

Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Performance Como Método Preparativo Para a Dosagem de Esteróides Hormonais Por RIE: Dosagens de 17OH-Progesterona e Diidrotestosterona

artigo original

RESUMO

A dosagem dos esteróides hormonais tem apresentado evolução técnica significativa, sendo os principais esteróides de interesse clínico dosados, atualmente, por métodos simples, rápidos e automatizados. Existe, no entanto, um compromisso em detrimento da exatidão, que é mais evidente na determinação de esteróides de menor concentração relativa e maior número de interferentes potenciais, como a 17-hidroxiprogesterona (17OHP), a diidrotestosterona (DHT) e outros. Nestes casos, um processo preparativo versátil e robusto é fundamental para garantir resultados com alto grau de exatidão. Apresentamos a padronização de um processo preparativo baseado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) comparado à cromatografia em coluna de celite para a dosagem de 17OHP e DHT. Os anticorpos empregados nos respectivos radioimunoensaios apresentam especificidade semelhante aos descritos na literatura. As amostras foram inicialmente extraídas em éter etílico e em seguida submetidas ao processo cromatográfico. Amostras de soro provenientes da rotina foram dosadas em paralelo pelos dois métodos, sendo 57 amostras para 17OHP e 84 para DHT. Não houve diferença significativa entre os resultados, e os índices de correlação foram elevados ($R = 0,95$ e $0,97$). Os resultados comprovam que a aplicação do HPLC é válida, além de ser mais reprodutível, versátil e menos operador-dependente. Sua aplicação mais ampla permitirá uma melhora de exatidão na dosagem de esteróides de baixa concentração relativa, onde os métodos mais simples resultam em valores falsamente elevados. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/1:91-96)

Descritores: Dosagem de esteróides hormonais; HPLC preparativo; Radioimunoensaio de 17OHP; Radioimunoensaio de DHT.

ABSTRACT

Preparative HPLC for Steroid Measurements: Determinations of 17OH-Progesterone and Dihydrotestosterone.

Measurement of steroid hormones has undergone a significant technical evolution so that steroids with greater clinical interest are, nowadays, measured with methods that are simple, fast and prone to automation. Nevertheless, a compromise is made in detriment of accuracy, which is more evident with steroids with lower concentration and more potential interferents, as 17-hydroxyprogesterone (17OHP), dihydrotestosterone (DHT), and others. In such cases, a robust and versatile preparative process is of utmost importance to warrant results with the highest degree of accuracy. In this paper we present the results obtained with the use of a preparative process based on high-pressure chromatography (HPLC) for the measurement of 17OHP and DHT, as compared with a process based on celite column chromatography. The antibodies used in the radioimmunoassays have similar specificity to those previously described for these kinds of assays. Samples were initially extracted in ethyl ether and then submitted to HPLC. Routine samples (57 for 17OHP and 84 for DHT) were measured in parallel with both methods. The differences between results were not statistically significant, and the correlation indexes were high ($R = 0.95$ and 0.97). Our results confirm that systems

José Gilberto H. Vieira
Odete H. Nakamura
Keiko O. Noguti

Setor de Esteróides, Fleury-Centro de Medicina Diagnóstica, São Paulo, SP.

Recebido em 14/03/01
Revisado em 07/10/01
Aceito em 12/11/01

based on HPLC are valid, besides being more robust, versatile and operator independent. A more pervasive application of HPLC preparation systems will allow an improvement in the accuracy of steroid measurements, specially those with low concentrations, where simple preparative processes result in falsely elevated results. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46/1:91-96)

Keywords: Hormonal steroids measurement; Preparative HPLC; 17OHP radioimmunoassay; DHT radioimmunoassay.

AUTILIZAÇÃO CLÍNICA DA MEDIDA dos principais esteróides hormonais iniciou-se na década de 50 com o emprego de métodos colorimétricos para a análise de metabólitos urinários dos principais produtos de secreção das adrenais e das gônadas. Tais métodos, que são trabalhosos e inespecíficos desde que medem grupos de esteróides com determinadas características bioquímicas, serviram, no entanto, de base para avanços significativos no diagnóstico e tratamento da patologia adrenal e gonadal. As dosagens dos 17-hidrocorticóides (17-OH), dos 17-cetoesteróides (17-KS), dos fenolesteróides e do pregnanediol urinários foram os mais empregados e tiveram utilização bastante ampla por mais de duas décadas. A dosagem rotineira de esteróides individuais no soro teve início com o trabalho pioneiro de Abraham (1) que descreveu em 1969, baseado nos estudos de Erlanger e cols. (2), o primeiro radioimunoensaio (RIE) de um esteróide hormonal, o estradiol. Esta descrição abriu as portas para desenvolvimento acelerado na área. Os métodos desenvolvidos foram todos do tipo competitivo (RIE) empregando esteróides triciados como traçadores. As variáveis ficavam por conta da especificidade dos antissoros, dependente em grande parte do sítio de ligação do esteróide à macromolécula utilizada para a imunização, e da conseqüente necessidade de processos preparativos mais ou menos elaborados.

Durante a década de 80 ocorreu uma grande evolução dos ensaios para hormônios protéicos com a introdução dos ensaios imunométricos que se baseiam em dupla identificação, inicialmente descritos por Miles e Hales em 1968 (3), e que tiveram aplicação ampla e definitiva com a descrição da metodologia de produção de anticorpos monoclonais (4). Métodos mais robustos, rápidos e específicos foram introduzidos em substituição ao tradicional RIE mas, em função de seu baixo peso molecular (em torno de 400Da), os esteróides, bem como as tironinas, não podem ser medidos com o emprego de ensaios imunométricos, sendo privados dos ganhos de sensibilidade, especifici-

dade e precisão intrínsecos a este novo desenho de ensaio. Os principais problemas dos ensaios de esteróides hormonais se prendem à grande semelhança estrutural que existe entre eles, com conseqüente dificuldade em obtenção de anticorpos de especificidade absoluta, e à grande variedade de concentrações relativas que podem ser encontradas. Assim, podemos ter circunstâncias onde um esteróide apresenta altas concentrações em relação a possíveis interferentes (como no caso do cortisol sérico), possibilitando um ensaio onde os métodos preparativos são de pouca monta, ou mesmo ausentes. Por outro lado, interferentes importantes podem estar presentes em concentrações muito mais elevadas que o esteróide a ser medido (como por exemplo o cortisol em relação ao 11-desoxicortisol e a testosterona em relação à DHT), o que obriga a utilização de métodos preparativos mais elaborados. Nesta última circunstância, mesmo a disponibilidade de anticorpos específicos não possibilita o desenvolvimento de ensaios sem a utilização de um processo preparativo mais elaborado.

A necessidade de ensaios simples e reprodutíveis foi sempre um fator a estimular desenvolvimentos tecnológicos em todas as áreas diagnósticas, inclusive no caso dos imunoensaios para esteróides hormonais. Processos preparativos cada vez menos elaborados, emprego de traçadores não triciados (radioativos ou não), emprego de métodos de separação mais reprodutíveis e simples (como fase sólida), foram sendo introduzidos ao longo dos anos (5,6). A limitação para tal desenvolvimento foi a disponibilidade de anticorpos mais específicos e o desenvolvimento de processos preparativos. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais de alta especificidade, embora proporcionasse um ganho qualitativo, não foi suficiente para solucionar definitivamente o problema (7). No caso dos esteróides de maior uso clínico, como testosterona, estradiol, progesterona e cortisol, o desenvolvimento técnico permitiu que ensaios diretos se tornassem rotina em laboratórios com alto grau de automação, empregando métodos simples, rápidos e reprodutíveis, sem necessidade de métodos preparativos complexos. Todavia, concessões são obrigatoriamente feitas à exatidão, especialmente em estados de deficiências hormonais como na menopausa e na infância, onde interferentes podem levar a resultados falsamente elevados (8,9).

Já os ensaios mais complexos, de aplicação clínica mais restrita, como 11-desoxicortisol, DHT, 17OHP, DHA, etc, não podem prescindir de métodos preparativos elaborados, caso contrário os níveis de interferência podem ser inaceitáveis. Esses processos preparativos incluem extração em solvente orgânico e,

se necessário, um processo cromatográfico. Quanto a este último, trata-se sempre de procedimento mais elaborado e complexo, exigindo pessoal e instalações especiais. As técnicas de cromatografia em coluna, especialmente empregando Sephadex LH-20 (10) e celite (11,12), tornaram praticáveis os procedimentos preparativos, embora fossem artesanais. A adaptação de sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para a separação de esteróides foi desenvolvida por vários autores utilizando diferentes conjuntos cromatográficos, com destaque para os trabalhos de Schöneshöfer (13-15). Os sistemas de HPLC trazem implícitas duas vantagens: o alto grau de resolução intrínseco ao sistema, que permite a separação de esteróides individuais sem problemas de co-eluição, e a possibilidade de automação do processo. Este último aspecto é especialmente atrativo, desde que as técnicas alternativas (colunas de celite ou Sephadex LH-20) são bastante trabalhosas, de difícil automação e dependentes da habilidade do operador.

Apresentamos os resultados iniciais da adaptação de sistema de HPLC como método preparativo para dosagem de 17OHP e DHT, comparando os resultados aos obtidos com um método manual, a cromatografia em coluna de celite.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro empregadas no estudo comparativo entre os dois métodos preparativos provieram de rotina diagnóstica, sendo 57 amostras para o estudo comparativo dos sistemas cromatográficos preparativos para 17OHP e 84 amostras para os sistemas para DHT. O RIE para 17OHP emprega antissoro desenvolvido em nosso laboratório contra conjugado de 17OHP acoplado a albumina bovina pela posição 3 (17OHP-3-CMO-BSA) (16). O anticorpo empregado no RIE para DHT foi produzido em nosso laboratório contra um derivado de DHT acoplado a albumina bovina pela posição 3 (DHT-3-CMO-BSA). A reatividade cruzada de ambos os anticorpos encontra-se na tabela 1. Os dois métodos preparativos se baseiam em extração prévia da amostra (1mL de soro) com éter etílico (5:1), evaporação da fração orgânica e posterior diluição em 200µL da mistura correspondente ao eluente do processo cromatográfico respectivo, que são injetados integralmente no sistema. A recuperação do processo é calculada a partir da adição de cerca de 800cpm do respectivo esteróide triciado. O coeficiente de variação inter-ensaio para os dois métodos é inferior a 20% (com base no perfil de imprecisão para 20 ensaios), e todas as amostras foram preparadas inde-

pendentemente pelas duas técnicas para posterior análise por RIE que emprega traçador triciado e separação com carvão-dextran.

Cromatografia em Colunas de Celite: o sistema empregado baseia-se no descrito por Abraham (11,12), utilizando-se colunas de vidro (0,9x30cm) contendo cerca de 0,5 gramas de celite embebida em etileno glicol. Antes do uso, as colunas são condicionadas com 3,5mL de isooctano. Os resíduos diluídos em 0,5mL de isooctano são aplicados nas colunas; após lavagem com mais duas alíquotas de 0,5mL de isooctano, no procedimento para 17OHP as colunas são lavadas com 3,5mL de isooctano, seguidos de 3,5mL de isooctano-acetato de etila (95:5, v/v), e finalmente 4,0mL de isooctano-acetato de etila (85:15, v/v) que são coletados, evaporados e empregados para o ensaio. No caso da DHT, a lavagem é feita com 4,0mL de isooctano e a eluição da alíquota a ser empregada no ensaio é feita com 4,0mL de isooctano-acetato de etila (94:6, v/v).

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC): o sistema baseia-se no descrito por Schöneshöfer (13), empregando equipamento adquirido da Waters, Milford, MA, USA, que consta de módulo de bombeamento, controlador de gradiente, injetor

Tabela 1. Reatividade cruzada dos dois antisoros empregados.

Anticorpo anti-17OHP alfa2 25/7 Esteróide	Reatividade Cruzada
17α-Hidroxi-progesterona	100%
17α-Hidroxi-pregnenolona	22%
Progesterona	15%
11-Desoxi-cortisol	0,9%
Pregnenolona	0,2%
Desoxicorticosterona	0,06%
Cortisol, Dehidroepiandrosterona, Androstenediona, Aldosterona, Corticosterona, Cortisona, Dexametasona, Prednisona, Testosterona, DHT, Estradiol	inferior a 0,03%
Anticorpo anti-DHT DHT 16/5 Esteróide	Reatividade Cruzada
Dihidrotestosterona	100%
Testosterona	44%
Androsterona	2,8%
Androstenediona	1,4%
Androstenediol	1,1%
Estradiol	0,3%
Progesterona	0,006%
Pregnenolona, Estrona, Estriol, Cortisol, Dexametasona, Aldosterona, Prednisona, 17OHP	inferior a 0,005%

automático de amostras e coletor de frações. A coluna empregada é Hibar RT 250-4 Lichrosorb Diol (5mm, 0,5x12cm) fornecida por Merck AG, Darmstadt, Alemanha. O sistema de eluição se baseia em duas soluções: a solução A composta de n-hexano, e a solução B composta de n-hexano-alcool isopropílico 70:30 (v/v). Para a 17OHP a composição inicial da fase móvel é de 90:10 com fluxo de 2mL/min, atingindo após 2 minutos as proporções 70:30, mantendo-se por 8 minutos em fluxo de 2,5mL/min. As frações coletadas correspondem a 1 minuto de eluição e a fração coletada aos 6 minutos corresponde à 17OHP. No caso da DHT as condições cromatográficas são semelhantes, com a diferença que o gradiente após 2 minutos atinge a proporção 83:17 e se mantém assim por 8 minutos a um fluxo de 2mL/min. A fração contendo a DHT é eluída aos 6 minutos. Incluindo o tempo de cromatografia e re-equilíbrio, o sistema pode receber uma amostra a cada 15 minutos. Para a comparação entre os resultados empregamos o programa de estatística InStat (GraphPad Co.), com cálculo do coeficiente de correlação de Spearman e teste de Wilcoxon bicaudal.

RESULTADOS

O perfil de eluição dos dois sistemas de HPLC estão representados nas figuras 1 e 2. Na figura 1, que representa o perfil de eluição obtido no sistema dese-

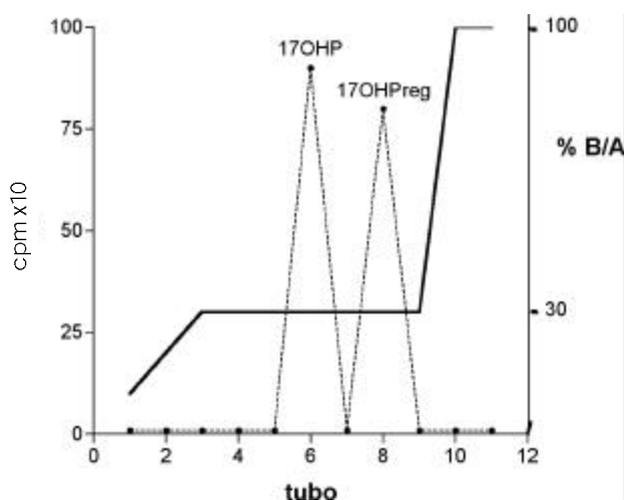


Figura 1. Perfil de eluição da 17 alfa-hidroxiprogesterona (17OHP) e da 17 alfa-hidroxipregnenolona (17OHPreg) no sistema de HPLC. A solução A é composta de n-hexano e a solução B de n-hexano-alcool isopropílico (70:30, v/v).

nhado para 17OHP, é nítida a separação entre o principal interferente potencial, a 17 alfa-hidroxipregnenolona, que juntamente com a progesterona (que neste sistema elui no tubo 4), são os únicos esteróides contra os quais o anticorpo empregado apresenta reatividade cruzada significativa (tabela 1). Na figura 2 está o perfil de eluição obtido no sistema desenhado para a DHT, sendo que o único esteróide que apresenta reatividade cruzada significativa com o anticorpo empregado, que é a testosterona, é separado com segurança.

Os resultados de 17OHP obtidos nas 57 amostras analisadas empregando os dois sistemas cromatográficos apresentaram alta correlação ($R= 0,95$, figura 3). A mediana dos valores obtidos com cromatografia em coluna de celite foi 140ng/dL, com valores entre 33 e 13.000ng/dL; com sistema de HPLC a mediana foi 130ng/mL, com valores entre 27 e 14.200ng/dL. A aplicação do teste de Wilcoxon bicaudal produziu um P de 0,161, considerado não significante. Os resultados de DHT obtidos nas 84 amostras analisadas empregando os dois sistemas mostrou correlação de $R= 0,97$ (figura 4). A mediana dos valores obtidos com cromatografia em coluna de celite foi 23,0ng/dL, com valores entre 5,0 e 146,0ng/dL; com sistema de HPLC a mediana foi de 22,5ng/dL, com valores entre 3,0 e 133ng/dL. A aplicação do teste de Wilcoxon bicaudal produziu um P de 0,194, considerado não significante.

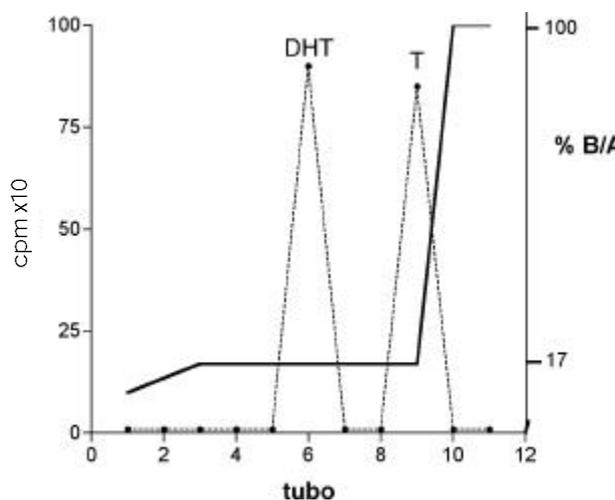


Figura 2. Perfil de eluição da Dihidrotestosterona (DHT) e da testosterona (T) no sistema de HPLC. A solução A é composta de n-hexano e a solução B de n-hexano-alcool isopropílico (70:30, v/v).

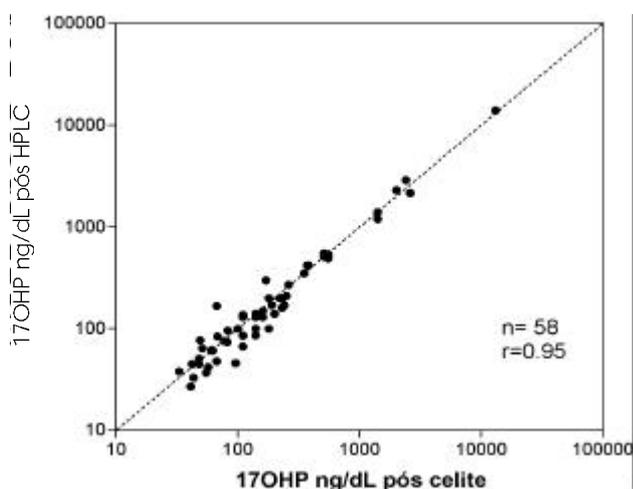


Figura 3. Representação da correlação entre os valores obtidos nas 58 amostras de soro onde foi determinado o nível de 17OHP após emprego de sistema preparativo constando de cromatografia em celite ou HPLC.

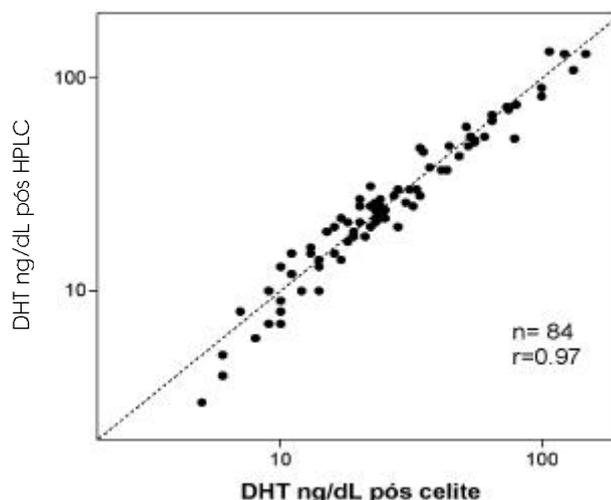


Figura 4. Representação da correlação entre os valores obtidos de 84 amostras de soro onde foi determinado o nível de DHT após emprego de sistema preparativo constando de cromatografia em celite ou HPLC.

DISCUSSÃO

Os resultados evidenciam que os valores obtidos, tanto para 17OHP como para DHT, em amostras submetidas aos dois processos cromatográficos, são comparáveis. Uma pergunta óbvia, que se faz necessária ao analisar os resultados é: porque substituir um método cromatográfico que vem sendo utilizado com sucesso há muitos anos (cromatografia em celite) por outro que produz resultados comparáveis numericamente? Além do mais, no caso da HPLC existe a necessidade de investimento em equipamentos. As respostas são múltiplas, mas algumas merecem destaque como o fato de que a adoção do sistema de HPLC traz maior reprodutibilidade aos processos. Neste aspecto vale salientar que a manufatura das colunas de celite e sua eluição é um processo altamente artesanal e que a boa reprodutibilidade depende de mãos de técnicos altamente experientes na metodologia.

Adicionalmente a automação dos procedimentos, com injetor automático de amostras e coletor de frações, permite a liberação de mão de obra altamente especializada. O sistema em geral é carregado para trabalhar ao longo do período noturno, de maneira que no dia seguinte as amostras estejam prontas para ensaio. Mas talvez a maior vantagem seja o fato de que um sistema de HPLC é potencialmente mais versátil, possibilitando a separação de um número muito maior de esteróides hormonais por modificações nos solventes utilizados no processo, ou dos gradientes. Na realidade, no próprio trabalho que serviu de base para este estudo

(13) são comparados 7 sistemas diferentes, com o emprego de colunas e solventes variados. Nós escolhemos o que melhor se adaptava às nossas necessidades e que propiciava, após cromatografia, uma evaporação mais rápida e fácil. Além disso os sistemas escolhidos permitem uma separação segura dos principais interferentes potenciais, tanto do ponto de vista da especificidade do anticorpo como da concentração relativa.

No caso do ensaio para 17OHP, o sistema a separa com segurança da 17-hidroxi-pregnenolona, pregnenolona e progesterona, o que permite uma determinação exata dos níveis de 17OHP mesmo em condições onde os níveis dos primeiros estão muito elevados, como no defeito da 3-beta hidroxisteróide desidrogenase. No caso dos sistemas baseados em colunas de celite, os esteróides são eluídos em grupos, o que potencialmente pode levar a interferências. Outros esteróides de interesse apresentam o mesmo problema, como por exemplo o ensaio para 11-desoxicortisol, que se for dosado sem processo cromatográfico discriminativo perde muito de seu valor diagnóstico. Quanto ao ensaio de DHT o problema potencialmente é mais simples, desde que o único interferente que deve obrigatoriamente ser separado é a testosterona, e neste caso os dois sistemas utilizados o fazem.

Em conclusão, os sistemas descritos são bastante reprodutíveis, robustos e permitem ensaios com alto grau de exatidão. Apresentam ainda o potencial de serem adaptados para a medida de outros esteróides hormonais em que uma separação detalhada é fundamental, como o 11-desoxicortisol, a 17-hidroxipregnenolona, e outros de interesse mais restrito ou de pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Abraham GE. Radioimmunoassay for serum estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* **1969**;29:866-71.
2. Erlanger BF, Borek F, Beiser SM, Lieberman SM. Steroid-protein conjugates I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J Biol Chem* **1957**;228:713-27.
3. Miles LE, Hales CN. Labeled antibodies and immunological assay systems. *Nature* **1968**;219:186-9.
4. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**; 256:495-7.
5. Pratt JJ. Steroid immunoassay in clinical chemistry. *Clin Chem* **1978**;24:1869-90.
6. Klingler W, Wiegand G, Knuppen R. Chemiluminescent labels for steroid immunoassays. *J Steroid Biochem* **1987**;27:41-5.
7. Vieira JGH, Nishida SK, Lombardi MT, Noguti KO. Estudo de um radioimunoensaio para a dosagem de testosterona sérica empregando anticorpo monoclonal. *J Bras Patol* **1996**;32:56-63.
8. Vieira JGH, Tachibana TT, Noguti KO, Ferrer CM, Maciel RMB. Valores falsamente elevados em ensaios diretos para a medida de hormônios esteróides no soro. *J Bras Patol* **1999**;35:71-4.
9. Thienpont LM. Standardization of steroid immunoassays – in theory an easy task. *Clin Chem Lab Med* **1998**;36:349-52.
10. Carr BR, Mikhail G, Flickinger GL. Column chromatography of steroids on Sephadex LH-20. *J Clin Endocrinol Metab* **1971**;33:358-60.
11. Manlimos F, Abraham GE. Chromatographic purification of tritiated steroids prior to use in radioimmunoassay. *Anal Let* **1975**;8:403-10.
12. Abraham GE. The use of diatomite microcolumns for the chromatographic separation of steroids prior to radioimmunoassay. *Pathol Biol (Paris)* **1975**;23:89-93.
13. Schöneshöfer M, Dulce HJ. Comparison of different high-performance liquid chromatographic systems for the purification of adrenal and gonadal steroids prior to immunoassay. *J Chromatogr* **1979**;164:17-28.
14. Schöneshöfer M, Fenner A, Dulce HJ. Assessment of eleven adrenal steroids from a single serum sample by combination of automatic high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay (HPLC-RIA). *J Steroid Biochem* **1981**;14:377-86.
15. Eibs G, Schöneshöfer M. Simultaneous determination of fifteen steroid hormones from a single serum sample by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *J Chromatogr* **1984**;310:386-9.
16. Vieira JG, Russo EMK, Maciel RMB, Germek AO, Verreschi ITN. Radioimunoensaio da 17-alfa-hidroxiprogesteronona no soro: considerações metodológicas. *Arq Bras Endocrinol Metab* **1980**;24:24-30.

Endereço para correspondência:

José Gilberto H. Vieira
Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica
Av. Waldomiro de Lima 508
04344-010 São Paulo, SP
fax: (11) 287-2566
e.mail: jose.vieira@fleury.com.br