

TAKEKO SHIMIZU KIYAN

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO DE 17β -ESTRADIOL (E_2) PLASMÁTICO E SUA APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SECREÇÃO DE E_2 EM MULHERES NORMAIS, DURANTE O CICLO MENSTRUAL E APÓS A INFUSÃO DO FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (LH/FSH-RH)

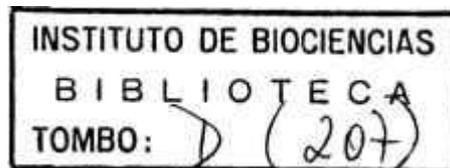
Tese apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título
de Doutor em Ciências,
(Área de Fisiologia).

SÃO PAULO
1979

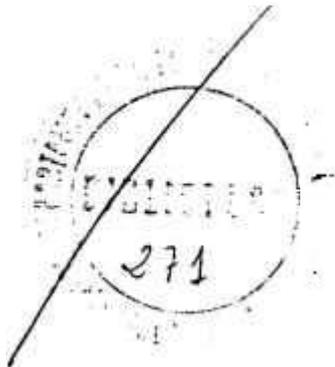
TAKEKO SHIMIZU KIYAN

24 084

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE RADIOIMUNOENSAIO DE 17β -ESTRADIOL (E_2) PLASMÁTICO E SUA APLICAÇÃO AO ESTUDO DA SECREÇÃO DE E_2 EM MULHERES NORMAIS, DURANTE O CICLO MENSTRUAL E APÓS A INFUSÃO DO FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (LH/FSH-RH)



Tese apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título
de Doutor em Ciências,
(Área de Fisiologia).



SÃO PAULO
1979

Tese elaborada no Centro de
Aplicações Biomédicas de Ra-
dioisótopos e Radiações do
Instituto de Pesquisas Ener-
géticas e Nucleares - São
Paulo.

Orientador: Dr. Bernardo Léo Wajchenberg

Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg, Orientador,

Ao Eng^o Hernani Augusto Lopes de Amorim, Superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN),

Ao Prof. Dr. Júlio Kieffer, Gerente do Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e Radiações (CABRR) do IPEN,

Ao Dr. Paolo Bartolini, Gerente do Projeto Medicina Nuclear "In Vitro" do CABRR do IPEN,

À Dra. Clara Bojarcjuk, Gerente do Projeto Medicina Nuclear "In Vivo" do CABRR do IPEN,

Ao Prof. Dr. José Moura Gonçalves, Gerente da Área de Radiobiologia do CABRR do IPEN,

Às Colegas: Ângela Macchione, Aisuko Kumagai Nakazone, Josefa Paredes Villalobos e Margô V.H. Rebelo dos Santos,

Nossos agradecimentos.

R E S U M O

Padronizou-se um método de radioimunoensaio para a dosagem de E₂ plasmático, sem purificação cromatográfica prévia.

O sôro anti-E₂ [-6(-0-carboximetil)-oxima]BSA empregado neste trabalho mostrou ser altamente específico e de alta afinidade, calculando-se por meio da projeção SCATCHARD as constantes de afinidade: K₁=1,62 x 10¹² l/mol e K₂=2,94 x 10¹¹ l/mol.

A sensibilidade da curva padrão foi de 2 picogramas. O método mostrou-se específico e exato, com a reprodutibilidade intra-ensaio apresentando um C.V. médio de 2,9% e inter-ensaio com o C.V. médio de 5,0%.

Com aplicação desta metodologia, foi estudado o ciclo menstrual de 6 mulheres normais, avaliando-se a secreção de E₂ e as mudanças dos níveis circulantes nos períodos folicular e lúteo. Os valores médios ± desvio padrão obtidos foram:

Dias: -14 a -10(fase folicular inicial)..64,68pg/ml±12,14
- 9 a - 1(fase folicular tardia)..122,39pg/ml±33,54
dia do pico281,28pg/ml±66,59
+ 1 a + 7(fase lútea inicial).....127,47pg/ml±24,88
+ 8 a +14(fase lútea tardia)..... 87,57pg/ml±37,56

Estudou-se também o efeito de LH/FSH-RH (hormônio hipotalâmico sintético de liberação das gonadotrofinas hi

pofisárias) em infusão aguda e prolongada (8 horas) na fase folicular e lútea. Na prova aguda não houve elevação significativa do valor médio de E_2 em nenhuma fase do ciclo. Na infusão prolongada entretanto, observou-se elevação dos níveis médios de E_2 , ao término do teste, nas 2 fases do ciclo e já na 4a. hora da fase lútea.

A B S T R A C T

A radioimmunoassay method for measurement of plasma E₂ was standardized utilizing a highly specific antisera against E₂ [-6(-0-carboximetyl)-oxime]BSA without the need of previous chromatographic purification.

The anti-E₂ serum was highly specific, showing high affinity with affinity constants: K₁=1.62x10¹² M⁻¹ and K₂=2.94x10¹¹ M⁻¹, calculated by SCATCHARD plot.

The standard curve sensitivity was 2 picograms. The method was specific and accurate, showing an intra-assay precision with a mean C.V. of 2.9%, with the inter-assay evaluation showing a mean C.V. of 5.0%.

This method was employed to evaluate E₂ secretion during the menstrual cycle in 6 normal females, as indicated below:

	<u>mean ± S.D.</u>
<u>Days:</u> -14 to -10(early follicular phase)	.64.68pg/ml±12.14
- 9 to - 1(late follicular phase)	.122.39pg/ml±33.54
Peak day281.28pg/ml±66.59
+ 1 to + 7(early luteal phase)....	.127.47pg/ml±24.88
+ 8 to +14(late luteal phase).....	.87.57pg/ml±37.56

The effect of the acute and prolonged infusion of LH/FSH-RH(synthetic hypothalamic LH and FSH releasing hormone) was evaluated in the follicular and luteal phase in some of the normal females.

In the acute test there was no significant increase in the mean E_2 level in both phases of the cycle. During the prolonged infusion an increase in the mean E_2 levels was observed at the end of the test, in the 2 phases of the cycle whereas already at the 4th hour during the luteal phase.

S U M Á R I O

	<u>pg.</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL	9
2.1- HORMÔNIOS	9
2.2- ANTISSORO	9
2.3- PREPARAÇÃO, CONSERVAÇÃO E USO DE SOLUÇÕES PARA O RADIOIMUNOENSAIO	9
2.3.1- Soluções Tampões	9
2.3.2- Suspensão de Carvão Ativado Neutro Reco- berto de Dextrana	10
2.3.3- Medida de Radioatividade	11
2.4- HORMÔNIO TRICIADO-PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM..	12
2.4.1- Cromatografia em Gel de Sephadex LH-20 ...	12
2.4.2- Controle de Pureza	12
2.4.3- Purificação do Hormônio Triciado	13
2.4.4- Determinação da Atividade Específica	13
2.4.5- Escolha da Diluição Ideal do Hormônio Marcado	13
2.5- CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO ANTISSO- RO	14
2.5.1- Título	14
2.5.2- Afinidade	14
2.5.3- Especificidade	15
2.6- PREPARO DAS AMOSTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO.	15
2.6.1- Coleta e Estocagem de Plasma	15
2.6.2- Material Biológico Analisado	16
2.6.2.1- Plasma de mulheres normais no decorrer do ciclo menstrual	16
2.6.2.2- Teste de infusão do hormônio liberador de gonadotrofinas (LH/FSH-RH)	16
2.6.2.3- Infusão prolongada de LH/FSH-RH	16
3. MÉTODOS	18
3.1- SEQUÊNCIA OPERACIONAL DO ENSAIO DE E ₂	18

	<u>pg.</u>
3.1.1-	Extração com Solvente Orgânico 18
3.1.2-	Representação Esquemática do Ensaio de E ₂ . 18
3.1.3-	Hormônio Padrão 18
3.1.4-	Misturas de Plasmas (Pools) 20
3.1.5-	Radioimunoensaio e a Separação da Fração Livre da Ligada 20
3.1.6-	Cálculo e Correção dos Resultados 23
3.2-	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MÉTODO 24
3.2.1-	Especificidade 25
3.2.2-	Sensibilidade da Curva Padrão 25
3.2.3-	Sensibilidade do Ensaio 25
3.2.4-	Exatidão 26
3.2.5-	Precisão 26
4.	RESULTADOS 28
4.1-	PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO RADIOATIVO 28
4.2-	CARACTERIZAÇÃO DO SORO ANTI-E ₂ 28
4.2.1-	Título 28
4.2.2-	Constante de Afinidade 28
4.2.3-	Reação Cruzada 33
4.3-	CURVA DOSE-RESPOSTA 33
4.3.1-	Sensibilidade da Curva Padrão 33
4.4-	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MÉTODO 40
4.4.1-	Especificidade 40
4.4.2-	Sensibilidade do Ensaio 45
4.4.3-	Exatidão 45
4.4.4-	Precisão 45
4.5-	APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AO ESTUDO DA SE- CREÇÃO DE E ₂ EM MULHERES NORMAIS, DURANTE O CICLO MENSTRUAL E APÓS A INFUSÃO DO FA- TOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS 49
4.5.1-	Ciclo Menstrual de Mulheres Normais 49
4.5.2-	Infusão de LH/FSH-RH 49
4.5.2.1-	Infusão aguda 53

	<u>pg.</u>
4.5.2.2- Infusão prolongada de LH/FSH-Rh.....	53
5. DISCUSSAO	59
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. I N T R O D U Ç Ã O E P R O P Ó S I T O

O 17 β -estradiol (E₂) é um estrógeno da série estrano(C₁₈), apresentando na sua estrutura o núcleo ciclopentano peridrofenantreno. É o principal hormônio produzido pelo ovário e, em pequena quantidade, pelo córtex da suprarrenal, placenta e pelo testículo⁽¹⁷⁾.

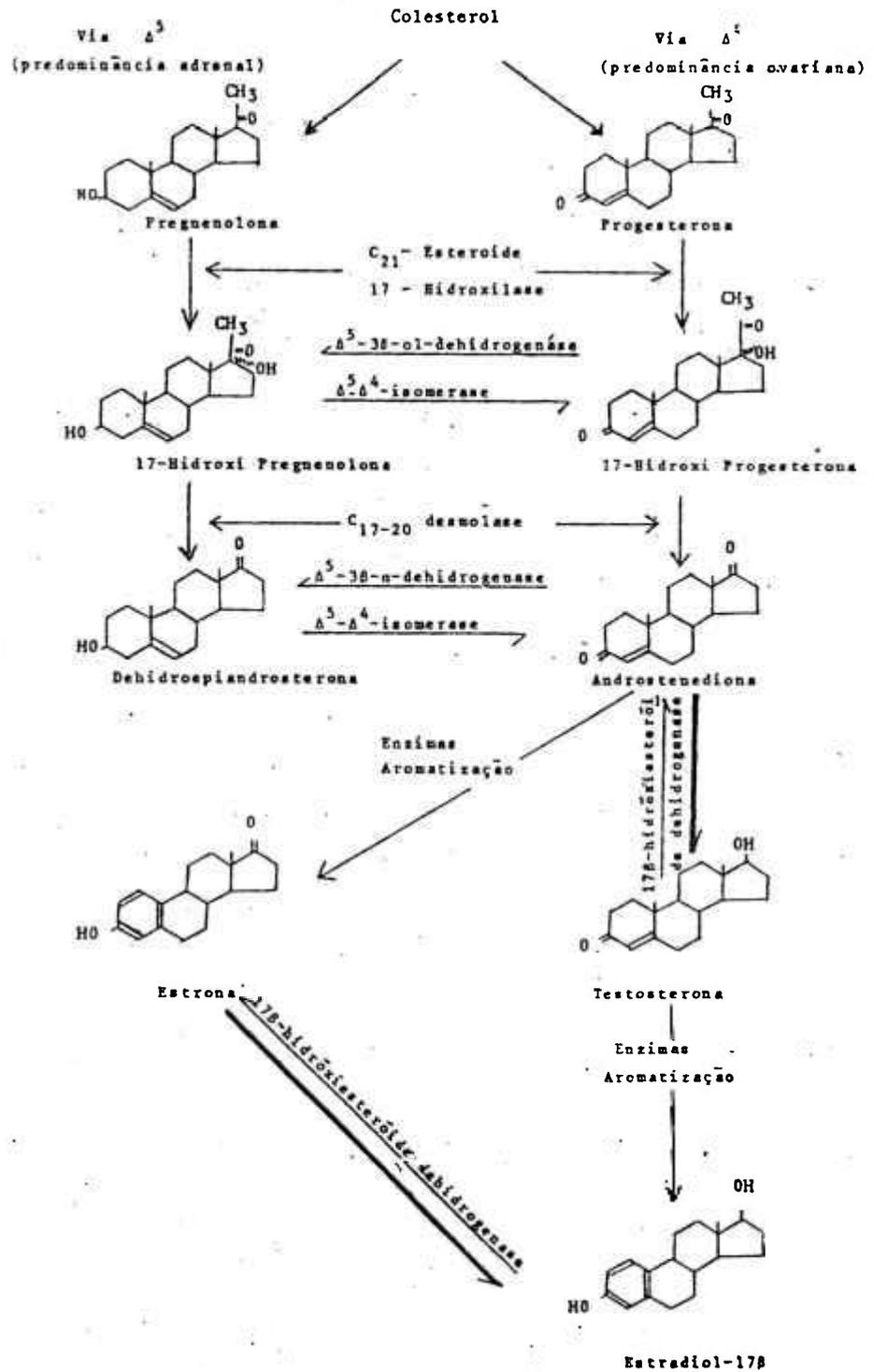
Os estrógenos são hormônios que agem fundamentalmente no desenvolvimento e maturação dos genitais femininos internos e externos e estimulam o crescimento mamário⁽³⁹⁾.

A síntese é realizada no ovário e nos demais órgãos mencionados a partir do colesterol via pregnenolona. No ovário, em função da concentração de enzimas, cofatores, substratos e outros fatores, são duas as vias para a produção de estrógenos: primeira via, Δ^5 , onde se mantém a configuração Δ^5 - 3 β -ol da pregnenolona e da dehidroepiandrosterona; a segunda via, Δ^4 , envolve a conversão inicial da pregnenolona a progesterona e androstenediona(Δ), segundo o Esquema 1⁽²⁾.

A via final para a biossíntese estrogênica se faz através da Δ , que dá origem a E₁ (estrona) e após a redução da Δ à testosterona, esta última vai formar o E₂. Por outro lado existe uma interconversão entre E₁ e E₂, predominante nos tecidos periféricos.

No córtex da suprarrenal, a síntese dos estrógenos é realizada na zona fasciculada⁽¹⁷⁾ com predominância de

ESQUEMA 1
Esquema da Biossíntese de 17 β -Estradiol⁽¹⁾



E_1 , enquanto que no ovário, são sintetizados pelas células da teca interna do folículo e pelo corpo amarelo⁽³⁹⁾, com predominância de E_2 .

Após a síntese, os estrógenos são lançados na circulação periférica, predominantemente transportada por uma beta-globulina específica. A fração livre, não conjugada, compreendendo 2 a 3% do total alcançam o tecido alvo para exercerem a sua função⁽²⁾.

O seu metabolismo é realizado, principalmente no fígado, por meio de conversão em estrógenos menos ativos (em estrona e em estriol)⁽²⁷⁾ ou por oxidação ou também conjugação com os ácidos glicurônico e sulfúrico. Estes produtos são excretados em parte pelo rim, e também nas fezes⁽¹⁷⁾.

Até recentemente, o estudo da secreção estrogênica era feito por meio de medida de metabólitos excretados pela urina, mas esta etapa dependia diretamente das funções renal e hepática, não se podendo avaliar a concentração plasmática disponível para os tecidos alvo. Para tanto de ver-se-ia fazer a medida de E_2 livre ou ligado a proteína no sangue. Porém, a concentração de E_2 no sangue é ínfima relativamente aos níveis urinários, da ordem de alguns picogramas por mililitro (pg/ml) e os métodos até então desenvolvidos para a medida quantitativa como cromatografia a gás, colorimetria e fluorimetria, careciam de sensibilidade, além da necessidade de volumes grandes de plasma e de uma purificação exaustiva antes da mensuração no fluido examinado⁽²⁾.

Nestes últimos anos, outros métodos físico-químicos foram desenvolvidos para medida de E_2 plasmático como téc

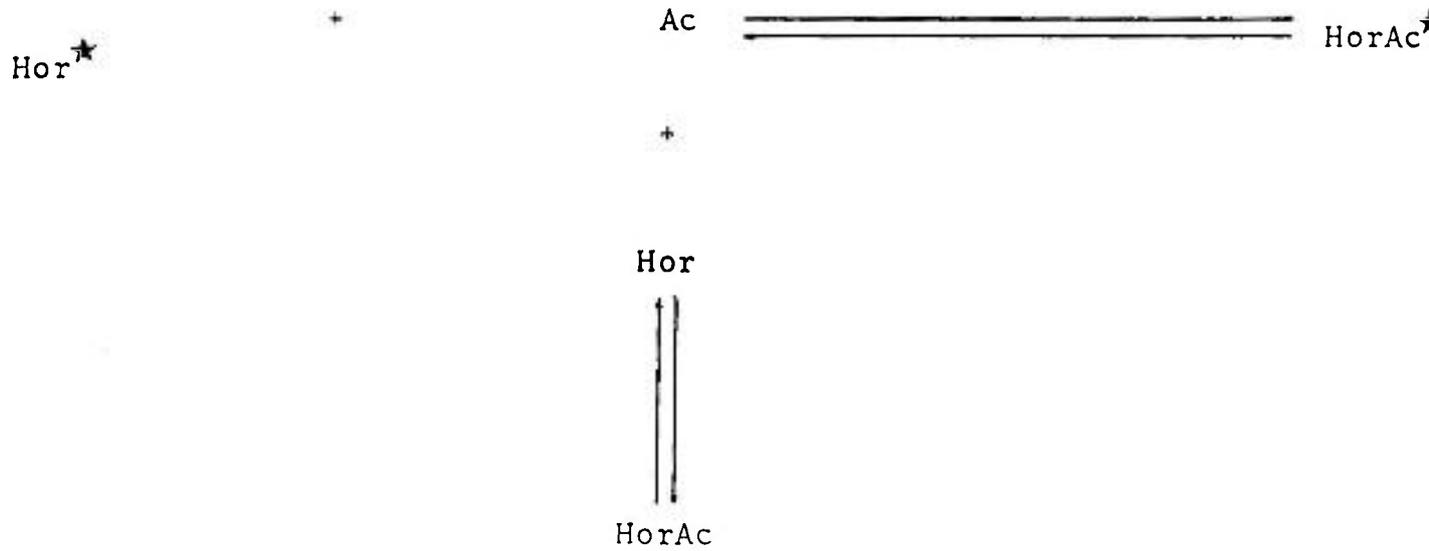
nicas de diluição por dupla marcação isotópica⁽⁵⁾ e competição à ligação pela proteína transportadora do plasma⁽⁹⁾, porém a sensibilidade era pequena além de se necessitar extração com solventes e purificação cromatográfica.

O desenvolvimento do radioimunoensaio por BERSON e YALOW no fim da década de 50, proporcionou um método sensível e preciso para a análise de esteróides no sangue, e segue o mesmo modelo descrito em 1959 para a medida de insulina plasmática⁽⁶⁾.

O princípio se baseia na reação de competição entre o antígeno marcado e não marcado para um anticorpo específico, formando um complexo antígeno-anticorpo⁽¹⁶⁾.

Pelo esquema podemos observar que o hormônio marcado reage com anticorpo específico, resultando na formação de complexo hormônio marcado-anticorpo. Se o hormônio não marcado (padrão ou desconhecido) é adicionado ao sistema, haverá uma competição com o hormônio marcado na união com uma quantidade fixa de anticorpo, passando a formar o complexo hormônio não marcado-anticorpo, reduzindo-se, consequentemente, a quantidade de anticorpo que poderia participar da formação do complexo marcado. Ou seja, a razão B/B_0 entre o hormônio marcado ligado ao anticorpo na presença do padrão ou do desconhecido (B) e o hormônio marcado ligado ao anticorpo na ausência do hormônio frio (B_0), cai progressivamente na proporção do aumento da concentração do hormônio não marcado no meio⁽¹⁶⁾. A concentração hormonal no plasma é determinada pela comparação do B/B_0 observado nas amostras, com aquele obtido com as soluções-padrões.

ERLANGER et alii demonstraram nos fins da década



Hor^{\star} = hormônio marcado

H = hormônio não marcado

Ac = anticorpo ao complexo derivado esteróide-proteína

HorAc^{\star} = complexo antígeno marcado-anticorpo

HorAc = complexo antígeno não marcado-anticorpo

de 50⁽¹²⁾ que era possível produzir anticorpos específicos contra esteróides, quando usados como haptenos, incorporando-os às proteínas, geralmente albumina sérica bovina (BSA) ou humana (HSA).

Os esteróides existentes possuem na sua estrutura radicais hidroxila ou cetona e como estes não apresentam reatividade com a proteína, tornou-se necessário sintetizar derivados para posterior ligação à proteína. Assim para o grupo cetônico utiliza-se o 0-(carboximetil)-hidroxilamina produzindo-se derivados oxima. Os derivados dos grupos hidroxila são obtidos mediante esterificação com anidrido succínico. A reatividade dos grupos hidroxila e cetona e de seus derivados depende da sua localização na molécula de esteróide⁽²⁹⁾. Os anticorpos mais específicos são obtidos quando as conjugações com os radicais introduzidos se situam na porção mais afastada de grupos funcionais⁽²⁹⁾. A constante de afinidade do anticorpo deve ser da ordem de 10^9 a 10^{10} l/mol, que é a constante de afinidade média, próxima da concentração dos esteróides nos fluidos biológicos⁽¹⁾.

Devido a um certo grau de especificidade dos anticorpos antiestrogênicos disponíveis, torna-se necessária uma purificação prévia através da extração com solventes orgânicos seletivos. Esse processo dependia do grau de especificidade do anticorpo empregado, da concentração dos esteróides interferentes presentes nos fluidos biológicos e da concentração de substâncias interferentes não-específicas^(1,29). Quando a especificidade do anticorpo é muito alta não ocorre a interferência dos esteróides competitivos, podendo-se realizar o radioimunoensaio sem extração e cromatografia⁽²⁰⁾.

Quando a quantidade de esteróides interferentes é muito grande, como acontece em algumas doenças endócrinas, há necessidade de purificação do extrato por métodos cromatográficos, como camada delgada, coluna de celite ou em gel de Sephadex LH-20^(11,41).

Os reagentes ou materiais usados durante a etapa de extração e purificação ("branco" dos solventes) podem também causar interferência demonstrável pelas curvas do se-resposta obtidas na ausência e na presença dos resíduos de solventes evaporados. Para prevenir esta situação de ve-se pois selecionar o anticorpo, escolher a partida do solvente e por fim preparar a curva de calibração na presença de resíduos secos de solventes⁽²⁹⁾.

Por fim, a separação entre fração do antígeno marcado livre e fração de antígeno marcado ligado ao anticorpo é feita com adsorventes seletivos, como o carvão ativado recoberto de dextrana, que adsorve o esteróide livre e deixa a fração ligada em solução. O complexo formado por esteróide-anticorpo é entretanto caracterizado pela constante de dissociação muito elevada, dependente da concentração do carvão(usado em geral na concentração de 10:1), da constante de afinidade do anticorpo, da polaridade dos esteróides, da temperatura de reação e do tempo de incubação com a suspensão de carvão.

Ensaíamos e padronizamos uma técnica de radioimunoensaio para dosagem de E₂ plasmático, controlando os vários fatores que poderiam influir na precisão e sensibilidade do ensaio. Para tanto foi mister caracterizar o antissoro através da determinação do título, afinidade e especificidade e realizamos uma avaliação do método considerando os seguintes parâmetros: especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão inter e intra-ensaio. Padroni

zada a técnica para a dosagem de E_2 plasmático, aplicamos o método para avaliar a concentração de E_2 durante ambas as fases de ciclos menstruais (folicular e lútea) de mulheres jovens, a fim de definir um padrão de secreção deste esteróide (4,5,7,15,22,37). Além disso, com o objetivo de verificar o funcionamento do eixo hipófise-ovário, mediu-se a concentração de E_2 sessenta minutos após a infusão de LH/FSH-RH (fator liberador das gonadotrofinas hipofisárias) na prova de infusão aguda e em dois tempos (240 e 480 minutos) na vigência da infusão contínua do mesmo hormônio liberador das gonadotrofinas (prova de infusão prolongada) (18,19,24,34,38,42,43).

2. M A T E R I A L

2.1- HORMÔNIOS

- Hormônios padrões: E₂(17β-estradiol); E₁ (estrona); E₃(estriol) e P(progesterona) foram adquiridos da Schwarz/Mann, Nova York, Estados Unidos da América.
- Hormônio LH/FSH-RH(gonadorelina) foi adquirido da Ayerst do Brasil.
- Hormônio radioativo 6,7-³H-E₂ foi adquirido da New England Nuclear, Mass., Estados Unidos da América, com atividade específica de 48 Ci/mM.

2.2- ANTISSORO

O soro anti-E₂[6(-0-carboximetil)-oxima]BSA foi obtido pela imunização em ovelhas, doado pela Dra. Judith Vaitukatis, do "National Institutes of Health", Mar., Estados Unidos da América.

2.3- PREPARAÇÃO, CONSERVAÇÃO E USO DE SOLUÇÕES PARA O RADIOIMUNOENSAIO

2.3.1- Soluções Tampões

- Tampão fosfato de sódio de estoque, 0,1M, pH=7,0 ±0,1
Fosfato monobásico de sódio,
monohidratado p.a. (NaH₂PO₄.H₂O-PM=137,99) 5,40 g

Fosfato dibásico de sódio, duodeca hidratado p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. - PM=358,14)	21,06 g
Azida sódica p.a. (Na_3N -PM=65,01)	1,0 g
Cloreto de sódio p.a. (NaCl -PM=58,44). ..	9,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml
Ajustado o pH a 7,0 \pm 0,1	
- <u>Tampão fosfato de sódio de ensaio, 0,1M, pH=7,0</u> <u>\pm0,1</u>	

Adicionou-se 0,1% de gelatina ao tampão fosfato de estoque, para aumentar a precisão do ensaio, diminuindo o efeito do "branco" e elevando a solubilidade de esteróides menos polares no tampão⁽¹⁾.

2.3.2- Suspensão de Carvão Ativado Neutro Recoberto de Dextrana

Carvão neutro	250 mg
Dextran T-70	25 mg
Tampão fosfato de sódio 0,1M, pH=7,0 \pm 0,1 com 0,1% de gelatina	100 ml

Antes do uso, esta suspensão é agitada durante 30 minutos em banho de gelo. Foi usado 1,0 ml desta suspensão para adsorver os esteróides livres. Durante o processo de pipetagem, a suspensão de carvão foi mantida sob agitação constante para homogenizá-la. Esta suspensão pode ser estocada a 4°C onde é estável durante um mês⁽²⁾.

2.3.3- Medida de Radioatividade

Para contagem das amostras de esteróide triciado, foi utilizado detector de cintilação β , Beckman modelo LS-150.

- Solução cintiladora de "estoque"

PP0	80 .g
d-metil POPOP	1,0g
Tolueno q.s.p.	1.000 ml

PP0 é um soluto primário com pico de fluorescência a 3.630 Å e d-metil POPOP, um soluto secundário, com pico de fluorescência a 4.180 Å. A utilidade do soluto secundário é de aproximar o pico de fluorescência do PP0 à faixa de sensibilidade da fotomultiplicadora que é de 4.000 a 4.500 Å.

- Solução A

Tolueno p.a.	666 ml
Triton X-100	333 ml

O Triton X-100 foi utilizado para dispersar as amostras triciadas aquosas na solução orgânica cintiladora^(8,36).

- Solução cintiladora de uso

100 ml da solução cintiladora de "estoque" foram diluídas em 900 ml de solução A e utilizou-se 10 ml desta solução para solubilizar 0,8 a 1,2 ml de amostras aquosas acidificadas com 0,1 ml de ácido clorídrico 2N.

d-metil POPOP=1,4-bis[2-(4-metil-5-feniloxazolil)]benzeno; PP0=(2,5-difeniloxazol); Triton X-100=produto de condensação do octil-fenoxi-poliétoxi-etanol.

2.4- HORMÔNIO TRICIADO - PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM

Utilizamos o hormônio triciado e como o trício apresenta meia vida relativamente longa (12 anos), a atividade específica do esteróide radioativo deveria permanecer praticamente inalterada. Porém, devida a autoradiólise⁽¹⁴⁾ durante o armazenamento, o hormônio radioativo foi purificado cada 6 meses, passando-o em colunas de gel Sephadex LH-20, como escrito abaixo.

2.4.1- Cromatografia em Gel de Sephadex LH-20

Foi preparada uma coluna de vidro, 1,0 cm x 20,0 cm, adaptando-se na base, uma placa de vidro poroso recoberto com disco de fibra de vidro Watman GF/A⁽¹¹⁾.

Foram entumecidos 2,0 gramas de Sephadex LH-20 em aproximadamente 5 ml da mistura de solventes benzeno:metanol (85:15), solvente I, durante uma noite e a seguir empacotados na coluna, Aplicou-se no topo do gel outro disco de fibra de vidro. A coluna assim preparada, foi lavada inicialmente com 100 ml de solução I, para eliminar as impurezas do gel, e a seguir com cerca de 100 ml do solvente de eluição isooctano: benzeno:metanol (62:20:18), solvente II. O fluxo foi controlado com o emprego do sifão que drena 1,5 ml⁽²⁸⁾.

2.4.2- Controle de Pureza

Aplicou-se no topo da coluna, 0,1 a 0,2 ml de $6,7\text{-}^3\text{H-E}_2$ com atividade da ordem de 2.000 cpm. A seguir, eluiu-se com solvente II até serem coletadas, em frasco para cintilação, 28 frações que foram levados até secura. Solubilizou-se o resíduo em 5 ml de solução cintiladora. De

terminou-se a atividade. O perfil cromatográfico foi obtido, tomando-se o número das frações na abcissa e as atividades expressas em cpm na ordenada, como representado na Figura 1. As frações correspondentes ao pico de maior atividade foram assim identificadas para fins de purificação.

2.4.3- Purificação do Hormônio Triciado

No topo da mesma coluna de Sephadex LH-20 aplicou-se 1,0 μ Ci do esteróide radioativo dissolvido em solvente de eluição (0,1 a 0,2 ml). Guiados pelo perfil cromatográfico, separaram-se em tubo de ensaio, as eluições correspondentes ao pico de maior atividade. Esta fração foi evaporada até secura e retomada em solução benzeno:etanol (9:1) e estocada a 4°C até o momento do uso (prazo de seis meses) ⁽¹⁾.

2.4.4- Determinação da Atividade Específica

A atividade específica do hormônio purificado foi determinada pelo método de auto-deslocamento, onde quantidades crescentes do hormônio marcado 6,7-³H-E₂ foram incubados com uma quantidade constante do anticorpo, nas mesmas condições do radioimunoensaio adiante descrito ⁽³³⁾ (Figura 2).

2.4.5- Escolha da Diluição Ideal do Hormônio Marcado

Após o controle da pureza e da determinação da atividade específica, preparou-se a solução do hormônio marcado, retirando uma alíquota do hormônio purificado dissolvido em benzeno:etanol e levando à secura em corrente de nitrogênio. Adicionou-se 5 ml da solução tampão fosfa

to de sódio com agitação contínua até dissolução completa, em banho a 40°C durante 4 horas.

A partir desta solução, foram realizadas duas diluições com os seguintes objetivos:

- 1) avaliação das perdas durante o ensaio. Foram empregadas 1.000 cpm em 0,1 ml de tampão.
- 2) uso no próprio radioensaio. Diluir de forma a obter 4.000 cpm em 0,1 ml de tampão. Esta atividade dá uma ligação de 50% na ausência do padrão de estradiol.

2.5- CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO ANTISSÔRO

2.5.1- Título

Os testes foram realizados em triplicata, incubando-se 4.000 cpm do traçador contidos em 0,1 ml com as seguintes diluições do antissôro: 1/10.000, 1/11.000, 1/12.000, 1/13.000, 1/14.000 e 1/15.000, perfazendo volume final de 0,4 ml, a 4°C durante 18 horas (Figura 3). A seguir, separaram-se as frações ligadas mercê de carvão ativado⁽¹⁾.

A diluição do antissôro que apresentou ligação em torno de 50% foi escolhida para o uso, como já é norma⁽¹⁾. No ensaio de estradiol, a diluição ótima resultou ser de 1/14.000 em 0,1 ml de tampão.

2.5.2- Afinidade

A constante de afinidade do antissôro foi calculada através da representação SCATCHARD⁽¹³⁾, relacionando a concentração do antígeno ligado ao antissôro(B) com a ra

ção entre o antígeno marcado ligado e o livre(B/F), obtendo uma curva composta (Figura 4), indicando heterogeneidade dos locais de fixação do antissoro. A curva, submetida a decomposição gráfica, demonstrou 2 classes de locais de afinidade (1 e 2). A linha 1 corresponderia aos locais de alta afinidade e a 2 aos de baixa afinidade.

2.5.3- Especificidade

A especificidade do antissoro foi determinada por meio do estudo das reações cruzadas⁽¹⁾. Projetou-se uma curva padrão de E₂ de massa de 0 a 500 picogramas e paralelamente curvas padrões de esteróides de configuração muito próxima do E₂ como o E₁ e E₃, de massa de 0,5 a 100 nanogramas, empregando o soro anti-E₂ [-6(-0-carboximetil)-oxima]BSA e o antígeno triciado de 4.000 cpm em 0,1 ml de tampão (Tabela 1, Figura 5).

Admitindo que o antissoro submetido a exame é produzido contra esteróide A e o que se deseja avaliar são as porcentagens de reação cruzada com esteróide B, estas porcentagens de reação cruzada são definidas pela relação⁽²⁾.

$$\% \text{ reação cruzada} = \frac{\text{dose de A necessária p/deslocar 50\% de A}^3\text{H}}{\text{dose de B necessária p/deslocar 50\% de A}^3\text{H}} \times 100$$

2.6- PREPARO DAS AMOSTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO

2.6.1- Coleta e Estocagem de Plasma*

Cada coleta de sangue no tempo aprazado foi efe

* Os plasmas foram cedidos pela 1a. Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

tuada com seringa heparinizada, colhendo-se cerca de 10ml por amostra. Separou-se a seguir, por centrifugação, o plasma que foi estocado em congelador a -20°C até o momento do uso, por período nunca superior a 2 anos⁽¹⁾. O material foi descongelado somente por ocasião do ensaio, a fim de evitar a hidrólise do esteróide.

2.6.2- Material Biológico Analisado

2.6.2.1- Plasma de mulheres normais no decorrer do ciclo menstrual

Colheram-se de 11 a 17 amostras de sangue distribuídas ao redor da data correspondente ao dia possível da ovulação, de seis voluntárias híginas com idades entre 20 a 31 anos. Os ciclos menstruais, todos com características normais, variaram entre 25 a 33 dias. As coletas foram feitas em jejum de véspera.

2.6.2.2- Teste de infusão do hormônio liberador de gonadotrofinas (LH/FSH-RH)

Utilizaram-se 6 voluntárias normais com idades entre 21 a 36 anos. Após o cateterismo e manutenção da veia anticubital, realizado pelo menos uma hora antes do início da prova, colheram-se amostras de sangue nos tempos zero, e 60 minutos após a administração endoflébica de 25 μg do fator liberador de gonadotrofinas. O teste foi realizado na metade da fase folicular nos 6 casos e nas 4 das voluntárias que compareceram também na metade da fase lútea, permitindo assim, parear as coletas.

2.6.2.3- Infusão prolongada de LH/FSH-RH

Foram estudadas mulheres normais, voluntárias,

com idade variando de 20 a 36 anos e períodos menstruais de 25 a 35 dias, em número de sete para a metade da fase folicular e cinco para a metade da lútea. Após o cateterismo e manutenção de veia antecubital, infundiram-se 100 μ g de LH/FSH-RH diluídos em 1.000 ml de solução fisiológica, durante um intervalo de 8 horas, com velocidade constante de 0,21 μ g/min. Do braço contra-lateral colheram-se amostras de sangue nos tempos zero, 240 e 480 minutos.

3. MÉTODOS

3.1- SEQUÊNCIA OPERACIONAL DO ENSAIO DE E₂

3.1.1- Extração com Solvente Orgânico

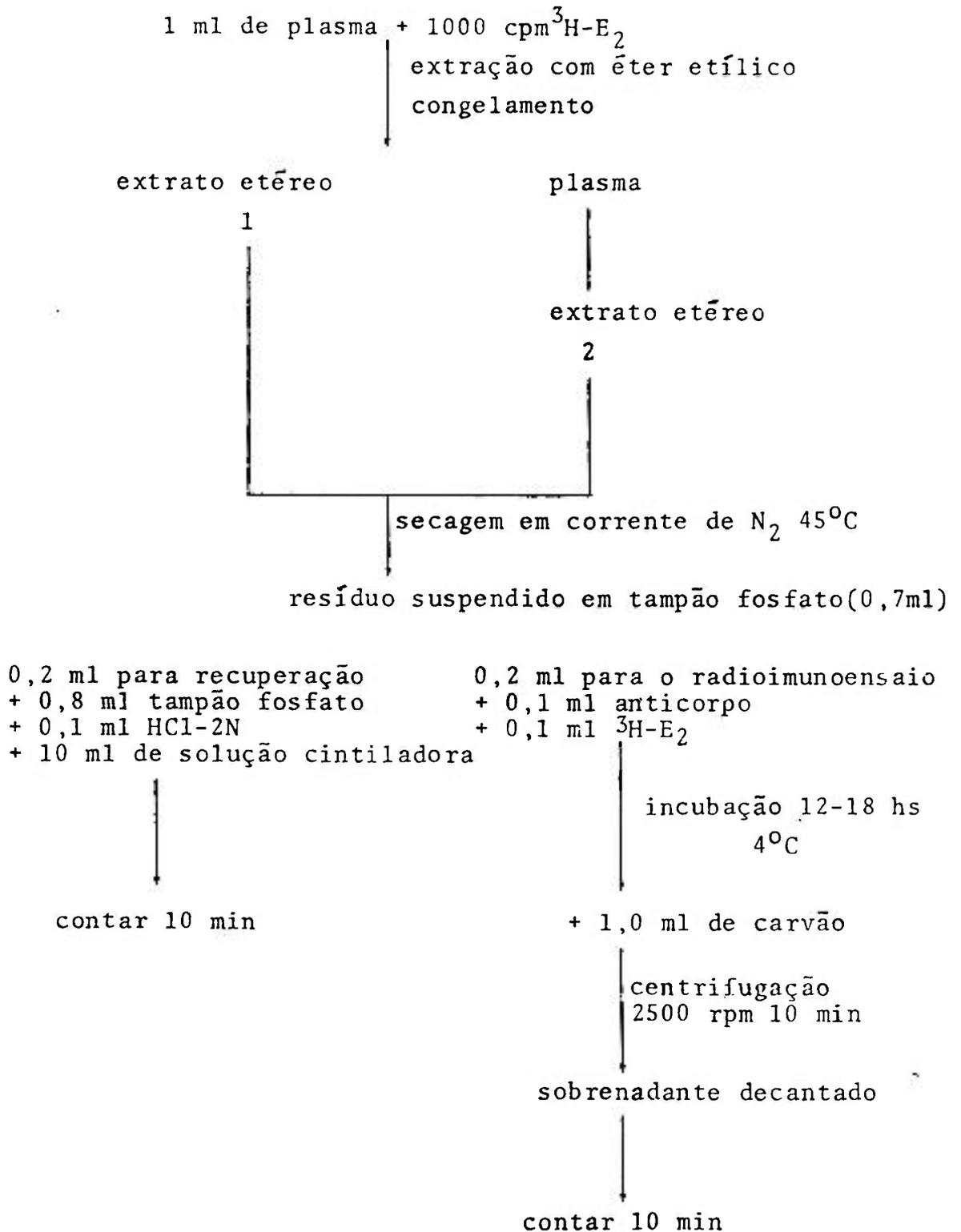
Para a extração do E₂ plasmático, empregou-se como solvente o éter etílico p.a.. Adicionaram-se a 1,0 ml de plasma, 1.000 cpm de 6,7-³H-E₂ num tubo de ensaio cônico, com rólha esmerilhada. Após a mistura, deixou-se em equilíbrio a 4°C por uma noite e a seguir extraiu-se o plasma, inicialmente com 5,0 ml de éter etílico agitando durante dois minutos no "Vortex". Os tubos foram levados ao congelador durante 60 minutos para que ocorresse o congelamento da fase plasmática, sendo a fase orgânica separada num tubo de ensaio. A seguir, foram adicionados 5,0 ml de éter etílico ao tubo de ensaio com plasma, já extraído, agitando no "Vortex" por um minuto. O tubo foi levado ao congelador e a fase etérea decantada e reunida à da primeira extração. O tubo com as fases etéreas foi levado à secura em corrente de nitrogênio, em banho a 45°C. Ao resíduo adicionaram-se 0,7 ml de tampão fosfato de sódio, agitando-se lentamente durante 4 horas a 45°C, até completa dissolução do resíduo no tampão. Após esta etapa, os tubos foram guardados a 4°C até o momento do uso.

3.1.2- Representação Esquemática do Ensaio de E₂

3.1.3- Hormônio Padrão

Foram dissolvidos 10 mg de E₂ em 10 ml de etanol absoluto. Prepararou-se a partir desta, uma solução inter

3.1.2- Representação Esquemática do Ensaio de E₂



mediãria de "estoque" de 10 ng/0,1 ml de tampão fosfato de sódio. Desta solução foram preparadas diluições usadas para o preparo da curva dose-resposta (Tabela 2).

3.1.4- Misturas de Plasmas (Pools)

Com o objetivo de introduzir elementos de controle analítico, prepararam-se misturas de plasmas com teores baixos, altos e médios de E_2 . Para os plasmas de concentração baixa, misturaram-se múltiplos plasmas de indivíduos do sexo masculino e de mulheres pós-menopáusicas. Para os plasmas de alto teor, misturaram-se amostras de plasmas obtidas de mulheres jovens na fase média do ciclo menstrual. A mistura de valor médio foi obtido reunindo quantitativamente ambas as misturas anteriores.

3.1.5- Radioimunoensaio e a Separação da Fração Livre da Ligada

O protocolo do radioimunoensaio está indicado na Tabela 3. Os extratos plasmáticos e os padrões foram pipetados em tubos de ensaio de 10 x 75 mm e a seguir adicionaram-se 0,1 ml do antissôro em todos os tubos, com a excessão de Tc e N e 0,1 ml do esteróide triciado de 4.000 cpm em todos os tubos. Agitou-se vigorosamente e deixou-se em incubação a 4°C durante 12 a 18 horas. Após este tempo, alcançado o equilíbrio da reação antígeno-anticorpo, adicionou-se em todos os tubos, com a excessão dos tubos Tc, 1,0 ml da suspensão de carvão recoberto com dextrana. Durante a pipetagem do carvão, para que a homogeneidade da suspensão fosse mantida, foi levada à agitação constante por meio de agitador eletromagnético, em banho de gelo. Após a adição do carvão, os tubos foram agitados em "Vortex" e deixados em contato durante 10 minutos. A se

TABELA 2

Diluição do padrão 17 β -estradiol para o uso em radioimunoensaio

Solução	Aliquota	Tampão	Concentração final
A	0,1ml sol.estoque (10ng/0,1ml)	0,9ml	1000pg/0,1ml
B	0,5ml A	0,5ml	500pg/0,1ml
C	0,5ml B	0,5ml	250pg/0,1ml
D	0,4ml C	0,6ml	100pg/0,1ml
E	0,75ml D	0,25ml	75pg/0,1ml
F	0,5ml D	0,5ml	50pg/0,1ml
G	0,5ml F	0,5ml	25pg/0,1ml
H	0,4ml G	0,6ml	10pg/0,1ml

TABELA 3

Protocolo do Radioimunoensaio de 17 β -estradiol

Tubos		Tampão	Padrão ou Amostras	Traçador ml	Antissoro ml	Carvão ml
1-2	Radioatividade total (Tc)	1,2	---	0,1	---	---
3-4	Controle do traçador (N)	0,2	---	0,1	---	1,0
5-6	Zero da curva(Bo)	0,2	---	0,1	0,1	1,0
7-8	Padrão G (10pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
9-10	Padrão F (25pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
11-12	Padrão E (50pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
13-14	Padrão D (75pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
15-16	Padrão C (100pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
17-18	Padrão B (250pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
19-20	Padrão A (500pg)	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
	Extratos plasmáticos	---	0,2	0,1	0,1	1,0
	Controle da sensibi- lidade(branco)*	---	0,2	0,1	0,1	1,0

* Para o controle da sensibilidade, foi usado no lugar do plasma, 1,0 ml de tampão-fosfato de sódio, seguindo-se o mesmo processo de extração e ensaio.

guir, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo a fração do hormônio ligado ao anticorpo foi transferido para um frasco de cintilação. O precipitado, contendo a fração do hormônio triciado livre, foi desprezado. Adicionaram-se a cada frasco de cintilação 10 ml da solução cintiladora e, após homogeneização, foi levado à contagem por 10 minutos ou até acúmulo de erro porcentual inferior a 5%.

3.1.6- Cálculo e Correção dos Resultados

Existem vários modelos teóricos estabelecidos para expressar a curva dose-resposta. Para a facilidade de manuseio, adotou-se a projeção da curva padrão em papel milimetrado (Figura 6). Os valores das contagens dos padrões ou das amostras (B) subtraídas das contagens não específicas (N), são relacionados com o valor médio da contagem no ponto zero (Bo), subtraído das não específicas⁽⁴¹⁾, segundo a fórmula abaixo.

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

N = contagem das ligações inespecíficas

B₀ = contagem por minuto do hormônio marcado ligado ao anticorpo, na ausência do hormônio padrão

B = contagem por minuto do sobrenadante de cada tubo (curva padrão e amostras)

A determinação da concentração das amostras foi realizada diretamente pela leitura na curva e através da fórmula:

$$\text{pg/ml} = \text{pg} \times \frac{\text{cpm } 100\%}{\text{cpm } 0,2 \text{ ml}} \times \text{fator de diluição}$$

- pg = picograma lido diretamente na curva padrão
- cpm 100% = contagem total adicionada ao plasma (recuperação)
- cpm 0,2 ml = contagem da recuperação em 0,2 ml do extrato plasmático.

3.2- ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MÉTODO

A avaliação da sequência operacional do ensaio de E_2 foi realizada através do estudo da especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão⁽³¹⁾.

3.2.1- Especificidade

A especificidade do ensaio foi demonstrada, estudando-se o efeito da diluição do plasma na determinação do esteróide endógeno. Volumes crescentes de plasma de teor elevado de E_2 foram pipetados e completados a 1,0 ml conforme indicado na Tabela 4. Calculou-se a média e o desvio padrão dos 4 resultados de cada diluição. O coeficiente de correlação e a equação da regressão linear foram também calculados (Figura 8).

Dosou-se E_2 plasmático submetido ou não à purificação cromatográfica em Sephadex LH-20, por radioensaio, empregando o antissoro altamente específico. Foram dosados E_2 de 10 indivíduos normais. Para o radioensaio de E_2 sem purificação cromatográfica, após a extração com éter etílico, empregou-se o soro anti- E_2 -6(-0-carboximetil)-oxima|BSA utilizado neste trabalho. A dosagem de E_2 com purificação cromatográfica⁽³²⁾ foi realizada empregando-se o gel de 2,0 gramas de Sephadex LH-20 e, como solvente de eluição, a mistura isoctano:benzeno:metanol

(62:20:18). Coletou-se a fração correspondente ao hormônio puro avaliada pelo perfil cromatográfico de E_2 triciado. Após a purificação, a fração correspondente ao hormônio puro foi levada à secar e adicionados 0,7 ml de tampão fosfato de sódio. Seguiu-se o mesmo processo de radioimunoensaio e a separação da fração ligada da livre, descrita anteriormente. Foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta de regressão linear.

3.2.2- Sensibilidade da Curva Padrão

Pelo método gráfico, calcularam-se a média de 8 determinações de B_0/T (relação entre a leitura do ponto zero da curva padrão e a contagem total) e o correspondente desvio padrão $(\bar{X} \pm s)$ ^(10,21). Subtraindo-se 2 desvios padrão da média \bar{X} , o valor obtido na curva-padrão correspondente, foi considerado como limite mínimo detectável, ou sensibilidade da curva-padrão, para $\alpha=0,05$ (Figura 10).

Pelo método discreto, a sensibilidade foi determinada através da análise em 5 determinações do ponto zero da curva padrão (B_0) e em 5 dos 4 primeiros pontos da curva correspondentes às menores massas de E_2 (0 a 10 pg). Calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. Os valores encontrados foram submetidos à análise de variância para o nível de significância de 5% (Tabela 6).

3.2.3- Sensibilidade do Ensaio

A sensibilidade do ensaio foi avaliada a partir dos valores do "branco" segundo a fórmula ⁽¹⁾:

$$S = \frac{2 \cdot s}{R.F.}$$

s = desvio padrão do "branco"
R = porcentagem de recuperação
F = fração do esteróide recuperado usado no ensaio.

Entretanto, como o valor do "branco" foi sistematicamente menor do que a sensibilidade da curva padrão, este não foi subtraído das leituras dos desconhecidos, antes de se corrigir pela recuperação.

3.2.4- Exatidão

A exatidão do ensaio foi testada por meio da recuperação do esteróide adicionado, em quantidades crescentes, ao plasma de baixo teor de E_2 endógeno. O estudo da recuperação para cada concentração foi realizado em quadruplicata. Determinou-se o coeficiente de correlação entre os valores teóricos e a média dos valores obtidos e a equação da reta de regressão linear (Figura 11, Tabela 7).

3.2.5- Precisão

A precisão do ensaio foi avaliada por meio de reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio.

A reprodutibilidade intra-ensaio foi avaliada por 10 determinações num mesmo ensaio, de três misturas de plasmas de indivíduos normais, com diferentes concentrações de E_2 (misturas de teor alto, médio e baixo). Calculou-se a média dos valores, o desvio-padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança para cada nível de concentração (Tabela 8).

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada por meio de 20 determinações de uma mistura de plasmas de va-

lor baixo e alto, cuja mensuração foi realizada em diferentes dias em um período de seis meses, usando o mesmo anticorpo e a mesma partida de 6,7-³H-E₂ purificado. Calcularam-se o valor médio, o desvio-padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança das 20 dosagens de cada concentração (Tabela 9).

4. R E S U L T A D O S

4.1- PURIFICAÇÃO DO HORMÔNIO RADIOATIVO

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico da separação de $6,7\text{-}^3\text{H-E}_2$ e $6,7\text{-}^3\text{H-E}_1$ em gel de Sephadex LH-20, onde se pode verificar que o E_1 sai nos efluentes de nº 6 a 13 e o E_2 de 14 a 18. Escolheu-se os nºs 15 a 17 onde a interferência do E_1 é praticamente nula. Após a purificação, determinou-se a atividade específica pelo método de auto-deslocamento⁽³³⁾, Figura 2. A atividade específica obtida foi em 4.000 cpm/15 pg, sendo que a fornecida pelo fabricante era de 4.000 cpm/22 pg.

4.2- CARACTERIZAÇÃO DO SÔRO ANTI-E₂

4.2.1- Título

A Figura 3 mostra o resultado dos testes de diluição do sôro anti- E_2 . A diluição ótima encontrada para uma ligação de 50%, em ausência de "massa fria", foi de 1/14.000 em 0,1 ml do antígeno marcado.

4.2.2- Constante de Afinidade

A constante de afinidade, calculada por meio da projeção Scatchard está representada na Figura 4. Obteve-se duas constantes de afinidade: $K_1=1,62 \times 10^{12}$ 1/mol e $K_2=2,94 \times 10^{11}$ 1/mol, demonstrando que o anticorpo possui 2 sítios diferentes de ligação. Verifica-se que uma linha corresponde ao sítio de ligação de alta afinidade

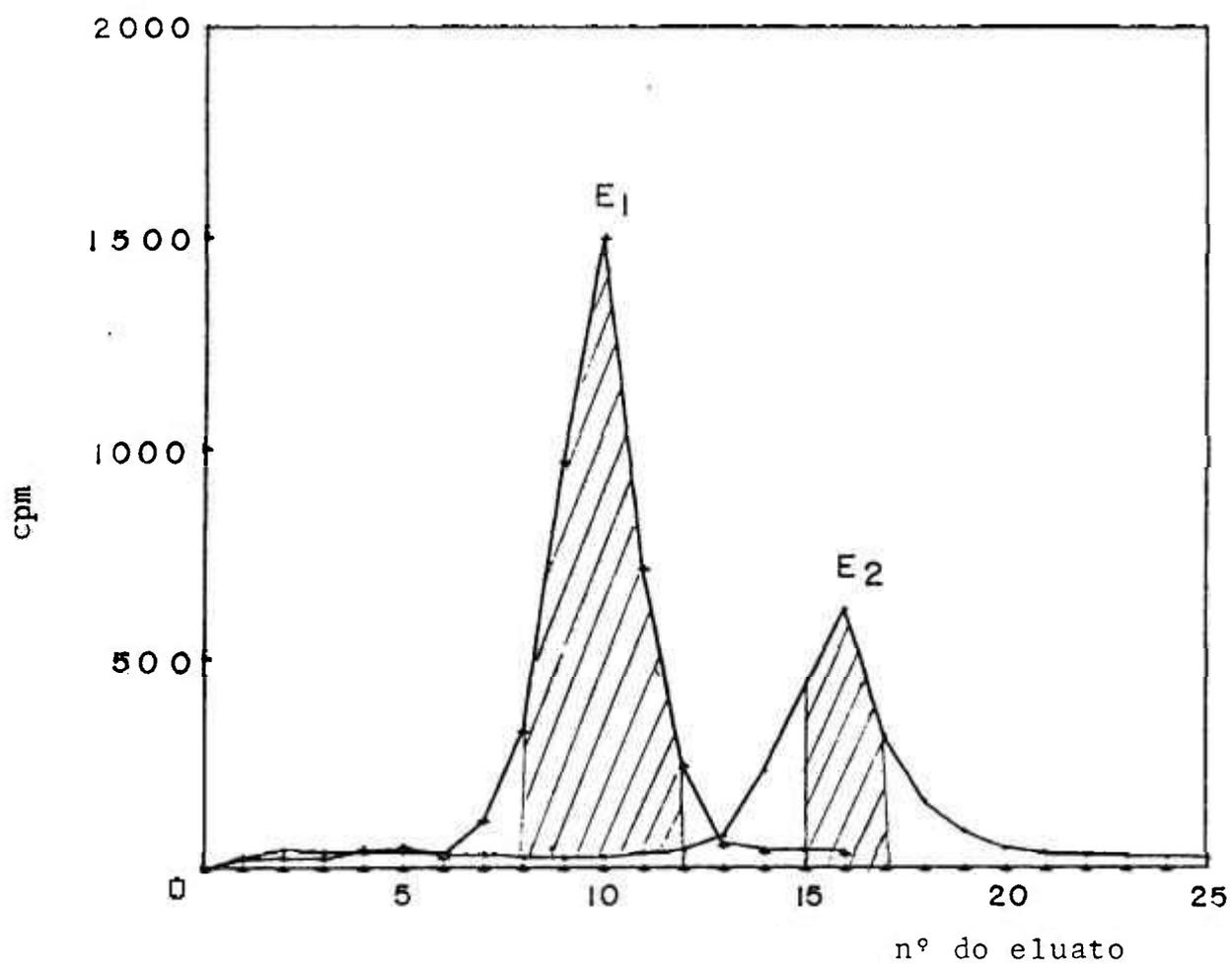


Figura 1- Cromatografia de E_1 e E_2 radioativos em gel de Sephadex LH-20
Solvente de eluição: isooctano:benzeno:metanol(62:20:18).
Volume de cada eluato = 1,5 ml.

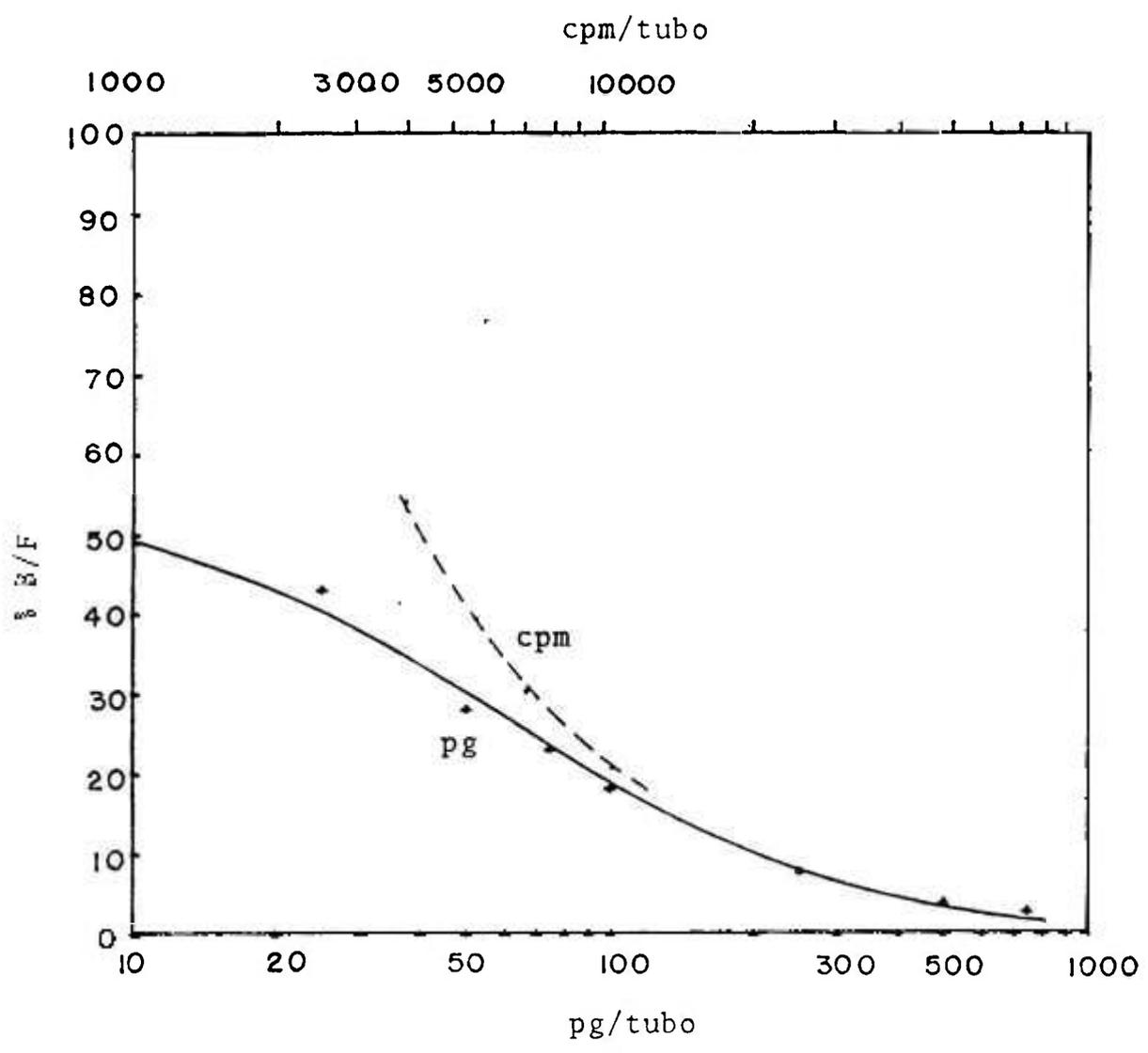


Figura 2- Determinação da atividade específica do 17 β -estradiol.
 X—X pg de E₂/tubo em função de % B/F.
 .-----cpm de E₂/tubo em função de % B/F.

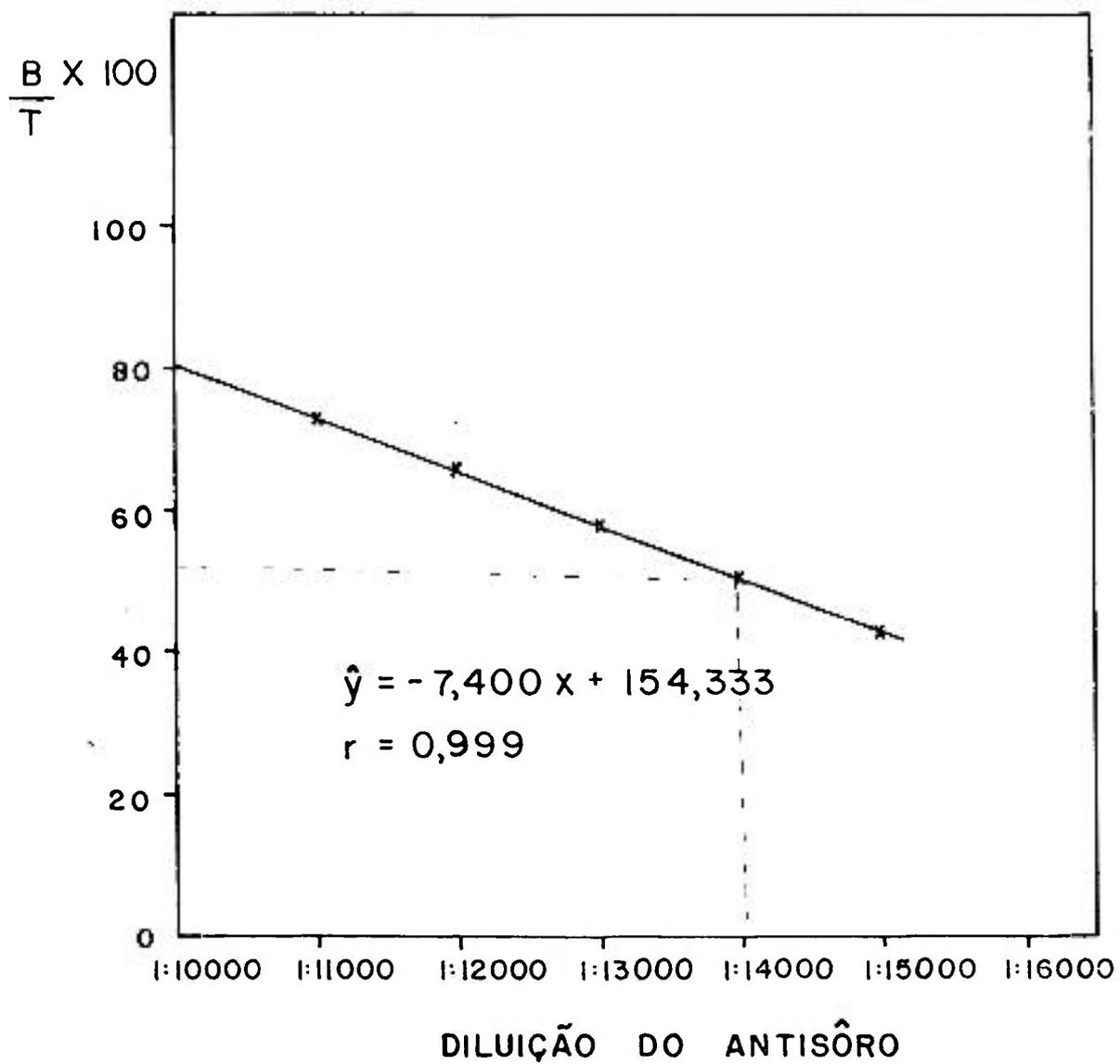


Figura 3- Determinação da diluição ótima do sêro-anti E_2 para uso no radioimunoensaio.

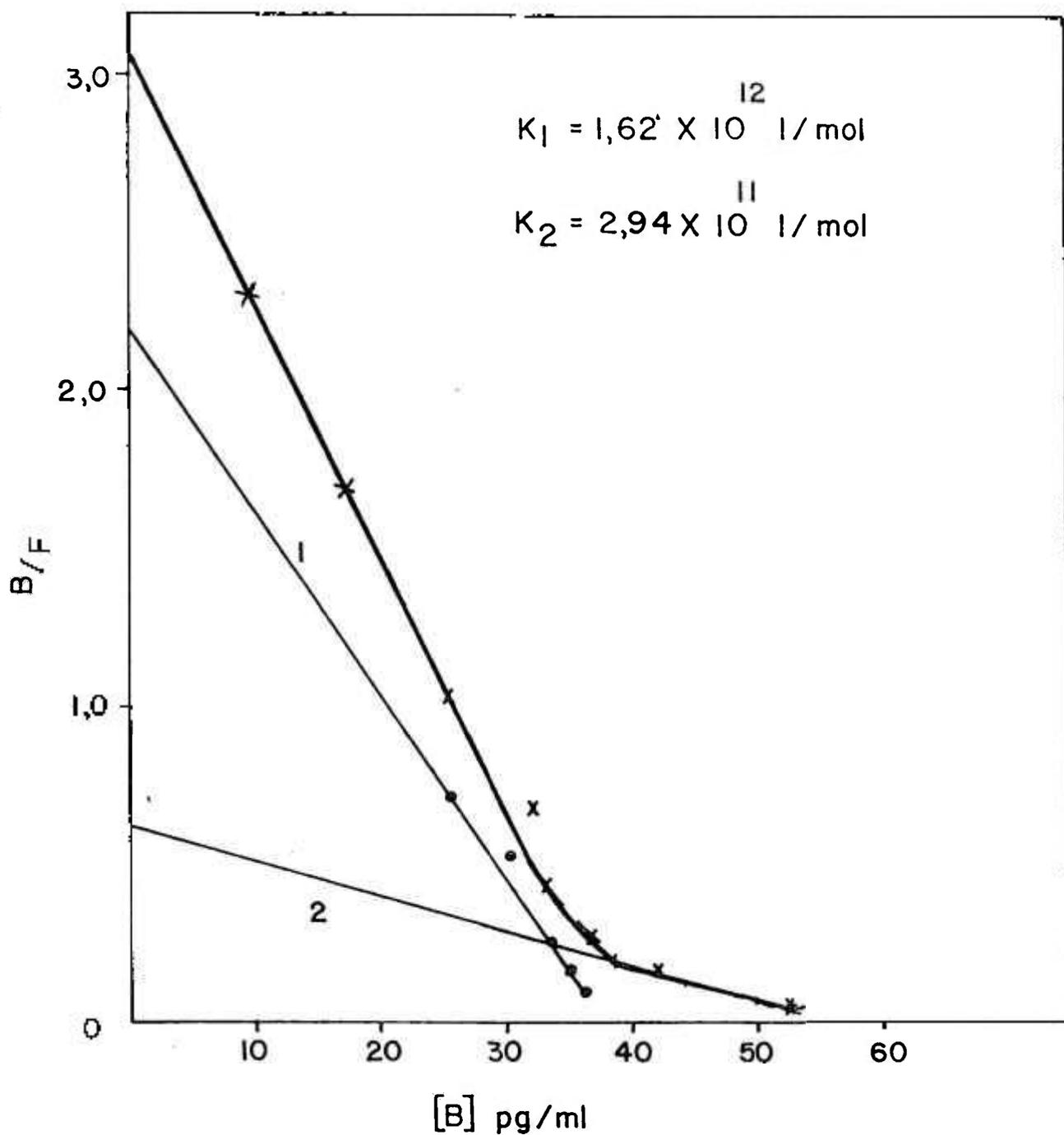


Figura 4- Determinação da constante de afinidade do anti-sêro contra o $17\beta\text{-E}_2\text{-6(-O-carboximetil)-oxima|BSA}$ com os 2 sítios de ligação (1 e 2).

com baixa capacidade, e a outra linha corresponde ao sítio de ligação com menor afinidade e maior capacidade de ligação.

4.2.3- Reação Cruzada

A Tabela 1 apresenta as porcentagens das reações cruzadas dos esteróides com configuração química semelhante ao E_2 a 50% de deslocamento (Figura 5). A reação cruzada foi de 3,2% para E_1 e mínima para E_3 e P.

4.3- CURVA DOSE-RESPOSTA

A Figura 6 reproduz uma curva típica de dose-resposta do padrão de E_2 , permitindo ler com segurança valores de 2 a 300 pg/tubo ou seja a curva padrão estabelecida é sensível e precisa, sendo útil para todo o intervalo normalmente usado para medida de E_2 nos plasmas, em condições normais e patológicas. A Figura 7 reproduz a mesma curva padrão na forma de logit (Y) versus $\ln(X)$.

4.3.1- Sensibilidade da Curva Padrão

A sensibilidade encontrada pelo método gráfico (Figura 10) foi de 2,0 picogramas.

A sensibilidade foi determinada também por método "discreto", por meio da análise de variância das médias dos pontos P_0 , P_1 , P_2 , P_3 e P_4 da curva padrão. Obtivemos o F calculado igual a 123,46 a nível de $\alpha=0,05$ e G.L.=1,20. O F crítico é igual a 2,87. Existe portanto diferença significativa entre as médias P_0 e as demais acima mencionadas. Para localizar as diferenças existentes, empregou-se o teste de Dunnett. O valor crítico tabelado para $\alpha=0,05$

TABELA 1

Porcentagem de reatividade cruzada medida a
50% de deslocamento de E₂-6,7 -³H

Esteróides	Reação cruzada a 50% de deslocamento
E ₂	100 %
E ₁	3,2%
E ₃	0,1%
p	0,01%

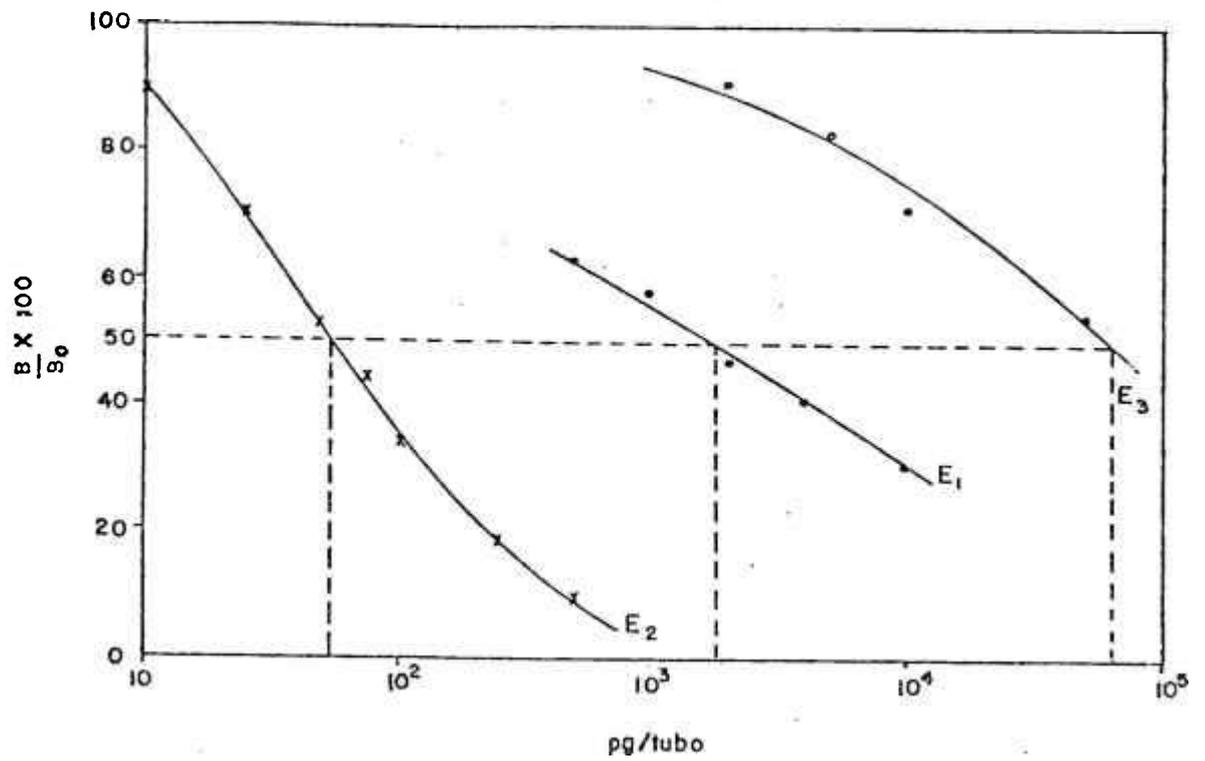


Figura 5- Determinação das reações cruzadas do anti-sôro contra o $17\beta\text{-E}_2|-6(-0\text{-carboximetil})\text{-oxima| BSA}$.

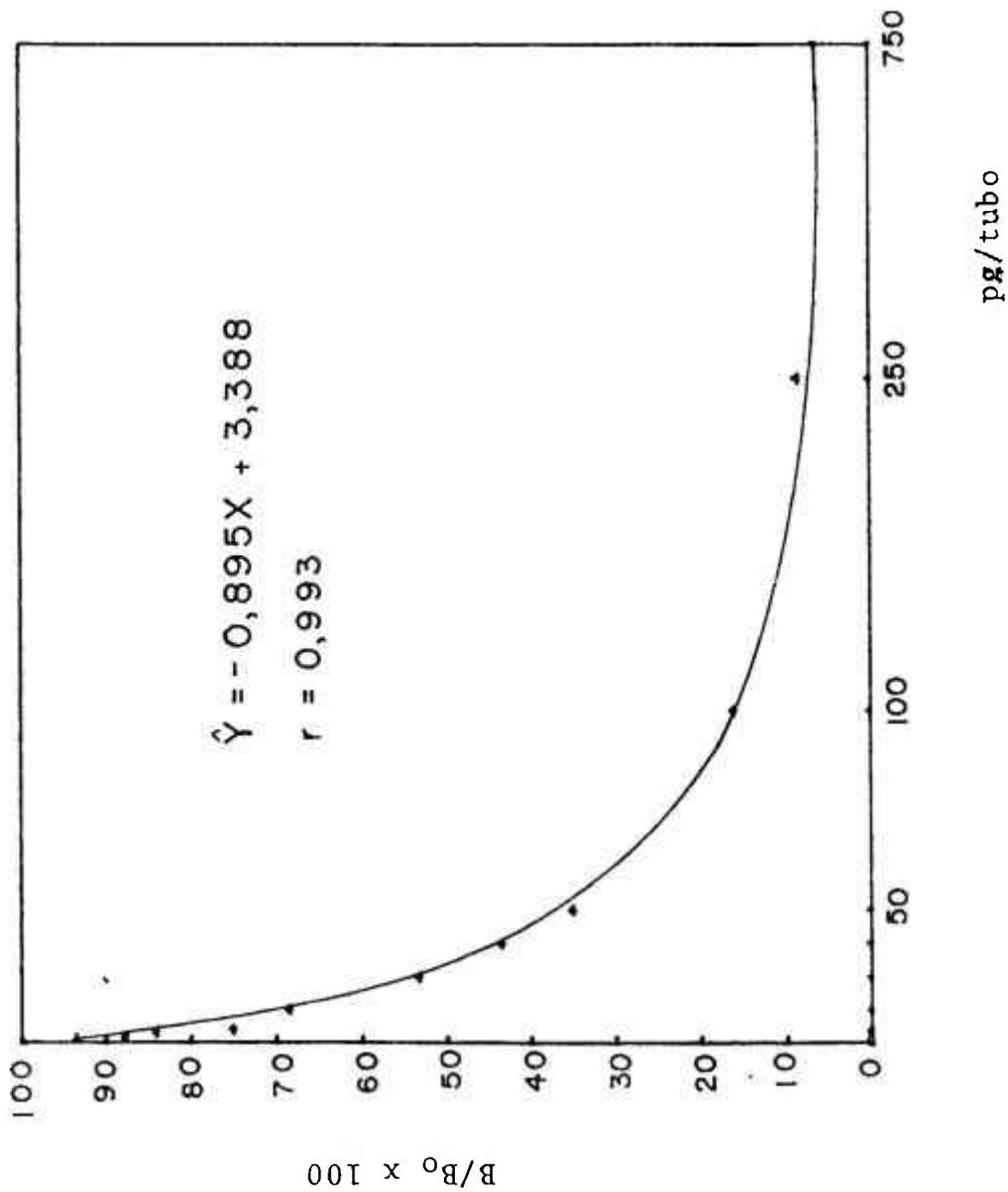


Figura 6- Curva típica de dose-resposta para o radioimunoensaio de E₂.

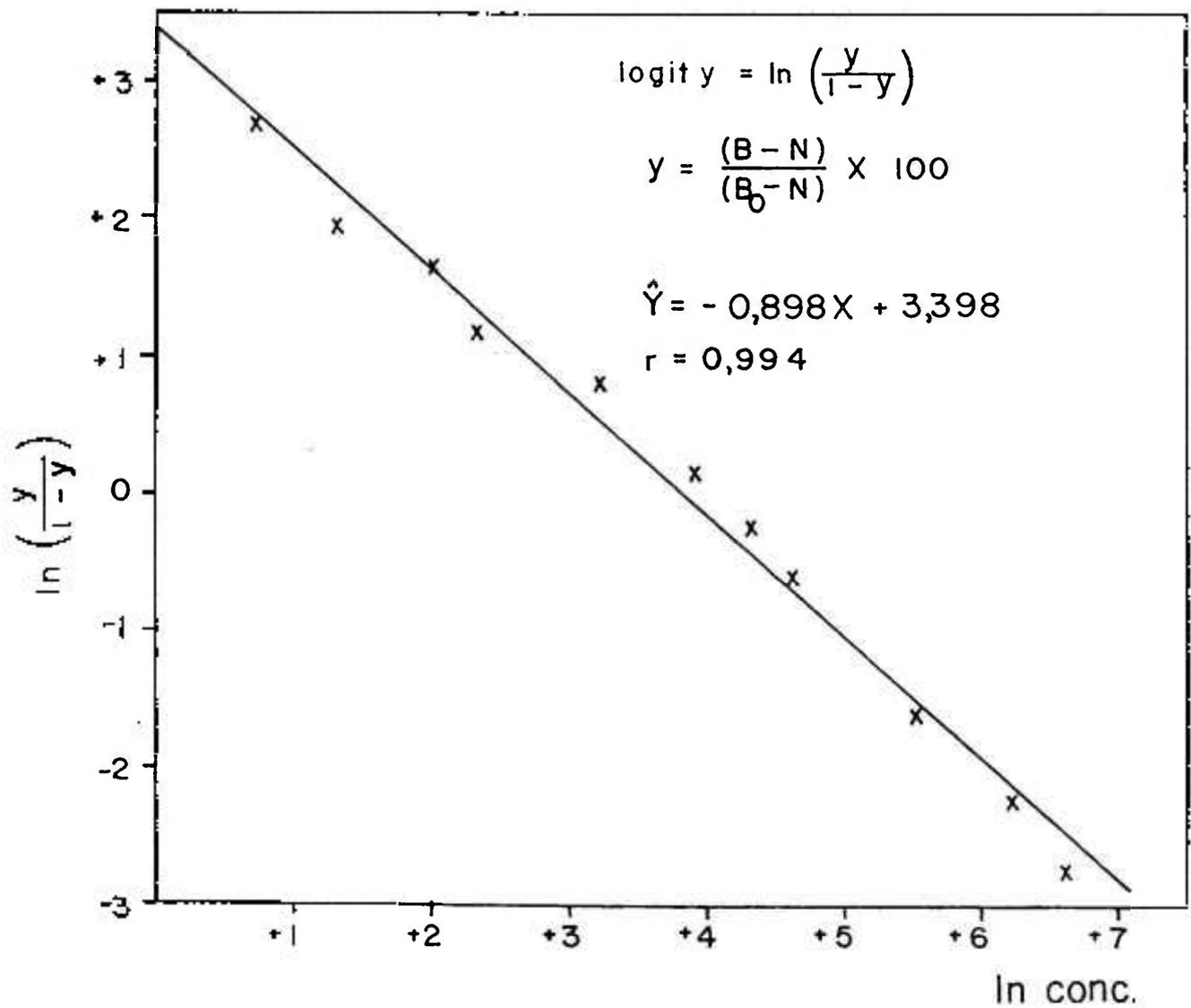


Figura 7- Projeção da curva dose-resposta de E₂ em logit(y) X ln(x).

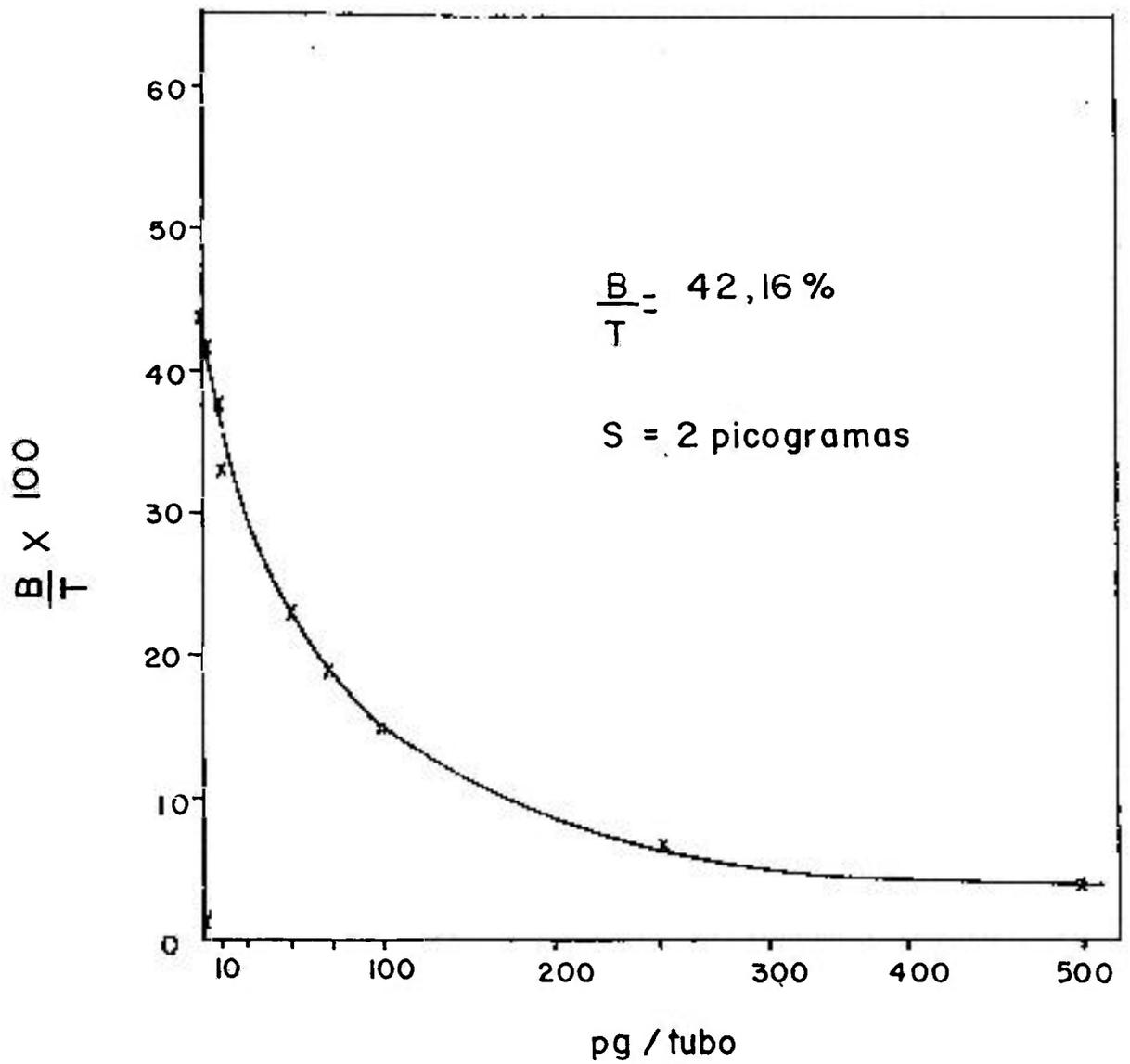


Figura 10- Determinação da sensibilidade da curva padrão do radioimunoensaio de E_2 pelo método gráfico.

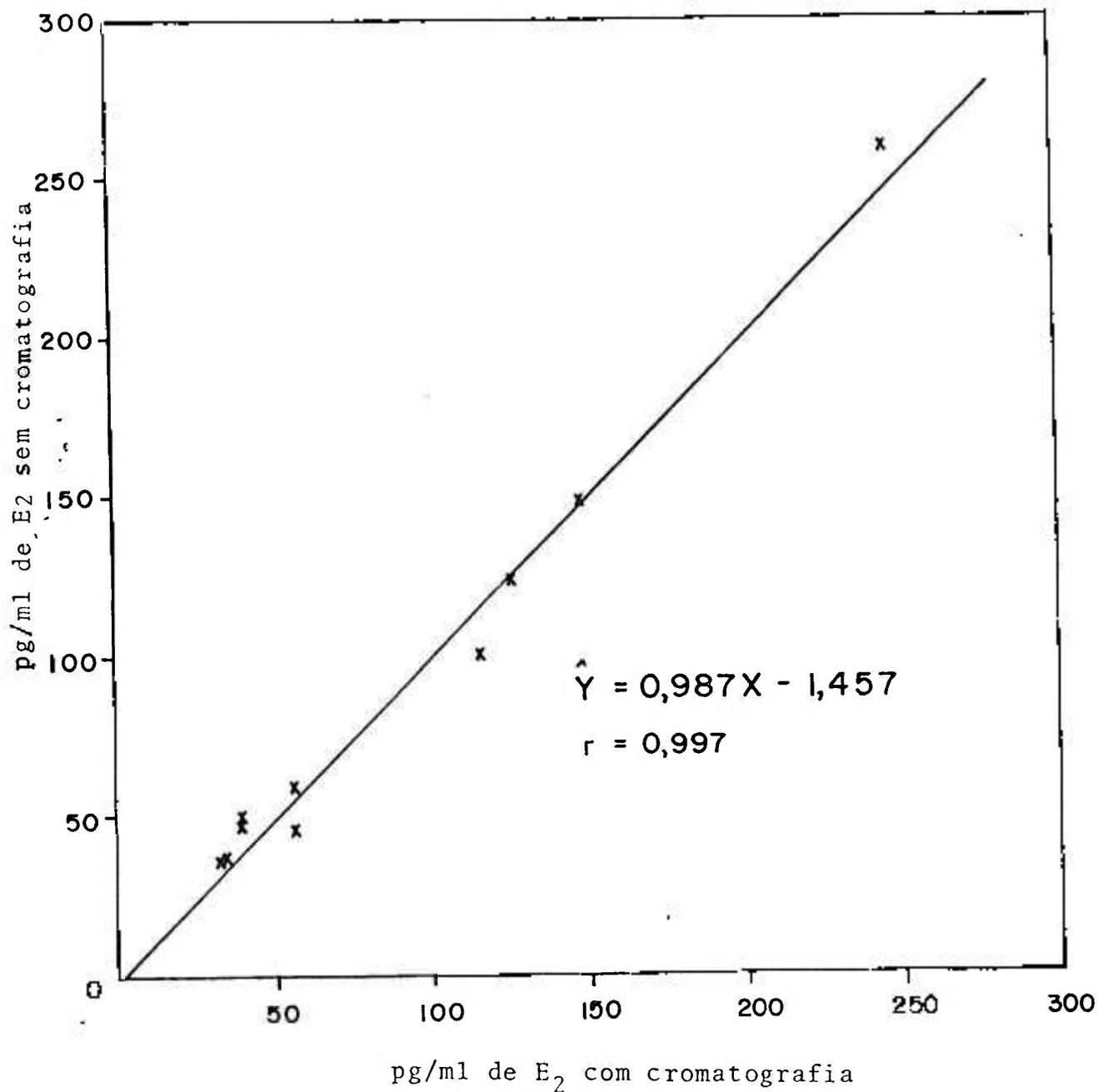


Figura 9- Comparação do radioimunoensaio de E₂ com e sem purificação prévia do extrato em coluna de Sephadex LH-20.

é de 3,45 e os valores observados estão indicados na Tabela 6. Pelos resultados obtidos, observamos que todas as médias são diferentes da de P_0 . Nestas condições a sensibilidade foi igual a 2,0 picogramas, no caso correspondente ao valor de P_1 .

4.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MÉTODO

4.4.1- Especificidade

A Tabela 4 apresenta os valores de E_2 obtidos de plasma de alto teor de esteróide endógeno, em diferentes diluições. A Figura 8 representa a reta de regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados cuja equação é $\hat{Y}=0,163 x +1,770$. O coeficiente de correlação entre os diferentes volumes de plasma e os valores correspondentes obtidos foi de 0,999.

A Tabela 5 apresenta os resultados de E_2 obtidos de plasma de indivíduos normais, submetidos ou não à purificação cromatográfica empregando em ambos o soro anti- E_2 altamente específico. A média dos resultados de E_2 do grupo, que foi submetido à purificação cromatográfica, com a média dos resultados de E_2 do grupo que não foi, foram analisados pelo teste "t" de STUDENT para variâncias iguais. Não houve diferença significativa ao nível de $\alpha = 0,05$ e G.L. = 18. O coeficiente de correlação calculado foi de 0,997 e a equação da reta de regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados foi $\hat{Y}=0,987 x -1,457$ (Figura 9). Nestas condições não houve praticamente diferença entre as 2 técnicas, indicando que o método utilizado prescinde de purificação cromatográfica prévia, nas condições habituais.

TABELA 6

Sensibilidade da curva-padrão (Método discreto)
(pg.ml⁻¹)

Tubos	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
1	43,00	42,00	39,35	38,49	32,60
2	43,70	41,70	39,38	37,87	33,38
3	45,60	40,80	40,81	37,59	32,32
4	44,68	41,50	39,59	39,91	34,15
5	44,20	41,60	41,32	37,74	33,50
\bar{X}	44,24	41,52	40,09	38,32	33,19
s	0,98	0,44	0,91	0,95	0,73
C.V.	2,23%	1,07%	2,28%	2,49%	2,21%
D	-	-6,23	-9,51	-13,57	-25,34

D_c p/aα=0,05=3,45.

$$D_c < D_{P1} < D_{P2} < D_{P3} < D_{P4} < p/a\alpha=5\%$$

- \bar{X} = média dos pontos
s = desvio-padrão
C.V.₂ = coeficiente de variação
D₂ = valores calculados pelo teste de Dunnett
D_c = valor crítico tabelado para o teste de Dunnett

TABELA 4
 Controle da especificidade da técnica

Tubos	Plasma (ml) (X)	Tampão (ml)	Valor obtido (pg.ml ⁻¹ (X [±] s) (Y)	Recuperação (%)
1	0,3	0,7	51,40 ± 1,27	95,33
2	0,4	0,6	67,20 ± 0,84	98,21
3	0,5	0,5	80,50 ± 0,53	102,56
4	0,6	0,4	102,23 ± 1,12	96,86
5	0,7	0,3	112,60 ± 0,71	102,57
6	0,8	0,2	133,16 ± 1,04	99,13
7	0,9	0,1	148,28 ± 0,94	99,85
8	1,0	-	164,74 ± 0,82	98,00

$r = 0,999$ (coeficiente de correlação)

$\hat{Y} = 0,163 X + 1,711$

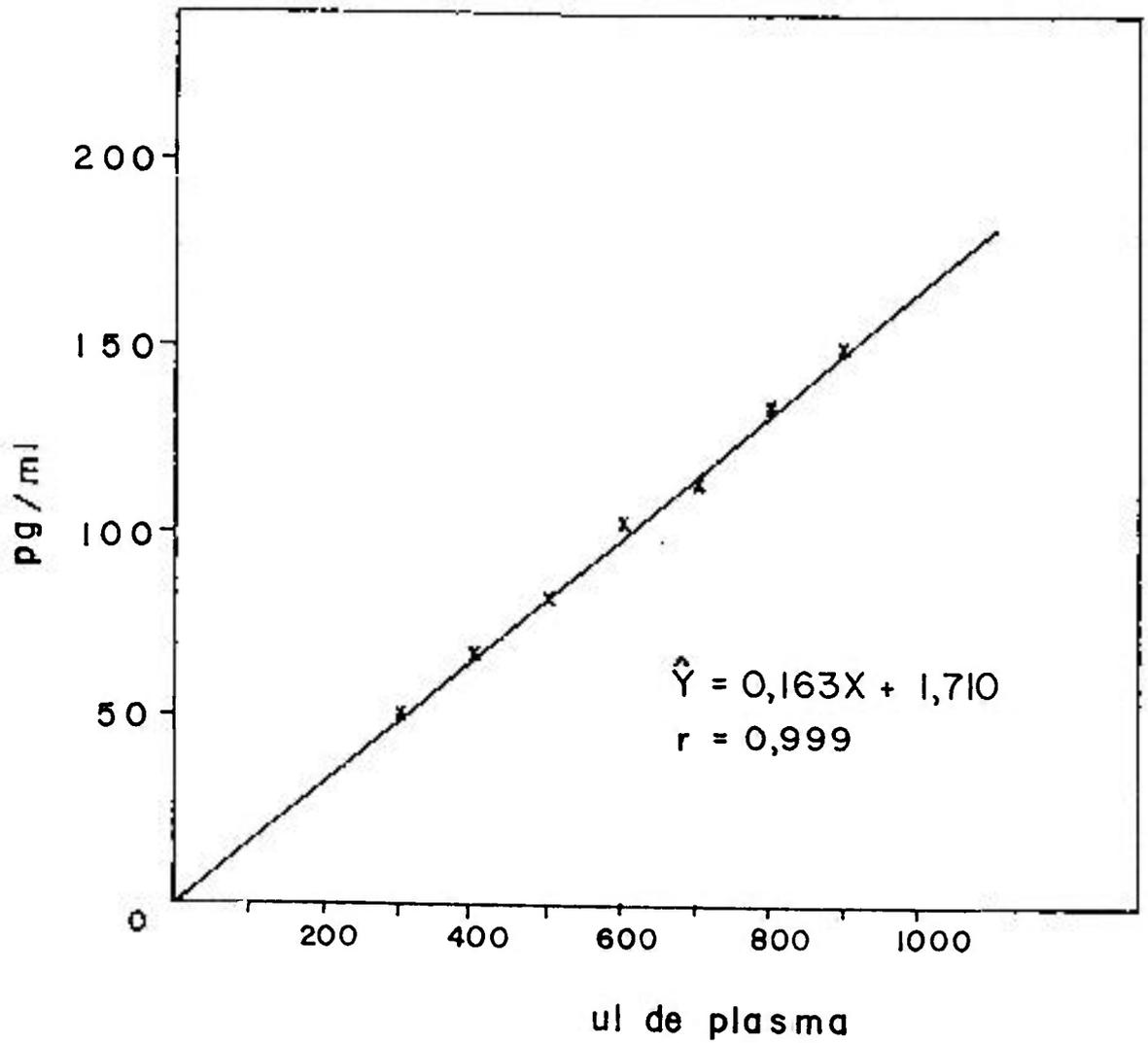


Figura 8- Controle da especificidade do radioimunoensaio de E_2 .
Efeito da diluição do plasma sobre a concentração de E_2 endógeno.

TABELA 5

Comparação de E_2 plasmático de indivíduos normais,
com e sem purificação cromatográfica

Indivíduo	Plasma com purificação (pg.ml ⁻¹)	Plasma sem purificação (pg.ml ⁻¹)
1	55,96	58,94
2	56,44	54,29
3	116,73	110,48
4	33,88	37,32
5	246,22	257,92
6	40,78	49,18
7	33,45	37,15
8	40,33	47,76
9	147,99	147,11
10	126,04	123,54
\bar{X} =	89,78	92,34
s =	69,36	70,08

\bar{X} = média

s = desvio padrão

Teste "t" de variâncias iguais

$t_c = 0,083 < t_c = 2,10$

$\alpha = 0,05$

GL = 18

4.4.2- Sensibilidade do Ensaio

A sensibilidade do ensaio foi avaliada a partir dos valores do "branco", cujos valores neste trabalho foram sempre praticamente iguais a zero. Assim não houve necessidade de subtrair os "brancos" dos valores das amostras do desconhecido.

4.4.3- Exatidão

A Tabela 7 apresenta os valores de E_2 obtidos por meio da recuperação das quantidades crescentes de E_2 adicionados a um volume fixo de plasma de baixo teor endógeno. Na Figura 11 está representada a reta de regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados e a equação da reta foi de $\hat{Y}=0,985 x +6,404$. O coeficiente de correlação entre os valores teóricos e calculados foi de 0,998, segundo MELO⁽³⁰⁾ pode ser considerado como excelente,

4.4.4- Precisão

A análise da precisão do método por meio da reprodutibilidade intra-ensaio, está representada na Tabela 8. Os resultados das dosagens de plasma B, M e A (valores endógenos baixo, médio e alto) foram obtidos de um mesmo ensaio. A média dos valores do plasma B foi de $\bar{X}=33,23$ pg/ml $\pm 0,79$ e o coeficiente de variação (C.V.) de 2,3%. Os valores para o plasma M foram: $\bar{X}=93,99$ pg/ml $\pm 2,19$ e C.V. igual a 2,33%. Para o plasma A temos os seguintes valores: $\bar{X}=162,84$ pg/ml $\pm 5,17$ e C.V. igual a 3,18%. Segundo MELO⁽³⁰⁾, o coeficiente de variação intra-ensaio é considerado excelente quando é menor que 5%, o que aconteceu em todas as misturas de plasma analisadas.

TABELA 7

Exatidão

Plasma (ml)	E ₂ adicionado (pg)	Valor obtido (pg.ml ⁻¹) (Y)	Valor teórico (pg.ml ⁻¹) (X)	Recuperação (%)
1,0	0	45,04 ± 0,59	45,04	95,00 ± 1,30
1,0	50	100,11 ± 0,82	95,04	105,34 ± 0,89
1,0	100	118,84 ± 2,32	145,04	81,93 ± 1,6
1,0	150	197,27 ± 2,05	195,04	105,15 ± 1,06
1,0	200	242,29 ± 3,10	245,04	98,88 ± 1,27
1,0	500	547,43 ± 10,43	545,04	100,44 ± 1,91

$r = 0,998$ (coeficiente de correlação)

$\bar{Y} = 0,985 X + 6,404$

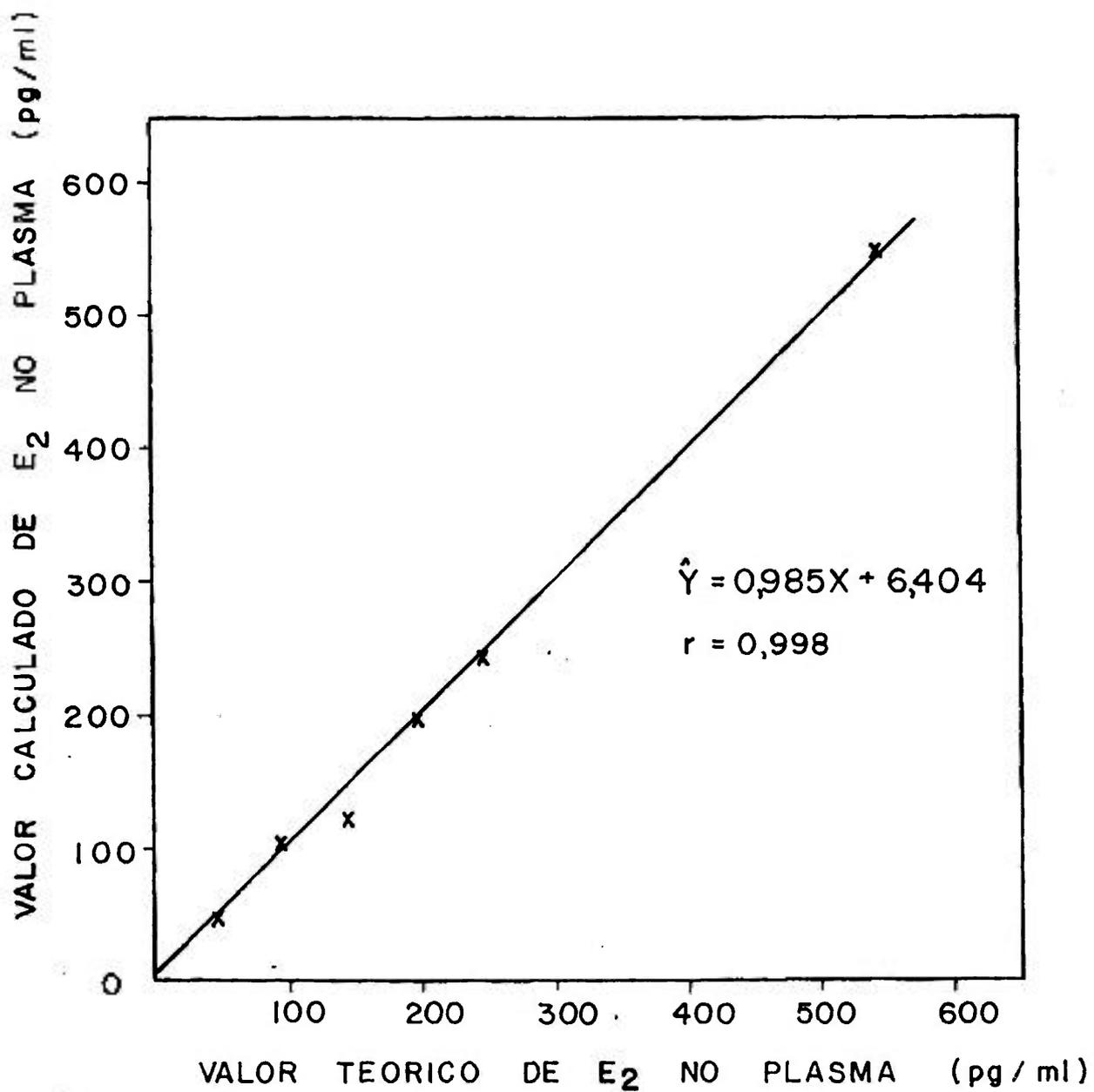


Figura 11- Controle da exatidão do radioimuncensaio de E₂. Prova da recuperação do E₂ padrão adicionado a um plasma de baixo teor hormonal.

TABELA 8
Precisão intra-ensaio

Pool baixo B (pg.ml ⁻¹)	Pool médio M (pg.ml ⁻¹)	Pool alto A (pg.ml ⁻¹)
33,88	93,30	169,96
32,25	97,03	158,95
32,25	91,78	170,28
34,23	94,43	158,28
32,40	91,65	168,28
33,50	94,70	157,45
34,40	92,40	158,73
32,80	91,58	159,74
33,15	97,34	160,80
33,32	95,72	165,90
$\bar{X} = 33,22$	$\bar{X} = 93,99$	$\bar{X} = 162,84$
$s = 0,79$	$s = 2,19$	$s = 5,17$
C.V. = 2,39%	C.V. = 2,33%	C.V. = 3,18%
I.C. = 33,22 [±] 1,55	I.C. = 93,99 [±] 4,29	I.C. = 162,84 [±] 10,13

\bar{X} = média dos pontos

s = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

A Tabela 9 apresenta os resultados das dosagens de plasma B e A (plasma de nível baixo e alto) realizadas em 20 determinações. Para o plasma B, a média dos valores foi: $\bar{X}=35,10$ pg/ml $\pm 2,02$ e C.V. igual a 5,74% e para o plasma A os valores foram: $\bar{X}=155,32$ pg/ml $\pm 6,74$ e C.V. = 4,34%. O coeficiente de variação em torno de 5% indica ser boa a reprodutibilidade inter-ensaio, de acordo com MELO.

4.5- APLICAÇÃO DA METODOLOGIA AO ESTUDO DA SECREÇÃO DE E_2 EM MULHERES NORMAIS, DURANTE O CICLO MENSTRUAL E APÓS A INFUSÃO DO FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS

4.5.1- Ciclo Menstrual de Mulheres Normais

Utilizaram-se seis mulheres normais, sendo o valor do acme de LH considerado como o dia da ovulação. Para comparar as mulheres, com diferente duração do ciclo, os resultados foram agrupados ao redor do pico de LH, como indicado na Tabela 10 e Figura 12. A concentração de E_2 no início da fase folicular de 54,46 pg/ml aumentou gradativamente, atingindo a média de 100 pg/ml na metade da fase folicular e continuando a elevar até 165,0 pg/ml no dia anterior ao do pico de LH, quando ocorre um aumento rápido alcançando o valor médio de 281,3 pg/ml neste dia. A seguir, observou-se uma queda acentuada de E_2 a 95 pg/ml no 2º dia após a ovulação, havendo um pequeno aumento até alcançar o platô de aproximadamente 132,38 pg/ml na fase lútea, entre o 3º e 10º dias após o pico de LH. O nível de E_2 cai a seguir até alcançar o valor aproximado de 50 pg/ml no primeiro dia da menstruação seguinte (dia + 14).

4.5.2- Infusão de LH/FSH-RH

TABELA 9
Precisão inter-ensaio

Pool baixo B (pg.ml ⁻¹)	Pool alto A (pg.ml ⁻¹)
37,32	148,60
33,88	144,50
36,15	145,70
33,25	158,70
32,45	157,45
34,23	143,02
31,40	149,79
36,49	148,28
35,80	156,46
37,40	159,96
35,50	158,95
37,49	157,87
32,24	160,28
33,31	160,80
35,80	150,33
35,53	165,90
38,32	158,30
37,50	162,40
34,45	163,50
33,50	155,50
\bar{X} = 35,10	\bar{X} = 155,32
s = 2,02	s = 6,74
C.V. = 5,74%	C.V. = 4,34%
I.C. = 35,10 [±] 3,96	I.C. = 155,32 [±] 13,21

\bar{X} = média dos pontos

s = desvio padrão

C.V. = coeficiente de variação

I.C. = intervalo de confiança

TABELA 10

Ciclo menstrual de mulheres normais
17 β -estradiol(pg.ml⁻¹)

Dias	CRG 30 anos	MLS 31 anos	SBS 20 anos	ACZ 25 anos	M.O 26 anos	MJB 31 anos	$\bar{x} \pm s$
-14	-	50,0	-	67,04	46,35	54,46	54,46 \pm 11,04
-13	-	-	56,58	-	55,0	50,50	54,02 \pm 3,15
-12	-	70,0	-	80,28	59,92	70,07	73,45 \pm 5,91
-11	54,37	-	77,13	-	-	98,96	76,82 \pm 22,29
-9	41,58	-	79,27	82,00	73,00	91,48	73,46 \pm 19,02
-7	70,74	93,42	62,64	84,36	-	189,13	100,06 \pm 51,19
-5	-	-	85,6	70,20	-	198,50	118,10 \pm 70,05
-4	119,20	90,67	-	-	93,30	-	101,05 \pm 15,77
-3	-	-	81,04	-	108,13	239,50	142,89 \pm 84,75
-2	155,40	135,92	-	213,54	118,50	-	155,84 \pm 41,31
-1	-	160,00	180,00	-	156,00	-	165,33 \pm 12,86
0	390,00	248,40	281,37	325,50	228,27	214,15	281,28 \pm 66,59
+2	-	81,35	106,58	-	122,14	71,12	95,29 \pm 23,29
+3	83,40	149,43	-	120,00	-	-	117,04 \pm 33,08
+4	-	147,99	171,00	-	-	107,14	142,04 \pm 32,34
+5	176,60	123,54	-	104,65	108,92	-	128,43 \pm 33,12
+6	-	125,05	144,00	-	-	73,8	114,28 \pm 36,32
+7	201,40	142,55	-	157,50	-	-	167,18 \pm 30,57
+8	-	113,39	38,14	-	139,17	139,65	107,58 \pm 47,89
+9	-	104,49	-	178,02	121,85	-	134,78 \pm 38,43
+10	180,00	93,52	35,59	-	-	147,22	114,08 \pm 63,32
+12	-	-	37,43	153,65	-	39,68	76,92 \pm 66,40
+13	21,32	50,00	-	-	40,00	-	37,10 \pm 14,55
+14	-	-	30,75	83,00	58,28	47,95	54,99 \pm 21,85

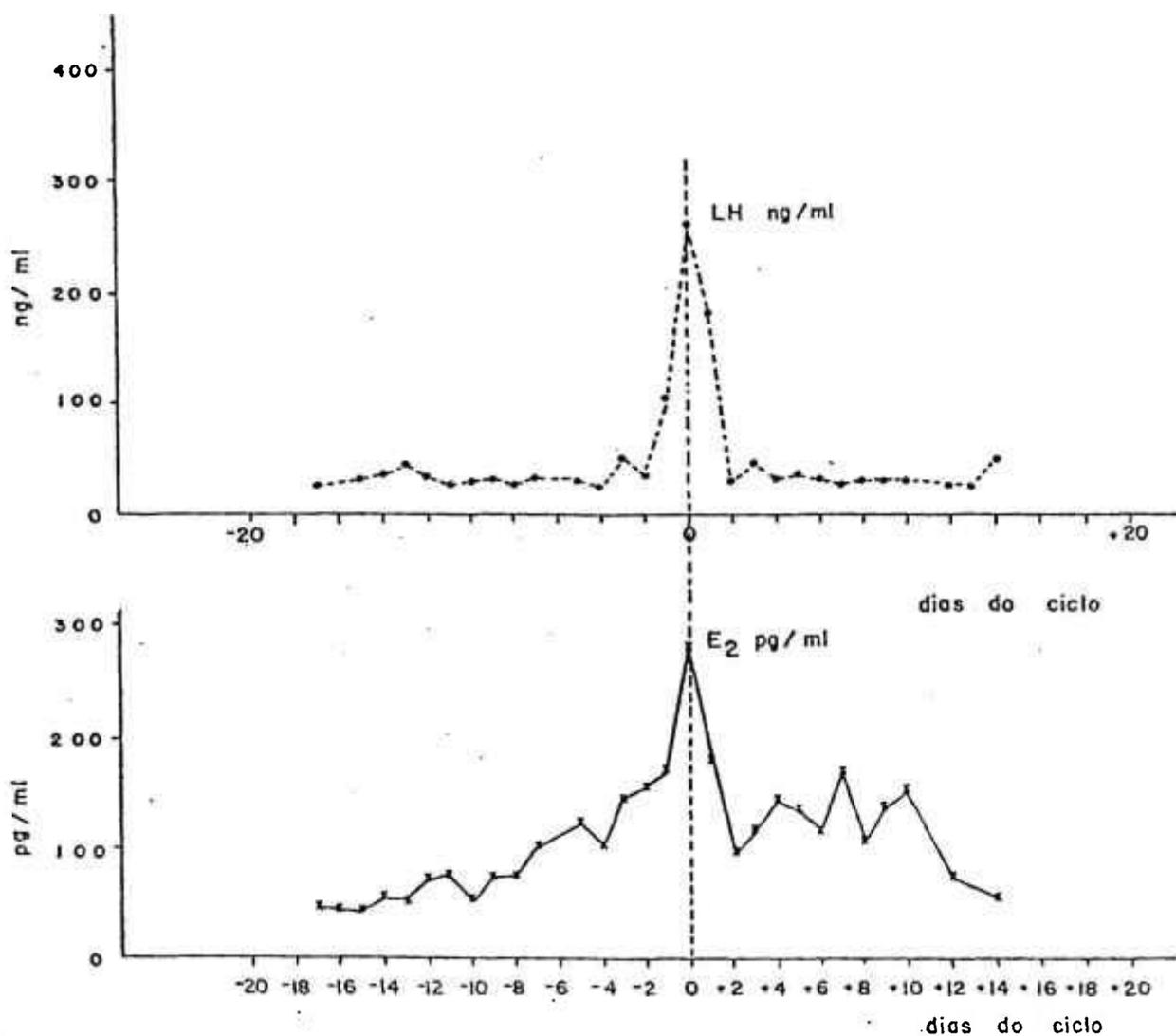


Figura 12- Valores médios de hormônio luteinizante(LH) e estradiol plasmáticos nas fases folicular e lútea de 6 ciclos menstruais normais. O dia zero é considerado como o correspondente ao da ovulação(pico de LH).

4.5.2.1- Infusão aguda

Os níveis plasmáticos de E_2 , antes e depois da infusão aguda de 25 μ g de fator liberador das gonadotrofinas em mulheres, na metade da fase folicular e lútea do ciclo menstrual estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Por meio da aplicação do teste não paramétrico de WILCOXON aos resultados, verificou-se que a resposta do ovário à infusão de LH/FSH-RH não foi significativa nos dois tempos (diferença não significativa entre as médias dos valores basais e após 60 minutos, nas fases folicular e lútea), obtendo-se para os tempos zero e 60 minutos da fase folicular o $z_0 = 0,6405$ e para os tempos zero e 60 minutos da fase lútea o $z_0 = 0,2887$, para z crítico tabelado igual a 1,96 ao nível $\alpha = 5\%$.

Por meio do teste de WILCOXON, verificou-se que os valores médios basais das fases folicular e lútea foram significativamente diferentes entre si, e o mesmo para os valores médios após 60 minutos da infusão. Obteve-se para o tempo zero minutos nas fases: $z_0 = 2,558$ e para o tempo 60 minutos, $z_0 = 2,558$ para $z_c = 1,96$ ao nível de significância de $\alpha = 5\%$.

4.5.2.2- Infusão prolongada de LH/FSH-RH

A Tabela 13 e 14 apresentam os resultados obtidos durante a infusão prolongada de LH/FSH-RH em mulheres na metade da fase folicular. Submetendo-se os resultados obtidos ao teste de WILCOXON verificamos que a comparação entre os valores nos tempos zero e 240, zero e 480, 240 e 480 minutos a nível de $\alpha = 5\%$ mostram:

TABELA 11

Infusão aguda LH/FSH-RH-Fase Folicular
 17β -estradiol(pg.ml^{-1})

Fase folicular	Tempo (min)	
	0	60
W.O.	72,75	86,36
H.H.	72,10	74,20
G.C.	43,30	56,93
A.G.	44,57	40,30
M.N.B.	66,66	75,05
E.A.	63,10	60,70
\bar{X}	60,40	65,59
s	13,26	16,33
$s\bar{X}$	5,41	6,67

\bar{X} = média

s = desvio padrão

$s\bar{X}$ = desvio da média

TABELA 12

Infusão aguda LH/FSH-RH Fase Lútea
17 β -estradiol (pg.ml⁻¹)

Fase lútea	Tempo (min)	
	0	60
W.O.	138,90	137,90
H.H.	217,47	231,60
G.C.	223,35	229,82
E.A.	209,22	191,70
\bar{X}	197,23	197,76
s	39,32	43,94
s \bar{X}	19,66	21,97

\bar{X} = média

s = desvio padrão

s \bar{X} = desvio da média

TABELA 13

Infusão prolongada de LH/FSH-RH

Fase folicular			
17 β -estradiol(pg.ml ⁻¹)			
Tempos(em minutos)			
Pacientes	0	240	480
A.G.	139,30	159,80	203,08
G.C.	44,20	94,20	155,40
H.H.	75,80	92,00	127,70
M.S.	105,00	135,00	185,70
W.O.	63,30	93,50	133,80
E.A.	128,10	158,54	175,22
M.B.	61,80	91,41	180,01
\bar{X}	88,21	117,78	165,84
s	36,27	32,22	27,87
s \bar{X}	13,71	12,18	10,53

 \bar{X} = média dos pontos

s = desvio-padrão

s \bar{X} = desvio da média

TABELA 14

Infusão prolongada de LH/FSH-RH

Pacientes	Fase lútea		
	17 β -estradiol (pg.ml ⁻¹)		
	Tempos (em minutos)		
	0	240	480
A.G.	212,50	257,08	290,22
G.C.	213,98	254,30	298,16
H.H.	190,98	237,20	270,34
M.S.	195,75	234,00	278,00
W.O.	187,98	237,50	287,50
\bar{X}	200,24	244,02	284,84
s	12,20	10,79	10,85
s \bar{X}	5,46	4,83	4,85

 \bar{X} = média dos pontos

s = desvio-padrão

s \bar{X} = desvio da média

$$z_1 = 1,469$$

$$z_2 = 2,747$$

$$z_3 = 2,108$$

$$z_c = 1,96, \text{ a nível de significância } 5\%, \text{ G.L.}=6$$

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos pela infusão prolongada do fator em cinco mulheres normais na metade da fase lútea. Submetendo-se os resultados ao teste de WILCOXON, observamos a nível de $\alpha = 5\%$:

$$z_1 = 2,842$$

$$z_2 = 2,842$$

$$z_3 = 2,842$$

$$z_c = 1,96 \text{ ao nível de significância } 5\%, \text{ G.L.}=4$$

Os níveis de E_2 foram significativamente mais elevados na fase lútea do que na folicular em todos os tempos de coleta a nível de $\alpha = 5\%$, demonstrados pelo teste de WILCOXON. Os valores obtidos foram:

$$z_0 = 2,842$$

$$z_{240} = 2,842$$

$$z_{480} = 2,842$$

$$z_c = 1,96 \text{ ao nível de significância de } 5\%.$$

z_x = Valores obtidos através do teste de Wilcoxon.

z_c = Valor crítico tabelado para o teste de Wilcoxon.

5. D I S C U S S Ã O

O radioimunoensaio desenvolvido no presente trabalho, representou a padronização de um método simples, prático e preciso para a determinação de E_2 plasmático, em mulheres normais, sem necessidade de purificação cromatográfica do plasma e em condições de patologia ovariana e adrenal (dados não publicados).

Inicialmente faremos uma análise dos parâmetros empregados para satisfazer os critérios de especificidade, sensibilidade e precisão do método.

O soro anti- E_2 obtido pela imunização de ovelhas com $17\beta-E_2$ -6(-0-carboximetil)-oxima|BSA foi caracterizado nesta pesquisa, obtendo-se constantes de afinidade, correspondentes a dois sítios diferentes de ligação, ambos de alta afinidade, porém um com alta e outro com baixa capacidade de ligação, como demonstrado na Figura 2. As constantes de afinidade dos dois sítios foram $K_1=1,62 \times 10^{12}$ l/mol e $K_2=2,94 \times 10^{11}$ l/mol, que são muito maiores do que as descritas para outros antissoros para a dosagem de E_2 . Com efeito: ABRAHAM e ODELL⁽³⁾ em 1970 obtiveram $K=2,8 \times 10^{10}$ l/mol; LORIAUX et alii⁽²⁸⁾ em 1973 $K=1,4 \times 10^{10}$ l/mol; DOERR⁽¹⁰⁾ em 1973 $K=10^{10}$ l/mol; MALVANO et alii⁽²⁹⁾ em 1974 $K=5,38 \times 10^9$ l/mol e finalmente LENTON et alii⁽²⁵⁾ em 1978 $K=16,8 \times 10^9$ l/mol.

Verificamos também a especificidade do soro anti- E_2 , demonstrada pelas reações cruzadas muito baixas com esteróides de configuração mais próxima como o E_1 . Apesar de E_1 existir no plasma de mulher normal numa concentração

muito próxima da de E_2 , a sua interferência foi mínima pois a reação cruzada foi de apenas 3,2%⁽²⁰⁾.

A especificidade foi também confirmada pelos resultados idênticos obtidos em uma série de plasmas de baixo teor de E_2 , com e sem purificação cromatográfica⁽³²⁾. Deve-se mencionar que a extração foi realizada com éter etílico, um solvente não seletivo para o estradiol, extraíndo juntamente com E_1 outros esteróides presentes no plasma. Pelos resultados obtidos verificamos, por meio da Figura 9, que o coeficiente de correlação é igual a 0,997, demonstrando a excelente correlação entre os resultados sem purificação e com purificação cromatográfica prévia.

Esta experiência mostrou portanto não haver necessidade de purificação do extrato plasmático por cromatografia, quando se emprega no radioimunoensaio um antissoro altamente específico, em plasma de indivíduos normais. Só em condições de excesso de E_1 tornar-se-ia necessária a purificação prévia, como na Hiperplasia congênita virilizante das adrenais (dados não publicados).

A linearidade e a alta correlação demonstrada pela Figura 9, comprovam a inexistência de fator plasmático interferente, no teste de diluição do plasma.

A sensibilidade calculada pelo método gráfico e pelo "discreto" foi de 2 picogramas, comparável à apresentada na literatura como variando de 1 a 10 picogramas, segundo autores: ORCZYK et alii⁽³⁵⁾; DOERR⁽¹⁰⁾; MALVANO et alii⁽²⁹⁾; LENTON et alii⁽²⁵⁾; ABRAHAM⁽¹⁾ e KORENMAN et alii⁽²³⁾. Com este nível de sensibilidade obtido, os valores mais baixos dosáveis em condições de hipoestrinismo, podem ser lidos diretamente na curva, sem haver necessidade de se realizar um ensaio especial para valores baixos de E_2 .

Além disso, o ensaio foi exato, pois o coeficiente de correlação calculado entre os valores teóricos e obtidos foi de 0,998, considerado excelente segundo MELO⁽³⁰⁾.

A análise da reprodutibilidade intra-ensaio mostrou os coeficientes de variação menores que 5%, enquanto na reprodutibilidade inter-ensaio, os coeficientes de variação foram de 5,74 e 4,34% considerados bons segundo MELO⁽³⁰⁾.

Portanto, foi possível concluir que o método proposto neste trabalho é específico, sensível e as reprodutibilidades foram excelentes tanto num mesmo ensaio como em sucessivos.

Como aplicação desta técnica, estudamos o ciclo menstrual de seis mulheres normais, avaliando a secreção de E_2 e as mudanças dos níveis circulantes nos períodos folicular e lúteo^(4,5,15,22).

Os valores encontrados foram semelhantes aos obtidos por ABRAHAM et alii em 1972⁽⁴⁾, BAIRD e GUEVARA em 1969⁽⁵⁾, GUERRERO et alii em 1976⁽¹⁵⁾ e KORENMAN e SHERMAN em 1973⁽²²⁾, onde mostram o nível de E_2 aumentando gradativamente de valores mais baixos, observados no início da fase folicular, Tabela 10, até ao pico máximo de LH no dia a dia da ovulação. Após o pico, o valor médio de E_2 caiu, subindo gradativamente no dia +3, atingindo um platô até o dia +11, cujos valores não atingiram mais do que a metade do pico máximo.

Os valores de E_2 , no dia do pico de LH, encontrados pelos autores acima citados foram maiores do que observados neste trabalho (281,3 pg/ml). Com efeito, o valor mé

dio máximo de E_2 citado por ABRAHAM e ODELL⁽³⁾ é 130-400 pg/ml; BAIRD e GUEVARA⁽⁵⁾ = 318 pg/ml; GUERRERO et alii⁽¹⁵⁾ = 355 pg/ml; KORENMAN et alii⁽²³⁾ = 380 pg/ml.

Pelas características ideais da metodologia de dosagem de E_2 , resolvemos aplicá-la para verificar se o LH/FSH-RH - Hormônio hipotalâmico de liberação das gonadotrofinas hipofisiárias - através da liberação endógena de gonadotrofina seria capaz de, em curto prazo de tempo, determinar a secreção de E_2 com menor dose efetiva de LH/FSH-RH⁽³⁸⁾ e também com estímulo prolongado deste fator de liberação. Em ambos os casos, a secreção de E_2 foi avaliada nas 2 fases do ciclo.

Na prova aguda, com a pequena dose de LH/FSH-RH, não houve aumento significativo dos níveis de E_2 , mas as Tabelas 11 e 12 mostram que, na metade das pacientes estudadas houve elevação dos níveis de E_2 quer na fase folicular quer na lútea. É interessante indicar que, pela ação da progesterona, facilitando a liberação de LH^(19,34,43), os níveis de gonadotrofinas são maiores na metade da fase lútea e mesmo assim não houve uma liberação uniforme de E_2 nesta fase.

Na infusão prolongada, na fase folicular, embora houvesse elevação de E_2 em todos os testes, no tempo de 240 minutos relativamente ao basal, a não significância obtida no teste não paramétrico de WILCOXON é provavelmente dependente da variação de valores dentro do basal, como seria de esperar devido a variável evolução do folículo ovariano e sua secreção durante a fase folicular. Entretanto no último tempo de coleta, como seria de esperar os valores atingidos foram significativamente maiores do que os basais e daqueles obtidos aos 240 minutos.

Por outro lado, na fase lútea, houve elevação significativa dos valores de E_2 em todos os tempos de coleta, pelo fato dos testes serem realizados quando os valores basais de E_2 variaram muito pouco entre si. Com efeito, comparando os valores nos tempos 0, 240 e 480 minutos das fases folicular e lútea, pelo teste de WILCOXON verificamos que houve significância nas diferenças entre os diversos tempos de coleta.

6. C O N C L U S Õ E S

- 1- O método de radioimunoensaio para a determinação de E_2 plasmático, desenvolvido neste trabalho, mostrou-se específico, prático, preciso e sensível sem purificação cromatográfica do plasma.
- 2- O soro anti- E_2 empregado neste trabalho mostrou-se específico, com alta afinidade.
- 3- A avaliação de E_2 do ciclo menstrual de 6 mulheres normais, permitiu estabelecer os níveis circulantes de E_2 nas duas fases do ciclo folicular e lútea, coincidindo o acme de LH com o de estradiol.
- 4- A infusão aguda de LH/FSH-RH não determinou elevação significativa do E_2 nas duas fases do ciclo.
- 5- A infusão prolongada do LH/FSH-RH demonstrou que a resposta do ovário é maior na fase lútea do que na folicular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, G.E. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta endocr. (Copenhagen), 75 (Suppl. 183), 1974.
2. ABRAHAM, G.E. & GARZA, R. Radioimmunoassay of steroids. In: DEKKER, M. Clinical and biochemical analysis. sem local, editor, 1977. p. 591-656.
3. ABRAHAM, G.E. & ODELL, W.D. Solid-phase radioimmunoassay of serum estradiol-17 β : A semi-automated approach. In: PERON, F.G. & CALDWELL, B.V. editores Immunologic methods in steroid determination. New York, N.Y., Meredith Corporation, 1970. p. 87-112.
4. ABRAHAM, G.E.; ODELL, W.D.; SWERDLOFF, R.S.; HOPPER, K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle. J.clin.Endocr.Metab., 34: 312-8, 1972.
5. BAIRD, D.T. & GUEVARA, A. Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in non pregnant women throughout the menstrual cycle, castrate and postmenopausal women and in men. J.clin. Endocr.Metab., 29: 149-56, 1969.
6. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. General principles of radioimmunoassay. Clinica chim. Acta, 22: 51-69, 1968.
7. BURGER, H.G.; CATT, K.J.; BROWN, J.B. Relationship between plasma luteinizing hormone and urinary estrogen excretion during the menstrual cycle. J.clin. Endocr. Metab., 28: 1508-12, 1968.
8. CHAPMAN, D.I. & MARCROFT, J. The use of Triton X-100 in the liquid scintillation counting of carbon-14 with particular reference to plasma and urine. Int. J.appl. Radiat. Isotopes, 22: 371-7, 1971.

9. CORKER, C.S.; EXLEY, D.; NAFTOLIN, F. Assay of 17 β -oestradiol by competitive protein binding methods. Acta endocr. (Copenhagen), (Suppl. 147): 305-17, 1970.
10. DOERR, P. Hapten-radioimmunoassay of plasma oestradiol. Acta endocr. (Copenhagen), 72: 330-44, 1973.
11. ENEROTH, P. & NYSTROM, E. A study on liquid-gel partition of steroids and steroid derivatives on lipophilic Sephadex gels. Biochim. Biophys. Acta, 144: 149-61, 1967.
12. ERLANGER, BF.; BOREK, F.; BEISER, SM.; LIEBERMAN, S. Steroid-protein conjugates. II-Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone. J.biol.Chem., 234: 1.090-4, 1959.
13. FELDMAN, H. & RODBARD, D. Mathematical theory of radioimmunoassay. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W. H., J.B. Lippincott Company. Principles of competitive protein-binding assays. Philadelphia, Pa., 1971 p.158-203.
14. GELLER, L.E. & SILBERMAN, N. Stability of labeled compounds after storage. In: BRANSOME JR., E.D., editor. The current status of liquid scintillation counting, New York, N.Y., Grune and Shatton, 1970, p. 137-41.
15. GUERRERO, R.; ASO, T.; BRENNER, P.F.; CEKAN, Z.; LANDGREN, B.M.; HAGENFELDT, K.; DICZFALUSY, E. Studies on the pattern of circulating steroids in the normal menstrual cycle. Acta endocr. (Copenhagen), 81: 133-49, 1976.
16. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: Review of basic principles. Semin. nucl. Med., 5(2):125-52, 1975.
17. HOUSSAY, B.A. Fisiologia humana. 4a.ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1971.

18. JAFFE, R.B. & KEYE, W.R. JR. Estradiol augmentation of pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in women. J. clin. Endocr. Metab., 39: 850-5, 1974.
19. JEWELWICZ, R.; DYRENFURTH, I.; FERIN, M.; BOGUMIL, J.; VANDE WIELE, R.L. Gonadotropin estrogen and progesterone response to long term gonadotropin-releasing hormone infusion at various stages of the menstrual cycle. J. clin. Endocr. Metab., 45: 662-7, 1977.
20. JURGENS, H.; PRATT, J.J.; WOLDRING, M.G. Radioimmunoassay of plasma estradiol without extraction and chromatography. J. clin. Endocr. Metab., 40: 19-25, 1975.
21. KIEFFER, J.D.; WEINTRAUB, B.D.; BAIGELMAN, W.; LEEMAN, S.; MALOOF, F. Homologus radioimmunoassay of thyrotrophin in rat plasma. Acta endocr., (Copenhagen), 76: 495-505, 1974.
22. KORENMAN, S.G. & SHERMAN, B.M. Further studies of gonadotropin and estradiol secretion during the pre-ovulatory phase of the human menstrual cycle. J. clin. Endocr. Metab., 36: 1205-9, 1973.
23. KORENMAN, S.G.; STEVENS, R.H.; CARPENTER, L.A.; ROBB, M.; NISWENDER, G.D.; SHERMAN, B.M. Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values. J. clin. Endocr. Metab., 38: 718-20, 1974.
24. LASLEY, B.L.; WANG, C.F.; YEN, S.S.C. The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophs. J. clin. Endocr. Metab., 41: 820-6, 1975.
25. LENTON, E.A.; COOKE, I.D.; SAMPSON, G.A.; SEXTON, L. Oestradiol secretion in men and pre-menopausal women. Clin. Endocr., 9: 37-47, 1978.

26. LISBOA, B.P. & STRASSNER, M. Gel chromatography of steroid oestrogens on Sephadex LH-20. J. Chromat., 111: 159-64, 1975.
27. LONGCOPE, C.; LAYNE, D.S.; TAIT, J.F. Metabolic clearance rates and interconversions of estrone and 17 β -estradiol in normal males and females. J.clin. Invest., 47:93-106, 1968.
28. LORIAUX, D.L.; GUY, R.; LIPSETT, B. A simple, quick, solid-phase method for radioimmunoassay of plasma estradiol in late pregnancy and of plasma cortisol. J. clin. Endocr. Metab., 36: 788-90, 1973.
29. MALVANO; R.; ROLLERI, E.; ROSA, U. Standardization and control of steroid radioimmunoassay. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY: Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of a symposium on held in Istambul, 10-14 September 1973, v.2. Vienna, 1974. p.97-123. (Proceedings series).
30. MELO, E.H.L. Padronização laboratorial dos lípedes séricos, em especial dos adultos normais. Goiânia, 1970. (Tese de livre-docência. Faculdade de Medicina da Universidade de Goiás).
31. MIDGLEY JR, A.R.; NISWENDER, G.D.; REBAR, R.W. Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, especificity). Acta endocr. (Copenhagen), 142 (Suppl.): 163-84, 1969.
32. MIKHAIL, G.; WU, C.H.; FERIN, M.; VANDE WIELE, R.L. Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. Steroids, 15: 333-97, 1970.
33. MORRIS, S.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. Clin. chim. Acta, 73: 213-6, 1976.

34. NILLIUS, S.J., & WIDE, L. Progesterone-induced augmentation of pituitary gonadotrophin responses to luteinizing hormone - releasing hormone in oestrogen-pre-treated amenorrhoeic women. Acta endocr. (Copenhagen), 83: 684-91, 1976.
35. ORCZYK, G.P.; CALDWELL, B.V.; BEHRMAN, H.R. Estrogens: estradiol, estrone, and estriol. In: JAFFE, B.M. & BEHRMAN, H.R., editores. Methods of hormone radio-immunoassay. New York, N.Y., Academic Press, 1974. p. 333-45.
36. PATTERSON, M.S. & GREENE, R.C. Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions. Analyt. Chem., 37(7): 354-7, 1965.
37. PENNY, R.; PARLOW, A.F.; OLAMBIWONNU, N.O.; FRASIER, S. Evolution of the menstrual pattern of gonadotrophin and sex steroid concentrations in serum. Acta endocr. (Copenhagen), 84: 729-37, 1977.
38. PINTO, H. Avaliação da crítica da radioiodação dos hormônios luteinizantes e folículo estimulante hipofisários humanos com lactoperoxidase e a sua comparação com o método clássico da cloramina-T: aplicação na medida das gonadotrofinas séricas, no ciclo menstrual, após estímulo com fator liberador hipotalâmico. São Paulo, 1977 (Tese de doutoramento, Instituto de Biociências, USP).
39. RICHARDSON, G.S. Hormonal physiology of the ovary. II- Pharmacology and physiology of hormones. In: GOLD, J.J. Gynecology endocrinology. Hagerstown, Mar., Harper & Row, 1975. p. 55-77.
40. ROBBARD, D. Statistical aspects of radioimmunoassays. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W.H. Principles of competitive protein-binding assay. Philadelphia, Pa., J.B. Lippincott Company, 1971 p.204-59.

41. SETCHELL, K.D.R. & SHACKLETON, H.L. The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on Sephadex LH-20. Clin. chim. Acta, 47: 381-8, 1973.
42. YEN, S.S.C.; LASLEY, B.L.; WANG, C.F.; LEBLANC, H.; SILER, T.M. The operating characteristics of the hypothalamic-pituitary system during the menstrual cycle and observations of biological action of somatostatin. Rec. Prog. Horm. Res., 31: 321-63, 1975.
43. 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.