

Desenvolvimento de técnicas de medida dos andrógenos plasmáticos - testosterona (T), diidrotestosterona (DHT), androstenediona (A) e deidroepiandrosterona (DHEA) - por radioimunoensaio e sua avaliação em adultos normais de ambos os sexos*

SETSUKO S. ACHANDO¹
BERNARDO LÉO WAJCHENBERG²

Os andrógenos esteróides da série androstana, com 19 átomos de carbono, são secretados pelas gônadas e córtex adrenal. No testículo são secretados a testosterona e em menor grau a diidrotestosterona, sendo que na gônada feminina são produzidas a testosterona e a androstenediona. Os principais andrógenos secretados pela córtex adrenal parecem ser deidroepiandrosterona e seus conjugados sulfatados e androstenediona e seus derivados 11 B-hidroxilados.

Os métodos analíticos clássicos para dosagem dos andrógenos nos fluidos orgânicos com técnicas isotópicas e de cromatografia de gás são muito laboriosos e necessitam um grande volume plasmático, além de carecerem de precisão e sensibilidade, reduzindo sua praticabilidade e limitando seu uso.

Durante a última década, diversos métodos físico-químicos, por exemplo, técnica da diluição de dupla marcação isotópica e, mais recentemente, ligação a proteínas transportadoras do plasma⁽⁶⁾, foram desenvolvidos para os ensaios dos baixos níveis de andrógenos (T e A) em plasma periférico.

Entretanto, a sensibilidade desta tecnologia era também pequena, além da necessidade de separação prévia dos esteróides dos demais circulantes, obtida, geralmente, por cromatografia em coluna ou camada delgada.

Posteriormente, o radioimunoensaio foi aplicado na mensuração de muitos compostos orgânicos⁽²⁾ de interesse biológico. Esta mensuração baseia-se, essencialmente, na reação de um antígeno marcado com anticorpo específico.

Quando publicaram o primeiro trabalho sobre aplicação dos princípios do radioimunoensaio, em 1959, Bersen e Yalow estudaram um hormônio polipeptídico de peso molecular não muito elevado, a insulina (6.000). Os hormônios polipeptídicos, apresentando peso molecular acima de 5.000, são imunogênicos em animais de espécie diferente, quando associados ao adjuvante de Freund, e não foram encontrados obstáculos no que se refere à produção de anticorpos específicos para uso em radioimunoensaio. Entretanto, os hormônios esteróides apresentam peso molecular de 250 a 350 e não são imunogênicos, pois o menor hormônio peptídico que se mostrou imunogênico foi a vasopressina, de peso molecular 1.080.

Erlanger e colaboradores⁽²⁾, em 1957 e 1959, já haviam demonstrado ser possível a produção de anticorpos específicos contra os esteróides, desde que eles fossem usados como haptenos, ou seja, incorporados a macromoléculas, em geral albumina sérica, bovina. Como os esteróides naturais contêm grupos OH⁻ e O⁻, que não se ligam às proteínas eficientemente, são produzidos derivados em que estes grupos se tornam reativos, ou seja, transformados em radicais carboxílicos ou amínicos. Assim, preparam-se derivados contendo grupos carboxílicos livres que são acoplados a grupos amínicos dos resíduos da lisina⁽²⁾, na albumina humana ou bovina sérica, pelo uso da condensação carbodiimida. Os reagentes para preparar os derivados esteróidicos variam, caso se utilizem os grupos OH⁻ ou cetônicos como locais de ancoradouro da proteína. Assim, são utilizados mais frequentemente a esterificação do grupo OH⁻ por anidrido succínico e para os grupos cetônicos preparam-se derivados oxima, usando a carboximetil-hidroxilamina. A reatividade dos grupos alcoólicos e cetônicos dependerá de sua localização na molécula dos esteróides. Os esteróides, covalentemente ligados a carreadores protéicos, são imu-

* Trab. realiz. no Centro de Aplicações Biomédicas de Radioisótopos e Radiações (CABRR) do Inst. de Pesq. Energéticas e Nucleares de S. Paulo e Unid. de Diabetes e Adrenal da Disc. de Endocrinol. e Metab., Hosp. das Clín. da Fac. de Med. da Univ. de S. Paulo, São Paulo, Brasil.

1. Bioquímica.
2. Professor Adjunto.

Pedidos de separata: Bernardo Léo Wajchenberg, Hospital das Clínicas, Caixa Postal 8.091, São Paulo, SP, Brasil.

nogênicos contra os resíduos livres da molécula de esteróide. Como os resíduos livres são às vezes comuns para diferentes esteróides, isto explicaria a reatividade cruzada entre eles.

Mais recentemente, Lindner e colaboradores⁽¹³⁾ conseguiram ligar diretamente o esteróide ao carreador protéico, sem a necessidade de formação de um derivado e os anticorpos resultantes são específicos.

Em 1969, Abraham⁽¹¹⁾ publicou uma técnica de dosagem de estriol sérico por radioimunoensaio, com anticorpo relativamente específico. A partir de 1970, as publicações se multiplicaram muito, de tal sorte que atualmente não se conhece nenhum esteróide de importância fisiológica que não seja mensurável por técnica radioimunológica.

Neste trabalho, propomo-nos a estudar a técnica do radioimunoensaio para a mensuração dos andrógenos em plasma humano, visando à sua padronização, de modo a torná-la aplicável nas medidas desses hormônios em condições normais, patológicas e experimentais, além de sua utilidade no diagnóstico de diversas disfunções gonadais e adrenais.

MATERIAL

1. Padrões dos hormônios esteróides: T, DHT, A e DHEA utilizados sem repurificação, foram obtidos da "Sigma Chemical Corporation" (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América). As soluções-estoque foram preparadas em etanol bidestilado⁽⁴⁾ a 1mg/ml e mantidas a -20°C . Destas, foram feitas as diluições seguintes:

Solução (B), tomando de (M) 100 μl e completando o volume para 10ml com tampão, obtendo-se uma concentração de 0,1ng/20 μl para T, DHT e DHEA, corres-

pondendo à solução de uso. Para a androstenediona, tomamos de (B) 50 μl e completamos para 10ml com tampão, obtendo-se solução de uso de uma concentração de 5ng/ml.

2. Hormônios radioativos

Foram empregados os seguintes traçadores: testosterona (1, 2, 3H (N)-40Ci/mmol-cat. Net-187), diidrotestosterona (1, 2, 3H (N)-40Ci/mmol-cat. Net-302), androstenediona (1, 2, 3H (N)-40Ci/mmol-cat. Net-181), deidroepiandrosterona (1, 2, 3H (N)-40Ci/mmol-cat. Net-479), que foram obtidos da New England Nuclear Corp. (Boston, Massachusetts, Estados Unidos da América), em solução de benzeno-etanol 9:1. Tomamos uma pequena alíquota, correspondendo de 500.000 a 1.500.000cpm, dependendo do esteróide marcado.

3. Anti-soros liofilizados

a) Para a medida de testosterona, utilizamos o anti-soro obtido de coelhos imunizados com testosterona-3-oxima albumina bovina, adquirido na "New England Nuclear Corporation" (Boston, Massachusetts, Estados Unidos da América). Este anti-soro, por ter 100% de imunorreatividade cruzada para DHT, foi também utilizado para o ensaio deste esteróide.

b) Para ensaio da androstenediona empregamos o anti-soro preparado em coelho, no qual foram injetados o androstenediona 7 α -soro albumina bovina, obtido da "Miles-Yeda Ltda." (Kiryat Weizmann, Rehovot, Israel).

c) Para a medida de deidroepiandrosterona, utilizamos o anti-soro preparado em coelho após imunização com deidroepiandrosterona-17-oxima-soro-albumina bovina, obtida da "Endocrine Sciences"

(Tarzana, Califórnia, Estados Unidos da América).

MÉTODOS

A técnica seguida baseou-se em termos gerais nas indicações de Auletta⁽⁸⁾, com modificações que introduzimos durante seu desenvolvimento e consistiu nas fases seguintes (fig. 1):

1. Preparo do plasma para o radioimunoensaio

Foram utilizadas as seguintes alíquotas do plasma, dependendo do andrógeno a ser medido: a) testosterona: 0,2 e 0,5ml para homem e mulher, respectivamente; b) diidrotestosterona: 1,0ml para homem e mulher, respectivamente; c) androstenediona: 0,5ml para homem e mulher respectivamente; e d) deidroepiandrosterona: 0,5 ml para homem e mulher, respectivamente. Completamos o volume para 1,0ml com tampão fosfato (a, b ou c) e adicionamos 0,1ml de hormônio tritiado ($\pm 4000\text{cpm}$). Agitamos, em "Vortex", por um minuto e deixamos em repouso a 4°C por 12-16 horas, para estabelecer o equilíbrio entre o hormônio contido no plasma e o hormônio tritiado. Este hormônio radioativo se constitui em padrão interno para a estimativa da recuperação.

2. Extração

Adicionam-se 4ml de éter etílico, agita-se por um minuto e separa-se a fase orgânica após a centrifugação por 10 minutos, à velocidade de 1.500rpm. À fase aquosa acrescentam-se, novamente, 4ml de éter etílico e repete-se a operação acima. Despreza-se por fim a fase aquosa final e conserva-se a orgânica, adicionada à obtida inicialmente. Esta é evaporada sob corrente de nitrogênio, em banho-

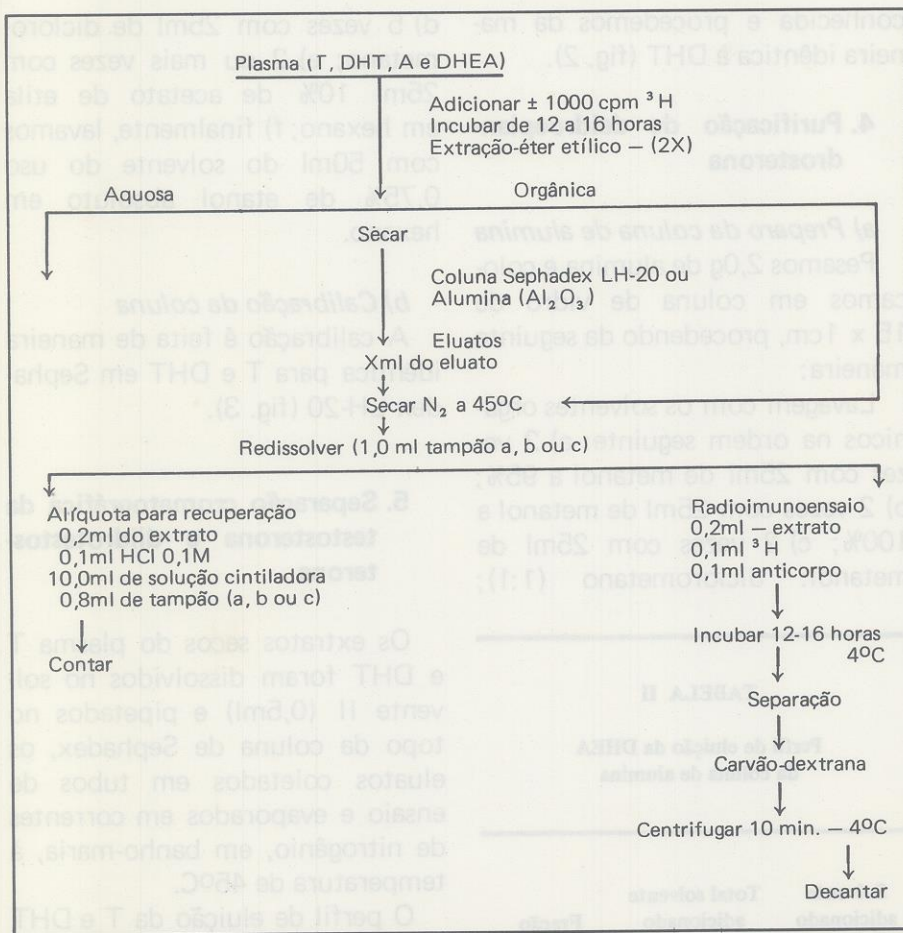


Fig. 1 - Representação esquemática da técnica para quantificação dos hormônios andrógenos (T, DHT, A e DHEA).

-maria, à temperatura de aproximadamente 45°C, sendo o resíduo seco dissolvido em 1ml de tampão fosfato (a, b ou c). No caso de necessitar-se de purificação cromatográfica, 0,5ml deve ser dissolvido em eluente específico, a ser descrito adiante.

3. Purificação da testosterona e diidrotestosterona

a) Preparo da coluna de Sephadex LH-20

2,5g de Sephadex LH-20⁽¹⁹⁾ são previamente intumescidos com 10ml do solvente I (benzeno: metanol 85:15 V:V) durante 12-18 horas. A seguir, este material é colocado em uma coluna de vidro de 15 x 1cm. A coluna assim preparada é lavada com o solvente I até completar um volume final de eluição de 100ml. Em seguida, percolam-se cerca de 50ml do solvente II (isooctano: benzeno: metanol 90:5:5 V:V) para saturar o Sephadex.

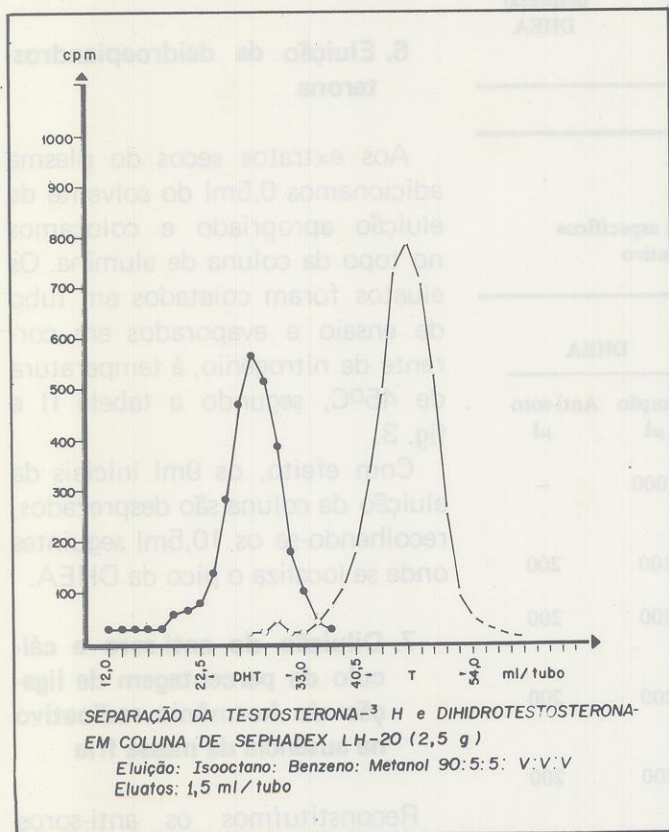


Fig. 2

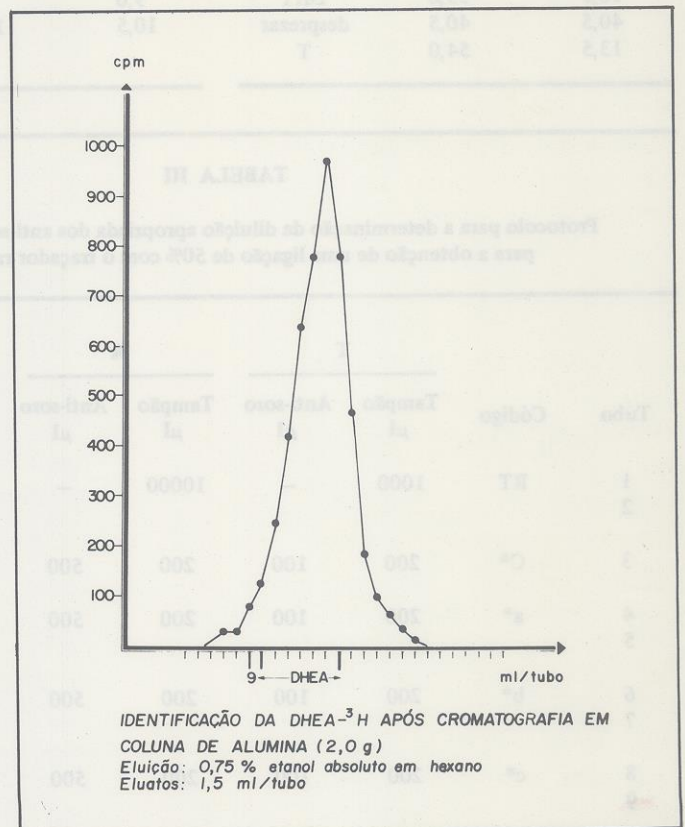


Fig. 3

b) Calibração da coluna

Adicionamos 100 μ l de DHT radioativo, de atividade específica conhecida, ao topo do Sephadex. Em seguida, fizemos eluição da DHT com solvente II, coletando-se frações de 1,5ml em frascos de cintilação líquida, que eram evaporadas em placa aquecedora, acrescentando-se, a seguir, 5ml de solução cintiladora e levadas ao cintilador líquido para a identificação do pico de radioatividade. Posteriormente, lavamos a coluna com 100ml de solvente II e a seguir adicionamos 100 μ l de T radioativa de atividade específica

conhecida e procedemos da maneira idêntica à DHT (fig. 2).

4. Purificação de deidroepiandrosterona

a) Preparo da coluna de alumina

Pesamos 2,0g de alumina e colocamos em coluna de vidro de 15 x 1cm, procedendo da seguinte maneira:

Lavagem com os solventes orgânicos na ordem seguinte: a) 2 vezes com 25ml de metanol a 95%; b) 2 vezes com 25ml de metanol a 100%; c) 2 vezes com 25ml de metanol: diclorometano (1:1);

d) 5 vezes com 25ml de diclorometano; e) 2 ou mais vezes com 25ml 10% de acetato de etila em hexano; f) finalmente, lavamos com 50ml do solvente do uso 0,75% de etanol absoluto em hexano.

b) Calibração da coluna

A calibração é feita de maneira idêntica para T e DHT em Sephadex LH-20 (fig. 3).

5. Separação cromatográfica da testosterona e diidrotestosterona

Os extratos secos do plasma T e DHT foram dissolvidos no solvente II (0,5ml) e pipetados no topo da coluna de Sephadex, os eluatos coletados em tubos de ensaio e evaporados em correntes de nitrogênio, em banho-maria, à temperatura de 45°C.

O perfil de eluição da T e DHT está indicado na tabela I e fig. 2.

6. Eluição da deidroepiandrosterona

Aos extratos secos do plasma adicionamos 0,5ml do solvente de eluição apropriado e colocamos no topo da coluna de alumina. Os eluatos foram coletados em tubo de ensaio e evaporados em corrente de nitrogênio, à temperatura de 45°C, segundo a tabela II e fig. 3.

Com efeito, os 9ml iniciais da eluição da coluna são desprezados, recolhendo-se os 10,5ml seguintes onde se localiza o pico da DHEA.

7. Diluição do anti-soro e cálculo da percentagem de ligação do hormônio radioativo na ausência da massa fria

Reconstituímos os anti-soros liofilizados, para T e A, com 5ml

TABELA I

Perfil de eluição de T e DHT da coluna de Sephadex LH-20

Solvente II adicionado (ml)	Total solvente adicionado (ml)	Fração
22,5	22,5	desprezar
10,5	33,0	DHT
40,5	40,5	desprezar
13,5	54,0	T

TABELA II

Perfil de eluição da DHEA da coluna de alumina

Solvente adicionado (ml)	Total solvente adicionado (ml)	Fração
9,0	9,0	desprezar
10,5	19,5	DHEA

TABELA III

Protocolo para a determinação da diluição apropriada dos anti-soros específicos para a obtenção de uma ligação de 50% com o traçador radioativo

Tubo	Código	T		A		DHEA	
		Tampão μ l	Anti-soro μ l	Tampão μ l	Anti-soro μ l	Tampão μ l	Anti-soro μ l
1	RT	1000	—	10000	—	1000	—
2							
3	C*	200	100	200	500	200	200
4	a*	200	100	200	500	200	200
5							
6	b*	200	100	200	500	200	200
7							
8	c*	200	100	200	500	200	200
9							

de tampão (a e b) e 1,0ml do tampão (c) para anti-soro de DHEA, constituindo-se assim as soluções concentradas.

Destas soluções concentradas fizemos as várias diluições, com a finalidade de chegar a uma percentagem de ligação em torno de 50%, com a massa fixa de hormônio "frio" existente no traçador radioativo.

O protocolo para a determinação da diluição dos anti-soros utilizados para a obtenção da percentagem de ligação apropriada com hormônio marcado está na tabela III.

Onde:

RT = radioatividade total

C* = anticorpo concentrado

a*, b* e c* = diluições utilizadas

Usamos as seguintes diluições:

T - 1:1, 1:2, 1:3

A - 1:10, 1:12, 1:4

DEA - 1:10.000, 1:12.000, 1:15.000

A todos os tubos adicionamos 100 μ l do hormônio marcado, com 4.000cpm e seguimos como indicado no parágrafo 3.11.

TABELA IV

Protocolo da curva-padrão para RIA de testosterona

Tubo nº	Código	Padrão esteróide (0,1ng/20 μ l)		Tampão (a) μ l	Anticorpo μ l	Hormônio 3 H μ l
		μ l	pg			
1	RT	-	-	1000	-	100
2		-	-	-	-	-
3	N	-	-	300	-	100
4		-	-	-	-	-
5	BO	-	-	200	100	100
6		-	-	-	-	-
7	Ponto 1	1	5	199	100	100
8		-	-	-	-	-
9	Ponto 2	2	10	198	100	100
10		-	-	-	-	-
11	Ponto 3	5	25	195	100	100
12		-	-	-	-	-
13	Ponto 4	10	50	190	100	100
14		-	-	-	-	-
15	Ponto 5	20	100	180	100	100
16		-	-	-	-	-
17	Ponto 6	30	150	170	100	100
18		-	-	-	-	-
19	Ponto 7	50	250	150	100	100
20		-	-	-	-	-
21	Ponto 8	100	500	100	100	100
22		-	-	-	-	-

O cálculo da percentagem de ligação do anti-soro está indicado a seguir.

$$\frac{C^*}{RT} = \frac{\text{cpm na presença do anticorpo concentrado ligado ao hormônio marcado}}{\text{Radioatividade total}}$$

$$\frac{a^*, b^*, e c^*}{RT} = \frac{\text{cpm na presença do anticorpo diluído}}{\text{Radioatividade total}}$$

nadante, por decantação, em frasco de cintilação líquida. Adicionam-se 100 μ l de HCl 0,1M e 10ml de solução cintiladora, contendo Triton X-100. As contagens foram realizadas após a homogeneização do conteúdo dos frascos, as atividades sendo determinadas com detector de cintilação líquida, com troca automática de amostras, com eficiência de 55% para trítio, durante 10 minutos, com erro teórico de 1,5%.

Escolhemos a diluição do anticorpo em que a relação com radioatividade total fosse em torno de 50%.

8. Protocolos das curvas-padrão de testosterona (T), androstenediona (A) e deidroepiandrosterona (DHEA)

Os protocolos das curvas-padrão para o radioimunoensaio (RIA) de T e DHEA estão indicados nas tabelas IV, V e VI.

9. Separação do hormônio marcado livre do hormônio ligado ao anti-soro

Faz-se a separação após repouso do tubo de reação por uma noite a 4 $^{\circ}$ C, com a adição de 1,0ml (T, DHT) ou 0,2ml (A e DHEA) da suspensão de carvão-dextrana em todos os tubos, com exceção dos de nºs 1 e 2. Agita-se cada tubo por 15 segundos e deixa-se em repouso por 15 minutos. Centrifuga-se a 2.500rpm, por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C, e separa-se o sobre-

10. Protocolo do radioimunoensaio das amostras plasmáticas

O extrato seco com ou sem purificação, dependendo do esteróide a ser medido, foi dissolvido em 1,0ml de tampão (a, b ou c), agitando-se intensamente por um minuto em "Vortex" e continuando em agitação contínua len-

TABELA V

Protocolo da curva-padrão para o RIA de androstenediona

Tubo nº	Código	Padrão esteróide (5ng/ml)		Tampão (a) μ l	Anticorpo μ l	Hormônio 3 H μ l
		μ l	pg			
1						
2	RT	—	—	1000	—	100
3						
4	N	—	—	700	—	100
5						
6	BO	—	—	200	500	100
7						
8	Ponto 1	1	5	199	500	100
9						
10	Ponto 2	2	10	198	500	100
11						
12	Ponto 3	5	25	195	500	100
13						
14	Ponto 4	10	50	190	500	100
15						
16	Ponto 5	20	100	180	500	100
17						
18	Ponto 6	30	150	170	500	100
19						
20	Ponto 7	50	250	150	500	100
21						
22	Ponto 8	100	500	100	500	100

TABELA VI

Protocolo da curva-padrão para o RIA de deidroepiandrosterona

Tubo nº	Código	Padrão esteróide (0,1ng/20 μ l)		Tampão μ l	Anti-soro μ l	Hormônio 3 H μ l
		μ l	pg			
1						
2	RT	—	—	1000	—	100
3						
4	N	—	—	400	—	100
5						
6	BO	—	—	200	200	100
7						
8	Ponto 1	1	5	159	200	100
9						
10	Ponto 2	2	10	198	200	100
11						
12	Ponto 3	5	25	195	200	100
13						
14	Ponto 4	20	100	180	200	100
15						
16	Ponto 5	50	250	150	200	100
17						
18	Ponto 6	60	300	140	200	100
19						
20	Ponto 7	80	400	120	200	100
21						
22	Ponto 8	100	500	100	200	100
23						
24	Ponto 9	150	750	50	200	100

tamente a 37°C, por 4 horas, para a completa dissolução do extrato preparado, como indicado na fig. 1.

11. O protocolo geral do radioimunoensaio de amostras de plasmas e um controle (B1) "branco" está indicado na tabela VII

Como se poderá observar na tabela VII, nos tubos de ensaio colocamos 100 μ l e 200 μ l do extrato dissolvido. Apenas ao tubo contendo 100 μ l do extrato adicionamos 100 μ l do tampão, para um volume final de reação igual para todos os tubos; 100 μ l do anticorpo (T) e 200 μ l para (DHEA) e 100 μ l de hormônio tritiado (\pm 4.000cpm). Agitamos em "Vortex" durante 15 segundos e incubamos por 12 a 16 horas, à temperatura de 4°C. A seguir adicionamos o carvão-dextrana, nas proporções de acordo com o hormônio a ser medido. Centrifugamos e decantamos para um frasco de cintilação, conforme está indicado em 9.

Para androstenediona procedemos da maneira seguinte:

a) Apesar de utilizarmos anti-soros específicos, fizemos sua purificação prévia em coluna de alumina, procedendo de maneira idêntica à da DHEA.

b) O extrato, após dissolução em tampão (b), foi distribuído nas quantidades de 100 e 200 μ l para tubos de ensaio. Em seguida adicionamos o 0,5ml de anti-soro, exceto para os tubos 1, 2, 3 e 4, aos quais acrescentamos o tampão. Incubamos por 30 minutos à temperatura ambiente e adicionamos 0,1ml de hormônio marcado, aproximadamente 4.000cpm, para todos os tubos. Incubamos por 90 minutos, à temperatura de 37°C, seguidos de 15 minutos a 4°C. Adicionamos 0,2ml de car-

TABELA VII

Protocolo geral do RIA de amostras plasmáticas

Amostra	Extrato dissolvido	Tampão μ l	Anti-soro μ l	Hormônio 3 H μ l
a	100	100	100(200)	100
	200	—	100(200)	100
b	100	100	100(200)	100
	200	—	100(200)	100
c	100	100	100(200)	100
	200	100	100(200)	100

TABELA VIII

Recuperação percentual do esteróide radioativo, para avaliação das perdas de esteróides no processamento dos plasmas para RIA

Esteróide radioativo	Recuperação após extração do plasma		Recuperação após extração e purificação cromatográfica	
	\bar{X} (%)	Intervalo	\bar{X} (%)	Intervalo
T+DHT	92	87 - 97	70	60 - 87
T			55	50 - 70
DHT			61	58 - 70
A	94	84 - 98	61	52 - 80
DHEA	91	83 - 97		

vão-dextrana, com exceção dos tubos 1 e 2. Agitamos os tubos por 15 segundos em "Vortex" e incubamos a 40°C por 10 minutos, e seguido de centrifugação a 2.500rpm, por 15 minutos. O sobrenadante é separado por decantação, em frasco de cintilação, e, em seguida, procede-se à leitura.

12. Avaliação das perdas de esteróides no processamento do plasma (recuperação)

Mediu-se a recuperação colocando-se 200 μ l do "extrato dissolvido" em frasco de cintilação e adicionando-se 100 μ l de HCl 0,1M, 800 μ l do tampão (a, b ou c) e 10,0ml de solução cintiladora para a estimativa das contagens por meio das quais se fará a correção para o número de contagens adicionadas inicialmente ao plasma.

A tabela VIII mostra a recuperação no processamento do plasma em percentagens, sendo menor quando a extração é seguida da purificação cromatográfica.

13. Cálculo do radioimunoensaio

Para o cálculo das percentagens de ligação do hormônio marcado, em cada tubo, as atividades dos sobrenadantes obtidos dos tubos 3 e 4 (tabelas IV, V e VI), representando as contagens não específicas*⁽¹⁸⁾, foram subtraídas das contagens em cada tubo (curva e amostra) como segue:

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

***Ausência do anticorpo correspondente a um branco da radioatividade no tampão de ensaio**.

TABELA IX

Reações cruzadas de vários esteróides com o anti-soro para testosterona

Composto	Reação cruzada
Testosterona	100
Diidrotestosterona	100
5-B-Androstan-3B-17-diol	3,1
5-a-Androstan-3B-17B-diol	2,9
5-a-Androstan-3a-17a-diol	1,3
Androstenediona	1,1
Androstanediona	0,6
Progesterona	0,4
Epitesterona	0,12
DOC, DHEA	0,07
Adrenosterona	0,05

onde,

B — contagens por minuto do sobrenadante de cada tubo (curva-padrão e amostras)

B₀ — contagens por minuto do hormônio ligado ao anti-corpo

N — contagens não específicas.

Para a construção da curva-padrão projetamos as concentrações do padrão em abscissas e em ordenadas as relações $\frac{B}{B_0} \times 100$.

As concentrações hormonais dos tubos desconhecidos são determinadas pela comparação direta das leituras (cpm) observadas nos frascos de cintilação, em comparação àquela obtida a partir das soluções-padrão. Da leitura direta da curva obtemos a massa da amostra plasmática seguindo a fórmula seguinte:

$$pg^* \times \frac{cpm}{cpm_r}$$

x Fator de diluição =

= pg/ml de plasma

onde,

pg* — massa da amostra lida diretamente na curva

TABELA X

Reações cruzadas de vários esteróides com o anti-soro para androstenediona

Composto	Reação cruzada (%)
Androstenediona	100
Testosterona	1
DHEA	0,01
11-Deoxicorticosterona	0,01
Progesterona	0,01
Estrona	0,01
Estradiol	0,01

cpm — contagens por minuto do hormônio tritiado adicionado ao plasma (± 1.000 cpm)

cpm_r — contagens por minuto obtidas da recuperação 0,2ml do extrato dissolvido em tampão (a, b ou c).

14. Avaliação da seqüência operacional para o ensaio de "andrógenos" em plasma (estudo estatístico do método)

A) Especificidade

Avaliou-se a especificidade do

$$\frac{\text{dose de X necessário para deslocar 50\% de X-}^3\text{H}}{\text{dose de Y necessário para deslocar 50\% de Y-}^3\text{H}} \times 100$$

a) As reações da antitestosterona com outros esteróides foram determinadas pela incubação direta de diversas quantidades dos diferentes esteróides a estudar com o anticorpo e o hormônio tritiado em proporções fixas (tabela IX). Dos compostos ensaiados, a DHT apresentou reação análoga ao anticorpo, sendo para os demais esteróides pouco significativas.

b) Reações da antiandrostenediona com outros esteróides, seguindo o esquema geral acima

TABELA XI

Reatividade cruzada dos esteróides com o anti-soro n° D17-113 para deidroepiandrosterona

Composto	Reação cruzada (%)
Pregnenolona	17
Epiandrosterona	3,8
5- α -androstan-3B-17B-diol	1,7
Testosterona	0,8
Dihidrotestosterona	0,2
Androstenediona	0,2
Androsterona	0,2
Etiocolanona	0,1
11-OH-Androsterona	0,1
17-OH-Progesterona	0,1
Adrenosterona	0,1
Cortisol	0,1
Corticosterona	0,1
Progesterona	0,1

radioimunoensaio de duas maneiras:

1) *Reatividade cruzada com outros esteróides* — Admitindo que o anticorpo submetido a exame é produzido contra o esteróide X e se deseja avaliar as percentagens de reação cruzada com o esteróide Y, a percentagem de reação cruzada do esteróide⁽¹⁶⁾ é definida pela relação:

(tabela X), observando-se que o anti-soro empregado foi de especificidade alta.

c) Reações do anti-soro contra DHEA com os outros esteróides (tabela XI), verificando-se apenas grau discreto de reatividade cruzada com pregninolona.

2) Reatividade comparada do esteróide plasmático e do padrão (ensaio da diluição).

Para provar que a reatividade do hormônio plasmático e a do padrão são análogas, fizemos uma

TABELA XII

Protocolo para a prova da diluição de plasma (avaliação da especificidade)

Tubo n°	Plasma μ l	Tampão μ l	Diluição final
1 e 2	10	990	1:100
3 e 4	20	980	1:50
5 e 6	25	975	1:40
7 e 8	33	967	1:30
9 e 10	50	950	1:20

mistura plasmática com elevado teor de T, DHT, A e DHEA, conforme a tabela XII.

B) Sensibilidade

Definimos a sensibilidade como a menor quantidade de hormônio não marcado que pode ser distinguida do traçador e que foi avaliada pela inclinação da curva-padrão. Avaliou-se esta propriedade pela análise de variância de cinco determinações do ponto zero sem massa fria, e do primeiro e segundo pontos da curva-padrão, correspondentes às menores massas de T, DHT, A e DHEA, diferentes de zero.

C) Precisão

Avaliou-se a precisão do método por meio da reprodutibilidade da medida de uma mistura de plasma, com quantidades variáveis de esteróides ("pool"), quantificando os hormônios T, DHT, A e DHEA, no mesmo ensaio-reprodutibilidade intra-ensaio, e em ensaios diferentes — reprodutibilidade interensaio.

D) Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação de quantidades conhecidas dos hormônios T, DHT, A e DHEA (250, 500 e 1.000pg) adicionadas a uma mistura de plasma (0,2ml) com teor conhecido, com valores baixos de T, DHT, A e DHEA, respectivamente.

TABELA XIII

Especificidade do radioimunoensaio de A, T, T+DHT e DHEA, avaliada pela prova de diluição

Androstenediona		Testosterona		Testosterona + Diidrotestosterona		Deidroepiandrosterona	
Concentração de A diluída	Concentração de A (fator X a diluição)	Concentração de T diluída	Concentração de T (fator X a diluição)	Concentração de T+DHT diluída	Concentração de T+DHT (fator X a diluição)	Concentração de DHEA diluída	Concentração de DHEA (fator X a diluição)
ng/ml		ng/ml		ng/ml		ng/ml	
0,32	32,00	0,063	6,30	0,070	7,00	0,35	35,00
0,31	32,00	0,059	5,90	0,065	6,50	0,35	35,00
0,67	33,50	0,114	5,70	0,118	5,90	0,64	32,00
0,65	33,50	0,110	5,50	0,114	5,70	0,60	30,00
0,85	34,00	0,150	6,00	0,117	7,08	0,78	31,20
1,03	31,50	0,196	5,88	0,200	6,00	1,10	33,00
1,02	30,60	0,206	6,18	0,252	7,56	1,15	34,00
1,74	34,80	0,292	5,84	0,282	5,72	1,55	31,00
1,71	34,20	0,282	5,72	0,297	5,94	1,60	32,00
$\bar{X} = 32,83$ $r = 0,996$		$\bar{X} = 5,89$ $r = 0,997$		$\bar{X} = 6,39$ $r = 0,971$		$\bar{X} = 32,36$ $r = 0,995$	

RESULTADO DO ESTUDO ESTATÍSTICO DA METODOLOGIA

A – Especificidade

a) As tabelas IX, X e XI mostram as reações cruzadas de vários esteróides com os anti-soros utilizados para T, A e DHEA, indicando os resultados em porcentagens de reação cruzada ao nível de 50% de ligação.

b) As tabelas XIII e XIV reúnem as médias das concentrações obtidas em cinco diluições diferentes, de uma mesma amostra*, expressas em ng/ml. Verificamos que a concentração média do hormônio, multiplicada pelo fator de diluição, permaneceu relativamente constante⁽¹⁴⁾, com um coeficiente de correlação r (entre a diluição e concentração final) bem significativo.

B – Sensibilidade

Na tabela XV estão indicadas cinco determinações do ponto

*Exceção da tabela XIV (DHT), que foram feitas apenas em três diluições.

zero (ausência de massa fria), do ponto 1 (5pg): P_1 , do ponto 2 (10pg): P_2 , das curvas-padrão de T, A e DHEA. Por utilizar o mesmo anti-soro e traçador da T para o radioimunoensaio de DHT, a sensibilidade da curva de T é aplicável para a de DHT.

C – Precisão

Na tabela XVI estão reunidos os dados de reprodutibilidade intra e interensaios de uma mesma amostra de plasma, com as médias, coeficiente de variação e desvios-padrão respectivos.

Estimou-se a precisão intra-ensaio no mesmo ensaio em 10 alíquotas para T, DHT, DHEA e seis alíquotas para A. A precisão interensaio foi avaliada pelas dosagens da mesma mistura de plasma realizadas em diferentes ensaios, no período de doze meses.

Os coeficientes de variação foram, como era de se esperar, menores na reprodutibilidade intra-ensaio do que interensaio, observando-se que para a DHT os coeficientes de variação foram os maiores.

D – Exatidão

A tabela XVII mostra os valores percentuais obtidos para recuperação de cada hormônio (padrão adicionado a uma mistura de plasma), o desvio-padrão, a média e o intervalo de valores extremos.

Na tabela XVIII encontram-se as médias, variações e intervalo de valores extremos de concentrações hormonais obtidos do plasma normal do sexo masculino e feminino.

DISCUSSÃO

A determinação dos hormônios androgênicos: T, DHT, A e DHEA, após sua extração com o éter etílico, com o método proposto, oferece sensibilidade, precisão e exatidão (tabelas XV a XVII).

O principal fator que isoladamente condiciona as qualidades de especificidade, sensibilidade e simplicidade de um radioimunoensaio é representado pelas características do anti-soro. O uso de anti-soros não totalmente específicos para hormônios esteróides exige a separação e a purificação cromatográfica do esteróide a ser medido; contudo, se o hormônio

TABELA XIV

Especificidade do radioimunoensaio de DHT avaliada pela prova de diluição

Nº	Plasma µl	Diluyente µl	Diluição final	Concentração de DHT diluída	Concentração de DHT (fator X a diluição)
1	1.000	—	1:1	0,280	0,280
2	1.000	—	—	0,283	0,283
3	1.000	—	—	0,278	0,278
4	500	500	1:2	0,145	0,290
5	500	500	—	0,135	0,270
6	500	500	—	0,147	0,294
7	400	600	1:2,5	0,115	0,312
8	400	600	—	0,120	0,288
9	400	600	—	0,125	0,300

 $\bar{X} = 0,288$ $r = 1,0$

TABELA XV

Sensibilidade da curva-padrão dos esteróides andrógenos

Nº	Androstenediona			Deidroepiandrosterona			Testosterona		
	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg)	P ₂ (10 pg)	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg)	P ₂ (10 pg)	B ₀ (0 pg)	P ₁ (5 pg)	P ₂ (10 pg)
	cpm			cpm			cpm		
1	2037	1860	1745	1889	1879	1729	1980	1727	1497
2	2060	1820	1772	1933	1735	1750	1853	1929	1488
3	2032	1890	1692	1982	1898	1760	1958	1728	1450
4	1975	1870	1688	1936	1975	1730	1831	1890	1551
5	1919	1810	1701	1956	1901	1630	1941	1823	1582
	$\bar{X} = 2 005$	$\bar{X} = 1 850$	$\bar{X} = 1 719$	$\bar{X} = 1 939$	$\bar{X} = 1 878$	$\bar{X} = 1 720$	$\bar{X} = 1 913$	$\bar{X} = 1 819$	$\bar{X} = 1 514$
	DP = 57,17	DP = 33,91	DP = 37,07	DP = 34,22	DP = 87,73	DP = 51,92	DP = 66,37	DP = 92,06	DP = 52,57
	CV = 2,85%	CV = 1,83%	CV = 2,16%	CV = 1,76%	CV = 4,67%	CV = 3,02%	CV = 5,06%	CV = 5,6%	CV = 3,47%

 $F_{\text{observado}} = 83,02$ significativo para $\alpha = 0,05$ $F_{\text{observado}} = 25,26$ significativo para $\alpha = 0,05$ $F_{\text{observado}} = 41,77$ significativo para $\alpha = 0,05$ $F_{\text{crítico}}(2,12) = 3,89$

a ser medido no fluido biológico apresentar níveis muito maiores do que o dos interferentes, é possível mensurá-lo sem cromatografia. Assim, no caso da T, foi necessário fazer uma purificação inicial do extrato, em coluna cromatográfica, usando Sephadex LH-20, em virtude do anti-soro usado apresentar um cruzamento de 100% com o DHT (tabela IX). Entretanto, em circunstâncias normais de rotina, dosamos a T sem a purificação prévia (T+DHT),

pois sua concentração, comparada com a da DHT, é muito elevada, havendo, portanto, pouca interferência desta última. Entretanto, como na mulher a proporção da DHT chega a ser de 35% em relação à concentração de testosterona, como descrito por Auletta⁽⁸⁾, torna-se então necessária uma purificação prévia, cromatográfica, para melhor avaliação dos níveis de T.

A extração com o éter etílico oferece uma recuperação consi-

derada ótima, sempre acima de 84% (tabela VIII). A recuperação após a purificação variou em torno de 50 a 80%, considerando as perdas durante a extração e purificação. Tentamos, inicialmente, utilizar outros solventes, como a hexana, mas a recuperação foi muito baixa, por ser o coeficiente de partição entre o plasma e o solvente melhor para o éter do que para os demais solventes, relativamente aos andrógenos.

A extração dos esteróides é de importância fundamental, porque apesar do anti-soro poder ser específico haverá sempre interferentes naturais, que alteram a medida das concentrações do hormônio a ser dosado⁽¹⁰⁾. Assim, no caso de A,

tentamos fazer a dosagem direta sem a extração do plasma, por se utilizar um anti-soro específico, à semelhança do que é feito para radioimunoensaio de hormônios protéicos, mas os resultados obtidos foram baixos, quando compa-

rados aos ensaios realizados com extração prévia, o que indica existir fatores interferentes. Além disso, a especificidade não tornou obrigatória a purificação do extrato em coluna, como se verificou com amostras de plasma de

TABELA XVI

Precisão - Avaliação reprodutibilidade do radioimunoensaio dos andrógenos plasmáticos

Hormônio	Intra-ensaio			Interensaio		
	$\bar{X} \pm DP$ ng/ml	CV (%)	n	$\bar{X} \pm DP$ ng/ml	CV (%)	n
T+DHT	4,21±0,23	5,4	10	4,72±0,56	11,9	10
T	4,51±0,27	5,9	10	4,21±0,42	10,0	10
DHT	0,20±0,02	10,6	6	0,22±0,04	16,0	6
A	6,26±0,40	6,4	10	5,32±0,60	11,3	10
DHEA	5,65±0,47	8,4	10	7,48±1,06	14,2	10

TABELA XVII

Exatidão - Recuperação do radioimunoensaio dos andrógenos plasmáticos

Hormônio	Média ± DP (%)	Intervalo (%)	n	r
T+DHT	98,52± 7,95	88 - 115	23	1,0
T	96,34±10,05	72 - 109	13	1,0
DHT	98,04± 8,74	86 - 11,7	10	0,967
A	104,82± 9,41	77,7 - 119,3	15	0,997
DHEA	103,66± 5,71	92,2 - 113	10	0,995

TABELA XVIII

Valores normais de andrógenos, variações etárias e intervalos dos valores extremos obtidos em plasma de homens e mulheres

Homens				
Esteróides	Idade (anos)	Número de amostras	Intervalos dos valores extremos ng/ml	Média ± DP
T+DHT	20-70	26	3,09 - 9,77	5,9 ±2,0
T	26-70	13	3,24 - 7,36	5,2 ±1,3
DHT	26-70	15	0,12 - 0,72	0,26±0,15
A	24-58	13	0,4 - 1,9	0,9 ±0,4
DHEA	24-60	10	2,8 - 7,5	4,6 ±1,7
Mulheres				
T+DHT	25-71	24	0,21 - 0,93	0,5 ±0,2
T	20-60	14	0,20 - 0,88	0,4 ±0,2
DHT	20-60	12	0,07 - 0,53	0,2 ±0,13
A	23-70	12	0,2 - 2,1	0,8 ±0,5
DHEA	21-60	10	2,6 - 7,2	4,8 ±1,7

valores variáveis dosadas com e sem purificação em coluna. Entretanto, a observação dos dados (tabela XIX) indica a necessidade de purificação cromatográfica quando os valores de A são muito elevados e não quando os valores são normais ou pouco elevados.

Por outro lado, para DHEA, embora o anti-soro seja também específico, torna-se necessária a purificação cromatográfica pelos interferentes, provavelmente não-esteróidicos (tabela XX).

Quanto à avaliação do método em relação à especificidade, vemos (tabelas XIII e XIV) que as concentrações dos hormônios T, DHT, E e DHEA, medidas em cinco diluições diferentes, forneceram os mesmos resultados quando utilizamos fator de diluição, ou seja, caíram ao longo da curva-padrão, indicando que o padrão utilizado tem a mesma reatividade com o anti-soro do que o esteróide que se está medindo no plasma.

Avaliando a reatividade cruzada dos anti-soros utilizados para os

ensaios com diferentes esteróides (tabelas IX, X e XI), concluímos que há necessidade de cromatografia para medida apenas da T, pois o anti-soro empregado apresentou reatividade igual para a DHT.

Além disso, para DHEA, embora o anti-soro seja específico, foi necessário o emprego de coluna, como já analisado.

Quanto à sensibilidade, esta foi de 5pg para A e DHEA e 6pg para

TABELA XIX

Comparação do radioimunoensaio de androstenediona com e sem purificação do extrato em coluna cromatográfica de alumina

Com coluna	Sem coluna
ng/ml	
1,72	1,79
2,90	2,84
1,96	2,19
1,52	2,39
2,05	1,71
3,36	3,53
9,31	6,74
9,06	7,88
10,70	8,05
11,03	7,90
26,96	33,12
27,17	28,15
$\bar{X} = 8,98$	$\bar{X} = 8,86$

$t_{calc.} = 2,058$

$t_{crit.} = 2,201$

Não houve diferença significativa ao nível de significância $\alpha = 0,05$ entre a média das dosagens sem e com coluna.

TABELA XX

Comparação do radioimunoensaio de deidroepiandrosterona com e sem purificação do extrato em coluna cromatográfica de alumina

Com coluna	Sem coluna
ng/ml	
678,00	738,52
17,47	188,94
10,15	72,38
9,54	101,85
2,53	8,86
6,14	9,62
3,60	14,04
3,54	20,44
144,76	372,37
5,54	11,04
$\bar{X} = 80,59$	$\bar{X} = 140,52$

$t_{calc.} = 2,599$

$t_{crit.} = 2,228$

Houve diferença significativa ao nível de significância $\alpha = 0,05$ entre as médias das dosagens feitas sem e com coluna cromatográfica.

TABELA XXI

Precisão - Avaliação da reprodutibilidade do radioimunoensaio comparadas com as publicadas anteriormente

Hormônio	Intra	Coefficiente de variação % Interensaio	Referências
T	6,8	13,2	Abraham, G.E.(2)
"	8,0	12,0-17,0	Schutz, S.K.; Levine, L.S.; New, M.I.(11)
"	5,0	11,0	Ducharme, J.R.; Forest, M.G.; Peretti, E.; Sempé, M.; Coller, R.; Bertrand, J.(10)
"	5,9	10,0	Presente estudo
DHT	9,4	15,6	Abraham, G.E.(2)
"	14,0	20,0-35,0	Schutz, S.K.; Levine, L.S.; New, M.I.(11)
"	5,0	5,0	Ducharme, J.R.; Forest, M.G.; Peretti, E.; Sempé, M.; Coller, R.; Bertrand, J.(10)
"	10,6	16,0	Presente estudo
A	8,6	14,5	Abraham, G.E.(2)
"	6,0	11,0-17,0	Schutz, S.K.; Levine, L.S.; New, M.I.(11)
"	7,0	9,0	Ducharme, J.R.(10)
"	6,4	11,3	Presente estudo
DHEA	9,9	12,6	Abraham, G.E.(2)
"	5,0	18,0-23,0	Schutz, S.K.; Levine, L.S.; New, M.I.(11)
"	10,0	10,0	Ducharme, J.R.(10)
"	8,4	14,2	Presente estudo

TABELA XXII

Valores normais de andrógenos plasmáticos comparados com os publicados anteriormente

Andrógenos	Média ± DP	Média ± DP	Referências
	ng/ml Homem	ng/ml Mulher	
T	5,59±1,5	0,48±0,2	Rivarola, M.A.; Migeon, C.J.(16,17)
"	4,90±1,6	0,22±0,07	Coyotupa, J.; Parlov, A.F.; Abraham, G.E.(9)
"	5,00±1,49	0,54±0,22	Anderson, P.H.; Fukushima, K.; Schieler, H.S.(6)
"	5,95±0,39	0,41±0,11	Attanasio, A.; Gupta, D.(7)
"	5,20±1,30	0,40±0,20	Presente estudo
DHT	0,50±0,14	0,22±0,04	Tremblay, R.R.; Beintin, I.Z.; Kowarski, A.; Migeon, C.J.(20)
"	—	0,19±0,08	Abraham, G.E.; Manlimos, F.S.(3)
"	0,57±0,06	0,14±0,018	Attanasio, A.; Gupta, D.(7)
"	0,26±0,15	0,20±0,13	Presente estudo
A	1,14±0,21	—	Rivarola and Migeon(17)
"	0,6 ±0,20	1,0 ±0,3	Leon, C.; Coronado, V.M.; Migeon, A.; Mateos, J.L.; Bermudez, J.A.(12)
"	—	0,53±0,12	Abraham, G.E.(3)
"	0,90±0,40	0,80±0,50	Presente estudo
DHEA	5,53±1,78	5,34±1,57	Rivarola and Migeon(16,17)
"	3,20±1,50	3,60±1,60	Buster, J.E.; Abraham, G.E.(2)
"	6,42±1,12	5,15±1,07	Attanasio, A.; Gupta, D.(7)
"	—	4,20±1,60	Abraham, G.E.(3)
"	5,32±1,34	4,03±2,16	Nieschlag, E.; Loriaux, D.L.; Lipsett, M.D.(15)
"	4,60±1,70	4,80±1,70	Presente estudo

T e DHT. Estes resultados são análogos aos descritos por Abraham⁽²⁾.

A análise de reprodutibilidade (tabela XVI) permitiu avaliar a precisão do método empregado, que mostrou ser boa (5-10%), com coeficiente de variação de 5,4% para (T+DHT), 5,9% para (T), 6,4% para (A), 10,6% para (DHT) e 8,4% para (DHEA), relativamente à reprodutibilidade intra-ensaio, sendo que para a reprodutibilidade interensaio o coeficiente de variação foi de 11,9% para (T+DHT), 10% para (T), 16,0% para (DHT), 11,3% para (A) e 14,2% para (DHEA), considerando adequadas (coeficiente de variação de 10 a 15%).

Para efeito de comparação, nossos dados e os correspondentes (com extração e coluna cromatográfica) estão indicados na tabela XXI.

A exatidão do método pode ser considerada excelente, pois o coeficiente de correlação (r) foi de 1,0 para (T+DHT) e (T); 0,967 para (DHT); 0,997 para (A) e 0,995 para (DHEA) — tabela XVII.

A técnica empregada foi portanto específica, comparável à descrita pelos autores mais experientes no campo, apresentando reprodutibilidade boa (intra-ensaio) e adequada (interensaio), com exatidão excelente. Nestas condições, os valores obtidos em indivíduos normais (tabela XVIII) foram comparáveis aos descritos por outros autores para métodos equivalentes (tabela XXII).

RESUMO

Padronizaram-se os métodos para dosagem dos esteróides androgênicos (T, DHT, A e DHEA) por radioimunoensaio,

usando pequenos volumes de plasma: T (0,2 e 0,5ml), DHT (1,0ml) A e DHEA (0,5ml) para homens e mulheres respectivamente.

A extração foi feita com éter etílico, o extrato sendo aplicado em mini-coluna de vidro com Sephadex LH-20 para separação da T e DHT e em alumina para purificação da DHEA.

Após a eluição e incubação com os anti-soros respectivos (T, DHT, A e DHEA), o radioimunoensaio era processado à temperatura de 40°C por 12 a 16 horas, seguido de separação das formas livres e ligadas ao anti-soro, com carvão dextrana T-70. As contagens foram realizadas em cintilador líquido.

A metodologia mostrou-se específica pela prova da diluição. A sensibilidade foi de 5pg para A e DHEA e 6pg para T e DHT. A

precisão mostrou-se boa, com coeficiente de variação de 5-10% para reprodutibilidade intra-ensaio e de 10-15%, adequada, para a reprodutibilidade inter-ensaio. A exatidão foi de $98,52 \pm 7,95\%$ para (T e DHT), $96,34 \pm 10,05\%$ para (T), $98,04 \pm 8,74\%$ para (DHT), $104,82 \pm 9,41\%$ para (A) e $103,66 \pm 5,71\%$ para (DHEA).

Os valores obtidos em indivíduos normais foram respectivamente em ng/ml: para homens (média \pm DP): T: $5,2 \pm 1,3$; DHT: $0,26 \pm 0,18$; A: $0,9 \pm 0,4$; e DHEA: $4,6 \pm 1,7$ e para mulheres T: $0,5 \pm 0,2$; DHT: $0,4 \pm 0,2$; A: $0,8 \pm 0,5$ e DHEA: $4,8 \pm 1,7$.

SUMMARY

Radioimmunoassay of androgens in plasma normal values in adults

A radioimmunoassay method have been developed for plasma T, DHT, A and DHEA. Plasma volumes usually employed were: 0.2ml and 0.5ml for men and women, respectively for T; 1.0ml from DHT and 0.5ml to A and DHEA.

After preliminary extraction with diethyl ether, the extracts were applied to Sephadex LH-20 microcolumns to separate T from DHT and to Al_2O_3 microcolumns purification of DHEA.

Following elution, the dried, purified extracts were incubated with specific antisera at temperature $40^\circ C$, overnight, the separation of antibody bound and free fractions being done on activated charcoal-dextrana T-70. The counting was done in a liquid scintillator.

Specificity studies have shown that the assays for all steroids were specific. The sensitivity was 5 pg for A and DHEA, 6 pg for T and DHT. The intra-assay coefficient of variation (C.V.) was 5-10% whereas the interassay precision had a CV of 10-15%. The accuracy was satisfactory with a recovery $98.5 \pm 7.95\%$ for T and DHT, $96.34 \pm 10.05\%$ for T, $98.04 \pm 8.74\%$ for DHT, $104.82 \pm 9.41\%$ for A and 103.66 ± 5.71 for DHEA.

The mean \pm SD of plasma T, DHT, A and DHEA concentrations in normal men and women determined by these methods were as follows: in males, T: $5.2 \text{ ng/ml} \pm 1.3$, DHT: 0.26 ± 0.18 , A: 0.9 ± 0.4 and DHEA: 4.6 ± 1.7 and in females: T: $0.5 \text{ ng/ml} \pm 0.2$, DHT: 0.4 ± 0.2 , A: 0.8 ± 0.5 and DHEA: 4.8 ± 1.7 .

REFERÊNCIAS

1. Abraham, G.E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol - 17B, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 866-70, 1969.
2. Abraham, G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials, *Acta. endocr. (Copenhagen)* 75 (Suppl. 183): 7-41, 1974.
3. Abraham, G.E., Manlinos, F.S. & Garza, R.: *Radioimmunoassay of steroids*. In Carson, Calif., Radioassay systems Laboratories, 1977, p. 591-656.
4. Achando, S.S., Wajchenberg, B.L. & Pieroni, R.R.: Avaliação do método de dosagem de pregnandiol urinário por cromatografia a gás, *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 33: 12-23, 1978.
5. Anderson, P.H.; Fukushima, K. & Schiller, H.S.: Radioimmunoassay of plasma testosterone, with use of polyethylene glycol to separate antibody bound and free hormone, *Clin. Chem.* 6: 708-14, 1975.
6. André, C.M. & James, V.H.T.: A method for the assay of testosterone and androstenedione in human female plasma by competitive protein binding, *Clin. Chim. Acta* 40: 325-33, 1972.
7. Attanasio, A. & Gupta, D.: Simultaneous radioimmunoassay of estrogens and androgens in plasma of prepubertal children. In Gupta, D., ed., *Radioimmunoassay of steroids hormones*, Weinheim, Chemie, 1975, p. 91-100.
8. Auletta, F.J., Caldwell, B.V. & Hamilton, G.L.: Androgens: testosterone and dihydrotestosterone. In Jaffe, B.M., ed., *Methods of hormone radioimmunoassay*, New York, Academic Press, 1974, p. 359-70.
9. Coyotupa, J., Parlow, A.F. & Abraham, G.E.: Simultaneous radioimmunoassay of plasma testosterone and dihydrotestosterone, *Anal. Lett.* 5(6): 329-40, 1972.
10. Ducharme, J.R., Forest, M.G., Peretti, E., Sempe, M., Coller, R. & Bertrand, J.: Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 468-76, 1976.
11. Kort-Schutz, S., Levine, L.S. & New, M.I.: Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42 (1): 117-24, 1976.
12. Leon, C., Coronado, V.M., Mijares, A., Mateos, J.L. & Bermudez, J.A.: Medición en plasma de androstenedione por radioimmunoanálisis utilizando anticuerpos obtenidos com un hapteno conjugado en el carbono 19, *Archiv. Invest. Med.* 5 (2): 75-88, 1974.
13. Linder, H.R., Perel, E., Friedlander, A. & Zeitlin, A.: Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier, *Steroids* 19: 357-75, 1972.
14. Midgley Jr., A.R., Niswender, G.D. & Rebar, R.W.: Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity), *Acta Endocr.* 142 (Suppl.): 163-84, 1969.
15. Nieschlag, E., Loriaux, D.L. & Lipsett, M.B.: Radioligand assay for A^5-3B -hidroxisteroids. 1-3B-hidroxi-5-androsterone-17-one and its 3-sulfate, *Steroids* 19 (5): 669-79, 1972.
16. Rivarola, M.A., Forest, M.G. & Migeon, C.J.: Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during and at delivery: concentration and protein binding, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 28: 34-40, 1968.
17. Rivarola, M.A. & Migeon, C.J.: Determination of testosterone and androst-4-ene-e, 17-dione concentration in human plasma, *Steroids* 7: 103-17, 1976.
18. Rodbard, D. & Frazier, G.R.: Statistical analysis of radioligand assay data, *Meth. Enzim.* 37: 3-22, 1975.
19. Setcheell, K.D.R. & Shackleton, C.H.L.: The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on sephadex LH-20, *Clin. Chim. Acta* 47: 381-8, 1973.
20. Tremblay, R.R., Beitins, I.Z., Kowarski, A. & Migeon, C.J.: Measurement of plasma dihydrotestosterone by competitive protein-binding analysis, *Steroids* 16: 29-40, 1970.