

BK8810856
INIS-BR-988

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

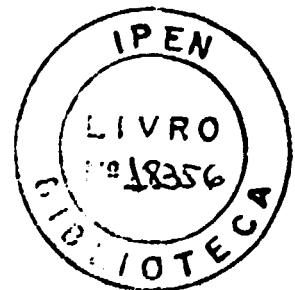
COMPARAÇÃO DO TESTE DA CLONIDINA COM O TESTE DE TOLERÂNCIA
À INSULINA NA AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM BAIXA ESTATURA

MARCELO CIDADE BATISTA

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
I. P. E. N.

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do
Grau de Doutor em Tecnologia
Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Willian Nicolau



SÃO PAULO
1986

AOS MEUS PAIS

JOÃO E DILZA

À LENA

cujo carinho e apoio se encontram
escritos em cada página deste
trabalho.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
I. P. E. N.

AGRADECIMENTOS

Esta tese resultou da colaboração e influência de várias pessoas, às quais expresso minha gratidão:

Ao Prof. Dr. Wilian Nicolau, orientador e sobretudo amigo, cujo estímulo e participação pessoal foram de fundamental importância para o meu desenvolvimento na área de Endocrinologia e Radioimunoensaio, culminando, agora, com a realização deste trabalho.

Ao Dr. Júlio Kieffer (in memoriam), ex-orientador e responsável por minha formação em Medicina Nuclear, por me incentivar a ingressar no curso de pós-graduação.

À Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, ex-orientadora, pelo apoio dado durante a realização dos cursos e seminários de área.

Ao Dr. Walter Bloise, Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça e Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold, responsáveis por minha formação clínica na área de Endocrinologia. Suas valiosas sugestões contribuíram muito para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Homero D'Abronzio, que me auxiliou e orientou no desenvolvimento da parte metodológica deste trabalho.

A Maria Ângela Henriques Zanella Fortes, Isabel Cristina de Mello Guazzelli e Antonio Cândido Pinheiro Palomino, pela colaboração técnica indispensável no desenvolvimento do radioimunoensaio de GH.

À Dra. Sandra Mara Villares, pela participação na dosagem dos hormônios peptídicos e somatomedina C.

A todos os médicos estagiários e residentes que trabalharam na Unidade de Gêndas e Intersexo no ano de 1985-86, em especial à Dra. Sufomar Madureira e Dra. Edna Regina Nakandakare, pelo auxílio na realização dos testes de estímulo.

A Valéria Samuel Lando, Maria Beatriz da Fonte Kohec, Tânia Cecílio Silva, Débora Gonçalves de Carvalho e Norma Cherem, pela participação na dosagem dos hormônios peptídicos e esteróides.

Ao Dr. Paulo Luiz Aguirre Costa, pela colaboração na análise estatística dos dados.

Ao Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel, pelo fornecimento de preparações hormonais de referência.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado na Divisão de Clínica Médica I do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, SP
I. P. E. II.

ÍNDICE

I	- RESUMO	1
II	- ABSTRACT	5
III	- INTRODUÇÃO	9
IV	- OBJETIVOS	19
V	- CASUÍSTICA	21
V	- MATERIAL E MÉTODOS	23
VII	- RESULTADOS	87
VIII	- DISCUSSÃO	125
IX	- CONCLUSÕES	138
X	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140

I — RESUMO

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/CP

COMPARAÇÃO DO TESTE DA CLONIDINA COM O TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA NA AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM BAIXA ESTATURA

MARCELO CIDADE BATISTA

RESUMO

Foram estudados 31 pacientes, com idade entre 2,9 e 17,5 anos e altura entre 1,3 e 8,5 desvios-padrões abaixo da média para sexo e idade. Todos foram submetidos a 2 testes de liberação de GH: (1) teste de tolerância à insulina (ITT): insulina simples 0,1 U/kg de peso por via endovenosa, com coletas de sangue nos tempos de -30, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos; (2) teste da clonidina (TCL0): clonidina 0,0375 mg/m² de superfície corpórea por via oral, com coletas de sangue nos tempos de -30, 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O GH foi dosado em soro por método de radioensaio desenvolvido em nosso laboratório e padronizado por comparação com preparação de referência fornecida pelo "National Institutes of Health". A sensibilidade do método foi de $1,1 \pm 0,08$ ng/ml (média \pm erro padrão da média), a variação intraensaio de 5,6, 4,7 e 4,2% e a interensaio de 19,4, 8,7 e 12,6% para amostras-controle de GH contendo 1,9, 8,3 e 25,2 ng/ml, respectivamente. A especificidade foi considerada adequada com

base em estudos de imunorreatividade cruzada e dos efeitos não específicos do meio de incubação.

Foram considerados normais quanto à secreção de GH 9 crianças (Grupo 1A) e 12 adolescentes (Grupo 1B) que preenchem 3 ou mais dos seguintes critérios: ausência de sinais típicos de nanismo hipofisário; ritmo de crescimento normal; dosagem sérica normal de somatomedina C (SmC) e pico de liberação de GH maior do que 7,0 ng/ml em pelo menos um teste de estímulo (ITT ou TCLO). Foi estabelecida deficiência de GH em 8 crianças (Grupo 2A) e 2 adolescentes (Grupo 2B), que apresentavam sinais típicos de nanismo hipofisário e/ou ritmo de crescimento diminuído, SmC baixa e pico de GH menor do que 5,0 ng/ml nos 2 testes provocativos (ITT e TCLO).

No TCLO, os únicos efeitos colaterais observados foram hipotensão e sonolência discretas, ao passo que todos os pacientes apresentaram hipoglicemia (≤ 45 mg/dl) no ITT, acompanhada por sudorese, náuseas, mal-estar geral e sonolência. Nos Grupos 1A e 1B, os picos de liberação de GH foram de $10,3 \pm 1,7$ (média \pm erro padrão da média) e $15,3 \pm 2,8$ ng/ml no ITT e de $14,8 \pm 2,4$ e $12,2 \pm 3,5$ ng/ml no TCLO, respectivamente. Estes valores não foram considerados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) quando comparados pelo teste "U" de Mann-Whitney. A incidência de resultados falso-negativos (pico $\leq 7,0$ ng/ml) nos Grupos 1A e 1B foi de 28,6 e 9,1% para o ITT e de 11,1 e 58,3% para o TCLO, respectivamente. No

Grupo 2A, os picos de GH observados no ITT e TCLO foram de $0,89 \pm 0,08$ e $1,1 \pm 0,08$ ng/ml, respectivamente, sendo significativamente menores ($p < 0,05$) do que os do Grupo 1A e não ultrapassando 2,3 ng/ml em nenhum teste. Não foi calculada a média dos picos no Grupo 2B, já que este era constituído por apenas 2 pacientes, cujos valores máximos foram de 0,9 e 3,5 ng/ml no ITT e 1,7 e 4,8 ng/ml no TCLO, respectivamente.

Conclui-se que o TCLO apresenta maior eficiência de liberação de GH do que o ITT em crianças, além de causar efeitos colaterais menos graves. Deve, portanto, ser considerado o teste de eleição para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário na idade pré-puberal, que engloba a maioria dos pacientes com déficit de crescimento. Em adolescentes, no entanto, o TCLO foi menos eficiente do que o ITT para excluir deficiência de GH, devendo ser utilizado apenas como teste complementar. Quando ambos os testes são realizados em um mesmo paciente, o diagnóstico de nanismo hipofisário pode ser estabelecido com segurança próxima a 100%, sugerindo que esta deva ser a conduta preferida naqueles com suspeita clínica desta patologia.

II - ABSTRACT

COMPARISON OF THE CLONIDINE TEST WITH THE INSULIN TOLERANCE
TEST IN THE EVALUATION OF PATIENTS WITH SHORT STATURE

MARCELO CIDADE BATISTA

ABSTRACT

We studied 31 patients aged 2.9 to 17.5 years, with heights from 1.3 to 8.5 standard deviations below the mean for age and sex. All underwent 2 GH provocative tests: (1) insulin tolerance test (ITT): intravenous regular insulin 0.1 U/kg body weight, with samples drawn at -30, 0, 15, 30, 45, 60 and 90 minutes; (2) clonidine test (CLOT): oral clonidine 0.0375 mg/m² surface area, with samples drawn at -30, 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. Serum GH was measured by a radioimmunoassay method developed in our own laboratory and calibrated against a reference preparation provided by the National Institutes of Health. The sensitivity of the method was 1.1 ± 0.08 ng/ml (mean \pm standard error of the mean), with an intraassay precision of 5.6, 4.7 and 4.2% and an interassay precision of 19.4, 8.7 and 12.6% for quality control samples of 1.9, 8.3 and 25.2 ng/ml, respectively. An adequate specificity was demonstrated by cross-reactivity studies and by assays designed to test non-specific effects

of the medium used for incubation.

A normal GH secretory reserve was established in 9 children (Group 1A) and 12 adolescents (Group 1B), who had 3 or more of the following features: absence of typical signs of pituitary dwarfism; normal growth rate; normal serum somatomedin C (SmC) measurement and peak GH responses greater than 7.0 ng/ml in at least one provocative test (ITT or CLOT). Eight children (Group 2A) and 2 adolescents (Group 2B) were diagnosed as GH deficient by the presence of typical signs of pituitary dwarfism and/or reduced growth rate, low serum SmC and a less than 5.0 ng/ml GH response to 2 provocative tests (ITT and CLOT).

Slight hypotension and drowsiness were the only side-effects observed during CLOT, whereas all patients had hypoglycemia (≤ 45 mg/dl) in ITT, associated with sweating, nausea, malaise and drowsiness. In Groups 1A and 1B, peak GH responses were 10.3 ± 1.7 (mean \pm standard error of the mean) and 15.3 ± 2.8 ng/ml for ITT and 14.8 ± 2.4 and 12.2 ± 3.5 ng/ml for CLOT, respectively. These values were not statistically different ($p > 0.05$) when compared by the "U" test of Mann-Whitney. False-negative results (peak ≤ 7.0 ng/ml) for Groups 1A and 1B were 28.6 and 9.1% for ITT and 11.1 and 58.3% for CLOT, respectively. In Group 2A, peak GH responses for ITT and CLOT were 0.89 ± 0.08 and 1.1 ± 0.08 ng/ml, respectively, with no response greater than 2.3 ng/ml. These values were

significantly lower ($p < 0.05$) than the ones observed in Group 1A. It was not possible to calculate mean peak levels for Group 2B, since only 2 patients were included in this group. Their peak GH responses were 0.9 and 3.5 ng/ml for ITT and 1.7 and 4.8 ng/ml for CLOT, respectively.

We conclude that the clonidine test with a low-oral dose of 0.0375 mg/m^2 is more effective than ITT in promoting GH release in children, besides being associated with less dangerous side effects. It should be considered the best provocative test to exclude the diagnosis of pituitary dwarfism in the prepubertal age, which encompasses most patients with growth retardation. Nevertheless, the clonidine test is less effective than ITT to exclude GH deficiency in adolescents and should be used only as a complementary test in pubertal patients. When both tests are performed in a single patient, pituitary dwarfism is very rarely misdiagnosed, suggesting that this should be the preferred approach when this disorder is clinically suspected.

III - INTRODUÇÃO

A somatotrofina (GH) é o hormônio mais abundante da hipófise humana, estando presente em quantidades de 5 a 10 mg em cada glândula. Ele é sintetizado e armazenado nas células somatotróficas, correspondentes a 35 a 45% da pituitária e localizadas predominantemente nas suas asas laterais. Seu ritmo de secreção diário é de 1 a 2 mg, desaparecendo do plasma com uma meia vida de 20 a 25 minutos (12).

O GH presente em extratos hipofisários e no plasma corresponde a uma mistura heterogênea de pelo menos 6 peptídeos, identificados por seu tamanho ou carga (42). O componente fisiológico predominante consiste em uma cadeia polipeptídica única, contendo 191 aminoácidos e com peso molecular de 22.000 daltons.

O papel primordial do GH consiste no controle do crescimento somático pós-natal. Quando administrado a crianças com hipopituitarismo, ele estimula o crescimento proporcionado do esqueleto e tecidos moles, associado a balanços positivos de nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo e magnésio. Acredita-se que esta ação seja mediada principalmente pela geração das somatomedinas (57), embora alguns estudos

"in vitro" tenham demonstrado um possível efeito estimulatório direto do GH sobre o crescimento longitudinal dos ossos (34).

As somatomedinas correspondem a uma família de peptídeos cujos 2 principais componentes, denominados "insulin-like growth factors" I (somatomedina C) e II, têm peso molecular de 7.500 daltons (57). São sintetizadas principalmente no fígado e sua ação sobre o crescimento somático consiste em promover a mitogênese e estimular a síntese de colágeno e proteoglican. Circulam no sangue ligadas a proteínas carregadoras de alto peso molecular (145.000 daltons), formando complexos proteicos que as protegem contra a proteólise e as conferem meia vida maior e flutuação sangüínea menor do que as dos demais hormônios peptídicos. Esta característica permite que os níveis séricos de somatomedina C (SmC), cuja secreção é diretamente controlada pelo GH, possam ser utilizados como índice de secreção da somatotrofina (75):

A secreção de GH é regulada pelo hipotálamo através de 2 peptídeos sintetizados ao nível dos núcleos ventromedial e arqueado: a somatocrinina (GRH) e a somatostatina (SS), agentes estimulador e inibidor da secreção hipofisária de GH, respectivamente. Através de mecanismo de "feedback" negativo, concentrações séricas de GH e somatomedinas atuam diretamente sobre o hipotálamo, aumentando ou reduzindo a liberação de GRH e SS. As somatomedinas também agem ao nível da hipó-

fise, diminuindo a resposta das células somatotróficas ao GRH (44).

Mecanismos de controle neural exercem importante ação sobre o hipotálamo, participando também da regulação da secreção de GH. A ativação dos receptores α -adrenérgicos e serotoninérgicos centrais promove a liberação de GRH e, conseqüentemente, de GH (44) ao passo que obloqueio dos receptores colinérgicos inibe esta resposta (13). Por outro lado, a estimulação dos receptores β -adrenérgicos centrais provoca inibição da secreção de GH (44).

A secreção de GH é episódica, caracterizada por pulsos de duração limitada. Na maior parte do dia, as concentrações séricas deste hormônio situam-se em nível inferior a 3,0 ng/ml, com 1 a 2 picos moderados ocorrendo 2 a 4 horas após as refeições. Os valores máximos são detectados aproximadamente 1 hora após início do sono profundo (estadio III ou IV), com picos menores ocorrendo posteriormente durante as fases mais tardias do sono (9,12).

Distúrbios da secreção de GH podem resultar em patologias tais como o nanismo hipofisário, decorrente da deficiência deste hormônio, ou a acromegalia, provocada por tumor produtor de GH. O nanismo hipofisário corresponde a uma causa rara de retardo de crescimento em crianças, sendo responsável por menos de 1% destes casos. Entretanto, o seu diagnóstico é muito importante, já que se dispõe, atualmente, de

terapêutica adequada para esta doença, como o GH extraído de hipófises humanas ou produzido por engenharia genética (12).

A possibilidade de déficit de GH deve ser considerada em todas as crianças que se apresentarem com baixa estatura proporcionada, inferior a 3 desvios-padrões em relação à média para sexo e idade (11). Em crianças acima de 5 anos de idade, a dosagem sérica de SmC corresponde a um bom teste de triagem, praticamente excluindo a presença de nanismo hipofisário quando normal (75). Entretanto, quando os níveis encontram-se diminuídos, o que pode ser ocasionado por outras doenças como desnutrição e hipotireoidismo, o diagnóstico de déficit de GH precisa ser confirmado por estudos da secreção deste hormônio. Estes também são necessários em crianças abaixo de 5 anos de idade, nas quais não é possível uma boa discriminação entre valores normais e baixos de SmC (75).

A dosagem sérica basal de GH não permite, na maioria das vezes, diferenciar entre crianças com e sem deficiência deste hormônio, já que sua secreção é episódica e mantém concentrações séricas baixas durante a maior parte do dia (28). Por este motivo, testes provocativos de liberação de GH foram desenvolvidos, com o intuito de se poder avaliar a reserva hipofisária deste hormônio. Não existe, no entanto, nenhum teste que consistentemente promova uma resposta hormonal adequada em todo paciente sem déficit de GH. Isto ocorre porque os diversos estímulos agem ao nível do hipotálamo através

de mecanismos neurais monoaminérgicos, modificando a secreção de GRH e/ou somatostatina; o efeito não é, portanto, direto sobre as células somatotróficas hipofisárias. Por estas razões, o diagnóstico de nanismo hipofisário deve se basear na demonstração de resposta subnormal do GH a pelo menos 2 testes provocativos (32).

Os testes de estímulo podem ser divididos em 2 grandes grupos (17):

1º) TESTES DE TRIAGEM

Estes testes consistem na dosagem do GH em uma única amostra de sangue coletada 20 a 40 minutos após o início do exercício físico ou 1 hora após o início do sono. Apesar de serem fisiológicos, convenientes, de baixo custo e sem efeitos colaterais, apresentam uma incidência relativamente alta (ao redor de 30%) de resultados falso-negativos (indivíduos sem deficiência deste hormônio mas com resposta subnormal ao teste) e, por isso, só são utilizados a nível ambulatorial para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário em pacientes com baixa suspeita clínica desta patologia.

2º) TESTES DEFINITIVOS

Estes testes implicam na dosagem de GH em amostras seriadas de sangue coletadas antes e após administração de

um estímulo farmacológico como a insulina, l-dopa, arginina ou glucagon. Apesar de apresentarem uma menor incidência de resultados falso-negativos (variável de 10 a 30%), todos estão associados a efeitos colaterais desagradáveis, por vezes severos e perigosos. São indicados em pacientes com características clínicas de nanismo hipofisário e/ou resposta subnormal a um teste de triagem.

Entre os testes definitivos, o teste de tolerância à insulina (ITT), embora associado às conseqüências perigosas da hipoglicemia, parece ser o mais eficiente no que se refere à liberação de GH, sendo considerado por muitos autores o teste padrão com o qual os demais devem ser comparados (48). Acredita-se que a hipoglicemia promova a secreção de GH por estimulação de receptores α -adrenérgicos centrais, já que o bloqueio destes receptores por drogas como a fentolamina inibe esta liberação (44). Nos vários estudos prévios sobre o ITT (18,20,35,36,56,59,64,72,77), a incidência de resultados falso-negativos variou de 8 a 26%, dependendo do nível de GH acima do qual a resposta foi considerada normal (5,0, 7,0 ou 10 ng/ml). Em todos, não foi observada liberação de GH em nenhum paciente com deficiência deste hormônio.

Recentemente, a clonidina, um agonista α -adrenérgico central utilizado como anti-hipertensivo (37,55,69), foi introduzida como novo agente capaz de estimular a secreção

de GH. Esta ação da clonidina, inicialmente demonstrada em adultos normais por Lal e col. (38) em 1975, provavelmente se deve à estimulação de receptores α_2 -adrenérgicos centrais. Em estudos realizados em macacos Rhesus (5), Chambers e Brown comprovaram que a clonidina atua ao nível de receptores α -adrenérgicos centrais, não tendo qualquer efeito sobre receptores dopaminérgicos ou serotoninérgicos. Em 1978, Gold e col. (26) demonstraram, nestes mesmos animais, que a administração de piperoxane, um α -antagonista, bloqueia o aumento da secreção de GH induzido pela clonidina. Outra evidência da ação α -adrenérgica central da clonidina foi relatada por Ganong e col. (22), que observaram que, após transecção da medula espinhal, a resposta do GH a esta droga permanecia inalterada. Estudos mais recentes em animais indicaram que a clonidina promove a liberação de GH por estimular neurônios hipotalâmicos secretores de GRH (44).

Gil-Ad e col. (23) foram os primeiros a descrever, em 1979, o uso da clonidina como agente liberador de GH para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário em crianças e adolescentes com baixa estatura. Utilizando uma dose oral de $0,15 \text{ mg/m}^2$ de superfície corpórea, os autores demonstraram uma elevação significativa da concentração de GH em todos os pacientes sem déficit deste hormônio. Nos 7 pacientes com hipopituitarismo, não houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de GH (máximo de $2,5 \text{ ng/ml}$), com exceção de

1 (pico de 5,5 ng/ml), com provável deficiência parcial de GH.

Em estudos mais recentes, o teste da clonidina realizado com a dose de 0,15 mg/m² foi comparado com o ITT (16, 39,66), l-dopa (62,71) e arginina (71), sendo em todos observado um maior pico de liberação de GH e uma menor incidência de resultados falso-negativos no primeiro teste. Em apenas um trabalho (30), os resultados obtidos no ITT foram equivalentes aos do teste da clonidina no que diz respeito à eficiência de liberação de GH.

Embora a clonidina na dose de 0,15 mg/m² seja um excelente estimulador da secreção de GH, ela provoca sonolência e hipotensão moderadas. Em todos os estudos realizados com esta dose (16,23,30,39,62,63,66,71), houve redução dos níveis pressóricos que variou de 15 a 25 mmHg para a sistólica e de 10 a 15 mmHg para a diastólica. Em um relato (47), foi observada hipotensão severa associada a choque, que respondeu à expansão de volume, levando os autores a chamar a atenção para esta possível complicação do teste.

Com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais, alguns autores tentaram realizar o teste da clonidina com doses menores e fixas tais como 0,025 mg (41), 0,05 ou 0,1 mg (40) ou com a dose de 0,035 mg/m² (11). Em todos estes estudos, foram observadas sonolência e hipotensão muito mais discretas do que com 0,15 mg/m², havendo decréscimo de 5 a 15 mmHg

na pressão sistólica e de 2 a 7 mmHg na diastólica. Entretanto, os resultados no que diz respeito à eficiência de liberação de GH foram muito discrepantes e não relacionados à magnitude da dose. Utilizando 0,050 mg de clonidina, Lanes e col. (40) obtiveram picos de GH de $11,6 \pm 1,6$ ng/ml (média \pm erro padrão da média) e resultados falso-negativos de 36%, enquanto que, no estudo de Laron e col. (41) com a dose de 0,025 mg, estes valores foram de $30,6 \pm 8,8$ ng/ml e 8,3%, respectivamente. Estas diferenças talvez possam ser explicadas pelo fato de que, no primeiro trabalho (40), apenas pacientes pré-púberes foram avaliados, ao passo que, no segundo (41), estudou-se um grupo misto constituído por crianças e adolescentes. Sabe-se que, na época da puberdade, a resposta do GH aos estímulos provocativos clássicos é maior do que a observada na infância, devido ao aumento da secreção de testosterona e estradiol (19). Isto não foi ainda, no entanto, demonstrado para o teste da clonidina, já que ele nunca foi avaliado em grupo constituído apenas por pacientes púberes.

Não se chegou, ainda, a um consenso geral sobre qual a dose de clonidina a ser utilizada nos testes provocativos, ou seja, a dose mínima que promova uma estimulação eficiente da secreção de GH associada a uma baixa incidência de efeitos colaterais. É mister, portanto, que outros estudos sejam realizados para esclarecer esta dúvida.

IV - OBJETIVOS

Comparar o teste da clonidina realizado com a administração oral de uma dose de $0,0375 \text{ mg/m}^2$ de superfície corpórea com o teste de tolerância à insulina em grupos de pacientes pré-púberes e púberes no que diz respeito à:

1º) Eficiência de liberação de GH.

2º) Incidência de efeitos colaterais indesejáveis.

V - CASUÍSTICA

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SZ
C. N. E. N.

Foram estudados 31 pacientes, sendo 22 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, com idade entre 2,9 e 17,5 anos, que procuraram o Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com queixa de déficit de crescimento. Em todos, foi constatada uma estatura abaixo da média para sexo e idade, variando entre 1,3 e 8,5 desvios-padrões (DP).

Dezenove pacientes que se apresentaram com forte suspeita clínica de déficit de GH foram internados por aproximadamente 5 dias na enfermaria da Divisão de Clínica Médica I do HC-FMUSP, sendo toda a avaliação clínica, laboratorial e radiológica realizada neste período. Os outros 12 pacientes foram estudados a nível ambulatorial, completando-se a investigação diagnóstica em um período máximo de 4 meses.

VI — MATERIAL E MÉTODOS

sença de cefaléia, convulsões, desmaios, alterações visuais, tosse, dispnéia, cianose, edema, diarreia, verminose, polidipsia, poliúria, nictúria, disúria, hematúria, dores ósteo-articulares, fraqueza muscular, câimbras, as tenia, sonolência e intolerância ao frio;

- f) exame físico: altura (média de 3 medidas feitas por um único médico em estadiômetro construído de acordo com as recomendações de Underwood e Van Wyk (74)), peso, relação púbis-vértex/púbis-chão, presença de pelos axilares e pu bianos, desenvolvimento mamário, tamanho de pênis e testículos, distúrbios neurológicos, anormalidades cardíaco-respiratórias e gastrointestinais, presença de estigmas somáticos, sinais de raquitismo, de hipotireoidismo, de Cushing ou de déficit de GH.

A estatura e o peso dos pacientes foram avaliados segundo as tabelas de Marques e col. (45), as quais foram utilizadas para o cálculo dos respectivos desvios-padrões e idade estatural. Os graus de pubarca e telarca foram classificados de acordo com os parâmetros de Tanner (46).

1.2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL E RADIOLÓGICA GERAL

Os exames laboratoriais gerais incluíram hemograma completo, glicemia de jejum, dosagens séricas de sódio, potássio, uréia, creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio,

fósforo, fosfatase alcalina, urina tipo I, parasitológico de fezes e eventualmente cariótipo. Foram também realizados Rx de tórax, Rx de crânio para visualização da sela túrcica e Rx de mãos e punhos para avaliação da idade óssea conforme o Atlas de Greulich & Pyle (29). Uma paciente foi submetida a tomografia computadorizada de crânio.

1.3. AVALIAÇÃO HORMONAL BASAL

Dosagens séricas basais de somatomedina C (SmC), triiodotironina (T_3), tiroxina (T_4), tireotrofina (TSH), testosterona (T) em meninos e estradiol (E_2) em meninas foram realizadas em todos os pacientes. Níveis séricos basais de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) foram determinados apenas nas meninas púberes.

1.4. TESTES FARMACOLÓGICOS DE ESTÍMULO

Todos os testes tiveram início às 8:00 horas da manhã, com o paciente repousando em decúbito dorsal por pelo menos 1 hora e em jejum por um período mínimo de 8 horas. Amostras seriadas de sangue foram coletadas através de veia canulada com "butterfly", mantida com solução fisiológica 0,9%, sendo a punção realizada pelo menos 60 minutos antes da primeira coleta. O sangue para dosagens hormonais foi colocado em tubo de vidro simples, deixado em repouso por 3 horas a

temperatura ambiente para que houvesse retração do coágulo e, a seguir, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O soro foi então separado, aliquotado em volumes de 1 a 2 ml e congelado a -20°C até a hora do ensaio.

A coleta de glicemia durante o teste de tolerância à insulina foi realizada em tubos contendo fluoreto de sódio, os quais foram encaminhados ao laboratório imediatamente após o término do teste.

a) TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

Amostras de sangue para dosagem de GH, glicemia e cortisol (este último determinado apenas em pacientes com suspeita clínica de panhipopituitarismo) foram coletadas nos tempos de - 30, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos, sendo realizada, no tempo zero, a administração endovenosa em bolo de insulina simples (U-40 Biobrás - Bioquímica do Brasil S.A., Montes Claros, MG) na dose de 0,1 U/kg de peso. Foram monitorizados sintomas e sinais de hipoglicemia durante todo o teste, tendo-se sempre à disposição solução de glicose hipertônica a 50% (20 ml), a qual era sistematicamente injetada por via endovenosa no final do teste ou durante este se ocorresse perda de consciência.

b) TESTE DA CLONIDINA

Amostras de sangue para dosagem de GH foram coletadas nos tempos de -30, 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, sendo a clonidina administrada por via oral, no tempo zero, na dose de $0,0375 \text{ mg/m}^2$ de superfície corpórea. O comprimido de 0,1 mg (Atensina 0,1 mg, De Angeli, Itapeçerica da Serra, SP) foi esmagado e dissolvido em 10 ml de água resultando em solução de 0,01 mg/ml. O volume correspondente à dose calculada para cada paciente foi então aspirado em seringa de plástico e injetado diretamente na boca, solicitando-se ao paciente que succionasse e engolisse todo o líquido durante o procedimento. Seguiu-se lavagem da seringa com água por 2 vezes para remoção de possíveis resíduos da droga retidos nas paredes de plástico, sendo a água aspirada e administrada ao paciente da mesma maneira que a solução de clonidina.

Medidas do pulso e pressão arterial foram realizadas em cada tempo do teste, sendo também observados quaisquer outros efeitos colaterais.

c) TESTE DO HORMÔNIO LIBERADOR DO TSH (TRH) ASSOCIADO AO TESTE DO HORMÔNIO LIBERADOR DAS GONADOTROFINAS (LHRH)

Amostras de sangue para dosagem de LH, FSH, TSH e prolactina (PRL) foram coletadas nos tempos de -30, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos, sendo realizada, no tempo zero, a adminis-

tração endovenosa em bolo de 200 µg de TRH (Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP) associado na mesma seringa a 100 µg de LHRH (Ayerst, São Paulo, SP).

Todos os pacientes foram submetidos aos testes de tolerância à insulina e clonidina, ao passo que o teste do TRH associado ao LHRH só foi realizado naqueles com suspeita clínica de panhipopituitarismo.

1.5. SEGUIMENTO AMBULATORIAL

Todos os pacientes foram avaliados em ambulatório a cada 3 meses por um período mínimo de 6 meses. Nestas consultas, prestou-se particular atenção ao ritmo de crescimento e início ou evolução do desenvolvimento puberal.

2. METODOLOGIA LABORATORIAL

2.1. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GH

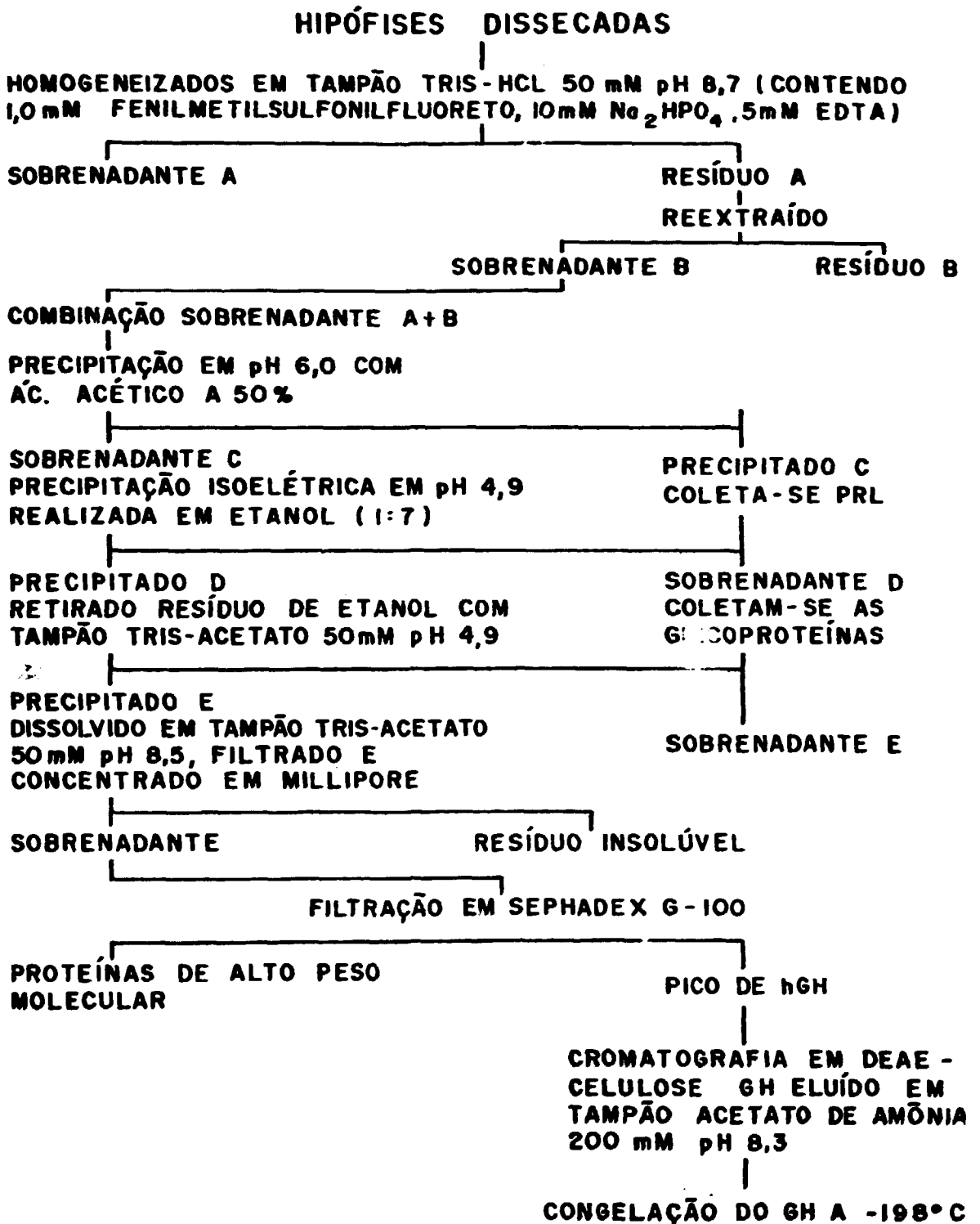
Todas as dosagens de GH foram realizadas em triplicata por método de radioensaio (RIE) desenvolvido a partir de reagentes inteiramente preparados no Laboratório de Pesquisas da Divisão de Clínica Médica I do HC-FMUSP. Todos os aspectos da técnica foram cuidadosamente analisados e controlados de modo a se obter, no final, um ensaio adequado às

finalidades deste projeto.

2.1.1. Extração e purificação do GH-HC

O GH utilizado na preparação de padrões para radioiodação e curva de deslocamento (a seguir designado GH-HC) foi extraído a partir de um lote de 100 hipófises congeladas, previamente obtidas de cadáveres humanos, baseado no método de Chapman e col. (6) com pequenas modificações (53).

As hipófises, coletadas durante autópsias de rotina pelo Serviço de Anatomia Patológica da FMUSP, foram conservadas a -20°C , envoltas individualmente em papel alumínio até o seu processamento. A dissecação das glândulas, realizada a 4°C assim como todas as demais etapas, foi seguida de homogenização em liquidificador durante 3 minutos com 200 ml de tampão Tris-fosfato (50 mM Tris, 10 mM Na_2HPO_4 , 5 mM EDTA, 1 mM fenilmetanossulfonilfluoreto), cujo pH foi ajustado a 8,7 com HCl concentrado (Fig. 1). O homogeneizado foi colocado em agitador magnético (Fanem Ltda., São Paulo, SP) por 2 horas e depois centrifugado a 10.000 g por 1 hora. O precipitado foi retomado, rehomogeneizado com 60 ml de tampão Tris-fosfato pH 9,5 (ajustado com NaOH) e submetido aos mesmos processos das etapas anteriores. Os sobrenadantes das frações foram combinados, filtrados em 1 $\bar{5}$ de vidro e o pH reduzido a 6,3 pela adição de ácido acético a 50%, gota a gota, com agitação constante. A suspensão foi então centrifugada



por 18 horas a 8.000 g, seguida de decantação do sobrenadante e ressuspensão do precipitado com 50 ml de tampão Tris-fosfato cujo pH foi ajustado a 6,3 com HCl concentrado. Esta fração homogeneizada foi adicionada ao sobrenadante anterior e centrifugada a 8.000 g por 1 hora, sendo o precipitado separado para eventual extração da prolactina. O pH do sobrenadante foi reduzido a 4,9 pela adição seqüencial, gota a gota, de ácido acético a 50% e etanol absoluto (volume 1:7), com agitação constante. A solução resultante repousou então por 12 horas antes de ser centrifugada a 15.000 g por 1 hora. A fração sobrenadante foi decantada e separada para eventual extração de LH, FSH, TSH e lipotrofinas.

O precipitado, que continha o GH, foi lavado com 50 ml de tampão Tris-fosfato, cujo pH foi ajustado a 4,9 com HCl concentrado contendo etanol 12,5%. A suspensão foi então centrifugada a 15.000 g por 1 hora e o precipitado dissolvido em 500 ml de tampão Tris-acetato 50 mM pH 8,5. A solução resultante foi filtrada e concentrada utilizando-se membrana de Millipore 10 K a um volume de 90 ml, o qual foi centrifugado a 15.000 g por 1 hora. A fração sobrenadante foi aplicada a uma coluna (5 x 100 cm) de Sephadex G.100 (Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla, Suécia), previamente equilibrada com tampão Tris-acetato 50 mM pH 8,5 contendo clorbutanol 0,02%. A eluição foi realizada com este mesmo tampão (fluxo 75 ml/min) e o efluente da coluna monitorizado com

absorbância a 280 nm (Fig. 2A). Quando o GH monômero começou a ser eluído, o efluente da coluna de Sephadex foi conectado diretamente a outra coluna (2 x 60 cm) de dietilaminoetil celulose DEAE - c 52 (Whatman, Clifton, NJ, EUA), preequilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 8,3. Após receber o GH, a coluna foi lavada com 350 ml de tampão acetato de amônio 50 mM pH 8,5 (fluxo 80 ml/hora) em um gradiente crescente de concentração até 200 mM, mantendo-se o mesmo volume e monitorizando-se o efluente com absorbância a 280 nm (Fig. 2B). Quando o pico principal do GH começou a ser eluído, a sua fração central (8 ml) foi coletada em frasco imerso em gelo seco, aliquotada em volumes de 0,1 ml e congelada em nitrogênio líquido (-198°C).

O conteúdo de uma destas alíquotas foi submetido a testes de controle de qualidade que consistiram em:

- a) determinação da concentração de proteínas pelo método de Schacterle & Pollack (68), obtendo-se em média um valor de 1,46 mg/ml;
- b) quantificação do GH-HC por "kit" comercial de RIE (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA), utilizando-se 6 diluições progressivas (1/200.000 até 1/3.200.000 em tampão de ensaio) como amostras desconhecidas e obtendo-se em média um valor de 1,15 mg/ml;
- c) estimativa da atividade biológica do GH-HC por método de

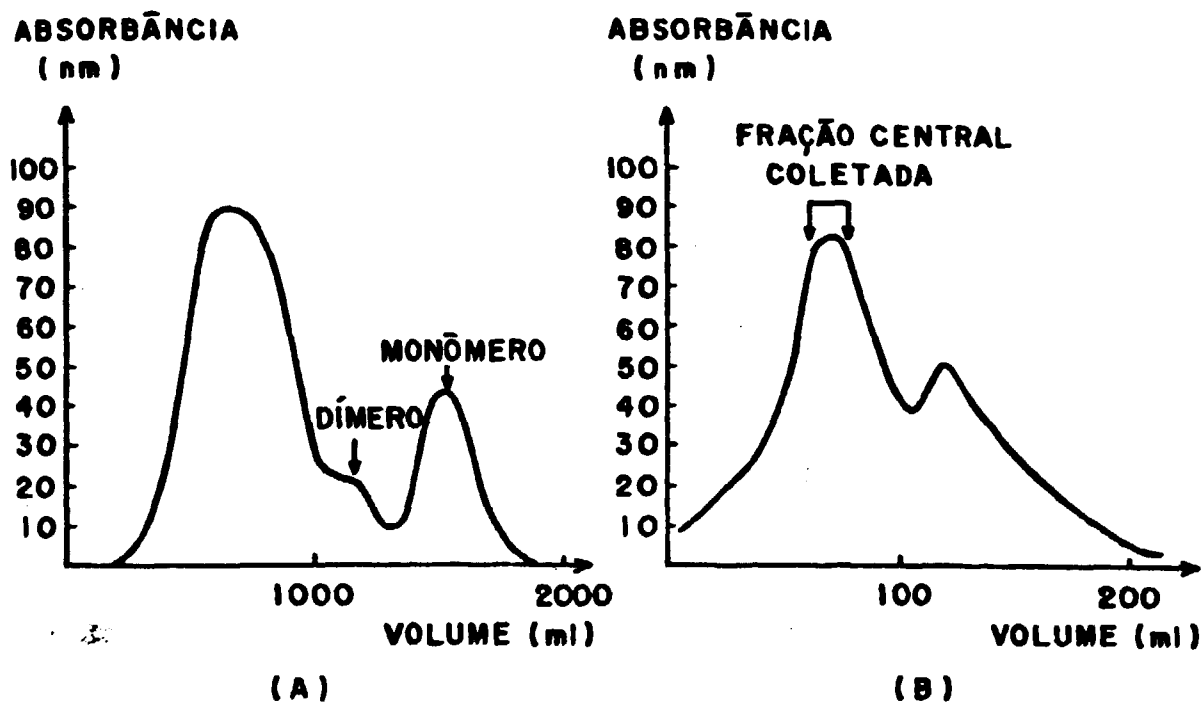


FIG. 2 - CROMATOGRÁFIA DO GH-HC EM SEPHADEX G.100 (A) E EM DEAE-c 52 (B).

radiorreceptor em fígado de mulher grávida (10), cujo resultado foi de 2,1 U/ml;

- d) comparação do GH-HC com padrão fornecido pelo National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA (GH-NIH) por eletroforese em gel de poliácridamida (8), a qual demonstrou ter o GH-HC padrão de isohormônios com predominância da forma β semelhante ao do GH-NIH;
- e) determinação da contaminação por outros hormônios hipofisários através de "kits" comerciais de RIE (Clinical Assays, Cambridge, MA, EUA): TSH \leq 3 μ UI/ml, PRL = 3 ng/mg, FSH = 82 mUI/mg e LH = 641 mUI/mg.

O GH-HC foi conservado em nitrogênio líquido por um período de 9 meses. A cada 45 dias aproximadamente, uma alíquota foi descongelada e utilizada para:

- a) preparação de padrões para radioiodação contendo 5 μ g de GH em 50 μ l de tampão fosfato (TF) 0,2 M pH 7,4 preparado com fosfato de potássio monobásico. Estes foram no mesmo dia utilizados para marcação e a seguir desprezados;
- b) preparação de padrões para curva de deslocamento contendo 1 μ g de GH em 1 ml de tampão borato (TB) 0,1 M pH 8,5 com albumina sérica bovina (BSA, Sygma Chemical Company, St Louis, MD, EUA) e azida sódica 0,1% (a seguir designado tampão de ensaio). Estes foram alíquotados em volumes de 0,5 ml e congelados a -20°C por 30 dias. Neste período,

uma alíquota foi descongelada na hora de cada ensaio e utilizada para a preparação de soluções contendo 1,25, 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 ng/ml de GH "frio" em tampão de ensaio, sendo todas desprezadas após o término do RIE.

2.1.2. Radioiodação do GH-HC

A radioiodação do GH-HC foi realizada de acordo com o método clássico de Greenwood e Hunter (27) com apenas algumas modificações (51). Em cada processo de marcação, adicionaram-se seqüencialmente, em tubo de vidro 12 x 60 mm, 50 µl do padrão para radioiodação (preparado no mesmo dia) contendo 5 µg de GH-HC, e 1 mCi de ^{125}I sob a forma de iodeto de sódio livre de carreador (Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra), com no mínimo 100 mCi/ml. Após homogenização, foram pipetados 20 µl de solução de cloramina T (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ) contendo 1,4 mg/ml em TF 0,2 M pH 7,4, seguidos de agitação suave por 10 segundos e adição de 20 µl de solução de metabissulfito de sódio (Merck) contendo 2,0 mg/ml em TF 0,2 M pH 7,4. Procedeu-se então a nova agitação suave por 10 segundos antes da adição de 0,2 ml de solução de iodeto de sódio (10 mg/ml em TF 0,2 M pH 7,4) e homogenização final da mistura.

A eficiência de radioiodação foi determinada de maneira grosseira pelo denominado teste do carvão, no qual 1 µl do material radioiodado, diluído em 2,4 ml de tampão

de ensaio, foi adicionado em duplicata a 0,5 ml de suspensão de carvão (carvão Merck a 100 mg/ml em TB 0,1 M pH 8,5). Após homogeneização em "Vórtex" e centrifugação por 15 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi separado do precipitado por decantação e a radioatividade de ambos determinada em contador de cintilação de poço (Gamma 4000, Beckman Instruments Inc., Irvine, CA, EUA). Considerou-se uma boa eficiência de marcação quando 60% ou mais da radioatividade total encontrava-se no precipitado (correspondente ao GH-HC - ^{125}I). Como, em cada processo, 2 alíquotas do mesmo padrão de GH-HC foram si multaneamente submetidas a radioiodação, o teste do carvão permitiu também escolher o material com maior eficiência de marcação, o qual foi em seguida submetido a purificação.

A cromatografia do GH-HC - ^{125}I foi realizada em coluna de vidro (1 x 55 cm) contendo Sephadex G.75 (Pharmacia) deareada e previamente equilibrada com TB 0,05 M pH 8,6 com BSA 0,1% e azida sódica 0,1%. Todo o conteúdo do tubo de radioiodação foi colocado no topo da coluna e, logo após sua penetração no Sephadex, foram adicionados 0,3 ml de solução de iodeto de sódio (10 mg/ml). A seguir, a eluição foi iniciada com TB 0,05 M pH 8,6 com BSA 0,1% e azida sódica 0,1%, com fluxo de 0,5 ml/minuto, sendo os primeiros 6 ml do eluído desprezados. O restante foi coletado em alíquotas de 1 ml a cada 2 minutos (2070 Ultrorac II, LKB, Bromma, Suécia) em 80 tubos de vidro (15 x 100 mm) contendo 0,1 ml de solução de

BSA 2% em TB 0,05 M) pH 8,6 com azida sódica 0,1%.

A radioatividade dos 80 tubos foi determinada por contagem de 10 μ l do conteúdo de cada tubo em detector de cintilação gama. Após construção do gráfico expressando a distribuição da radioatividade ao longo do volume e-luído (Fig. 3). 2 picos foram constatados: o primeiro correspondendo ao GH-HC - 125 I íntegro e o segundo ao 125 I livre. Praticamente não foi observado pico de agregados do hormônio marcado. Os conteúdos dos tubos que acusaram as 3 maiores atividades no primeiro pico foram misturados de modo a se obter, no final, 3 ml de GH-HC - 125 I íntegro. Este foi, a seguir, aliqotado em volumes de 0,1 ml e congelado a -20°C por um período de 30 dias.

O controle de qualidade do GH-HC - 125 I purificado consistiu em:

a) DETERMINAÇÃO DO GRAU DE CONTAMINAÇÃO POR 125 I LIVRE PELO TESTE DO CARVÃO

Este teste foi realizado da mesma maneira que antes da cromatografia, só que agora adicionando-se 10 μ l de GH-HC - 125 I diluídos em 2,4 ml de tampão de ensaio à suspensão de carvão. Para que o hormônio marcado fosse considerado de boa qualidade, a porcentagem de radioatividade total presente no sobrenadante (correspondente ao 125 I livre) deveria situar-se abaixo de 20% (51).

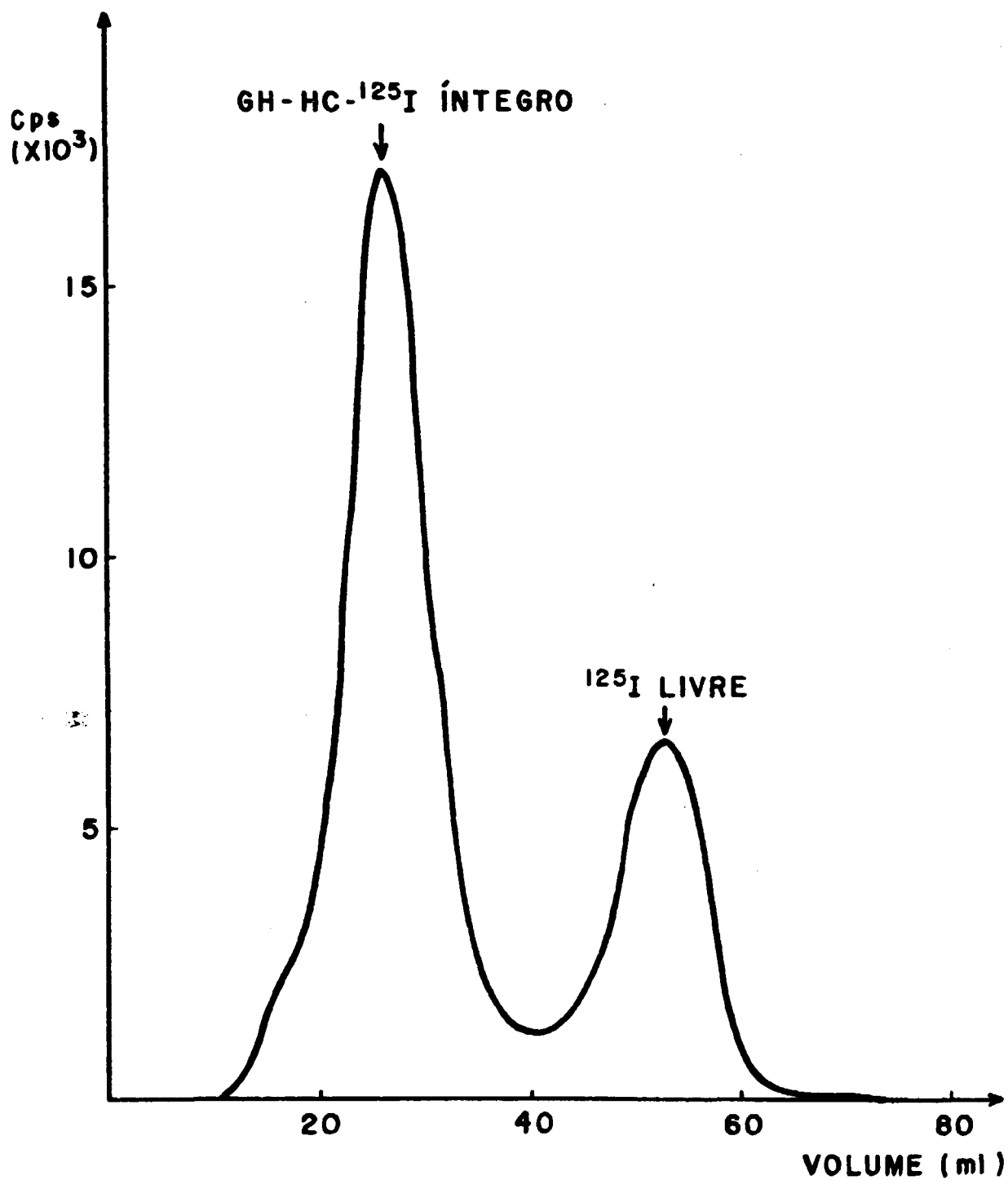


FIG. 3 - CROMATOGRÁFIA DO GH-HC-¹²⁵I EM SEPHADEX 6.75.

b) AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE MÁXIMA DO GH-HC - ^{125}I
PELA ADIÇÃO DE EXCESSO DE ANTICORPO

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) tampão de ensaio (100 μl); (2) anti-soro 72 (100 μl de solução 1/1000 em tampão de ensaio); (3) GH-HC - ^{125}I (100 μl de solução 1/200 em tampão de ensaio).

O método de separação do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre, utilizado neste como em todos os demais ensaios deste projeto, consistiu na adição de 1,0 ml de solução de polietilenoglicol a 17% (PEG 8000, Sygma), preparada em tampão de ensaio sem BSA e conservada a 4°C. Seguiu-se a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C e decantação do sobrenadante. Após contagem do precipitado, o grau de ligação máxima do hormônio marcado ao anticorpo foi determinado pela razão (radioatividade do precipitado/radioatividade total x 100), devendo situar-se acima de 80% para que o GH-HC ^{125}I fosse considerado de boa qualidade.

c) ESTIMATIVA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO GH-HC - ^{125}I PELO
MÉTODO DO AUTODESLOCAMENTO (25,49,65)

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) concentrações crescentes de hormônio marcado (100 μl de soluções 1/100, 1/75, 1/50 e 1/25 em tampão de ensaio, cujas ati

vidades foram previamente determinadas, a seguir denominadas amostras desconhecidas) e de hormônio "frio" (100 µl de soluções contendo 0, 1,25, 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 ng/ml em tampão de ensaio); (2) anti-soro 72 (100 µl de solução 1/90.000 em tampão de ensaio); (3) GH-HC - ^{125}I (100 µl de solução 1/200 em tampão de ensaio). Em 3 tubos (NSB), incubou-se apenas tampão de ensaio (200 µl) e hormônio marcado (100 µl) para determinação da ligação inespecífica.

Todos os tubos foram contados antes e após precipitação com PEG para determinação da radioatividade total e do precipitado, respectivamente. A seguir, a razão radioatividade ligada/radioatividade total (B/T), utilizada para construção da curva dose-resposta da Fig. 4, foi calculada para cada padrão de GH "frio" e amostra desconhecida pela equação:

$$\frac{B}{T} = \frac{B_i \text{ (ou } B_n) - \text{NSB}}{T} \times 100$$

onde:

B_i (ou B_n) = radioatividade do precipitado correspondente ao padrão i ng/ml de GH "frio" (B_i) ou à amostra desconhecida n (B_n).

NSB = radioatividade do precipitado correspondente ao tubo NSB.

T = radioatividade total.

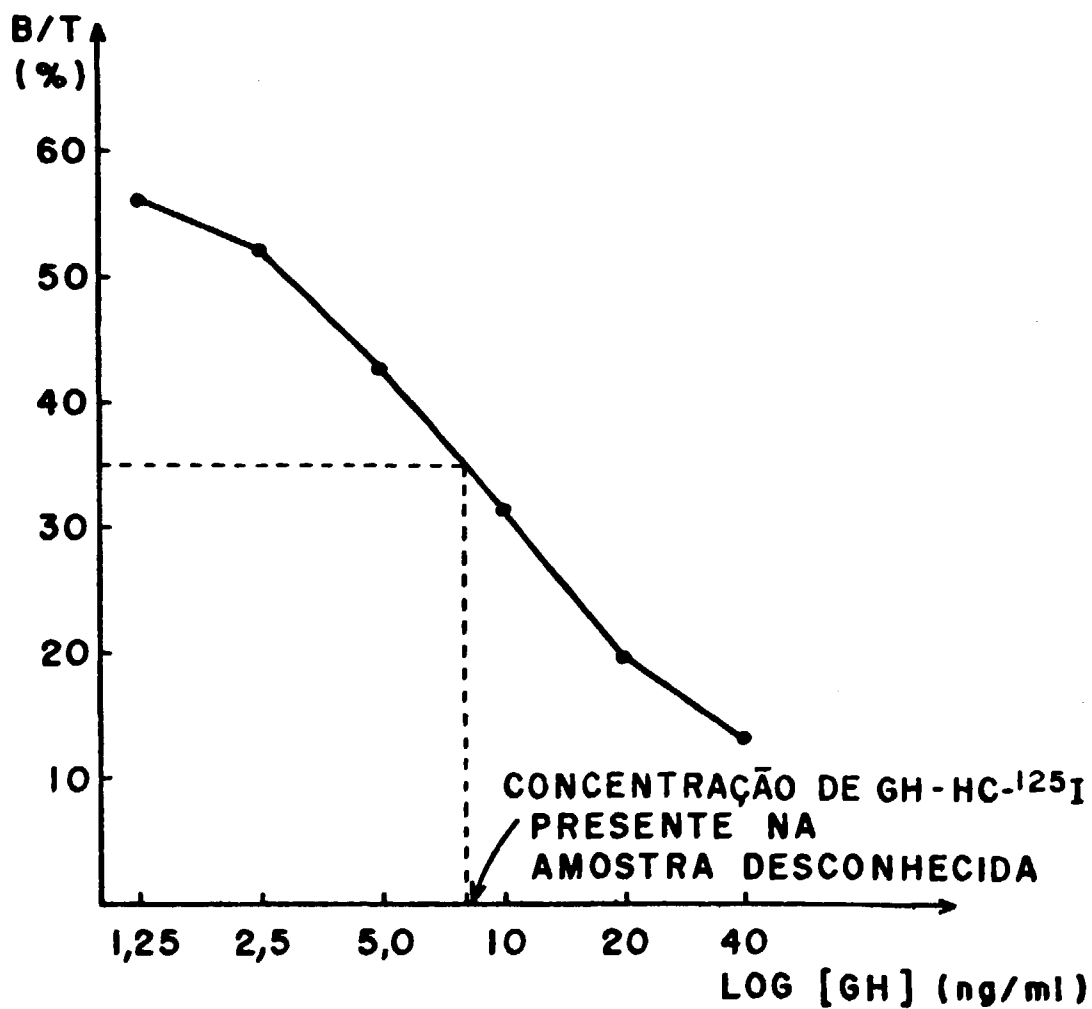


FIG. 4 - CÁLCULO DA MASSA DE GH-HC-¹²⁵I PRESENTE EM UMA AMOSTRA DESCONHECIDA PELA TÉCNICA DO AUTO-DESLOCAMENTO.

A concentração do hormônio marcado e, conseqüentemente, sua massa, presente nas diferentes amostras desconhecidas, foi então determinada por interpolação de suas respectivas razões B/T a partir da curva dose-resposta. Foi possível, dessa maneira, correlacionar a massa e atividade do traçador presente em cada amostra e construir o gráfico da Fig. 5, a partir do qual a atividade específica foi calculada pela recíproca da inclinação da reta obtida por regressão linear simples.

d) DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DO GH-HC-¹²⁵I CONSERVADO A 4°C E A -20°C

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) tampão de ensaio (100 µl); (2) anti-soro 72 (100 µl de solução 1/90.000, correspondente ao tubo Bo) ou tampão de ensaio (100 µl, correspondente ao tubo NSB); (3) GH-HC-¹²⁵I (100 µl de solução 1/200).

Após separação com PEG e contagem do precipitado, as porcentagens de ligação total (%Bo total), inespecífica (%NSB) e específica (%Bo específica) foram calculadas pelas equações:

MASSA DO TRAÇADOR
($\mu\text{g} \cdot 10^{-4}$)

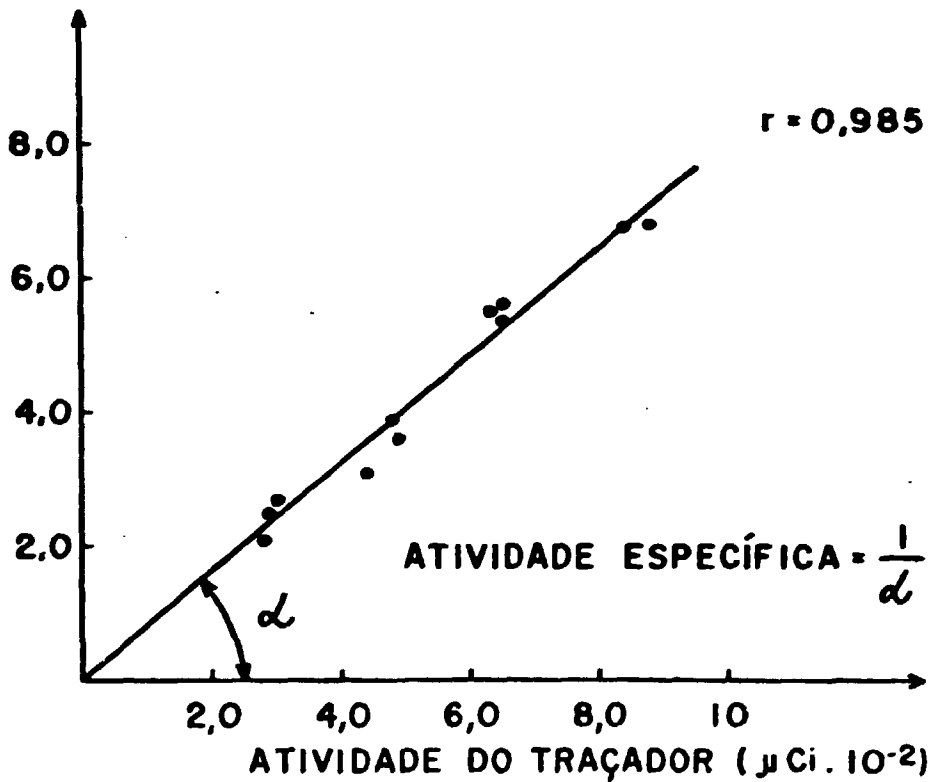


FIG. 5 - RELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE DE UMA AMOSTRA DE GH-HC- ^{125}I E SUA RESPECTIVA MASSA DETERMINADA PELA TÉCNICA DO AUTODESLOCAMENTO.

$$\%Bo \text{ total} = \frac{\text{radioatividade do precipitado do tubo Bo}}{\text{radioatividade total}} \times 100$$

$$\%NSB = \frac{\text{radioatividade do precipitado do tubo NSB}}{\text{radioatividade total}} \times 100$$

$$\%Bo \text{ especifica} = \%Bo \text{ total} - \%NSB$$

Medidas seriadas ao longo de 30 dias após radioiodação (Fig. 6) revelaram uma redução lenta e discreta dos 3 parâmetros ao longo de todo o período, sendo esta redução um pouco mais acentuada a 4°C do que a -20°C. Estes dados demonstraram uma maior perda de imunoreatividade do hormônio marcado a 4°C e, por esta razão, as alíquotas de GH-HC - ¹²⁵I conservadas a -20°C passaram a ser descongeladas e diluídas apenas na hora do ensaio, sendo desprezadas após o término deste.

- e) COMPARAÇÃO DO GH-HC - ¹²⁵I COM GH-NIH - ¹²⁵I
(PREPARAÇÃO PARA RADIOIODAÇÃO FORNECIDA PELO NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH E MARCADA NO HC-FMUSP)

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) padrões de GH "frio" (100 µl de soluções contendo desde 0 até 40 ng/ml); (2) anti-soro 72 (100 µl de solução 1/90.000); (3) GH-HC - ¹²⁵I

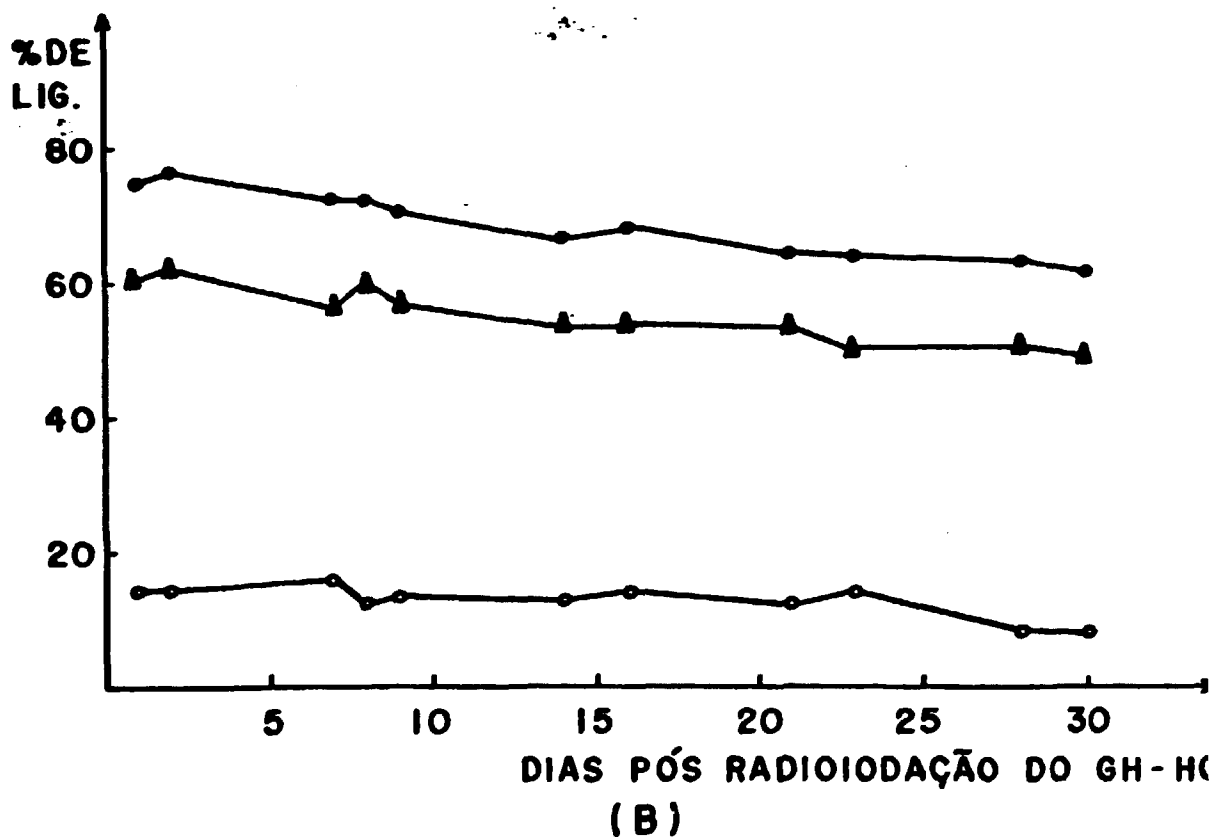
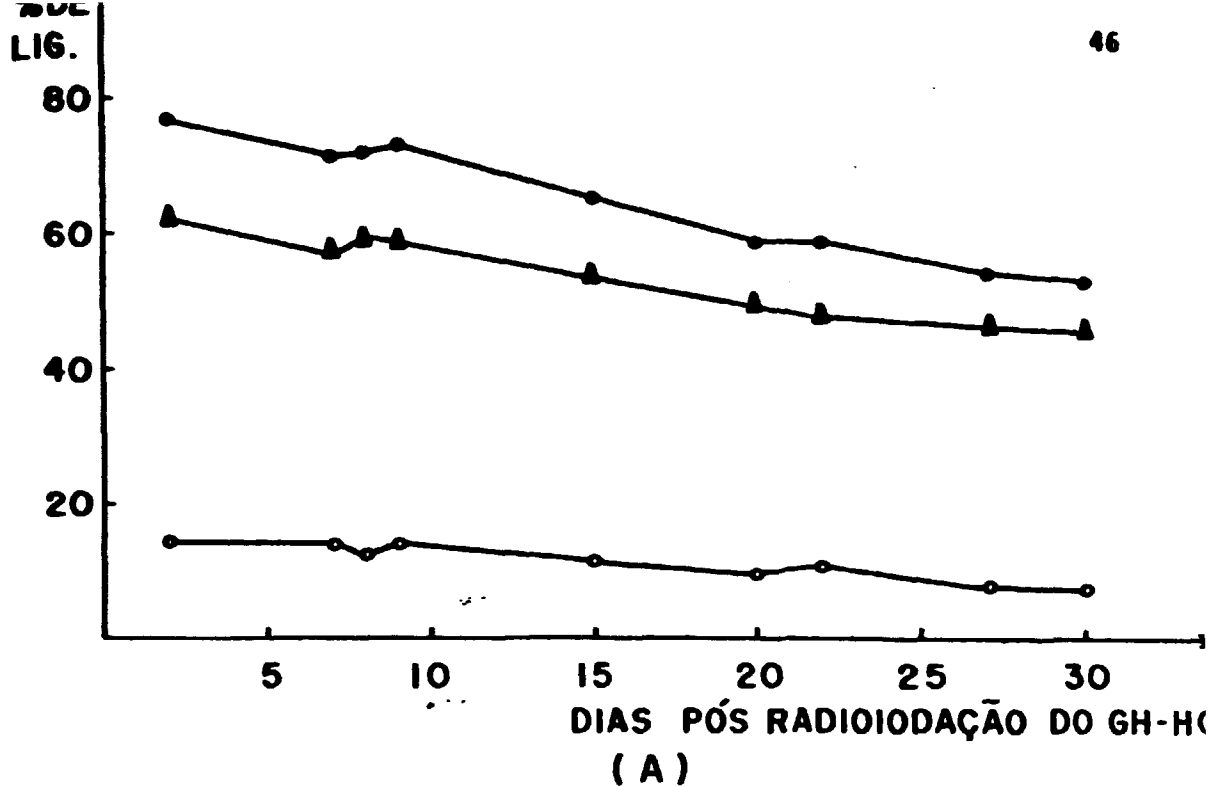


FIG. 6 - VARIÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO TOTAL (●), INESPECÍFICA (○) E ESPECÍFICA (▲) AO LONGO DE 30 DIAS APÓS RADIOIODAÇÃO DO GH-HC COM ESTE CONSERVADO A 4°C (A) OU A -20°C (B).

ou GH-NIH - ^{125}I (100 μl de solução 1/200). Em 3 tubos (NSB), incubou-se apenas tampão de ensaio (200 μl) e hormônio marcado (100 μl).

Após separação com PEG e contagem do precipitado, as curvas dose-resposta para cada hormônio marcado foram elaboradas e comparadas entre si (Fig. 7). O paralelismo observado entre elas confirmou o comportamento idêntico do GH-HC - ^{125}I em relação ao GH-NIH - ^{125}I .

Oito processos de radioiodação foram realizados em um período de 9 meses, um a cada 45 dias aproximadamente. Em dois, a eficiência de marcação determinada pelo teste do carvão foi inferior a 50% e, por isso, o material radioiodado não foi submetido a purificação. Nos outros 6 processos, a eficiência de marcação situou-se entre 64 e 71%, o grau de contaminação com ^{125}I entre 4 e 15%, a imunorreatividade máxima entre 82 e 94% e a atividade específica entre 124 e 157 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, demonstrando a boa qualidade do GH-HC - ^{125}I para fins de RIE. Não houve deterioração significativa de nenhum destes parâmetros ao longo dos 9 meses, indicando ser o nitrogênio líquido eficiente meio de conservação para o GH-HC.

2.1.3. Produção de anti-soro anti-GH

A técnica de imunização empregada para a produção de anti-soro anti-GH baseou-se primariamente no método de Vaitukatis e col. (76).

LOGITO
B/B₀ (%)

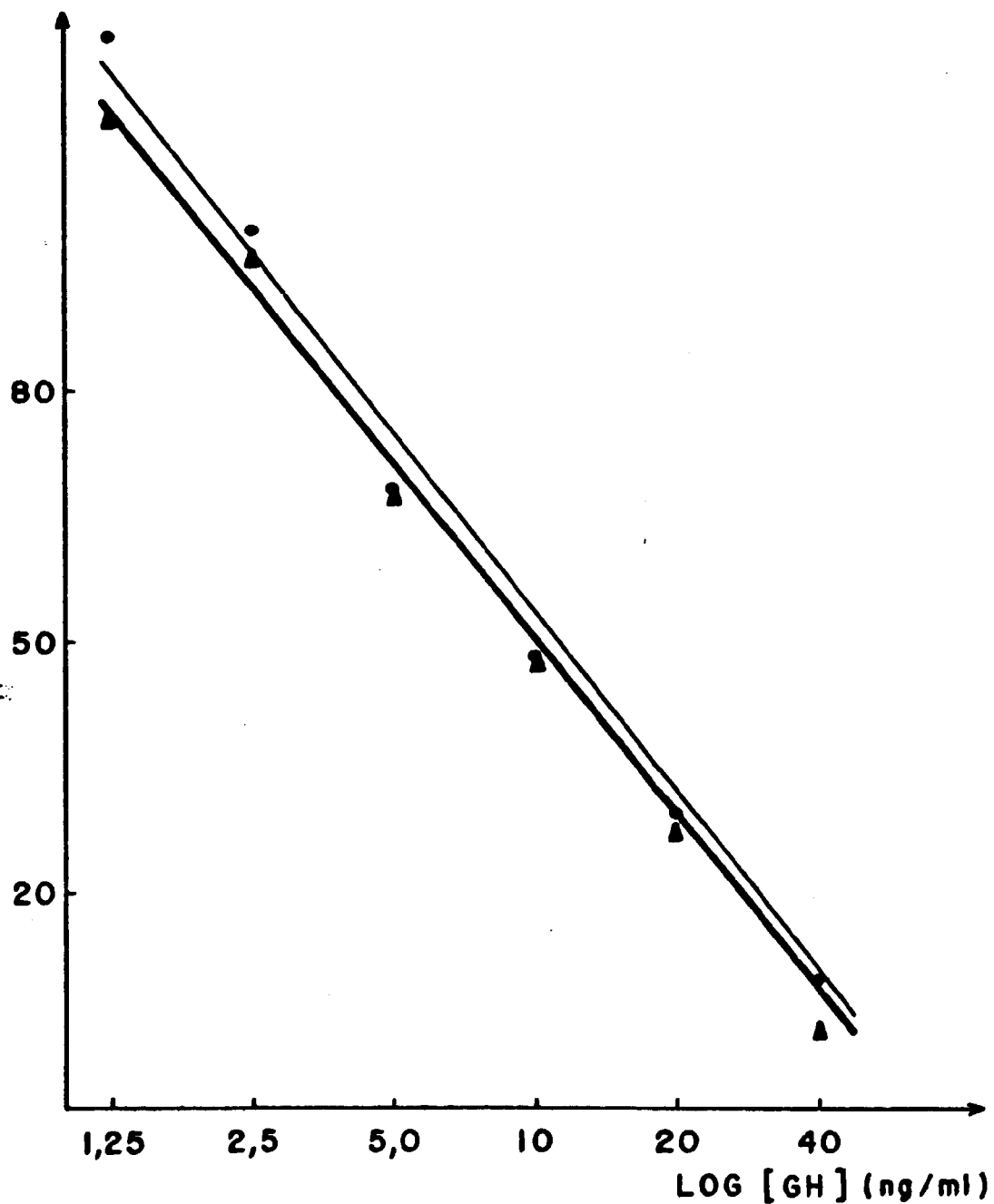


FIG. 7 - COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS DOSE-RESPOSTA PREPARADAS COM GH-HC-¹²⁵I (●—●) E GH-NIN-¹²⁵I (▲—▲).

Preparou-se, inicialmente, emulsão contendo 3 mg de GH (Kabi Diagnostica, Estocolmo, Suécia), 9 ml de solução salina e 6 ml de adjuvante completo de Freund, seguida de homogenização em Vórtex e repouso por 24 horas a 4°C para confirmar a não separação das partes. Após raspagem dos pelos do dorso, 3 coelhos da Nova Zelândia (idade média de 3 meses) foram imunizados, cada animal recebendo 30 aplicações intradérmicas de 0,1 ml da emulsão em diferentes pontos do dorso, correspondendo a 0,6 mg de GH. A cada 3 semanas, foi realizada nova imunização nas mesmas condições que a primeira, só que com emulsão preparada com adjuvante incompleto de Freund.

Amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia central da orelha 10 dias após cada imunização. O sangue coletado foi deixado em repouso a 4°C por 48 a 72 horas para que houvesse retração do coágulo, seguido de separação do soro e diluição do mesmo com tampão de ensaio na proporção de 1:1. Procedeu-se então à titulação do anti-soro para se determinar a necessidade ou não de novas imunizações. Após a quarta imunização de um dos animais, foi finalmente obtido um anti-soro (anti-soro 72), cujas excelentes características foram demonstradas pelos testes de controle de qualidade. Estes consistiram em:

a) DETERMINAÇÃO DO TÍTULO, O QUAL FOI DEFINIDO COMO A DILUI

**ÇÃO FINAL DO ANTI-SORO CAPAZ DE LIGAR 50% DO HORMÔNIO
MARCADO EM CONDIÇÕES PRÉ-ESTABELECIDAS (54)**

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) tampão de ensaio (100 μ l); (2) diluições progressivas do anti-soro 72 (100 μ l de solução 1/30.000 até 1/1.920.000 em tampão de ensaio); (3) GH-HC - 125 I (100 μ l de solução 1/200). Em 3 tubos, incubou-se apenas tampão de ensaio (200 μ l) e hormônio marcado (100 μ l).

Após separação com PEG e contagem do precipitado, os valores da %Bo específica para cada diluição do anti-soro foram calculados e expressos no gráfico da Fig. 8. O título do anti-soro 72 foi então determinado pela diluição final correspondente a 50% de ligação específica, ou seja, 1/640.000.

**b) CÁLCULO DA CONSTANTE DE AFINIDADE (K) PELO MÉTODO DE
SCATCHARD (67)**

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) concentrações crescentes de GH "frio" (100 μ l de soluções contendo desde 0 até 40 ng/ml); (2) anti-soro 72 (100 μ l de solução 1/90.000) e (3) GH-HC - 125 I (100 μ l de solução 1/200). Em 3 tubos (NSB), incubou-se apenas tampão de ensaio (200 μ l) e hormônio marcado (100 μ l).

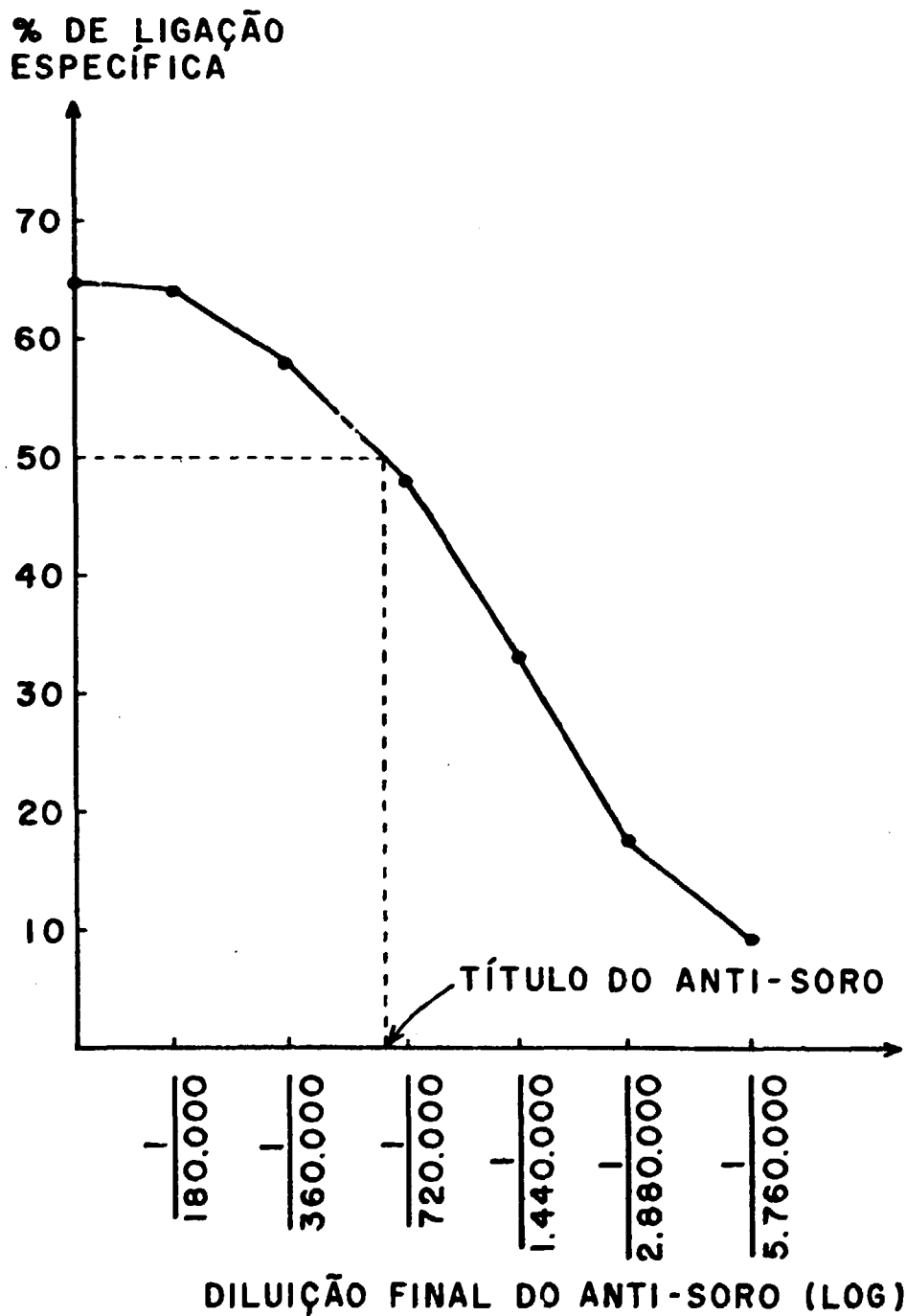


FIG. 8 - CURVA DE TITULAÇÃO DO ANTI-SORO 72.

Todos os tubos foram contados antes e após precipitação com PEG para determinação da radioatividade total e do precipitado, respectivamente. Os parâmetros radioatividade ligada/radioatividade livre (B/F) e concentração de hormônio ligado ao anticorpo (b) foram calculados para cada padrão de GH "frio" pelas equações:

$$\frac{B}{F} = \frac{(B_i - NSB)}{[T - (B_i - NSB)]}$$

$$b = \text{concentração de GH "frio"} \times \frac{(B_i - NSB)}{T}$$

onde:

B_i = radioatividade do precipitado correspondente à concentração i ng/ml de GH "frio";

NSB = radioatividade do precipitado correspondente ao tubo NSB;

T = radioatividade total.

A partir do gráfico relacionando estes 2 parâmetros (gráfico de Scatchard, Fig. 9), o valor de K ($2,1 \cdot 10^{10}$ 1/mole) foi determinado pela inclinação da reta obtida por regressão linear simples.

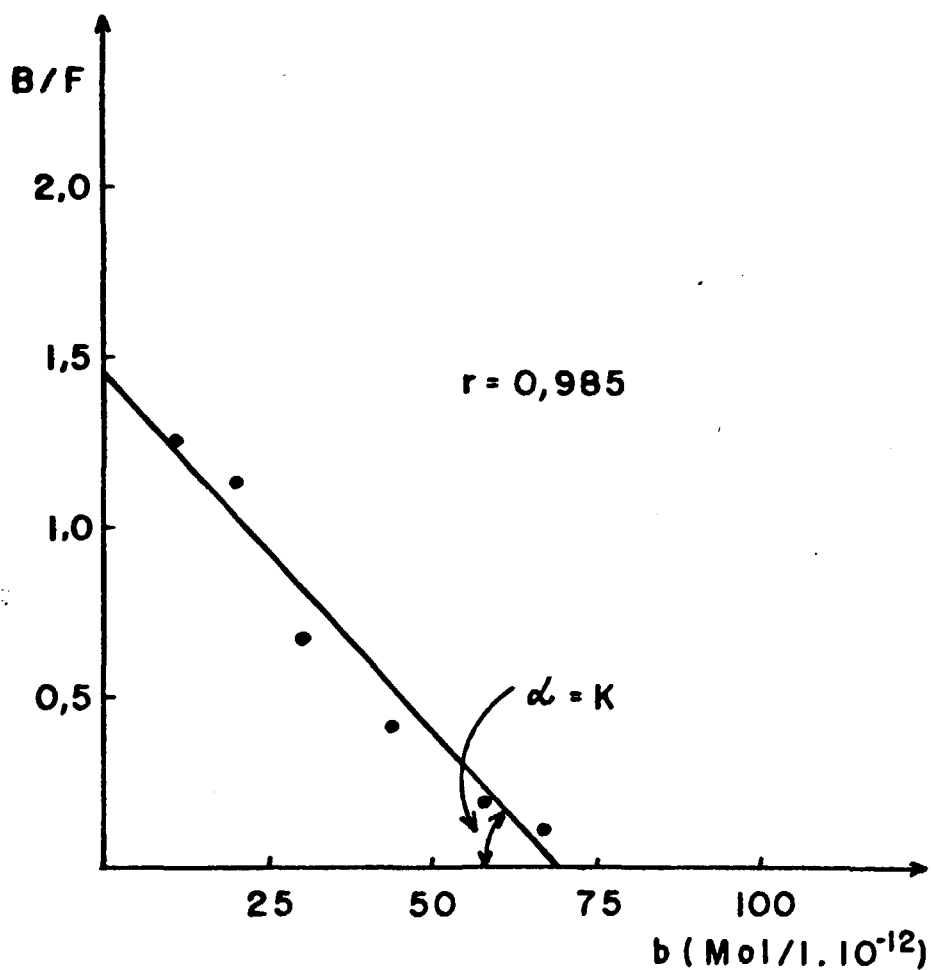


FIG. 9 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE (K) PELO GRÁFICO DE SCATCHARD.

c) DETERMINAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE CRUZADA COM PADRÕES PUROS DE LH, FSH, TSH, PRL E HORMÔNIO LACTOGÊNICO PLACENTÁRIO (HPL) FORNECIDOS PELO NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (PREPARAÇÕES PARA RADIOIODAÇÃO)

Os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente: (1) concentrações crescentes de hormônio "frio" em tampão de ensaio (100 µl) tais como GH (0 até 40 ng/ml), TSH (até 2500 ng/ml), HPL (até 10.000 ng/ml) e LH, FSH e PRL (até 2.000 ng/ml cada um); (2) anti-soro 72 (100 µl de solução 1/90.000) e (3) GH-HC - ¹²⁵I (100 µl de solução 1/200) e hormônio marcado (100 µl).

Após separação com PEG e contagem do precipitado, o grau de inibição da ligação máxima (B/Bo) foi determinado para cada hormônio pela equação:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{(B_i - NSB)}{(B_0 - NSB)} \times 100$$

onde:

B_i = radioatividade do precipitado correspondente à concentração i ng/ml de hormônio "frio";

B_0 = radioatividade do precipitado correspondente à concentração zero;

NSB = radioatividade do precipitado correspondente ao tubo NSB.

A porcentagem de imunorreatividade cruzada do anti-soro 72 para cada hormônio foi então determinada pela razão entre a concentração de GH "frio" e a do hormônio estudado necessárias para provocar 50% de inibição (2), ou seja, $B/B_0 = 50\%$ (Fig. 10). Os seguintes valores foram encontrados: LH < 0,3%, FSH < 0,3%, TSH < 0,3%, PRL = 0,6%, HPL < 0,1%.

As características do anti-soro 72, comparáveis às descritas na literatura para anticorpos anti-GH de comprovada eficácia (50), confirmaram a sua excelente qualidade, permitindo que ele fosse utilizado em todos os ensaios deste projeto. Aliquotas de 0,1 ml foram liofilizadas e posteriormente conservadas a -20°C . A cada 6 meses, uma foi reconstituída e diluída 1/10 em tampão de ensaio, realiquotada em volumes de 0,1 ml e recongelada a -20°C . A partir destas últimas aliquotas, soluções 1/90.000 em tampão de ensaio foram preparadas a cada 30 dias, conservadas a 4°C e utilizadas nos ensaios durante este período.

2.1.4. Método de separação do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre

A separação do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre foi realizada pela técnica do polietilenglicol, descrita em 1971 por Desbuquois e Aurbach (14). Este agente provoca a redução da quantidade de água livre do sistema, resultando em diminuição da solubilidade e precipitação

LOGITO
B/B₀ (%)

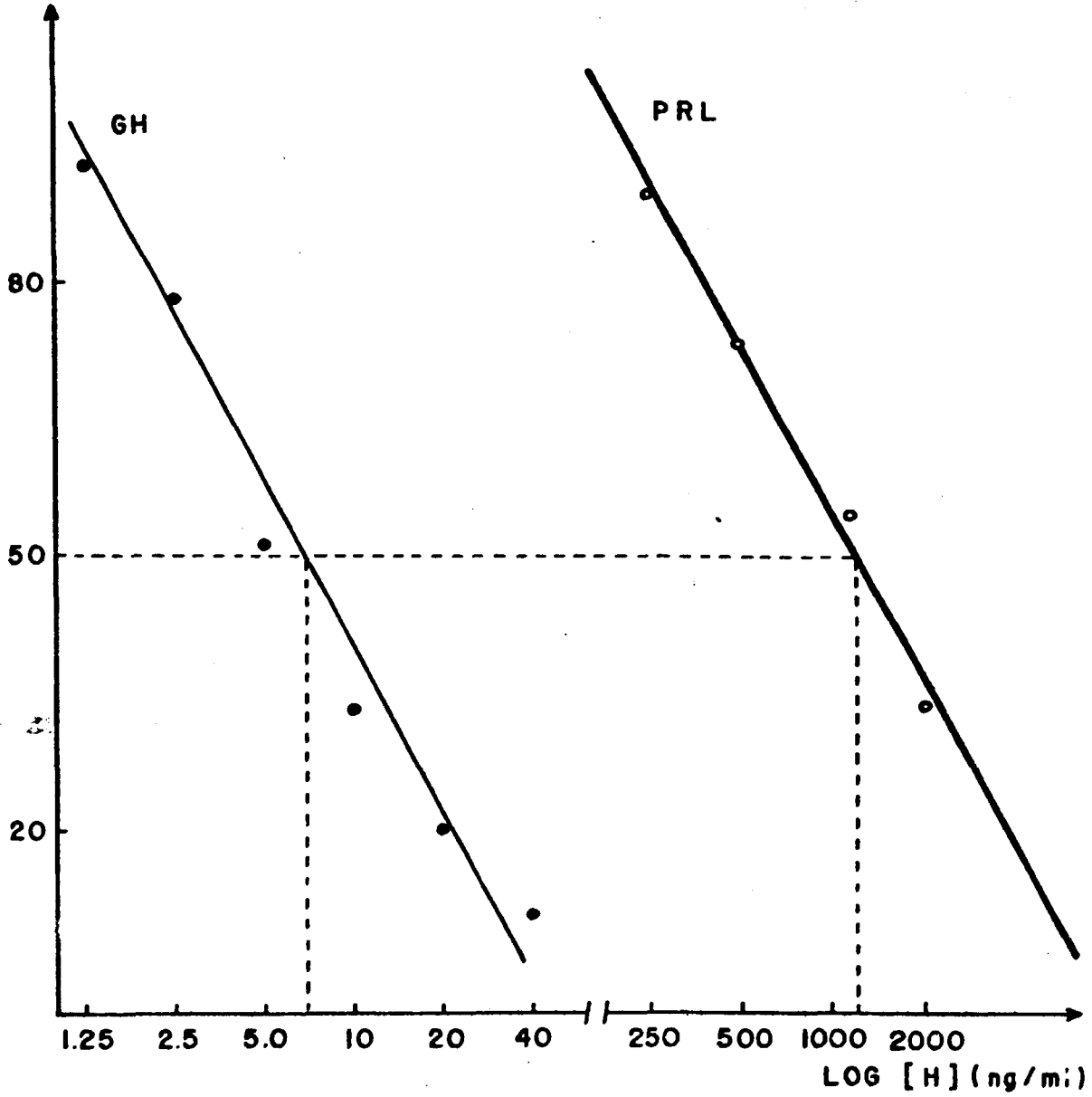


FIG. 10 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE IMUNORREATIVIDADE CRUZADA DO ANTI-SORO 72 COM A PRL.

do complexo antígeno-anticorpo (7). Suas principais vantagens consistem em ser um método simples e de baixo custo e, no caso do GH, promover a separação instantânea e eficiente do complexo antígeno-anticorpo do antígeno livre. O grau relativamente alto de ligação inespecífica, citado como a principal desvantagem deste método, não parece comprometer significativamente a precisão de ensaios em que a capacidade de ligação total é maior do que 50% (7), como é o caso do RIE desenvolvido neste projeto. Por estas razões, o PEG foi escolhido como método de separação, ao invés de técnicas mais sofisticadas tais como precipitação com segundo anticorpo, as quais exigem maior custo e complexidade.

A concentração de PEG a ser adicionada ao ensaio foi determinada por experimento que consistiu na incubação em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente, dos seguintes reagentes: (1) tampão de ensaio (100 μ l); (2) anti-soro 72 (100 μ l de solução 1/90.000, correspondente ao tubo Bo) ou tampão de ensaio (100 μ l, correspondente ao tubo NSB); (3) GH-HC - 125 I (100 μ l de solução 1/200). A precipitação foi realizada com diferentes concentrações finais de PEG (2 a 20%) diluído em tampão de ensaio sem BSA, pipetando-se 1,0 ml do mesmo imediatamente após adição de soro humano (100 μ l). Uma vez contados os precipitados, as porcentagens de ligação total, inespecífica e específica foram determinadas para cada concentração de PEG e expressas

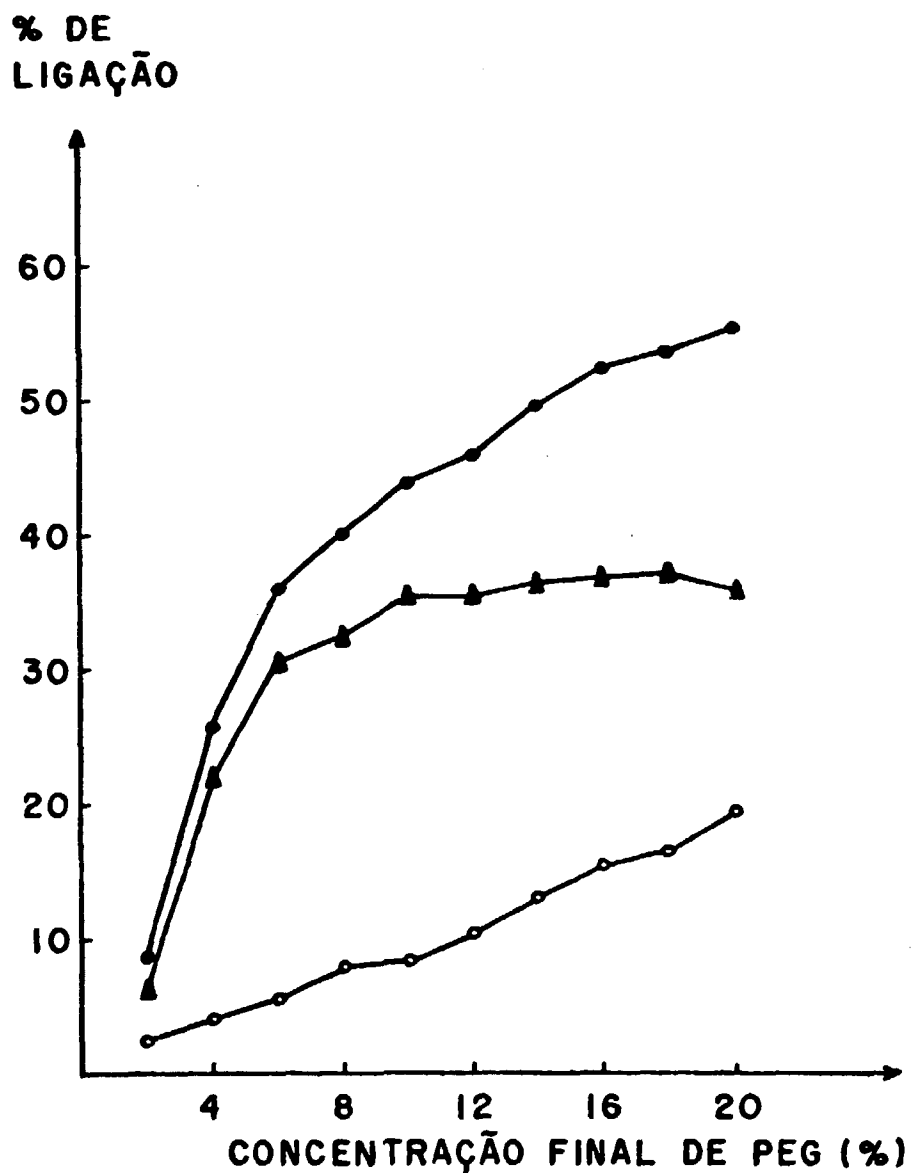


FIG. II - VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO TOTAL (●), INESPECÍFICA (○) E ESPECÍFICA (▲) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FINAL DE PEG.

no gráfico da Fig. 11. O incremento da concentração de PEG acima de 10% resultou em aumentos muito pequenos da %Bo específica associados a elevações mais significativas da %NSB, demonstrando não haver vantagem alguma em se utilizar concentrações muito maiores do que 10%. Por esta razão, a concentração final de PEG foi fixada em 12,1%, sendo este valor utilizado em todos os ensaios deste projeto.

A influência da concentração proteica do meio sobre o grau de precipitação do complexo antígeno-anticorpo provocado pelo PEG foi estudada em ensaio no qual realizou-se incubação idêntica à do experimento anterior. Soro humano ("pool" com concentração proteica total = 7,0 g/dl, imunologicamente negativo para hepatite B, sífilis e Chagas) foi acrescentado à mistura de incubação em volumes crescentes variando de 0 até 200 μ l, seguido da adição de 1,0 ml de PEG (concentração final 12,1%). Após contagem do precipitado, as porcentagens de ligação total, inespecífica e específica foram calculadas para cada volume de soro adicionado antes do PEG e expressas no gráfico da Fig. 12. Na ausência de soro, a precipitação do complexo antígeno-anticorpo com PEG foi muito pequena, aumentando substancialmente após adição de 25 μ l de soro. Incrementos a partir deste volume resultaram em aumentos progressivos da %Bo total e %NSB, ao passo que a %Bo específica permaneceu praticamente constante. Estes dados demonstraram claramente a necessidade de uma concentra

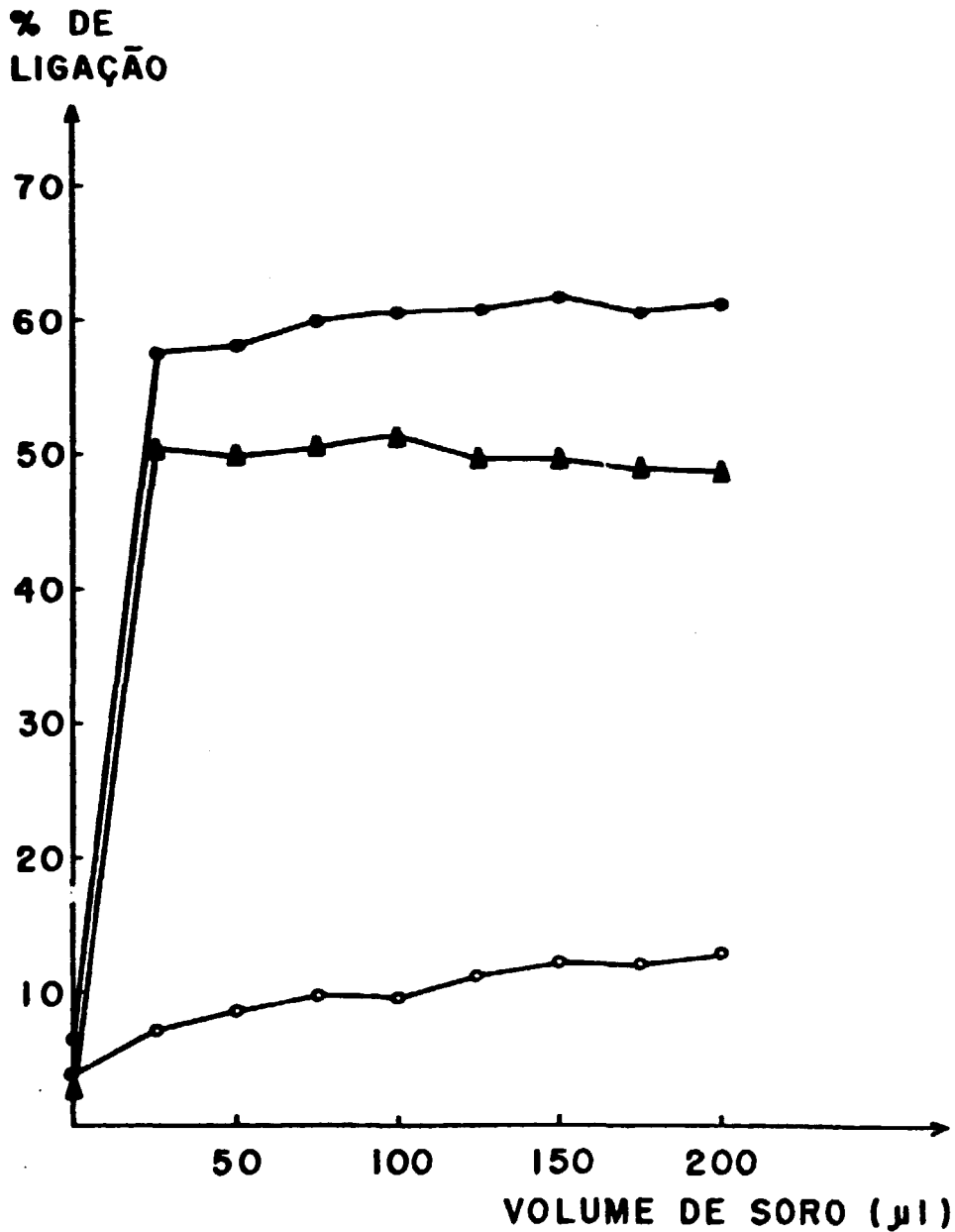


FIG. 12 - VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO TOTAL (●), INESPECÍFICA (○), E ESPECÍFICA (▲) EM FUNÇÃO DO VOLUME DE SORO ADICIONADO IMEDIATAMENTE ANTES DO PEG (CONCENTRAÇÃO FINAL 12,1%).

ção mínima de proteínas séricas (1,2 mg/ml) para que a precipitação do complexo antígeno-anticorpo pelo PEG fosse completa.

Com a finalidade de se igualar a concentração de proteínas séricas em todos os tubos de um determinado ensaio, foi estabelecido que, antes da precipitação com PEG, seriam acrescentados 100 µl de soro humano ("pool" com concentração proteica total variando entre 6,0 e 8,0 g/dl) nos tubos correspondentes à curva-padrão (diluída em tampão de ensaio), sendo pipetados 100 µl de tampão de ensaio nos tubos correspondentes aos controles e amostras desconhecidas. Nos casos em que houvesse necessidade de diluir estas amostras com tampão de ensaio antes de sua dosagem, seria adicionado, antes do PEG, soro diluído em tampão de modo a completar o volume de soro presente em cada tubo a 100 µl.

2.1.5. Protocolo do RIE de GH

A elaboração do protocolo do RIE de GH, descrito na Tabela I, envolveu o estudo de diversos fatores:

a) PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE GH "FRIO", CONTROLES E AMOSTRAS

Um padrão de GH contendo 1 µg/ml (preparado no dia da radioiodação) foi descongelado na hora do RIE e diluído progressivamente em tampão de ensaio até obtenção de

Tabela I - Protocolo do RIE de GH

Tubo	Tampão/Padrão/Amostra (μ l)	Anti-soro 72 (1/90.000) (μ l)	GH-HC- ¹²⁵ I (1/200) (μ l)	Tampão/Soro (μ l)	PEG (17%) (ml)
Total			100		
NSB	200 (tampão)		100	100 (soro)	1,0
Bo	100 (tampão)	100	100	100 (soro)	1,0
A	100 (padrão 1,25 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
B	100 (padrão 2,5 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
C	100 (padrão 5,0 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
D	100 (padrão 10 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
E	100 (padrão 20 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
F	100 (padrão 40 ng/ml)	100	100	100 (soro)	1,0
Controle	100 (amostra)	100	100	100 (tampão)	1,0
Amostra	100 (amostra)	100	100	100 (tampão)	1,0

- a) adição seqüencial, em triplicata, de tampão de ensaio/padrão/amostra, anti-soro 72 e GH-HC-¹²⁵I, seguida de homogenização em Vórtex;
- b) incubação por 20 a 24 horas a temperatura ambiente;
- c) adição seqüencial de tampão/soro e PEG, seguida de homogenização em Vórtex;
- d) centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C;
- e) aspiração do sobrenadante;
- f) contagem do precipitado por 1 minuto em detector de cintilação gema;
- g) análise dos dados obtidos através do programa de computador RIA CALC.

todos os pontos da curva (padrões "frios" contendo 1,25, 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 ng/ml). Após o término do ensaio, estas soluções foram todas desprezadas.

Os controles (alto, médio e baixo), includos no início e no final de cada ensaio, foram preparados a partir de 3 "pools" obtidos pela mistura de soros previamente dosados, com concentrações de GH variando entre 20 a 25, 7 a 10 e 1 a 3 ng/ml, respectivamente. Aliquotas de 0,5 ml de cada controle foram conservadas a -20°C até sua utilização no ensaio, sendo desprezadas a seguir.

As amostras de soro a serem dosadas, mantidas a -20°C desde a sua coleta, foram descongeladas no início do ensaio e recongeladas após o término deste, permitindo assim a repetição da dosagem caso esta fosse necessária.

b) CONCENTRAÇÃO DO GH-HC - ¹²⁵I

Uma solução 1/200 em tampão de ensaio foi preparada na hora do RIE a partir de uma alíquota de 100 µl de GH-HC - ¹²⁵I conservada a -20°C desde o dia da radiofodação, sendo ambas desprezadas após o término do ensaio. Desta solução, um volume de 100 µl, correspondendo a uma massa de 0,07 ng e a uma atividade aproximada de 15.000 cpm, foi pipetado em cada tubo do ensaio, resultando em uma concentração final de 0,23 ng de traçador por ml da mistura de incubação.

c) DILUIÇÃO DO ANTI-SORO ANTI-GH

De acordo com Hunter (33), a diluição do anticorpo a ser utilizada em um determinado ensaio deve resultar em ligação específica ao redor de 65%. Baseado nesta premissa, as soluções 1/60.000 e 1/90.000 do anti-soro 72, cujas respectivas %Bo específica correspondiam a 65 e 62%, foram incubadas com antígeno "frio" e marcado de acordo com o protocolo da Tabela I, resultando em diluições finais do anticorpo de 1/180.000 e 1/270.000, respectivamente. As características das curvas dose-resposta assim obtidas (Fig. 13A) foram comparadas pelos seus respectivos perfis de precisão (Fig. 13B), elaborados segundo os critérios de Rodbard (60). A precisão intraensaio obtida com a diluição 1/90.000 foi nitidamente superior à obtida com a solução 1/60.000, situando-se em nível igual ou inferior a 10% para concentrações de GH "frio" acima de 1,7 ng/ml. A sensibilidade, definida como a dose mínima detectável, também foi melhor com a solução 1/90.000 (0,8 ng/ml) do que com 1/60.000 (1,3 ng/ml). Estes dados permitiram concluir que a solução 1/90.000 resultava em melhores características do ensaio e, por isso, ela foi escolhida e utilizada em todos os RIEs de GH realizados neste projeto.

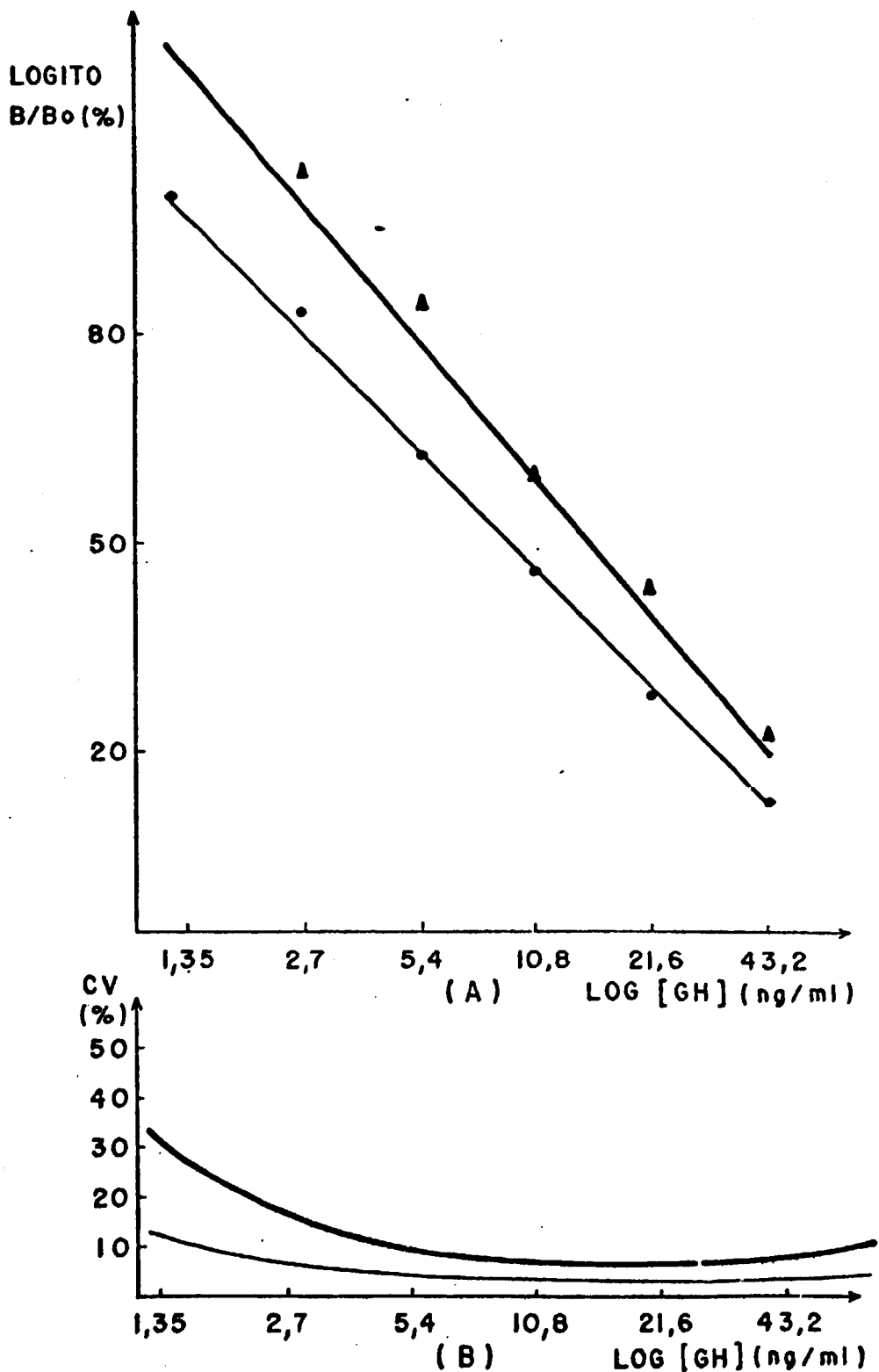


FIG. 13 - CURVAS DOSE-RESPOSTA (A) E PERFIS DE PRECISÃO (B) PARA RIEs DE GH REALIZADOS COM DILUIÇÕES 1/60.000 (▲) E 1/90.000 (●) DO ANTI-SORO 72.

d) TEMPO DE INCUBAÇÃO

As características das curvas dose-resposta elaboradas com e sem período de pré-incubação (Fig. 14A), definido como a incubação do antígeno "frio" com anticorpo sem a adição do traçador, foram comparadas pelos seus respectivos perfis de precisão (Fig. 14B). A introdução de pré-incubação por 1 hora, realizada a temperatura ambiente ou a 37°C, levou a uma redução muito discreta da dose mínima detectável (0,7 e 0,6 ng/ml, respectivamente, comparadas com 0,9 ng/ml, obtida sem período de pré-incubação), associada a uma piora importante da precisão intraensaio para concentrações de GH "frio" acima de 10 ng/ml. Por esta razão, os RIEs de GH deste projeto passaram a ser realizados sem período de pré-incubação.

Após adição do hormônio marcado, o tempo de incubação necessário para que a reação atingisse o equilíbrio foi determinado em diferentes condições de temperatura. Neste experimento, os seguintes reagentes foram incubados, em triplicata, a 4°C, temperatura ambiente e a 37°C: (1) tampão de ensaio (100 µl); (2) anti-soro 72 (100 µl de solução 1/90.000, correspondente ao tubo Bo) ou tampão de ensaio (100 µl, correspondente ao tubo NSB); (3) GH-HC - 125 I (100 µl de solução 1/200). Após diferentes períodos de incubação (0 a 48 horas), foi efetuada a separação com PEG, seguida de contagem do precipitado. O cálculo da porcentagem de ligação

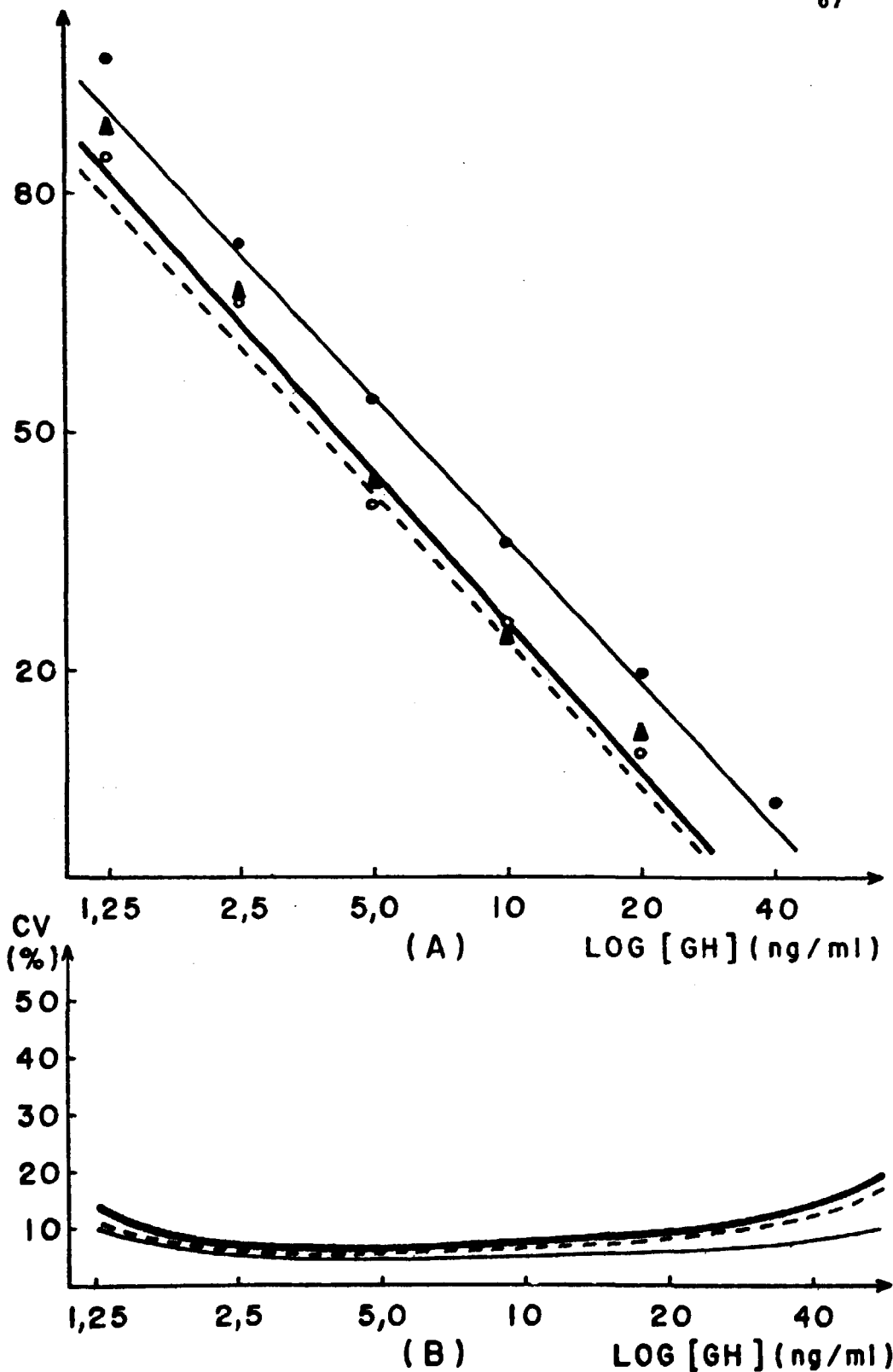


FIG. 14 - CURVAS DOSE-RESPOSTA (A) E PERFILES DE PRECISÃO (B) PARA RIEs DE GH REALIZADOS SEM PERÍODO DE PRÉ-INCUBAÇÃO (●—●) E COM PERÍODO DE PRÉ-INCUBAÇÃO POR 1 HORA A TEMPERATURA AMBIENTE (▲—▲) OU A 37°C (○---○).

total, inespecífica e específica para cada tempo e temperatura de incubação (Fig. 15) permitiu concluir que (1) a reação atingiu o equilíbrio mais rapidamente a 37°C (12 horas) do que a 4°C ou a temperatura ambiente (16 horas para ambos); (2) a %Bo específica observada no equilíbrio durante incubação a temperatura ambiente (47%) foi maior do que a 4° e 37°C (43 e 41%, respectivamente); (3) a %NSB durante incubação a 4°C e a temperatura ambiente foi semelhante (ao redor de 16%), mas inferior à observada a 37°C (ao redor de 17,5%). A partir destes dados, ficou estabelecido que a incubação dos RIEs de GH seria realizada a temperatura ambiente por 20 a 24 horas, já que, nestas condições, a %Bo específica era maior e a %NSB permanecia em níveis aceitáveis.

e) PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

Os cálculos da curva dose-resposta e da concentração das amostras desconhecidas foram efetuados por um programa de computação denominado RIA CALC, formulado por D. Gianella (comunicação pessoal) em 1982. Este programa baseia-se na transformação logito-log, segundo os critérios propostos por Rodbard e col. (61).

Em todos os ensaios (exceto os correspondentes ao cálculo da atividade específica e da constante de afinidade), a curva dose-resposta foi ajustada a uma reta por regressão linear não ponderada a partir das equações:

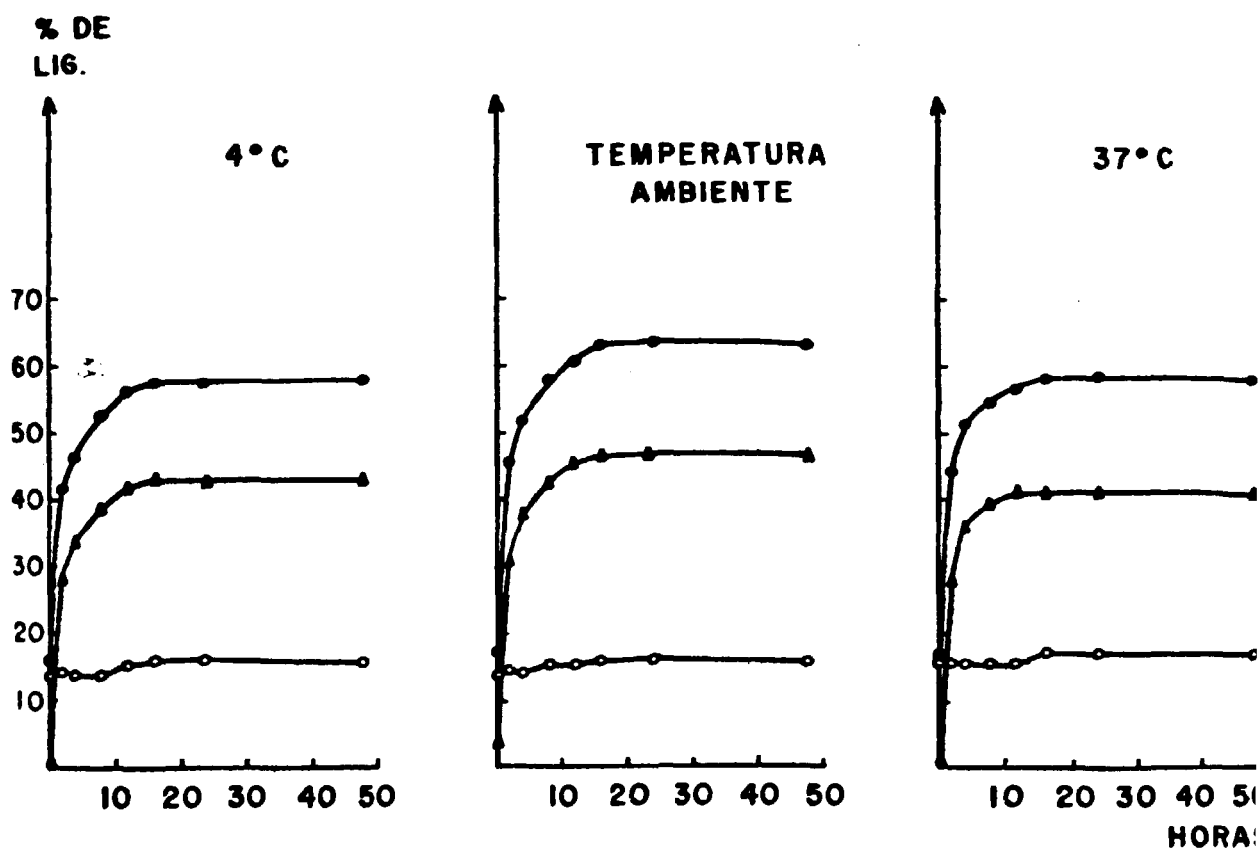


FIG. 15 - INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE AS PORCENTAGENS DE LIGAÇÃO TOTAL (●), INESPECÍFICA (○), E ESPECÍFICA (▲).

$$\text{Logito (B/Bo \%)} = a + b \cdot \log i$$

$$\frac{B}{Bo} \% = \frac{Bi - NSB}{Bo - NSB} \times 100$$

onde:

B_i = radioatividade do precipitado correspondente à concentração i ng/ml do padrão de GH "frio";

B_o ou NSB = radioatividade do precipitado correspondente aos tubos B_o e NSB , respectivamente.

As concentrações das amostras desconhecidas foram determinadas pelo cálculo dos respectivos valores logito (B/B_o %) e interpolação a partir da curva dose-resposta.

2.1.6. Caracterização do RIE de GH

a) COMPARAÇÃO COM PADRÃO INTERNACIONAL PARA DETERMINAÇÃO DE PARALELISMO E POTÊNCIA

Em 3 ensaios diferentes, concentrações crescentes de GH-NIH (preparação de referência fornecida pelo National Institutes of Health) e GH-HC "frios" foram incubadas com anti-soro 72 e GH-HC - ^{125}I , obedecendo ao protocolo da Tabela 1. Após separação com PEG e contagem do precipitado, as curvas dose-resposta para cada hormônio foram compara

das entre si para determinação de paralelismo (confirmada por inclinações idênticas das curvas) e potência. Esta última foi calculada pela razão entre as concentrações de GH-HC e GH-NIH necessárias para provocar 50% de inibição da ligação máxima, ou seja, $B/B_0 = 50\%$ (21).

A Fig. 16 mostra claramente o paralelismo entre as 2 curvas, confirmando o comportamento idêntico dos 2 hormônios. O cálculo da potência revelou ser o GH-HC, em média, 7% mais potente do que o GH-NIH, permitindo dessa maneira a calibração correta dos padrões "frios" de GH-HC.

b) SENSIBILIDADE

A sensibilidade, definida como a dose mínima detectável (DMD), foi determinada pela concentração de GH que resultou em valor B/B_0 estatisticamente diferente do obtido para a dose zero (15). Assim,

$$\text{DMD} = \text{concentração de GH correspondente ao logito } \left[\frac{(\overline{B_0} - \text{NSB}) - 2 \text{ DP}}{(\overline{B_0} - \text{NSB})} \right] \%$$

onde:

$\overline{B_0}$ = média das contagens do precipitado em 9 replicatas do tubo B_0 ;

DP = desvio-padrão de $\overline{B_0}$;

NSB = contagens do precipitado do tubo NSB.

LOGITO
B/B₀(%)

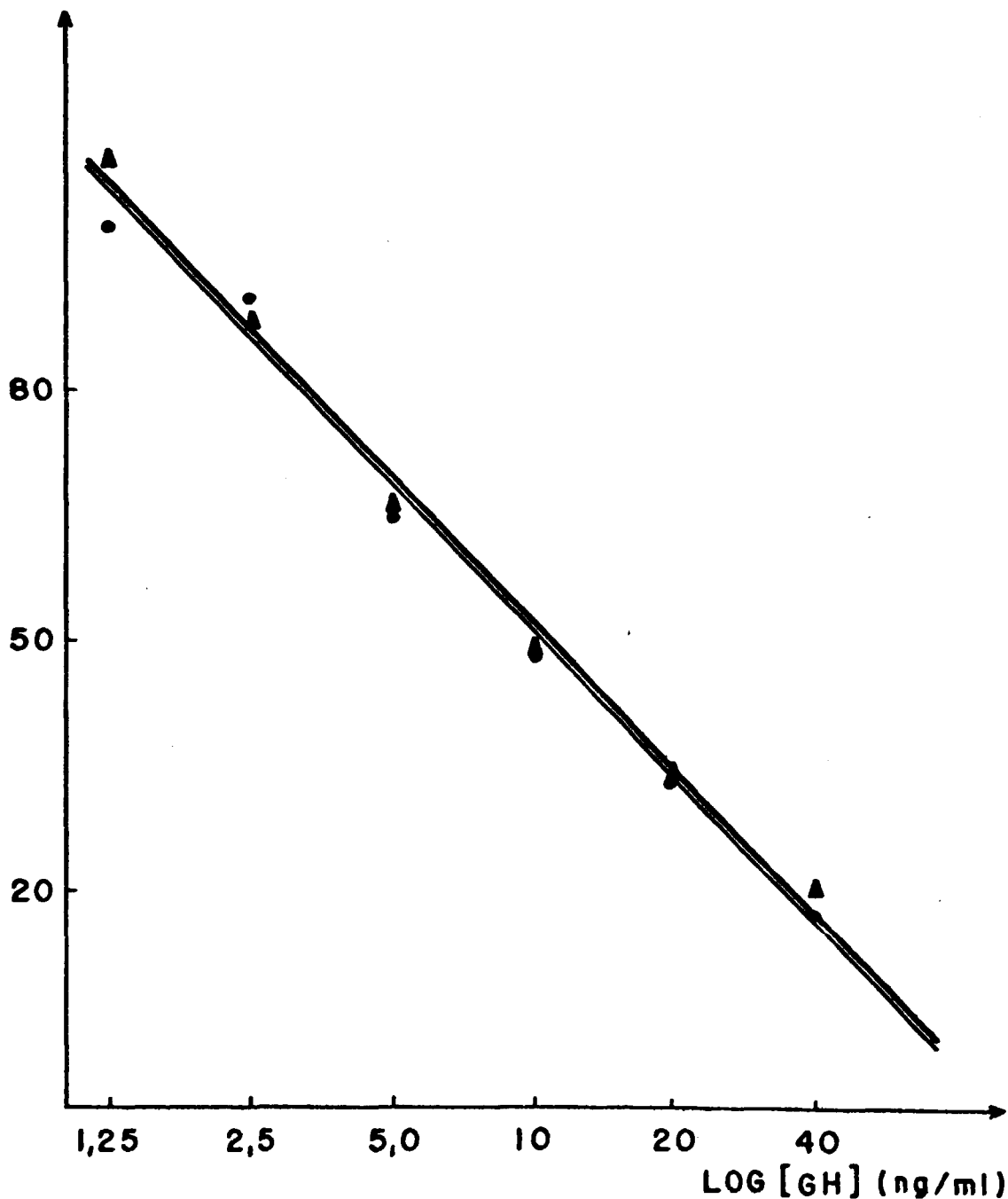


FIG. 16 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA PREPARADAS COM PADRÕES DE GH-HC (●—●) E GH-NIH (▲—▲) "FRIOS".

A sensibilidade, calculada em 12 ensaios, foi de $1,1 \pm 0,08$ ng/ml (média \pm erro padrão da média), sendo considerada adequada para o estudo dos testes de liberação de GH.

c) PRECISÃO

A variação intraensaio intraamostra foi determinada pelo perfil de precisão (Figs. 13B e 14B), elaborado de acordo com os critérios propostos por Rodbard e col. (60). O coeficiente de variação (CV) para uma determinada concentração de hormônio "frio" foi calculado pela equação:

$$CV_x = \frac{\delta y}{dy/dx} \times 100$$

onde:

δy = desvio-padrão da resposta B/Bo correspondente à concentração x (determinada em triplicata);

dy/dx = inclinação da curva dose-resposta no ponto correspondente à concentração x .

Em todos os RIEs de GH, a variação intraensaio situou-se em nível igual ao inferior a 10% para concentrações de GH acima de 1,5 - 2,0 ng/ml e permaneceu ao redor de 5% para valores entre 10 a 30 ng/ml, intervalo que

compreende a maioria dos picos de GH obtidos nos testes de liberação. Quando 9 replicatas do controle baixo (2,3 ng/ml), médio (8,0 ng/ml) e alto (22,3 ng/ml) foram dosadas seqüencialmente em um único RIE, o coeficiente de variação foi de 5,6, 4,7 e 4,2%, respectivamente. Não houve alteração significativa destes valores quando 4 replicatas foram determinadas no início e 4 no final do ensaio, demonstrando a estabilidade do RIE.

A variação interensaio intraamostra foi calculada por dosagens repetidas dos controles baixo, médio e alto em 12 ensaios sucessivos, resultando em valores de 19,4, 8,7 e 12,6% para concentrações de 1,9, 8,3 e 25,2 ng/ml, respectivamente.

d) ESPECIFICIDADE

A especificidade, definida como o grau de interferência provocado por substâncias estranhas sobre a reação antígeno-anticorpo, foi estabelecida de acordo com os critérios propostos por Yalow & Berson (78):

d₁) Estudo dos efeitos não específicos do meio de incubação

Uma possível dúvida surgida na elaboração do RIE de GH consistiu na diferença existente entre a composição do meio de incubação dos pontos da curva-padrão (apenas tampão de ensaio) e das amostras desconhecidas (tampão de ensaio mais soro), o que poderia invalidar a comparação da

razão B/B₀ das amostras desconhecidas como as da curva-padrão.

Para se avaliar esta possibilidade, foram comparadas curvas dose-resposta preparadas com padrões de GH-HC "frio" diluídos em tampão de ensaio e em "stripper" (soro com concentração de GH < 1,2 ng/ml), obedecendo ao protocolo da Tabela 1. A Fig. 17 revela a identidade entre estas 2 curvas, excluindo dessa maneira a presença de efeitos não específicos do soro sobre a reação antígeno-anticorpo e validando o protocolo do RIE de GH.

Neste mesmo experimento, a porcentagem de ligação inespecífica, determinada pela incubação de tampão de ensaio (200 µl) e GH-HC - ¹²⁵I (100 µl) por 20 a 24 horas a temperatura ambiente, não foi significativamente diferente da calculada pela incubação de soro, tampão de ensaio e hormônio marcado (100 µl de cada), exibindo valores de 14,9 e 14,3%, respectivamente. Estes dados demonstraram a validade de se utilizar o mesmo NSB para o cálculo da curva-padrão e das amostras desconhecidas.

d₂) Recuperação quantitativa

Neste experimento, padrões de GH "frio" (100 µl de soluções contendo desde 1,25 até 40 ng/ml em tampão de ensaio) foram incubados em triplicata, por 20 a 24 horas a temperatura ambiente, com anti-soro 72 (50 µl de solução 1/45.000 em tampão de ensaio) e GH-HC - ¹²⁵I (50 µl

LOGITO
B/B₀ (%)

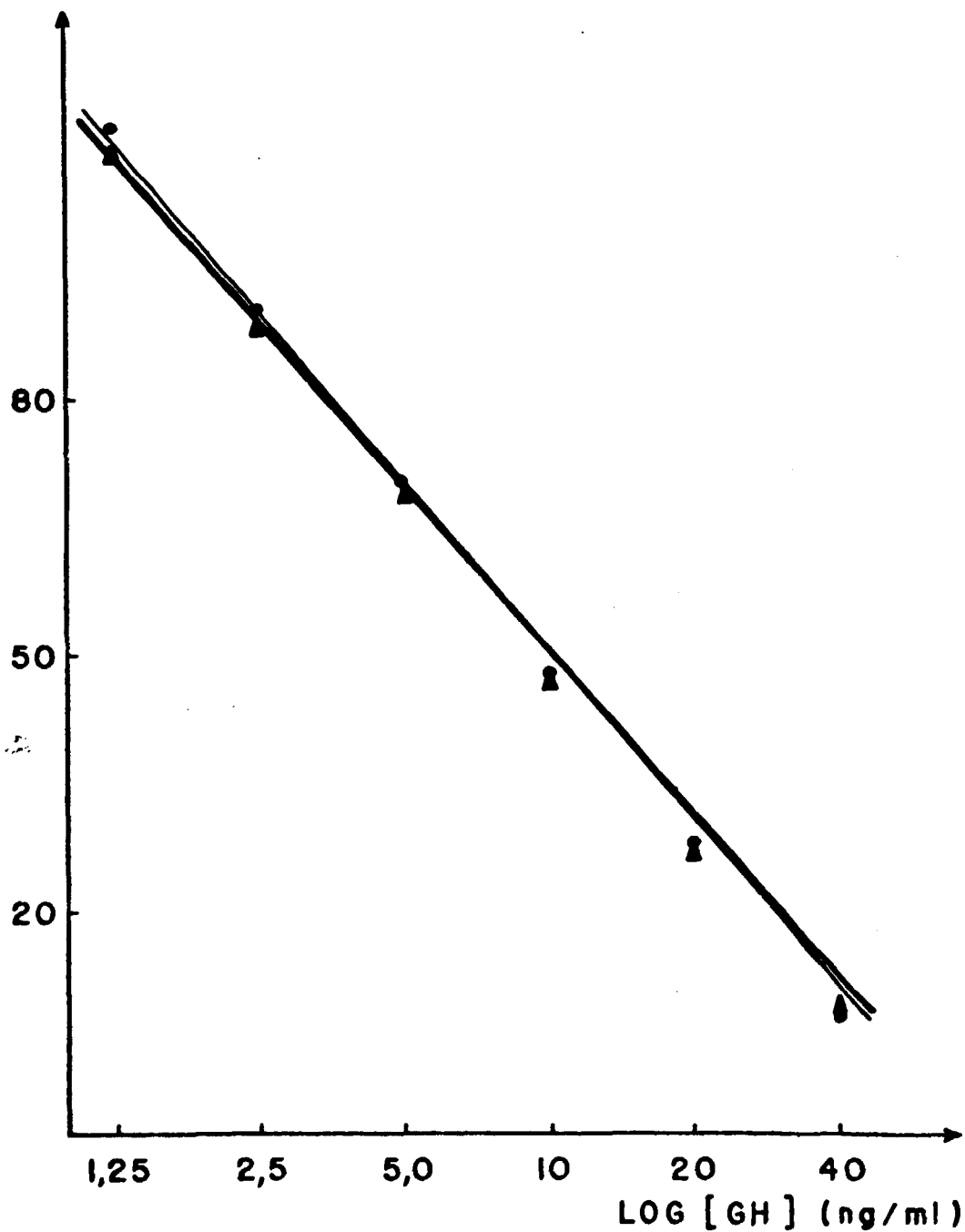


FIG. 17 - COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS DOSE - RESPOSTA PREPARADAS COM PADRÕES DE GH "FRIO" DILUÍDOS EM TAMPÃO DE ENSAIO (●—●) OU EM "STRIPPER" (▲—▲).

de solução 1/100 em tampão de ensaio), completando-se o volume final a 300 μ l com tampão de ensaio. Simultaneamente, os mesmos padrões de GH "frio" foram incubados com quantidade fixa e conhecida de GH (100 μ l de soro contendo 5,3 ng/ml) e volumes idênticos de anticorpo e hormônio marcado, sendo tratados como se fossem amostras desconhecidas.

Após separação com PEG e contagem do precipitado, as concentrações de GH presentes nestas amostras foram determinadas por interpolação a partir da curva dose-resposta e comparadas com os valores esperados. A existência de uma relação linear tipo $Y = X$ entre as concentrações esperadas e observadas (Fig. 18) confirmou a identidade entre estes 2 parâmetros e excluiu novamente a presença de efeitos não específicos do soro sobre a reação antígeno-anticorpo.

d₃) Construção de curva dose-resposta com diluições progressivas de soro de paciente acromegálico

Neste experimento, padrões de GH "frio" e diluições progressivas (1/2 até 1/32 em tampão de ensaio) de soro de paciente acromegálico contendo 43,1 ng/ml de GH foram incubados com anti-soro 72 e GH-HC - ¹²⁵I, obedecendo ao protocolo da Tabela I, e utilizados para construção de curvas dose-resposta. A identidade entre estas 2 curvas, demonstrada na Fig. 19, excluiu a presença de substâncias estranhas que pudessem interferir com a reação antígeno-anticorpo nestas condições.

CONCENTRAÇÃO OBSERVADA
(ng/ml)

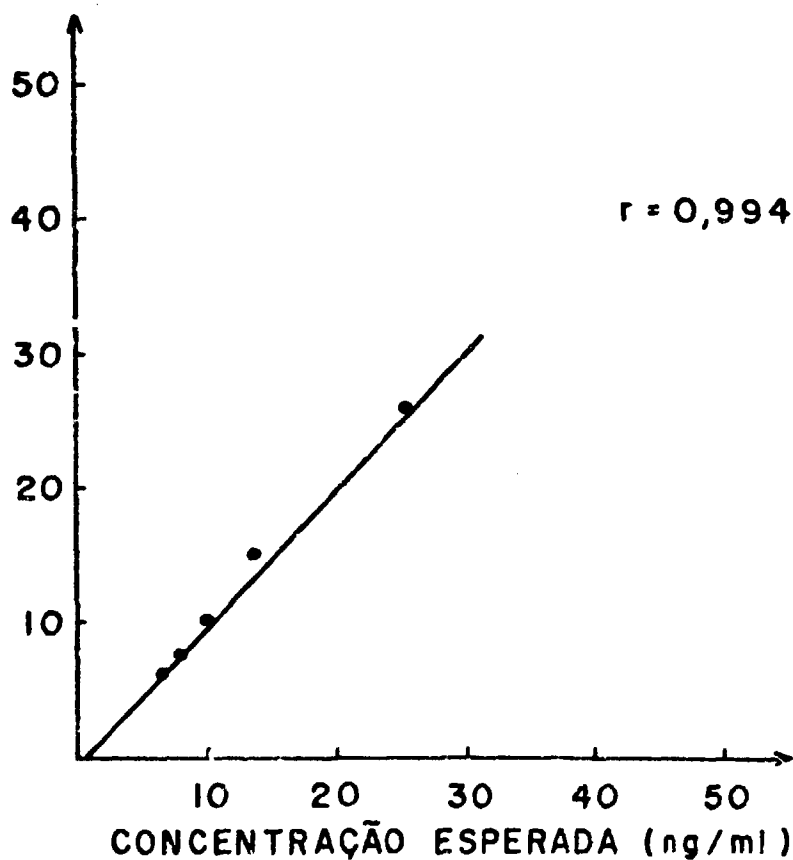


FIG. 18 - RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES ESPERADAS E OBSERVADAS DE GH EM ENSAIO DENOMINADO RECUPERAÇÃO QUANTITATIVA.

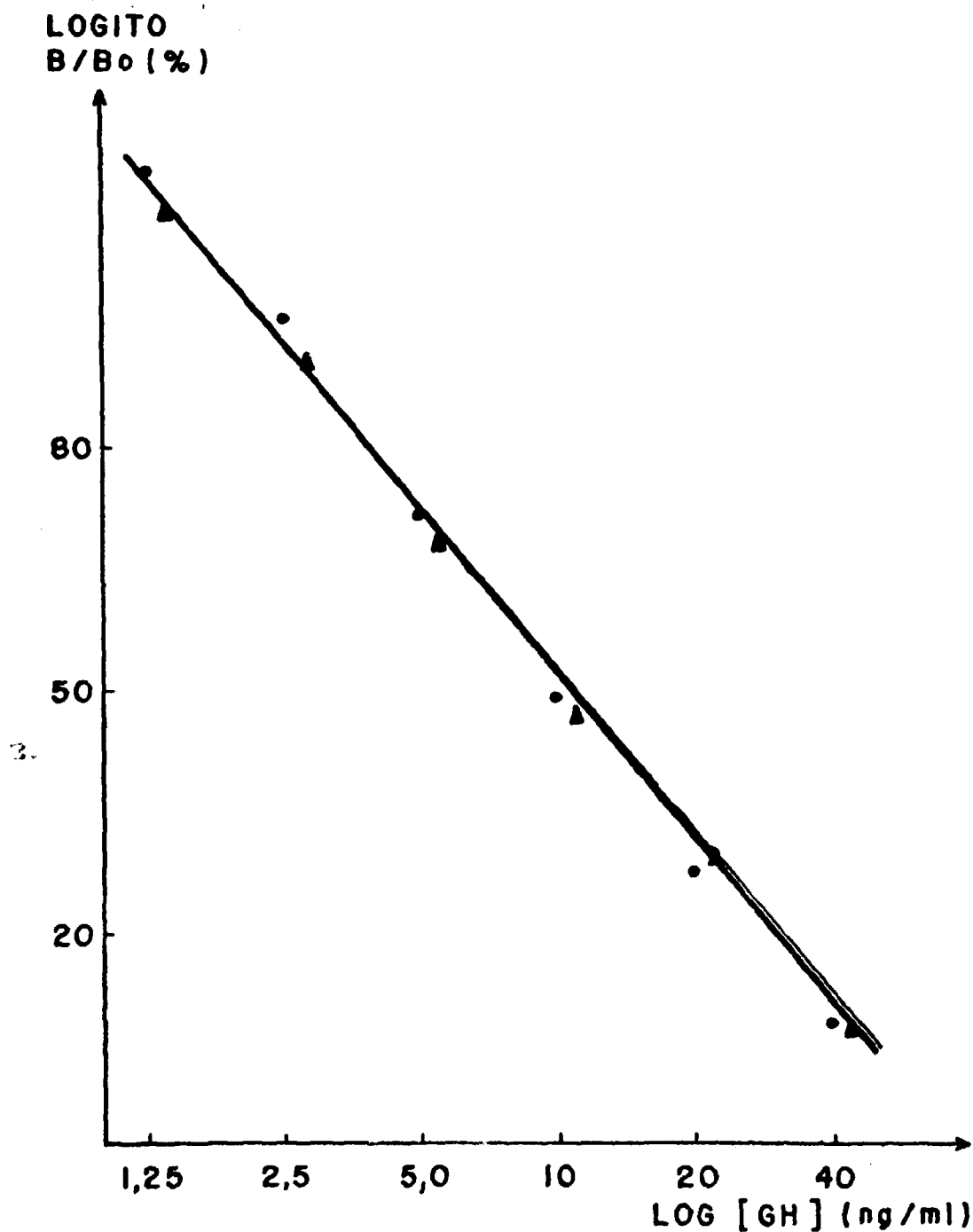


FIG. 19 - COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS DOSE - RESPOSTA PREPARADAS COM PADRÕES DE GH "FRIO" (●—●) OU COM DILUIÇÕES PROGRESSIVAS DE SORO DE PACIENTE ACROMEGÁLICO (▲—▲).

2.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DOS DEMAIS HORMÔNIOS

Todos os outros hormônios, com exceção da testosterona, foram dosados em duplicata no soro por "kits" comerciais de RIE.

a) SmC

- "kit": "Sm-C Radioimmunoassay Kit" (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, EUA).
- características: dosagem sem extração prévia; separação por segundo anticorpo.
- sensibilidade: 0,1 U/ml.
- variação intra e interensaio: 5,0 e 5,2% para concentrações de 0,70 e 1,50 U/ml, respectivamente.
- variação interensaio: 11,2, 9,4 e 9,0% para concentrações de 0,33, 1,3 e 3,2 U/ml, respectivamente.

b) T₃

- "kit" "GAMMACOATTM (¹²⁵I) T₃ Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays, Trisol - Genentech Diagnostics, Cambridge, MA, EUA).
- características: fase sólida (anticorpo ligado à parede do tubo).
- sensibilidade: 9 ng/dl:
- variação intraensaio: 7,9, 3,6 e 3,1% para concentrações de 89, 169 e 449 ng/dl, respectivamente.

c) T₄

- "kit": "GAMMACOATTM (¹²⁵I) Free/Total T₄ Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: fase sólida (anticorpo ligado à parede do tubo).
- sensibilidade: 0,5 µg/dl.
- variação intraensaio: 7,8, 3,2 e 4,0% para concentrações de 2,3, 7,8 e 13,2 µg/dl, respectivamente.
- variação interensaio: 7,1, 3,6 e 5,2% para concentrações de 2,8, 7,7 e 13,0 µg/dl, respectivamente.

d) TSH

- "kit": "GAMMADAB^R HS (¹²⁵I) hTSH Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: separação por segundo anticorpo.
- sensibilidade: 0,34 µUI/ml.
- variação intraensaio: 4,6, 4,1 e 5,2% para concentrações de 2,6, 5,6 e 14,8 µUI/ml, respectivamente.
- variação interensaio: 7,3, 5,3 e 5,3% para concentrações de 3,0, 5,1 e 12,2 µUI/ml, respectivamente.

e) PRL

- "kit": "GAMMADAB^R (¹²⁵I) Prolactin Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: separação por segundo anticorpo.

- sensibilidade: 1,6 ng/ml.
- variação intraensaio: 5,0, 2,9 e 5,3% para concentrações de 16,0, 41,4 e 116 ng/ml, respectivamente.
- variação interensaio: 5,1, 5,4 e 9,2% para concentrações de 11,7, 41,0 e 118 ng/ml, respectivamente.
- valores normais: calibrados pelo padrão da WHO 1st IRP 75/504.

f) LH

- "kit": "GAMMADAB ^R $\left(^{125}\text{I}\right)$ LH Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: separação por segundo anticorpo.
- sensibilidade: 1,6 mUI/ml.
- variação intraensaio: 6,7, 8,4 e 8,8% para concentrações de 16,9, 38,7 e 172 mUI/ml, respectivamente.
- variação interensaio: 7,8, 4,2 e 7,3% para concentrações de 16,6, 40,6 e 150 mUI/ml, respectivamente.
- valores normais: calibrados pelo padrão da WHO 2nd IRP-HMG.

g) FSH

- "kit": "GAMMADAB ^R $\left(^{125}\text{I}\right)$ FSH Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: separação por segundo anticorpo.
- sensibilidade: 0,5 mUI/ml.

- variação intraensaio: 6,4, 6,6 e 5,6% para concentrações de 8,4, 24,4 e 49,6 mUI/ml, respectivamente.
- variação interensaio: 8,6, 5,5 e 9,4% para concentrações de 8,1, 23,4 e 51,9 mUI/ml, respectivamente.
- valores normais: calibrados pelo padrão da WHO 2nd IRP-HMG.

h) Cortisol

- "kit": "GAMMACOAT TM (¹²⁵I) Cortisol Radioimmunoassay Kit" (Clinical Assays).
- características: fase sólida (anticorpo ligado à parede do tubo).
- sensibilidade: 0,24 µg/dl.
- variação intraensaio: 7,9, 3,2 e 4,4% para concentrações de 3,8, 11,6 e 39,1 µg/dl, respectivamente.
- variação interensaio: 9,7, 5,0 e 5,2% para concentrações de 3,8, 11,4 e 38,1 µg/dl, respectivamente.

i) Estradiol

- "kit": "Coat - A - Count ^R Estradiol" (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, EUA).
- características: dosagem sem extração prévia; fase sólida (anticorpo ligado à parede do tubo).
- sensibilidade: 10 pg/ml.
- variação intraensaio: 11,4, 4,7 e 2,8% para concen-

trações de 37, 111 e 295 pg/ml, respectivamente.

- variação interensaio: 13,7, 7,0 e 5,5% para concentrações de 81, 125 e 300 pg/ml, respectivamente.

j) Testosterona

Os níveis séricos de testosterona foram determinados por RIE segundo o método de Abraham (1), após extração do soro com acetato de etila: hexana (3:2) e sem cromatografia prévia. Antes de ser utilizado, o anti-soro (Radioassay Systems Laboratories, Inc., Carson, CA, EUA) foi testado, sendo a sua especificidade considerada adequada. Os padrões "frios" foram obtidos da Sygma e o hormônio triciado da Amersham. A sensibilidade variou de 5,5 a 6,5 ng/dl, a variação intraensaio de 5,6 a 6,7% e a interensaio de 12 a 15%.

2.3. OUTRAS DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

Todos os outros exames laboratoriais foram incluídos na rotina do Laboratório Central do HC-FMUSP e determinados por técnicas consagradas na literatura (3,4,31):

- a) hemograma completo: a contagem global foi realizada em contador automatizado e a específica em lâmina após coloração com mistura de Romanowsky (Leishman);
- b) glicemia plasmática: método enzimático automatizado;
- c) sódio e potássio séricos: espectrofotometria de chama;

- d) uréia sêrica: método enzimático da urease;
- e) creatinina sêrica: método colorimétrico;
- f) proteínas sêricas totais: método do biureto;
- g) albumina sêrica: método do verde bromocresol;
- h) cálcio sêrico: espectrofotometria de absorção atômica;
- i) fósforo sêrico: método de Fiske-Subbarow;
- j) fosfatase alcalina: método enzimático e cinético;
- l) urina tipo I: microscopia óptica;
- m) exame parasitológico de fezes: método de Faust e Hoffmann;
- n) cariótipo: análise em cultura de linfócitos.

3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os níveis de GH observados nos testes de tolerância à insulina e clonidina foram comparados e estatisticamente analisados pelo teste "U" de Mann-Whitney, o equivalente não paramétrico do "t" de Student, com poder de eficiência de 95% (43,70). Este teste foi escolhido por se tratar de comparação entre variáveis independentes, com número relativamente pequeno de amostras, cuja distribuição não era previamente conhecida. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p \leq 0,05$).

Todos os valores foram expressos como média \pm 1 erro padrão da média (EPM), inclusive os dados referentes à literatura.

VII — RESULTADOS

Os pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com os dados obtidos na avaliação clínica, laboratorial, radiológica e hormonal.

GRUPO 1: PACIENTES SEM DÉFICIT DE GH

Foram incluídos neste grupo 21 pacientes que preencheram 3 ou mais dos seguintes critérios:

- a) ausência de sinais típicos de nanismo hipofisário;
- b) ritmo de crescimento normal;
- c) dosagem sérica normal de SmC;
- d) pico de liberação de GH maior do que 7,0 ng/ml em pelo menos um teste de estímulo (ITT ou clonidina).

Os principais fatores que contribuíram para a baixa estatura destes pacientes foram:

- a) déficit de crescimento intrauterino, caracterizado como altura inferior a 46 cm e peso abaixo de 2.500 g ao nascimento para gestações a termo: 4 pacientes (FCS, MAN, FFH e JCES);

- b) retardo puberal, caracterizado por início da puberdade após os 13 anos em meninas e após os 14 em meninos: 5 pacientes (SRC, SCN, AVC, JCES e AS);
- c) desnutrição discreta, caracterizada por baixa ingestão proteica e proteínas séricas totais entre 5 - 6 g/dl: 7 pacientes (FCS, FFH, RTS, AAM, SRC, AVC e JCES);
- d) doença crônica prévia (tuberculose pulmonar e úlcera duodenal estenosante): 2 pacientes (JCES e AS);
- e) nanismo primordial, caracterizado por retardo mental e estigmas somáticos: 1 paciente (FCS);
- f) baixa estatura familiar, caracterizada pela média da altura dos pais inferior a 158 cm (correspondente ao percentil 10 da população brasileira): 7 pacientes (FFH, RTS, SCN, PMR, CAC, EZ e MBM).

Em 7 pacientes (JAM, ADO, AHM, MIT, JHS, MSP e JABA), não foi encontrada explicação para o déficit de crescimento.

1. AVALIAÇÃO CLÍNICA (TABELAS II E III)

1.1. IDADE E SEXO

Foram estudados 15 meninos e 6 meninas, com idade entre 2,9 e 17,5 anos.

1.2. HISTÓRIA DO DÉFICIT ESTATURAL

O início do retardo de crescimento foi observado desde o nascimento até 3 anos antes da avaliação inicial no HC-FMUSP. Vários pacientes tinham sido previamente tratados com vitaminas ou anabolizantes não hormonais, sem resultados satisfatórios.

1.3. ANTECEDENTES INDIVIDUAIS

Todos os pacientes nasceram após gestações normais a termo, exceto o paciente SCN, que nasceu prematuro (7 meses) com peso de 1.800 g e altura de 37 cm. Quinze partos foram por via vaginal, apresentação cefálica, apenas um domiciliar, enquanto que 6 mães foram submetidas a cesárea. Duas crianças (FCS e JCES) apresentaram cianose na hora do parto e 5 (FCS, MAN, FFH, SCN e JCES) nasceram com peso menor do que 2.500 g e altura abaixo de 45 cm.

Foram observados retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor em 4 pacientes (FCS, RTS, SCN e JCES) e baixo aproveitamento escolar em 2 (FFH e RTS). As condições de nutrição foram consideradas inadequadas em 7 crianças (FCS, FFH, RTS, AAM, SRC, AVC e JCES) e as de afeto domiciliar em apenas 1 (JCES).

Os pacientes JCES e AS tinham sido previamente submetidos a cirurgias de úlcera duodenal estenosante e pneu-

mectomia direita por tuberculose pulmonar, respectivamente.

A maioria referia verminose anterior tratada.

Doze pacientes relataram início do desenvolvimento puberal entre 9 e 17 anos, sendo este considerado retardado em 4 (SCN, AVC, JCES e AS). A menarca tinha ocorrido apenas em MBM aos 12 anos.

1.4. ANTECEDENTES HEREDITÁRIOS

A média da altura dos pais foi menor do que 158 cm em 7 pacientes (FFH, RTS, SCN, PMR, CAC, EZ e MBM), não sendo possível determinar a idade em que teve início a puberdade paterna ou materna. Apenas os pais de FCS eram consangüíneos (primos em 1º grau), enquanto que só JHS tinha um irmão com nanismo (hipofisário). Não foram detectadas outras patologias familiares que pudessem auxiliar no diagnóstico da causa da baixa estatura.

1.5. INTERROGATÓRIO COMPLEMENTAR

Não foram observados sintomas importantes referentes aos sistemas neurológico, cardíaco-respiratório, gastro-intestinal, osteo-articular ou endócrino em nenhum dos pacientes estudados.

1.6. EXAME FÍSICO

A altura variou entre 1,3 e 4,2 DP e o peso entre 0,7 e 3,4 DP abaixo da média para sexo e idade.

O exame clínico de FCS revelou retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor associado a hipotonia global e estigmas somáticos como pâlato ogival, retrognatia, filtro nasal curto e esboço de sinofris. No paciente MAN, foram detectados pectus excavatum e prega simiesca e, em JABA e EZ, nevos em tronco e pâlato ogival. Os demais pacientes não apresentavam estigmas ou anormalidades importantes.

Oito meninos e 1 menina não mostravam nenhum sinal de puberdade ao exame físico, sendo classificados como Grupo 1A (Tabela I). Nos outros 12 pacientes, incluídos no Grupo 1B (Tabela II), foi detectada pubarca em todos, telarca nas 5 meninas e testículos com dimensões maiores do que 2,5 cm nos 7 meninos.

2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL E RADIOLÓGICA GERAL (TABELAS II E III)

As proteínas séricas totais estavam discretamente diminuídas em 4 pacientes (FCS, FFH, SRC e AVC), sendo detectada hipoalbuminemia em apenas um (FCS). Foi constatada anemia hipocrômica microcítica em 4 pacientes (FCS, AHM, AVC e

TABELA II - Dados clínicos e laboratoriais em pacientes pré-púberes sem déficit de GH (Grupo 1A)

Nome	Sexo	Idade cron. (anos)	Peso		Altura		Idade estat. (anos)	Idade óssea (anos)	Ritmo cresc. (cm/ano)	Hemog. (g/dl)	Prot. tot. (g/dl)	Aib. (g/dl)
			(kg)	(-DP) ⁽¹⁾	(cm)	(-DP) ⁽¹⁾						
FCS	M	2,9	10,2	2,6	85,0	3,1	1,7	1,5	0	10,2	5,3	3,2
MAN	M	9,0	22,0	1,1	122,0	1,9	7,0	7	5,6	13,9	7,4	4,3
FFH	M	9,1	19,0	1,7	114,3	3,3	5,7	6	6,3	13,6	5,8	3,9
RTS	M	11,0	18,7	1,8	120,0	3,0	6,5	10	5,2	12,4	6,1	4,0
JAM	M	11,0	31,1	0,7	131,7	1,8	9,5	8	3,3	12,6	7,0	4,0
FDO	M	12,1	26,8	1,2	138,3	1,3	10,0	10	2,1	12,3	7,4	4,3
AAM	M	13,0	25,2	1,8	130,0	3,1	8,2	8	4,2	12,6	6,5	3,8
SRC	M	14,5	24,3	2,8	123,3	5,5	7,2	10	5,1	13,3	5,6	4,3
AHM	F	7,9	19,5	1,4	112,1	2,8	5,2	4	5,1	11,2	6,9	4,0
Normal										12-16	6-8	3,5-5,0

(1) Desvio-padrão em relação à média para sexo e idade segundo as tabelas de Marques e col. (45).

TABELA III - Dados clínicos e laboratoriais em pacientes púberes sem déficit de GH
(Grupo 1B)

Nome	Sexo	Idade cron. (anos)	Peso		Altura		Idade estat. (anos)	Idade óssea (anos)	Ritmo cresc. (cm/ano)	Hemog. (g/dl)	Prot. tot. (g/dl)	Alb. (g/dl)
			(kg)	(-DP) ⁽¹⁾	(cm)	(-DP) ⁽¹⁾						
MTT	M	12,8	34,4	0,7	140,1	1,5	10,5	9	6,6	12,7	6,5	4,3
JHS	M	13,0	28,7	1,4	132,5	2,8	8,7	9	9,5	14,1	6,3	4,0
MSP	M	15,4	39,1	1,8	152,8	2,2	13,0	11	8,7	12,3	6,2	4,0
SCN	M	15,0	34,0	1,9	142,6	2,9	11,5	12	8,4	13,8	6,0	4,0
PMR	M	15,2	30,0	2,6	142,0	3,5	11,0	10	5,3	12,7	7,1	4,2
AVC	M	16,5	39,7	2,1	146,5	3,4	12,0	13	9,8	11,9	5,7	3,8
JCES	M	17,5	30,1	3,2	141,4	4,2	10,7	13	5	12,0	7,2	4,1
CAC	F	9,7	31,2	0	128,0	1,5	8,0	9	4,5	14,1	7,0	4,3
JABA	F	11,8	25,2	1,8	126,5	3,3	7,7	11	4,4	13,1	6,7	3,7
EZ	F	11,9	25,7	1,0	136,0	2,1	9,5	10	6,1	11,5	6,7	4,5
MBM	F	13,1	31,3	1,2	138,4	2,7	10,0	12	6,9	12,6	6,1	3,5
AS	F	15,8	25,2	3,4	141,7	2,8	10,5	11	4,8	13,5	7,5	4,4
Normal										12-16	6-8	3,5-5,0

(1) Desvio-padrão em relação à média para sexo e idade segundo as tabelas de Marques e col. (45).

EZ) e verminose em 5 (RTS, JHS, MSP, AVC e AS).

Todos os outros exames laboratoriais gerais, bem como o Rx de crânio e o cariótipo (este último realizado apenas em MAN, AHM, JABA e EZ) mostraram-se normais.

O Rx de mãos e punhos revelou retardo da idade óssea em todos os pacientes, sendo compatível com a idade estatural em 13 casos.

3. AVALIAÇÃO HORMONAL BASAL (TABELAS IV E V)

As concentrações séricas de T_3 , T_4 e TSH apresentaram-se dentro dos limites da normalidade em todos os pacientes, assim como a SmC, quando correlacionada com a idade cronológica e sexo.

No Grupo 1A, a testosterona e o estradiol situaram-se em nível inferior a 27 ng/dl e 10 pg/ml, respectivamente. Já no Grupo 1B, os valores de T foram sempre maiores do que 60 ng/dl, enquanto que os de E_2 permaneceram abaixo da sensibilidade do ensaio (10 pg/ml). Foram detectados níveis séricos normais de LH e FSH em todas as meninas púberes.

TABELA IV - Avaliação hormonal basal em pacientes pré-púberes sem déficit de GH (Grupo IA)

Nome	SmC (U/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (µg/dl)	TSH (µUI/ml)	T (ng/dl)	E ₂ (pg/ml)
FCS	0,90 (0,08-1,1) ⁽¹⁾	180	9,0	2,1	13,6	
MAN	1,2 (0,22-2,8)	189	10,1	2,9	16,0	
FFH	6,2 (0,22-2,8)	181	10,9	3,3	20,6	
RTS	2,9 (0,22-2,8)	188	10,7	4,2	20,0	
JAM	2,7 (0,22-2,8)	180	9,0	1,0	11,0	
ADD	2,8 (0,28-3,7)	170	11,0	2,6	25,0	
AAM	1,4 (0,28-3,7)	181	9,6	2,3	25,0	
SRC	2,9 (0,90-5,6)	181	10,0	1,2	26,0	
AHM	0,60 (0,41-4,5)	152	8,7	1,4		< 10
Normal		80-200	4,5-11,5	0,8-5,0	3-27	< 10

(1) Valores normais para sexo e idade cronológica.

TABELA V - Avaliação hormonal basal em pacientes púberes sem déficit de GH (Grupo 1B)

Nome	SmC (U/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (µg/dl)	TSH (µUI/ml)	T (ng/dl)	E ₂ (pg/ml)
MTT	1,7 (0,28-3,7) ⁽¹⁾	160	8,0	1,0	542	
JHS	1,5 (0,28-3,7)	178	9,7	1,6	153	
MSP	2,3 (0,91-3,1)	160			468	
SCN	2,5 (0,90-5,6)	185	9,8	4,5	257	
PMR	2,8 (0,91-3,1)	195	11,2	1,8	65	
AVC	6,1 (0,91-3,1)	188	10,0	3,0	445	
JCES	1,3 (0,91-3,1)	168	9,5	3,7	76	
CAC	3,7 (0,41-4,5)	200	8,2	1,7		< 10
JABA	1,5 (0,99-6,8)	190	11,0	2,9		< 10
EZ	2,0 (0,99-6,8)	150	9,0	1,7		< 10
MBM	6,8 (1,20-5,9)	181	8,4	3,0		< 10
AS	1,6 (0,71-4,1)	160	10,0	1,5		< 10
Normal		80-200	4,5-11,5	0,8-5,0	> 50	< 82

(1) Valores normais para sexo e idade cronológica.

4. TESTES FARMACOLÓGICOS DE ESTÍMULO

4.1. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TABELAS VI, VII E VIII)

Em todos os testes, foi obtida hipoglicemia igual ou inferior a 45 mg/dl, considerada estímulo efetivo para a liberação de GH. Todos os pacientes queixaram-se de mal-estar geral, náuseas, sudorese e sonolência, não sendo necessário, no entanto, interromper o teste devido a perda de consciência em nenhum deles.

Três pacientes (FFH e ADO do Grupo 1A e AVC do Grupo 1B) apresentaram níveis basais elevados de GH, provavelmente devido a "stress" na hora do teste, e, por isso, foram excluídos da comparação com os demais. Os outros 7 pertencentes ao Grupo 1A partiram de concentrações basais de GH menores do que 3,0 ng/ml. Após administração da insulina, estes níveis elevaram-se acima de 7,0 ng/ml em 5 (71,4%). A média dos picos de GH, incluindo o doente JAM no qual não houve aumento dos níveis hormonais durante o teste, foi de $10,3 \pm 1,7$ ng/ml.

No Grupo 1B, 11 pacientes partiram de concentrações basais de GH inferiores a 3,6 ng/ml. Após o estímulo hipoglicêmico, estes níveis ultrapassaram 7,0 ng/ml em 10 (90,9%). A média dos picos de GH foi de $15,3 \pm 2,8$ ng/ml, não sendo estatisticamente diferente ($p = 0,47$) da obtida no Grupo 1A.

TABELA VI - Níveis de GH em condições basais (B) e de pico (P) em pacientes sem déficit de GH

Pacientes pré-púberes (Grupo 1A)					Pacientes púberes (Grupo 1B)				
Nome	GH (ng/ml)				Nome	GH (ng/ml)			
	ITI		Clonidina			ITI		Clonidina	
	B ⁽¹⁾	P	B	P		B	P	B	P
FCS	3,0	10,3	2,3	11,4	MTT	< 1,2	7,2	1,2	< 1,2
MAN	1,1	12,2	1,3	13,3	JHS	2,0	6,1	< 1,0	15,4
FFH	8,9	12,6	1,5	9,8	MSP	1,4	16,3	1,2	1,6
RTS	1,8	6,1	< 1,1	11,5	SCN	1,4	26,9	1,8	30,4
JAM	3,0	3,3	1,3	23,6	PHR	< 1,3	33,4	< 1,3	38,0
ADO	9,2	21,8	< 1,2	4,0	AVC	13,9	9,2	2,1	6,7
AAM	1,5	11,6	1,6	24,3	JCES	3,6	21,2	1,6	4,6
SRC	< 1,1	16,9	1,1	22,9	CAC	1,8	10,1	1,1	16,4
AHM	1,8	11,7	2,5	12,6	JADA	1,9	8,2	< 1,2	3,9
					EZ	< 1,3	7,1	1,3	5,6
					MBM	< 1,3	21,1	1,5	3,5
					AS	1,3	11,1	2,1	18,6
Média ⁽²⁾	1,9	10,3	1,5	14,8		1,7	15,3	1,4	12,2
EPM	0,30	11,7	0,16	2,4		0,20	2,5	0,10	3,5

(1) Média das concentrações de GH nos tempos de -30 e 0 minutos.

(2) Para o cálculo da média, as concentrações de GH que caíram abaixo da sensibilidade foram consideradas iguais ao valor da sensibilidade do respectivo ensaio.

(3) Os pacientes FFH, ADO e AVC foram excluídos do cálculo das médias no ITI por apresentarem valores basais elevados de GH.

TABELA VII - Níveis séricos de GH nos testes de tolerância à insulina e clonidina em pacientes pré-púberes sem déficit de GH (Grupo IA)

Nome	Dosagem	ITT (0,1 U/kg)							Clonidina (0,0375 mg/m ²)					
		-30	0	15	30	45	60	90	-30	0	30	60	90	120
FCS	GH ⁽¹⁾	3,5	2,5	2,2	10,3	8,7	8,0	5,7	3,2	1,4	1,5	11,4	9,1	1,7
	G ⁽²⁾	79	85	30	38	53	72	48						
MAN	GH	1,1	<1,1	<1,1	5,8	4,7	6,2	12,2	1,2	1,5	1,6	1,7	7,9	13,0
	G	85	77	30	54	54	69	53						
FFH	GH	9,5	8,3	6,5	12,6	8,7	3,6	2,7	1,9	<1,2	<1,2	<1,2	9,8	5,0
	G	87	81	22	49	55	77	74						
RTS	GH	2,6	<1,1	<1,1	2,2	8,3	<1,1	6,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	11,5	3,0
	G	81	78	55	45	71	73	71						
JAM	GH	3,1	2,9	1,8	1,4	1,6	3,3	1,6	<1,2	1,4	<1,2	5,1	23,6	7,0
	G	88	88	26	38	54	79	58						
ADD	GH	7,3	11,1	14,2	21,8	17,2	2,3	9,0	<1,2	<1,2	<1,2	3,0	4,0	<1,2
	G	88	81	47	45	53	69	60						
AAM	GH	1,3	1,8	2,4	<1,3	9,7	11,6	9,8	1,6	1,6	3,5	24,3	6,0	2,0
	G	93	92	21	40	59	92	73						
SRC	GH	<1,1	<1,1	<1,1	5,1	5,9	16,9	9,7	<1,1	1,2	1,3	1,7	15,2	22,0
	G	87	90	36	27	53	67	53						
AHM	GH	2,0	1,6	1,8	3,7	8,2	11,7	10,2	2,8	2,2	1,4	12,6	5,8	2,0
	G	77	74	37	14	-	51	41						
Média ⁽³⁾	GH	2,1	1,7	1,6	4,2	6,3	8,4	7,9	1,7	1,4	1,5	6,9	10,3	6,0
EPH		0,37	0,27	0,21	1,2	1,2	2,0	1,4	0,26	0,11	0,25	2,5	2,0	2,0

(1) GH (ng/ml).

(2) Glicemia (mg/dl).

(3) Para o cálculo das médias, as concentrações de GH que caíram abaixo da sensibilidade foram consideradas iguais ao valor da sensibilidade do respectivo ensaio.

TABELA VIII - Níveis séricos de GH nos testes de tolerância à insulina e clonidina em pacientes púberes sem déficit de GH (Grupo 1B)

Nome	Dosagem	ITT (0,1 U/kg)							Clonidina (0,0375 µg/µ²)					
		-30	0	15	30	45	60	90	-30	0	30	60	90	120
MTT	GH ⁽¹⁾	<1,2	<1,2	<1,2	1,2	7,9	7,2	6,1	<1,2	1,3	<1,2	<1,2	-	<1,2
	G ⁽²⁾	80	82	19	28	42	45	52						
JHS	GH	1,9	2,1	2,2	6,1	3,1	2,2	<1,0	<1,0	<1,0	1,5	15,4	14,0	6,2
	G	91	85	43	39	57	64	73						
MSP	GH	1,6	<1,2	<1,2	10,0	17,6	16,3	9,6	1,2	<1,2	<1,2	<1,2	1,6	1,1
	G	73	74	30	40	56	61	74						
SCH	GH	1,4	1,4	2,0	1,4	18,1	26,9	15,6	1,8	1,9	2,7	30,4	24,7	10,0
	G	83	80	59	44	60	72	77						
PMR	GH	<1,3	<1,3	<1,3	11,3	24,8	26,2	33,4	<1,3	<1,3	9,2	38,0	26,1	13,0
	G	81	77	34	39	36	35	44						
AVC	GH	15,6	12,2	4,7	2,8	7,2	9,1	9,2	1,8	2,5	1,6	<1,0	6,1	6,7
	G	74	75	40	27	49	45	69						
JCES	GH	3,7	3,5	6,6	21,2	14,2	9,1	5,0	1,5	1,8	1,3	4,6	3,6	1,4
	G	89	96	54	34	51	60	63						
CAC	GH	2,1	1,6	1,6	1,5	5,5	7,4	10,1	1,3	0,9	1,2	2,0	16,4	4,6
	G	83	79	45	38	66	78	84						
JABA	GH	1,2	2,6	2,1	2,1	8,2	4,5	1,8	<1,2	<1,2	1,4	3,9	1,4	<1,2
	G	95	90	45	38	77	84	87						
EZ	GH	<1,3	<1,3	<1,3	3,6	5,6	6,3	6,7	1,3	1,3	<1,3	2,0	5,6	1,9
	G	87	84	44	40	62	72	84						
MBH	GH	<1,3	<1,3	2,0	21,1	19,3	19,2	17,0	1,4	1,7	1,5	2,1	2,5	3,5
	G	68	73	46	36	39	47	60						
AS	GH	<1,2	1,4	<1,2	1,4	8,4	11,1	5,1	1,9	2,3	2,7	18,6	3,7	2,3
	G	93	94	40	27	51	66	84						
Média ⁽³⁾	GH	1,6	1,7	2,0	7,3	12,0	12,4	10,1	1,4	1,5	2,2	10,0	9,6	4,4
EPM		0,22	0,22	0,45	2,3	2,1	2,6	2,8	0,08	0,14	0,63	3,6	2,8	1,1

(1) GH (ng/ml).

(2) Glicemia (mg/dl).

(3) Para o cálculo das médias, as concentrações de GH que caíram abaixo da sensibilidade foram consideradas iguais ao valor da sensibilidade do respectivo ensaio.

Em ambos os grupos, a concentração máxima de GH ocorreu entre 30 e 90 minutos após injeção da insulina, mais frequentemente no tempo 60 (7 pacientes).

O cortisol só foi dosado no paciente FCS, mostrando uma resposta normal ao estímulo hipoglicêmico (Tabela XVI).

4.2. TESTE DA CLONIDINA (TABELA VI, VII E VIII)

Na maioria dos testes, houve discreta redução dos níveis pressóricos associada a leve sonolência, ocorrendo entre 60 e 120 minutos após administração da clonidina. A queda foi de $10,9 \pm 1,8$ mmHg para a pressão sistólica e de $5,9 \pm 1,1$ mmHg para a diastólica.

Todos os pacientes partiram de níveis basais de GH inferiores a 2,5 ng/ml. No Grupo 1A (9 pacientes), a resposta à clonidina foi maior do que 7,0 ng/ml em 8 (88,9%). Considerando todos os 9 pacientes, a média dos picos de GH foi de $14,8 \pm 2,4$ ng/ml, não sendo estatisticamente diferente ($p = 0,26$) da obtida no ITT.

No Grupo 1B (12 pacientes), a clonidina promoveu incremento na concentração de GH acima de 7,0 ng/ml em apenas 5 (41,7%). A média dos picos de GH, incluindo os 7 pacientes com resposta inferior a 7,0 ng/ml, foi de $12,2 \pm 3,5$ ng/ml, não sendo estatisticamente diferente da obtida no mesmo teste no Grupo 1A ($p = 0,28$) nem da observada no ITT no Grupo 1B ($p = 0,15$). Entretanto, os níveis de GH observados nos dife

rentes tempos do teste da clonidina foram discretamente inferiores aos do ITT (Fig. 20).

Em ambos os grupos, a concentração máxima de GH ocorreu entre 60 e 120 minutos após administração da clonidina, mais freqüentemente no tempo 60 (9 pacientes).

4.3. TESTE DO TRH ASSOCIADO AO LHRH

Este teste sô foi realizado no paciente FCS, revelando respostas hipofisárias normais de LH, FSH, TSH e PRL. Os níveis basais elevados de PRL deveram-se provavelmente a "stress" na hora do teste (Tabela XVI).

5. SEGUIMENTO (FIGS. 21 E 22)

Todos os pacientes apresentaram ritmo de crescimento adequado, com exceção de FCS e ADO. Durante a evolução, foi observada pubarca em ADO aos 12,5 anos e início da puberdade em SRC aos 14,8 anos, permanecendo pré-púberes os demais componentes do Grupo 1A. Já no Grupo 1B, houve progressão discreta dos sinais puberais em todos os pacientes.

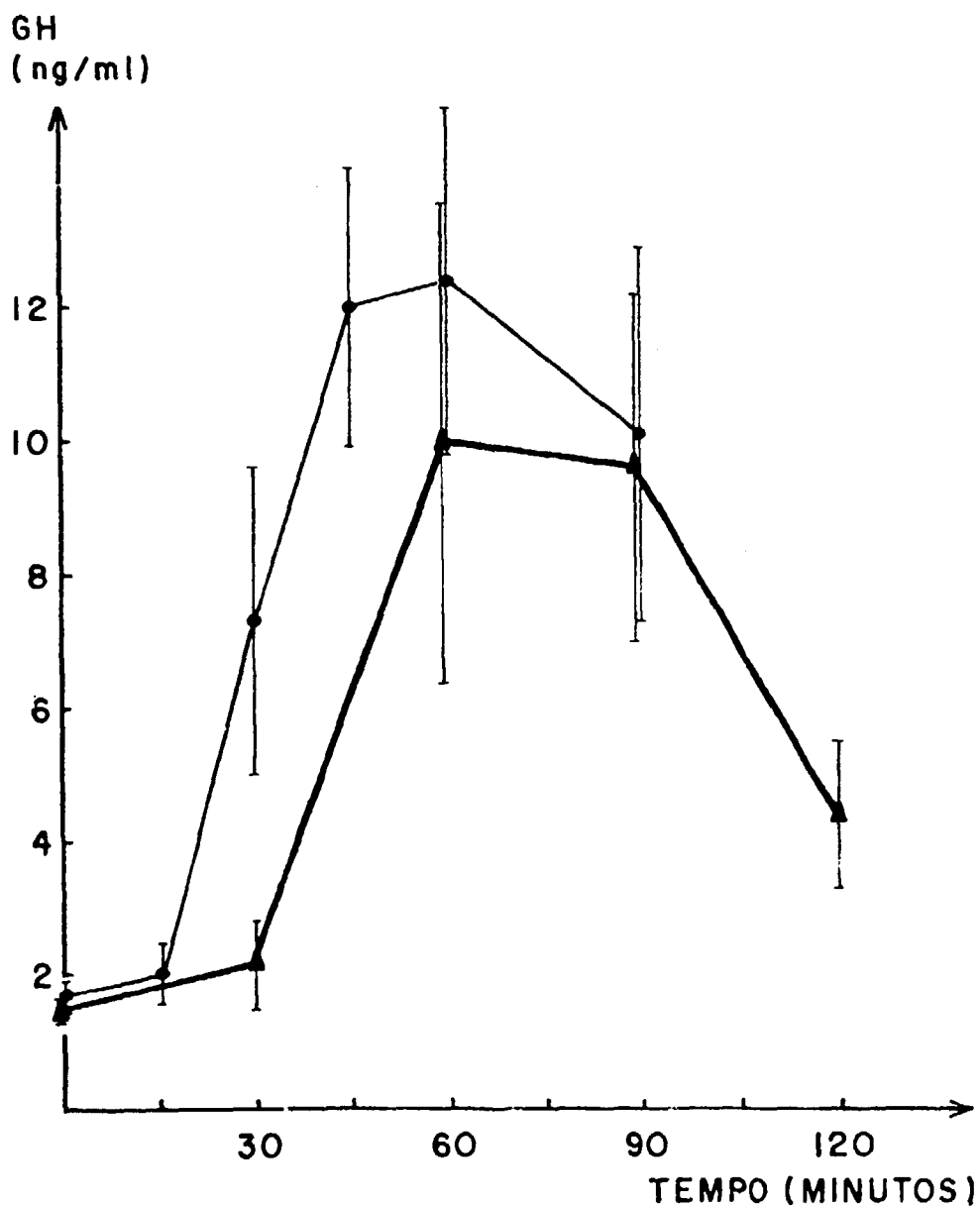


FIG. 20 - NÍVEIS SÉRICOS DE GH (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA) NOS TESTES DE TOLERÂNCIA À INSULINA (●—●) E CLONIDINA (▲—▲) EM PACIENTES PÚBERES SEM DÉFICIT DE GH.

ALTURA

cm

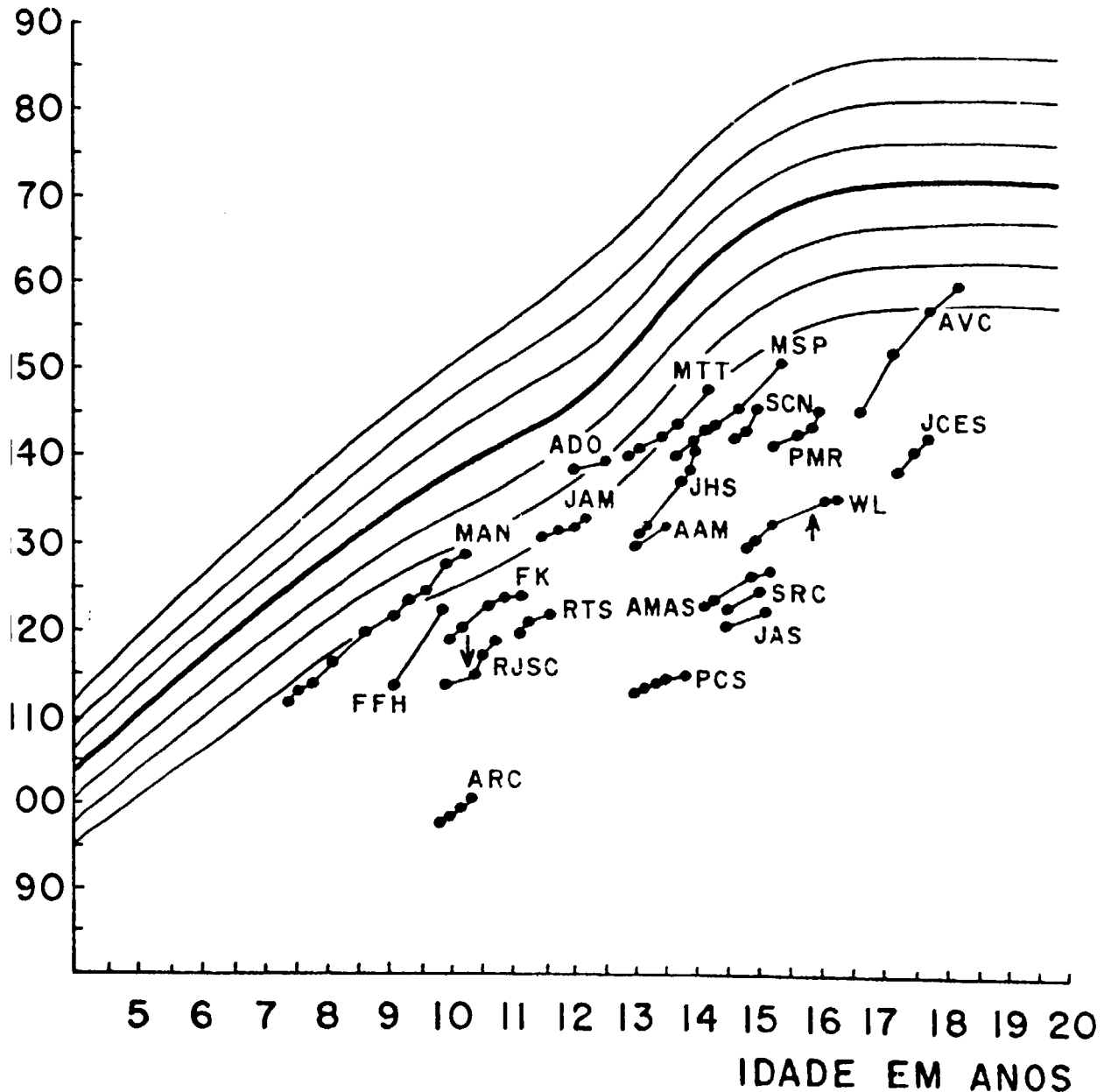


FIG. 21 - RITMO DE CRESCIMENTO DE 21 PACIENTES DO SEXO MASCULINO COMPARADO COM O GRÁFICO DE MARQUES E COL.(28).
 (↓) INÍCIO DO TRATAMENTO COM GH.
 (↑) INÍCIO DA PUBERDADE.

ALTURA
cm

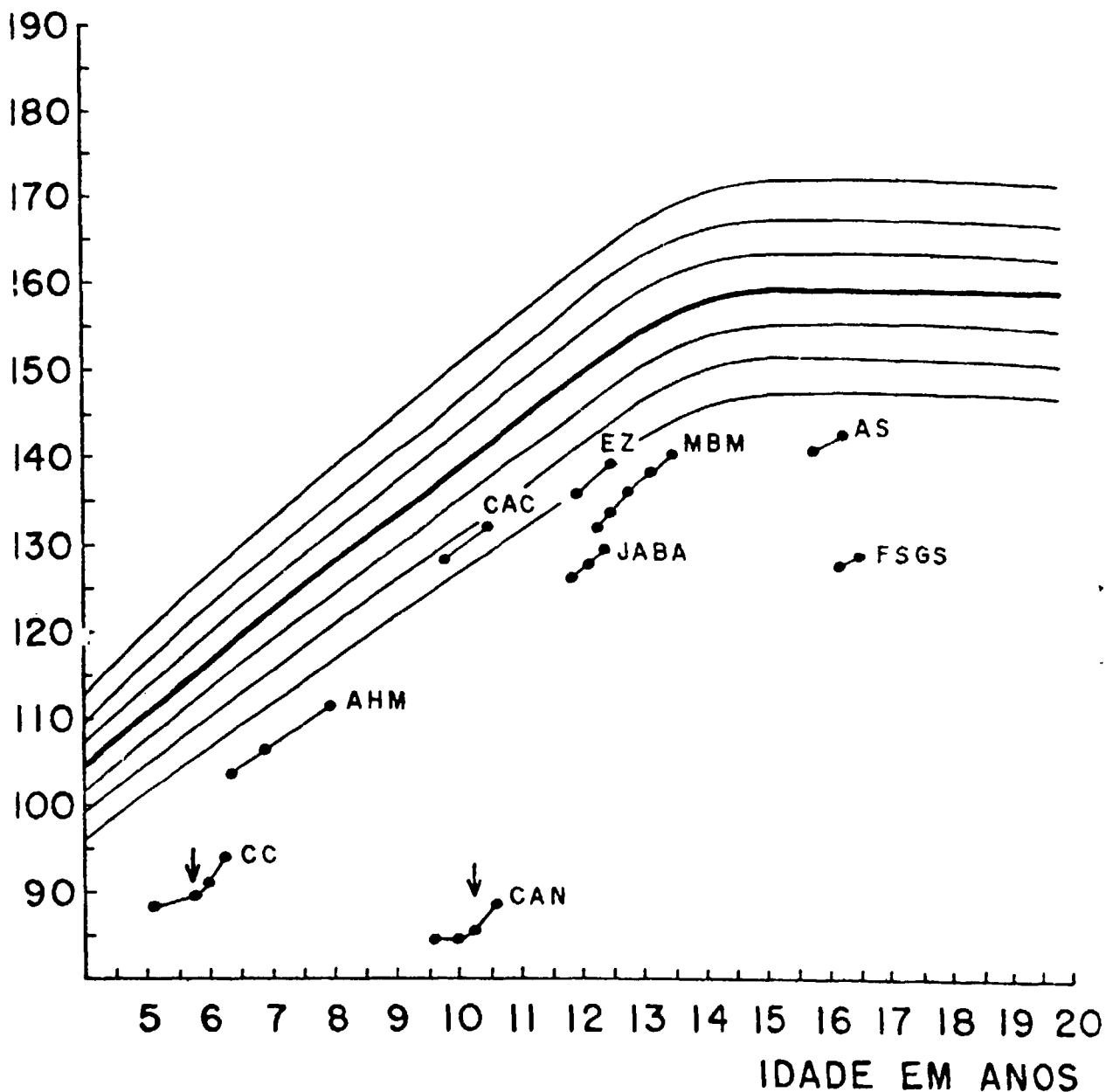


FIG. 22 - RITMO DE CRESCIMENTO DE 9 PACIENTES DO SEXO FEMININO COMPARADO COM O GRÁFICO DE MARQUES E COL. (28).
(↓) INÍCIO DO TRATAMENTO COM GH.
(↑) INÍCIO DA PUBERDADE.

GRUPO 2: PACIENTES COM DÉFICIT DE GH

Foram incluídos neste grupo 10 pacientes que preencheram 3 ou mais dos seguintes critérios:

- a) presença de sinais típicos de nanismo hipofisário;
- b) ritmo de crescimento reduzido;
- c) dosagem sérica diminuída de SmC;
- d) pico de liberação de GH menor do que 5,0 ng/ml em 2 testes de estímulo (ITT e clonidina).

A etiologia do distúrbio hormonal foi considerada idiopática em todos os pacientes com exceção de FSGS, na qual foi diagnosticado craniofaringioma. Entretanto, suspeitou-se de doença hipofisária familiar em 4 (ARC, PCS, CC e JAS) devido à presença de consangüinidade entre os pais.

Em 4 pacientes (RJSC, PCS, CAN e FSGS), foi feito o diagnóstico de deficiência hipotalâmica-hipofisária múltipla pelos níveis séricos basais reduzidos de T_3 e T_4 e/ou respostas subnormais dos demais hormônios hipofisários aos estímulos de hipoglicemia, TRH e LHRH. Os outros 6 pacientes (ARC, FK, AMAS, WL, CC e JAS) foram classificados como déficit isolado de GH.

1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

1.1. IDADE E SEXO

Foram estudados 7 meninos e 3 meninas, com idade entre 5,0 e 16,1 anos.

1.2. HISTÓRIA DO DÉFICIT ESTATURAL

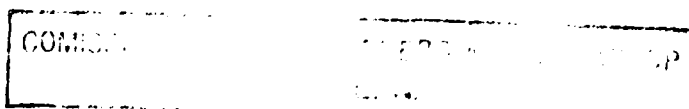
O retardo de crescimento foi notado pelos familiares nos primeiros 6 anos de vida. Com exceção de vitaminas, nenhum paciente tinha recebido qualquer tratamento antes de procurar o HC-FMUSP.

1.3. ANTECEDENTES INDIVIDUAIS

Todas as gestações evoluíram sem intercorrências, com duração de 9 meses. Os 10 partos foram por via vaginal, sendo 3 pélvicos e associados a cianose do recém-nascido.

Apenas 1 criança nasceu com peso inferior a 2.500 g e nenhuma com altura abaixo de 48 cm. Foi observado retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor no paciente PCS e um baixo aproveitamento escolar em RJCS e PCS. As condições de nutrição foram consideradas inadequadas em 4 crianças (PCS, WL, CC, CAN) e as de afeto domiciliar em apenas 1 (ARC). Não foram relatadas outras patologias importantes em nenhum dos doentes, a não ser criptorquidia tratada com Pregnyl em AMAS, asma brônquica em RJCS e verminoses prévias.

Dois pacientes (JAS e FSGS) referiram início do desenvolvimento puberal aos 14 e 15 anos, respectivamente, sendo os demais pré-púberes.



1.4. ANTECEDENTES HEREDITÁRIOS

A média da altura dos pais foi menor do que 158 cm em apenas 1 paciente (FSGS), sendo observada consangüinidade entre os pais de 4 (ARC, PCS, CC e JAS). Foi relatado nanismo acentuado (não investigado) só em 1 irmão de ARC, não sendo referidas outras patologias relevantes nas demais famílias.

1.5. INTERROGATÓRIO COMPLEMENTAR

A paciente FSGS apresentava polidipsia, poliúria, nictúria e hemianopsia bitemporal não associada a cefaléia. Nenhum dos outros doentes referia sintomas neurológicos, de hipotireoidismo ou de hipocortisolismo.

1.6. EXAME FÍSICO

Sete pacientes (ARC, RJSC, FK, PCS, CC, CAN e JAS) apresentavam sinais típicos de nanismo hipofisário como nariz em sela e adiposidade abdominal, associados a pele ressecada e reflexo aquileu lentificado em 2 (RJSC e PCS). Não foram detectadas outras anormalidades em nenhum dos pacientes, a não ser presença de fronte olímpica e esclera azulada em CC.

Seis meninos e 2 meninas foram considerados pré-puberes ao exame físico, sendo classificados como Grupo 2A (Tabela IX). No Grupo 2B (púberes), constituído por apenas 2

elementos (Tabela X) a paciente FSGS apresentava pubarca e telarca (estadio II de Tanner), enquanto que JAS tinha testículos com 3,2 cm de diâmetro.

2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL E RADIOLÓGICA GERAL (TABELAS IX E X)

As proteínas séricas totais encontravam-se diminuídas em 4 pacientes (PCS, WL, CC e CAN), sendo detectada hipalbuminemia discreta em apenas 1 (CAN). Foi constatada verminose em 3 pacientes (WL, CC e FSGS) e graus variáveis de anemia normocítica normocrômica ou microcítica hipocrômica em todos, com exceção de FK. Os demais exames laboratoriais estavam dentro dos limites da normalidade.

O Rx de crânio de FSGS revelou sela túrcica com dimensões aumentadas, desdobramento do assoalho, e calcificação supraselar, sendo confirmado o diagnóstico de tumor cístico com extensão intra e supraselar pela tomografia computadorizada. Nos demais pacientes, o estudo radiológico não mostrou anormalidades ao nível da sela túrcica.

A idade óssea estava retardada em todos os pacientes, não sendo compatível com a idade estatural em apenas 2 (AMAS e WL).

TABELA IX - Dados clínicos e laboratoriais em pacientes pré-púberes com déficit de GH (Grupo 2A)

Nome	Sexo	Idade cron. (anos)	Peso		Altura		Idade estat. (anos)	Idade óssea (anos)	Ritmo cresc. (cm/ano)	Hemog. (g/dl)	Prot. tot. (g/dl)	Alb. (g/dl)
			(kg)	(-DP) ⁽¹⁾	(cm)	(-DP) ⁽¹⁾						
ARC	M	9,7	15,7	2,4	98,6	5,6	3,2	3	4,2	11,9	6,5	4,1
RJSC	M	10,0	25,0	0,9	114,8	3,5	5,7	5	2,0	11,0	6,1	3,9
FK	M	10,0	26,2	0,8	119,2	2,8	6,5	7	5,5	13,2	8,4	4,6
PCS	M	12,9	19,4	2,4	113,0	5,4	5,5	6	3,4	10,4	5,5	3,7
AMAS	M	14,1	21,0	3,0	124,2	5,2	7,2	10	2,9	11,4	6,4	4,0
WL	M	15,3	29,0	2,7	133,1	4,7	9,0	12	3,2	11,4	5,8	3,5
CC	F	5,0	12,2	2,1	87,4	4,7	2,0	2	1,5	11,3	5,0	3,7
CAN	F	9,6	10,3	3,5	84,7	8,5	1,7	1,5	2,9	10,3	5,0	3,4
Normal										12-16	6-8	3,5-5,0

(1) Desvio-padrão em relação à média para sexo e idade segundo as tabelas de Marques e col. (45).

TABELA X - Dados clínicos e laboratoriais em pacientes púberes com déficit de GH (Grupo 2B)

Nome	Sexo	Idade cron. (anos)	Peso		Altura		Idade estat. (anos)	Idade óssea (anos)	Ritmo cresc. (cm/ano)	Hemog. (g/dl)	Prot. tot. (g/dl)	Alb. (g/dl)
			(kg)	(-DP) ⁽¹⁾	(cm)	(-DP) ⁽¹⁾						
JAS	M	14,5	21,5	3,1	120,9	5,8	6,7	9	3,2	11,7	6,3	4,0
FSGS	F	16,1	25,7	3,4	128,8	4,8	8,2	9	2,8	10,9	6,2	4,4
Normal										12-16	6-8	3,5-5,0

(1) Desvio-padrão em relação à média para sexo e idade segundo as tabelas de Marques e col. (45).

3. AVALIAÇÃO HORMONAL BASAL (TABELAS XI E XII)

A SmC, quando correlacionada com a idade cronológica e sexo, mostrou-se diminuída em todos os pacientes. Níveis séricos reduzidos de T_3 e/ou T_4 , associados a valores normais de TSH, foram observados em 3 (RJSC, PCS e FSGS), confirmando a presença de hipotireoidismo secundário.

A testosterona sérica situou-se em nível inferior a 27 ng/dl em todos os meninos do Grupo 2A, enquanto que, no Grupo 2B, JAS mostrou um valor de 50,1 ng/dl. Já o estradiol sérico caiu abaixo da sensibilidade do ensaio (10 pg/ml) em todos os pacientes de ambos os grupos.

4. TESTES FARMACOLÓGICOS DE ESTÍMULO

4.1. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TABELAS XIII, XIV E XV)

Níveis de glicemia inferiores a 40 mg/dl ocorreram entre 15 e 30 minutos após administração da insulina em todos os testes. Apesar dos sintomas desagradáveis de hipoglicemia observados em todos os pacientes, não foi necessário interromper o teste devido a perda de consciência em nenhum.

Com exceção de JAS, todos os pacientes partiram de níveis basais de GH iguais ou menores do que 1,0 ng/ml, não

TABELA XI - Avaliação hormonal basal em pacientes pré-púberes com déficit de GH (Grupo 2A)

Nome	SmC (U/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (µg/dl)	ISH (µUI/dl)	T (ng/dl)	E ₂ (pg/ml)
ARC	0,11 (0,22-2,8) ⁽¹⁾	100	7,7	4,2	16,0	
RJSC	< 0,10 (0,22-2,8)	122	3,7	2,9	8,2	
FK	< 0,10 (0,22-2,8)	147	7,5	3,7	6,4	
PCS	0,13 (0,28-3,7)	75	4,0	2,2	13,0	
AMAS	0,14 (0,90-5,6)	156	11,5	1,0	25,0	
ML	< 0,10 (0,91-3,1)	98	7,4	4,2	23,0	
CC	< 0,10 (0,18-2,4)	136	8,0	1,7		< 10
CAN	< 0,10 (0,41-4,5)	97	8,3	2,0		< 10
Normal		80-200	4,5-11,5	0,8-5,0	3-27	< 10

(1) Valores normais para sexo e idade cronológica.

TABELA XII - Avaliação hormonal basal em pacientes púberes com déficit de GH (Grupo 2B)

Nome	S _m C (U/ml)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (µg/dl)	TSH (µUI/dl)	T (ng/dl)	E ₂ (pg/ml)
JAS	0,10 (0,90-5,6) ⁽¹⁾	97	10,7	2,2	50,1	
FSGS	0,10 (0,71-4,1)	37	3,9	2,7		< 10
Normal		80-200	4,5-11,5	0,8-5,0	> 50	< 82

(1) Valores normais para sexo e idade cronológica.

havendo incrementos acima de 1,4 ng/ml após o estímulo hipoglicêmico em nenhum. No pacientes JAS, a concentração de GH elevou-se de um basal de 1,9 ng/ml para um máximo de 3,5 ng/ml no tempo 30.

No Grupo 2A, a média dos picos detectados após injeção de insulina foi de $0,89 \pm 0,08$ ng/ml, estatisticamente menor ($p < 0,01$) do que a obtida no Grupo 1A. Houve uma discriminação completa entre os níveis de GH observados nos diferentes tempos do ITT no Grupo 2A quando comparados com os do Grupo 1A (Fig. 23).

Não foi calculada a média dos picos nem realizada a comparação estatística do Grupo 2B com os demais, já que este era constituído por apenas 2 pacientes que, além de tudo, apresentavam secreções nitidamente diferentes de GH.

Nos pacientes em que houve discreto aumento dos níveis de GH durante o teste, os valores máximos foram observados entre 30 e 90 minutos.

Com relação ao cortisol (Tabela XVI), os níveis séricos basais mostraram-se normais em todos os pacientes. Após estímulo hipoglicêmico, a resposta foi considerada subnormal em apenas 3 (RJSC, PCS e FSGS), confirmando a deficiência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou do hormônio liberador do ACTH (CRF).

TABELA XIII - Níveis de GH em condições basais (B) e de pico (P) em pacientes com déficit de GH

Pacientes pré-púberes (Grupo 2A)					Pacientes púberes (Grupo 2B)				
Nome	Níveis de GH (ng/ml)				Nome	Níveis de GH (ng/ml)			
	III		Clonidina			III		Clonidina	
	B ⁽¹⁾	P	B	P		B	P	B	P
ARC	0,6	0,8	< 0,6	1,0	FSGS	1,0	0,9	1,2	1,7
RJSC	0,6	1,4	0,9	1,0	JAS	1,9	3,5	1,4	4,8
FK	< 0,9	0,9	< 0,9	0,9					
PCS	1,0	1,0	0,9	1,2					
AMAS	0,7	0,8	0,6	2,3					
WL	< 0,6	0,8	1,3	1,3					
CC	< 0,6	0,7	0,6	0,7					
CAN	< 0,6	0,7	0,7	0,6					
Média ⁽²⁾	0,70	0,89	0,81	1,1					
EPM	0,05	0,08	0,08	0,18					

(1) Média dos níveis de GH nos tempos de -30 e 0 minutos.

(2) Para o cálculo da média, as concentrações de GH que caíam abaixo da sensibilidade foram consideradas iguais ao valor da sensibilidade do respectivo ensaio.

TABELA XIV - Níveis séricos de GH nos testes de tolerância à insulina e clonidina em pacientes pré-púberes com déficit de GH (Grupo 2)

Nome	Dosagem	ITI (0,1 U/kg)							Clonidina (0,0375 µg/m ²)					
		-30	0	15	30	45	60	90	-30	0	30	60	90	120
ARC	GH ⁽¹⁾	0,7	<0,6	<0,6	0,6	<0,6	<0,6	0,8	<0,6	<0,6	1,2	0,8	0,9	1,0
	G ⁽²⁾	72	61	39	30	32	38	43						
RJSC	GH	0,6	0,7	1,0	1,3	0,8	1,2	1,4	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	0,9
	G	86	86	40	25	32	38	40						
FK	GH	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9
	G	89	82	26	29	40	80	-						
PCS	GH	1,1	0,9	1,0	0,8	0,7	0,8	1,0	0,9	0,9	1,2	0,7	0,9	0,9
	G	75	73	43	36	36	49	36						
ANAS	GH	0,8	0,6	0,6	<0,6	0,8	0,8	0,8	0,6	<0,6	2,3	1,0	1,6	2,3
	G	77	78	50	30	39	52	67						
WL	GH	<0,6	<0,6	0,6	0,7	<0,6	0,7	0,8	1,1	1,6	1,3	0,5	<0,6	0,8
	G	104	72	48	39	44	51	56						
CC	GH	<0,6	<0,6	0,6	0,7	-	0,6	<0,6	0,6	<0,6	-	<0,6	0,7	0,6
	G	81	76	34	32	42	34	-						
CAN	GH	<0,6	<0,6	<0,6	0,7	<0,6	<0,6	<0,6	0,8	<0,6	<0,6	<0,6	0,6	<0,6
	G	56	58	28	11	17	22	27						
Média ⁽³⁾	GH	0,73	0,68	0,73	0,78	0,71	0,77	0,86	0,80	0,83	1,2	0,77	0,90	1,0
EPM		0,06	0,10	0,06	0,08	0,04	0,07	0,09	0,06	0,12	0,20	0,05	0,11	0,19

(1) GH (ng/ml).

(2) Glicemia (mg/dl).

(3) Para o cálculo das médias, as concentrações de GH que caíram abaixo da sensibilidade foram consideradas iguais ao valor da sensibilidade do respectivo ensaio.

TABELA XV - Níveis séricos de GH nos testes de tolerância à insulina e clonidina em pacientes púberes com déficit de GH (Grupo 2B)

Nome	Dosagem	ITT (0,1 U/kg)							Clonidina (0,0375 µg/m ²)					
		-30	0	15	30	45	60	90	-30	0	30	60	90	120
FSGS	GH ⁽¹⁾	1,2	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	<0,9	1,4	1,1	1,3	1,7	1,6	1,2
	G ⁽²⁾	78	74	37	24	28	33	36						
JJS	GH	1,7	2,1	2,9	3,5	2,4	2,1	2,8	1,8	1,1	1,6	4,8	3,7	2,0
	G	88	82	35	26	53	46	62						

(1) GH (ng/ml).

(2) Glicemia (mg/dl).

4.2. TESTE DA CLONIDINA (TABELAS XIII, XIV E XV)

Houve redução de $10,8 \pm 2,8$ e de $5,0 \pm 1,6$ mmHg nos níveis da pressão arterial sistólica e diastólica, respectivamente. Esta queda ocorreu entre os 60 e 120 minutos do teste e foi acompanhada por leve sonolência, de maneira semelhante à observada no Grupo 1.

Todos os pacientes partiram de concentrações basais de GH iguais ou inferiores a $1,4$ ng/ml. Após administração da clonidina, não houve incremento acima de $2,3$ ng/ml em nenhum, com exceção de JAS, que mostrou um valor máximo de $4,8$ ng/ml no tempo 60.

No Grupo 2A, a média dos picos pós-clonidina foi de $0,81 \pm 0,08$ ng/ml. A análise estatística mostrou que este valor era menor ($p < 0,01$) do que o observado no mesmo teste no Grupo 1A, mas não diferente ($p = 0,37$) do obtido no ITT no Grupo 2A. Houve também uma discriminação completa entre os níveis de GH observados nos diferentes tempos do teste da clonidina no Grupo 2A quando comparados com os do Grupo 1A (Fig. 23).

No Grupo 2B, não foi calculada a média dos picos nem realizada a comparação estatística com os demais grupos pelas razões anteriormente especificadas.

Os tempos de pico, nos testes em que houve discreto aumento dos níveis de GH, ocorreram entre 30 e 90 minutos após

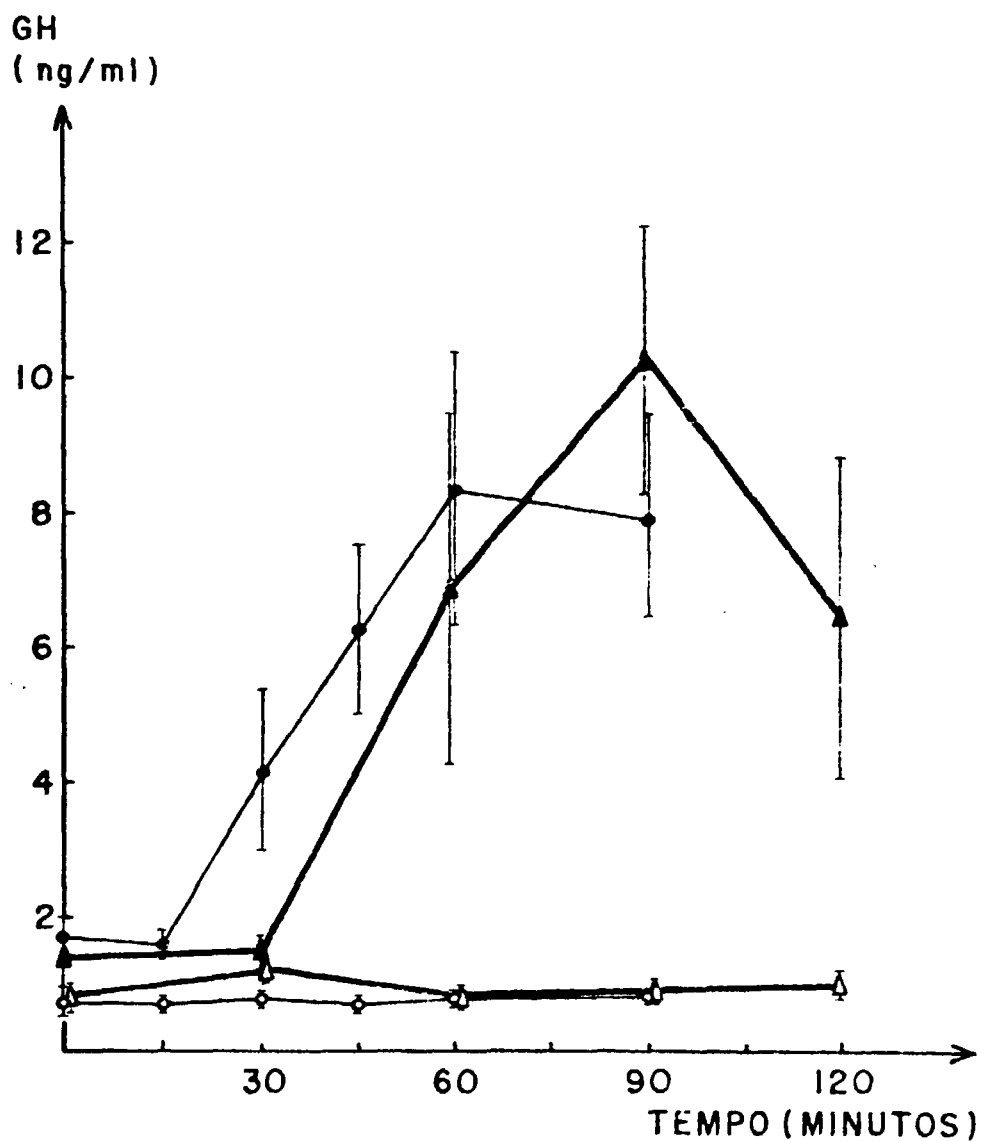


FIG. 23 - NÍVEIS SÉRICOS DE GH (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA) NOS TESTES DE TOLERÂNCIA À INSULINA (\bullet — \bullet , \circ — \circ) E CLONIDINA (\blacktriangle — \blacktriangle , \triangle — \triangle) EM PACIENTES PRÉ-PÚBERES SEM DÉFICIT (\bullet — \bullet , \blacktriangle — \blacktriangle) E COM DEFICIÊNCIA (\circ — \circ , \triangle — \triangle) DE GH.

administração da clonidina, sendo mais precoces do que no Grupo 1.

4.3. TESTE DO TRH ASSOCIADO AO LHRH (TABELA XVI)

Todas as dosagens basais de TSH, PRL, LH e FSH foram normais, com exceção do valor elevado de PRL observado nos pacientes PCS e FSGS, sugestivo de distúrbio hipotalâmico.

Após estímulo com TRH, os incrementos do TSH e PRL foram considerados subnormais em apenas 1 (CAN) e 2 (FSGS e CAN) pacientes, respectivamente, indicando uma baixa reserva hipofisária destes hormônios. Em RJSC, a resposta exagerada do TSH sugeriu um distúrbio hipotalâmico.

Com exceção de CAN (teste não realizado), todos os pacientes responderam ao LHRH com elevação dos níveis séricos de LH e FSH, excluindo uma deficiência hipofisária total destes hormônios. O aumento das gonadotrofinas foi considerado normal nos 2 pacientes púberes, ao passo que, nas crianças pré-púberes, não foi possível avaliar o grau de resposta, já que, nesta fase, a hipófise normal pode não responder ao estímulo agudo com LHRH.

TABELA XVI - Resposta do cortisol (F), TSH, PRL, LH e FSH ao estímulo hipoglicêmico, TRH e LHRH em 11 pacientes com baixa estatura

Nome	ITI (0,1 U/kg)				TRH (200 µg)				LHRH (100 µg)			
	glic. (mg/dl)		F (µg/dl)		TSH (µUI/ml)		PRL (ng/ml)		LH (µUI/ml)		FSH (µUI/ml)	
	(1) B	(2) N	B	P ⁽³⁾	B	P	B	P	B	P	B	P
FCS	82	30	16,5	20,0	2,2	26,0	34,6	98,6	3,0	21,6	4,1	10,0
ARC	66	30	20,5	30,4	4,2	12,0	5,4	29,3	5,8	12,3	1,9	5,7
RJSC	86	25	6,0	5,3	2,9	58,3	8,7	29,1	7,4	12,2	2,8	10,5
FK	85	26	8,3	25,6	3,5	16,9	6,9	31,1	2,0	4,9	0,8	2,0
PCS	74	36	8,8	12,8	2,2	-	32,1	55,4	5,6	11,7	3,8	6,4
AMAS	77	30	16,0	34,0	1,6	4,8	-	-	4,6	28,0	3,3	4,8
WL	88	39	7,1	31,0	4,2	23,8	8,1	19,6	9,9	30,9	6,7	13,8
CC	78	32	13,0	27,0	1,6	7,9	7,1	13,7	3,0	8,6	3,4	9,4
CAN	57	11	21,5	32,0	2,8	4,9	5,0	7,5	-	-	-	-
JAS	85	26	10,1	20,1	1,1	10,3	-	-	4,4	26,7	2,7	8,5
FSGS	76	24	6,7	15,0	2,9	26,5	21,1	21,2	11,6	25,3	12,7	29,5
Normal	70-110		5-17	16-42	1-6	6-30	2-16	16-98	3-17	13-97 ⁽⁵⁾	2-9	4-19 ⁽⁵⁾

(1) Basal = média dos níveis hormonais no tempos de -30 e 0 minutos.

(2) Nadir.

(3) Pico de concentração hormonal após estímulo.

(4) Valores normais segundo Nery (52).

(5) Respostas normais para pacientes púberes.

5. SEGUIMENTO (FIGS. 21 E 22)

Todos os pacientes foram seguidos por um período mínimo de 6 meses, com exceção de FSGS, a qual foi submetida a cirurgia transfenoidal 3 meses após a avaliação inicial, sendo confirmado o diagnóstico de craniofaringioma. Neste período, a única medicação administrada foi l-tiroxina (50 a 100 µg por via oral) aos pacientes com hipotireoidismo confirmado laboratorialmente.

Com exceção de ARC e FK, todos os demais pacientes apresentaram ritmo de crescimento reduzido, sendo que apenas WL entrou em puberdade aos 15,7 anos. Após iniciado tratamento com GH extraído de hipófises humanas no HC-FMUSP (0,1 U/kg de peso administrados por via intramuscular 3 vezes por semana), houve aceleração da velocidade de crescimento em RJSC, CC e CAN.

VIII — DISCUSSÃO

A clonidina, administrada na dose oral de $0,15 \text{ mg/m}^2$, é comprovadamente um potente agente estimulador da secreção de GH. Isto foi demonstrado pela primeira vez por Gil-Ad e col. (23,24) em 1979, que observaram picos de GH acima de 10 ng/ml (média \pm erro padrão da média: $34,4 \pm 4,5 \text{ ng/ml}$) em todos os elementos de um grupo de 18 crianças e adolescentes com baixa estatura sem distúrbio endócrino. Em estudo semelhante, Romero e col. (63) relataram picos de GH de $21,9 \pm 4,0 \text{ ng/ml}$, com resultados falso-negativos (resposta menor do que $7,0 \text{ ng/ml}$) em 14,3%.

Em três estudos (16,39,66) em que o teste da clonidina ($0,15 \text{ mg/m}^2$) foi comparado com o ITT ($0,1-0,15 \text{ U/kg}$ ou 4 U/m^2) em pacientes com nanismo não hipofisário, foi observado maior pico de liberação de GH, associado a menor incidência de resultados falso-negativos, no primeiro teste. Salti e col. (66) relataram picos pós-clonidina de $13,7 \pm 1,9 \text{ ng/ml}$, sendo menores ou iguais a $8,0 \text{ ng/ml}$ em 9,7% dos pacientes. Já Fraser e col. (16) não encontraram respostas inferiores a $7,5 \text{ ng/ml}$ em nenhum teste da clonidina, cuja média dos picos foi de $18,8 \pm 1,6 \text{ ng/ml}$. Picos muito mais elevados durante

este teste ($36,5 \pm 9,9$ ng/ml) foram observados por Lanes e col. (39) no único estudo em que apenas crianças pré-púberes foram avaliadas, com 5,8% de respostas inferiores a 10 ng/ml. A eficiência de liberação de GH provocada pela clonidina foi considerada equivalente e não superior à do ITT em apenas um trabalho (30), que consistiu na investigação de 64 pacientes com baixa estatura em diversos centros da Grã-Bretanha. Entretanto, algumas objeções foram feitas quanto à validade dos resultados deste último estudo, já que as dosagens de GH foram realizadas em diferentes laboratórios e os pacientes nem sempre estavam em jejum no dia do teste da clonidina (16).

O teste da clonidina ($0,15$ mg/m²) também mostrou-se superior ao do l-dopa (120-250 mg ou 300 mg/m²) e ao da arginina (0,5 g/kg). Em dois estudos (62,71) realizados em pacientes com nanismo não hipofisário, foi observado maior pico de liberação de GH ($16,3 \pm 0,96$ e $13,1 \pm 1,76$ ng/ml) e menor índice de resposta inferior a 7,0 ng/ml (6 e 0%, respectivamente) no teste da clonidina.

Devido à ocorrência de hipotensão por vezes severa (47) associada à dose de $0,15$ mg/m², a clonidina foi testada em quantidades menores com o intuito de se reduzir a incidência de efeitos colaterais e, ao mesmo tempo, manter eficiência adequada de liberação de GH. Romer e col. (62) estudaram, em 1982, a secreção deste hormônio em pacientes com nanismo não hipofisário após administração de 0,05, 0,10 e 0,15 mg/m²

de clonidina, não observando diferenças estatisticamente significantes nas respostas obtidas com estas 3 doses. Neste mesmo ano, Laron e col. (41) propuseram a realização do teste da clonidina com a dose fixa de 0,025 mg e compararam-no com o ITT (0,1 U/kg). Em 12 pacientes com baixa estatura constitucional, sem menção ao estágio puberal, os autores relataram picos de GH e resultados falso-negativos (resposta menor do que 10 ng/ml) de $21,8 \pm 4,9$ ng/ml e 16,7% para o ITT, e de $30,6 \pm 8,8$ ng/ml e 8,3% para a clonidina, sendo este último associado a reduções da pressão sistólica de 5 a 10 mmHg. Concluíram, portanto, que a clonidina, mesmo na pequena dose de 0,025 mg, era um agente liberador de GH mais potente do que o estímulo hipoglicêmico.

Entretanto, dois estudos subseqüentes (11,40), realizados em grupos de crianças pré-púberes com nanismo não hipofisário, demonstraram que o teste da clonidina com dose inferior a 0,15 mg/m², embora adequado para avaliar a reserva hipofisária de GH, não era tão eficiente quanto inicialmente proposto por Laron e col. (41). No trabalho realizado por Dammacco e col. (11) em 1983, o teste da clonidina (0,035 mg/m²) foi comparado com o da arginina (0,5 g/kg). Os resultados revelaram picos de liberação de GH semelhantes ($16,7 \pm 2,44$ ng/ml para a clonidina e $15,69 \pm 2,56$ ng/ml para a arginina), mas menor incidência de resultados falso-negativos (pico $\leq 7,0$ ng/ml) no teste da clonidina (16,7%) do que na arginina (25%). Houve

redução dos níveis pressóricos pós-clonidina de $11,5 \pm 0,8$ mmHg para a sistólica e de $7,5 \pm 0,7$ mmHg para a diastólica. Já no estudo de Lanes e col. (40), publicado em 1985, a clonidina foi testada nas doses fixas de 0,100 e 0,050 mg (correspondentes, em média, a $0,119$ e $0,0619$ mg/m², respectivamente) em 10 (Grupo A) e 14 (Grupo B) crianças, respectivamente. Os picos de GH foram de $14,5 \pm 2,0$ e $11,6 \pm 1,6$ ng/ml nos Grupos A e B, respectivamente, com índice de respostas subnormais (menores do que 10 ng/ml) de 10 e 36%. Houve decréscimo semelhante da pressão arterial nos 2 grupos, variando de 14 a 15,3 mmHg para a sistólica e de 2,3 a 4,0 mmHg para a diastólica. Neste mesmo trabalho, 9 crianças com baixa estatura idiopática foram estudadas com uma dose de $0,100$ µg/m² de clonidina e uma única coleta de sangue aos 60 minutos, sendo observados picos maiores ou iguais a 10 ng/ml em todas.

O teste da clonidina com a dose de $0,0375$ mg/m² foi, neste projeto, avaliado no que diz respeito à eficiência de liberação de GH e à incidência de efeitos colaterais indesejáveis, particularmente hipotensão e sonolência. Para tanto, ele foi comparado com o ITT (0,1 U/kg), considerado por muitos autores o teste padrão de avaliação da reserva hipofisária de GH (32,48,58). Os 2 testes foram realizados em grupos distintos de crianças e adolescentes, para se estudar também a possível influência da puberdade sobre a resposta do GH à clonidina.

A avaliação clínica, laboratorial e radiológica geral obedeceu às recomendações propostas por Underwood & Van Wyk no que se refere à investigação diagnóstica de crianças com baixa estatura (74). As dosagens basais dos hormônios tireoidianos, gonadotrofinas e SmC contribuíram para descartar a presença de hipotireoidismo, disgenesia gonadal em meninas púberes e nanismo hipofisário, respectivamente.

O ITT foi padronizado segundo critérios previamente estabelecidos na literatura (18,20,35,36,56,59,64,72,77), com coletas de sangue até os 90 minutos após administração da insulina, já que, neste teste, o pico de GH geralmente ocorre entre os 30 e 90 minutos. A coleta não foi continuada até os 120 minutos para não perpetuar em demasia os efeitos colaterais desagradáveis associados à hipoglicemia, observados em todos os pacientes.

O teste da clonidina foi realizado com a dose de $0,0375 \text{ mg/m}^2$, escolhida por corresponder a exatamente um quarto do valor inicialmente preconizado na literatura ($0,15 \text{ mg/m}^2$) e ser próxima da dose de $0,035 \text{ mg/m}^2$, já previamente testada e associada a boa eficiência de liberação de GH e baixa incidência de efeitos colaterais (12). Foi ponderado também que, embora criasse problemas na hora de sua preparação, a dose deveria ser corrigida para a superfície corpórea, de modo que todas as crianças recebessem, proporcionalmente, a mesma quantidade da droga.

A transformação da clonidina em pó e posterior diluição em água foi a única maneira simples encontrada de se preparar diferentes micro-doses da droga, individualizadas para cada paciente, já que o menor comprimido comercializado contém 0,1 mg. Embora não se conseguisse uma solução completamente homogênea de clonidina em água, este procedimento facilitou também a administração da droga a crianças que se recusassem a engolir o comprimido.

As amostras de sangue após administração da clonidina foram coletadas a cada 30 minutos durante 2 horas, já que, em todos os estudos prévios (11,16,23,30,39,40,41,62,63,66, 71), o pico de GH ocorreu entre 60 e 120 minutos. O fato de que os tempos de coleta não foram idênticos neste teste e no ITT não invalida a comparação entre eles, já que correspondem a estímulos provocativos diferentes da secreção de GH, embora ambos com provável ação ao nível de receptores α-adrenérgicos centrais.(38,44).

Em todos os testes,o GH foi determinado por método próprio de RIE completamente desenvolvido, caracterizado e adequado às necessidades deste projeto. Todos os soros de um mesmo paciente foram dosados em um único ensaio, evitando-se,dessa maneira,a influência da variação interensaio. O método foi ajustado de modo a apresentar sensibilidade ao redor de 1,0 ng/ml e precisão máxima no intervalo de 5,0 a 30,0 ng/ml, correspondente à maior parte dos picos de liberação

ção de GH observados nos testes provocativos. Não se procurou obter maior sensibilidade porque não era a finalidade deste projeto estudar valores basais de GH. A especificidade do ensaio foi demonstrada pelo baixo grau de imunorreatividade cruzada do anti-soro anti-GH com os demais hormônios hipofisários e pela ausência de efeitos não específicos do meio de incubação sobre a reação antígeno-anticorpo.

A classificação dos 31 pacientes em portadores (Grupo 1) e não portadores (Grupo 2) de déficit de GH, baseada nas características clínicas, ritmo de crescimento, dosagem basal de SmC e resposta aos testes provocativos, obedeceu a critérios previamente estabelecidos na literatura (32, 58,74,75). Foi possível a inclusão de pacientes com patologias diversas no Grupo 1, já que estudos prévios (35) demonstraram que a resposta do GH aos testes provocativos não é diferente nestas doenças quando comparadas entre si ou com indivíduos normais.

Em todos os pacientes incluídos no Grupo 2, o nanismo hipofisário foi fortemente suspeitado na avaliação clínica pela severidade do déficit estatural e/ou presença de sinais típicos, confirmando a importância do exame clínico.

O ritmo de crescimento, considerado um dos parâmetros mais importantes na decisão de se submeter ou não um paciente com baixa estatura a investigação laboratorial extensa (74), permitiu uma boa discriminação entre os pacientes

com e sem déficit de GH. Todos com exceção de 2 pacientes do Grupo 1, embora situando-se abaixo do percentil 10, acompanharam a curva normal de crescimento, enquanto que isto ocorreu em apenas 2 crianças do Grupo 2 durante o período de observação. Não foi encontrada explicação adequada para a velocidade de crescimento normal nestes dois últimos pacientes. Embora eles pudessem apresentar alguma forma de GH biologicamente ativo mas imunologicamente não ensaiável (74), a presença de SmC diminuída praticamente excluiu esta hipótese.

A dosagem sérica de SmC, freqüentemente utilizada como teste de triagem para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário (74,75), mostrou-se normal em todos os pacientes incluídos no Grupo 1 e diminuída nos do Grupo 2, possibilitando uma completa diferenciação entre eles. Em crianças acima de 5 anos de idade, faixa etária em que se enquadravam todos com exceção de 1 paciente estudado neste projeto, valores normais de SmC praticamente excluem deficiência de GH (75). Por outro lado, valores baixos estão freqüentemente associados a outras patologias, como hipotireoidismo e desnutrição, e não permitem estabelecer o diagnóstico de nanismo hipofisário (75). Aliás, a dosagem sérica normal de SmC, apontada como um dos melhores índices do estado nutricional adequado de um indivíduo (74), foi também utilizada para descartar a presença de graus mais severos de desnutrição em qualquer um dos pacientes do Grupo 1, principalmente quando

associada a concentrações basais baixas de GH.

Embora um assunto controvertido, a maioria dos autores considera um pico de GH acima de 7,0 ng/ml como resposta normal a qualquer teste de liberação deste hormônio (32, 48, 74). Este valor está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, já que todos os pacientes incluídos no Grupo 1 apresentaram picos de GH maiores do que 7,0 ng/ml em pelo menos um teste provocativo. Por outro lado, apenas um paciente púbere do Grupo 2 mostrou resposta maior do que 2,3 ng/ml, sendo ainda inferior a 5,0 ng/ml. Segundo os critérios propostos por Milner e col. (48), este paciente poderia ser classificado como déficit parcial de GH.

A comparação entre o teste da clonidina e o ITT no grupo de crianças pré-púberes demonstrou que a média dos picos de liberação de GH foi maior (embora não estatisticamente significativa) no primeiro teste, o qual estava também associado a menor incidência de respostas falso-negativas. Os resultados obtidos foram mais compatíveis com os relatados por Dammacco e col. (11) com a dose de 0,035 mg/m² e por Lanes e col. (40) com a dose fixa de 0,1 mg. Entretanto, foram nitidamente inferiores aos de Laron e col. (41) com a dose fixa de 0,025 mg e aos de Lanes e col. (39) com a dose inicialmente preconizada na literatura de 0,15 mg/m². Estes dados reforçam a idéia inicial de que os maiores valores de pico, obtidos por Laron e col. (41) com a menor dose de cloni-

dina já testada, talvez se devam ao fato dos autores terem incluído crianças e adolescentes em um mesmo grupo, já que, na puberdade, as respostas do GH aos estímulos provocativos clássicos são maiores do que na infância (19).

No grupo de pacientes púberes, o mesmo estudo comparativo revelou que a média dos picos de liberação de GH foi menor (embora não estatisticamente significante) no teste da clonidina, o qual apresentou também incidência muito maior de resultados falso-negativos do que o ITT. A média dos picos pós-clonidina neste grupo foi também inferior à observada nas crianças pré-púberes, fato curioso levando-se em consideração que a puberdade geralmente está associada a respostas mais exacerbadas de GH (19). Não houve correlação entre a presença de resposta inadequada e a superfície corpórea ou sexo do paciente. A obesidade, freqüentemente associada a respostas subnormais de GH (73), não estava presente em nenhum paciente. A única hipótese proposta para explicar estes resultados é que a dose de clonidina, embora corrigida para a maior superfície corpórea apresentada pelos adolescentes, tenha sido insuficiente para provocar uma eficiente liberação de GH nestes pacientes, os quais necessitariam de quantidades da droga proporcionalmente maiores do que crianças. Esta possibilidade implicaria talvez em uma menor sensibilidade dos receptores α_2 -adrenérgicos centrais à clonidina na época da puberdade, contrariamente ao que ocorre com os de-

mais estímulos provocativos da secreção de GH.

Com relação aos efeitos colaterais, a sonolência e hipotensão observadas no teste da clonidina foram semelhantes às relatadas nos trabalhos em que a droga foi administrada nas doses de $0,035 \text{ mg/m}^2$ (12) ou $0,025 \text{ mg}$ (41). A redução dos níveis pressóricos foi, no entanto, inferior à observada com a dose de $0,15 \text{ mg/m}^2$ (23,39,62,66). Por outro lado, o ITT resultou em sintomas desagradáveis de hipoglicemia em todos os pacientes, não havendo, no entanto, perda de consciência em nenhum.

Conclui-se, pois, que o teste da clonidina deve ser preferencialmente realizado com a dose de $0,0375 \text{ mg/m}^2$ em crianças pré-púberes. Nesta dose, a eficiência de liberação de GH ainda é maior do que a do ITT, ao passo que os efeitos colaterais são muito mais discretos e menos perigosos do que os observados ou no teste realizado com $0,15 \text{ mg/m}^2$ ou no ITT. O teste da clonidina ($0,0375 \text{ mg/m}^2$) deve, portanto, ser considerado o teste provocativo de eleição para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário em crianças pré-púberes, que correspondem à maior parte dos pacientes que procuram o endocrinologista por baixa estatura.

Nos pacientes púberes, a clonidina, na dose de $0,0375 \text{ mg/m}^2$, é um agente liberador de GH muito menos potente do que o estímulo hipoglicêmico. Esta dose, portanto, deve ser utilizada apenas em teste complementar para excluir

deficiência de GH neste grupo ou, preferencialmente, deve ser substituída pela dose de 0,15 mg/m².

Finalmente, quando os resultados do teste da clonidina (0,0375 mg/m²) são associados aos do ITT, o diagnóstico de nanismo hipofisário pode ser estabelecido com segurança próxima a 100%, sugerindo que ambos devam ser realizados em pacientes com suspeita clínica desta patologia.

IX — CONCLUSÕES

- 1º) O teste da clonidina ($0,0375 \text{ mg/m}^2$) apresenta maior eficiência de liberação de GH e menor incidência de efeitos colaterais graves do que o ITT ($0,1 \text{ U/kg}$), devendo, portanto, ser considerado o teste provocativo de eleição para excluir o diagnóstico de nanismo hipofisário em crianças pré-púberes.
- 2º) Nos pacientes púberes, o teste da clonidina ($0,0375 \text{ mg/m}^2$) apresenta incidência muito maior de resultados falso-negativos do que o ITT ($0,1 \text{ U/kg}$), devendo, portanto, ser utilizado apenas como teste complementar para excluir deficiência de GH.
- 3º) Quando os resultados do teste da clonidina ($0,0375 \text{ mg/m}^2$) são associados aos do ITT ($0,1 \text{ U/kg}$), o diagnóstico de nanismo hipofisário pode ser estabelecido com segurança próxima a 100%, sugerindo que ambos devam ser realizados em pacientes com suspeita clínica desta patologia.

X — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, G. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocrinol., 75(Suppl. 183):1-42, 1974.
2. ABRAHAM, G.E. Solid phase radioimmunoassay of oestradiol, 17 β . J. Clin. Endocrinol., 29:866-70, 1969.
3. AMATO NETO, V. & CORRÊA, L.L. Exame parasitológico de fezes. São Paulo, Sarvier, 1980.
4. BROWN, B.A. Hematology: principles and procedures. 4ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1934.
5. CHAMBERS, J.W. & BROWN, G.M. Neurotransmitter regulation of growth hormone and ACTH in the rhesus monkey: effects of biogenic amines. Endocrinology, 98:420-8, 1976.
6. CHAPMAN, G.E.; RENWICK, A.G.C.; LIVESEY, J.H. The isolation of human pituitary hormones from frozen glands. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53:1008-13, 1981.

7. CHARD, T. Ammonium sulfate and polyethylene glycol as reagents to separate antigen from antigen-antibody complexes. Methods Enzimol., 70:280-90, 1980.
8. CHRAMBACH, J.M.; YADLEY, R.A.; BENDAVID, M.; RODBARD, D. Isohormones of human growth hormone. I. Characterization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrilamide gel. Endocrinology, 93:848-57, 1973.
9. CRYER, P.E. & DAUGHADAY, W.H. Growth hormone. In: MARTINI, L. & BESSER, G.M. eds. Clinical neuroendocrinology. New York, Academic, 1977. p.243-77.
10. D'ABRONZO, F.H. Receptores do hormônio de crescimento no fígado humano. São Paulo, 1985. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, USP).
11. DAMMACCO, F.; DAMMACCO, A.; CAVALLO, T.; BAFUNDI, N.; TORELLI, C.; FREZZA, E. Low oral dose of clonidine: an effective test of growth hormone reserve (letter). J. Pediatr., 103(3):501-2, 1983.
12. DAUGHADAY, W.H. The anterior pituitary. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. eds. 7ed. Williams textbook of endocrinology. Philadelphia, Saunders, 1985. p.563-613.

13. DELITALA, G.; MAIOLI, M.; PACIFICO, A.; BRIANDA, S.; PALERMO, M.; MANNELLI, M. Cholinergic receptor control mechanisms for L-dopa, apomorphine and clonidine-induced growth hormone secretion in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57:1145-9, 1983.
14. DESBUQUOIS, B. & AURBACH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormone in radioimmunoassay. J. Clin. Endocr., 33: 732-8, 1971.
15. EKINS, R.P. Theoretical aspects of saturation analysis. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. In vitro procedures of radioisotopes in medicine: proceedings of the symposium on..., held in Vienna, 8-12 September 1969. Vienna, 1970. p.325-53.
16. FRASER, N.C.; SETH, J.; BROWN, N.S. Clonidine is a better test for growth hormone deficiency than insulin hypoglycaemia. Arch. Dis. Child., 58:355-8, 1983.
17. FRASIER, S.D. A review of growth hormone stimulation tests in children. Pediatrics, 53(6):929-37, 1974.

18. FRASIER, S.D. The serum growth hormone response to hypoglycemia in dwarfism. J. Pediatr., 71:625-38, 1967.
19. FRASIER, S.D.; HILBURN, J.M.; SMITH JR, F.C. Effect of adolescence on the growth hormone response to hypoglycemia. J. Pediatr., 77:465-7, 1970.
20. FROHMAN, L. A.; ACETO JR., T.; MACGILLIVRAY, M.H. Studies of growth hormone secretion in children: normal, hypopituitary and constitutionally delayed. J. Clin. Endocrinol., 27:1409-17, 1967.
21. GAINES DAS, R.E. Calibration and assessment of standards - Problems encountered in the comparison of radioimmunoassay dose - response curves. In: HUNTER, W.M. & CORRIE, J.E.T. eds. Immunoassays for clinical chemistry. Edinburgh, Great Britain, Churchill Livingstone, 1983. p.632-9.
22. GANONG, W.F.; WISE, B.L.; REID, I.A.; HOLLAND, J.; KAPLAN, S.; SHACKELFORD, R.; BORYCZKA, A.T. Effect of spinal cord transection of the endocrine and blood pressure responses to intravenous clonidine. Neuroendocrinology, 25(2):105-10, 1978.

23. GIL-AD, I.; TOPPER, E.; LARON, Z. Oral clonidine as a growth hormone stimulation test. Lancet, 2:278-9, 1979.
24. GIL-AD, I.; TOPPER, E.; LARON, Z. Oral clonidine as a growth hormone stimulation test (letter). Lancet, 2:1242, 1979.
25. GOCKE, D.J.; GERTEN, M.S.; SHERWOOD, L.M.; LARAGH, J. H. Physiological and pathological variation of plasma angiotensin II in man. Correlation with renin activity and sodium balance. Circ. Res., 24/25(Suppl. 1):131-48, 1969.
26. GOLD, M.S.; DONABEDIAN, R.K.; REDMOND JR, D.E. Clonidine-induced increase in serum growth hormone: possible role of epinephrine-mediated synapses. Psychoneuroendocrinology, 3:187-94, 1978.
27. GREENWOOD, F.C. & HUNTER, W.M. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89:114-23, 1963.
28. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M.; MARRIAN, V.J. Growth-hormone levels in children and adolescents. Brit.

Med. J., 5374:25-6, 1964.

29. GREULICH, W.W. & PYLE, S.J. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Stanford, Stanford University, 1959.
30. THE HEALTH Services Human Growth Hormone Committee. Comparison of the intravenous insulin and oral clonidine tolerance tests for growth hormone secretion. Arch. Dis. Child., 56:852-4, 1981.
31. HENRY, R.J. Clinical chemistry: principles and techniques. New York, Harper & Row, 1964.
32. HO, K.Y.; EVANS, W.S.; THORNER, M.O. Disorders of prolactin and growth hormone secretion. Clin. Endocrinol. Metab., 14(1):1-32, 1985.
33. HUNTER, W.M. Optimization of RIA: some simple guidelines. In: HUNTER, W.M. & CORRIE, F.T. eds. Immunoassays for clinical chemistry. Edinburg, Great Britain, Churchill Livingstone, 1983. p.69-75.
34. ISAKSSON, O.G.P.; JANSSON, J-O; GANSE, I.A.M. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly.

Science, 216:1237-8, 1982.

35. KAPLAN, S.L.; ABRAMS, C.A.L.; BELL, J.J.; CONTE, F.A.; GRUMBACH, M.M. Growth and growth hormone. I. Changes in serum level of growth hormone following hypoglycemia in 134 children with growth retardation. Pediat. Res., 2:43-63, 1968.
36. KAPLAN, S.L.; ABRAMS, C.A.L.; BELL, J.J.; CONTE, F.A.; GRUMBACH, M.M. Serum growth hormone response to insulin induced hypoglycemia in disorders of growth. J. Pediatr., 67:956-9, 1965.
37. KOBINGER, W. Pharmacologic basis of the cardiovascular actions of clonidine. In: ONESTI, G.; KIM, K.E.; MOYER, J. eds. Hypertension: mechanisms and management. New York, Grune & Stratton, 1973. p.369.
38. LAL, S.; TOLIS, G.; MARTIN, J.B.; BROWN, G.M.; GUYDA, H. Effect of clonidine on growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone in the serum of normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41:827-32, 1975.

39. LANES, R.; HURTADO, E. Oral clonidine - An effective growth hormone releasing agent in prepubertal subjects. J. Pediatr., 100(5):710-4, 1982.
40. LANES, R.; RECKER, B.; FORT, P.; LIFSHITZ, F. Low-dose oral clonidine. Amer. J. Dis. Child., 139:87-8, 1985.
41. LARON, Z.; GIL-AD, I.; TOPPER, E.; KAUFMAN, H.; JOSEFS BERG, Z. Low oral dose of clonidine: an effective screening test for growth hormone deficiency. Acta Paediatr. Scand., 71:847-8, 1982.
42. LEWIS, U.J.; SINGH, R.N.; TUTWILER, G.F.; SIGEL, M.B.; VANDERLAAN, E.F.; VANDERLAAN, W.P. Human growth hormone: a complex of proteins. Recent Prog. Horm. Res., 36:477-508, 1980.
43. MANN, H.B. & WHITNEY, D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Ann. Math. Statist., 18:50-60, 1947.
44. MARTIN, R.C. The hypothalamus, hypophysis and thymus. In: MARTIN, R.C. Endocrine physiology. New York, Oxford University, 1985. p.815-85.

45. MARQUES, R.M.; MARCONDES, E.; BERQUÔ, E.; PRANI, R.; YUNES, J. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros. II. Altura e peso. São Paulo, Editora Brasileira de Ciências, 1982.
46. MARSHALL, W.A. Puberty. In: FALKNER, F. & TANNER, J. M. eds. Human growth. New York, Plenum, 1978. V.2, p.141-81.
47. MASSARANO, A.A. Clonidine and insulin tests for growth hormone deficiency (letter). Arch. Dis. Child., 60 (4):399, 1985.
48. MILNER, R.D.G. & BURNS, E.C. Investigation of suspected growth hormone deficiency. Arch. Dis. Child., 57: 944-7, 1982.
49. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracers determined by self-displacement: a re-evaluation. Clin. Chim. Acta, 73:213-6, 1976.
50. MUNRO, A.C.; CHAPMAN, R.S.; TEMPLETON, J.G.; FATORI, D. Production of primary antisera for radioimmunoassay. In: HUNTER, W.M. & CORRIE, J.E.T. eds. Immunoassays

for clinical chemistry. Edinburgh, Great Britain, Churchill Livingstone, 1983. p.447-55.

51. NAKASONE, A.; PUPO, A.A.; PIERONI, R.R. Radioimunoensaio com duplo anticorpo para dosagem de hormônio de crescimento humano no soro. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 22(1):29-33, 1978.
52. NERY, M. Avaliação da função pituitária anterior em pacientes com deficiência idiopática de hormônio de crescimento. São Paulo, 1983. (Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina, USP).
53. NICOLAU, W.; VILLARES, S.M.; CARDIA, G.; PALOMINO, A.; BILHARINHO, B.M.; BLOISE, W.; ASSIS, L.M.; MATTAR, E. Extração e purificação de hormônio de crescimento de hipófises congeladas humanas (hGH-HC). Arq. Bras. Endocrinol. Metabol., 28(4):83-6, 1984.
54. ODELL, W.; SKOWSKY, R.; ABRAHAM, G.; HESCOX, M.; FISCHER, D.; GROVER, P.K. Production of antisera for polypeptide and steroid radioimmunoassay. Biol. Reprod., 6:427-42, 1972.

55. ONESTI, G.; SCHWARTZ, A.B.; KIM, K.E.; SWARTZ, C.;
BREST, A.M. Pharmacodynamic effects of a new anti-
hypertensive drug, Catapress (STI55). Circulation,
39:219-28, 1969.
56. PARKER, M.L.; HAMMOND, J.M.; DAUGHADAY, W.H. The arginine
provocative test: an aid in the diagnosis of hypo-
somatotropism. J. Clin. Endocrinol., 27:1129-36,
1967.
57. PHILLIPS, L.S. & VASSIPOULOU-SELIN, R. Somatomedins.
New England J. Med., 302(7):371-80, 1980.
58. PREECE, M.A. Diagnosis and treatment of children with
growth hormone deficiency. Clin. Endocrinol. Metab.,
11(1):1-24, 1982.
59. RAITI, S.; DAVIS, W.T.; BLIZZARD, R.M. A comparison of
the effects of insulin hypoglycemia and arginine
infusion on release of human growth hormone. Lancet,
2:1182-3, 1967.
60. RODBARD, D. Quality control for RIA: Recommendations
for a minimal program. In: INTERNATIONAL ATOMIC
ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay and related procedures

in medicine: proceedings of the international symposium
in... held in Berlin from 31 October to 4 November,
1977. Vienna, 1978. V.2 p.21-36.

61. ROOBARD, D. & LEWALD, J.E. Computer analysis of radioligand assays and radioimmunoassay data. Acta Endocrinol., 64(Suppl. 147):79-103, 1970.
62. ROMER, T.E.; RYMKIEWICZ-KLUCZYNSKA, B.; BOGONIEWSKA, Z. Oral clonidine for screening of growth hormone deficiency. Pan. Med., 24:231-5, 1982.
63. ROMERO, F.M.; PALOMINO, A.A.; RUIZ-CABAL, J.E.; ORTEGA, J.C.; GUERRERO, F.R.; GARCIA, J.J.C. "Test" con clonidina oral como estímulo de la hormona del crecimiento. Anal. Esp. Pediatr., 14(4):254-8, 1981.
64. ROOT, A.W.; ROSENFELD, R.L.; BONGIOVANNI, A.M.; EBERLEIN, W.R. The plasma growth hormone response to insulin-induced hypoglycemia in children with retardation of growth. Pediatrics, 39:844-52, 1967.
65. ROULSTON, J.E. Validation of the self-displacement technique for estimation of specific radioactivity of radioimmunoassay tracers. Ann. Clin. Biochem.,

16:26-9, 1979.

66. SALTI, R.; GALLUZZI, F.; BECHERUCCI, P.; SEMINARA, S.; CALZOLARI, C.; INNOCENTI, S.; LA CAUZA, C. Oral clonidine: an effective provocative test of growth hormone release. Helv. Paediat. Acta, 36:527-31, 1981.
67. SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660-72, 1949.
68. SCHACTERLE, G.R. & POLLACK, R.L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic materials. Anal. Biochem., 51:654-5, 1973.
69. SCHMITT, H.; SCHMITT, H.; FENARD, S. Evidence for an alpha-sympathomimetic component in the effects of Catapresan on vasomotor centers: antagonism by piperoxan. Eur. J. Pharmacol., 14:98-100, 1971.
70. SIEGEL, S. Non parametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw-Hill, 1956. p.131-44.
71. SLOVER, R.H.; KLINGENSMITH, G.J.; GOTLIN, R.W.; RADCLIFFE, J. A comparison of clonidine and standard

- provocative agents of growth hormone. Amer. J. Dis. Child., 138:314-7, 1984.
72. STIMMLER, L. & BROWN, G.A. Growth hormone secretion provoked by insulin-induced hypoglycaemia in children of short stature. Arch. Dis. Child., 42:232-8, 1967.
73. TOPPER, E.; GIL-AD, I.; BAUMAN, B.; JOSEFSBERG, Z.; LARON, Z. Plasma growth hormone response to oral clonidine as compared to insulin hypoglycemia in obese children and adolescents. Horm. Metab. Res., 16(Supplement):127-30, 1984.
74. UNDERWOOD, L.E. & VAN WYK, J.J. Normal and aberrant growth. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. Williams textbook of endocrinology. 7ed. Philadelphia, Saunders, 1985. p.155-205.
75. UNDERWOOD, L.E.; D'ERCOLE, A.J.; VAN WYK, J.J. Somatomedin C and the assessment of growth. Pediatr. Clin. North Amer., 27:771-82, 1980.
76. VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr., 33:988-

91, 1971.

77. WESTPHAL, O. Growth hormone release during insulin tolerance test in normal children. Acta Paediat. Scand., 182(Suppl.):39-42, 1968.
78. YALOW, R.S. & BERSON, S.A. General aspects of radio-immunoassay procedures. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. In vitro procedures with radioisotopes in medicine: proceedings of a symposium on..., held in Vienna, 8-12 September, 1969. Vienna, 1970. p.455-79.