

# Análise de um radioimunoensaio iodado para determinação de 11-deoxicortisol

## *Analysis of an iodide radioimmunoassay for 11-deoxicortisol measurement*

João Luiz de Oliveira Madeira<sup>1</sup>, Luciane Zgoda Bussmann<sup>1</sup>,  
Helena Panteliou Lima-Valassi<sup>1</sup>, Berenice Bilharinho de Mendonça<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42), São Paulo, SP, Brasil

### RESUMO

**Objetivo:** Nosso objetivo foi comparar duas técnicas de dosagem do 11-desoxicortisol: a técnica de radioimunoensaio iodado, a qual foi validada neste trabalho, e a cromatografia líquida de alta *performance* seguida por espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS), sendo a última considerada o padrão-ouro para dosagem dos hormônios esteroides. **Materiais e métodos:** Para a comparação entre os resultados de 11-desoxicortisol, foram selecionadas 88 amostras. **Resultados:** A sensibilidade analítica do radioimunoensaio foi de 0,30 ng/mL, com linearidade e perfil de precisão inadequado (34% das amostras com CV  $\geq$  20%). Das 88 amostras selecionadas, apenas 54 apresentaram resultados mensuráveis em ambos os métodos. A comparação desses resultados, por meio da regressão de Deming, resultou em um coeficiente de correlação de 0,610, inclinação de 3,751, intercepção de 0,145, evidenciando a pobre correlação entre os resultados e a superestimação dos resultados pelo RIA. **Conclusão:** Concluímos que o método de dosagem de 11-desoxicortisol por radioimunoensaio iodado apresentou resultados inadequados nos diversos parâmetros avaliados, inviabilizando sua utilização como método de dosagem do 11-desoxicortisol. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014;58(3):232-6

### Descritores

11-desoxicortisol; radioimunoensaio; espectrometria de massas; hiperplasia suprarrenal congênita

### ABSTRACT

**Objective:** Our aim was to correlate 11-deoxycortisol levels obtained by two currently available techniques for 11-deoxycortisol measurement: radioimmunoassay, and high performance liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry (MS/MS). The latter is the gold standard method for steroid hormone measurement. **Materials and methods:** We selected 88 samples and the results of these two methods were compared by Deming regression. **Results:** The analytical sensitivity of the RIA was 0.30 ng/mL, with inadequate linearity and inadequate precision profile (34% of the samples had a CV  $\geq$  20%). From the selected samples, 54 had measurable levels of 11-deoxycortisol in both methods and were used in the comparison. The comparison of RIA with LC-MS/MS showed an overestimation of the results by RIA. The correlation coefficient was 0.610; linear regression slope was 3.751; and the intercept was 0.145, indicating a poor correlation between the two methods. **Conclusion:** We concluded that 11-deoxycortisol measured by radioimmunoassay, despite a good analytical sensitivity, showed very low specificity, precluding its use as a reliable method for 11-deoxycortisol measurement. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014;58(3):232-6

### Keywords

11-deoxycortisol; radioimmunoassay; mass spectrometry; congenital adrenal hyperplasia

### Correspondência para:

João Luiz de Oliveira Madeira  
Universidade de São Paulo,  
Faculdade de Medicina,  
Universidade de São Paulo  
PAMB, Laboratório de Hormônios  
e Genética Molecular LIM/42,  
Av. Dr. Enéias de Carvalho Aguiar,  
155, 2º andar, bloco 6  
05403-900 – São Paulo, SP, Brasil  
joao.madeira@usp.br

Recebido em 25/06/2013  
Aceito em 15/01/2014

## INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 11 $\beta$ -hidroxilase (HAC-11OHD) é uma doença autossômica recessiva descrita pela primeira vez em 1955 por Eberlein e Bongiovani (1,2) e compreende cerca de 5% a 8% dos casos de HAC, com uma incidência de aproximadamente um entre 100.000 nascidos vivos (3,4).

O principal diagnóstico diferencial da HAC-11OHD é com a forma clássica virilizante da deficiência de 21 $\alpha$ -hidroxilase (HAC-21OHD). O diagnóstico da HAC-11OHD deve ser realizado por meio da dosagem de 11-desoxicortisol (3,4), a qual é pouco disponível e apresenta alto custo, de modo que os níveis desse hormônio frequentemente não são mensurados em pacientes com ambiguidade genital. Pacientes com HAC-11OHD geralmente apresentam níveis elevados de 17OHP, acarretando diagnóstico equivocado de HAC-21OHD (3).

A determinação do 11-desoxicortisol foi realizada por vários anos pela técnica de radioimunoensaio triado após extração do soro com hexano e acetato de etila. Com as restrições para uso de compostos triciados para preservação do meio ambiente, o Laboratório de Hormônios e de Genética Molecular (LIM/42) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) passou a terceirizar a determinação de 11-desoxicortisol, em um laboratório privado (Laboratório Fleury) que utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta *performance* seguida por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) (5).

Recentemente, o *kit* 11-Desoxycortisol – RIA – CT da DiaSource, Nivelles, Bélgica, um radioimunoensaio iodado, foi disponibilizado no mercado nacional. Entretanto, não há dados na literatura da comparação entre esses métodos para dosagem do 11-desoxicortisol.

O diagnóstico preciso da HAC-11OHD antes da realização do tratamento é fundamental para reposição hormonal adequada, além de ser importante para dirigir o estudo molecular para posterior aconselhamento genético e tratamento pré-natal.

Nosso objetivo foi verificar o desempenho analítico de um *kit* comercial para determinação de 11-desoxicortisol e comparar seus resultados com os obtidos pela técnica de LC-MS/MS, considerada padrão-ouro para dosagem dos hormônios esteroides.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Validação do radioimunoensaio iodado

**Radioimunoensaio iodado (RIE):** foi utilizado o *kit* 11-Desoxycortisol – RIA – CT (11-DOC, RIA CT, n. cat. KIP120000, DiaSource, Nivelles, Bélgica) sem extração prévia, conforme as instruções do fabricante. Na validação do RIE, foram analisados os seguintes parâmetros: sensibilidade analítica, exatidão, linearidade, precisão intraensaio, perfil de precisão e especificidade.

**Sensibilidade analítica:** 10 replicatas do calibrador zero foram dosadas em um único ensaio e o valor da sensibilidade analítica foi definido como a concentração correspondente à média das contagens das replicatas de calibrador zero subtraída de dois desvios-padrão dessas contagens.

**Exatidão:** foram preparados os padrões de 11-desoxicortisol nas seguintes concentrações: 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL, 15,62 ng/mL, 7,81 ng/mL, 3,91 ng/mL, 1,95 ng/mL, 0,98 ng/mL e 0,49 ng/mL (Sigma, R0500, St. Louis, MO, EUA). Esses padrões foram dosados em duplicata em único ensaio.

**Linearidade:** seis alíquotas preparadas a partir de uma amostra com baixa concentração e outra com alta concentração por meio da mistura em diferentes proporções, e cada alíquota foi dosada em duplicata em um único ensaio.

**Precisão intraensaio:** 10 replicatas de um *pool* de amostras apresentando baixa concentração e 10 replicatas de um *pool* de alta concentração de 11-desoxicortisol foram dosadas em um único ensaio para determinação da precisão intraensaio.

**Perfil de precisão:** 88 amostras provenientes da rotina diagnóstica foram analisadas em duplicata, e o coeficiente de variação (CV) entre as duplicatas de cada uma dessas amostras foi calculado.

**Especificidade:** o anticorpo empregado no ensaio, segundo dados do fabricante, apresenta reação cruzada de 5,6% com a 17-hidroxiprogesterona (17OHP) e < 1% com outros esteroides. Para investigarmos a influência dos níveis de 17OHP nas dosagens de 11-desoxicortisol por RIE, avaliamos a correlação entre o resultado desses dois hormônios em 62 amostras, nas quais foram determinadas as concentrações de 17OHP por RIE validado previamente pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42 do HCFMUSP (6). Um padrão de 17OHP (Sigma, H5752, St. Louis, MO, EUA) com concentração de 1.000 ng/mL foi dosado em duplicata no RIE de 11-desoxicortisol.

**Comparação do RIE com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS):** para comparação das duas metodologias, 88 amostras provenientes da rotina diagnóstica foram encaminhadas ao Laboratório Fleury para determinação de 11-desoxicortisol por LC-MS/MS descrito previamente na literatura (5).

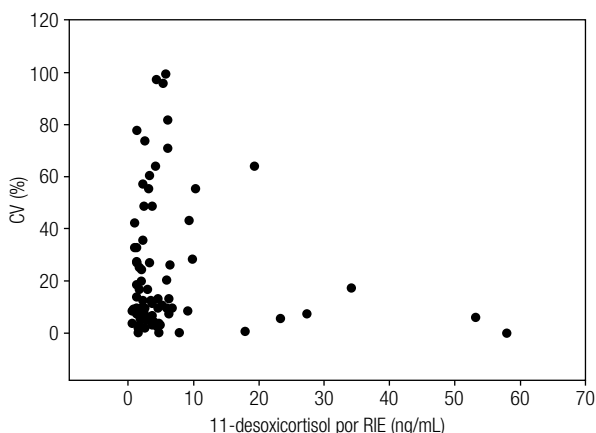
**Análise estatística:** para análise estatística, foram utilizados o Programa SigmaStat 3.5 (Statcon) e o Programa EP Evaluator 9 (Data Innovations).

## RESULTADOS

### Validação do radioimunoensaio iodado

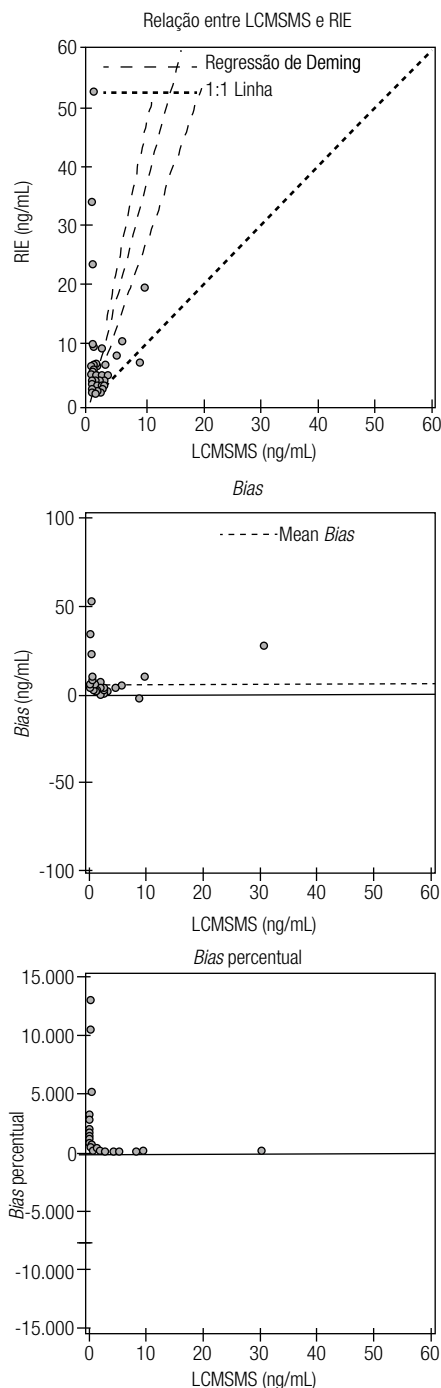
A sensibilidade analítica do ensaio foi de 0,30 ng/mL, valor este acima do informado pelo fabricante (0,11 ng/mL). O estudo de exatidão com padrões Sigma em diversas concentrações evidenciou uma recuperação média de 71% (variação de 51% a 112%), indicando que o RIE subestima os resultados de 11-desoxicortisol na ausência de outros esteroides. A linearidade mostrou-se inadequada, variando entre 75% e 102%. A recuperação da alíquota de 11-desoxicortisol foi de 75%, abaixo dos valores considerados adequados (80% a 120%).

O estudo de precisão intraensaio mostrou mais uma inadequação do *kit*. A análise de 10 replicatas das amostras de 4,7 ng/mL e 55 ng/mL apresentou CV de respectivamente 36% e 15%, valores estes acima do CV máximo permitido (10,7%) disponível na tabela de variação biológica. No perfil de precisão, observamos que 34% das amostras apresentaram CV  $\geq 20\%$  (Figura 1). A correla-

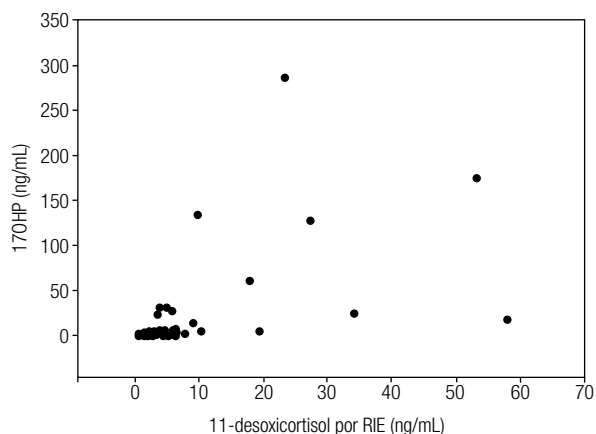


**Figura 1.** Avaliação do perfil de precisão. Relação entre o coeficiente de variação (CV) intraensaio e o nível médio de 11-desoxicortisol de cada amostra determinado por RIE. O método apresenta um perfil de precisão inadequado, sendo que mais de 30% das amostras apresentam CV maior ou igual a 10,7%.

ção entre o RIE e LC-MS/MS por meio da regressão de Deming resultou em um coeficiente de correlação de 0,610, *slope* de 3,751, *intercept* de 0,145, evidenciando uma correlação fraca entre os resultados (Figura 2). Os resultados do RIE foram sistematicamente mais altos que os observados pela técnica de LC-MS/MS, com um *bias* médio de 5,36 (117%), segundo regressão de Deming.



**Figura 2.** Comparação entre os resultados de 11-desoxicortisol obtidos por RIE e por MS/MS. Representação da relação entre os níveis de 11-desoxicortisol dosados por RIE e por LC-MS/MS (ng/mL), *bias* e *bias* percentual utilizando LCMS/MS como referência.



**Figura 3.** Correlação entre os níveis de 11-desoxicortisol e os níveis de 17OH-pregesterona dosados por RIE. Representação da relação entre os níveis de 11-desoxicortisol e os de 17-hidroxiprogesterona (17OHP), ambos expressos em ng/mL. A correlação entre esses valores foi baixa ( $\rho = 0,555$ ), indicando que outros esteroides devem interferir na dosagem de 11-desoxicortisol por RIE.

A dosagem do padrão Sigma de 17OHP na concentração de 1.000 ng/mL resultou em valores de 11-desoxicortisol > 65 ng/mL, demonstrando não ser o RIE um método específico.

Observamos uma correlação estatisticamente significativa ( $\rho = 0,555$ ,  $p < 0,001$ ), entre os níveis de 17OHP e os de 11-desoxicortisol dosados por RIE, evidenciando a alta reação cruzada desse ensaio.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, comparamos duas técnicas de dosagem do 11-desoxicortisol: a técnica de RIE e a LC-MS/MS. A espectrometria de massa é mais específica do que o radioimunoensaio para a dosagem de vários hormônios, sendo considerado o padrão-ouro para dosagem dos hormônios esteroides (6,7).

As vantagens do método de RIE são sua maior disponibilidade e o menor custo para adquirir um contador de radiação  $\gamma$  em relação a um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas. No entanto, na validação do método de radioimunoensaio para dosagem de 11-desoxicortisol, diversos parâmetros se mostraram inconsistentes, tornando o método impróprio para o uso na rotina diagnóstica.

Uma grave deficiência identificada pelos experimentos foi a falta de especificidade do RIE iodado, havendo reação cruzada significativa com a 17OHP, provavelmente pela similaridade das estruturas químicas da 17OHP e do 11-desoxicortisol. Esse problema invia-

biliza a aplicação do RIE como ferramenta diagnóstica, já que a dosagem de 11-desoxicortisol é fundamental para o diagnóstico diferencial entre a HAC-21OHD e a HAC-11OHD, e ambas as patologias apresentam níveis elevados de 17OHP. Esse fato foi relatado na literatura nacional em uma paciente portadora de HAC-21OHD, confirmado pela presença da mutação V281L em um dos alelos e uma grande conversão de seis éxons a partir de CYP21P no outro, que, além de apresentar níveis elevados de 17OHP (385 ng/mL) e 21-desoxicortisol (233,4 ng/mL), também apresentava medidas elevadas de 11-desoxicortisol (49 ng/mL) segundo RIE, mostrando a ineficácia do método para determinação desse esteroide (8). Além disso, o anticorpo anti-11-desoxicortisol empregado nos RIEs apresenta reação cruzada com outros hormônios esteroides, devido à similaridade de estrutura química.

Em conclusão, o método de dosagem de 11-desoxicortisol por radioimunoensaio, atualmente disponível no mercado nacional, apresentou diversas falhas nos diferentes parâmetros avaliados, o que inviabiliza sua utilização como método de dosagem do 11-desoxicortisol.

Agradecimentos: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa de iniciação científica, processo 2010/05188-0. Além disso, gostaríamos de ressaltar a colaboração dos funcionários do Setor de Hormônios do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42 – HCFMUSP.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Eberlein WR, Bongiovanni AM. *J Clin Endocrinol Metab.* 1955;15:1531-34.
2. Eberlein WR, Bongiovanni AM. Plasma and urinary corticosteroids in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem.* 1956;223(1):85-94.
3. Mello MP, Penachioni JY, do Amaral FC, de Castro M. Deficiência da 11 $\beta$ -hidroxilase. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(5):713-23.
4. de Mello MP, Bachega TASS, da Costa-Santos M, Mermejo LM, de Castro M. Bases moleculares da hiperplasia adrenal congênita. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2002;46(4):457-77.
5. Carvalho VM, Nakamura OH, Vieira JGH. Simultaneous quantitation of seven endogenous C-21 adrenal steroids by liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *J Chromat B.* 872(2008):154-61.
6. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):786-90.

7. Lepage R, Albert C. Fifty years of development in the endocrinology laboratory. *Clin Biochem.* 2006;39:542-57.
8. Tonetto-Fernandes V, Lemos-Marini SHV, Kuperman H, Ribeiro-Neto LM, Verreschi ITN, Kater CE. Brazilian Congenital Hyperplasia Multicenter Study Group. Serum 21-Deoxycortisol, 17-Hydroxyprogesterone, and 11-deoxycortisol in classic congenital adrenal hyperplasia: clinical and hormonal correlations and identification of patients with 11beta-hydroxylase deficiency among a large group with alleged 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2179-84.