

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ENSAIO E PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO RADIOMÉTRICO PARA DOSAGEM**  
**DE TESTOSTERONA LIVRE EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

**Monica Beatriz Mathor**

**Disertação apresentada como parte dos**  
**requisitos para obtenção do Grau de "Mestre**  
**na Área de Concentração em Tecnologia**  
**Nuclear Básica".**

**Orientador: Prof. Dr. José Carlos Barbério**

17  
12

**SÃO PAULO**  
**1983**

---

# ENSAIO E PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO RADIOMÉTRICO PARA DOSAGEM DE TESTOSTERONA LIVRE EM MATERIAIS BIOLÓGICOS.

## RESUMO

A autora faz uma análise do princípio do método da diálise, mostrando as vantagens da modificação introduzida nos cálculos, em comparação à técnica clássica de diálise de equilíbrio, a qual necessita da pesagem dos segmentos de celulose. Mostra os princípios técnicos analisando a variação de peso, comparando os resultados do plasma não diluído com os resultados para uma única diluição e para diluições seriadas e comparando, ainda, os resultados em soro e plasma. Os resultados obtidos por extrapolação das diluições seriadas foram iguais aos obtidos em plasma não diluído, enquanto que aqueles obtidos com apenas uma diluição foram significativamente diferentes. As características operacionais analisadas mostraram que o método é específico, pelo menos, pela técnica da diluição além de preciso, tendo uma boa reprodutibilidade tanto intra como inter-ensaio. Após a padronização do método, a autora determinou como valores percentuais médios de testosterona livre para homens e mulheres híginas na fase folicular do ciclo menstrual,  $2,57 \pm 0,45\%$  e  $1,67 \pm 0,30\%$ , respectivamente.

ASSAY AND STANDARDIZATION OF A RADIOMETRIC METHOD FOR THE  
MEASUREMENT OF FREE TESTOSTERONE CONCENTRATION IN BIOLOGICAL  
FLUIDS

ABSTRACT

The principles of equilibrium dialysis technique using semi-permeable cellulose membranes were analysed and a modification was presented for the calculation of the unbound or free fraction of plasma steroids. The results were compared with those from the classical way of calculation used in the equilibrium dialysis technique in which it is necessary to include the change in weight of the dialysis bags. Technical aspects of the method were studied such as: weight variation of the dialysis bags during dialysis, comparison of the results obtained using multiple plasma dilutions or one dilution only and comparing serum and plasma. The results obtained with the multiple dilutions technique were similar to those with non-diluted plasma while significantly different from those using one dilution only. The operational characteristics of the method were evaluated showing its specificity at least by the dilution test, besides being precise considering intra and inter-assay reproductibility. The mean  $\pm$  s.d. of the percent free testosterone levels were  $2.57 \pm 0.45\%$  and  $1.67 \pm 0.30\%$  for males and females at the mid-follicular phase respectively.

---

## ÍNDICE

### RESUMO

### ABSTRACT

	pág.
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	
1.1 - Generalidades .....	1
1.2 - Objetivo .....	4
<b>2 - MATERIAIS</b>	
2.1 - Reagentes, Sais e Soluções .....	5
2.2 - Materiais Biológicos .....	8
2.3 - Equipamentos .....	9
<b>3 - MÉTODOS</b>	
3.1 - Princípio do método radiométrico utilizado na técnica de diálise de equilíbrio .....	11
3.2 - Cromatografia de testosterona triciada .....	17
3.3 - Diálise de equilíbrio com soro ou plasma não diluído .....	17
3.4 - Diálise de equilíbrio com plasma diluído .....	20
3.5 - Diálise de equilíbrio com plasma não diluído (técnica modificada) .....	22
3.6 - Variação de peso do segmento de tubo de diálise durante o tempo .....	23
3.7 - Características operacionais .....	24
3.8 - Determinação de valores normais em plasma humano..	25
<b>4 - RESULTADOS</b>	
4.1 - Cromatografia da testosterona triciada .....	26

4.2 - Variação de peso do segmento de tubo de diálise durante o tempo .....	26
4.3 - Diluições plasmáticas .....	30
4.4 - Comparação das porcentagens de testosterona livre obtidas a partir do plasma e soro .....	37
4.5 - Comparação entre os resultados obtidos pela técnica de Kley e colaboradores (3.3) e os obtidos com as medidas apenas na "fase externa" (técnica modificada (3.5)).....	37
4.6 - Características operacionais .....	42
4.7 - Determinação dos valores normais em plasma humano .....	45
5 - DISCUSSÃO .....	47
6 - CONCLUSÕES .....	54
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Generalidades

Na circulação sanguínea, a maior parte dos hormônios esteróides não conjugados se encontra ligada, com maior ou menor afinidade, a proteínas carreadoras (9,13,33,36). Esta associação inibe a atividade biológica dos hormônios esteróides, pois, o hormônio ligado a esta proteína no sangue constitui uma reserva inativa que protege o hormônio de alterações químicas e metabólicas e, provavelmente, por dissociação reversível, se constitui em tampão contra súbitas alterações na concentração do hormônio ativo (5,34). As afinidades de esteróides fisiologicamente importantes, por proteínas carreadoras tais como globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG) e globulina de ligação dos corticosteróides (CBG), são da ordem de 2 a 3 vezes maiores do que a afinidade destes hormônios pela albumina, proteína que também se liga aos hormônios esteróides. Entretanto a ligação destes com a albumina torna-se importante, uma vez que esta se encontra presente em grandes concentrações na circulação sanguínea e devido a sua rápida dissociação do esteróide, pode suplementar a reserva de hormônios livres dentro

dos tecidos (34).

Sabendo-se que somente a fração não ligada é metabolicamente ativa, pode-se inferir que a quantificação da fração livre permite uma avaliação mais precisa da atividade biológica do esteroide do que a simples determinação de sua concentração total (11, 16, 29, 45).

Os hormônios esteróides tem diferentes funções no organismo, como por exemplo, os estrógenos e os andrógenos que são chamados hormônios sexuais. Os estrógenos são hormônios que agem fundamentalmente no desenvolvimento e maturação dos genitais femininos internos e externos e estimulam o crescimento mamário. Os andrógenos são substâncias capazes de estimular, especificamente, o desenvolvimento das características sexuais secundárias, tipo masculino, apresentando, pois, atividade androgênica. Estas substâncias afetam, também, outros sistemas do corpo e em alguns casos o efeito pode ser de maior significância do que a ação sobre a estrutura sexual.

Dentre os andrógenos podemos citar a testosterona como um dos hormônios mais importantes e que vem despertando particular interesse.

Muitos autores tem estudado variações da testosterona livre em patologias tais como: ovários policísticos (38), hirsutismo (27, 33, 41, 45), hipogonadismo (45), câncer da próstata (29); em pacientes usando drogas: tratamento de recém-nascidos com fenobarbital (12), anti-epilépticos em mulheres com epilepsia (3), exposição ao levonorgestrel (40); e outras alterações como efeitos genéticos (20), obesidade (39) e acne (18).

A testosterona tem como proteínas carreadoras:

- a) SHBG, uma  $\beta$ -globulina com peso molecular de  $\sim 100.000$ <sup>(5)</sup> que tem uma alta afinidade e uma baixa capacidade de ligação, tanto com a testosterona como com outro hormônio sexual que é o 17  $\beta$ -estradiol;
- b) Albumina, que tem uma baixa afinidade, porém uma alta capacidade de ligação;
- c) uma pequena quantidade ligada à CBG<sup>(1,4,10,11,26,35)</sup>.

Nenhum dos métodos convencionais para a determinação de hormônios esteróides, inclusive o radioimunoensaio, é suficientemente sensível para uma determinação quantitativa de esteróides livres no sangue humano. Na busca de ensaios mais sensíveis têm sido desenvolvidas várias técnicas como a diálise de equilíbrio que utiliza uma membrana semipermeável para separar o hormônio livre daquele ligado a proteína carreadora<sup>(10,11,13,17,20,22,28,29,30,32,33,38,39,43,44,45,47)</sup>; diálise de fluxo, que também utiliza uma membrana semipermeável porém adaptada a uma célula especial<sup>(21,23,24)</sup>; ultrafiltração, utilizando uma membrana semipermeável e centrifugação<sup>(6,13,15,30)</sup>; gel filtração que separa o hormônio ligado daquele livre com Sephadex<sup>(7,31,44)</sup>; radioimunoensaio em saliva<sup>(19)</sup>; analisador semi-automático (Centria Radioimmunoassay Centrifugal Analyser)<sup>(35)</sup>; método do carvão-dextran, que utiliza uma suspensão de carvão como meio de separação<sup>(12,23,24,33,41)</sup>; precipitação protéica com sulfato de zinco e hidróxido de bário<sup>(40,42)</sup>; ou, indiretamente, medindo a capacidade de ligação à SHBG<sup>(3,18,27)</sup>, todos utilizando técnicas radiométricas. Embora

tenha sido demonstrado que resultados similares podem ser obtidos com a maioria das técnicas citadas, cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens. Alguns métodos têm a vantagem de utilizar pequena quantidade de material biológico ou de serem efetuados em curto espaço de tempo, porém têm a desvantagem de necessitarem de anticorpos altamente sensíveis ou aparelhagem especial; outros métodos apresentam valores muito discrepantes de um autor para outro e outros, ainda, medem somente o hormônio livre de uma proteína específica como, por exemplo, da globulina de ligação dos hormônios sexuais (SHBG).

## 1.2 - Objetivo

Devido aos motivos expostos propuzemo-nos padronizar um método de determinação de esteróides livres em materiais biológicos, que pudesse ser usado rotineiramente em laboratórios de dosagens hormonais. Dentre as técnicas descritas, a diálise de equilíbrio foi a que mais se ajustou a esta finalidade, principalmente, em termos de custo e aparelhagem utilizada. Propuzemo-nos, então, desenvolver essa técnica para determinação de testosterona livre, esteróide cujo estudo vem despertando particular interesse.

## 2 - MATERIAIS

### 2.1 - Reagentes, Sais e Soluções

2.1.1 - Hormônio Radioativo: Testosterona 1,2, <sup>3</sup>H(N), 40 Ci/mmol, cat. NET-187 obtido da New England Nuclear Corp, Boston, Massachusetts, E.E.U.U., em solução de benzeno-etanol (9:1).

2.1.2 - Solventes Orgânicos Ácido clorídrico, grau laboratório, álcool metílico, benzeno e isooctano para cromatografia e tolueno da firma Merck Darmstadt, República Federal da Alemanha.

2.1.2.1 - Solução I (solução de intumescimento): benzeno: metanol (85:15 v:v).

2.1.2.2 - Solução II (solução de eluição): isooctano : benzeno: metanol (90:5:5 v:v:v).

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

2.1.3.1 - Intumescimento do Sephadex: 15 g de Sephadex foram intumescidos com 10 ml de solução I durante aproximadamente 18 horas.

2.1.3.2 - Empacotamento do Sephadex: Sephadex, previamente intumescido, foi empacotado em uma coluna cromatográfica de 15 cm x 1 cm com uma placa de vidro poroso adaptada na sua base e esta recoberta com um disco de fibra de vidro .

2.1.3.3 - Saturação do Sephadex: Após o empacotamento percolaram-se cerca de 50 ml da solução II . Saturado o Sephadex, aplicou-se outro disco de fibra de vidro no topo do mesmo.

2.1.4 - P.P.O. (2,5 difeniloxazole): Amersham/Searle, Illinois, E.E.U.U.

2.1.5 - Dimetil P.O.P.O.P. (1,4-bis (2(4-metil-5 feniloxazolidin)- benzeno) - Amersham/Searle, Illinois, E.E.U.U.

2.1.6 - Triton X-100 (iso-octil-fenoxipoletoxi-etanol) Rohn and Haas, Filadelfia, Pensilvania, E.E.U.U.

2.1.7 - Líquido de Cintilação:

2.1.7.1 - Solução A (solução concentrada): 40g de P.P.O. e 0,50 g de dimetil P.O.P.O.P., dissolvidos em 1000 ml de tolueno.

2.1.7.2 - Solução B: mistura de Triton X-100: Tolueno (1:2 v:v).

- 2.1.7.3 - Solução de uso: 100 ml da solução A diluídos em 900 ml da solução B; 9 ml desta solução foram suficientes para solubilizar aproximadamente 1 ml da amostra aquosa acidificada com 0,1 ml de ácido clorídrico 2 N.
- 2.1.8 - Azida sódica (AzNa): Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.
- 2.1.9 - Fosfato monobásico ( $\text{Na H}_2 \text{P O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): Merck, Darmstadt, República Federal da Alemanha.
- 2.1.10 - Hidróxido de Sódio (NaOH): Merck Darmstadt, República Federal da Alemanha.
- 2.1.11 - Solução tampão (tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4): A 8,9g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  adicionou-se 1,0g de AzNa, aos quais foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada e mantidos sob agitação magnética até a dissolução completa dos sais. O pH foi ajustado para 7,4 com o auxílio de pastilhas de NaOH.
- 2.1.12 - Solução tampão contendo hormônio triciado: adicionou-se à solução tampão uma quantidade suficiente de 1,2,  $^3\text{H(N)}$ -testosterona para obter-se uma solução contendo aproximadamente 8000 cpm / 10 ml da solução tampão.

2.1.13 - Membrana de diálise: tubo de celulose Spectrapor cat. nº 8667A, Fisher Scientific Co, Pittsburgh, E.E.U.A.

2.1.14 - Fio revestido com parafina: fio dental Johnson's, da Johnson & Johnson S.A. Ind. e Com., S. J. dos Campos, São Paulo.

## 2 - Material Biológico

2.2.1 - Mistura de soro e de plasma (pool): de indivíduos normais, do sexo masculino e do sexo feminino, foram obtidos de banco de sangue.

2.2.2 - Soro humano: obtido por colheita venosa, de homens e mulheres hígidos entre 20 e 40 anos, no horário compreendido entre 8 e 10 horas, sendo todas as coletas feitas quando os voluntários encontravam-se em jejum. O sangue foi mantido em banho-maria por aproximadamente uma hora e posteriormente centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, para possibilitar a retirada do soro. Após a separação, o soro foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

2.2.3 - Plasma humano: Parte do sangue, dos mesmos voluntários acima citados, foi recolhido em tubos contendo aproximadamente 1 microgota de heparina sódica e centrifugada imediatamente. O plasma foi separado e estocado

atē o momento do uso, quando foi novamente centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos para separar a fibrina.

## 2.3 - Equipamentos

- 2.3.1 - Agitador magnético modelo 18: Fisher Scientific Corporation, E.E.U.U.
- 2.3.2 - Balança analítica: Mettler H 20 T - Zurique, Suíça .
- 2.3.3 - Banho com aquecimento e agitação: Dubnoff Metabolic Shaking Incubator, Precision Scientific, Chicago, Illinois, E.E.U.U.
- 2.3.4 - Centrífuga refrigerada: Damon IEC tipo PR-600, International Equipment Company, Boston, Massachusetts , E.E.U.U.
- 2.3.5 - Congelador
- 2.3.6 - Detector de cintilações beta: Beckman LS-150, Beckman Instruments, Inc., E.E.U.U.
- 2.3.7 - Potenciômetro para determinação de pH: Präzisions - pH Meter ES 10, Metrohm Herisau Suíça.
- 2.3.8 - Placa de Aquecimento: Thermolyne Sybron Corporation, type 1900, Dubuque, Iowa, E.E.U.U.

**2.3.9 - Refrigerador**

**2.3.10 - Vortex: Mixer Gene model K 550-G, Scientific Industries Inc., Springfield, Massachusetts, E.E.U.U.**

### 3 - MÉTODOS

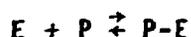
#### 3.1 - Princípio do método radiométrico utilizado na técnica de diálise de equilíbrio

O método baseia-se na semipermeabilidade da membrana de celulose, a qual retém macromoléculas, permitindo a passagem de solventes e de pequenas moléculas. A força de impulsão será a pressão de difusão relativa ao gradiente de concentração da molécula em estudo através da membrana semipermeável. Assim, teremos uma difusão das moléculas pequenas até que o gradiente de concentração seja igual a zero. Pode-se afirmar que a membrana de diálise funciona como uma peneira mecânica, significando que os fatores limitantes em qualquer diálise são: o tamanho efetivo dos poros da membrana e o tamanho dos solutos em estudo. Para solutos maiores do que os poros da membrana, obviamente, não haverá penetração; para solutos muito menores que os poros da membrana, a difusão é irrestrita e a razão de transferência é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão, ao gradiente de concentração e a área da membrana ocupada pelos poros<sup>(37)</sup>.

A utilização da radiometria, ou seja, a presença de um traçador radioativo possibilitando a determinação da porcentagem do

hormônio livre, se prende ao fato de que o hormônio marcado tem, praticamente, as mesmas características químicas e estruturais do endógeno correspondente, distribuindo-se de maneira análoga a este (14,25).

A noção de hormônio livre está essencialmente baseada na suposição de que a interação entre o hormônio e a proteína de ligação é reversível e governada pela lei da ação das massas<sup>(9)</sup> que no presente contexto pode ser estabelecida como:



sendo que:

$$\begin{aligned} & \text{a velocidade de associação entre o hormônio e a proteína} = \\ & = K_a |E| |P| \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{e a velocidade de dissociação do complexo hormônio-proteína} = \\ & = K_d |P-E| \end{aligned}$$

onde:

$$K_a = \text{constante de associação do complexo}$$

$$K_d = \text{constante de dissociação do complexo}$$

$$|P| = \text{concentração proteica}$$

$$|E| = \text{concentração do hormônio livre}$$

$$|P-E| = \text{concentração do complexo hormônio-proteína}$$

No equilíbrio as reações de associação e dissociação estão balanceadas:

$$K_a |E| |P| = K_d |P-E| \quad \therefore \quad \frac{K_a}{K_d} = \frac{|P-E|}{|E| |P|}$$

Como a relação das constantes  $K_a/K_d$  é por definição a constante de afinidade (K), teremos:

$$K = \frac{|P-E|}{|E||P|}$$

e a porcentagem de E será evidentemente:

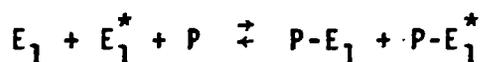
$$\%E = \frac{|E|}{|E| + |P-E|} \times 100 \quad (I)$$

jã que:  $|E_t| = |E| + |P-E|$

onde :  $|E_t| =$  concentração total do hormônio

Teremos então:  $\%E = \frac{|E|}{|E_t|}$

No novo equilíbrio, após a adição do traçador, teremos:

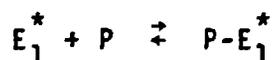


onde os índices:

1 = moléculas da "fase interna"

\* = moléculas marcadas com trício

Considerando que  $E^*$  está distribuído de maneira homogênea em E:



com uma constante de afinidade:

$$K' = \frac{|P-E_1^*|}{|E_1^*||P|}$$

Como a adição de uma massa  $E^*$  não altera a constante de afinidade:

$$K = K'$$

Então:

$$\frac{|P-E|}{|E||P|} = \frac{|P-E_1^*|}{|E_1^*||P|} \dots \frac{|P-E|}{|E|} = \frac{|P-E_1^*|}{|E_1^*|}$$

Considerando que a concentração do esteróide em questão, encontrada no plasma é muito menor do que a das proteínas ligantes e que a adição de  $E^*$  com a massa fria correspondente, seria compatível com as quantidades de  $E$ , e portanto as condições de equilíbrio não seriam alteradas, teríamos:

$$|E| - |E_1^*| = |E| + |P-E| - |E_1^*| + |P-E_1^*| \quad (II)$$

Substituindo (II) em (I):

$$\%E = \frac{|E_1^*|}{|E_1^*| + |P-E_1^*|} \quad (III)$$

Pelas leis da diálise, no equilíbrio:

$$|E_1 + E_1^*| = |E_2 + E_2^*|$$

Onde o índice:

2 = moléculas da "fase externa"

E considerando que as atividades específicas são iguais:

$$|E_1^*| = |E_2^*| \quad (IV)$$

Desde que a interferência da liberação de E do complexo P-E nas atividades específicas deverá ser de pequena monta, podemos substituir (IV) em (III):

$$\%E = \frac{|E_2^*|}{|E_1^*| + |P-E_1^*|}$$

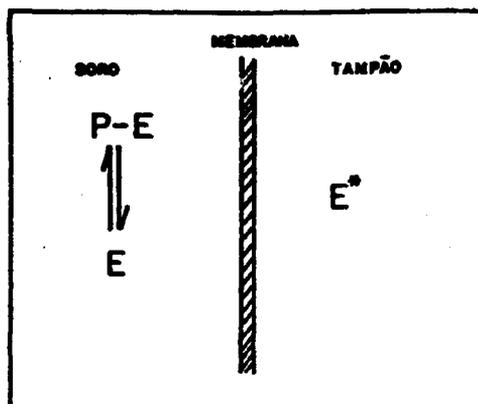
Portanto:

$$\%E = \frac{\text{radioatividade externa/ml}}{\text{radioatividade interna/ml}}$$

Na Figura 1, encontram-se esquematizadas as situações das moléculas em estudo: no início da diálise (Figura 1a), na "fase interna" temos um equilíbrio dinâmico entre o hormônio livre (E) e aquele ligado à proteína carreadora (P-E), e após a diálise, quando o equilíbrio final foi atingido (Figura 1b), o hormônio radioativo ( $E^*$ ) está distribuído proporcionalmente da mesma maneira do que o hormônio endógeno. Assim, na "fase externa" encontramos unicamente o hormônio livre (sem estar ligado a P) :  $E + E^*$ , e na "fase interna" a forma livre ( $E + E^*$ ) e aquela ligada à proteína carreadora (P-E em equilíbrio com  $P-E^*$ ).

Desta forma, a medida do traçador na "fase externa" será o indicador da fração livre do esteróide e a medida deste na "fase interna" será o indicador do esteróide total.

ANTES DO EQUILIBRIO



NO EQUILIBRIO

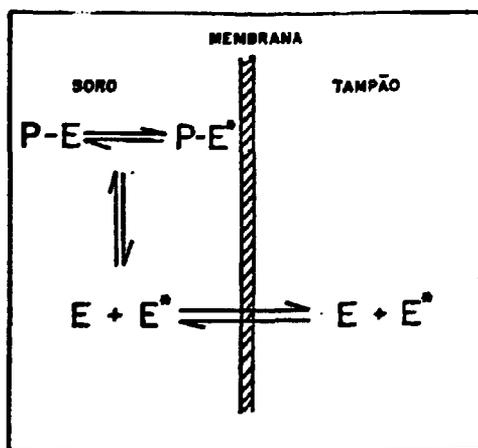


Figura 1 - Esquema das situações das moléculas em estudo

### 3.2 - Cromatografia de testosterona triciada

Como o hormônio marcado deve estar livre de outros esteróides contaminantes ou de produtos de degradação do mesmo (por estocagem ou auto-radiólise), para que possa ser utilizado na técnica adotada que exige traçadores puros, fizemos a verificação de pureza utilizando cromatografia em coluna<sup>(2)</sup> com Sephadex LH-20, preparada conforme técnica descrita nos itens 2.1.3.1 a 2.1.3.3., a cada 6 meses.

Coletamos os eluatos em frações de 2 ml cada, em frascos de cintilação, sendo posteriormente evaporado o solvente orgânico e o extrato ressuspendido em 5 ml da solução cintiladora.

### 3.3 - Diálise de equilíbrio com soro ou plasma não diluídos

A técnica utilizada foi a descrita por KLEY e colaboradores<sup>(17)</sup>, obedecendo a seguinte seqüência:

- a) Cortam-se segmentos de tubos de celulose de aproximadamente 15 cm (Figura 2a);
- b) Os segmentos são imersos em água destilada por 30 minutos, para lavagem;

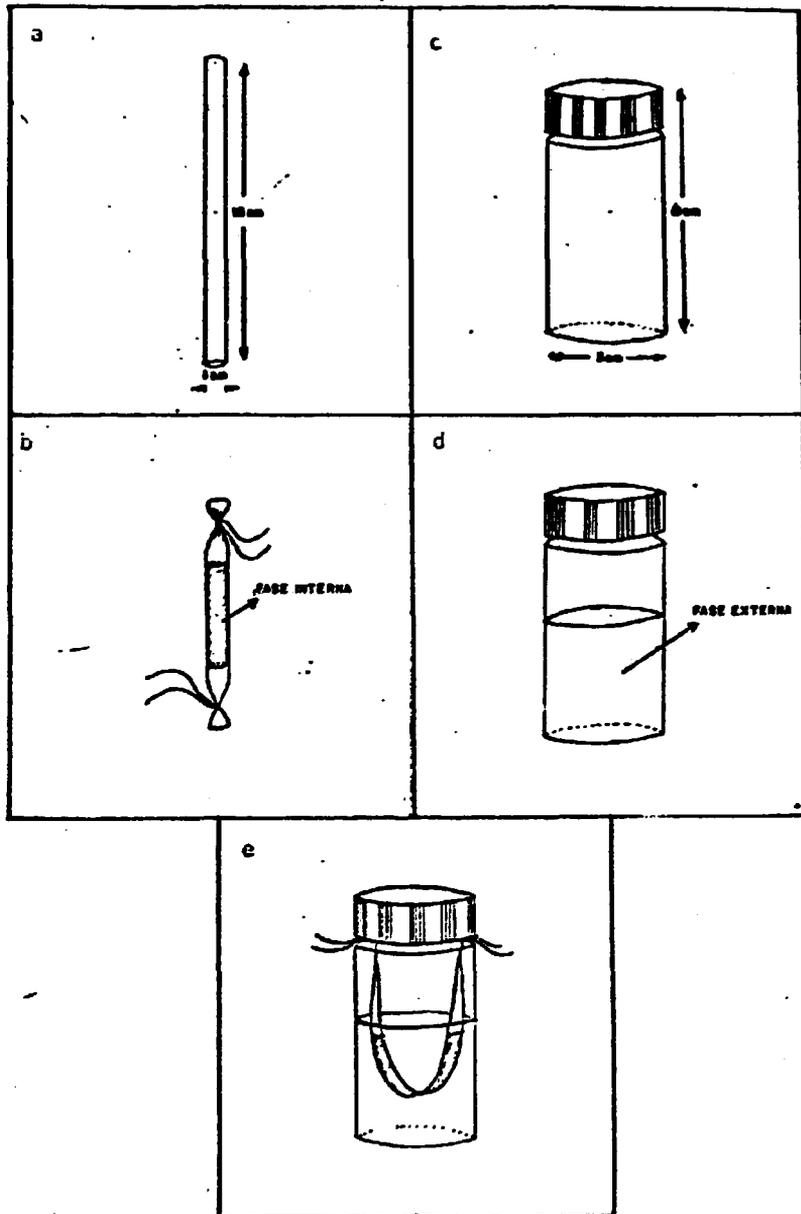


Figura 2 - Preparo do material para realização da diálise de equilíbrio

- c) Da água, os segmentos de tubos de celulose são transferidos para a solução tampão (2.1.11), onde permanecem durante a noite, por período de aproximadamente 16-18 horas;
- d) Adicionam-se a frascos de cintilação (Figura 2c) 10 ml de solução tampão contendo aproximadamente 8000 cpm de testosterona triciada (Figura 2d), sendo esta considerada a "fase externa";
- e) Preenchem-se os segmentos com 1 ml de plasma, fechando-se os lados com fio revestido com parafina, conforme Figura 2b, sendo esta considerada a "fase interna";
- f) Pesam-se os sacos a serem dialisados acondicionando-os imediatamente em forma de U dentro dos frascos previamente preparados, como mostra a Figura 2e;
- g) Incubam-se em banho a 37°C por 16 horas, sob agitação (60 ciclos/min) no aparelho Dubnoff;
- h) Após a incubação, os tubos de diálise são novamente pesados e o seu conteúdo imediatamente esvaziado em tubo de ensaio;
- i) Em frascos de cintilação contendo 8 ml de solução cintiladora (2.1.7.3.), pipetam-se 1 ml da "fase externa" e 0,3 ml da "interna", separadamente, completando-se o volume do segundo frasco para 10 ml com 0,7 ml de solução tampão;
- j) Determinam-se a radioatividade de ambas as fases no detector de cintilações beta (2.3.5);

As fórmulas para calcular a porcentagem de testosterona livre são as seguintes, segundo KLEY<sup>(17)</sup>:

$$cpm_{corr} = cpm_{int} + (cpm_{int} \times p/vol_{int} - cpm_{ext} \times p/vol_{ext})$$

$$\% \text{ livre} = (cpm_{ext} \times vol_{int} / cpm_{corr} \times vol_{ext}) \times 100$$

onde:

cpm = contagens por minuto

cpm<sub>cor</sub> = cpm<sub>int</sub> corrigido pela diferença de volume

cpm<sub>int</sub> e cpm<sub>ext</sub> = radioatividade medida nas fases "interna" e "externa" respectivamente.

vol<sub>int</sub> e vol<sub>ext</sub> = volume utilizado para medir a radioatividade de

p = diferença de peso causada pelo aumento do volume da fase "interna", após a diálise.

### 3.4 - Diálise de equilíbrio com plasma diluído

De acordo com procedimento já descrito<sup>(11,13,32,38,43,44,45)</sup> realizamos em 10 amostras diálise de equilíbrio de plasma diluído 1:5 segundo o descrito no item 3.3.

Efetuamos também as seguintes diluições do plasma:

1:2,5; 1:5; 1:7,5; 1:10; 1:15; 1:20, em solução de tampão fosfato, sendo então preenchidos segmentos dos tubos de diálise com

1 ml de cada diluição, seguindo o procedimento descrito no item 3.3.

As fórmulas para calcular a porcentagem de testosterona livre foram as seguintes:

### 3.4.1 - Cálculo da porcentagem por meio de cada diluição

Observamos que, com o plasma diluído, não houve variação de peso antes e após diálise e, portanto, segundo a equação de KLEY modificada para plasma diluído:

$$\% \text{ livre} = \frac{\text{cpm}_{\text{ext}} \times \text{vol}_{\text{int}}}{\text{cpm}_{\text{int}} \times \text{vol}_{\text{ext}} \times f} \times 100$$

onde:  $f$  = fator de diluição

### 3.4.2 - Cálculo da porcentagem por meio da curva de diluição

a)  $\% \text{ livre} = \frac{\text{cpm}_{\text{ext}} \times \text{vol}_{\text{int}}}{\text{cpm}_{\text{corr}} \times \text{vol}_{\text{ext}}} \times 100$ , para cada diluição

b) traça-se a curva de porcentagem de testosterona livre em ordenada versus diluição em abscissa

c) o valor da porcentagem de testosterona livre no plasma não diluído é obtido por extrapolação, a partir da reta construída no gráfico do item b, para o plasma não diluído, ou pela equação da reta  $y = a \times x + b$  (obtida pela regressão linear), quando  $x = 1$ .

### 3.5 - Diálise de equilíbrio com plasma não diluído (técnica modificada)

O procedimento geral foi o mesmo descrito no item 2.2 , onde os itens a, b, c, e e g permaneceram inalterados e f e h não foram utilizados. As alterações nos demais itens foram as seguintes:

- d.1) Adicionam-se a frascos de cintilação, 11 ml de solução tampão fosfato contendo aproximadamente 800 cpm de testosterona triciada por ml;
- d.2) O sistema é estabilizado por repouso de, aproximadamente, 1 hora;
- d.3) Retira-se 1 ml desta solução para contagem da radioatividade inicialmente adicionada. Os 10 ml restantes constituirão a "fase externa", como na técnica original;
- i) Em frascos de cintilação contendo 9 ml de solução cintiladora, pipeta-se 1 ml da "fase externa" após a diálise , procedendo da mesma maneira com a solução do item d.3 (pré-diálise);
- j) Determinam-se a radioatividade da "fase externa" antes e após a diálise, no detector de cintilações beta.

As fórmulas para calcular a porcentagem de testosterona livre são as seguintes:

$$\text{cpm}_{\text{int}} / \text{ml} = (\text{cpm}_{\text{tot}} - \text{cpm}_{\text{ext}}) \times 10$$

$$\% \text{ livre} = \frac{\text{cpm}_{\text{ext}} / \text{ml}}{\text{cpm}_{\text{int}} / \text{ml}} \times 100$$

onde:

$\text{cpm}_{\text{tot}}$  = radioatividade da "fase externa" medida antes da diálise

$\text{cpm}_{\text{ext}}$  = radioatividade da "fase externa" medida após a diálise

### 3.6 - Variação de peso do segmento de tubo de diálise durante o tempo

3.6.1 - Antes da diálise: adicionamos 1 ml de plasma em um segmento de celulose previamente tratado (itens 3.3.a e 3.3.c):

Após fecharmos as extremidades procedemos a pesagens sucessivas em intervalos de 5' durante os primeiros 30', intervalos de 10' até os 120' e intervalos de 30' até completar 270' (4h e 30').

3.6.2 - Após a diálise: a técnica da diálise de equilíbrio foi seguida conforme item 3.3. até o item 3.3.h, onde, ao invés de uma única pesagem foram efetuadas medidas sucessivas em intervalos de 10' nos primeiros 30' e de 30' até completar 270'.

### 3.7 - Características operacionais

Foram avaliadas as seguintes características operacionais dos métodos descritos:

3.7.1 - Especificidade: A especificidade da técnica foi avaliada pelas curvas obtidas com os resultados das várias diluições do plasma (item 3.4), que devem se apresentar ao longo de uma linha reta. A prova de diluição é uma condição necessária para afastar interferentes no ensaio, os quais devem-se reduzir com o aumento das diluições.

3.7.2 - Precisão: Verificamos a precisão do método calculando o coeficiente de variação dos resultados encontrados em duas misturas ("pool") de amostras de plasma, analisando a sua reprodutibilidade:

3.7.2.1 - Intra-ensaio: Uma série de alíquotas das duas misturas foram medidas por 7 e 9 vezes.

3.7.2.2 - Inter-ensaio: Alíquotas iguais das mesmas misturas foram distribuídas em vários ensaios em dias diferentes.

### 3.8 - Determinação de valores normais em plasma humano

Após a padronização da técnica modificada da diálise de equilíbrio com plasma não diluído (item 3.5), medimos 29 amostras de mulheres híginas na fase folicular e de 19 homens, com idades variando entre 20 e 40 anos.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Cromatografia da testosterona triciada

A Figura 3 mostra o cromatograma de eluição da testosterona triciada, em Sephadex LH-20, onde podemos observar a pureza da mesma, como indicado por um pico nas frações 21-24.

O mesmo ocorreu com os outros cromatogramas obtidos a cada 6 meses; portanto, como não observamos degradação, não houve necessidade de purificação do esteróide triciado no decorrer do nosso trabalho.

### 4.2 - Variação de peso do segmento de tubo de diálise durante o tempo

Na Tabela I mostramos os resultados da variação de peso do segmento de tubo de diálise com o tempo, antes e após diálise.

Esta variação é melhor visualizada na Figura 4, onde podemos observar que apesar do peso variar, tanto antes como após a diálise, houve uma perda maior de peso antes da diálise, no período

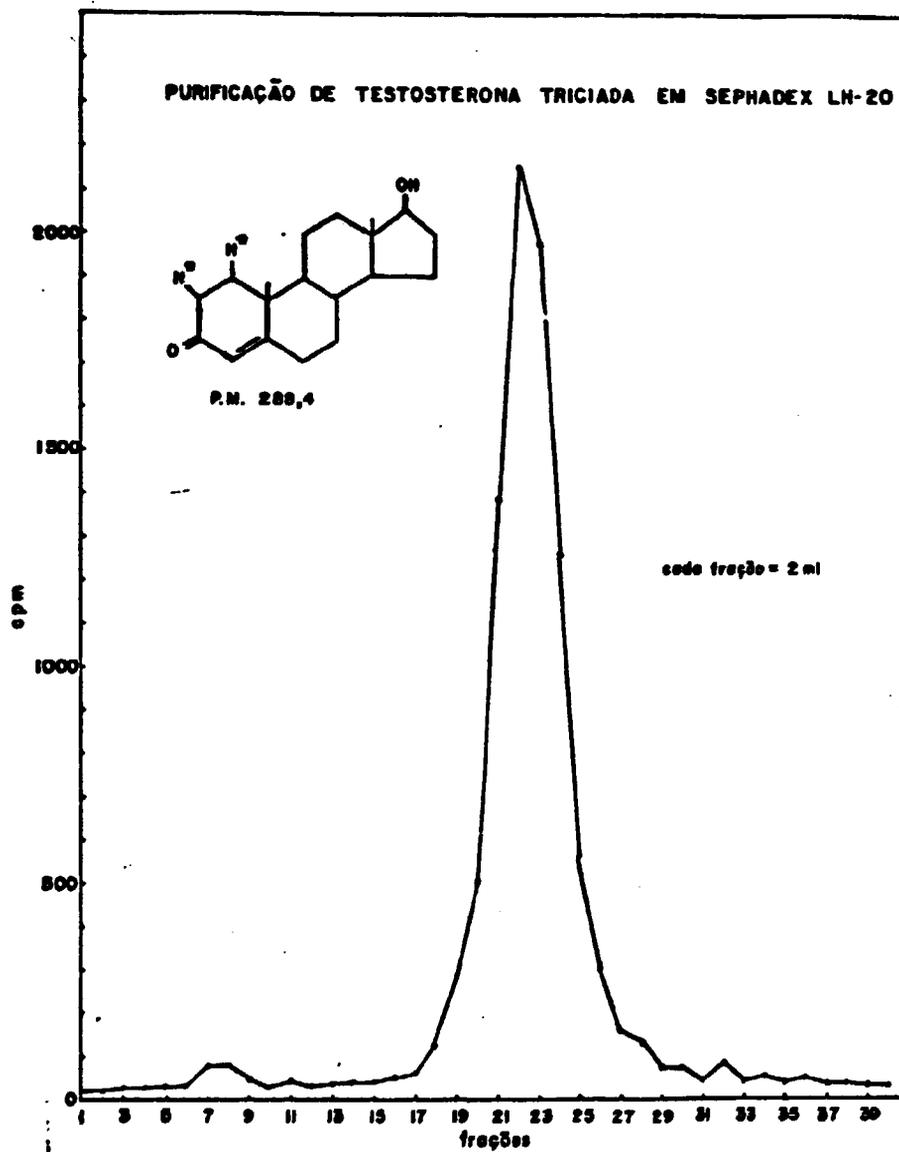


Figura 3 - Cromatograma de eluição da testosterona triciada em Sephadex LH-20

Tabela I - Variação de peso nos segmentos do tubo de diálise, preenchidos com 1 ml de plasma. Avaliação antes e após diálise de equilíbrio.

Tempo (minutos)	Peso (g)	
	Antes da diálise	Após a diálise
0	1,34383	1,33736
5	1,34306	—
10	1,33742	1,33047
15	1,33148	—
20	1,32591	1,32852
25	1,32100	—
30	1,31459	1,32561
40	1,30852	—
50	1,30090	—
60	1,29287	1,31733
70	1,28682	—
80	1,28062	—
90	1,27364	1,31016
100	1,26793	—
110	1,25685	—
120	1,24023	1,30045
150	1,23446	1,29270
180	1,21969	1,28461
210	1,18379	1,27752
240	1,17923	1,26779
270	1,16034	1,26074
Variação do peso*	0,18349	0,07662
Variação percentual*	13,65%	5,73%

\* valor inicial - valor aos 270 minutos

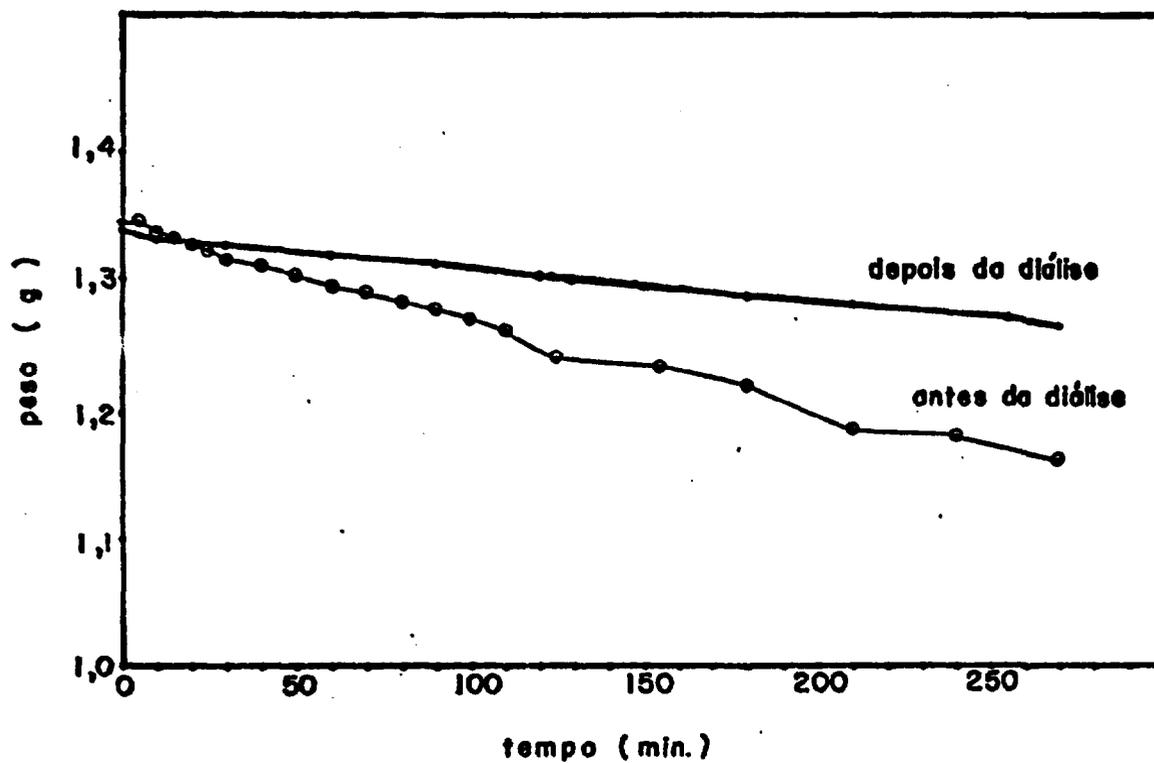


Figura 4 - Variação do peso nos segmentos de tubos de diálise contendo 1 ml de plasma. Avaliação antes e após diálise de equilíbrio.

do de 270 minutos, com uma variação de -13,85% (1,34383 g → 1,16034 g), comparada com a variação de -5,73% (1,33736 g → 1,26074 g) após a diálise.

#### 4.3 - Diluições plasmáticas

4.3.1 - Na Tabela II estão os valores da porcentagem de testosterona livre obtidos em plasma diluído (1:5), utilizando o fator de diluição para efeito de cálculo e aqueles obtidos nestes mesmos plasmas, porém pelo método direto.

A análise das médias nos mostrou serem significativamente diferentes pelo teste t de "Student" ao nível de 5% ( $t_{obs} = 16,0190$ ,  $t_{0,05} = 2,306$ ).

A correlação entre a porcentagem de testosterona livre, obtida a partir do plasma diluído, com os resultados correspondentes com plasma não diluído, foi de  $r = 0,3710$  ( $n = 10$ ) não sendo significativa ( $r_{0,05} = 0,6319$ ).

Tabela II - Porcentagem de testosterona livre em 10 amostras de plasma, medidas pela técnica direta no plasma não diluído e com diluição 1:5

	Diluição 1:5 (%)	Método Direto. (%)
	1,44	2,21
	1,38	2,03
	1,34	1,88
	1,20	3,15
	2,04	4,32
	2,21	2,51
	2,20	2,50
	1,02	1,71
	1,80	3,12
	2,98	2,71
$\bar{x}$	1,76	2,61
D.P.	0,60	0,77
$t_{\text{calc.}} = 16,019 > t_{\text{crit.}} = 2,306$		

Houve diferença significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  entre as médias obtidas por ambas as técnicas.

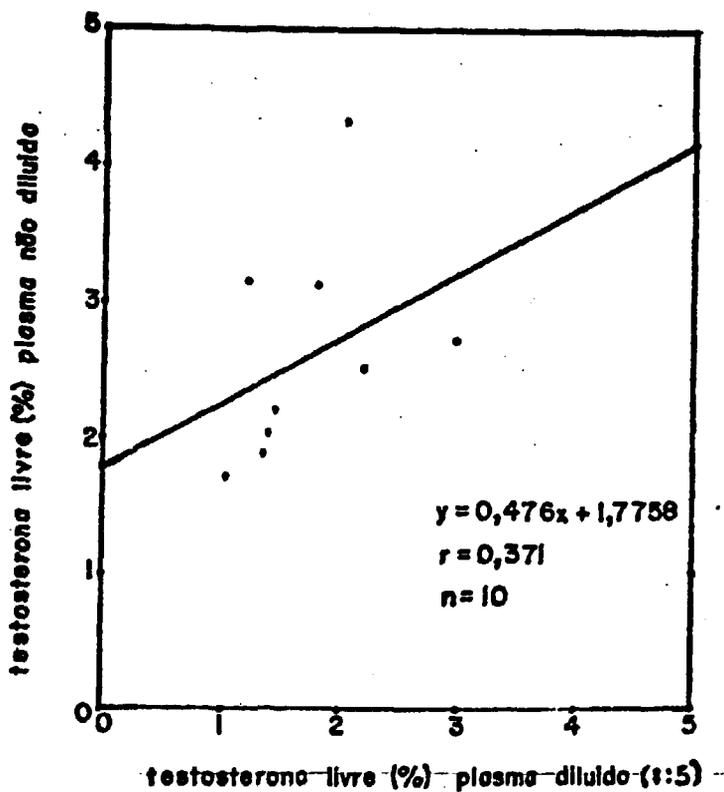


Figura 5 - Correlação entre a porcentagem de testosterona livre obtida com plasma diluído (1:5) e a partir de plasma não diluído.

4.3.2.1 - A Tabela III mostra as equações das retas da regressão linear das diluições seriadas de 5 amostras plasmáticas conforme os cálculos indicados no item 3.4.2, com seus respectivos coeficientes de correlação. Observamos que a correlação entre as diluições do plasma e a porcentagem de testosterona livre foi perfeitamente linear, com valor médio de 0,9967.

Na Figura 6 mostramos duas destas retas de diluição seriada do plasma versus porcentagem de testosterona livre.

4.3.2.2 - A observação da Tabela IV mostra que na comparação dos resultados da porcentagem de testosterona livre obtidos pela diluição seriada do plasma e pelo método direto, nas 5 amostras de plasma, os valores não foram significativamente diferentes ( $t_{\text{observado}} = 0,10656$ ;  $t_{0,05} = 3,182$ ).

Por outro lado, a comparação entre os 2 métodos foi altamente significativa ( $r_{\text{obs}} = 0,9658$ ;  $r_{0,05} = 0,8783$ ), apesar do pequeno número de amostras.

Tabela III - Equações das retas correspondentes aos resultados da diálise de equilíbrio com diluições seriadas de amostras de plasma.

Amostra (nº)	Equação da Reta (regressão linear)	Coefficiente de correlação (r)
1	$y = 1,2016x + 0,9252$	0,9984
2	$y = 1,2480x + 0,6117$	0,9963
3	$y = 1,2618x + 0,5157$	0,9988
4	$y = 0,8875x + 1,7222$	0,9930
5	$y = 1,3615x + 3,5747$	0,9972
		$\bar{X} = 0,9967$

Onde:

$x$  = recíproco da diluição

$y$  = % de testosterona livre para uma dada diluição

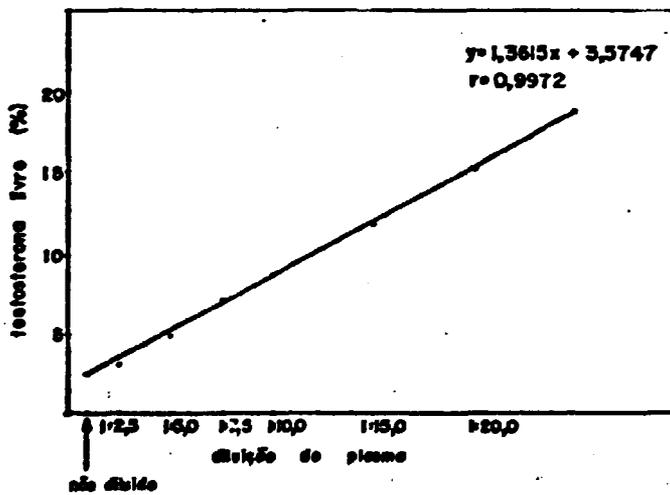
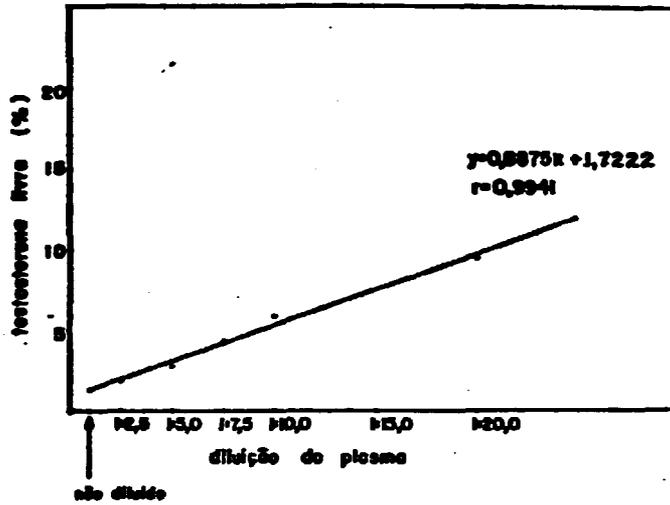


Figura 6 - Efeito da diluição do plasma na porcentagem de testosterona livre determinada pela diálise de equilíbrio, em 2 amostras diferentes de plasma.

Tabela IV - Comparação dos resultados da porcentagem de testosterona livre obtidos pelas diluições seriadas do plasma e pelo método direto.

% Testosterona Livre		
	Diluição Seriada	Método Direto
	2,13	2,21
	1,86	2,03
	1,77	1,88
	2,61	3,15
	4,94	4,32
$\bar{X}$	2,66	2,21
D.P.	1,32	1,02
$t_{\text{calc.}} = 0,107 < t_{\text{crit.}} = 3,182$		

Não houve diferença significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$  entre as médias obtidas por ambas as técnicas.

#### 4.4 - Comparação das porcentagens de testosterona livre obtidas a partir do plasma e soro

Os resultados obtidos para soro e plasma, utilizando o método de diálise de equilíbrio para material não diluído (item 3.3), mostram não haver diferença significativa entre as médias ( $t_{obs} = 1,339$  e  $t_{0,05} = 2,042$ ) obtidas - Tabela V.

A correlação entre os valores da % testosterona livre no plasma e soro foi significativa, sendo dada pela equação  $y = 0,8480x + 0,1730$  com uma correção de 0,9268 ( $n=32$ ) - Figura 7.

#### 4.5 - Comparação entre os resultados obtidos pela técnica de Kley e colaboradores (3.3) e os obtidos com as medidas apenas na "fase externa" (técnica modificada (3.5) ).

A Tabela VI mostra os resultados de 62 pares de amostras medidas pelos dois métodos de cálculo, em que se pode observar que as diferenças das médias não foram estatisticamente significativas ( $t_{obs} = 0,806$ ;  $t_{0,05} = 2,000$ ).

A comparação dos resultados obtidos pelos 2 métodos mostrou uma regressão linear (Figura 8) dada pela equação  $y = 1,0044x - 0,1242$  com uma correlação altamente significativa de 0,9852 para  $n = 62$  ( $r_{0,05} = 0,2500$ ).

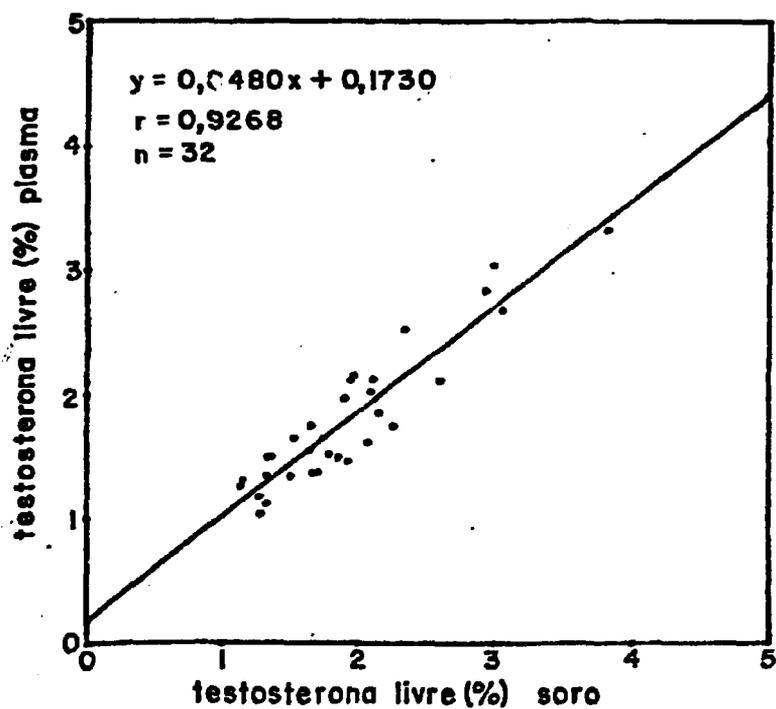


Figura 7 - Correlação entre as porcentagens de testosterona livre em amostras pareadas de plasma e soro.

Tabela VI - Resultados da porcentagem de testosterona livre obtidos em 62 amostras de plasma, pelos dois métodos de medidas.

= Testosterona Livre		
	Método Padronizado	Medida Modificada
	1,88	1,84
	1,69	1,76
	2,42	2,60
	2,81	2,98
	3,99	3,74
	2,76	2,80
	3,28	3,33
	2,89	3,00
	2,18	2,17
	1,27	1,31
	2,14	2,20
	2,12	2,19
	2,38	2,32
	1,52	1,57
	3,81	3,70
	3,04	3,11
	3,44	3,50
	3,24	3,34
	3,34	3,52
	2,94	3,26
	3,06	3,46
	3,74	3,73
	2,89	3,19
	2,28	2,58
	2,21	2,45
	1,18	1,19
	1,26	1,44
	2,06	2,46
	1,82	1,91
	1,93	1,86
	1,35	1,49
	1,98	2,26
	1,71	1,80
	1,60	1,83
	1,44	1,53
	2,09	1,79
	1,63	1,85
	2,08	2,22
	1,76	1,90
	1,65	1,72
	1,73	1,94
	2,90	3,20
	1,76	1,97
	2,27	2,29
	2,12	1,24
	1,32	1,45
	1,50	1,65
	1,86	1,84
	1,31	1,42
	1,15	1,15
	1,35	1,50
	1,51	1,61
	1,38	1,65
	1,67	1,72
	1,26	1,53
	1,13	1,28
	1,04	1,29
	1,29	1,49
	1,35	1,74
	1,33	1,53
	1,66	1,72
	1,54	1,61
X	2,04	2,15
D.P.	0,77	0,75
	$t_{calc.} = 0,806 < t_{crit.} = 2,000$	

Não houve diferença significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$  entre as  $\bar{m}$ é dias obtidas por ambas as técnicas de medidas.

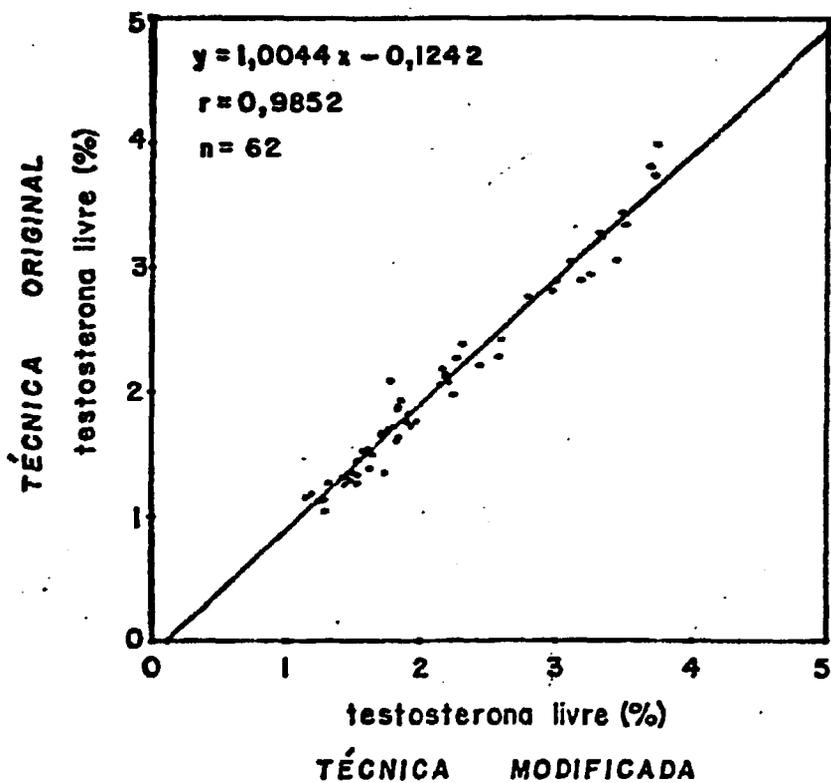


Figura 8 - Correlação entre as porcentagens de testosterona livre obtidas com a medida modificada (técnica modificada) e segundo a avaliação pela técnica original de Kley (técnica original).

## 4.6 - Características Operacionais

### 4.6.1 - Especificidade

Na Tabela III podemos verificar que a correlação entre a diluição e a porcentagem de testosterona livre, foi em média 0,9967, variando de 0,9930 a 0,9988 (n = 5).

### 4.6.2 - Precisão

4.6.2.1 - A Tabela VII mostra a reprodutibilidade intra-ensaio, para ambas as "técnicas" (original e modificada), sendo que os coeficientes de variação foram de 6,16 e 8,62%, no mesmo ensaio para uma mistura de plasmas com valores médios (amostra A) e altos (amostra B), respectivamente, na "técnica" original. Na "técnica" modificada os coeficientes de variação foram de 4,57 e 6,31% para os valores médios e altos respectivamente valores estes menores do que os correspondentes na "técnica" original.

4.6.2.2 - A Tabela VIII mostra a reprodutibilidade inter-ensaio, para ambas as "técnicas" (original e modificada), sendo que os coeficientes de variação foram de 5,97 e 4,61% em vários ensaios para uma mistura de plasmas com valores

Tabela VII - Reprodutibilidade intra-ensaio da medida da porcentagem de testosterona livre em duas misturas de plasma avaliadas pelas "técnicas" original e modificada.

Técnica Original		Técnica Modificada	
Amostra A (%)	Amostra B (%)	Amostra A (%)	Amostra B (%)
2,78	3,81	2,81	3,70
2,70	3,04	2,84	3,11
2,42	3,44	2,55	3,50
2,56	3,24	2,69	3,34
2,59	3,34	2,72	3,52
2,93	3,12	2,96	3,26
2,69	3,26	2,82	3,46
	3,74		3,73
	3,00		3,19
$\bar{X}$ 2,67	3,33	2,77	3,42
D.P. 0,16	0,29	0,13	0,22
n 7	9	7	9
C.V.(%) 6,16	8,62	4,57	6,31

Tabela VIII - Reprodutibilidade inter-ensaio da medida da porcentagem de testosterona livre em duas misturas de plasma avaliadas pela "técnica" original e modificada.

	Técnica Original		Técnica Modificada	
	Amostra A (%)	Amostra B (%)	Amostra A (%)	Amostra B (%)
	2,67	3,15	2,69	3,21
	2,60	3,24	2,53	3,25
	2,52	3,28	2,51	3,42
	2,63	3,21	2,77	3,52
	2,58	3,00	2,45	3,16
	2,67	3,45	2,48	
	2,27			
	2,34			
$\bar{X}$	2,54	3,22	2,57	3,31
D.P.	0,15	0,15	0,13	0,15
n	8	6	6	5
C.V. (%)	5,97	4,61	4,98	4,59

médios (amostra A) e altos (amostra B), respectivamente na "técnica" original. Na "técnica" modificada os coeficientes de variação foram de 4,98 e 4,59% para os valores médios e altos, respectivamente.

#### 4.7 - Determinação dos valores normais em plasma humano

A Tabela IX mostra os percentuais médios de testosterona livre para homens ( $2,57 \pm 0,45\%$ ) e mulheres hígdas na fase folicular do ciclo menstrual ( $1,67 \pm 0,30\%$ ), nas nossas condições de trabalho, significativamente diferentes.

Tabela IX - Média dos valores percentuais de testosterona livre em mulheres na fase folicular do ciclo menstrual e em homens hígidos.

	% Testosterona Livre	
	Mulheres (Fase Folicular)	Homens
Média	1,67	2,57
Desvio Padrão	0,30	0,45
Número de Casos	29	19

$t_{\text{calc.}} = 22,228 > t_{\text{crit.}} = 2,021$

Houve diferença significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  entre as médias.

## 5 - DISCUSSÃO

Por refletir de uma maneira geral as condições "in vivo" a técnica de diálise de equilíbrio como método de avaliação de tes<sub>t</sub>osterona livre tem sido largamente aceita, embora os resultados das medidas "in vitro" não representem necessariamente o valor real "in vivo" da interação do esteróide com as proteínas transportadoras no plasma<sup>(13)</sup>.

Para as técnicas "in vitro", um fator importante é de que o hormônio marcado (traçador) se encontre quimicamente puro e sem produtos de degradação, fato este que pode ser observado no cromatograma da Figura 3.

Por haver uma variação de peso dos segmentos dos tubos de diálise, durante o período de pesagem (Figura 4), torna-se necessária a realização rápida desta etapa; para que não ocorram erros importantes o ensaio não deve ser conduzido com número elevado de amostras. O estudo da variação de peso antes e após a diálise mostrou que a queda de peso se comportou de maneira diversa nas duas situações acima citadas (Figura 4), pois, como estamos trabalhando com uma membrana semi-permeável, a tendência é de que as pressões osmóticas, "interna" e "externa", se igualem. Entretanto, como a "fase externa" no momento da pesagem, antes da diálise, é o ar ambiente, haverá tendência a uma perda progressiva da água existente

na "fase interna" (plasma). Com a provável formação de uma película de água na superfície externa da membrana, durante a diálise de equilíbrio, ocorrerá o mesmo fenômeno da perda progressiva de água, porém com uma velocidade mais lenta, pois, esta película formará uma barreira. Este fato foi comprovado experimentalmente.

A etapa de pesagem se faz necessária na medida em que existe um gradiente de pressão osmótica entre o plasma não diluído, contido no segmento de diálise e a solução tampão, com tendência a um aumento do segmento de celulose, após a diálise.

Na tentativa de eliminar a pesagem, estudou-se a diálise de equilíbrio com plasma diluído, pois, dependendo da diluição, o gradiente da fase "interna" e "externa" tende a zero, eliminando, assim, o aumento de volume da "fase interna"; desta forma, poder-se-ia, eventualmente, eliminar a etapa de pesagem dos tubos contendo o plasma.

Na primeira tentativa diluiu-se o plasma 1:5, por ser esta diluição a mais utilizada por diversos autores<sup>(13,39,39,45,47)</sup>, porém quando comparamos os dados obtidos, corrigidos para diluição, com aqueles encontrados em plasmas não diluídos, mais próximos das condições fisiológicas, verificamos que os valores corrigidos foram significativamente mais baixos que aqueles do plasma não diluído (Tabela II).

O passo subsequente seria, pois, empregar diluições sucessivas do mesmo plasma e extrapolar a curva para um valor teórico não diluído; nesta situação o valor observado na extrapolação da curva, para a situação teórica não diluídas, não foi significativamente diferente daquele encontrado na diálise direta do plasma não diluído (Tabela IV). Além disso, como as inclinações destas retas

variam de um plasma a outro (Tabela III), provavelmente, devido às diferenças de afinidade das proteínas ligantes (SHBG, Albumina ou CBG) de indivíduo para indivíduo, não seria possível a obtenção de um fator único que permitisse o emprego de apenas uma diluição do plasma, como seria desejável.

Entretanto, embora o emprego de diluições sucessivas fosse válido, seria extremamente trabalhoso e inexecutível para uso clínico.

Portanto, não havia dúvida de que, do ponto de vista de simplicidade, a diálise de equilíbrio, com correção do peso, como sugerida por Kley, seria um método para uso nas investigações clínicas. Sendo o frasco de diálise de equilíbrio um sistema fechado (Figura 2), toda a radioatividade inicialmente adicionada deveria estar presente, ao final do ensaio, nas fases externa e interna. Portanto, a diferença entre a radioatividade inicialmente adicionada e aquela encontrada na "fase externa, após o equilíbrio, deveria ser, obviamente, igual à radioatividade contida na "fase interna".

Deste raciocínio resultou a fórmula do item 3.5:

$$\% \text{livre} = \frac{\text{cpm}_{\text{ext}}/\text{ml}}{\text{cpm}_{\text{int}}/\text{ml}} = 100$$

Caso esta maneira de obtenção dos resultados fosse idêntica àquele obtida com a correção de peso, proposta por KLEY e colaboradores<sup>(17)</sup>, evitar-se-ia um passo que poderia determinar erros, como sejam as pesagens dos segmentos de diálise. Com efeito, não só a correlação foi altamente significativa ( $r = 0,9852$ ), como as médias dos resultados obtidos com as duas técnicas não fo

ram significativamente diferentes ( $t_{obs} = 0,806$ ;  $t_{0,05} = 2,000$ ), utilizando um grande número de amostras ( $n = 62$ ).

Assim, esta modificação é certamente válida e, por outro lado, não deverá existir adsorção significativa do traçador às paredes, quer do frasco de diálise, quer da membrana.

Devido à modificação proposta nos cálculos da porcentagem de testosterona livre, eliminou-se um possível fator de erro, relativo a etapa de pesagem. Inexistindo a pesagem conseguiu-se maior rapidez no ensaio.

Como o objetivo foi padronizar um método de determinação de testosterona livre que pudesse ser usado rotineiramente em laboratório clínico e de pesquisa e, levando-se em conta o fato de alguns investigadores não utilizarem plasma e sim soro, para suas dosagens, realizamos um estudo pareado com plasma e soro, verificando-se não haver diferença significativa entre os dois materiais. Portanto, esta técnica pode ser usada indiscriminadamente para plasma ou soro.

Para avaliar as características operacionais da técnica em desenvolvimento, verificamos a especificidade pelas curvas de diluição dos plasmas, pois, se existissem interferentes que pudessem modificar o resultado final, estes, provavelmente, se diluiriam de maneira diferente daquela do hormônio em estudo, modificando o perfil da curva. De acordo com o item 4.6.1, todos os pontos se apresentaram ao longo de uma reta, o que é uma condição necessária para medida de especificidade<sup>(46)</sup>.

Comparando os coeficientes de variação (C.V.), intra e inter-ensaio, dos resultados encontrados pela "técnica modificada" e pela "técnica original", verificamos que os C.V. da "técnica

ca modificada" são mais baixos do que os da "técnica original" que, por sua vez, são compatíveis com os C.V. apresentados em literatura pertinente (Tabela X). Este fato se deve, provavelmente, a eliminação do fator pesagem no computo geral dos fatores de erros que são inerentes a toda técnica.

Após padronizar o método para as nossas condições de trabalho, ensaiamos plasmas colhidos de homens e mulheres hígidas, a fim de estabelecer valores médios. Quando comparamos os valores obtidos com aqueles encontrados na literatura (Tabela XI) verificamos ser compatíveis com os encontrados por vários autores que utilizam o mesmo método de diálise de equilíbrio com plasma não diluído (10,17,39) ou diluído 1:2<sup>(20)</sup> e semelhante a outros métodos (8 ; 23,24). Pela Tabela XI podemos observar, ainda, que todos os autores que utilizaram diálise de equilíbrio com plasma diluído, obtiveram valores mais baixos do que aqueles obtidos com plasma não diluído, fato este confirmado por nós, como já foi discutido anteriormente.

Podemos verificar, ainda, na Tabela XI, a grande variação de resultados encontrados por diversos autores que utilizaram outras técnicas, como por exemplo, adsorção com carvão-dextran (12,23,41) ou ultrafiltração por centrifugação (13,15).

Tabela XI - Valores normais de porcentagens de testosterona livre plasmática comparados com resultados publicados

Método	Diluição	Homens (%)		Mulheres (%)		Referências
Diálise de Equilíbrio	não diluído	2,57	± 0,45	1,67	± 0,30	Presente Estudo
Diálise de Equilíbrio	não diluído	2,10	± 0,16	1,55	± 0,17	17
Diálise de Equilíbrio	não diluído	2,20	± 0,42	1,00	± 0,18	10
Diálise de Equilíbrio		2,50	± 0,17			39
Diálise de Equilíbrio	1:2	2,60	± 0,63			20
Diálise de Equilíbrio	1:5	1,72	± 0,59	0,96	± 0,59	45
Diálise de Equilíbrio	1:5	1,44	± 0,32	0,90	± 0,24	32-11
Diálise de Equilíbrio	1:5*	6,90	± 1,90	4,50	± 1,20	13
Diálise de Equilíbrio	1:5*	10,12	± 0,99	6,56	± 0,89	38
Diálise de Equilíbrio	1:20*	46,76	± 20,42	26,68	± 14,04	33
Diálise de Fluxo		2,80	± 0,41	1,89	± 0,44	24
Adsorção c/ Carvão-Dextran		2,50	± 0,35	1,38	± 0,28	23
Adsorção c/ Carvão-Dextran		6,76	± 1,45	4,05	± 1,25	12
Adsorção c/ Carvão-Dextran		47,20	± 4,10	29,60	± 2,80	41
Ultrafiltração por Centrifugação		8,50	± 2,50	5,60	± 1,10	13
Ultrafiltração por Centrifugação		1,97	± 0,56	0,90	± 0,20	15
Precipitação Proteica		8,60	± 2,00	5,50	± 2,00	42
Capacidade de Ligação Proteica (SHBG)				1,70	± 0,43	27
Capacidade de Ligação Proteica (SHBG)				1,13	± 0,16	18
Capacidade de Ligação Proteica (SHBG)		2,23		1,36		8

\* Não foi considerado o fator de diluição.

Tabela X - Avaliação da reprodutibilidade do método, comparado com resultados publicados

Método	Coeficiente de Variação (%)		Referências
	Intra-ensaio	Inter-ensaio	
Diálise de Equilíbrio	8,1	9,9	17
Diálise de Equilíbrio	7,0	8,9	47
Diálise de Equilíbrio	6,16 - 8,62	5,97 - 4,61	Presente Estudo
Diálise de Equil. "Modificada"	4,57 - 6,31	4,98 - 4,59	Presente Estudo
Diálise de Equil. c/ plasma diluído	3,0	1,6	39
Diálise de Equil. c/ plasma diluído	3,8	-	45
Diálise de Fluxo	-	-10	24
Diálise de Fluxo	-5	5 - 10	21
Gel Filtração	6,0	8,0	31
Ultrafiltração por centrifugação	9,0	10,5	17
Ultrafiltração por centrifugação	10,0	6,9 - 10,0	15
Adsorção c/ Carvão-Dextran	1,9	3,8	41

## 6 - CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1 - Na diálise de equilíbrio, o peso dos segmentos dos tubos varia tanto antes como após a diálise, havendo perda maior antes da diálise;
- 2 - O método de cálculo da porcentagem de esteróide circulante livre, proposto neste trabalho, resultou ser semelhante ao original gravimétrico, com a vantagem de não necessitar incluir o valor de variação no peso do segmento de diálise, eliminando, assim, a etapa de pesagem;
- 3 - O método utilizado levou aos mesmos valores daqueles encontrados em diluições sucessivas do plasma, com extrapolação dos resultados, mas diferentes daqueles obtidos por uma única diluição;
- 4 - Verificou-se haver correlação significativa ( $r = 0,9268$ ) quando do estudo pareado de soro e plasma na diálise de equilíbrio;

- 5 - O método mostrou ser específico, pelo menos pela técnica da diluição;
- 6 - A precisão da medida, apreciada pela reprodutibilidade intra e inter-ensaio, apresentou valores dentro do esperado para métodos biológicos;
- 7 - Os valores percentuais médios de testosterona livre foram: para homens  $2,57 \pm 0,45\%$  e para mulheres na fase folicular do ciclo menstrual,  $1,67 \pm 0,30\%$ ;
- 8 - Os valores referidos podem ser considerados significativamente diferentes se, se leva em conta as condições de realização do trabalho.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANDERSON, D.C. & GALVÃO-TELES, A. The role of sex-hormone-binding globulin in androgen disorders. Rev.Port.Terap. Med., 8(1):31-43, 1974-1975.
- 2 - AULETTA, F.J.; CALDWELL, B.V.; HAMILTON, G.L. Androgens : testosterone and dihidrotestosterone. In: JAFFÉ, B.M., ed. Methods of hormone radioimmunoassay. New York, Academic, 1974. p.359-70.
- 3 - BACKSTROM, C.T. & SODERGARD, R. Testosterone-estradiol-binding globulin, unbound and total estradiol and testosterone, and total progesterone during the menstrual cycle in women with epilepsy taking antiepileptic drugs. J. Endocrinol. Invest., 2:359-66, 1979.
- 4 - BARTSCH, W.; HORST, H.J.; DERWAHL, K.M. Interralation ships between sex hormone-binding globulin and  $17\beta$ -estradiol testosterone, 5,2-dihydrotestosterone, thyroxine, and tri-iodothyronine in prepubertal and pubertal girls. J. Clin. Endocrinol.Metab., 50:1053-6, 1980.
- 5 - BURTON, R.M. & WESTPHAL, V. Steroid hormone-binding proteins in blood plasma. Metabolism., 21(3):253-75, 1972.
- 6 - DAVIDSON, B.J.; GAMBONE, J.C.; LAGASSE, L.D.; CASTALDO, T.W.; HAMMOND, G.L.; SIITERI, P.K.; JUDD, H.L. Free estradiol in postmenopausal women with and without endometrial cancer . J.Clin.Endocrinol.Metab., 52:404-8, 1981.

- 7 - DE MOOR, P.; HEIRWEGH, K.; HEREMANS, J.F.; DECLERCK-RASKIN, M. Protein binding of corticoids studied by gel filtration. J.Clin.Invest., 41(4):816-27, 1962.
  - 8 - DUNN, J.F.; NISULA, B.C.; RODBARD, D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. J.Clin.Endocrinol.Metab., 53 : 58-68, 1981.
  - 9 - EKINS, R. The physiological significance and measurement of free hormones in blood. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium on..., held in Vienna, 21-25 June, 1982. 1983. p.191-219.
  - 10 - ENDOCRINE SCIENCES. Serum free testosterone and androgenizing disorders. Tanzania, Calif. s.d. (guia comercial).
  - 11 - FOREST, M.G. & MIGEON, C.J. Percentage of testosterone, androstenedione, and dehydroisoandrosterone bound to plasma protein in preadolescent children. J.Pediatr., 76(5):732-8, 1970.
  - 12 - FOREST, M.G.; LECOQ, A.; SALLE, B.; BERTRAND, J. Does neonatal phenobarbital treatment affect testicular and adrenal functions and steroid binding in plasma infancy? J.Clin. Endocrinol.Metab., 52:103-10, 1981.
  - 13 - FOREST, M.G.; RIVOLA, M.A.; MIGEON, C.J. Percentage binding of testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in human plasma. Steroids, 12:323-43, 1968.
  - 14 - HAISSINSKY, M. Nuclear chemistry and its applications. Reading, Mass., Addison-Wesley, 1964. Chap. 18, p.520-35.
-

- 15 - HAMMOND, G.L.; NISKER, J.A.; JONES, L.A.; SIITERI, P.K.  
Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. J. Biol. Chem., 255(11):5023,26, 1980.
- 16 - KATO, T. & HORTON, R. Studies of testosterone binding globulin. J.Clin.Endocrinol., 28:1160-8, 1968.
- 17 - KLEY, H.K.; BARTMANN, E.; KRUSKEMPER, H.L. A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol, by equilibrium dialysis : comparison with centrifugal filtration. Acta Endocrinol., 85:209-19, 1977.
- 18 - LAWRENCE, D.M.; KATZ, M.; ROBINSON, T.W.E.; NEWMAN, M.C.; .  
McGARRIGLE, H.H.G.; SHAW, M.; LACHELIN, G.C.L. Reduced sex hormone binding globulin and derived free testosterone levels in women with severe acne. Clin.Endocrinol., 15: 8791, 1981.
- 19 - LUISI, M.; BERNINI, G.P.; DEL GENOVESE, A.; BIRINDELLI, R. ;  
BARLETTA, D.; GASPERI, M.; FRANCHI, F. Radioimmunoassay for "free" testosterone in human saliva. J.Steroid Bioch., 12: 513-16, 1980.
- 20 - MEIKLE, W.; STANISH, W.M.; EDWARDS, C.Q.; BISHOP, C.T.  
Familial effects on plasma sex-steroid content in man: testosterone, estradiol and sex-hormone-binding globulin . Metabolism., 31(1):6-9, 1982.
- 21 - MOLL Jr., G.W. & ROSENFELD, R.L. A flow dialysis technique for the measurement of free testosterone in human plasma under physiologic conditions. Biochem.Med., 18:344-52 , 1977.

- 22 - MOLL Jr., G.W. & ROSENFELD, R.L. Some limitations of using equilibrium dialysis to study human serum albumin-testosterone interaction. J.Clin.Endocrinol.Metab., 46:501-3, 1978.
- 23 - MOLL Jr., G.W. & ROSENFELD, R.L. Testosterone binding and free plasma androgen concentration under physiological conditions: characterization by flow dialysis technique. J.Clin.Endocrinol.Metab., 49:730-6, 1979.
- 24 - MOLL Jr., G.W.; ROSENFELD, R.L.; HELKE, J.H. Estradiol-testosterone binding interactions and free plasma estradiol under physiological conditions. J.Clin.Endocrinol., 52:868-74, 1981.
- 25 - NESMEYANOV, A.N. Radiochemistry. Moscow, MIR, 1974. chap. 18, p.546-51.
- 26 - ODLIND, V.; ELAMSSON, K.; ENGLUND, D.E.; VICTOR, A.; JOHANSSON, E.D.B. Effects of oestradiol on sex hormone binding globulin. Acta Endocrinol., 101:248-53, 1982.
- 27 - PAULSON, J.D.; KELLER, D.W.; WIEST, W.G.; WARREN, J.C. Free testosterone concentration in serum: elevation is the hall-mark of hirsutism. Am.J.Obstet.Gynecol., 128:851-7, 1977.
- 28 - PEARLMAN, W.H. & CRÉPY, O. Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. J.Biol.Chem., 242(2):182-9, 1967.
- 29 - PEARLMAN, W.H.; CRÉPY, O.; MURPHY, M. Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy, and the post-partum period. J.Clin. Endocrinol., 27:1012-8, 1967.
- 30 - PLAGER, J.E.; KNOPP, R.; SLAUNWHITE Jr., W.R.; SANDBERG, A.A. Cortisol binding by dog plasma. Endocrinol., 73:353-8, 1963.

- 31 - RIGAUDIERE, N.; PRADIER, P.; DELOST, P. Free and bound androgens in the female guinea pig during gestation and after parturition and in the offsprings during the perinatal period. Acta Endocrinol., 95:101-9, 1980.
- 32 - RIVOLA, M.A.; FOREST, M.G.; MIGEON, C.J. Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: concentration and protein binding. J.Clin.Endocrinol., 28:34-40, 1968.
- 33 - ROSENFELD, R.L. Plasma testosterone binding globulin and indexes of the concentration of unbound plasma androgens in normal and hirsute subjects. J.Clin.Endocrinol., 32:717-28, 1971.
- 34 - SIITERI, P.K.; MURAI, J.T.; HAMMOND, G.L.; NISKER, J.A.; RAYMOURE, W.J.; KUHN, R.W. The serum transport of steroid hormones. Recent Prog. Horm. Res., 38:457-510, 1982.
- 35 - SCHWARZ, S. & BOYD, J. A rapid procedure for measurement of the free testosterone fraction in human plasma using the centria radioimmunoassay centrifugal analyser. Arch.Gynecol., 230(3):213-8, 1981.
- 36 - SLAUNWHITE Jr., W.R. & SANDBERG, A.A. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. J.Clin.Invest., 38:384-91, 1959.
- 37 - SOBER, H.A.; HARTLEY Jr., R.W.; CARROLL, W.R.; PETERSON, E. Fractionation of proteins. part 5. dialysis and ultra-filtration. In: NEURATH, H. ed. The proteins composition, structure and fucntion. New York, Academic, 1965. v.3, p. 27-31.

- 38 - SOUTHREN, A.L.; GORDON, G.G.; TOCHIMOTO, S.; OLIVO, J. ;  
SHERMAN, D.H.; PINZON, G. Testosterone and androstenedione  
metabolism in the polycystic ovary syndrome: studies of  
the percentage binding of testosterone in plasma. J.Clin.  
Endocrinol., 29:1356-63, 1969.
- 39 - STANIK, S., DORNFELD, L.P.; MAXWELL, M.H.; VIOSCA, S.P.;  
KORENMAN, S.G. the effect of weight loss on reproductive  
hormones in obese men. J.Clin.Endocrinol.Metab., 53:828-  
32, 1981.
- 40 - STUMPF, P.G.; NAKAMURA, R.M.; MISHELL Jr., D.R. Changes in  
physiologically free circulating estradiol and testosterone  
during exposure to Levonorgestrel. J.Clin.Endocrinol., 52:  
138-43, 1981.
- 41 - TOHOLOKAN, K.K.; JONES, G.M.; SANBORN, B.M.; RODRIGUEZ, R.J.;  
REIMONDO, G.G. Evaluation and clinical application of a  
dextran-charcoal method for measuring bound testosterone  
in human plasma. Clin.Chem., 26(1):101-6, 1980.
- 42 - TREMBLAY, R.R. & DUBE, J.Y. Plasma concentrations of free  
and non-TeBG bound testosterone in women on oral  
contraceptives. Contraception, 10:599, 1974.
- 43 - VERMEULEN, A. & VERDONCK, L. Studies on the binding of  
testosterone to plasma. Ann.Endocrinol., (Paris), 29(1)  
supl:149-52, 1968.
- 44 - VERMEULEN, A. & VERDONCK, L. Studies on the binding of  
testosterone to human plasma. Steroids, 11(5):609-35,  
1967.
- 45 - VERMEULEN, A.; STOICA, T.; VERDONCK, L. The apparent free  
testosterone concentration, an index of androgenicity.  
J.Clin.Endocrinol., 33:759-67, 1971.

- 46 - YALOW, R.S. & BERSON, S.A. Problems of validation of radioimmunoassays. In: ODELL, W.D. & DAUGHADAY, W.H., ed. Principles of competitive protein-binding assays. Philadelphia, Pa. J.B. Lippincott, 1971. p.374-400.
- 47 - WU, C-H; MOTOHASHI, T.; ABDEL-RAHMAN, H.A.; FLICKINGER, G.L.; MIKHAIL, G. Free and protein-bound plasma estradiol-17 $\beta$  during the menstrual cycle. J.Clin.Endocrinol.Metab., 43: 436-45, 1976.