

Desenvolvimento de Um Radioimunoensaio para 21-Deoxicortisol Sérico e Sua Potencial Aplicação no Diagnóstico da Hiperplasia Adrenal Congênita

artigo original

RESUMO

O 21-deoxicortisol (21DF) sérico tem sido considerado um excelente marcador para o diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita (HAC) por deficiência de 21-hidroxilase (D21OH). Embora vários métodos de radioimunoensaio (RIE) tenham sido descritos para 21DF, nenhum deles está disponível comercialmente. Desenvolvemos um RIE adaptado para a dosagem de 21DF, com extração prévia das amostras com éter e separação por cromatografia líquida (HPLC). O ensaio foi aplicado para a avaliação de crianças portadoras da forma clássica de D21OH (15F/10M) e um grupo controle (5F/8M). O anticorpo obtido, associado à eficiência da separação por HPLC, viabilizou o emprego do cortisol tritiado neste RIE. Enquanto nos pacientes os níveis de cortisol estavam reduzidos (48h após suspensão do tratamento) em comparação com o grupo controle ($2,1 \pm 2,1$ vs. $16,2 \pm 7,0 \mu\text{g/dl}$), os valores do 21DF sérico estavam bastante elevados ($1.359 \pm 853 \text{ng/dl}$, variando de 434 a 3.079), embora consistentemente abaixo do limite de sensibilidade (156ng/dl) no grupo controle. O presente método, mesmo destituído de sensibilidade para aplicação em indivíduos normais, permite a quantificação deste esteróide em portadores de D21OH, com a sensibilidade e a especificidade necessárias para o diagnóstico e acompanhamento desta condição clínica. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/2:171-176)

Descritores: 21-Deoxicortisol; Radioimunoensaio; HPLC; Deficiência de 21-hidroxilase; Hiperplasia adrenal congênita

ABSTRACT

Development of a Radioimmunoassay for Serum 21-Deoxycortisol and Its Potential Application in the Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. Serum 21-deoxycortisol (21DF) has been considered a useful hormonal marker for the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency (21OHD). Although several radioimmunoassay (RIA) methods for 21DF have been reported, none are commercially available. We developed a RIA adapted for 21DF determination, preceded by ether-extraction and liquid chromatographic separation (HPLC) of samples. The assay was employed to evaluate children (15F/10M) with the classic form of 21OHD and a control group (5F/8M). The antibody obtained, in addition to efficient HPLC separation, permitted tritiated cortisol instead of 21DF to be used, since labeled ^3H -21DF is expensive and difficult to obtain. Serum cortisol levels were reduced in patients with 21OHD (48h following therapy withdrawal) as compared to controls (2.1 ± 2.1 vs. $16.2 \pm 7.0 \mu\text{g/dl}$), whereas serum levels of 21DF were significantly elevated ($1,359 \pm 853 \text{ng/dl}$, ranging from 434 to 3,079) in the former, but consistently below the sensitivity limit of the assay (156ng/dl) in the latter group. The reported method, although devoid of sensitivity for its application in normal subjects, permits 21DF to be quantified in patients with 21OHD, with adequate sensitivity and specificity to diagnose and follow patients with this condition. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/2:171-176)

Keywords: 21-Deoxycortisol; 21-Hydroxylase deficiency; Radioimmunoassay; HPLC; Congenital adrenal hyperplasia

Vânia Tonetto-Fernandes
Luciane M. Ribeiro-Neto
Ieda T.N. Verreschi
Jean Fiet
José Gilberto H. Vieira
Claudio E. Kater

*Disciplina de Endocrinologia,
Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo
- UNIFESP/EPM (VTF, LMRN,
ITNV, JGHV, CEK); Serviço de
Endocrinologia Pediátrica,
Hospital Infantil Darcy Vargas,
São Paulo, SP (VTF) e Service de
Biologie Hormonale, Hôpital Saint
Louis, Paris, France (JF).*

*Recebido em 11/09/02
Revisado em 21/02/03
Aceito em 28/02/03*

NA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA (HAC), cerca de 90% dos casos são decorrentes da forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase (D21OH). No mundo, a incidência desta doença é de 1:13.000 a 1:15.000 nascimentos vivos (1), enquanto no Brasil parece ser em torno de 1:7.500 (2). A atividade reduzida ou ausente desta enzima (21OH ou CYP21) resulta num déficit na síntese do cortisol, promovendo uma excessiva secreção de ACTH e conseqüente aumento da produção de andrógenos e de precursores esteróides, principalmente a 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) e o 21-deoxicortisol (21DF).

Clinicamente, estas alterações repercutem na identificação sexual da menina (presença de genitália ambígua) e, quando não tratada, em pseudopuberdade precoce em ambos os sexos. Em cerca de 70% dos casos, existe risco de vida por perda renal de sódio, já que a síntese de aldosterona também está comprometida (1,2). A significativa elevação da 17OHP sérica faz deste esteróide um marcador característico da D21OH, tornando sua determinação imprescindível para o diagnóstico. Como sua produção também tem origem gonadal (3,4), a interpretação de seus níveis séricos é menos fidedigna no período pubertário, principalmente na monitorização terapêutica destes pacientes.

Em contraste - apesar de ser um esteróide derivado diretamente da 17OHP através de sua 11 β -hidroxilação -, o 21DF é produzido exclusivamente no córtex adrenal (5-7). Esta via alternativa de síntese é virtualmente inativa em condições fisiológicas, mas torna-se exacerbada em pacientes com D21OH. Assim, o 21DF pode ser considerado um marcador bioquímico adicional da D21OH, tendo-se mostrado até mais sensível do que a 17OHP (8) e permitindo, também, detectar mais de 90% dos portadores heterozigotos (9). Mesmo assim, por razões técnicas e pelo elevado custo, este ensaio não se encontra amplamente disponível para a avaliação do perfil hormonal adrenal.

Neste trabalho, apresentamos os resultados preliminares da aplicação de um radioimunoensaio (RIE) adaptado para a determinação de 21DF no soro, com separação prévia dos esteróides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na avaliação de um grupo de crianças portadoras de HAC com a forma clássica da D21OH e de um grupo controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrão

O 21DF (4-pregnen-11 β ,17-diol-3,20-diona) foi adquirido da Steraloids Inc. (USA) e preparado em solução de metanol (grau cromatográfico, EM Science), na concentração de 100 μ g/ml.

Imunização

Obtivemos o anticorpo anti-21DF através da imunização de 5 coelhos *New Zealand White* (NZW) com o conjugado 4-pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-diona 21-hemissuccinato: soroalbumina bovina (cortisol-21-hemissuccinato:BSA, Steraloids Inc.), que foi diluído em água destilada (1mg/ml) e emulsionado com o adjuvante completo de Freund. O volume correspondente a 200 μ g do conjugado foi injetado em cada animal por via intra-dérmica. Duas re-imunizações, no 42 $^{\circ}$ e no 70 $^{\circ}$ dia, foram realizadas com base nos estudos de título. A técnica empregada foi baseada na de Vaitukaitis e cols. (10), modificada por Vieira e cols. (11).

Purificação das amostras por HPLC

Amostras de 1ml de soro foram extraídas com 3ml de éter p.a. (Merck, Brasil) sob agitação mecânica por 30s. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 3.000rpm por 10min a 10 $^{\circ}$ C em centrífuga refrigerada (Sorvall[®] RT7 plus) e, em seguida, evaporada sob fluxo de nitrogênio. Os resíduos obtidos foram reconstituídos com 200 μ l de fase móvel e filtrados através de membrana de celulose (0,5 μ m, 13mm, Millipore). Destes, 50 μ l foram injetados em um equipamento HPLC (HP1100, Hewlett Packard, EUA), equipado com mostrador automático, bomba quaternária e detector de UV com comprimento de onda variável. A detecção ocorreu em 246nm. Para a separação cromatográfica empregou-se coluna analítica (125 x 4mm, 5 μ m; Hypersil[®] BDS) e coluna-guarda equivalente (4 x 4mm), ambas da HP. A fase móvel foi água-metanol (53:47, v/v) em fluxo de 1ml/min. A água utilizada foi obtida através de equipamento Milli-Q[®] (Millipore, EUA). Toda a análise foi realizada a 40 $^{\circ}$ C.

O eluente foi fracionado em alíquotas correspondentes ao intervalo de 2min, com o auxílio de um coletor de frações (FRAC-100, Pharmacia Biotech, EUA). A alíquota de número 4, correspondente à fração do 21DF, foi evaporada sob nitrogênio até secagem total e os resíduos mantidos a -20 $^{\circ}$ C até a análise por RIE.

RIE

Os resíduos das amostras foram reconstituídos com 1ml de solução tampão gelatina-fosfato (TG) (11). Destes, 100 μ l foram utilizados em duplicatas para a execução do RIE. O anticorpo anti-21DF (100 μ l) foi utilizado na diluição 0,125 x 10 $^{-7}$, em solução TG. O triciado [1,2,6-7- 3 H-cortisol, Amersham, EUA], com atividade específica de 2,29 TBq/mmol, foi mantido a -20 $^{\circ}$ C até a sua utilização na proporção 15:10.000 em TG. Desta solução, 100 μ l foram empregados no RIE. O tempo de

incubação variou de 12 a 24 horas, a 4°C, com volume final de 700µl. Depois da incubação, 200µl de carvão-dextran (12), mantidos em agitação contínua a 4°C, foram adicionados a cada amostra. Após a homogeneização e subsequente repouso por 15min a 4°C, as amostras foram submetidas a centrifugação a 3.000rpm, por 30min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo KMA contendo 2ml de líquido de cintilação (Ophthase "Hisafe" 3, Perkin Elmer, EUA). A contagem foi realizada num contador de radiação beta (Packard, modelo 1900 TR, EUA). O cálculo do 21DF, em ng/dl, foi realizado pelo programa RIACALC (Wallac Oy, Turku, Finlândia). A curva de calibração foi determinada com 7 diferentes concentrações: 39, 78, 156, 313, 625, 1.250 e 2.500pg/0,1 ml e foram preparadas em TG a partir do padrão de 21DF (100µg/ml). Os resultados obtidos foram corrigidos em função do volume inicial e da diluição das amostras.

O cortisol foi dosado em todas as amostras, sem qualquer preparo prévio, por um RIE empregado na rotina do nosso laboratório (11).

Validação analítica

No estudo da especificidade foi avaliada a reação cruzada com esteróides endógenos estruturalmente semelhantes ao 21DF, ou aqueles cuja concentração sérica é de interesse na avaliação de portadores de HAC por D21OH. A recuperação foi determinada através da avaliação de amostras (n= 6) de soro livre de esteróides (obtido através da purificação com carvão-dextran), adicionados com 750ng/dl de 21DF e submetidos a todas as etapas do procedimento. A sensibilidade do método foi definida como a menor quantidade que pode ser diferenciada do soro livre de esteróides com o intervalo de confiança de 98%. O estudo da variação intra-ensaio foi determinado através da análise de 3 a 6 replicatas de amostras de soro livre de esteróides adicionadas com 21DF em concentrações conhecidas, avaliadas seriadamente e submetidas a todas as etapas do método. O coeficiente de variação (CV) inter-ensaio foi determinado através das avaliações das amostras descritas acima, entre 3 dias diferentes. Para o estudo comparativo, 7 amostras de soro escolhidas aleatoriamente foram submetidas à determinação de 21DF pelo presente método e também no *Service de Biologie Hormonale*, Paris, sob a coordenação de Jean Fiet.

População estudada

Avaliamos 25 crianças (15F/10M, 4,6-10,3 anos de idade), portadoras da forma clássica da D21OH, acompanhadas no Ambulatório de Adrenal da Disciplina de

Endocrinologia da UNIFESP, São Paulo, SP. O diagnóstico foi estabelecido pelos níveis séricos elevados de 17OHP e de andrógenos. Todas foram orientadas para suspender a terapia com glicocorticóide (hidrocortisona ou prednisona) e mineralocorticóide durante as 48h antecedentes à coleta. O intervalo estabelecido para a suspensão da medicação foi previamente avaliado em um estudo piloto cujos pacientes permaneceram internados sob rigorosa avaliação, nos quais não foi observado qualquer comprometimento clínico neste período.

Um grupo controle, constituído por 13 crianças híginas (5F/8M, idades de 5,2 a 15,2 anos), foi também estudado.

As amostras de sangue foram obtidas, entre 7 e 8h da manhã, por punção venosa periférica e, após centrifugação, o soro foi armazenado a -20°C até sua utilização.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, e todas as coletas foram realizadas após consentimento por escrito dos pais e/ou responsáveis.

RESULTADOS

Os resultados da imunização com os coelhos são apresentados na figura 1; os títulos mais elevados foram obtidos com os anticorpos B e D. A tabela 1 apresenta o estudo da especificidade com todos os anticorpos, com exceção do animal E, desconsiderado para o experimento em função da baixa resposta imunogênica. Devido às suas melhores características, selecionou-se para o RIE os anticorpos gerados no coelho D, cuja diluição foi definida para o ensaio como $0,125 \times 10^{-7}$.

A exatidão do método, avaliada pela recuperação do 21DF no soro, foi de 93% e a sensibilidade de 156ng/dl. A precisão, avaliada pelos CV intra- e inter-ensaio, foi de 6,3 e 2,8% e de 15% e 5%, respectivamente para concentrações de 750 e 1.500ng/dl. O estudo comparativo com outro laboratório mostrou que os resultados obtidos por este método, 5 valores não detectáveis e dois elevados (918 e 2.768ng/dl), encontravam-se, respectivamente, na faixa de 13 a 37ng/dl e 561 e 2.792ng/dl.

Os valores de 21DF observados nos pacientes variaram de 434 a 3.079ng/dl, com média (\pm DP) de 1.359 ± 853 ng/dl, enquanto no grupo controle mostraram-se todos abaixo do limite de sensibilidade do método (156ng/dl) (figura 2).

Os níveis séricos de cortisol dos pacientes encontravam-se na faixa de 0,3 a 8µg/dl, enquanto no grupo controle variaram de 8 a 28µg/dl.

Tabela 1. Especificidade encontrada para o anticorpo anti-21-deoxicortisol.

Esteróides	Coelho A (%)	Coelho B (%)	Coelho C (%)	Coelho D (%)
21-DF	100,0	100,0	100,0	100,0
Cortisol	72,6	100,0	70,0	100,0
Cortisona	8,9	39,0	15,9	6,0
Corticosterona	10,8	7,0	24,7	12,8
Desoxicorticosterona	5,4	7,2	8,8	1,9
11-Deoxicortisol	34,7	100,0	18,1	9,5
17 α OH-Progesterona	100,0	85,4	24,7	9,5
Aldosterona	0,3	0,8	1,6	0,4
Estradiol	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

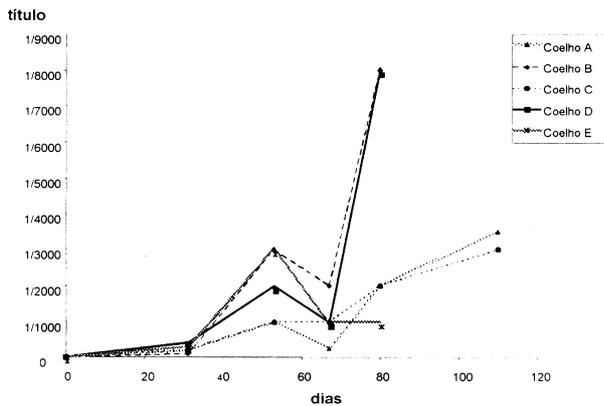


Figura 1. Título de anticorpos obtidos em coelhos durante a imunização com cortisol-21-hemissuccinato:BSA.

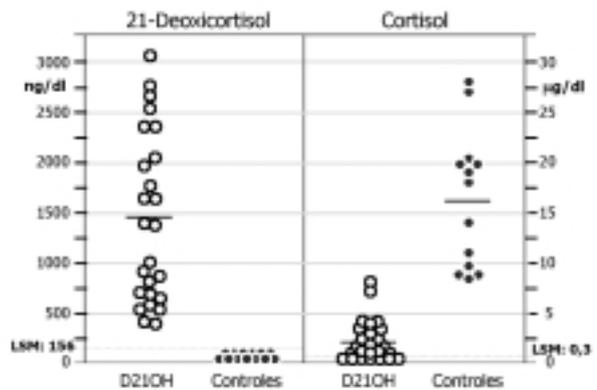


Figura 2. Distribuição da concentração sérica de 21-deoxicortisol e de cortisol em pacientes com HAC por deficiência de 21-hidroxilase (D21OH), forma clássica, e no grupo controle. LSM= limite de sensibilidade do método.

DISCUSSÃO

A especificidade do anticorpo obtido mostrou-se apropriada para todos os esteróides testados, com a óbvia exceção do cortisol, que apresentou reatividade cruzada de 100%. Em especial, este anticorpo cruza pouco (<10%) com 17OHP e 11-deoxicortisol, não comprometendo, portanto, a identificação exata de pacientes com HAC. Por termos empregado um artefato (um conjugado de cortisol acoplado à soroalbumina bovina na posição 21), o anticorpo obtido estaria, evidentemente, impossibilitado de diferenciar entre 21DF e cortisol. Em realidade, os primeiros RIE desenvolvidos para a determinação de 21DF foram realizados com a utilização de anticorpos anti-cortisol, visto que a reação cruzada era de 100% com o 21DF (13,14). Por outro lado, o desenvolvimento de um RIE específico para 21DF na rotina laboratorial em nosso meio seria economicamente inviável, uma vez que o marcado triciado para o 21DF é de custo elevado (US\$ 9.000,00 por 1mCi, na faixa de 40-60Ci/mmol). Esta questão,

entretanto, foi satisfatoriamente resolvida com a extração das amostras (livrando-as de impurezas de outra natureza) e separação prévia por HPLC, isolando especificamente o esteróide a ser analisado. Deve-se salientar que, mesmo utilizando um RIE desenvolvido com conjugado, anticorpo e marcador específicos para 21DF, seria imprescindível um procedimento prévio para separação dos esteróides. As condições cromatográficas empregadas neste estudo permitiram nítida separação do 21DF do cortisol (15), uma vez que os resultados de 21DF obtidos no grupo controle (<156ng/dl) não sofreram influência das concentrações normais de cortisol (na faixa de µg/dl). A reprodutibilidade intra- (5,6,16,17), e inter-ensaio (6,17) e a recuperação (5,16) mostraram-se adequadas e similares àquelas previamente reportadas.

Devido à baixa sensibilidade nas condições atuais do RIE (constatada também pelo estudo comparativo com a técnica empregada por Jean Fiet), seu emprego para estudo de concentrações esperadas dentro da faixa da normalidade fica comprometido.

Entretanto, a determinação dos níveis deste esteróide em indivíduos normais é de pouca relevância, por se tratar de uma via alternativa que se expressa especificamente na vigência da D21OH. Nestes pacientes, motivo precípuo da proposta deste trabalho, a quantificação dos níveis séricos de 21DF mostrou-se plenamente satisfatória, corroborando os dados da literatura (17-20).

Assim, o método adaptado para a dosagem de 21-DF mostrou-se adequado para a avaliação de pacientes com D21OH, embora apresentasse sensibilidade insuficiente para aplicação em indivíduos normais. Estudos complementares devem ser realizados para verificar a aplicabilidade da determinação de 21DF, isoladamente ou em adição à 17OHP, para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com a D21OH. Além disso, segundo dados da literatura (6,9,21), é possível que seu emprego na detecção de heterozigotos tanto para a forma clássica como não clássica de HAC por D21OH, possa suplantará a importância da 17OHP.

AGRADECIMENTOS

A Keiko Noguti do Laboratório Fleury pela imunização dos coelhos. A Lilian F. Hayashi do Laboratório de Esteróides da Disciplina de Endocrinologia / UNIFESP, pela contribuição técnica na execução dos RIEs. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros (proc. No. 97/05365-2).

REFERÊNCIAS

1. New MI. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. The United States Experience. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001;30(1):1-13.
2. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001; 30(1):15-30.
3. Scholler R, Nahoul K, Castanier M, Rotman J, Sala-Baroux J. Testicular secretion of conjugated and unconjugated steroids in normal adults and in patients with varicocele. *J Steroid Biochem* 1984;20(1):203-15.
4. Mikhail G. Hormone secretion by the human ovaries. *Gynec Invest* 1970;1(1):5-20.
5. Nahoul, K, Adeline J, Bercovici JP. Radioimmunoassay of plasma 21-deoxycortisol. *J Steroid Biochem* 1989;33(6):1167-72.
6. Fiet J, Villette JM, Galons H, Boudou P, Burthier JM, Hardy H, et al. The application of a new highly sensitive radioimmunoassay of plasma 21-deoxycortisol to the

detection of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Ann Clin Biochem* 1994;31(1):56-64.

7. Wieland RG, Maynard DE, Riley TR, Hamwi GJ. Detection of 21-deoxycortisol in blood from a patient with congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism* 1965; 14(12):1276-81.
8. Fiet J, Gueux B, Raux-Demay MC, Kuttenn F, Vexiau P, Gourmelen M, et al. Le 21-déoxycortisol. Um nouveau marqueur de l'hyperandrogénie surrénalienne par déficit em 21-hydroxylase. *Presse Méd* 1989;18(40):1965-9.
9. Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttenn F, Vexiau P, Couillin P, et al. Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66 (4):659-67.
10. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33(6):988-91.
11. Vieira JGH, Russo EMK, Maciel RMB, Germek AO, Antunes LAN. Método radioimunológico para a dosagem do cortisol sérico. *Rev Bras Patol Clin* 1979;15(3):125-30.
12. Vieira JGH, Russo EMK, Maciel RMB, Germek AO, Verreschi ITN. Radioimunoensaio da 17a-hidroxioprogestero na no soro: considerações metodológicas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1980;24(1):24-30.
13. Franks RC. Plasma 17-hydroxyprogesterone, 21-deoxycortisol and cortisol in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;6(39):1099-102.
14. Loriaux DL, Ruder HJ, Lipsett MB. Plasma steroids in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;4(39):627-30.
15. Fernandes VT, Ribeiro-Neto LM, Lima SB, Vieira JGH, Verreschi ITN, Kater CE. Reverse-phase high-performance liquid chromatography separation of adrenal steroids prior to radioimmunoassay: application in congenital adrenal hyperplasia. *J Chrom Sci* 2003 (no prelo).
16. Milewicz A, Vecsei P, Korth-Schutz S, Haack D, Rösler A, et al. Development of plasma 21-deoxycortisol radioimmunoassay and application to the diagnosis of patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem* 1984;21(2):185-91.
17. Gueux B, Fiet J, Pham Huu Trung MT, Villette JM, Gourmelen M, Galons H, et al. Radioimmunoassay for 21-deoxycortisol: clinical applications. *Acta Endocrinol* 1985;108(4):537-44.
18. Fukushima DK, Nishina T, Wu RHK, Hellman L, Finkelstein JW. Rapid assay of plasma 21-deoxycortisol and 11-deoxycortisol in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol* 1979;10(4):367-75.
19. Milewicz A, Vecsei P, Korth-Schutz S, Haack S, Rösler A, Lichtwald K, et al. Development of plasma 21-deoxycortisol radioimmunoassay and application to the diagnosis of patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem* 1984;21(2):185-91.
20. Gueux B, Fiet J, Galons H, Boneté R, Villette J-M, Vexiau P, et al. The measurement of 11 β -hydroxy-4-pregnene-

3,20-dione (21-deoxycorticosterone) by radioimmunoassay in human plasma. **J Steroid Biochem** 1987;26(1):145-50.

21. Milewicz A, Afelska A, Wasikowa R, Romer T. Evaluation of 21-deoxycortisol as a marker for the detection of heterozygous carriers of 21-hydroxylase deficiency. **Endokrynologia Polska** 1993;44(2):188-93.

Endereço para correspondência:

Claudio E. Kater
Laboratório de Esteróides
Disciplina de Endocrinologia, Depto. de Medicina
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM)
R. Pedro de Toledo 781, 13°. andar
04039-032 São Paulo, SP.