



CNEN/SP

ipen **Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares**

GOVERNO DO BRASIL

**PADRONIZAÇÃO DA DOSAGEM DE DIIDROTESTOSTERONA POR
RADIOIMUNOENSAIO APÓS CROMATOGRAFIA EM COLUNA
DE CELITE**

Valéria Samuel LANDO Berenice Bilharrho de MENDONÇA e Wilton NICOLAU

IPEN-Pub-382

JANEIRO/1993

SÃO PAULO

**PADRONIZAÇÃO DA DOSAGEM DE DIIDROTESTOSTERONA POR
RADIOIMUNOENSAIO APÓS CROMATOGRAFIA EM
COLUNA DE CELITE**

Valéria Samuel LANDO Berenice Bilharinho de MENDONÇA e Wilian NICOLAU

DIVISÃO DE INTERCÂMBIO E COOPERAÇÃO TÉCNICA

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

INIS Categories and Descriptors

C62 00

TESTOSTERONE
RADIOIMMUNOASSAY
STANDARDIZATION
EXTRACTION COLUMNS
CHROMATOGRAPHY

IPEN Doc-4533

Aprovado para publicação em 19/10/92

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es)

**PADRONIZAÇÃO DO MODO DE DE DIIDROTESTOSTERONA POR RADIOIMU-
NOENSAIO APOS CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CELITE ***

Valéria Samuel LAFERRE - Bióloga - Hospital do de MINIONÇA,
WILLIAM NEOLAU

COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - CN
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEÁRES
Caixa Postal 11049 - Emborós
05392 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

Padronizamos o metodo de dosagem de diidrotestosterona apos cromatografia. Um mililitro de soro contendo 1000 contagens por minuto de diidrotestosterona triciada foi extraída com hexano acetato de etila (2/3) seco diluido com isooctana não saturada e aplicado na coluna previamente lavada com 3,5 ml de isooctana pura (1) soro foi eluido da coluna com isooctana pura (3,5ml) seguida de isooctana com acetato de etila a 5%. A recuperacao da diidrotestosterona triciada variou de 50% a 80% em todos os ensaios. A sensibilidade do metodo foi de 4 ng/dl e a variacao intratensao foi menor que 9% e a inter-ensao menor que 9,7%. Dosamos a diidrotestosterona e testosterona para avaliarmos a relacao testosterona/diidrotestosterona nos seguintes grupos: GRUPO I - Quarenta e um individuos adultos normais em condicoes basais com idade cronologica de 19 a 40 anos e obtivemos valores de diidrotestosterona de $49,3 \pm 23,5$ ng/dl e de testosterona foi de 521 ± 132 ng/dl e da relacao testosterona/diidrotestosterona de $12,4 \pm 5,4$. GRUPO II - Seis homens adultos normais com idade cronologica entre 21 e 39 anos avaliados em condicoes basais e apos estimulo

(*) Trabalho realizado em colaboracao com o Laboratorio de Pesquisa de 1ª Clinica Medica do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP

- 1- Biologista do lab. de pesquisas do Hospital das Clinicas e aluna do curso de pos-graduacao do IPEN
- 2- Profa. Dra. Livre-Docente do Hospital das Clinicas da USP atuante na area de endocrinologia clinica e laboratorial
- 3- Pro. Dr. Livre-Docente do Hospital das Clinicas da USP e orientador do curso de pos-graduacao do IPEN

com 6000 Unidades Internacionais de Gonadotrofina Coriônica humana tiveram como resultado de diidrotestosterona de 44.2 ± 10.2 ng/dl e 68.5 ± 22.2 ng/dl respectivamente testosterona de 610 ± 200 ng/dl para basais e 1277 ± 562 ng/dl após estímulo. A relação testosterona/diidrotestosterona foi de 14.6 ± 5.6 e 18.7 ± 7.9 respectivamente GRUPO III Seis crianças pre-pubescentes com idade de 2 a 7 anos obtiveram valores de testosterona em condições basais (18.0 ng/dl) abaixo da sensibilidade do método e após estímulo 411 ± 143 ng/dl. Os valores em condições basais foram também abaixo da sensibilidade do método (4.0 ng/dl) e após estímulo com hCG de 29.9 ± 8.0 ng/dl. A relação testosterona/diidrotestosterona no basal não foi possível detectarmos, mas após estímulo foi de 15.0 ± 2.6 . GRUPO IV Oito pacientes com idade cronológica entre 13 e 33 anos com pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase em condições basais e após estímulo. Os valores de diidrotestosterona encontrados foram 12.5 ± 6.3 ng/dl e 20.5 ± 8.4 ng/dl respectivamente e da testosterona de 482 ± 112 ng/dl em condição basal e 1296.7 ± 257.9 ng/dl após estímulo. A relação testosterona/diidrotestosterona foi de 42.7 ± 18.9 nos basais e 64 ± 20 ng/dl após estímulo. A relação testosterona/diidrotestosterona foi capaz de diagnosticar os pacientes adultos com pseudohermafroditismo masculino por deficiência de 5-alfa-redutase tanto em condições basais como após estímulo. Concluímos que a dosagem de diidrotestosterona após cromatografia em coluna de celite e um método de baixo custo de fácil execução e que foi capaz de identificar pacientes portadores de pseudohermafroditismo masculino por deficiência de 5-alfa-redutase. Neste trabalho determinamos os valores normais para adultos e crianças que poderá servir como referência do método.

STANDARDIZATION OF THE MEASUREMENT OF DIHYDROTESTOSTERONE
BY RADIODIMUNOASSAY AFTER CELITE COLUMN CHROMATOGRAPHY

Valeria Samuel LANDO Berenice Bilharinho de MENDONÇA ,
Willian NICOLAU

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros

SUMMARY

We developed a method for measuring dihydrotestosterone after previous chromatography. One ml of serum containing 1000 cpm of tritiated dihydrotestosterone was extracted with hexane-ethylacetate (2/3), dried, diluted with non saturated isooctane and injected in the column previously washed with 3.5ml of pure isooctane. The serum was eluted from the column with pure isooctane (3.5ml) followed by 5% ethylacetate in isooctane. The quantity of tritiated dihydrotestosterone which was recovered 50% and 80% in all assays. The sensitivity of the method was 4 ng/dl, the intra-assay variation was 9% and the inter-assay variation was 9.7%. We measured dihydrotestosterone e testosterone and testosterone/dihydrotestosterone ratio in the following groups: GROUP 1: Forty one normal adult subjects in basal conditions with chronological age varying from 19 to 40 years old. We obtained dihydrotestosterone values 49.3 ± 23.5 ng/dl and testosterone values of 521 ± 132 ng/dl and testosterone/dihydrotestosterone ratio was 12.6 ± 5.3 . GROUP 11: Six normal adult subjects with chronological age between 21 and 33 years old, evaluated in basal conditions and after stimulus with 6000 UI of human Chorionic Gonadotrofin.

(*) Work performed in collaborations with the "Laboratório de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - São Paulo - Brazil

- 1- Biologist of laboratory of research of Hospital das Clínicas da USP and student of IPEN
- 2- MD Assistant Professor of Medicine, Division of Endocrinology of Hospital das Clínicas da FMUSP
- 3- MD Postdoctoral Research Endocrinologist, Professor of Facul. of Medicine of USP and Supervisor of Course of Post-Graduation of IPEN

We obtained dihydrotestosterone values of 44.2 ± 10.2 ng/dl and 68.5 ± 22.2 ng/dl respectively and T values of 610 ± 200 ng/dl for basal and 1277 ± 562 ng/dl after stimulus. The basal testosterone/dihydrotestosterone ratio was 14.6 ± 5.6 and after stimulus the ratio was 18.6 ± 7.9 . GRUPO III Seven pre-puberal children with chronological age varying from 2 to 7 years old. We obtained testosterone values in basal conditions below the method sensitivity (<8 ng/dl) and after stimulus we obtained 411 ± 143 ng/dl. The values in basal conditions were below the sensitivity of the method (<4 ng/dl) and after stimulus we obtained 29.9 ± 8.0 ng/dl. It was not possible to determine the basal testosterone/dihydrotestosterone ratio but after stimulus was 15.0 ± 2.6 . GRUPO IV Eight patients with chronological age varying from 13 to 33 years old with male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency in basal conditions and after stimulus. We obtained the dihydrotestosterone values of 12.5 ± 6.3 ng/dl and 20.5 ± 8.4 ng/dl respectively and testosterone values of 482 ± 112 ng/dl for basal and 1296 ± 257 ng/dl after stimulus. The basal testosterone/dihydrotestosterone ratio was 42.7 ± 18.9 and 64 ± 20 ng/dl after stimulus. The testosterone/dihydrotestosterone ratio was able to diagnose patients with male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency in adults in basal conditions as well as after stimulus with hCG. We conclude that the measurement of dihydrotestosterone in celite column chromatography is an affordable easy-to-perform method which we able to identify patients with male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency. We have established the normal values for adults and children in this work and these values will be useful as a reference for the method.

INTRODUÇÃO

As células intersticiais do testículo (células de Leydig) sob estímulo dos hormônios luteinizante (LH) e gonadotrofina coriônica (hCG) secretam os esteróides sexuais representados principalmente pela testosterona (T) (1,2) que por sua vez é convertida em diidrotestosterona (DHT) através da enzima 5-alfa-redutase presente nos tecidos (13,14).

A secreção de T inicia-se na oitava semana de vida intrauterina. Nesta fase a testosterona é responsável pela diferenciação sexual do hipotálamo, dos ductos de Wolff (vaso deferente, epididimo e vesícula seminal) e a virilização da genitália interna, externa e prostata.

A DHT se liga aos receptores androgênicos com mais alta afinidade do que a T (3) em tecidos específicos e é encontrada em concentrações mais altas na prostata (4,5), na pele e nos folículos pilosos onde a atividade da enzima 5-alfa-redutase é alta (3,5,6,7,8).

A importância da DHT como um androgênio responsável pela diferenciação do feto masculino em seres humanos foi confirmada pela descrição de pacientes com deficiência de 5-alfa-redutase (9). Estes pacientes apresentam ao nascimento genitália externa ambígua caracterizada por hiposspadia perineal, microfalo, bolsa escrotal bifida, testículos, epididimo, vaso deferente, vesícula seminal normais e próstata pouco desenvolvida. Estes indivíduos tem níveis séricos normais de T e baixo de DHT.

A dosagem de DHT por radioimunoensaio é raramente realizada e a maioria dos anticorpos existentes apresentam grande reação cruzada com a testosterona cuja concentração plasmática em adultos pe de 5 a 16 vezes os níveis de DHT.

Para o diagnóstico da deficiência da 5-alfa-redutase é fundamental a dosagem da DHT isoladamente para termos uma relação T/DHT que confirme o diagnóstico.

O objetivo deste trabalho é padronizar um método de dosagem de DHT confiável, reprodutível e preciso que determine a concentração real de DHT. Conforme mencionado acima a obtenção desta concentração real é muito importante uma vez que em nosso meio os métodos empregados nas dosagens de DHT medem também a T o que invalida a relação T/DHT para diagnóstico da deficiência da 5-alfa-redutase.

PROCEDIMENTO

1 - Obtenção das amostras de soro ou plasma

Para a determinação de DHT, as amostras foram obtidas dos diferentes indivíduos após jejum de uma noite e em condições basais e após estímulo com hCG. O sangue foi colhido em tubos heparinizados (10 unidades/ml) ou não, sendo colocados a temperatura ambiente até retrair o coágulo e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. Os soros ou plasma assim obtidos foram estocados a -20°C para posterior dosagem.

2 - PREPARO DO TRACADOR

Purificação da DHT marcada

A DHT tetratriclada foi adquirida da Amersham International plc (England) código TRK 395 (5 ALPHADIHI-DRO[1 ALPHA, 2 ALPHA(N)-H3]TESTOSTERONA em frascos contendo 250 microCurie (9,25 MegaBq) com o nome de 5 ALHDIHI-DRO[1 ALPHA 2 ALPHA (N)-H3]TESTOSTERONA diluída em solução tolueno/etanol (3/2) com atividade específica de 50-60 Ci/mM. Devido sua longa vida média (12 anos) o trício tem a vantagem de poder ser utilizado nos ensaios por longo período. Seus limitantes de uso são a radiólise sofrida na ligação do hormônio-marcado, impurezas que eventualmente se alojam na solução devido o manuseio constante ou efeito de variação de temperatura e quebra da molécula do esteroide em questão.

Para evitar que estes efeitos afetem o ensaio, purifica-se o marcado em coluna de celite a cada 6 meses. Ao frasco original contendo 250 μl de solução tolueno/etanol (9/1) e acrescentado 5 ml da mesma mistura, 0,5 ml da DHT triciada em e seca em capela e resuspendida com 1 ml de isoctana pura e aplicada na coluna. Quando todo o volume aplicado estiver passado colocamos 5 ml de isoctana pura e em seguida 5 ml de isoctana e acetato de etila à 5% que posteriormente é seca e resuspendida com álcool etílico absoluto (0,5 ml) e colesterol (0,05 ml). Essa solução é estocada a -20°C e uma pequena parte (0,02 ml) é diluída em tampão fosfato o suficiente para se obter 5000 cpm em 0,1 ml a ser utilizado no ensaio.

3 - TITULAÇÃO DO ANTISORO

O antisoro liofilizado de procedência Radioassay Systems Laboratories Inc (fornecido em frascos contendo 1ml do antisoro - suficiente para 1000 tubos), é resuspendido com 1ml de tampão do ensaio e alíquotado em tubos de 0,1ml e congelado. Uma dessas alíquotas é diluída com 5ml de tampão do ensaio seguido de diluições seriadas 1/50, 1/100, 1/150 e 1/200 para determinar qual dessas diluições é capaz de ligar 50% do hormônio marcado (40).

Especificidade do antisoro utilizado na dosagem de
DHT lote R-140 - 3

ESTEROIDE	% REAÇÃO CRUZADA
5 - alfa-dihidrotestosterona	100 00
Testosterona	7 78
5-beta-dihidrotestosterona	1 45
6-beta-dihidrotestosterona	1 95
Androstenediona	0 42
6-alfa-androstane-3 17-diona	2 92
Epiandrosterona	0 77
Progesterona	0 00
Estrona	0 00
Estradiol	0 00
Estriol	0 00

4 - EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Antes de submetermos a amostra ao radioimunoensaio, devemos fazer uma extração previa do soro para separarmos os esteroides das proteínas e lipídeos que interferem com o sistema de contagem líquida. A extração foi feita com hexana acetato de etila na proporção (2/3) num volume dez vezes superior ao da amostra.

Utilizamos o solvente hexana acetato de etila pela pouca polaridade dessa solução fazendo com que os hormônios mais polares tal como androstenediona permaneça no plasma que é descartado junto com proteínas e lipídeos após seu congelamento.

5- RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO

Para controle da extração dos esteroides 0,1 ml do marcado contendo 1000 cpm foi colocada em contato com a amostra durante 30 minutos para atingir o equilíbrio. Adicionando após o líquido extrator e agitado no vortex por 1 - 2 minutos. Após 10 minutos em repouso as amostras foram congeladas (ou com gelo seco ou colocadas a -20°C por 6 a 12 horas). A seguir o sobrenadante foi transferido para outro frasco onde foi evaporado. Depois de seco o extrato é diluído em isoctana pura ao invés de diluí-lo em isoctana saturada com etileno glicol como no método original de Abraham (10).

Esta modificação foi introduzida pelo fato de termos obtido baixas porcentagens de recuperação % quando utilizamos isoctana saturada (30 ± 10). Verificamos que a umidade relativa do ar em nosso meio oscila entre 70 a 80% enquanto que na Califórnia onde o método foi desenvolvido é de 20 a 40%. Passamos então a transferir o extrato seco com isoctana, pura na tentativa de manter as condições de polaridade ideal e observamos uma melhora significativa da % de recuperação. ($70 \pm 10\%$)

6 - PREPARO DA CURVA PADRÃO

O padrão 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3one fornecido pela Sigma Chemical Company de numero A-8183 foi preparado uma vez por ano e estocado em concentrações diferentes 1ug/ml (solução uso) e 10ug/ml (solução estoque) a -20°C . A curva padrão foi obtida utilizando as diluições abaixo:

Solução I 50ul da sol 1ug/ml + 5ml de tampão(5000pg/tubo)
Solução A 1 0ml de sol I + 4 0ml de tampão(1000pg/tubo)
Solução B 2 5ml de sol A + 2 5ml de tampão(500pg/tubo)
Solução C 2 5ml de sol B + 2,5ml de tampão(250pg/tubo)
Solução D 2 0ml de sol C + 3 0ml de tampão(100pg/tubo)
Solução E 2 5ml de sol D + 2 5ml de tampão(50pg/tubo)
Solução F 2 5ml de sol E + 2 5ml de tampão(25pg/tubo)
Solução G 2 0ml de sol F + 3 0ml de tampão(10pg/tubo)
Solução H 2 5ml de sol G + 2,5ml de tampão(5pg/tubo)

Estas soluções podem ser estocadas por 4 semanas quando mantidas na geladeira a 4°C .

Cada solução de A a H, é usada num volume de 0,5ml, em duplicata para cada ensaio a ser realizado.

O mesmo procedimento é feito para testosterona de padrão também Sigma de numero 1500.

7 - PREPARAÇÃO DA COLUNA DE CELITE

Utilizamos microcolunas de celite pelas seguintes razões são fáceis de preparar são de baixo custo e o celite tem alto poder de resolução

A técnica de cromatografia em celite baseou-se no sistema I do método descrito por Abraham (10) Após permanecer 18 horas em mufla a 800C o celite foi misturado com etileno glicol(2:1) isto é 20g de celite são misturados com 10ml de etileno-glicol

O aquecimento é importante para a combustão de componentes orgânicos que possam interferir no ensaio e remover a água do próprio celite que varia de acordo com a umidade do ar interferindo também com a polaridade da fase estacionária alterando significativamente a recuperação do hormônio na coluna

Utilizamos pipetas de vidro de 5 ml (Vidrolabor) que são usadas para empacotar o celite depois de cortada a parte superior da pipeta em 5cm. Por intermédio de um micro funil introduzimos o celite para dentro da pipeta e com um bastão forçamos o conteúdo compactando o celite dentro da coluna. Enchemos novamente a pipeta até a marca zero e com leves toques ajustamos a massa interna socando com o bastão o celite até que se estabeleça na marca 4.5 da pipeta. Sempre em posição vertical lavamos a coluna 2 vezes com 3.5 ml de isoootana pura sob pressão de nitrogênio podendo ser estocadas a temperatura ambiente em isoootana por uma semana antes do uso

8 - PREPARAÇÃO DOS CONTROLES

Os ensaios foram realizados em duplicata com os tubos controles amostras de soro com concentração média e baixa (pools) NSB (não específico) e tubo zero (não contém antígeno frio ou tubo de ligação máxima)

Os pools foram preparados do seguinte modo 500 ml de plasma fornecido pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP foi tratado com carvão dextran para retirar todos os hormônios contido no plasma. Separamos 250 ml do plasma onde colocamos concentração média de padrão do hormônio (100ng para DHT e 600ng para T) e nos restante (250 ml) colocamos baixa concentração (10ng tanto para T como para DHT) Esses pools médio e baixo foram aliqotados e armazenados em freezer para serem utilizados sempre que necessário

Com os controles determinamos o coeficiente de variação intra e inter ensaio tomando a variação correspondente a média e os desvios padrões de 5 ensaios como critério de aceitação do ensaio

ENSAIO DE DHT

O primeiro passo para se dosar DHT foi a obtenção de 1ml de soro ou plasma após centrifugação, colocado durante 30 minutos em contato com 0,1 ml de DHT marcado (1000cpm). Ao fim deste adicionamos 10 ml de líquido extrator e agitamos em agitador de tubos tipo Vortex durante 1 minuto e deixamos em repouso durante 10 minutos para que ocorra a separação das duas fases (soro/extrator). Em seguida congelamos e decantamos o sobrenadante em frascos de secagem onde foi evaporado e resuspendido com 1,0 ml de isoctana pura e aplicada na coluna de celite pre-montada. A eluição foi efetuada sob pressão de nitrogênio (6 libras) com velocidade de 10 a 12 gotas/minuto. Após a passagem da amostra lavou-se o frasco com 0,5 ml de isoctana pura que também foi transferido para a coluna. Sem deixar secar o celite de dentro da coluna adicionou-se 3,5 ml de isoctana pura que é descartada. Em seguida colocamos 3,5 ml de acetato de etila a 5% em isoctana fase em que obtemos o DHT. Esta amostra foi recolhida da coluna em frascos evaporada para ser resuspendida com 2 ml do tampão do ensaio sendo depois incubada em banho-maria a 37°C antes de ser ensaiada.

O radioimunoensaio propriamente dito, é constituído de curva padrão (como mencionado no item 6 - Procedimentos) tubos NSB onde colocamos 0,6 ml de tampão do ensaio tubos zero com 0,5 ml de tampão e as amostras (todos os tubos foram ensaiados em duplicata).

As amostras contendo 2,0 ml de tampão foram agitadas no vortex para resuspende o extrato seco sendo que 0,5 ml destas amostra foram colocadas em vials contendo líquido de cintilação para futuro cálculo da % de recuperação. 0,5 ml em duplicata foram pipetados em tubos de ensaio de vidro que acompanharam os controles e a curva padrão. A quantidade de 0,1 ml de antisoro anti-DHT é pipetada em todos os tubos seguido de 0,1 ml de DHT-triciada (5000cpm/0,1 ml) que foram incubados na geladeira por 24hs. Após este período separamos as frações livre da ligada com 0,2 ml de carvão dextran que foi mantida sob agitação a 4°C. Após a agitação dos tubos seguida de repouso por 20 minutos a 4°C procedeu-se a centrifugação por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 3000rpm.

O sobrenadante foi decantado diretamente no frasco de cintilação contendo 5 ml de líquido de cintilação e após as contagens o cálculo foi efetuado com auxílio de computador acoplado ao contador Beckman (ou poderia se feito através de programa de Radioimunoensaio em Calculadora HP-97).

ENSAIO DE TESTOSTERONA.

As dosagens de testosterona foram realizadas por radioimunoensaio onde utilizamos como marcador a testosterona marcada com trício.

As amostras de soro ou plasma foram extraídas com o mesmo líquido extrator utilizado para a dosagem de DHT. Em homens normais utilizamos 0,5 ml de soro e em crianças 0,5 ml de soro que foram extraídas com 5 ml do líquido extrator através de agitação em vortex durante 1 minuto cada amostra. Após 10 minutos em repouso as amostras foram congeladas e em seguida decantadas em frasco de secagem.

Depois de evaporadas foram resuspensas com 2 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (o mesmo do DHT) agitadas em vortex e deixadas em banho-maria 37°C por 30 minutos.

A curva padrão foi realizada da mesma maneira que descrito para DHT, só que neste caso utilizamos o padrão de 1 (µg) para a confecção da curva padrão.

O ensaio foi realizado utilizando 0,5 ml de cada ponto da diluição da curva e 0,5 ml de cada extrato resuspenso em tampão, além de 0,6 ml de tampão nos tubos NSB e 0,5 ml de tampão nos tubos zeros sempre realizados em duplicata.

Em seguida colocamos 0,1 ml de antisoro antitestosterona (21) seguido de 0,1 ml de testosterona triciada (5000cpm/0,1ml). Agitamos os tubos e incubamos a 4°C por 18 a 24 horas. Como método de separação empregamos a solução de carvão-dextran mantida em agitação a 4°C durante a pipetagem. Desta solução 0,2 ml foram pipetados em todos os tubos menos nos totais e após agitação seguida de repouso por 20 minutos a 4°C procedeu-se a centrifugação por 20 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi decantado diretamente no frasco de contagem que contém 5 ml de líquido de cintilação.

O método de cálculo utilizado baseou-se num programa que acompanha a calculadora HP-97. As correções foram feitas tendo base para a extração no volume utilizado para o ensaio.

PARÂMETROS RELATIVOS AOS ENSAIOS DE DHT E TESTO

Os ensaios foram analisados em computador PC utilizando o programa RIAKALK desenvolvido em linguagem Basic, na Unidade de Diabetes e Adrenal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que além dos resultados parciais de DHT nos forneceu vários parâmetros de controle de 5 ensaios como mostra a tabela abaixo

Dados obtidos dos ensaios de DHT (ng/dl)

Ensaio	1	2	3	4	5
C L %	34,5	51,2	47,2	37,1	48,2
NSB/	1,3	1,7	2,0	1,5	2,2
MDDng/dl	4,3	4,1	4,3	4,2	4,3
P M	134 ± 6,4	127 ± 6,4	125 ± 5,7	138 ± 4,2	130 ± 12
C V _i	4,8%	5,0%	4,6%	3,0%	9,0%
C V _e (media ± DP)	5,28 ± 2,2				
P B	21 ± 1,3%	25 ± 2,0%	26 ± 2,0%	27 ± 1,7%	28 ± 1,6%
C V _e	6,2%	8,0%	7,7%	6,3%	5,7%
C V _i (media ± DP)	6,7 ± 1,0				

Dados obtidos nos ensaios de T

Ensaio	1	2	3	4	5
C L %	46,0	52,0	47,0	50,0	49,0
NSB %	1,7	1,8	1,9	1,3	5,0
MDD	7,8	8,8	8,1	8,6	8,0
P M	220 ± 16,9	215 ± 14	210 ± 12	240 ± 9,9	250 ± 15
C V _i	7,7%	6,5%	5,7%	4,0%	6,4%
C V _e	6,0 ± 1,35%				
P B	64 ± 4,4	67 ± 6,5	63 ± 6,4	62 ± 5,2	65 ± 3,6
C V _i	6,9%	9,7%	10%	8,4%	5,5%
C V _e	8,1 ± 1,9				

C L = Capacidade de ligação (antígeno e anticorpo)

NSB = % ligação não específica

MDD = Mínima dose detectável (sensibilidade)

C V_i = Coeficiente de variação intra-ensaio

C V_e = Coeficiente de variação inter-ensaio

P M = Pools médios

P B = Pools baixos

RESULTADOS

Comparando os resultados das dosagens de DHT com coluna e sem coluna (Tabela 1) observamos que os valores com coluna foram significativamente menores dos que os sem coluna ($31,6 \pm 21,1$ contra $89,8 \pm 47,7$). A análise estatística do teste T pareado entre esses dois grupos (com e sem coluna) mostrou haver estatisticamente diferença significativa $p < 0,05$.

Valores basais

Homens adultos Em relação aos níveis de testosterona observamos que os níveis de DHT s/col em valores baixos de testosterona (50ng/dl) eram maiores que os valores da própria testosterona em alguns casos sugerindo a presença de substâncias interferentes.

Apartir desta constatação utilizamos apenas o ensaio de DHT após cromatografia para determinar os valores normais do método.

Os valores basais de teste e DHT de um grupo de homens adultos normais se encontram na Tabela 3 e são: estes valores de teste de $521 \pm 132\text{ng/dl}$ e de DHT $49,3 \pm 23,5$ e relação T/DHT $12,6 \pm 5,3$.

Teste com hCG

Homens adultos Como podemos observar na Tabela 3 os valores basais de Teste foram de $610 \pm 200\text{ng/dl}$ e após hCG e de 1276 ± 569 de DHT os valores basais foram $44,2 \pm 10,2\text{ng/dl}$, após hCG de $68,5 \pm 22,2\text{ng/dl}$. Notamos que houve um aumento da relação T/DHT após estímulo de hCG com valores basais de $14,6 \pm 5,6$ e pós-hCG de $18,6 \pm 7,9$.

Em crianças pré-púberes (Tabela 4) observamos valores baixos de T e DHT indicativos da não atividade das células de Leydig característica desta faixa etária. Entretanto após estímulo com hCG observamos um incremento de T ($437 \pm 136\text{ng/dl}$) e DHT ($29,8 \pm 8,1\text{ng/dl}$) e da relação T/DHT variou de $15,0 \pm 2,6\text{ng/dl}$.

Os pacientes com PHM tiveram seu diagnóstico de deficiência da 5-alfa-redutase já sugerido pelos dados clínicos confirmados pela determinação dos metabolitos beta reduzidos através da cromatografia a gás. Todos os pacientes apresentaram níveis > 4 sendo o normal < 3 indicativo de deficiência da atividade da 5-alfa-redutase. Como podemos observar na Tabela 5 os valores de T estão ligeiramente diminuídos ($482 \pm 112,4\text{ng/dl}$) mesmo após estímulo ($1206,7 \pm 257,9\text{ng/dl}$) os valores basais de DHT o que era esperado estão abaixo do normal ($12,5 \pm 6,3\text{ng/dl}$) mesmo após estímulo ($20,5 \pm 8,4\text{ng/dl}$) e finalizando a relação T/DHT ficou bem acima do normal ($42,7 \pm 10,9$) também após hCG ($64 \pm 20\text{ng/dl}$), fechando o diagnóstico.

TABELA 1

COMPARAÇÃO DE VALORES DE TESTO E VALORES DE DHT
REALIZADO COM E SEM CROMATOGRAFIA

Individuos controles	Testo ng/dl	DHT (ng/dl)	
		c/coluna	s/coluna
01	08 0	04 0	36 3
02	09 0	05 3	36 8
03	19 8	14 0	17 7
04	49 9	11 5	39 5
05	50 5	04 4	47 3
06	56 6	04 0	37 6
07	66 8	12 4	22 0
08	74 0	22 0	52 4
09	90 2	16 8	37 5
10	112 0	19 2	57 4
11	138 9	18 5	73 1
12	148 0	11 0	64 4
13	330 0	22 4	78 9
14	330 0	27 8	94 4
15	350 0	19 7	101 3
16	366 0	22 8	61 0
17	410 0	57 3	140 0
18	420 0	40 9	40 9
19	420 0	45 5	146 1
20	472 0	21 5	74 3
21	475 0	36 3	92 4
22	510 0	28 9	129 4
23	510 0	40 9	116 0
24	515 0	42 0	114 0
25	517 0	37 7	137 5
26	600 0	65 6	142 8
27	605 0	44 4	171 0
28	630 0	56 3	172 3
29	630 0	70 5	165 4
30	645 0	40 0	117 9
31	930 0	79 9	172 0
32	945 0	67 5	083 6
Media	357 3	31 6	89 8
±	±	±	±
D P	265 5	21 1	47 7

TABELA 2

VALORES BASAIS DE TESTO DHT E RELAÇÃO T/DHT
DE INDIVÍDUOS NORMAIS

Indivíduos	I C	TESTO (ng/dl)	DHT(ng/dl)	T/DHT
01	36	475	36 3	13 1
02	24	930	79 9	11 6
03	34	330	22 4	14 7
04	31	645	40 0	16 0
05	19	517	37 7	13 7
06	25	510	40 9	12 5
07	26	410	57 3	07 1
08	33	605	44 4	13 6
09	32	472	21 5	21 9
10	34	630	70 5	08 9
11	22	420	40 9	10 2
12	25	330	27 8	11 8
13	30	515	50 3	10 2
14	35	630	56 3	11 2
15	40	350	19 7	17 7
16	36	510	28 9	17 6
17	34	230	24 9	09 2
18	26	570	80 3	07 1
19	30	634	74 6	08 5
20	26	556	93 7	05 9
21	28	716	63 7	11 2
22	29	429	59 7	07 2
23	27	572	74 2	07 7
24	31	617	77 9	08 2
25	26	516	70 9	07 4
26	27	535	66 6	08 0
27	26	629	59 7	10 5
28	25	536	93 0	05 8
29	30	653	104 0	06 3
30	27	342	50 5	06 8
31	24	329	22 1	14 9
32	25	524	18 6	28 1
33	25	545	23 2	23 5
34	24	570	28 2	20 2
35	26	503	35 5	14 8
36	25	722	40 0	18 1
37	26	508	29 9	16 9
38	25	410	19 3	21 2
39	24	385	24 5	15 6
40	31	420	45 5	15 6
41	27	600	65 5	09 2
Media ±		521 ±	49 5 ±	12 7 ±
D P		132	23 6	5 3

* I C = Idade cronológica

TABELA 3

VALORES DE DHT, TESTO E CORRELAÇÃO T/DHT EM HOMENS
ADULTOS PRÉ E PÓS hCG

INDIVÍDUO	I C	TESTO (ng/dl)		DHT (ng/dl)		T/DHT	
		Basal	Pico*	Basal	Pico	Basal	Pico*
1	26	410	702	57	79	7,2	8,9
2	33	554	1180	27	41	20,5	21,0
3	23	556	1589	44	82	12,6	19,0
4	26	441	638	47	58	9,4	11,0
5	28	775	2123	40	100	19,4	21,3
6	21	925	1425	50	51	18,5	31,0
MEDIA ±		610	1276	44,2	68,5	14,6	18,6
DP		200	563	10,2	22,2	5,6	7,9

* Após hCG (6000 UI dose única)
I C = Idade Cronológica em anos

TABELA 4

VALORES DE DHT, TESTO E CORRELAÇÃO T/DHT EM CRIANÇAS
PRÉ-PUBERES EM CONDIÇÃO BASAL E PÓS-hCG

INDIVÍDUO	I C	TESTO (ng/dl)		DHT (ng/dl)		T/DHT	
		Basal	Pico*	Basal	Pico*	Basal	Pico*
1	2,3	68,0	411	4,0	32	--	12,8
2	5,8	68,0	283	4,0	24,5	--	11,3
3	3,5	68,0	683	4,0	43	--	15,8
4	7,0	6,7	354	4,0	19	--	18,6
5	2,0	6,9	427	4,0	32	--	15,2
6	3,0	14,2	465	4,0	28	--	16,3
MEDIA ±	=	--	437 ±	--	29,9 ±	--	15,0 ±
DP	=	--	136	--	8,0	--	2,6

* Após hCG (100U/Kg por dose x 4 doses)
I C = Idade Cronológica em anos

TABELA 5

VALORES DE DHT, T E RELAÇÃO T/DHT DE PACIENTES COM PSEUDOPERMA-
FRIDITISMO MASCULINO POR DEFICIÊNCIA DE 5 ALFA REDUTASE

Individuo	TESTO(ng/dl)		DHT c/col(ng/dl)		T/DHT	
	Basal	Pico*	Basal	Pico*	Basal	Pico*
01	476	1366	19	35	25	38
02	443	1029	11	18	40	57
03	666	1500	24	30	27	50
04	559	1453	14	16	39	91
05	443	1288	09	24	34	54
06	575	1180	10	17	57	69
07	362	708	09	12	37	59
08	332	1130	04	12	83	94
=====						
MEDIA	482	1206,7	12,5	20,5	42,7	64
±	±	±	±	±	±	±
SD	112,4	257,9	6,3	8,4	18,9	20
=====						

VALORES NORMAIS

MEDIA	610	1276,7	44,2	68,5	14,6	18,7
±	±	±	±	±	±	±
SD	201	562,1	10,2	22,2	5,6	7,9
=====						

* Após hCG (6000 UII dose unica)

DISCUSSÃO

A dosagem de DHT por radioimunoensaio vem sendo realizada desde a década de 70 onde pesquisadores (26, 27 e 28) sentindo a necessidade de purificar a amostra pela grande reação cruzada que o anticorpo apresentava principalmente com a T utilizavam diferentes tipos de cromatografia como meio de separação de outros esteroides.

O método de cromatografia em coluna de celite é um método baixo custo relativamente fácil no qual a DHT é separada por diferença da polaridade da fase móvel dos demais esteroides, contra os quais apresenta reação cruzada mais expressiva entre eles T e androstenediona.

O problema de baixa recuperação das amostras conforme já explanado no item 5 de Procedimentos (Recuperação da extração) foi solucionado com redução da polaridade da solução de transferência utilizando isooctano puro.

Apesar de usarmos um anticorpo mais específico do que a maioria dos normalmente utilizados observamos que os níveis de DHT realizados sem cromatografia previa eram significativamente superiores aos obtidos após cromatografia. Este fato foi mais evidente quando se correlaciona os valores de DHT com os de T, onde alguns pacientes com níveis baixos de T apresentavam valores de DHT superiores aos níveis de T o que do ponto de vista biológico é absurdo já que 90% da DHT circulante deriva da conversão periférica da T. Além do mais considerando a porcentagem de reação cruzada com a T (7,78%) podemos admitir que outros fatores além da reação cruzada com outros esteroides interferiram na dosagem de DHT sem cromatografia. Entre estes fatores uma interferência provável é a presença de proteínas plasmáticas já que o volume de soro utilizado é de 1ml o que facilita a contaminação por solventes orgânicos com proteína, contribuindo para um efeito "quenching" (diminuição na contagem causado pela perda do quantum de luz diminuindo a altura de pulso). Os níveis normais do nosso método são semelhantes aos níveis descritos por Imperato-McGinley (13) e Wilson (22).

A relação T/DHT foi capaz de diagnosticar os pacientes com PHM por deficiência de 5-alfa-redutase em idade pós-puberal, tanto em condições basais quanto após estímulo com hCG. Entretanto nos indivíduos pré-puberes os níveis da relação T/DHT só se mostraram alterados após estímulo com hCG, já que a secreção testicular de T é pequena nesta faixa etária o que impede uma real avaliação da conversão de T em DHT.

CONCLUSÃO

Concluimos que a dosagem de DHT sem cromatografia prévia não se mostrou confiável para avaliar os níveis de DHT.

O método de dosagem de DHT com cromatografia em coluna de celite é um método relativamente simples de baixo custo reprodutível e específico e se mostrou útil no diagnóstico do pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 5-alfa-redutase.

Sugerimos que a dosagem de DHT seja realizada sempre após cromatografia prévia até que se desenvolvam anticorpos altamente específicos e de grande afinidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) MORRIS M D & Chaikoff, I L The origin of cholesterol in liver Small intestine adrenal gland and testis of the rat dietary versus endogenous contributions J Biol Chem 234 1095-1097 1959
- 2) YANAIHARA, T & TROEN, P Studies of the human testis IRiosynthetic pathways for androgen formation in human testicular tissue in vitro J Clin Endocrinol Metab 34 783-792 1972
- 3) BRUCHOVSKY N & WILSON J D The conversion of testosterone to 5 alpha androstan-17betaol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro J Biol Chem 243 2012 - 2021 1968
- 4) ANDERSON K M & LIAO S Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei Nature 219, 277-279 1968
- 5) BRUCHOVSKY N & WILSON J D The intra nuclear binding of testosterone and 5 alpha-androstan-17betaol-3-one by rat prostate J Biol Chem 243 5953 - 5960 1968
- 6) WILSON J D & GLOYNA R E The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction Recent Progr Horm Res 26 309-336 - 1970
- 7) WILSON J D & WALKER J D The conversion of testosterone to 5alpha-androstan-17betaol-3one (Dihydrotestosterone) by skin slices of man J Clin Invest 48 371-379, 1969
- 8) MOORE, R J & WILSON, J D The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate delta4-3-ketosteroid 5alpha-oxidoreductase of rat ventral prostate Endocrinology 93 581-592 - 1973
- 9) PRICE P WASS, J A H , GRIFFIN J E et al High dose androgen therapy in male pseudohermaphroditism due to 5 alpha reductase deficiency and disorders of the androgen receptor J Clin Invest 74 1496 - 1508 - 1984
- 10) ABRAHAM G E Handbook of Radioimmunoassay, Marcel Dekker Clinical and Biochemical Analysis 5 591 - 656 1977
- 11) ROBBARD D & LEWARD, J E Computer Analyses of Radioligend assays and radioimmunoassay data Acta Endocrinol 64 (Suppl 147) 79-103 1970
- 12) DYER A FAWCETT J M and POTTS, D U , The Measurement of Aqueous Solutions of Metallic Radioisotopos by Liquid Scintillation Methods Int J App Radiation and Isotopes 15 377 1964
- 13) IMPERATO-MCGINLEY J Steroid 5-alpha-reductase deficiency in man An inherited form of male pseudohermaphroditism Science 18 (6) 1213-1215 1974

- 14) WALSH P C , MADDEN J D , HARROD M J , GOLDSTEIN, J L MACDONALD P C WILSON J D Familial incomplete male pseudohermaphroditismo type 2 Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias N Engl J Med 291 944-949 1974
- 15) PETERSON K E , IMPERATO-MCJINLEY J , GAUTIER, T, Sturla E Male pseudohermaphroditism due to steroid 5-alpha-reductase deficiency Am J Med 62 170 - 180 1977
- 16) DYER R J & HART W L Studies with Doubly-Labeled Iron I Simultaneous Liquid Scintillation Counting of Isotopes Fe55 and Fe59 as Ferrous Perchlorate J Lab and Clin Med 57 322 1961
- 17) DYER, A , FAWCETT, J M and POTTS, D U 'The Measurement of Aqueous Solutions of Metallic Radioisotopes by Liquid Scintillation Methods Int App Radiation and Isotopes Int J App Radiation and Isotopes 15 377 1964
- 18) PERRY S W & WARNWE G T A Method of Sample Preparation for the Estimation of Fe55 in Whole Blood by the Liquid Scintillation Counting Technique Int J App Radiation and Isotopes 14 397 1963
- 19) JENNER H & OBRINK, K J Determination of Fe55 and Fe59 Mixtures in Blood by Liquid Scintillation Counting Scandinavian J Clin and Lab Investigation 14, 466 1962
- 20) SARNAT N & JEFFAY E Determination of Radioactive Calcium by Liquid Scintillation Counting Anal Chem 34 643 1962
- 21) MENDONÇA B B NICOLAU W e COL Obtenção de anti-soro anti-testosterona em coelhos Arg Bras Endocrinol Metabol 29 2 1985
- 22) WILSON, J D Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts Comparison of cells from normal subjects and patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism typ 2 J Biol Chem 250 3498-3504 1975
- 23) MENDONÇA B B Pseudohermafroditismo masculino por deficiência da 3 beta hidroxisteroide dehidrogenase não acompanhada de perda de sal, São Paulo 1984 (tese de Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- 24) ITO, T & HURTON R Dihydrotestosterone in Human Peripheral Plasma J Clin Endocr 3 362 1970
- 25) TOSCANO, V , PETRANGELI, E , ADAMO, M V , FOLI S , CAIOLA S and SCIARRA F Simultaneous Determination of 5 alfa reduced Metabolites of Testosterone in Human Plasma J of Steroid Biochemistry 14 574 1981
- 26) VERMELUEN A Testosterona and 5-alpha-androstan-17B-ol-3 one (DHT) level in man Acta Endocrinol 83 651-664 1976