

22 a 27 de abril de 1990

ANAIS - PROCEEDINGS

ESTUDO DA SECREÇÃO DE 17- β estradiol (E_2) DURANTE O CICLO MENS -
TRUAL E APÓS A INFUSÃO DO FATOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (LH/
FSH-RH) POR RADIOIMUNOENSAIO

¹Takeko Shimizu Kiyon

²Bernardo Leo Wajchenberg

¹Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas
Divisão de Radiobiologia
Comissão Nacional de Energia Nuclear-IPEN-CNEN/SP

²1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina da USP-SP

SUMÁRIO

Padronizou-se o método de radioimunoensaio de 17- β estradiol (E_2), sem purificação cromatográfica prévia, em plasma de indivíduos normais, utilizando-se o antissoro altamente específico, o soro anti E_2 [6-(0-carboximetil)-oxima] BSA, obtido pela imunização em ovelhas. Como aplicação desta técnica, foi estudado o ciclo menstrual de seis mulheres normais, avaliando-se a secreção de E_2 e as mudanças dos níveis circulantes nos períodos folicular e lúteo. Os resultados apresentados correlacionam com os citados na literatura. Estudou-se também o efeito de LH/FSH-RH (hormônio sintético de liberação de gonadotrofinas hipofisárias) nas fases 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 duas fases do ciclo.

ABSTRACT

A radioimmunoassay method of 17- β estradiol (E_2) was standardized without the need of previous chromatographic purification, in plasma of normal subjects utilizing a highly specific antiserum against E_2 - [6(0-carboxymethyl) oxime] BSA, elicited in ewes. This method was employed to evaluate E_2 secretion during menstrual cycle in normal females and the change in circulating levels in luteal and follicular phases. The results presented were correlated with those of the literature. 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 whereas during the prolonged infusion an increase in the mean E_2 level was observed at the end of the test in the 2 phases of the cycle.

INTRODUÇÃO

Foi padronizado uma técnica de radioimunoensaio para dosagem de E₂ plasmático, controlando os vários fatores que poderiam influir na precisão e sensibilidade do ensaio. (1,3). Para tanto, foi mister caracterizar o antissoro através da determinação do título, afinidade e especificidade e foi realizada uma avaliação do método considerando os seguintes parâmetros: especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão inter e intra ensaio. Padronizada a técnica para a dosagem de E₂ plasmático, aplicamos o método para avaliar a concentração de E₂ durante ambas as fases de ciclos menstruais (folicular e lútea) de mulheres jovens, a fim de definir um padrão de secreção de esteróide. Além disso, com o objetivo de verificar o funcionamento do eixo hipófise-ovário, mediu-se a concentração de E₂, 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 de infusão contínua do mesmo hormônio liberador das gonadotrofinas (prova de infusão prolongada).

MATERIAL BIOLÓGICO

a) Plasma de mulheres normais no decorrer do ciclo menstrual.

Colheram-se 11 a 17 amostras de sangue distribuídos ao redor da data correspondente ao dia possível da ovulação, de seis voluntárias sadias 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.

b) Teste de infusão aguda de hormônio liberador de gonadotrofinas (LH/FSH-RH).

Utilizaram-se 6 voluntárias normais com idade 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 de fator liberador de gonadotrofinas. O teste foi realizado na metade da fase folicular nos 6 casos e 4 na metade da fase lútea.

c) Infusão prolongada de LH/FSH-RH

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

RESULTADOS

a) Ciclo menstrual de mulheres normais:

Para comparar as mulheres, com diferente duração do ciclo, os resultados foram agrupados ao redor do pico de LH, considerado como o dia da ovulação. 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 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 1º dia de menstruação seguinte (dia + 14). (Fig.1; Tabela 1).

b) Infusão de LH/FSH-RH

Prova aguda: Não houve elevação significativa do valor médio de E_2 , nas fases folicular e lútea. (Tabelas 3 e 4).

Infusão prolongada: Na infusão prolongada, observou-se elevação dos níveis médios de E_2 , ao término do teste, nas 2 fases do ciclo. (Tabelas 4 e 5).

DISCUSSÃO

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.

Estudando o ciclo menstrual de seis mulheres normais, avaliámos a secreção de E_2 e as mudanças dos níveis circulantes nos períodos folicular e lúteo.

Os valores encontrados foram semelhantes aos obtidos por Abraham e col.², Baird e Guevara³, Guerrero e col.⁴ e Korenman e Sherman⁷, onde mostraram o nível de E_2 aumentando gradativamente de valores mais baixos, observados no início da fase folicular, tabela 1, até ao pico máximo de LH no dia da ovulação. Após o pico, o valor médio de E_2 caiu, subindo gradativamente no dia +3, atingindo uma platô até o dia +11, cujos valores não atingiram mais do que a metade do pico máximo.

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 hipofisárias - através da liberação endôgena de gonadotrofina seria capaz de, em curto prazo de tempo, determinar a secreção de E_2 com menor dose efetiva de LH/FSH-RH e também com estímulo prolongado deste fator de liberação. Em ambos os casos, a secreção de E_2 foi realizado 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 2 e 3 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^{7,8,9} os níveis de gonadotrofinas são maiores

TABELA 1

Ciclo menstrual de Mulheres Normais
17 β -estradiol (pg.mL⁻¹)

Dias	CRG 30 anos	MLS 31 anos	SBS 20 anos	ACZ 26 anos	M.O 26 anos	MJB 31 anos	X \pm s
-14	-	50,0	-	67,04	46,35	54,46	54,46 \pm 11,04
-13	-	-	56,58	-	55,00	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	-	180,13	239,50	142,89 \pm 84,75
- 2	155,40	135,92	-	213,54	118,50	-	155,84 \pm 41,31
- 1	-	260,00	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	58,18	47,95	54,99 \pm 21,85

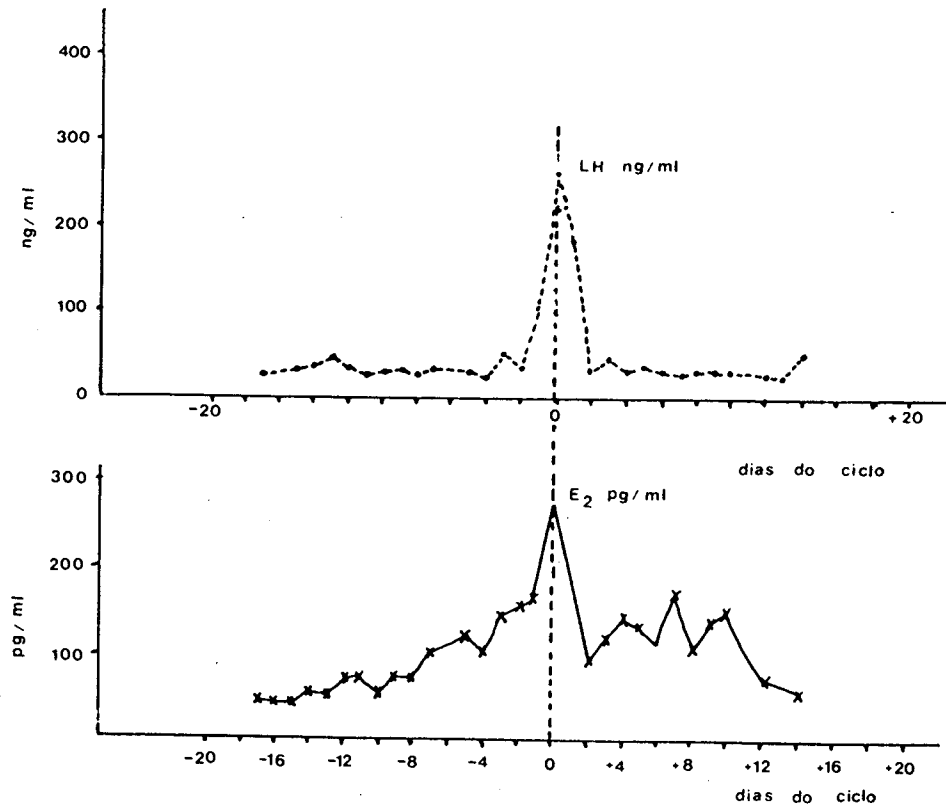


FIG.1 - Valores médios de hormônio luteinizante (LH) e estradiol plasmáticos nas fases folicular e lútea de 6 ciclos menstruais normais. O dia zero é considerado como o correspondente ao da ovulação (pico de LH).

TABELA 2 - Infusão aguda LH/FSH-RH-Fase Folicular 17β -estradiol
(pg. mL^{-1})

Pacientes	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

TABELA 3 - Infusão aguda LH/FSH-RH Fase Lútea 17β -estradiol
(pg. mL^{-1}).

Pacientes	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 4 - Infusão prolongada de LH/FSH-RH

Fase Folicular 17 β -estradiol (pg.m ℓ^{-1})			
Tempos (em minutos)			
Pacientes	0	240	480
A.G	139,30	159,80	203,80
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

TABELA 5 - Infusão prolongada LH/FSH-FH - Fase Lútea
17 β -estradiol (pg. m ℓ^{-1})

Tempo (min)			
Pacientes	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

na metade da fase lútea e mesmo assim não houve uma liberação uniforme de E₂ nesta fase.

Na infusão prolongada, na fase folicular, embora houvesse elevação de E₂ em todos os testes, no tempo de 240 minutos relativamente ao basal, a não significância obtida 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 E₂ em todos os tempos de coleta, pelo fato dos testes serem realizados quando os valores basais de E₂ variaram muito pouco entre si. Com efeito, comparando os valores nos tempos 0, 240 e 480 minutos da fase folicular e lútea, verificamos que houve significância nas diferenças entre os diversos tempo de coleta.

CONCLUSÕES

1. A avaliação de E₂ do ciclo menstrual de 6 mulheres normais, permitiu estabelecer os níveis circulantes deste hormônio nas duas fases do ciclo, coincidindo o acme de LH com o de E₂.
2. A infusão aguda LH/FSH-RH não determinou elevação significativa do E₂ nas duas fases do ciclo.
3. A infusão prolongada do LH/FSH-RH demonstrou que a resposta do ovário é maior na fase lútea do que na folicular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham, G.E. Radioimmunoassay of steroids in Biological materials. *Acta endocr. (Copenhagen)*, 75 (Suppl.183), 1974.
2. ABRAHAM, G.E.; ODELL, W.D.; SMERDLOFF, R.S.; HOPPER, K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle. *J. clin. Endocr. Metab.*; 34: 312-8, 1972.
3. BAIRD; D.T. & GUEVARA, A. Concentration of unconjugated estrone and estradiol in peripheral plasma in nonpregnant women throughout the menstrual cycle, castrate and postmenopausal women and in men. *J. clin. Endocr. Metab.*, 29: 149-56, 1969.
4. 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.
5. GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: Review of basic principles. *Semin. nucl. Med.*, 5 (2): 125-52; 1975.
6. JEWELWICZ, R.; DYRENFURTH, I.; FERIN, M.; BOGUMIL, J.; VANDEWIELE, R.L. Gonadotropine 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.

7. KOREMANN, S.G.; STEVENS, R.H.; CARPENTER, L.A.; ROBB, M.; NISWENDER, G.D.; SHERMAN, B.M. Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure validation and normal value. J. clin. Endocr. Metab., 38: 718-20, 1974.
8. NILLIUS, S.J. & WIDE, L. Progesterone-induced augmentation of pituitary gonadotropin responses to luteinizing hormone-releasing hormone in oestrogen-pre-treated amenorrhoeic women. Acta endocr. (Copenhagen), 83: 684-91, 1976.
9. 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.