

Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação direta da 17 α -hidroxiprogesterona sérica

Eduardo Kinio Sugawara ¹, Luciane Maria Ribeiro Neto ^{1,2}, Vânia de Fátima Tonetto Fernandes ³,
Cláudio Elias Kater ¹, Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi ^{1*}

¹ Laboratório de Esteróides, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; ² Toxikón - Assessoria Toxicológica, ³ Hospital Infantil Darcy Vargas

A determinação dos níveis séricos de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) é essencial no diagnóstico laboratorial da hiperplasia adrenal congênita (CAH) por deficiência de 21-hidroxilase. Essa condição é responsável por pseudo-hermafroditismo em meninas e precocidade sexual em ambos os sexos. A 17OHP foi quantificada diretamente empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa (RP-HPLC) em amostras de soro previamente extraídas com éter. Utilizou-se coluna ODS-Hypersil[®] e fase móvel composta de água-metanol (4:6 v/v) com vazão de 1,0 mL/min. A determinação deu-se em 246 nm. A 17OHP apresentou tempo de retenção de 5,6 min. O método mostrou-se eficaz e eficiente com sensibilidade e linearidade ($r^2 = 0,9993$) na faixa de concentração estudada de 500 a 100.000 ng/dL. As precisões intra e interensaios foram respectivamente 4,4 e 8,1%. O método pode ser empregado na rotina laboratorial da avaliação desse esteróide para diagnóstico de CAH, sendo necessário o emprego do radioimunoensaio (RIA) apenas para quantificar amostras com valores abaixo de 500 ng/dL.

Unitermos:

- HPLC
- Radioimunoensaio
- 17 α -hidroxiprogesterona
- Hiperplasia Adrenal Congênita
- Esteróides

*Correspondência:

I. T.N. Verreschi
Laboratório de Esteróides
Disciplina de Endocrinologia -
Departamento de Medicina
Universidade Federal de São Paulo -
UNIFESP/EPM
R. Pedro de Toledo, 781, 13º andar
04039-032 - São Paulo, SP
E-mail: ieda@endocrino.epm.br

INTRODUÇÃO

A determinação dos níveis séricos de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) é essencial no diagnóstico laboratorial da hiperplasia adrenal congênita CAH por deficiência de 21-hidroxilase. Essa condição deve, idealmente, ser detectada precocemente, pois é responsável por pseudo-hermafroditismo no sexo feminino e, quando não tratada, por precocidade sexual em ambos os sexos.

A 17OHP é um precursor esteróide produzido nas adrenais e também nos ovários, testículos e placenta. Além

da sua importância no diagnóstico da CAH, sua mensuração é de valor diagnóstico na caracterização dos estados hiperandrogênicos e no estudo da infertilidade em mulheres.

Na deficiência de 21-hidroxilase, como consequência da deficiência de cortisol e ausência de *feed-back* negativo hipotálamo-hipofisário com elevação do ACTH, aumenta a produção de precursores esteróides, sendo a 17OHP o principal deles (Edwards, 1975).

A determinação deste esteróide em amostras biológicas costuma ser feita por radioimunoensaio (RIA)

(Vieira *et al.*, 1980). Os principais problemas dos ensaios de hormônios esteróides por essa técnica estão relacionados à grande semelhança estrutural que existe entre eles e à dificuldade de obtenção de anticorpos específicos associados à ampla faixa de concentração em que podem ser encontrados (Vieira *et al.*, 1999). A cromatografia líquida tem sido empregada para a separação da 17OHP com posterior quantificação por RIA (Wong *et al.*, 1992; Vieira, Nakamura, Noguti, 2002; Tonetto-Fernandes *et al.*, 2003) bem como para quantificação direta (Saisho, Shimozawa, Yata, 1990; Wei *et al.*, 1990; Gudmundsson *et al.*, 1999). A espectrometria de massas, associada à cromatografia gasosa (GC-MS) ou à cromatografia líquida (LC-MS), também tem sido empregada na determinação desse esteróide (Lai *et al.*, 2001, 2002). Ambas as técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade. A desvantagem da aplicação do GC-MS é que nesta técnica é necessária a utilização de derivatização, além de requerer volumes maiores de amostra. O LC-MS não apresenta estas dificuldades, porém é um equipamento de alto custo, dificultando sua aplicação em laboratório de rotina diagnóstica. Avaliamos a quantificação direta da 17OHP por cromatografia líquida de alta eficiência no modo fase reversa (RP-HPLC) visando à rapidez e à confiabilidade no diagnóstico de CAH.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrão

O padrão de 17OHP foi adquirido da Steraloids Inc. e soluções metanólicas foram preparadas nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/dL. O metanol empregado foi de grau cromatográfico (EM Science). Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração.

RP-HPLC

Utilizou-se um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência HP1100 (Hewlett-Packard) constituído por amostrador automático, bomba quaternária e detector UV com comprimento de onda variável. A detecção foi feita em 246 nm. Para a separação cromatográfica empregou-se coluna analítica ODS-Hypersil® (125 x 4 mm, 5 µm), com coluna-guarda equivalente, ambas obtidas da Hewlett-Packard e mantidas a 40 °C durante a análise. A fase móvel foi água-metanol (4:6; v/v) com vazão de 1,0 mL/min. A água utilizada foi obtida empregando sistema Milli-Q de purificação (Millipore) e o metanol foi grau cromatográfico (EM Science). Para posterior análise comparativa com RIA, a fração correspondente à

17OHP foi coletada com auxílio de um coletor de frações FRAC-100 (Pharmacia Biotech). Os eluatos correspondiam a um intervalo de 2 min e foram evaporados a 40 °C em banho-seco sob fluxo de nitrogênio (N₂).

Preparação das amostras

Aliquotas de 2,0 mL de soro foram extraídas com 5,0 mL de éter p.a (Merck) sob agitação mecânica em agitador tipo vórtex por 1 min. A fase etérea foi separada sob centrifugação a 21.130 g por 30 min a 4 °C. Os extratos foram submetidos a evaporação a 40 °C sob fluxo de N₂ em um banho-seco. Os resíduos foram ressuspensos com 200 mL de fase móvel e filtrados com membrana Durapore® (13 mm, 0,45 µm; Millipore). Destes, 50 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

Validação analítica

A linearidade foi verificada na faixa de concentração esperada para o diagnóstico de CAH. Para este estudo foram utilizadas amostras adicionadas de 17OHP entre 500 a 100.000 ng/dL e avaliadas em triplicatas. A partir desses resultados determinou-se o limite de quantificação (L.Q.), que foi definido como a menor concentração, cujo o coeficiente de variação não ultrapasse 15%. A precisão intra-ensaio foi demonstrada através do coeficiente de variação médio (CV%) das triplicatas das amostras de 11 diferentes concentrações analisadas em um mesmo dia. Para a determinação do CV% médio interensaio analisaram-se 6 diferentes concentrações por 2 dias. A exatidão do método foi verificada por análise de amostras de concentração conhecida (500, 1.000, 3.000, 5.000, 25.000 e 50.000 ng/dL) e expressa em porcentagem. O procedimento de validação foi baseado em propostas da literatura para a validação de métodos cromatográficos (ANVISA, 2004; Chasin, Chasin, Salvadori, 1994; Chassin *et al.*, 1998). As amostras empregadas na determinação desses parâmetros foram elaboradas a partir de um *pool* de soro livre de esteróides obtido através da purificação com carvão-ativado, adaptado de Carter (1978), e submetido previamente ao método proposto por RP-HPLC e à dosagem por RIA, comprovando a ausência de 17OHP.

Curva de calibração

A curva de calibração para a quantificação das amostras séricas foi determinada a partir de amostras adicionadas em 11 diferentes concentrações na faixa de 500 a 100.000 ng/dL. Estas amostras foram submetidas ao método proposto.

Amostragem

Foram utilizadas 16 amostras de sangue obtidas por punção venosa periférica, provenientes da rotina para confirmação de diagnóstico da CAH; após a centrifugação o soro foi armazenado a -20°C até sua utilização.

Estudo comparativo com RIA

Para estudo comparativo as amostras submetidas ao método cromatográfico e amostras de soro livre adicionadas de concentração conhecida de 17OHP foram também avaliadas por RIA. A dosagem da 17OHP por RIA foi feita empregando-se o método da rotina laboratorial, previamente adaptado (Fernandes *et al.*, 2003). A concentração em ng/dL foi calculada com ajuda do *software* RIACALC (Wallac Oy) e os resultados foram corrigidos em função do volume inicial e da diluição das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RIA tem sido freqüentemente empregado na determinação da 17OHP, porém é necessário o emprego de técnicas analíticas preparativas para garantir a sensibilidade e especificidade necessárias destas dosagens. O HPLC tem sido recomendado como técnica preparativa para as dosagens de 17OHP por RIA, uma vez que a utilização de colunas de celite e Sephadex[®] não permitem a separação deste esteróide de outros interferentes, como a 17-hidroxipregnenolona, pregnenolona e progesterona (Viera, Nakamura, Noguti, 2002), além de serem bastante trabalhosas, técnico-dependentes e de difícil automação. Considerando-se a robustez aliada à eficiência e à seletividade do HPLC este pode ser empregado para dosagem direta da 17OHP visando o diagnóstico da CAH.

O método proposto neste trabalho, mostrou-se rápido e eficiente na determinação da 17OHP sérica. A Figura 1

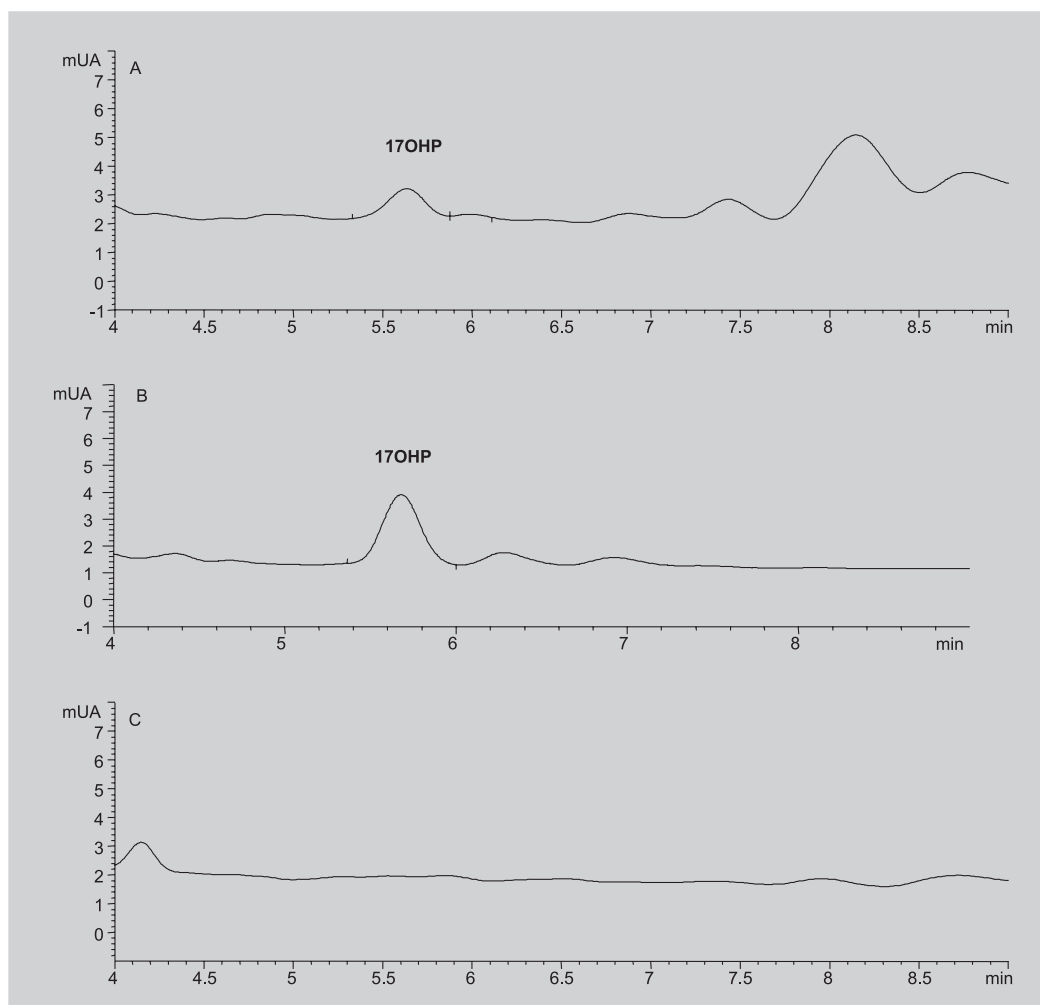


FIGURA 1 - Cromatograma característico da análise de 17OHP em amostras de soro empregando RP-HPLC. (A) Amostra de soro adicionada de 1000 ng/dL; (B) Amostra de indivíduo portador de CAH e (C) Amostra de soro livre de esteróides.

apresenta o perfil cromatográfico obtido na separação da 17OHP no método proposto. O tempo de retenção (t_R) obtido foi de 5,6 min e o tempo total de análise foi de 14,0 min. Uma citação da literatura que emprega separação cromatográfica com fase reversa que se assemelha ao método proposto nesse trabalho (Saisho, Shimosawa, Yata, 1990) apresenta tempo de análise superior a 25 min e t_R de 19,2 min para a 17OHP. O emprego do éter na extração garante simplicidade e baixo custo na purificação de amostras destinadas a

análise por HPLC. Seu emprego na extração de esteróides é bastante citado na literatura (Wei *et al.*, 1990; Vieira *et al.*, 1979; Tonetto-Fernandes *et al.*, 2003)

Observou-se linearidade na faixa de concentração estudada de 500 a 100.000 ng/dL com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9993. Sua representação gráfica é apresentada na Figura 2. A Tabela I reúne os resultados da validação analítica obtidos no estudo da precisão e da exatidão. O CV% médio intra-ensaio obtido para a faixa

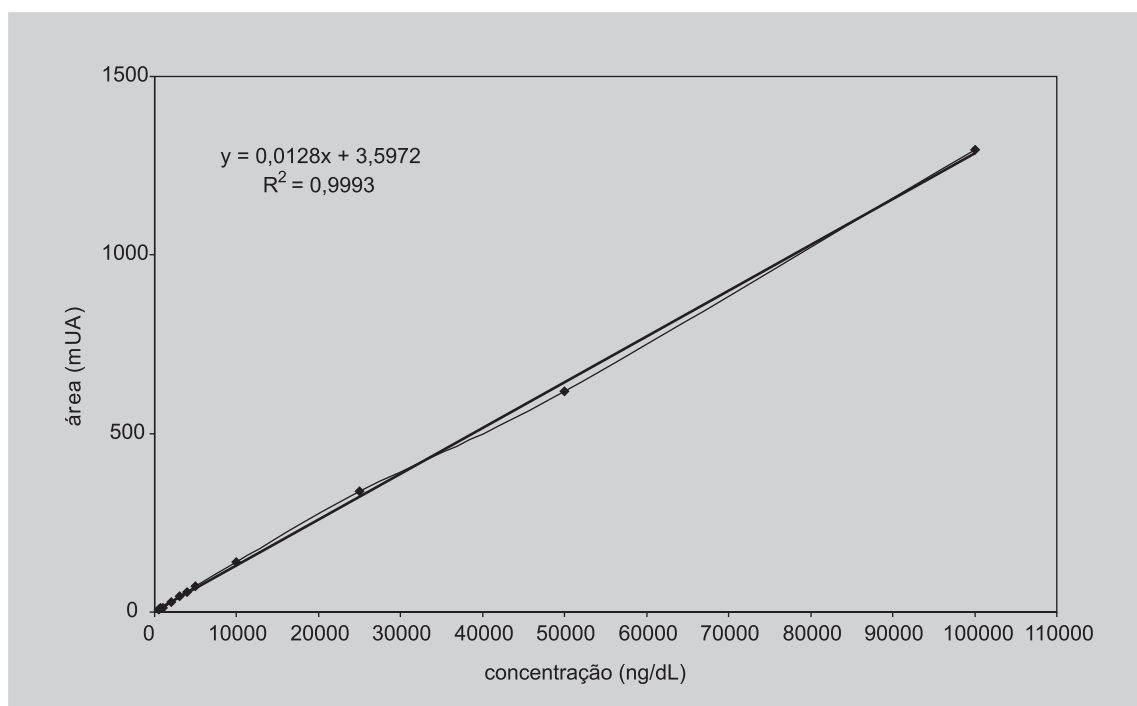


FIGURA 2 - Representação gráfica da linearidade do método de RP-HPLC para a dosagem de 17OHP sérico.

TABELA I - Resultados da validação analítica obtidos no estudo da precisão e da exatidão

Concentração (ng/dL)	Precisão (CV%)		Exatidão (%)
	Intra-ensaio (n=3)	Interensaio (n=2)	
500	7,7	27,1	111,8
750	8,3	N.D.	N.D.
1.000	2,6	13,0	95,6
2.000	7,6	N.D.	N.D.
3.000	3,9	4,6	113,3
4.000	0,7	N.D.	N.D.
5.000	1,3	0,3	109,5
10.000	5,6	N.D.	N.D.
25.000	3,3	1,7	106,8
50.000	3,4	N.D.	93,5
100.000	3,6	1,7	N.D.

N.D.: não determinado

de concentração de 500 a 100.000 ng/dL foi de 4,4%. Para a faixa de concentração compreendida entre 500 e 50.000 ng/dL o CV% médio interensaio foi de 8,1%. A exatidão do método estava compreendida entre 93,5 e 111,8%. Este parâmetro mostrou-se compatível com relatos da literatura, que oscilaram entre 80 a 104%, bem como os CV% intra e interensaio, apropriados e de acordo com relatados anteriormente, embora os protocolos de estudo não tenham sido exatamente os mesmos (Wei *et al.*, 1990; Harr, 1994).

A Tabela II apresenta os resultados obtidos para as amostras submetidas à dosagem de 17OHP sérica tanto pelo método proposto empregando RP-HPLC, como pelo método de rotina por RIA. As amostras analisadas oscilaram entre valores inferiores ao limite de quantificação do método (500 ng/dL) e 51.107 ng/dL (Tabela II). Pelos resultados obtido apenas 37% das amostras enviadas confirmam o diagnóstico de CAH.

TABELA II - Resultados encontrados para a 17OHP sérica de amostras provenientes da rotina diagnóstica de CAH submetidas à dosagem por RP-HPLC e por RIA

Amostras	Concentração de 17-OHP (ng/dL)	
	RP-HPLC	RIA
1	< 500	276
2	< 500	258
3	51.107	12.977
4	< 500	240
5	< 500	293
6	< 500	178
7	< 500	231
8	< 500	178
9	< 500	182
10	< 500	338
11	2.866	3.289
12	< 500	156
13	1.184	2.578
14	13.231	6.800
15	4.188	2.796
16	31.660	14.950

Os resultados obtidos para as amostras de concentrações conhecidas submetidas a ambos os métodos são mostrados na Tabela III. A comparação dos resultados obtidos entre as duas técnicas mostra que embora o RIA se aplica à amostras de baixas concentrações de 17OHP, o HPLC é adequado para a determinação deste esteróide visando ao diagnóstico da CAH em que os valores encontrados são exacerbados em relação aos valores normais, que podem atingir até 400 ng/dL após estímulo com ACTH.

TABELA III - Resultados encontrados em amostras de soro livre adicionado de concentração conhecida de 17OHP submetidas à dosagem por RP-HPLC e por RIA

Adicionada	Concentração de 17-OHP (ng/dL)	
	RP-HPLC	RIA
1.000	954	933
	959	853
3.000	3.336	3.111
	3.458	3.333
5.000	5.472	5.156
25.000	26.705	6.756
50.000	46.759	24.889

Pacientes portadores de CAH apresentam níveis superiores a 800 ng/dL. Os níveis de 17OHP nestes pacientes podem atingir concentrações de até 100.000 ng/dL (Tonetto-Fernandes, 2002). O HPLC mostra, ainda, maior linearidade e exatidão em concentrações mais altas deste esteróide. Além disso, o tempo de análise fica significativamente reduzido em relação ao consumido pela dosagem empregando RIA. Esta técnica pode ainda proporcionar sua utilização como etapa preparatória para outros métodos analíticos.

O método descrito mostrou-se rápido e eficiente na determinação da 17OHP sérica. A comparação dos resultados obtidos com as duas técnicas mostra que o RP-HPLC ajusta-se com vantagem à rápida caracterização de níveis elevados de 17OHP e diagnóstico da CAH por deficiência de 21-hidroxilase.

ABSTRACT

Application of reversed-phase liquid-chromatography (RP-HPLC) to direct quantification of 17 α -hydroxyprogesterone in serum

Determination of serum levels of 17 α -hydroxyprogesterone (17OHP) is essential for hormonal characterization of the 21-hydroxylase deficiency form of congenital adrenal hyperplasia (CAH). This condition results in female pseudo-hermaphroditism and sexual precocity in both sexes. 17OHP was directly quantified by liquid chromatography and reverse-phase separation (RP-HPLC) in previously ether extracted serum samples. A ODS-Hypersil[®] column and a water-methanol (4:6; v/v) mobile phase at 1.0 mL/min were employed in the procedure. The 17OHP peak was measured at 246 nm, with a retention time of 5.6 min. The method was effective and efficient

with good sensitivity and linearity ($r^2 = 0.9993$) in the concentration range of 500 to 100,000 ng/dL. Intra and inter-assay precisions were 4.4 and 8.1%, respectively. This method can be employed in the laboratory routine for 17OHP in the diagnostic evaluation of CAH; RIA must only be employed to quantify values below the 500 ng/dL.

UNITERMS: HPLC. Radioimmunoassay. 17 α -hydroxyprogesterone. Congenital Adrenal Hyperplasia. Steroids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003, Consulta Pública, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2004.
- CARTER, P. Preparation of ligand-free human serum for radioimmunoassay by adsorption on activated charcoal. *Clin. Chem.*, v. 24, n. 2, p. 362-364, 1978.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.
- CHASIN, A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo.*, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.
- EDWARDS, R.W.H. Inborn errors of corticosteroid biosynthesis In: MAKIN, H.L.J., *Biochemistry of steroid hormones*. Oxford: Blackwell, 1975. p. 277.
- FERNANDES, V.T.; RIBEIRO-NETO, L.M.; LIMA, S.B.; VIEIRA, J.G.H.; VERRESCHI, I.T.N.; KATER, C.E. Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of adrenal steroids prior to radioimmunoassay: application in congenital adrenal hyperplasia, *J. Chromatogr. Sci.*, v. 41, p. 251-253, 2003.
- GUDMUNDSSON, K.; MAJZOUB, J.A.; BRADWIN, G.; MANDEL, S.; RIFAI, N. Virilizing 21-hydroxylase deficiency: timing of newborn screenig and confirmatory tests can be crucial. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, v. 12, n. 6, p. 895-901, 1999.
- HARR, R. Measurement of adrenal corticosteroids by high-performance liquid chromatography. *Clin. Lab. Sci.*, v.7, n.1, p. 50-56, 1994.
- LAI, C.C.; TSAI, C.A.; TSAI, F.J.; WU, J.Y.; LIN, Y.D.; LEE, C.C. Rapid screening assay of congenital adrenal hyperplasia by measuring 17 α -hydroxyprogesterone with high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *J. Clin. Lab. Anal.*, n. 16, p. 20-25, 2002.
- LAI, C.C.; TSAI, C.H.; TSAI, F.J.; LEE, C.C.; LIN, W.D. Rapid monitoring assay of congenital adrenal hyperplasia with microbore high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, v.15, n. 22, p. 2145-2151, 2001.
- SAISHO, S; SHIMOZAWA, K.; YATA, J. Changes of several adrenal D4-steroids measured by HPLC-UV spectrometry in neonatal patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm. Res.*, v. 33, p. 27-34, 1990.
- TONETTO-FERNANDES, V.F. Padronização da técnica de determinação do 21-deoxicortisol e sua aplicabilidade a hiperplasia adrenal congênita. São Paulo, 2002. 86 p. [Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo].
- TONETTO-FERNANDES, V.; RIBEIRO-NETO, L.M.; VERRESCHI, I.T.N.; FIET, J.; VIEIRA, J.G.H.; KATER, C.E. Desenvolvimento de um radioimunoensaio para 21-deoxicortisol sérico e sua potencial aplicação no diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 47, n. 2, p. 171-176, 2003.
- VIEIRA, J.G.H.; NAKAMURA, O.H.; NOGUTI, K.O. Aplicação da cromatografia líquida de alta performance como método preparativo para a dosagem de esteróides hormonais por RIE: dosagem de 17OH-progesterona e diidrotestosterona. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n. 1, p. 91-96, 2002.
- VIEIRA, J.G.H.; RUSSO, E.M.K.; MACIEL, R.M.B.; GERMEK, A.O.; ANTUNES, L.A.N. Método radioimunológico para a dosagem do cortisol sérico. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v. 15, n. 3, p. 125-130, 1979.

- VIEIRA, J.G.H.; RUSSO, E.M.K.; MACIEL, R.M.B.; GERMEK, A.O.; VERRESCHI, I.T.N. Radioimunoensaio para 17 α -hidroxiprogesterona sérica: considerações metodológicas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 24, n. 1, p. 24-30, 1980.
- VIEIRA, J.G.H.; TACHIBANA, T.T.; NOGUTI, K.O.; FERRER, C.M.; MACIEL, R.M.B. Valores falsamente elevados em ensaios diretos para a medida de hormônios esteróides no soro. *J. Bras. Patol.*, v. 35, p. 71-74, 1999.
- WEI, J.Q.; WEI, J.L.; ZHOU, X.T.; CHENG, J.P. Isocratic reversed phase high performance liquid chromatography determination of twelve natural corticosteroids in serum with on-line ultraviolet and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, v. 4, n. 4, p. 161-164, 1990.
- WONG, T.; SHACKLETON, C. H.; COVEY, T. R.; ELLIS, G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17 alpha-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin. Chem.*, v. 38, n. 9, p. 1830-1837, 1992.

Recebido para publicação em 04 de fevereiro de 2004.

Aceito para publicação em 22 de junho de 2004.