com as correções acima mencionadas, verificou-se (Tabelas X, XI e XVI) que o tempo para atingir o valor máximo era também mais precoce na prova aguda pós-crônica ( $t_{\text{médio}} = 15,0$  minutos); do que na prova aguda isolada ( $t_{\text{médio}} = 26,3$  minutos); o incremento máximo também era maior após infusão crônica e este mesmo incremento, relativamente ao valor basal ( $\Delta\%$ ) era praticamente o mesmo nas duas provas. A área secretória média também era maior na fase aguda pós-crônica, mas a diferença com a prova aguda foi no entanto, de significância limiar ( $t_{\text{observado}} = 2,128$  e  $t_{0,05} = 2,160$ ).

Finalmente, a comparação entre as duas infusões agudas do fator liberador, precedidas ou não da infusão prolongada, mostrou na fase lútea que em relação ao LH, como já indicado e esperado, o basal e o pico foram significativamente maiores após a infusão crônica; o tempo para se atingir o acme foi maior na infusão aguda simples ( $t_{\text{médio}} = 25,6$  minutos) do que na prova aguda pós-crônica ( $t_{\text{médio}} = 12,9$  minutos) para  $t_0$  correspondente a 480 minutos; os incrementos máximo absoluto e relativo porcentual bem como a área secretória foram significativamente maiores na infusão aguda isolada.

Quanto ao FSH, apenas o valor basal e o tempo médio (16,4 minutos na prova aguda pós-crônica e 35 minutos na aguda isolada) foram significativamente diferentes na comparação da infusão aguda e aguda pós-crônica. Os demais parâmetros não foram estatisticamente diferentes (Tabelas X, XIII e XV).

## 5 - DISCUSSÃO

Comparando-se as características físico-químicas e imunoquímicas das gonadotrofinas<sup>125</sup> preparadas pelo método enzimático<sup>(29,44)</sup> com as obtidas pela técnica clássica da Cloramina-T<sup>(3,29,30)</sup> (modificada pela redução da quantidade de agente oxidante, de 10 µg/µg de hormônio<sup>(15)</sup> para 1 µg/µg<sup>(31)</sup>) e realizando a reação à temperatura de 4°C, com atividade específica teórica ao redor de 100 µCi/µg) mostramos serem as obtidas pelo primeiro método como apresentando melhor imunorreatividade. No caso do FSH, vimos ser importante o tempo de exposição à lactoperoxidase, ativada pela água oxigenada, e optamos pelo tempo de 2 minutos<sup>(29)</sup>. O tempo de exposição para o LH não apresentou tantos problemas, mostrando ser este molécula mais resistente à oxidação, e escolhemos

Tabela VIIa

Respostas do LH Sérico à Infusão Crônica + Aguda do F.L.G. na Fase Folicular do Ciclo Menstrual

Tempo Paciente	LH (ng/ml)																
	-15'	0'	30'	60'	120'	180'	240'	360'	480'	485'	490'	495'	500'	510'	520'	530'	540'
L.G.A.	23	26	-	122	112	231	332	206	200	443	448	387	348	326	320	274	273
N.A.S.	35	41	-	132	549	750	725	725	511	625	725	750	700	750	725	700	650
M.P.S.	43	50	-	127	412	680	792	874	712	833	792	874	915	792	710	710	680
M.L.S.	43	31	-	268	704	704	892	676	667	620	760	748	732	676	620	620	467
M.I.A.	42	30	-	334	295	311	855	541	498	337	565	710	782	565	513	401	401
T.Z.V.	57	62	-	341	634	933	1000	878	841	834	834	834	933	812	769	641	706
J.C.C.	50	47	-	308	681	760	700	880	608	681	760	662	681	662	662	624	726
Médias	41,9	39,6	-	233,1	483,9	624,1	756,7	682,9	576,7	624,7	697,7	709,3	727,3	654,7	617,0	576,1	536,1
± s	10,8	14,8	-	102,0	221,1	255,5	213,3	245,9	204,0	185,4	139,0	159,1	194,6	167,9	155,2	164,9	161,4

Tabela VIIb

Respostas do FSH Sérico à Infusão Crônica + Aguda do F.L.G. na Fase Folicular do Ciclo Menstrual

Tempo Paciente	F S H (ng/ml)															
	-15'	0'	60'	120'	180'	240'	360'	480'	485'	490'	495'	500'	510'	520'	530'	540'
L.G.A.	400	400	589	1014	1473	1540	1400	800	1540	1684	1400	1112	1400	1400	1112	1473
N.A.S.	457	467	488	688	772	1263	1001	908	1123	1263	-	1333	1263	1193	1122	1228
M.P.S.	354	456	428	428	456	1228	1000	842	1158	1999	1228	1158	1000	1298	842	772
M.J.S.	175	298	288	456	589	688	660	414	965	702	631	484	512	498	568	498
M.I.A.	337	281	337	460	491	519	775	635	705	782	765	768	772	737	667	670
T.Z.V.	263	526	656	1572	1572	1424	1256	876	1256	1466	1382	1572	1572	1256	1382	1466
J.C.C.	246	337	660	870	793	891	912	561	870	870	849	937	870	849	891	870
Médias	318,9	395,0	492,3	784,0	878,0	1079,0	1000,6	719,4	1088,1	1252,3	1042,5	1052,0	1055,6	1033,0	940,6	996,7
± s	96,9	93,0	149,6	414,3	459,3	385,0	258,0	185,8	273,3	493,3	335,0	360,7	374,6	338,6	283,7	392,1

Tabela VIIIa

Respostas do LH Sérico à Infusão Crônica + Aguda do F.L.G. na Fase Lútea do Ciclo Menstrual

Tempo Paciente	LH (ng/ml)															
	-15'	0'	60'	120'	180'	240'	360'	480'	485'	490'	495'	500'	510'	520'	530'	540'
L.G.A.	27	27	170	290	—	460	190	200	168	250	280	400	314	342	280	192
N.A.S.	35	38	170	876	714	938	690	365	384	570	618	594	504	526	422	306
M.P.S.	36	23	158	236	390	467	448	436	466	620	704	696	410	467	448	429
M.J.S.	32	40	148	560	908	1056	956	592	692	568	556	668	548	484	572	568
M.I.A.	27	23	49	453	491	387	299	620	1056	968	1156	968	772	772	620	284
T.Z.V.	18	28	167	641	790	727	812	475	597	812	784	663	641	458	424	375
J.C.C.	27	25	51	334	547	489	334	281	418	547	—	518	432	320	320	272
Médias	28,0	29,1	130,6	501,4	640,0	646,3	532,7	424,1	540,1	619,3	677,0	643,9	517,3	481,3	438,0	346,4
± s	6,2	7,0	55,6	237,1	196,6	264,0	288,9	154,6	281,6	225,6	286,7	176,3	153,5	148,7	127,3	123,7

Tabela VIIIb

Respostas do FSH Sérico à Infusão Crônica + Aguda do F.L.G. na Fase Lútea do Ciclo Menstrual

Tempo	F S H (ng/ml)															
	-15'	0'	60'	120'	180'	240'	360'	480'	485'	490'	495'	500'	510'	520'	530'	540'
Pacientes																
L.G.A.	239	239	431	477	498	754	589	442	709	695	610	723	982	842	842	842
N.A.S.	260	270	723	861	—	932	1052	491	695	614	596	579	526	491	579	491
M.P.S.	375	419	965	1245	1473	1403	1403	828	1300	1403	1789	1473	840	813	777	603
M.J.S.	358	388	758	1087	1316	1123	947	667	912	912	983	1017	842	807	737	667
M.I.A.	263	370	288	386	530	842	912	530	754	982	1052	877	909	930	807	561
T.Z.V.	246	246	561	1056	1340	1298	1340	932	1130	1340	1256	1298	1256	1298	1172	—
J.C.C.	210	263	263	281	456	667	596	281	526	624	596	631	526	509	526	456
Médias	277,3	299,0	569,9	770,4	935,5	1002,7	977,0	595,9	860,9	938,6	983,1	942,6	640,1	812,9	777,1	603,3
± s	63,2	72,3	260,8	384,8	486,4	279,1	321,4	227,3	271,4	327,4	441,1	340,3	266,6	272,6	210,1	139,4

Tabela IX

Avaliação da Resposta do LH Sérico à Infusão Aguda de F.L.G. nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minuto <sup>-1</sup> )					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
G.F.	57,5	180	40	122,5	213	2147,5	30	692	30	662	2207	11645
L.G.A.	27,5	106	30	78,5	285	1420	37,5	560	20	522,5	1393	13025
N.A.S.	54	180	25	126	233	2820	54	710	30	656	1215	12955
M.P.S.	37,5	123	25	85,5	228	2495	39	642	30	603	1546	13732,5
M.J.S.	15	70	30	55	367	817,5	34	213	25	179	526	3957,5
M.I.A.	23	46	40	23	100	597,5	17	133	30	116	682	3120
T.Z.V.	27,5	75	30	47,5	173	1112,5	14	116	25	102	729	2522,5
J.C.C.	39	181	20	142	364	2930	46,5	334	15	287,5	618	7152,5
Média	35,1	120,1	30,0	85,0	245,4	1792,5	34,0	425,0	25,6	391,0	1114,5	8513,8
$\pm s$	14,9	54,9	7,1	42,3	91,3	921,9	13,6	264,1	5,6	245,2	585,0	4850,9

Tabela X

Avaliação da Resposta do FSH Sérico à Infusão Aguda de F.L.G. nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x $\text{min}^{-1}$ )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x $\text{min}^{-1}$ )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
G.F.	222,5	386	15	163,5	73	3890	242,5	656	60	413,5	171	1715
L.G.A.	265	533	40	268	101	4497,5	371,5	888	25	516,5	139	6282,5
N.A.S.	420,5	589	30	168,5	40	2977,5	400	758	50	358	90	3135
M.P.S.	319	674	20	355	111	6782,5	477	702	50	225	47	5645
M.J.S.	349,5	442	20	92,5	26	1667,5	393	744	25	351	89	12402,5
M.I.A.	245	586	30	341	139	5130	347,5	737	25	389,5	112	9065
T.Z.V.	326	505	30	579	178	16117,5	319,5	842	20	522,5	164	11475
J.C.C.	333	386	25	53	16	2215	496,5	754	25	257,5	52	7072,5
Média	310,1	562,6	26,3	252,6	85,5	5284,7	380,9	760,1	35,0	379,2	108,0	7099,4
$\pm s$	63,9	172,7	7,9	171,4	57,2	4298,6	82,2	73,8	15,6	107,2	47,2	3753,5

Tabela XI

Avaliação da Resposta do LH Sérico à Infusão Crônica (0-480') do F.L.G. nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
L.G.A.	24,5	332	240	307,5	1255	41250	27	460	240	433	1604	78330
N.A.S.	38	750	180	712	1874	174150	36,5	938	240	910,5	2470	200190
M.P.S.	46,5	874	360	827,5	1780	165480	29,5	467	240	437,5	1483	78110
M.J.S.	37	892	240	855	2311	170130	36	1056	240	1020	2833	238110
M.L.A.	31	855	240	824	2685	138129	25	491	180	466	1864	99870
T.Z.V.	59,5	1000	240	940,5	1581	181860	23	812	360	789	3430	167610
J.C.C.	48,5	880	360	831,5	1714	190020	26	547	180	521	2004	130860
Médias	40,7	797,6	265,7	756,9	1881,9	151572,9	29,0	681,6	240,0	652,6	2241,1	141582,9
$\pm s$	11,7	217,9	68,0	209,1	467,0	51308,1	5,3	249,2	60,0	245,7	706,6	6267,9

Tabela XII

Avaliação da Resposta do FSH Sérico à Infusão Crônica (0-480') do F.L.G. nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
M.J.S.	236,5	688	240	451,5	191	83400	372	1316	180	944	254	278580
L.G.A.	400,0	1540	240	1140	285	263160	239	754	240	515	215	203150
N.A.S.	461,5	1263	240	801,5	174	89160	260	1052	360	792	305	96630
M.P.S.	405,0	1228	240	823	203	83340	397	1473	180	1076	271	213870
M.I.A.	309,0	775	360	466	151	43680	266,5	912	360	645,5	242	105360
T.Z.V.	394,5	1572	180	1177,5	298	238740	246	1340	360	1094	445	235620
J.C.C.	291,5	912	360	620,5	213	157260	236,5	667	240	430,5	182	85740
<b>Médias</b>	<b>356,9</b>	<b>1139,7</b>	<b>265,7</b>	<b>782,9</b>	<b>216,4</b>	<b>136962,9</b>	<b>288,1</b>	<b>1073,0</b>	<b>274,0</b>	<b>785,3</b>	<b>273,4</b>	<b>174150,0</b>
<b><math>\pm s</math></b>	<b>79,2</b>	<b>355,7</b>	<b>68,0</b>	<b>294,9</b>	<b>55,2</b>	<b>85075,9</b>	<b>67,1</b>	<b>312,0</b>	<b>84,0</b>	<b>265,7</b>	<b>85,2</b>	<b>77100,0</b>

Tabela XIII

Avaliação da Resposta do FSH Sérico à Infusão "Aguda-Pós-Crônica" do F.L.G. (490'-540') nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
M.J.S.	414	965	485	551	133	7065	667	1017	500	350	52	10E05
L.G.À.	800	1684	490	884	111	11750	442	982	510	540	122	8947,5
N.A.S.	908	1333	500	425	47	7252,5	491	695	485	204	42	4050
M.P.S.	842	1999	490	1157	137	16055	828	1789	495	961	116	10052,5
M.I.A.	635	782	490	147	23	4567,5	530	1052	495	522	98	18377,5
T.Z.V.	876	1572	510	696	79	13670	932	1340	490	408	44	8470
J.C.C.	561	937	500	376	67	8895	281	631	500	350	125	9945
Médias	719,4	1324,6	495,0	605,1	85,3	9894,3	595,9	1072,3	496,4	476,4	85,6	10046,8
$\pm s$	185,8	450,8	8,7	338,7	43,5	4083,1	227,3	394,6	8,0	242,1	38,1	4267,7

Tabela XIV

Avaliação da Resposta do LH Sérico à Infusão "Aguda-Pós-Crônica" do F.L.G. (480'-540') nas Duas Fases do Ciclo Menstrual

Paciente	FASE FOLICULAR						FASE LÚTEA					
	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	Basal (ng/ml)	PICO		Incremento máximo $\Delta$ (ng/ml)	Incremento Relativo ( $\Delta$ %)	Área (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)					Valor (ng/ml)	Tempo (minutos)			
L.G.A.	200	448	490	248	124	5850	200	400	500	200	100	5270
N.A.S.	511	750	510	239	47	12697,5	365	618	495	253	69	6172,5
M.P.S.	712	915	500	203	29	13147,5	436	704	495	268	62	7455
M.J.S.	687	780	490	93	14	10772,5	592	692	485	100	17	5150
M.I.A.	498	782	500	284	57	10495	620	1156	495	536	86	11350
T.Z.V.	841	933	500	92	11	6450	475	812	490	337	71	7815
J.C.C.	608	760	490	152	25	9482,5	281	547	490	266	95	11037,5
<b>Médias</b>	<b>576,7</b>	<b>764,0</b>	<b>497,1</b>	<b>187,3</b>	<b>43,9</b>	<b>9842,1</b>	<b>424,1</b>	<b>704,1</b>	<b>492,9</b>	<b>280,0</b>	<b>71,4</b>	<b>7750,0</b>
<b><math>\pm s</math></b>	<b>204,0</b>	<b>159,0</b>	<b>7,6</b>	<b>76,7</b>	<b>39,1</b>	<b>2826,8</b>	<b>154,6</b>	<b>238,3</b>	<b>4,9</b>	<b>134,6</b>	<b>27,8</b>	<b>2557,9</b>

Tabela XV

Comparação das Respostas do FSH Sérico às Infusões Agudas e Crônicas do F.L.G.

PROVA	BASAL (ng/ml)	PICO		INCREMENTO MÁXIMO $\Delta$ (ng/ml)	INCREMENTO RELATIVO ( $\Delta$ %)	ÁREA (ng/ml $\times$ min <sup>-1</sup> )
		VALOR (ng/ml)	TEMPO (min.)			
AGUDA (fase folicular vs. lútea) $t^p_{0,05} = 2,365$ (n = 8)	$t^* = 2,791$  S	3589  S	1,178  NS	2,347  NS*	1,197  NS	1,107  NS
CRÔNICA (fase folicular vs. lútea) $t^p_{0,05} = 2,447$ (n = 7)	$t^* = 3,258$  S	0,679  NS	0,208  NS	0,030  NS	2,539  S	1,000  NS
AGUDA-PÓS- CRÔNICA (fase folicular vs. lútea) $t^p_{0,05} = 2,447$ (n = 7)	$t^* = 2,322$  NS	1,178  NS	0,269  NS	0,679  NS	0,011  NS	0,032  NS
Aguda vs. Aguda- Pós-Crônica (fase folicular) $t_{0,05} = 2,160$ (n <sub>1</sub> = 8; n <sub>2</sub> = 7)	$t^* = 5,550$  S	4,210  S	2,614  S	2,489  S	0,008  NS	2,128  NS*
Aguda vs. Aguda- Pós-Crônica (fase lútea) $t_{0,05} = 2,160$ (n <sub>1</sub> = 8; n <sub>2</sub> = 7)	$t^* = 2,370$  S	2,062  NS	2,953  S	0,982  NS	1,017  NS	1,411  NS

$t^*$  = " $t$ " obtido;  $t^p$  = " $t$ " parado;  $t$  = " $t$ " não parado; S = diferença significativa; NS = diferença não significativa; NS\* = significância limítrofe.

Tabela XVI

Comparações das Respostas do LH Sérico às Infusões Agudas e Crônicas do F.L.G.

PROVA	BASAL (ng/ml)	PICO		INCREMENTO MÁXIMO $\Delta$ (ng/ml)	INCREMENTO RELATIVO ( $\Delta$ %)	ÁREA (ng/ml x min <sup>-1</sup> )
		VALOR (ng/ml)	TEMPO (min.)			
AGUDA (fase folicular vs. Kites) $t^p_{0,05} = 2,365$ (n = 8)	$t^* = 0,219$  NS	3,983  S	1,986  NS	3,951  S	4,043  S	4,437  S
CRÔNICA (fase folicular vs. Kites) $t^p_{0,05} = 2,447$ (n = 7)	$t^* = 2,180$  NS	1,148  NS	0,660  NS	1,065  NS	1,155  NS	0,468  NS
AGUDA-PÓS- CRÔNICA (fase folicular vs. Kites) $t^p_{0,05} = 2,447$ (n = 7)	$t^* = 2,2342$  NS	9,788  NS	1,441  NS	2,084  NS	2,273  NS	1,504  NS
Aguda vs. Aguda- Pós-Crônica (fase folicular) $t_{0,05} = 2,160$ (n <sub>1</sub> = 8; n <sub>2</sub> = 7)	$t^* = 7,008$  S	6,340  S	3,387  S	3,140  S	5,679  S	7,206  S
Aguda vs. Aguda- Pós-Crônica (fase Kites) $t_{0,05} = 2,160$ (n <sub>1</sub> = 8; n <sub>2</sub> = 7)	$t^* = 6,652$  S	2,195  S	4,705  S	1,105  NS	5,036  S	0,388  NS

Tabela XVII

Separação da Gonadotrofina Livre do Complexo  
Gonadotrofina-Anti-Gonadotrofina\*

Tubos	Concentração do PEG 4000 (g/100 ml)	Volume do PEG (ml)	% da radioatividade total ligada ao excesso de anti-soro
N**	5	0,5	2,0
B <sub>0</sub> ***	5	0,5	12,0
N	5	1,0	2,5
B <sub>0</sub>	5	1,0	13,0
N	5	2,0	2,5
B <sub>0</sub>	5	2,0	15,0
N	10	0,5	2,5
B <sub>0</sub>	10	0,5	18,0
N	10	1,0	2,5
B <sub>0</sub>	10	1,0	18,5
N	10	2,0	2,0
B <sub>0</sub>	10	2,0	19,0
N	16	0,5	5,0
B <sub>0</sub>	16	0,5	38,0
N	16	1,0	5,0
B <sub>0</sub>	16	1,0	45,0
N	16	2,0	5,0
B <sub>0</sub>	16	2,0	44,0
N	25	0,5	7,0
B <sub>0</sub>	25	0,5	41,0
N	25	1,0	7,5
B <sub>0</sub>	25	1,0	48,0
N	25	2,0	7,5
B <sub>0</sub>	25	2,0	45,0

\* volume de incubações do radioimunoensayo = 0,5 ml

\*\* contagens não específicas (LH-<sup>125</sup>I ligado ao PEG 4000)

\*\*\* contagens da fração de LH-<sup>125</sup>I ligada ao anti-LH, na ausência de LH frio (Ag-Ab pipetado pelo PEG 4000).

Tabela XVIII

Comparação das Áreas Secretrias de Gonadotrofinas Liberadas após as  
"Provas Agudas Isoladas" com as "Provas Agudas Pós-Crônicas

PROVAS (25 µg de F.L.G.)	ÁREA (ng/ml x min <sup>-1</sup> )	
	L H	F S H
Aguda isolada vs. Aguda pós-crônica "LÚTEA"	"Y" obtido = 0,388 NS*	"Y" obtido = 1,411 NS
Aguda isolada "LÚTEA" vs. Aguda pós-crônica "FOLICULAR"	"Y" obtido = 0,657 NS	"Y" obtido = 1,373 NS
Aguda isolada "FOLICULAR" vs. Aguda pós-crônica "LÚTEA"	"t" obtido = 5,839 S**	"t" obtido = 2,149 SL***
Aguda isolada vs. Aguda pós-crônica "FOLICULAR"	"Y" obtido = 7,206 S	"Y" obtido = 2,128 SL

Prova "t" não pareado - "Y" teórico = 2,160

\* NS = não significativo

\*\* S = significativo

\*\*\* SL = significância limiar.

O tempo de 5 minutos que foi o que induziu menor instabilidade molecular durante a incubação do radioimunoensaio. Por outro lado, diminuindo a quantidade de inibidor enzimático, ou seja, quando não interrompemos a reação por diluição, obtivemos curvas dose-resposta mais sensíveis, mas havendo perda de precisão, resultante da superiodação.

Quanto ao sistema usado para a purificação das gonadotrofinas radioiodadas, pudemos notar que a separação dos radio-hormônios indenes dos componentes danificados e  $^{125}\text{I}$  livre não reativo, em coluna de BioGel P-60, se revelou um bom método de purificação, pelo fato de apenas necessitarmos gonadotrofinas- $^{125}\text{I}$  imunorreativas sem a obrigatoriedade de completa conservação da integridade molecular, em virtude da técnica empregada na separação das formas livres e ligadas do radio-hormônio.

Para a técnica de separação do hormônio livre daquele ligado ao anti-soro específico, utilizamos o método de precipitação do complexo Ag-Ab, por meio da substância química (PEG 4000) ou por meio de produto biológico (antigama globulina de coelho preparada em carneiros). Nas amostras quantificadas por meio de leitura em curvas padrão de gonadotrofinas (Figura 7) notamos que os resultados foram aproximados para os valores baixos (basais) porém mais elevados para os valores altos, quando utilizamos o segundo anticorpo, em comparação com o PEG. De qualquer maneira, a utilização do PEG 4000 ou do segundo anticorpo, como método de separação das frações ligadas daquelas livres, não exige alta porcentagem de pureza do hormônio marcado, ao contrário das técnicas adsorptivas do hormônio livre não reativo<sup>(31)</sup>, em que há necessidade de que a fração não adsorvida se constitua em proporção predominante do complexo antígeno-anticorpo que não é discriminado do componente danificado. Assim sendo, está explicada a substituição da purificação do radio-hormônio no sistema duplo gel de amido e Sephadex<sup>(30)</sup>, por uma única, em coluna de BioGel P-60<sup>(29)</sup>; as frações obtidas a partir do pico de radioatividade (eluatos 3 a 5) mantêm a imunoreatividade adequada, frente ao anti-soro.

Após o preparo das gonadotrofinas- $^{125}\text{I}$  elas foram utilizadas no radioimunoensaio, e assim pudemos obter os valores de LH e FSH séricos, em oito mulheres normais, após estímulo com as duas doses do fator liberador (FLG)<sup>(46,47)</sup>.

Quanto à responsividade ao FLG (Figura 8) aceita-se, atualmente, ser a interação dos esteróides sexuais com o fator liberador das gonadotrofinas como determinantes da regulação da secreção de LH e FSH hipofisários<sup>(16,36,38,39,49)</sup>. As respostas ao FLG foram diferentes durante o ciclo menstrual, sendo maiores na fase lútea e menores na folicular. Esta diferença na resposta, supõe-se ser devida à ação dos esteróides gonadais circulantes sobre a hipófise. Com efeito, as concentrações médias de estradiol ( $\text{E}_2$ ) e progesterona estão por volta de 70 pg/ml e 0,50 pg/ml na metade da primeira fase e 112 pg/ml e 4,33 pg/ml na metade da segunda fase, respectivamente (dados não publicados). Assim, a resposta do LH sérico à infusão aguda do fator liberador das gonadotrofinas (25  $\mu\text{g}$ ) foi maior na fase lútea do ciclo menstrual, por todos os parâmetros estatísticos analisados. Embora os valores médios de FSH sérico fossem mais elevados também na fase lútea, as diferenças não foram estatisticamente significativas, nas duas fases do ciclo menstrual (Tabelas XV e XVI)<sup>(11)</sup>.

A maior responsividade ao FLG, na prova aguda, na metade da fase lútea, em comparação com a da fase folicular, relativamente às gonadotrofinas séricas, se deve provavelmente ao efeito modulador dos níveis mais elevados de progesterona na sensibilidade da pituitária ao fator liberador, na presença de estradiol em valores pouco maiores do que na fase folicular<sup>(26)</sup>. Uma outra explicação para a resposta hipofisária mais intensa ao FLG, não excluindo necessariamente a anterior, seria de que a secreção do fator liberador endógeno sendo muito baixa na fase lútea do ciclo normal (embora presente e contínua, sendo suficiente para promover a síntese gonadotrófica - Figura 8), dependente dos níveis de  $\text{E}_2$  e progesterona, haveria maior responsividade ao fator liberador exógeno<sup>(49)</sup>. O uso da dose de 25  $\mu\text{g}$ , pequena em relação à habitualmente empregada (100  $\mu\text{g}$ ), foi considerada por SCHALLY<sup>(16)</sup> como a mínima eficiente, com valor discriminativo e, nestas condições, demonstramos ser a resposta hipofisária ao FLG, nitidamente maior ao LH, em relação ao FSH (Tabelas IX e X), considerando-se apenas o incremento porcentual relativo, parâmetro usualmente empregado na literatura. Com efeito, BRENNER e

PAULSEN<sup>(8)</sup> demonstraram em infusões prolongadas de 0,2 µg/minuto por 4 horas, haver uma liberação evidente nos 15 minutos iniciais, de LH mas não de FSH, sugerindo estes autores que existiria um compartimento ("pool") de LH pré-formado que seria agudamente liberado pelo FLG, mas que tal compartimento não existiria para o FSH (Figura 6). Nossos dados com as infusões de 25 µg e 100 µg são compatíveis com as sugestões desses autores, sendo o LH sempre liberado mais facilmente. Além disso, VILCHEZ-MARTINES e colaboradores<sup>(45)</sup> mostraram, em ratos, que o pré-tratamento com Actinomicina D não bloqueava a liberação de gonadotrofinas à infusão aguda de FLG e apenas suprimia a secreção, após a primeira hora, na infusão prolongada (4 horas) do FLG. Tais dados são também compatíveis com a existência de um compartimento de liberação imediata de LH e também de FSH, pré-formados, e que a síntese "de novo" só é necessária na infusão prolongada. A discrepância entre os dados em seres humanos e os experimentos são provavelmente devidos à pequena dose de FLG empregada nos primeiros.

No caso das infusões prolongadas do fator liberador (0-480'), ao contrário das agudas isoladas, não houve diferenças significativas nas respostas hipofisárias das gonadotrofinas (Tabelas XV e XVI), quando se compararam as duas fases do ciclo menstrual, exceto para alguns parâmetros relativos ao FSH, porém não para a área secretória total. Tal situação seria de esperar na presença de estímulo secretório intenso e prolongado de FLG, mesmo com a influência moduladora dos esteróides ovarianos, diferente nas duas fases do ciclo, como já indicado.

Além disso, embora aparentemente a hipótese se tornasse "refratária" ou com "menor sensibilidade" ao estímulo do fator liberador, como sugerido pela ligeira queda da concentração das gonadotrofinas séricas entre 360 e 480 minutos, a superposição de uma sobrecarga aguda, ao término da infusão crônica, resultou numa elevação intensa dos níveis de gonadotrofinas, descrito em carneiros por SANFORD<sup>(35)</sup>, não foi previamente relatada em seres humanos. BREMNER<sup>(7)</sup> descreveu em homens, persistência de valores quase máximos em infusões de 14 horas. Entretanto, o conceito da refratariedade ou sensibilidade alterada, ao fim da infusão do FLG por 8 horas, não pode ser aceito, pois em quase todas as mulheres houve uma resposta evidente quando se fez uma sobrecarga aguda do FLG. A observação das Tabelas VII e VIII mostra que nas mulheres M.J.S. e M.I.A. na fase folicular, e L.G.A., na lútea, a queda dos níveis de LH na primeira amostra pós-sobrecarga aguda seria compatível à este conceito de refratariedade; no entanto, torna-se pouco provável quando observamos os níveis de FSH, que se elevaram, nas mesmas amostras, falando contra a hipótese de refratariedade ou hiposensibilidade, pelo menos global, não podendo ser afastada a eventualidade que os níveis de FSH elevados dependeriam primariamente da meia-vida mais prolongada desta gonadotrofina ( $t_{1/2} = 44$  minutos) em relação ao LH ( $t_{1/2} = 22$  minutos). A outra possibilidade, mais provável, seria um efeito de regulação retrógrada negativa ("feed back") na pituitária, exercida por níveis de  $E_2$  ou também da progesterona, atingidos durante o estímulo prolongado das gônadas.

Quanto às infusões agudas, pós-crônicas, não mostraram diferenças significativas entre as duas fases do ciclo menstrual em nenhuma das gonadotrofinas liberadas, compatível com a idéia de que após a infusão prolongada, a liberação aguda com dose de 25 µg se torna "máxima" ou constante para a dose de FLG, independente da fase do ciclo (influência dos esteróides gonadais), pois a liberação prolongada dos hormônios hipofisários exigiria uma contínua substituição (síntese) da forma de liberação aguda, mantendo este compartimento como que "saturado", em estado de equilíbrio dinâmico ("steady-state"). Na Tabela XVIII, notamos que a comparação das áreas secretórias de LH e FSH, nas provas aguda e aguda pós-crônica, mostrou que para o LH, as respostas secretórias são semelhantes nas duas provas da fase lútea, havendo uma diferença significativa entre a resposta aguda isolada da fase folicular e as provas agudas pós-crônicas nas duas fases. Quanto ao FSH, a comparação entre a prova aguda isolada na fase folicular e as provas agudas pós-crônicas, mostra também que a área secretória foi menor na primeira, porém com significância limiar. À idéia de que a resposta gonadotrófica à prova aguda pós-crônica já era "máxima" ou "constante", independente da fase do ciclo, se deve acrescentar o conceito de que a responsividade na fase lútea à sobrecarga aguda isolada induziria também resposta "máxima", pelo menos à dose empregada. Esta resposta, similar ao fator liberador após sobrecarga prolongada, estaria de acordo com a capacidade limitada do liberador exógeno em relação às gonadotrofinas, ou que o tamanho do compartimento de liberação aguda é que seria o fator limitante.

## 6 - CONCLUSÕES

- 1) As radioiodogonadotrofinas preparadas pelo método enzimático utilizando-se lactoperoxidase ativada com peróxido de hidrogênio, mostraram-se mais estáveis e com melhor imunorreatividade do que as obtidas pela oxidação com a Cloramina-T.
- 2) O método de separação do hormônio radioiodado livre daquela ligado ao anticorpo, utilizando o PEG 4000 apresentou sensibilidade e precisão semelhantes a anti-gama globulina de coelho (anticorpo duplo), simplificando-se a metodologia da separação.
- 3) A infusão de uma dose de 25 µg de FLG demonstrou que a resposta hipofisária de LH e FSH foi maior na segunda fase do ciclo menstrual, ao passo que a diferença desapareceu na infusão prolongada e na prova aguda pós-crônica.

## ABSTRACT

A method is described for the enzymatic radioiodination of human gonadotropins by a system consisting of lactoperoxidase, hydrogen peroxide and Na<sup>125</sup>I. A comparison with the Chloramine-T modified technique was done a satisfactory specific activity (100 µCi/µg) of the labeled hormone was obtained with the enzymatic iodination, with much greater immunoreactivity and stability than after Chloramine-T.

As aqueous polyethylene glycol causes precipitation of antibody-bound peptide hormones with radioactive iodine with little or no precipitation of free hormones, a method of separation was developed and applied to radioimmunoassay of gonadotropins, providing several advantages over the double-antibody precipitation method.

*Results are reported now for*  
 We have demonstrated that, in humans, the intravenous administration of synthetic LH-FSH/RH stimulates the pituitary release of both LH and FSH. The present communication reports our findings in normal women infused with an acute load of 25 µg of synthetic LH-FSH-RH and 8 hours infusion of 100 µg, during the mid-follicular and luteal phases. The greatest gonadotropin responsiveness to LH-FSH-RH are found in the luteal phase, during acute testing. However, no differences were noticed during chronic infusion as well as acute post-chronic, performed in both phases of the menstrual cycle. The possible modulating effects of steroidal secretion by the ovaries are discussed. *(Auto)*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, G. E. et alii. Simultaneous RIA plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 beta, during the menstrual cycle. *J. clin. Endocr. Metab.*, 34:312-8, 1972.
2. ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, 91:222-33, 1964.
3. AONO, T. et alii. A radioimmunoassay for human pituitary luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotrofin (HCG), using <sup>125</sup>I-LH. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 98:966-1001, 1967.
4. BAHL, O. P. et alii. Human chorionic gonadotropin-amino acid sequence of the alpha and beta subunits. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 48:416-22, 1972.
5. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. General methodology. In: YALOW, R. S., comp. *Methods of radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p.1-36.
6. BERSON, S. A. & YALOW, R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J. clin. Invest.*, 38:1996-2016, 1959.

7. BREMNER, W. J. & PAULSEN, C. A. Prolonged intravenous infusions of LH-releasing hormone into normal men. *Hormone Metab. Res.*, 9:13-6, 1977.
8. BREMNER, W. J. & PAULSEN, C. A. Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: evidence from constant administration of luteinizing hormone releasing hormone. *J. clin. Endocr. Metab.*, 39:811-5, 1974.
9. BRUNINGS, K. J. Preparation and properties of the iodohistidines. *J. Am. chem. Soc.*, 69:205-8, 1947.
10. BURR, I. M. et alii. Some critical factors in double antibody radioimmunoassay systems utilizing sheep-antirabbit precipitating sera for measurement of human serum LH, FSH and HCG. *J. clin. Endocr. Metab.*, 29:948-56, 1969.
11. CHRAMBACH, A. & RODBOARD, D. Polymerization of polyacrylamide gels: efficiency and reproductibility as a function of catalyst concentrations. *Science (New York)*, 7:663-703, 1972.
12. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G. D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays. *J. clin. Endocr. Metab.*, 33:732-8, 1971.
13. ELY, C. A. & TALBERG, T. A study of the immunochemical and biological properties of a follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, 74:314-24, 1964.
14. FAWCETT, D. M. & KIRKWOOD, S. Tyrosine iodinase. *J. biol. Chem.*, 209:249-56, 1954.
15. GREENWOOD, F. C. et alii. The preparation of <sup>131</sup>I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
16. GUAL, C. et alii. Effects of sex steroids on the pituitary responsiveness synthetic LH- and FSH-releasing hormone (LH-RH/FSH-RH) in women. In: EXCERPTA MEDICA, Amsterdam. *Hypothalamic hypophysiotrop hormones: proceedings of the conference held at Acapulco, Gro., Mexico, June 29 - July 1, 1972*. Amsterdam, 1972.
17. HELMKAMP, R. W. et alii. High specific activity iodination of gamma-globulin with iodine-131 monochloride. *Cancer Res.*, 20:1495-500, 1960.
18. HUGHES JR., W. L. & STRAESSLE, R. Preparation and properties of serum and plasma proteins: iodination of human serum albumin. *J. Am. chem. Soc.*, 72:452-57, 1950.
19. HUNTER, W. M. The preparation and assessment of iodinated antigens. In: KIRKHAM, K. E. & HUNTER, W. M., eds. *Radioimmunoassay methods*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971. p.3-23.
20. IZZO, J. L. et alii. Relationship between degree of iodination of insulin and its biological, electrophoretic, and immunochemical properties. *J. biol. Chem.*, 239:3749-54, 1964.
21. JOHNSON, A. et alii. The effect of iodination on antibody activity. *J. Immun.*, 84:213-20, 1960.
22. MARCHALONIS, J. J. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.*, 113:259-305, 1969.
23. MATSUO, H. et alii. Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid-phase method. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 45:822-7, 1971.
24. McFARLANE, A. S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature (London)*, 182(4627):53, 1958.

25. MILHAUD, G. et alii. Synthèse de la LH-RH et effect sélectif sur la libération de l'hormone luteotropique chez l'homme adulte. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci.*, D273:1858-61, 1971.
26. NILLIUS, S. J. & WIDE, L. Progesterone-induced augmentation of pituitary gonadotrofin responses to luteinizing hormone-releasing-hormone in oestrogen-pre-treated amenorrheic women. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 83:684-91, 1976.
27. NIXON, W. E. & CARGILLE, C. M. Binding of tracer FSH, LH, GH and TSH by anti-FSH sera prepared by several immunization regimens. *J. Lab. clin. Med.*, 78:949-56, 1971.
28. PINTO, H. *Padronização da técnica do radioimunoensaio para a dosagem do hormônio luteinizante no soro humano, pelo método do duplo anticorpo*. São Paulo, 1973. (Dissertação de Mestrado).
29. PINTO, H. et alii. Preparation of high-quality iodine-125 labelled pituitary human follicle-stimulating hormone (hFSH) for radioimmunoassay: comparison of enzymatic and chloramine-T iodination. *Clinica chim. Acta*, 76:25-34, 1977.
30. PINTO, H. et alii. Preparation of high-quality iodine-125 labelled pituitary luteinizing hormone for radioimmunoassay. *Clinica chim. Acta*, 60:125-35, 1975.
31. PINTO, H. et alii. *Preparo de radioinsulinas para radioimunoensaio: comparação entre o método clássico da cloramina-T e lactoperoxidase*. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, abr. 1977. (IEA-472).
32. RODBARD, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.*, 20:1255-70, 1974.
33. ROOS, P.; FEVOLD, H. R. & GEMZELL, C. A. Preparation of human growth hormone by gel filtration. *Biochim. biophys. Acta*, 74:525-31, 1963.
34. ROSA, V. et alii. Chemical and biological effects of iodination on human albumin. *Biochim. biophys. Acta*, 133:486-98, 1967.
35. SANFORD, M. et alii. The profile of LH and testosterone secretion in the ram. *Endocrinology*, 95:627-31, 1974.
36. SANTEN, R. J. & BARDIN, C. W. Episodic luteinizing hormone secretion in man. *J. clin. Invest.*, 52:2617-28, 1973.
37. SCHALLY, A. V. et alii. Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology and clinical studies. *Fert. Steril.*, 22:703-21, 1971.
38. SCHALLY, A. V. et alii. Hypothalamic regulatory hormones: at least nine substances from the hypothalamus control the secretion of pituitary hormones. *Science (New York)*, 179:341-50, 1973.
39. SCHALLY, A. V. et alii. *The hypothalamus and reproduction*. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 114:423-42, 1972.
40. SCHALLY, A. V. et alii. Isolation of the luteinizing and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalamic. *J. Biol. Chem.*, 246:7230-6, 1971.
41. SCHALLY, A. V. et alii. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) activity of some synthetic polypeptides. 1. Fragments shorter than decapeptide. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 49:366-76, 1972.

42. SCHNEIDER, B. et alii. Some considerations in the preparation of radioiodoinsulin for radioimmunoassay and receptor assay. *Diabetes*, 25:260-7, 1976.
43. SERIF, G. S. & KIRKWOOD, S. Enzyme systems concerned with the synthesis of monoiodotyrosine. *J. biol. Chem.*, 233:109-15, 1958.
44. THORELL, J. I. & JOHANSSON, B. G. Enzymatic iodination of polypeptides with  $^{125}\text{I}$  to high specific activity. *Biochim. biophys. Acta*, 251:363-9, 1971.
45. VILCHEZ-MARTINEZ, J. A. et alii. Effect of actinomycin D on the pituitary response to LH-RH. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 81:73-81, 1976.
46. WOLLESEN, F. et alii. LH and FSH responses to luteinizing releasing-hormone in normal fertile women. *Metabolism*, 25:1275-85, 1976.
47. WOLLESEN, F. et alii. LH and FSH responses to luteinizing releasing hormone in normal human adult males. *Metabolism*, 25:843-63, 1976.
48. YALOW, R. S. & BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. clin. Invest.*, 39:1157-75, 1960.
49. YEN, S. S. C. & TSAI, C. C. Acute gonadotropin release induced by exogenous estradiol during the mid-follicular phase of the menstrual cycle. *J. clin. Endocr. Metab.*, 34:298-305, 1972.



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

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