



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Níveis Séricos da Testosterona e da Globulina Ligadora dos
Esteroides Sexuais em Homens Saudáveis: Relação com a Idade,
Índice de Massa Corporal e Resistência Insulínica

Indianara Franciele Porgere

Porto Alegre, setembro de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Níveis Séricos da Testosterona e da Globulina Ligadora dos Esteroides Sexuais
em Homens Saudáveis: Relação com a Idade, Índice de Massa Corporal e
Resistência Insulínica

Indianara Franciele Porgere

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Pinho Silveiro

Coorientadora: Dr^a Fabíola Satler

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas: Endocrinologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, setembro de 2021

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o apoio de várias pessoas, as quais serei eternamente grata.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sandra Pinho Silveiro, por toda sua paciência e dedicação com que sempre me orientou neste trabalho. Agradeço pelo acolhimento que tive nesses quatro anos, desde a iniciação científica. E agradeço ainda mais por sempre nos incentivar, nos ensinar e apoiar. Sempre será minha grande inspiração.

À minha coorientadora, Dr.^a Fabíola Satler, por todo apoio, compreensão e dedicação para a realização deste trabalho. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário e por sempre me motivar. Certamente este trabalho não seria o mesmo sem a sua colaboração.

À minha família, por confiar e acreditar em mim. Obrigada pelo apoio incondicional e por vezes entender os motivos da minha ausência. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu colega e amigo, Dr. Gustavo M. Escott, por todos esses anos compartilhando conhecimento comigo e com o nosso grupo. Obrigada pela amizade e mais do que nunca, por me incentivar a continuar e a acreditar em mim. És um dos grandes responsáveis por minha paixão pela pesquisa que cresce cada dia mais.

Desejo igualmente agradecer a todos meus colegas do nosso grupo de pesquisa, em especial a nossa aluna de iniciação científica, Bruna Martins Rocha, que sempre esteve pronta para nos ajudar e tem papel muito importante neste

trabalho. Obrigada por ser essa aluna dedicada e por todo auxílio que nos deu durante esses dois anos. Tua participação foi fundamental.

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, sendo apresentada na forma de uma introdução sobre o tema, seguida de um artigo original contendo os resultados finais.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
RESUMO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUÇÃO E REFERENCIALTEÓRICO	11
<i>Testosterona</i>	<i>11</i>
<i>Globulina Ligadora De Hormônios Sexuais (SHBG).....</i>	<i>14</i>
<i>Testosterona Livre e Biodisponível</i>	<i>15</i>
<i>Impacto do Avanço da Idade nos Níveis de Testosterona e na SHBG</i>	<i>16</i>
<i>Associação entre a Obesidade e Resistência Insulínica com a Testosterona e SHBG.....</i>	<i>17</i>
<i>Análise Laboratorial da Testosterona e da SHBG</i>	<i>20</i>
REFERÊNCIAS.....	26

RESUMO

A testosterona é um hormônio esteroide que regula as funções reprodutivas masculinas, sendo transportada no plasma ligada a duas proteínas: a globulina ligadora de hormônios sexuais, do inglês *sex hormone-binding globulin* (SHBG) e a albumina. A ligação entre a testosterona e a SHBG torna-a indisponível aos tecidos, sendo os níveis de SHBG influenciados por diversos fatores hormonais, metabólicos e fisiológicos. A fração de testosterona circulante que não está ligada às proteínas plasmáticas, cerca de 1 a 4% da testosterona total (TT), é chamada de testosterona livre (TL), que, de acordo com a teoria do hormônio livre, é a forma ativa do esteroide. O termo testosterona biodisponível (Tbio) refere-se à fração da testosterona circulante que não está ligada à SHBG e representa a soma de TL com a fração ligada à albumina, sendo que a ligação com esta é mais fraca. Para o diagnóstico de hipogonadismo masculino, recomenda-se inicialmente a dosagem da testosterona total. No caso de valores no limite inferior da normalidade e na presença de fatores que possam afetar os níveis de SHBG, recomenda-se a análise da TL ou Tbio que, por dificuldades metodológicas são mais amplamente obtidas através de cálculos a partir dos valores de TT, SHBG e albumina. No entanto, existem ainda grandes obstáculos quanto à disponibilidade limitada de valores normativos para estes hormônios, ressaltando a necessidade de atualizar intervalos de referências que sejam confiáveis, rastreáveis e representativos da população que se pretende avaliar.

O presente estudo teve como objetivos:

- a) Analisar os níveis da testosterona total e frações e SHBG em homens saudáveis e avaliar a influência da idade, índice de massa corporal (IMC) e da resistência insulínica sobre esses resultados.
- b) Estudar o uso de valor fixo pré-estabelecido de albumina ou a necessidade da dosagem desta proteína para o cálculo da TL.
- c) Estabelecer intervalos de referência da testosterona total, livre e biodisponível e SHBG para homens adultos de acordo com a faixa etária.

Foram incluídos 140 homens saudáveis, não obesos, com idade média de 41 ± 13 anos (18-67 anos), sendo 79% brancos. Após a divisão da amostra em tercios de idade, sem haver diferenças relevantes nos parâmetros metabólicos entre

os 3 grupos, os níveis de SHBG encontrados no tercil superior (>50 anos) foram mais elevados em comparação aos dos grupos mais jovens. A dosagem da TT foi semelhante nos três grupos, porém foi encontrada diferença significativa na TL calculada e na Tbio, sendo as dosagens mais baixas no tercil superior comparadas aos outros tercís. Resultados obtidos a partir de regressão linear múltipla mostraram que a SHBG aumenta 0,6 nmol/L por ano enquanto a TL e a Tbio diminuem respectivamente 0,08 e 2,3 ng/dL a cada ano de vida. A SHBG e a TT também diminuem a cada aumento no índice de resistência à insulina (triglicérides/HDL); 1,7 nmol/L e 18,5 ng/dL, respectivamente. Devido à idade >50 anos ter apresentado diferença estatística tanto para a SHBG como para TL e Tbio, analisamos seus percentis, a fim de propormos novos valores de referência (VR) para homens adultos (percentil 2,5 e 97,5). Os VR de SHBG foram definidos como 16-57 nmol/L para homens de 18-50 anos e de 21-82 nmol/L para as idades de 51-67 anos. Para a TLc, os VR foram de 5-16 ng/dL e de 4-11 ng/dL, respectivamente. A TT não foi afetada pela idade, sendo os VR para o grupo total de 206-805 ng/dL. Além disso, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao analisarmos o cálculo da TL usando valor fixo de albumina de 4,3 g/dL conforme proposto por Vermeulen vs. o valor da albumina medida no voluntário, mas não encontramos diferença entre os dois cálculos quando usado o valor fixo de albumina em 4,8 g/dL.

Em conclusão, existe variação das dosagens de SHBG, TL e Tbio com a idade, indicando a necessidade da obtenção de valores de referência diferenciados. Os valores de TT não se mostram reduzidos com a idade, possivelmente devido ao aumento da SHBG e à população ter limite máximo de 67 anos. Para o cálculo da TL, sugerimos que seja utilizada a medida da albumina dosada simultaneamente à TT e SHBG, ou na falta desta dosagem, que seja usado o valor de 4,8 g/dL. As variações encontradas entre diferentes populações para valores de referência utilizados, distintos métodos, unidades de medida entre outros, realça a importância da harmonização dos intervalos de referência e unidades de medidas utilizadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

CBG	Globulina Ligadora de Corticoesteroide
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CPC	Centro de Pesquisa Clínica
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECLIA	Eletroquimioluminescência
FSH	Hormônio folículo-estimulante
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1C	Hemoglobina Glicada
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPLC/MS-MS	Cromatografia líquida de alta performance com espectrômetro de massas
IMC	Índice de Massa Corporal
IRI	Índice de resistência à insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína c-reativa
RIE	Radioimunoensaio
SHBG	Globulina Transportadora de Hormônios Sexuais
Tbio	Testosterona biodisponível
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TL	Testosterona Livre
TLc	Testosterona Livre calculada
TG	Triglicerídeos
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TT	Testosterona total

LISTA DE FIGURAS

Introdução e Referencial Teórico

Figura 1 – Biossíntese da Testosterona nos testículos.....	12
Figura 2 – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo	13
Figura 3 – Representação esquemática da testosterona total e suas frações .	14
Figura 4 – Relação entre os níveis de testosterona, obesidade e resistência insulínica	19
Figura 5 – Gráfico de Bland-Altman representando a relação entre as duas dosagens de testosterona total e testosterona livre (ECLIA/HPLC/MS-MS)	22
Anexo 1 – Laudos de SHBG e hormônios sexuais do laboratório interno (HCPA) e laboratório externo.....	23

INTRODUÇÃO E REFERENCIALTEÓRICO

Na circulação, a testosterona, assim como os outros hormônios esteroides, é ligada a proteínas as quais desempenham um importante papel no seu transporte, distribuição, metabolismo e atividade biológica. A determinação de valores normais de testosterona ligada ou não ligada às proteínas e, conseqüentemente, das próprias proteínas, é central para o diagnóstico e tratamento das disfunções do aparelho reprodutor masculino (1).

Testosterona

A testosterona é um hormônio esteroide que determina e regula as funções reprodutivas masculinas, como o desenvolvimento e a manutenção dos caracteres sexuais masculinos, a espermatogênese e a atividade sexual. Também atua como hormônio anabólico, além de ter efeitos sobre o comportamento (1).

É sintetizada a partir do colesterol pelas células intersticiais de Leydig, localizadas nos testículos, através de uma cadeia enzimática até a sua forma final. Nos testículos, uma pequena porcentagem da testosterona é aromatizada em estradiol (Figura 1) (2).

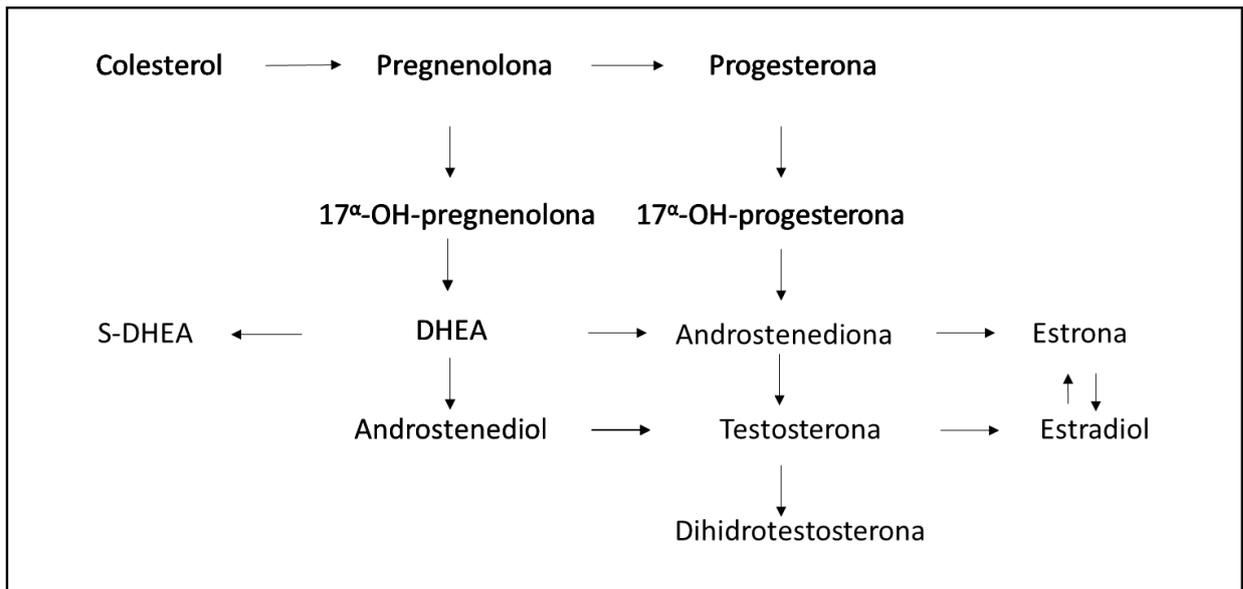


Figura 1 - Biossíntese da testosterona nos testículos. DHEA: Dehidroepiandrosterona; S-DHEA: Sulfato de Dehidroepiandrosterona. Adaptado de Gebara et al 2002 (3).

A síntese de testosterona é regulada pela ação do hormônio luteinizante (LH), predominando em três períodos distintos da vida masculina: o primeiro trimestre da vida intrauterina, o período neonatal e a partir da puberdade, diminuindo após, de acordo com a idade (2).

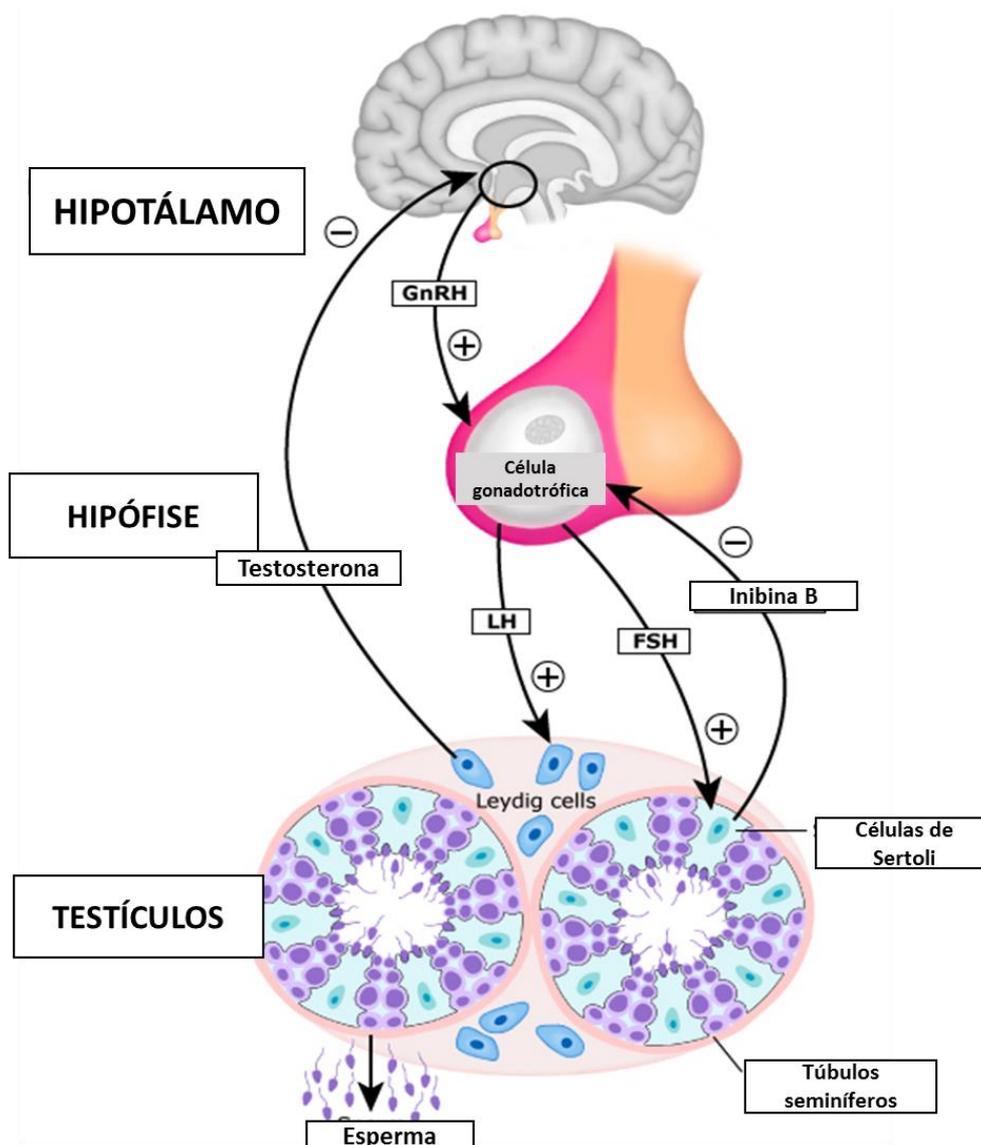


Figura 2. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Testículo Adaptado de Uptodate: Clinical features and diagnosis of male hypogonadism (4).

As concentrações sanguíneas de testosterona podem sofrer grandes oscilações durante as horas do dia. Elas têm seu pico por volta das 6:00h às 8:00h da manhã, sofrem declínio de até 35% durante o dia, até começarem a aumentar novamente no decorrer da noite (2,5).

A maior parte da testosterona é transportada no plasma ligada a duas proteínas: a globulina ligadora de hormônios sexuais, do inglês *sex hormone-binding globulin* (SHBG) e a albumina. Além destas, sabe-se que a testosterona também possui ligação fraca com a globulina ligadora de corticosteroide, do inglês

corticosteroid-binding globulin (CBG) e com a alfa-1-glicoproteína ácida ou orosomucoide. Entretanto, o papel destas proteínas na biodisponibilidade da testosterona ainda é pouco conhecido, não sendo consideradas nos modelos matemáticos para estimativa da fração livre de testosterona (1). Estima-se que em homens adultos jovens, cerca de 45% da testosterona está ligada à albumina, 52% ligada à SHBG e entre 1 e 4% está em sua forma livre (1). (Figura 3).

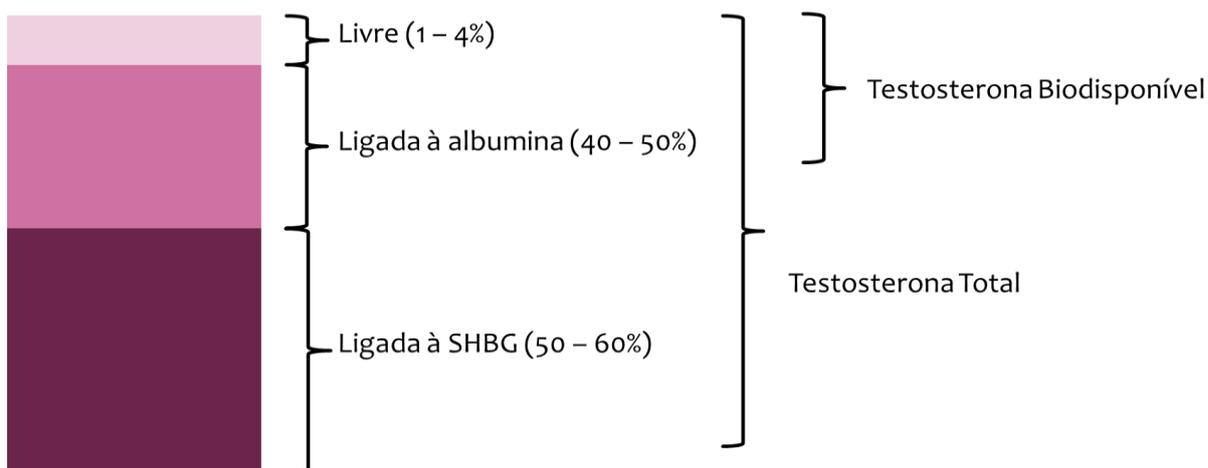


Figura 3 – Representação esquemática da testosterona total e suas frações (2).

A testosterona total (TT) se refere à soma das concentrações de testosterona ligada e não ligada às proteínas em circulação. A fração de testosterona circulante que não está ligada a nenhuma proteína plasmática é chamada de testosterona livre (TL), que, de acordo com a teoria do hormônio livre, é a forma ativa do esteroide. A alta afinidade de ligação entre a testosterona e a SHBG torna-a indisponível aos tecidos. O termo testosterona biodisponível (Tbio) refere-se à fração de testosterona circulante que não está ligada à SHBG e representa a soma de TL com a fração ligada à albumina, uma vez que a ligação com esta é mais fraca (1).

Globulina Ligadora De Hormônios Sexuais (SHBG)

A SHBG é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 90 kDa que foi primeiramente identificada por *Mercier et al* em 1966, após análise de eletroforese (6). Ela é predominantemente sintetizada no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde se liga aos esteroides sexuais com alta afinidade, sendo

um importante determinante da distribuição da testosterona circulante em suas frações ligada e livre (7).

A produção hepática de SHBG é afetada pela interação de diversos fatores hormonais e metabólicos e sua concentração é influenciada por várias condições fisiológicas e patológicas (8). Sabe-se que, dentre outras situações, a sua concentração está diminuída na obesidade, hipotireoidismo não tratado, diabetes tipo 2 (DM2), acromegalia, administração de androgênios e glicocorticoides e é aumentada pela idade, uso de estrogênio, hipertireoidismo não tratado, gravidez e na cirrose hepática (1). A presença de síndrome nefrótica e doença hepática grave reduzem os níveis de SHBG, por perda urinária e diminuição da produção, respectivamente (9).

A afinidade da SHBG pela testosterona pode diferir devido a polimorfismos genéticos (10,11) ou devido às concentrações plasmáticas da SHBG. Foram observadas constantes de associação diferenciadas quando as concentrações plasmáticas da SHBG estão muito baixas (<15 nmol/L) ou elevadas (>100 nmol/L) (12).

Testosterona Livre e Biodisponível

Considerando que a ligação da testosterona às proteínas influencia na biodisponibilidade tecidual e na taxa de depuração do esteroide, as dosagens de testosterona livre ou fracamente ligada (biodisponível) tornam-se importantes. A Endocrine Society recomenda que a TL ou a Tbio sejam avaliadas em homens com concentração de TT no limite inferior da normalidade e com suspeita de alteração nos valores de SHBG (13).

Os métodos considerados como padrão-ouro para a dosagem de TL são a diálise de equilíbrio ou análise de espectrometria de massa, porém são métodos complexos, dificultando seu amplo uso na prática diária. A fim de amenizar essas dificuldades, foram propostos imunoenaios analógicos que detectam a TL, porém são amplamente criticados pela falta de precisão e variabilidade dos resultados (14). A Tbio pode ser medida através do método de precipitação com sulfato de amônio ou do método da concanavalina A (1).

Tendo em vista as dificuldades para a obtenção da medida das frações de testosterona, diferentes fórmulas estão disponíveis para calcular a TL e Tbio.

Algumas utilizam algoritmos baseados em modelos lineares de ligação da testosterona com a SHBG, (15,16). Outras utilizam equações de predição matemática empíricas (17) ou ainda baseadas em modelos não lineares (18). No entanto, parece haver variações significativas quando se comparam os resultados de TL dosada através do método padrão-ouro e da testosterona livre calculada (TLc). Esta diferença provavelmente se deve a fatores biológicos como a variabilidade interindividual das concentrações de hormônios concorrentes e suas proteínas de ligação, da afinidade da testosterona por SHBG, além das diferentes metodologias utilizadas nas dosagens de testosterona e SHBG (19). Vale salientar que, até o momento, não existe um consenso sobre qual a melhor equação para se obter resultados de TL, sendo atualmente a mais utilizada a de Vermeulen (13).

Assim como a SHBG, a albumina também tem grande importância na realização do cálculo de TL e sua medida torna-se bastante relevante. Com base nisso, Vermeulen et al. estudaram a influência das variações da concentração de albumina nos valores de TLc e mostraram ser possível a utilização de um valor de albumina pré-estabelecido de 4,3 g/dL, exceto quando estivesse lidando com anormalidades marcadas na composição de proteínas plasmáticas, como síndrome nefrótica ou cirrose hepática, onde a concentração real de albumina deverá ser levada em consideração (14).

Impacto do Avanço da Idade nos Níveis de Testosterona e na SHBG

Estima-se que a concentração sérica de testosterona seja constante até a quarta década de vida, quando começa a declinar a uma taxa de aproximadamente 0,5-1% ao ano (20). Estudos em homens mais velhos demonstraram declínios progressivos nos androgênios circulantes e concentrações mais altas de LH (21-23). Na maioria dos homens idosos, as concentrações de testosterona em declínio gradual permanecem ainda dentro da faixa fisiológica, sem mostrar evidências claras de deficiência de androgênio (24). No entanto, uma minoria (1%-2% da população geral) de homens idosos (com idade ≥ 70 anos) mostra comprometimento progressivo da função testicular com baixa testosterona, LH elevado, múltiplos sintomas sexuais e sintomas físicos compatíveis com deficiência androgênica (25,26).

Estudos apontam para a relação de declínio de testosterona com o envelhecimento, independente de outras variações, como IMC, tabagismo, atividade física, ingestão de álcool e cafeína (27). No entanto, outros autores não encontram essa associação (28,29), sendo os achados divergentes possivelmente atribuíveis a fatores étnicos ou características específicas das coortes (30). Segundo Orwolle et al, as formas biologicamente ativas de T, ou seja, a TL e Tbio, diminuem em uma taxa maior do que a TT durante o envelhecimento (31). Devido às concentrações de SHBG aumentarem com a idade, os níveis de TL tendem a decair mais rapidamente do que os de testosterona total (19,30).

As razões pelas quais a SHBG aumenta com a idade ainda não estão completamente esclarecidas. O estudo European Male Study demonstrou que a média de SHBG aumenta em aproximadamente 50% dos 40 aos 75 anos, com uma taxa de aumento maior após os 50 anos (32). Dados *in vitro* em células do fígado mostram que o IGF-1, do inglês *insulin-like growth factor 1*, pode ser um regulador negativo da síntese de SHBG. Foi proposto que a diminuição do IGF-1 relacionada ao envelhecimento reduza o efeito inibitório, sendo causa do aumento de SHBG. O aumento de SHBG também pode estar relacionado com o aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, que parece estimular a síntese de SHBG (33).

Associação entre a Obesidade e Resistência Insulínica com a Testosterona e SHBG

A deficiência de testosterona pode contribuir para várias condições e doenças crônicas, como síndrome metabólica, obesidade e resistência à insulina (RI) (34). Alguns estudos já demonstraram que a manutenção de concentrações fisiológicas de testosterona poderia ser cardioprotetora e que a sua deficiência em pacientes diabéticos está relacionada ao risco de desfechos cardiovasculares. Isto porque no DM há uma elevação nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), ao passo que na deficiência de testosterona isso também ocorre, juntamente com uma diminuição nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (35).

A redução da biodisponibilidade em homens cria um círculo vicioso, onde baixas concentrações de testosterona podem contribuir para o acúmulo de gordura

abdominal e reduzir a lipólise dessa região (36). No tecido adiposo, há aromatização da testosterona em estradiol, devido ao aumento das citocinas inflamatórias. A obesidade também se associa a níveis de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) geralmente baixos ou anormais. Estas alterações sugerem uma supressão do eixo hipotálamo-hipófise-testicular, através de feedback negativo que inibe a secreção das gonadotrofinas hipofisárias (37). Sabe-se que a obesidade está ligada à resistência à insulina e está associada à redução da síntese e da secreção da SHBG pelo fígado, reduzindo valores de TT (38).

Embora os mecanismos da produção de SHBG ainda não estejam totalmente esclarecidos, os baixos níveis de SHBG são frequentemente observados em estados de resistência à insulina, como na síndrome dos ovários policísticos, DM2 e obesidade. Inclusive seus níveis foram estudados como possível preditor do desenvolvimento de DM2 em populações com excesso de peso (39-41). Os baixos níveis de SHBG também predizem alto risco de desenvolver síndrome metabólica, obesidade, resistência à insulina e redução nos níveis de testosterona plasmática (42), estando todos interligados, como mostra a Figura 4. Resultados de vários estudos *in vitro* (43) e *in vivo* (44) evidenciaram a insulina como supressora da produção hepática de SHBG. Outro estudo demonstrou que a produção hepática é inibida pelos lipídios hepáticos e pelo fator de necrose tumoral α , mais do que pela insulina diretamente. Assim, os baixos níveis de SHBG vistos em pacientes com obesidade e diabetes estariam mais associados à inflamação de baixo grau e ao aumento das quantidades hepáticas de gordura do que ao hiperinsulinismo (45). Outras pesquisas sugerem que o excesso de consumo de carboidratos e os níveis de glicemia em jejum, ao invés da hiperinsulinemia, seriam os determinantes reais da produção de SHBG hepática (46).

Um estudo demonstrou haver uma correlação negativa entre a SHBG e os índices de síndrome metabólica, tais como IMC, circunferência da cintura e triglicerídeos, assim como em pacientes com DM2. Neste estudo foi demonstrado também que, apesar da relação da baixa testosterona com SHBG no DM2, houve uma maior correlação da obesidade abdominal, independente do estado de diabetes (47), reforçando a forte correlação de baixos níveis de SHBG e obesidade.

A hiperinsulinemia secundária à resistência à insulina na obesidade leva a uma diminuição nos níveis de testosterona total relacionada com diminuição nos níveis de SHBG, resultantes da diminuição da síntese hepática dessa proteína, ou de uma diminuição da testosterona livre, implicando no declínio da produção de testosterona (47).

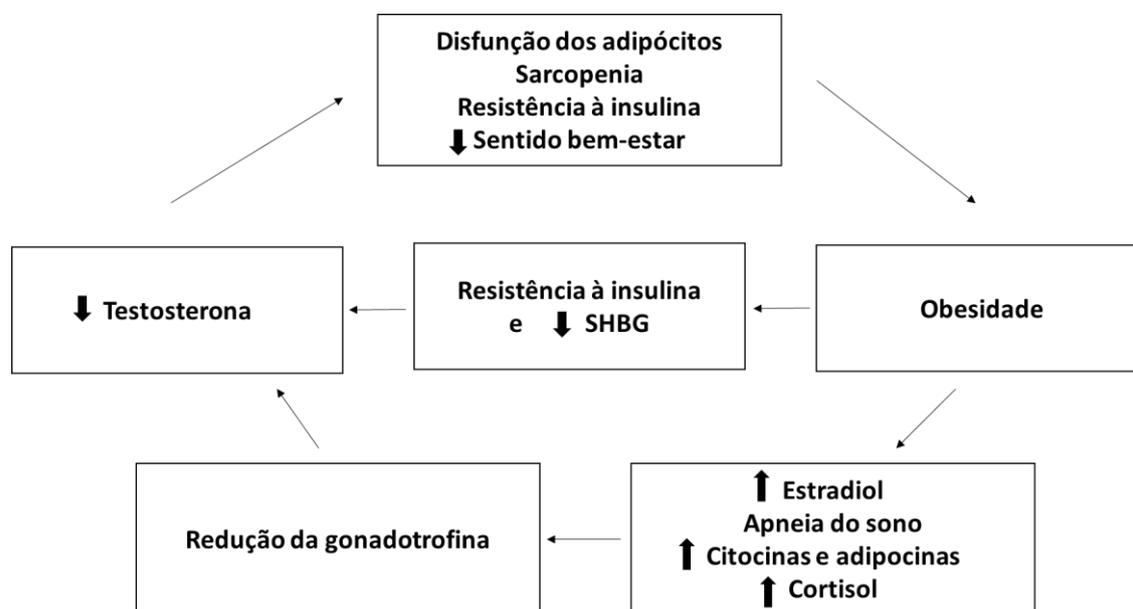


Figura 4 – Relação entre os níveis de testosterona, obesidade e resistência insulínica. Adaptado de Fui et al.2014 (37).

A RI representa uma alteração metabólica de etiologia genética e ambiental que se caracteriza pela resposta anormal dos tecidos periféricos à ação da insulina. O melhor método para determinar a RI é a técnica de *clamp euglicêmico hiperinsulinêmico*, porém, por ser altamente invasiva, é utilizada apenas em pesquisa clínica (48). Outra forma de obter este resultado é através do índice de HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*), o qual apresenta forte correlação com o clamp (49). Outras possibilidades para determinar a RI foram avaliadas a fim de encontrar uma forma mais acessível e alternativa na prática clínica (50). As concentrações plasmáticas de triglicerídeos (TG) e colesterol-HDL estão independentemente associadas à sensibilidade à insulina, portanto, a razão da concentração plasmática de TG/HDL é relacionada a uma medida direta de eliminação de glicose mediada por insulina (50,51). Vasques et al. concluíram que a relação TG/HDL foi o melhor indicador bioquímico do perfil lipídico na avaliação de níveis mais elevados de HOMA-IR sugerindo que

esta relação pode ser utilizada para avaliação da RI como um instrumento alternativo e de fácil acesso na prática clínica (52).

Análise Laboratorial da Testosterona e da SHBG

A medida da TT no soro fornece suporte bioquímico para a avaliação dos níveis de androgênio. Entretanto, quando há alteração nos níveis de SHBG, a mensuração de TT pode ser incorreta, havendo necessidade de avaliação da fração livre. Dessa forma, é possível uma melhor interpretação dos níveis séricos de T ativa. Como já mencionado, as metodologias para dosagem direta da testosterona livre ou biodisponível não são amplamente disponíveis, havendo necessidade da dosagem da testosterona total e da SHBG para aplicação no cálculo da testosterona livre (14).

Para isso, deve ser dada atenção especial aos erros associados às dosagens, sendo estes em etapas pré-analíticas e analíticas (metodológicos). Quanto aos fatores pré-analíticos, devem ser consideradas as variações fisiológicas, como aquelas induzidas pela dieta, ritmo circadiano, estresse físico ou emocional, doenças não endócrinas e efeitos gerados por medicações hormonais (53). A alimentação e o horário do dia podem afetar os níveis circulantes de TT, cujo pico ocorre de manhã, com uma queda substancial no período da noite. Considerando tais aspectos, os níveis basais de TT devem ser aferidos após uma noite normal de sono, em jejum e entre as 7:00h e 10:00h (54). Dentro das variações, temos aquelas induzidas pelo estresse físico, como condições que levam ao aumento de proteínas plasmáticas e acabam alterando os hormônios que são ligados a elas e o exercício físico de alta intensidade, que leva a uma série de alterações laboratoriais, podendo induzir alterações nos ritmos hormonais (55). Ainda dentro de erros pré-analíticos, podemos dar atenção aos erros que ocorrem durante a coleta do material biológico, como por exemplo, os tipos de tubos utilizados. Sabe-se que a SHBG circula como um homodímero e, os íons de cálcio e zinco são extremamente necessários para manter essa ligação (56), sendo assim, os agentes quelantes, como o EDTA (anticoagulante) podem dissociar o dímero SHBG e quebrar essa ligação, logo, é importante que a coleta do material seja realizada em tubos que não contenham anticoagulantes para não haver contaminação da amostra (57).

As metodologias hoje disponíveis para dosagem de testosterona e SHBG na maioria dos laboratórios não possuem um padrão, sendo a razão pela qual os valores medidos não são rastreáveis (58). A Endocrine Society recomenda dosagem de testosterona confirmatória por método de espectrometria de massa que oferece maior precisão do que a maioria dos imunoenaios ou, na indisponibilidade desta, dosagem verificada por um programa de controle de qualidade externo baseado em precisão (13).

Vieira JG et al. fizeram uma análise comparando os métodos eletroquimioluminescência (ECLIA) e cromatografia líquida de alta performance com espectrômetro de massa (HPLC/MS-MS). Ao comparar os resultados da testosterona total nos dois métodos, encontrou valores discrepantes entre testosterona no ECLIA e com HPLC/MS-MS, especialmente observados nas concentrações mais baixas. A visualização deste fenômeno é mais clara com o emprego do gráfico de Bland-Altman (Figura 5), que compara as médias entre as duas dosagens e a relação entre elas, com a dispersão maior entre os valores mais baixos e o predomínio de valores mais elevados com o ECLIA. O encontro de algumas amostras com valores mais baixos no ECLIA do que com HPLC/MS-MS muito provavelmente se deve à menor acurácia do primeiro. O autor sugere que seja considerada a dosagem em métodos de referência quando os valores por ECLIA forem alterados (59).

Outra forma de se obter valores de testosterona livre é através da dosagem de testosterona salivar, isso porque é possível determinar quantitativamente a fração da testosterona que é livre e atuante no organismo. Quando comparamos com o meio padrão, ou seja, a dosagem no soro/plasma, o uso da saliva pode eliminar por exemplo, o estresse da punção venosa, além disso, a coleta salivar é facilmente aceitável, não invasiva e requer um treinamento mínimo, facilitando assim a coleta de várias amostras até mesmo para averiguar as variações biológicas de cada indivíduo (60). Outro ponto positivo para a dosagem de testosterona salivar é o fato de que esta, em contraste com a testosterona sérica dosada no soro, não ser afetada por variações SHBG e albumina, logo, medir a testosterona salivar pode fornecer a oportunidade de avaliar diretamente as concentrações de testosterona no “tecido”, podendo ser um índice mais preciso e alternativa para obtenção de valores de testosterona livre (61). No momento ainda não é um método amplamente disponível.

Em relação à SHBG, o método mais utilizado para dosagem é a quimioluminescência. É um método que teve mais popularidade nos últimos 30 anos, se tornando uma alternativa ao radioimunoensaio. Quando se trata de dosagens hormonais, é um método que não necessita de duplicatas, não requer uso de marcadores radioativos e é realizado por um sistema totalmente automatizado, diminuindo assim erros relacionados à pipetagem e preparação dos reagentes, além disso, é um método tão preciso quanto o radioimunoensaio e mais sensível que o ELISA (62,63). Sendo assim, é um método preciso e de baixo custo para a dosagem de SHBG, sendo utilizado na maioria dos laboratórios brasileiros.

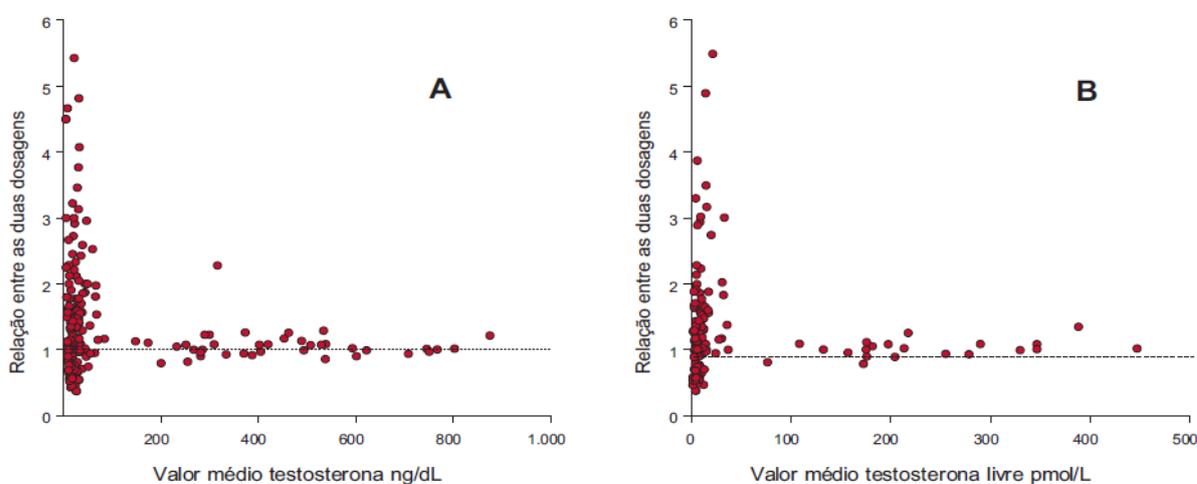


Figura 5 – Gráfico de Bland-Altman representando a relação entre as duas dosagens de testosterona total e suas médias (A) e a mesma relação entre a testosterona livre calculada com os dois métodos e respectivas médias (B). Jose Gilberto Vieira, 2008 (59).

A determinação de hormônios esteroides em humanos tem passado por grandes atualizações tecnológicas. No entanto, ainda se tem grandes limitações quanto à disponibilidade limitada de valores normativos mostrando existir necessidade em atualizar os intervalos de referência confiáveis e rastreáveis (64). Esses valores normativos e intervalos de referência são de extrema importância, uma vez que sua interpretação poderá determinar a condição patológica do indivíduo. Contudo, na prática, existem condições em que os resultados destes testes laboratoriais não se enquadram dentro dos limites de referência definidos como normais e, apesar disso, o paciente não apresenta determinada condição patológica (53). Um dos motivos é não haver valores definidos para a população a

ser analisada, sendo utilizados os valores sugeridos pelo fabricante dos reagentes. A questão principal a ser analisada é se os intervalos de referência gerados em uma única população de homens podem ser aplicados de forma ampla para homens de outras regiões/populações.

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o método utilizado para a dosagem da TT é a eletroquimioluminescência. O Anexo 1 mostra laudos atuais de dosagens de testosterona total, SHBG e da testosterona livre calculada do laboratório do HCPA e de outros laboratórios nacionais. Notamos que no HCPA os valores de SHBG não são especificados por idade e, neste laudo atual, a testosterona total está subdividida por idade, em grupo <50 anos e >50 anos, o que é bastante controverso. Além disso, nota-se que a testosterona total e a livre possuem diferentes unidades de medidas. Ao analisarmos laudos de laboratórios externos ao HCPA, notamos nítidas diferenças entre os laudos, tanto para valores de referência como para as unidades de medidas utilizadas.

A implementação de métodos com processos preparados por HPLC e medida por espectrometria de massa implicaria em investimentos elevados, tanto para profissionais capacitados como para instalações e equipamentos, incompatível para a maioria dos laboratórios. Dada às limitações dos métodos empregados, ressaltamos a importância de reavaliar os valores de referência de acordo com dados locais e fracionados por idade, conforme necessário, para SHBG, testosterona total e da testosterona livre calculada.

Anexo 1 – Laudos de SHBG e hormônios sexuais do laboratório interno (HCPA) e laboratório externo.

a) SHBG:

- Laboratório interno (HCPA)

GLOBULINA CARREADORA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS-SHBG: 17,50 nmol/L
Método: Quimioluminescência
Valores de referência 13.5 a 71.4 nmol/L

- Laboratório externo 1

GLOBULINA LIGADORA DE HORMÔNIOS SEXUAIS - SHBG

MÉTODO: QUIMIOLUMINESCÊNCIA

RESULTADO: nmo1/L

VALORES DE REFERÊNCIA: HOMEM DE 21 A 49 ANOS: DE 14,6 A 94,6 nmo1/L
 HOMEM DE 50 A 89 ANOS: DE 21,6 A 113,1 nmo1/L

- Laboratório externo 2

VALOR REFERÊNCIA

Homens de 20 a 70 anos.....: 13,2 a 89,5 nmo1/L
 Mulheres de 20 a 46 anos.....: 18,2 a 135,7 nmo1/L
 Mulheres de 47 a 91 anos (Pós-Menopausa): 16,8 a 125,2 nmo1/L

b) Testosterona Total

- Laboratório interno (HCPA)

Material SANGUE

TESTOSTERONA TOTAL: 3,53 ng/mL

Método: Eletroquimioluminescência por Competição

Valores de referência:

Homens de 20 a 49 anos: 2,49 - 8,36 ng/mL
 > 50 anos: 1,93 - 7,40 ng/mL
 Mulheres de 20 a 49 anos: 0,08 - 0,48 ng/mL
 > 50 anos: 0,03 - 0,41 ng/mL

- Laboratório externo 1

MÉTODO: QUIMIOLUMINESCÊNCIA

RESULTADO: ng/dL

VALORES DE REFERÊNCIA: ADULTOS: HOMEM : DE 165 A 753 ng/dL
 MULHER : DE 12 A 60 ng/dL

- Laboratório externo 2

VALOR REFERÊNCIA

Homens 18 a 66 anos.: 175,00 a 781,00 ng/dL
Mulheres 21 a 73 anos: 10,00 a 75,00 ng/dL

* Valores de referência não estabelecidos para idades inferiores a 18 anos do sexo masculino e inferiores a 21 anos para o sexo feminino.

c) Testosterona Livre

- Laboratório interno (HCPA)

Material SANGUE

TESTOSTERONA LIVRE: 6,73 ng/dL

Método: Cálculo, conforme referência bibliográfica

Valores de referência: Homens: 0,384 a 3,417 ng/dL

Mulheres: 0,0001 a 0,701 ng/dL

- Laboratório externo 1

TESTOSTERONA LIVRE CALCULADA

MÉTODO: CÁLCULO BASEADO NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA TOTAL E SHBG, SEGUNDO VERMEULEN, A. ET AL., 1999.

RESULTADO: ng/dL

VALORES DE REFERÊNCIA:

HOMEM DE 21 A 49 ANOS : DE 3,03 A 14,80 ng/dL
HOMEM DE 50 A 89 ANOS : DE 1,81 A 10,20 ng/dL

- Laboratório externo 2

Homens:

17 a 40 anos: 3,400 a 24,600 ng/dL

41 a 60 anos: 1,670 a 18,300 ng/dL

61 a 90 anos: 1,860 a 19,000 ng/dL

Mulheres

Fase folicular.....: 0,180 a 1,680 ng/dL

Meio do ciclo.....: 0,300 a 2,340 ng/dL

Fase lútea.....: 0,170 a 1,870 ng/dL

Pós menopausa (sem reposição): 0,190 a 2,060 ng/dL

Pós menopausa (com reposição): 0,100 a 1,640 ng/dL

Abaixo de 17 anos: Sem valor de referência definido

REFERÊNCIAS

1. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A reappraisal of testosterone's binding in circulation: Physiological and clinical implications. Vol. 38, *Endocrine Reviews*. Oxford University Press; 2017. p. 302–24.
2. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. Vol. 26, *Endocrine Reviews*. 2005. p. 833–76.
3. Gebara OCE, Vieira NW, Meyer JW, Calich ALG, Tai EJ, Pierri H, et al. Efeitos Cardiovasculares da Testosterona. *Arq Bras Cardiol*. 2002 Dec;79(6):644–9.
4. Snyder PJ, Matsumoto AM, Martin KA. Clinical features and diagnosis of male hypogonadism. In: *UpToDate*, 2020. Accessed August 11, 2021.
5. Hickson RC, Hidaka K, Foster C, Falduto MT, Chatterton RT. Successive time courses of strength development and steroid hormone responses to heavy-resistance training. *J Appl Physiol*. 1994;76(2):663–70.
6. Mercier C, Alfsen A, Baulieu E-E. A testosterone binding globulin. In: *Proceedings of the Second Symposium on Steroid Hormones*; 1965; Ghent, Belgium. *Excerpta Medica International Congress Series*. 1966;101:212.
7. Midzak AS, Chen H, Papadopoulos V e Zirkin B. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299 (2009) 23-32.
8. Rosner W. Free estradiol and sex hormone-binding globulin. Vol. 99, *Steroids*. Elsevier Inc.; 2015. p. 113–6.
9. Blikle D. The Free Hormone Hypothesis: When, Why, and How to Measure the Free Hormone Levels to Assess Vitamin D, Thyroid, Sex Hormone, and Cortisol Status. *JBMR PLUS (WOA)*, Vol.5, No. 1, January 2021, e10418.
10. Ohlsson C, Wallaschofski H, Lunetta KL, Stolk L, Perry JRB, Koster A, et al. Genetic determinants of serum testosterone concentrations in men. *PLoS Genet*. 2011 Oct;7(10).
11. Wu TS, Hammond GL. Naturally occurring mutants inform SHBG structure and function. *Mol Endocrinol*. 2014;28(7):1026–38.
12. Giton F, Fiet J, Guéchet J, Ibrahim F, Bronsard F, Chopin D, et al. Serum bioavailable testosterone: Assayed or calculated? *Clin Chem*. 2006;52(3):474–81.
13. Bhasin S, Brito PJ, Cunningham GR., et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: Na Endocrine Society*Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, May 2018, 103(5);1715-1744.
14. Slaats EH, Kennedy JC, Kruijswijk H. Interference of sex-hormone binding globulin in the "Coat-A-Count" testosterone no-extraction radioimmunoassay. *Clin Chem*. 1987 Feb;33(2 Pt 1):300-2. PMID: 3802514.
15. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3666–72.
16. Södergard R, Bäckström T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem*. 1982;16(6):801–10.

17. Ly LP, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 471-472.
18. Zakharov MN, Bhasin S, Travison TG, Xue R, Ulloor J, Vasani RS, et al. A multi-step, dynamic allosteric model of testosterone's binding to sex hormone binding globulin. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jan 5;399:190–200.
19. Hackbarth JS, Hoyne JB, Grebe SK, Singh RJ. Accuracy of calculated free testosterone differs between equations and depends on gender and SHBG concentration. *Steroids* [Internet]. 2011;76(1–2):48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.08.008>
20. Handelsman DJ, Yeap BB, Flicker L, Martin S, Wittert GA, Ly LP. Age-specific population centiles for androgen status in men. *Eur J Endocrinol*. 2015 Dec 1;173(6):809–17.
21. Hsu B, Cumming RG, Hirani V, Blyth FM, Naganathan V, Le Couteur DG, et al. Temporal trend in androgen status and androgen-sensitive outcomes in older men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Apr 1;101(4):1836–46.
22. Ahern T, Swiecicka A, Eendebak RJA, Carter EL, Finn JD, Pye SR, et al. Natural history, risk factors and clinical features of primary hypogonadism in ageing men: Longitudinal Data from the European Male Ageing Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016 Dec 1;85(6):891–901.
23. Yeap BB, Manning L, Chubb SAP, Handelsman DJ, Almeida OP, Hankey GJ, et al. Progressive impairment of testicular endocrine function in ageing men: Testosterone and dihydrotestosterone decrease, and luteinizing hormone increases, in men transitioning from the 8th to 9th decades of life. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018 Jan 1;88(1):88–95.
24. Cheetham TC, An JJ, Jacobsen SJ, Niu F, Sidney S, Quesenberry CP, et al. Association of testosterone replacement with cardiovascular outcomes among men with androgen deficiency. *JAMA Intern Med*. 2017 Apr 1;177(4):491–9.
25. Wu FCW, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: The European male aging study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2737–45.
26. Tajar A, Huhtaniemi IT, O'Neill TW, Finn JD, Pye SR, Lee DM, et al. Characteristics of androgen deficiency in Late-onset hypogonadism: Results from the European Male Aging study (emas). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 May;97(5):1508–16.
27. Ferrini RL, Barrett-Connor E. Sex hormones and age: A cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men. *Am J Epidemiol*. 1998;147(8):750–4.
28. Sparrow D, Bosse R, Rowe JW. The Influence of Age, Alcohol Consumption, and Body Build on Gonadal Function in Men*. Vol. 51, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1980.
29. Tsitouras PD, Martin CE, Harman SM. Relationship of serum testosterone to sexual activity in healthy elderly men. *Journals Gerontol*. 1982;37(3):288–93.
30. Kaufman JM, Lapauw B, Mahmoud A, T'Sjoen G, Huhtaniemi IT. Aging and the Male Reproductive System. Vol. 40, *Endocrine Reviews*. Endocrine Society; 2019. p. 906–72.
31. Orwoll E, Lambert LC, Marshall LM, Phipps K, Blank J, Barrett-Connor E, et al. Testosterone and estradiol among older men. *J Clin Endocrinol Metab*.

- 2006 Apr;91(4):1336–44.
32. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations. *Eur J Endocrinol*. 2008 Nov;159(5):507–14.
 33. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: Evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003 Apr 1;46(4):459–69.
 34. Traish AM, Zitzmann M. The complex and multifactorial relationship between testosterone deficiency (TD), obesity and vascular disease. Vol. 16, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. Springer New York LLC; 2015. p. 249–68.
 35. Huang F. Is a Previously or Currently Reduced Testosterone Level in Male Patients with Type 2 Diabetes Mellitus a Risk Factor for the Development of Coronary Artery Disease? A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Ther* [Internet]. 2018;9(3):1061–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13300-018-0415-3>
 36. Roumaud P, Martin LJ. Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;24(1):25–45.
 37. Fui MNT, Dupuis P, Grossmann M. Lowered testosterone in male obesity: Mechanisms, morbidity and management. Vol. 16, *Asian Journal of Andrology*. 2014. p. 223–31.
 38. Cunningham GR. Testosterone and metabolic syndrome. 2015;(October 2014):192–6.
 39. Ding L, Song Y, Manson E J., et al. Sex Hormone-Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes in Women and Men. 2010;361(12):1152–63.
 40. Lakshman KM, Bhasin S, Araujo AB. Sex hormone-binding globulin as an independent predictor of incident type 2 diabetes mellitus in men. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2010 May;65 A(5):503–9.
 41. Dhindsa S, Ghanim H, Batra M, Dandona P. Hypogonadotropic Hypogonadism in Men With Diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(7):1516–25.
 42. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, Hernández C, Selva DM. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(7):376–83.
 43. Plymate SR, Jones RE, Matej LA, Friedl KE. Regulation of sex hormone binding globulin (SHBG) production in Hep G2 cells by insulin. *Steroids*. 1988 Oct;52(4):339–40.
 44. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72(1):83–9.
 45. Wang Q, Kangas AJ, Soininen P, Tiainen M, Tynkkynen T, Puukka K, et al. Sex hormone-binding globulin associations with circulating lipids and metabolites and the risk for type 2 diabetes: Observational and causal effect estimates. *Int J Epidemiol*. 2015 May 27;44(2):623–37.
 46. Huang M, Liu J, Lin X, Goto A, Song Y, Tinker LF, et al. Relationship between dietary carbohydrates intake and circulating sex hormone-binding globulin

- levels in postmenopausal women. *J Diabetes*. 2017 May;
47. Mohammed M, AL-Habori M, Abdullateef A, Saif-Ali R. Impact of Metabolic Syndrome Factors on Testosterone and SHBG in Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. *J Diabetes Res* [Internet]. 2018;2018:1–8. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2018/4926789/>
 48. Mlinar B, Marc J, Janež A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Vol. 375, *Clinica Chimica Acta*. 2007. p. 20–35.
 49. Manley SE, Stratton IM, Clark PM, Luzio SD. Comparison of II human insulin assays: Implications for clinical investigation and research. *Clin Chem*. 2007 May;53(5):922–32.
 50. McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, et al. Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol*. 2005 Aug 1;96(3):399–404.
 51. Mclaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of Metabolic Markers To Identify Overweight Individuals Who Are Insulin Resistant Background: Insulin resistance is more common in overweight [Internet]. 2003. Available from: www.annals.org
 52. Vasques ACJ, Rosado LEFP de L, Rosado GP, Ribeiro R de CL, Franceschini S do CC, Priore SE, et al. Indicadores do perfil lipídico plasmático relacionados à resistência à insulina. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(3):342–6.
 53. Jose Gilberto H. Vieira. Avaliação dos Potenciais Problemas Pré-Analíticos e Metodológicos em Dosagens Hormonais. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46/1:9-15).
 54. Arver S, Lehtihet M. Advances in the Management of Testosterone Deficiency. Vol. 37, *Front Horm Res*. Basel, Karger. 2009.
 55. Opstad PK, Haugen AH, Sejersted OM, Bahr R, Skrede KK. Atrial natriuretic peptide in plasma after prolonged physical strain, energy deficiency and sleep deprivation. Vol. 68, *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. Springer-Verlag; 1994.
 56. Grishkovskaya I, Avvakumov G V, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. Vol. 19, *The EMBO Journal*. 2000.
 57. Hammond L. Geoffrey. Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 85, 431–441 (2011) Published online before print 25 May 2011.
 58. Travison TG, Vesper HW, Orwoll E, Wu F, Kaufman JM, Wang Y, et al. Harmonized reference ranges for circulating testosterone levels in men of four cohort studies in the United States and Europe. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Apr 1;102(4):1161–73.
 59. Vieira JGH, Nakamuraoh. Ferrer MC. et al. Importância da Metodologia na Dosagem de Testosterona Sérica: Comparação entre um Imunoensaio Direto e um Método Fundamentado em Cromatografia Líquida de Alta Performance e Espectrometria de Massa em Tandem (HPLC/MS-MS). *Arq Bras Endocrinol Metab* 52 (6) • Ago 2008.
 60. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, Palo E. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* 383 (2007) 30–40.
 61. Sartorius G, Ly P L, Sikaris K., et al. Predictive accuracy and sources of

- variability in calculated free testosterone estimates. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 137–143. DOI: 10.1258/acb.2008.008171.
62. Ciarlini, L.R.P.; Ciarlini, P.C.; Feitosa, F.L.F. Quimioluminescência: principio e aplicações. *Revista Educação continuada CRMV-SP*, v.5, n.2, p.181-187. 2002.
 63. Richardson A.P.; Kim, J.B.; Bernard, G.J. et al., Chemiluminescence immunoassay of plasma progesterone with progesterone-acridinium ester used as the labeled antigen. *Chemical Chemistry*, v.31, n.10, p.455-465, 1985.
 64. Mezzullo M, Dalmazi GD, Fazzini A., et al. Impact of age, body weight and metabolic risk factors on steroid reference intervals in men. *European Journal of Endocrinology* (2020) 182. 459-471.

