



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LETÍCIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

***ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE IMUNOENSAIO E
ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM PARA ANDRÓGENOS
BASAIS E APÓS ESTÍMULO COM GONADOTROFINA
RECOMBINANTE HUMANA EM CRIANÇAS COM AMBIGUIDADE
GENITAL E CARIÓTIPO 46,XY***

CAMPINAS

2019

LETÍCIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE IMUNOENSAIO E ESPECTROMETRIA DE
MASSA EM TANDEM PARA ANDRÓGENOS BASAIS E APÓS ESTÍMULO COM
GONADOTROFINA CORIÔNICA RECOMBINANTE HUMANA EM CRIANÇAS COM
AMBIGUIDADE GENITAL E CARIÓTIPO 46,XY

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Saúde da
Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: DR GIL GUERRA JÚNIOR

COORIENTADOR: DR CARLOS ALBERTO LONGUI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LETÍCIA RIBEIRO DE OLIVEIRA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. GIL GUERRA JÚNIOR.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL4a Oliveira, Leticia Ribeiro de, 1981-
Análise comparativa entre imunoenensaio e espectrometria de massa em tandem para andrógenos basais e após estímulo com gonadotrofina coriônica recombinante humana em crianças com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY / Leticia Ribeiro de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Gil Guerra Júnior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Testosterona. 2. Testículo. 3. Androstenodiona. 4. Síndrome de resistência a andrógenos. 5. 3-Oxo-5-alfa-Esteroido 4-Desidrogenase. I. Guerra Júnior, Gil, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative analysis between immunoassay and tandem mass spectrometry for androgens before and after recombinant gonadotropin in children with genital ambiguity and 46,XY karyotype

Palavras-chave em inglês:

Testosterone

Testis

Androstenedione

Androgen-insensitivity syndrome

3-Oxo-5-alpha-Steroid 4-Dehydrogenase

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Gil Guerra Júnior [Orientador]

Vinícius Nahime Brito

Cristiane Kochi

Juliana Gabriel Ribeiro de Andrade

Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Data de defesa: 04-06-2019

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3724-4884>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1569027448442572>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LETÍCIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR (A): PROF(A). DR(A). GIL GUERRA JÚNIOR

COORIENTADOR (A): PROF(A). DR(A). CARLOS ALBERTO LONGUI

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). GIL GUERRA JÚNIOR**
 - 2. PROF(A). DR(A). JULIANA GABRIEL RIBEIRO DE ANDRADE**
 - 3. PROF(A). DR(A). LILIA FREIRE RODRIGUES DE SOUZA LI**
 - 4. PROF(A). DR(A). VINÍCIUS NAHIME BRITO**
 - 5. PROF(A). DR(A). CRISTIANE KOCHI**
-

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM

Data: 04/06/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pacientes, que são o foco do meu estudo, que confiam em mim e que me motivam a seguir o caminho da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meus pais João Batista e Terezinha, minhas irmãs Lívia e Laura e a meu marido Eduardo pelo apoio e compreensão em momentos em que minha ausência era necessária, por terem compartilhado comigo a importância do que a área acadêmica, a pesquisa e esse título representam para mim.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr Gil Guerra Júnior pelo exemplo de profissionalismo, gentileza e dedicação; por se preocupar com as viagens feitas, com a dificuldade da distância, por ser tão preciso e assertivo em todos os passos da orientação dessa pesquisa. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto no GIEDDS.

Meu sincero e especial agradecimento ao Dr. Carlos Alberto Longui, não somente pela colaboração nesse trabalho, mas principalmente por ter apontado desde o início da residência o caminho da pesquisa e por ter sugerido, viabilizado e confiado a mim a continuidade de um projeto junto à equipe da UNICAMP.

Agradeço a meus amigos, especialmente àqueles que conheci durante o andamento desse projeto e que me ajudaram em algum momento no processo de conclusão do doutorado. Agradeço especialmente o carinho e o apoio de Stela Carpini, uma grande amiga que a UNICAMP me deu.

Meus agradecimentos à equipe dos Laboratórios de Fisiologia e de Toxicologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP pela colaboração.

Agradeço a toda equipe do GIEDDS, da Faculdade de Ciências Médicas e da pós-graduação.

Agradeço também a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão) da UNICAMP cujos financiamentos tornaram possível a realização desse projeto. Este estudo foi financiado por CNPq (Processo 472098/2011-0), FAEPEX (Processo nº 106/2014) e CAPES (001).

Agradeço à empresa Merck Serono pela doação das ampolas do medicamento utilizado para o estudo.

Por fim, agradeço também ao grupo Fleury de São Paulo, em especial à Dra Maria Izabel Chiamolera, pela contribuição em relação às dosagens hormonais de dihidrotestosterona por espectrometria de massa.

RESUMO

Introdução: A dosagem de esteroides é um dos desafios da endocrinologia pediátrica e, embora os métodos de imunoensaio tenham sido usados por mais de 40 anos para esse fim, a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) é atualmente considerada o padrão ouro para a medida de esteroides.

Objetivos: Foi comparar métodos tradicionais de imunoensaio e LC-MS/MS para a dosagem de andrógenos antes e após o estímulo de gonadotrofina coriônica humana recombinante (hCGr) em crianças com diagnóstico de distúrbio da diferenciação do sexo (DDS) e cariótipo 46,XY com produção normal de testosterona, além de verificar a eficácia do hCGr para estímulo da esteroidogênese testicular.

Métodos: Foram avaliados 19 pacientes, cinco casos de síndrome de insensibilidade parcial aos andrógenos (IPA), quatro casos de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 e 10 crianças com diagnóstico de DDS 46,XY idiopático, todos pré-púberes e não-gonadectomizados. Foram dosados os hormônios testosterona total, dihidrotestosterona (DHT), dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona por imunoensaio e LC-MS/MS antes e sete dias após a aplicação de 6.500 UI do hCGr (Ovidrel®). A correlação entre os dois métodos foi analisada pelos Coeficientes de Correlação Intraclasse (ICC) e Coeficiente de Correlação de Spearman (CCS), enquanto a análise de concordância foi feita pelos métodos de regressão de Passing & Bablok (PB) e método de Bland & Altman (BA).

Resultados: Em relação aos coeficientes ICC e CCS, respectivamente, a testosterona total apresentou excelente correlação em ambos (0,960 e 0,964), para o DHT a correlação entre os dois métodos foi desprezível pelo ICC (0,222) e moderada pelo CCS (0,631), para o DHEA moderada em ambos (0,585 e 0,716) e a androstenediona mostrou uma correlação pobre no ICC (0,363) e moderada no CCS (0,735). Para a relação Testosterona/DHT (T/DHT) as correlações entre os dois métodos foram: pobre no ICC (0,441) e moderada no CCS (0,690). O método de regressão de PB mostrou que os quatro hormônios avaliados apresentaram relação linear de concordância entre os métodos analisados, porém com erros proporcionais e sistemáticos para androstenediona, erro sistemático para testosterona, e para

DHEA e DHT nenhum desses erros foi observado, apesar da ampla diferença entre os desvios-padrão da média das diferenças entre os métodos e um grande intervalo de confiança das linhas de referência mostradas no gráfico de BA para a DHT. Pelo método BA existe uma tendência do imunoensaio superestimar os valores de testosterona e androstenediona em relação ao LC-MS/MS e subestimar os valores de DHEA e DHT. Observou-se um aumento significativo dos hormônios 7 dias após estímulo com hCGr (Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$) para todos os hormônios com exceção do DHEA por imunoensaio (Teste de Wilcoxon, $p = 0,107$).

Conclusão: Apesar da LC-MS/MS e dos imunoensaios apresentarem alguma correlação e estarem linearmente relacionados, foram detectados erros sistemáticos e/ou proporcionais de concordância entre os métodos, com o imunoensaio superestimando os valores de testosterona e androstenediona e subestimando os valores de DHEA e DHT em relação ao método de LC-MS/MS. Verificou-se também que o hCGr foi eficaz para estimular a produção androgênica testicular aplicado em dose única de 6.500 UI via subcutânea com avaliação hormonal sete dias após aplicação do medicamento.

Palavras-chave: testosterona, testículo, androstenediona, Síndrome de Resistência Androgênica, 5 alfa-redutase.

ABSTRACT

Introduction: The measurement of steroid level is one of the challenges in pediatric endocrinology and although immunoassay methods has been used by more than 40 years, liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is currently considered the gold standard for steroid measurement.

Objectives: To compare traditional immunoassays and LC-MS/MS methods for androgens measurement before and after human recombinant chorionic gonadotropin (hCGr) stimulation in children with diagnosis of disorder of sex development (DSD) with 46,XY karyotype and past of normal testosterone secretion, besides of verifying the efficacy of hCGr to stimulate testicular steroidogenesis.

Methods: It was evaluated 19 patients, five cases of partial androgen insensitivity syndrome (PAIS), four of 5 α -reductase type 2 deficiency and 10 of idiopathic 46,XY DSD, all prepubertal and non-gonadectomized, before and seven days after application of 6,500 IU of hCGr (Ovidrel®). Total testosterone, dihydrotestosterone (DHT), dehydroepiandrosterone (DHEA) and androstenedione were measured by immunoassay and LC-MS/MS before and seven days after hCGr. The correlation between the two methods was analyzed by the Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and Spearman Correlation Coefficient (SCC), while the concordance analysis was done by Passing & Bablok (PB) regression method and the Bland & Altman (BA) method.

Results: Regarding the ICC and SCC coefficients, respectively, the total testosterone showed an excellent correlation in both (0.960 and 0.964), DHT showed an absence of correlation in ICC (0.222) and a moderate correlation in SCC (0.631), the DHEA moderate in both (0.585 and 0.716) and androstenedione a poor correlation in ICC (0.363) and moderate in SCC (0.735). For Testosterone/DHT (T/DHT) rate the correlations were: poor in ICC (0.441) and moderate no CCS (0.690). For the PB method all the hormones showed some linear relationship, but concordance errors were detected, like proportional and systematic errors for androstenedione, systematic error for testosterone, none of these errors for DHEA and DHT although a wide difference between the standard-deviations of the two methods mean difference and the wide confidence interval of reference lines showed in BA graphic for DHT. By the BA analysis we can see a tendency of the immunoassay towards LC-MS/MS to

overestimate values of testosterone and androstenedione and to underestimate those of DHEA and DHT. There was a significant increase of androgens seven days after stimulation with hCGr (Wilcoxon test, $p < 0.05$) for all hormones except for DHEA by immunoassay (Wilcoxon test, $p = 0.107$).

Conclusion: Despite the LC-MS/MS method and immunoassays having some correlation and being linearly related, systematic and/or proportional errors of concordance were detected, with the immunoassay overestimating testosterone and androstenedione values and underestimating DHEA and DHT values in relation to LC-MS/MS. In addition, it was also observed that hCGr was effective in stimulating testicular androgen production used in a single dose of 6,500 IU subcutaneously with hormones evaluated seven days after application.

Key words: testosterone, testes, androstenedione, Androgen-Insensitivity Syndrome, 5 alpha-reductase.

ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Linha do tempo - evolução das metodologias laboratoriais em endocrinologia. 21
- Figura 2:** Importância da gônada na diferenciação sexual fetal. Fonte: adaptado de Rey e Grinspon (2010) ⁽¹⁴⁾ 23
- Figura 3:** Diferenciação sexual do seio urogenital e da genitália externa. Fonte: adaptado de Rey e Grinspon (2014) ⁽¹⁵⁾ 24
- Figura 4:** Apresentação gráfica dos níveis séricos hormonais do eixo reprodutivo da vida fetal até a vida adulta no sexo masculino. Fonte: adaptado de Grinspon, Urrutia e Rey (2018) ⁽²¹⁾ 28
- Figura 5:** Testosterona total (T) (ng/mL) (n=38). **5A:** Regressão de Passing & Bablok entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **5B:** Gráfico de Bland & Altman entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS) 53
- Figura 6:** DHT (pg/mL) (n=35). **6A:** Regressão de Passing & Bablok entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **6B:** Gráfico de Bland & Altman entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS) 54
- Figura 7:** Dehidroepiandrosterone DHEA (ng/mL) (n=38). **7A:** Regressão de Passing & Bablok entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **7B:** Gráfico de Bland & Altman entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS) 55
- Figura 8:** Androstenediona (A) (ng/mL) (n=38). **8A:** Regressão de Passing & Bablock entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **8B:** Gráfico de Bland & Altman entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS) 56
- Figura 9:** Curva ROC mostrando a sensibilidade e a especificidade da testosterona total pré e pós hCGr por LC-MS/MS em discriminar os pacientes com produção normal de testosterona. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados dos coeficientes de variação e viés de todos os hormônios analisados para as diferentes concentrações (controles de qualidade)	44
Tabela 2: Dados da relação entre testosterona total (T) e dihidrotestosterona (DHT) (T/DHT) por LC-MS/MS após a gonadotrofina coriônica humana recombinante (hCGr) de acordo com o diagnóstico de DDS 46,XY.	48
Tabela 3: Valores de testosterona total (ng/mL), DHEA (ng/mL), androstenediona (ng/mL), DHT (pg/mL) e relação T/DHT antes e após hCG recombinante por imunoensaio e LC-MS/MS dos pacientes da amostra (n=19).	50
Tabela 4: Análise dos coeficientes de correlação intraclassa (ICC) e de correlação de Spearman (CCS) entre os valores de testosterona total, DHT, T/DHT, DHEA e androstenediona pelo imunoensaio versus LC-MS/MS de 19 crianças com DDS XY.	52

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH: Hormônio Anti-Mülleriano

AR - Androgen Receptor (gene)

BA: método de Bland e Altman

DAX: Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1

DDS: Distúrbios da Diferenciação do Sexo

DHH - Desert HedgeHog

DHT: dihidrotestosterona

ECLIA: eletroquimioluminescência

ELISA: enzima-imunoensaio

EP: potencial de entrada

FGF10: Fibroblast Growth Factor 10

FOG2: FOG for feminization of the germ line type 2

GATA4: GATA-binding protein 4

GC: cromatografia gasosa

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GIEDDS: Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo

GLI: GLI-kruppel family

HAC: hiperplasia adrenal congênita

hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana

hCGr: gonadotrofina coriônica humana recombinante

HOXA13: HOmeoboX A13

HOXD4: HOmeoboX D4

HOXD13: HOmeoboX D13

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

INSL3: peptídeo insulina-símile 3

ICA: insensibilidade completa aos andrógenos

IGF1: Fator semelhante a insulina tipo 1

IPA: insensibilidade parcial aos andrógenos

LC: cromatografia líquida

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem

LH - Hormônio luteinizante

LHCGR: receptor de LH e hCG

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS: espectrometria de massa

m/z: relação massa/carga

NR5A1: Nuclear Receptor subfamily 5, group A, member 1

NR0B gene: Nuclear Receptor subfamily 0, group B, member 1

PB: regressão de Passing e Bablock

PTCH1: PaTCHed, drosophila, homolog of 1

RIA: radioimunoensaio

ROR2: Receptor tyrosine Orphan kinase-like Receptor 2

RXFP2: Relaxin Family Peptide receptor 2

SHH – GLI – BMP4: via de sinalização Sonic HedgeHog – GLI-kruppel family – Bone Morphogenetic Protein 4

SHBG: proteína ligadora de hormônios sexuais

SF1: Steroidogenic Factor 1

SOX9: Sry bOX 9

SRD5A2: Steroid 5-Alpha-Reductase 2

SRY: Sex determining Region on Y

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

T/DHT: razão entre testosterona e dihidrotestosterona

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

WT1: Wilms Tumor 1

LISTA DE UNIDADES

A: amperes

KV: kilovolt

min (minuto)

mm: milímetro

μ L: microlitro

ng/dL: nanograma por decilitro

ng/mL: nanograma por mililitro

pg/mL: picrograma por mililitro

psi: unidade de pressão : *"pound fource per square"*

rpm: rotações por minuto

u: unidade de massa

UI: Unidades internacionais

V: volt

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Contexto	19
1.2	Diferenciação Sexual Masculina	22
1.3	Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) e ambiguidade genital	28
1.4	DDS 46,XY com produção normal de testosterona	30
1.5	Teste de estímulo com hCG	32
1.6	Laboratório em Endocrinologia	34
2	Justificativa	37
3	Objetivos	39
4	Casuística e Métodos	40
4.1	Casuística	40
4.2	Tipo do estudo	41
4.3	Avaliações hormonais	41
4.4	Análise estatística	45
5	Resultados	47
6	Discussão	59
7	Conclusões	70
8	Referências	72
	Anexos	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto

Nossa compreensão da base biológica da determinação do sexo durante a vida fetal e, portanto, de possíveis causas para variação dos padrões de sexo mais frequentes desenvolveu-se a partir do melhor conhecimento de estudos experimentais, macro e microscópicos humanos, bioquímicos e genético-moleculares ⁽¹⁾.

Em 1949, Alfred Jost foi o primeiro a provar que o desenvolvimento da genitália masculina em mamíferos dependia da presença de um testículo, demonstrando que o desaparecimento dos dutos mullerianos em fetos masculinos era condicionado pela presença da gônada masculina ipsilateral ^(1,2).

A descrição dos cromossomos sexuais humanos em Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) em 1960 foi crucial para explicar que o primeiro passo na determinação do sexo depende do cromossomo sexual presente no espermatozóide, sendo o cromossomo Y responsável pela determinação da gônada masculina ⁽³⁾. Em seguida, técnicas citogenéticas foram capazes de delimitar a zona crítica no cromossomo Y para a determinação testicular, com a descoberta do gene *SRY* em 1990 ⁽⁴⁾. Com isso, a realização do cariótipo tornou-se o primeiro passo na investigação dos casos de ambiguidade genital e DDS ^(1,3).

Os estudos dos casos de DDS desenvolveram-se juntamente com o aprimoramento das técnicas de dosagem hormonais. Os primeiros casos estudados foram os extremos de mulheres virilizadas com hiperplasia adrenal congênita (HAC) e mulheres feminizadas com testículos intra-abdominais e cariótipo 46,XY com síndrome de insensibilidade completa aos andrógenos (ICA) ⁽¹⁾. A descoberta, purificação e determinação da estrutura e peso molecular para a síntese dos principais esteroides gonadais e adrenais foram realizados por pesquisadores em hospitais e na indústria farmacêutica, sendo que os hormônios ovarianos e testiculares foram isolados primeiramente entre 1923 e 1934 ⁽¹⁾. Inicialmente as técnicas cromatográficas foram desenvolvidas para separar os diferentes metabólitos por papel, camada fina e cromatografia gasosa; essa última possibilitou a determinação do perfil urinário de metabólitos, o que permitiu o diagnóstico de

deficiências enzimáticas adrenais e gonadais nas décadas de 1960 a 1980. Nesse período iniciou-se a medida desses metabólitos acoplando a cromatografia gasosa a um espectrômetro de massas ⁽⁵⁾.

Entre os anos de 1960 e 1970, endocrinologistas em conjunto com bioquímicos criaram laboratórios para análise de hormônios esteroides. Os hormônios esteroides foram inicialmente avaliados em soro graças ao desenvolvimento de técnicas de radioimunoensaio (RIA) e o primeiro hormônio dosado por RIA foi a insulina em 1960 ^(1,6). A partir desse momento, laboratórios iniciaram a corrida para obtenção de anticorpos cada vez mais específicos para a molécula antigênica mas a especificidade não era 100%, principalmente para avaliação de esteroides, em que as reações cruzadas com outras moléculas semelhantes eram frequentes. Isso levou a necessidade de uma etapa cromatográfica de separação de compostos ou extração com solventes antes do RIA, o que era particularmente importante nas amostras de neonatos, nos quais a presença de sulfatos esteroides da adrenal fetal poderia interferir nas outras dosagens ⁽¹⁾.

Todo o processo laboratorial progrediu de manual para automatizado e as técnicas de avaliação mais aprimoradas permitiram a quantificação de quase todos os glicocorticóides, mineralocorticóides e seus precursores e a evolução da concentração sérica de esteroides sexuais em cada sexo desde o nascimento até o período neonatal, infância, puberdade e idade adulta, o que foi essencial para análise e diagnóstico dos defeitos da biossíntese de esteroides em endocrinologia pediátrica, particularmente nos casos de DDS ⁽¹⁾.

O uso de marcadores dos esteroides com iodo marcado (I^{125}) no uso do RIA evitava o uso da cromatografia como passo inicial, mas sua natureza radioativa mostrou desvantagens como decaimento progressivo além da necessidade de equipamentos e instalações dispendiosas. Esses ensaios radioativos (1960) foram substituídos por ensaios enzimáticos (1971), que foram aprimorados com marcadores luminescentes (1983), com a melhora da sensibilidade de detecção dos métodos. Entretanto, apesar da melhora da especificidade dos ensaios para dosagem de esteroides, as reações cruzadas ainda eram frequentes e a automação

tornou-os ainda menos sensíveis e específicos do que os RIA iniciais acoplados à cromatografia ^(1,8).

Medições de hormônios esteroides e peptídeos gonadais evoluíram então a partir de colorimetria para RIA e imunoenaios automatizados, embora a cromatografia gasosa e líquida acoplada à espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS) sejam agora as técnicas padrão-ouro para medições de esteroides ⁽⁸⁾. Técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) têm sido validadas para quantificação de esteroides hormonais e de novos metabólitos ⁽¹⁾. A Figura 1 mostra a evolução das metodologias laboratoriais em relação ao tempo de aparecimento.

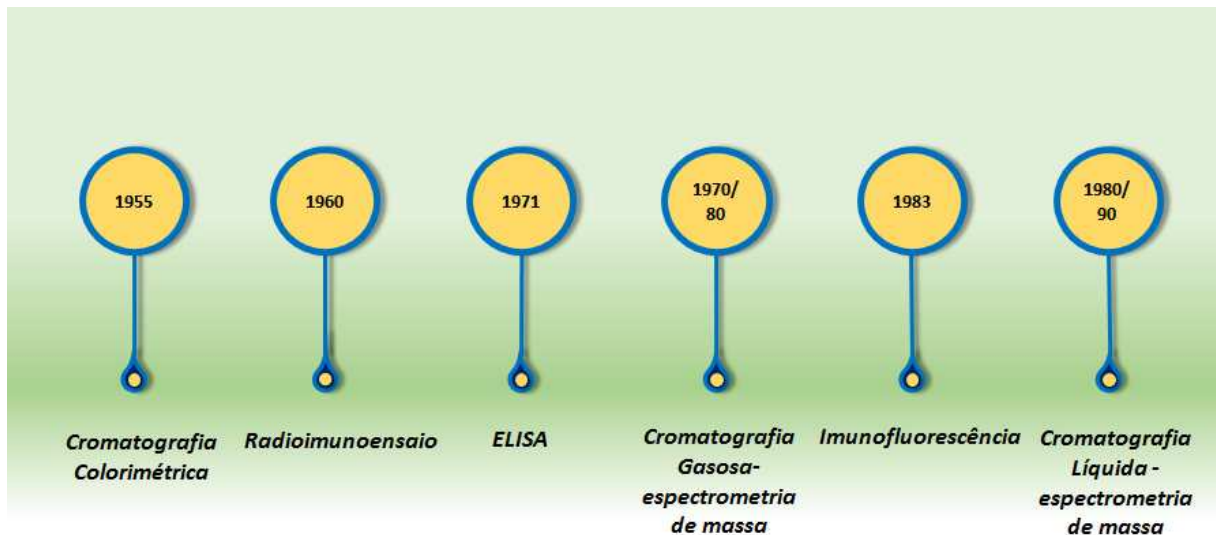


Figura 1: Evolução das metodologias laboratoriais em endocrinologia. Fonte: adaptado de Audi et al. (2018) ⁽¹⁾.

Na investigação etiológica de pacientes com DDS, a avaliação hormonal é indispensável para nortear o estudo molecular a ser indicado, o tratamento e o seguimento desses pacientes. Nos pacientes pediátricos a dosagem de esteroides androgênicos muitas vezes é baixa, até mesmo abaixo do limite de detecção inferior do método, o que dificulta a quantificação exata dos hormônios ⁽⁹⁾. Portanto, a especificidade da dosagem de andrógenos e precursores é uma questão relevante, visto que o limite de detecção dos imunoenaios podem ser muito altos para o uso de rotina em crianças ⁽⁹⁾. Atualmente os pontos de corte dos valores hormonais são

todos derivados de imunoenaios tradicionais, sabidamente pouco específicos se comparados a técnicas como LC-MS/MS^(9,10).

Uma outra questão a ser considerada é a forma de avaliação da esteroidogênese gonadal que tem sido feita através do estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) para verificar a normalidade ou não da produção de esteroides testiculares. O hCG possui similaridade com a molécula do hormônio luteinizante (LH) e meia vida longa, o que permite a avaliação da produção androgênica gonadal por meio de um estímulo prolongado e sustentado^(10,11). Esse teste é muito usado na prática e por isso é importante considerar também o método de dosagem de esteroides gonadais em condições em que a produção androgênica deve ser quantificada, como nos casos de DDS 46,XY sob condições de estímulo da produção hormonal testicular⁽¹⁰⁾.

1.2. Diferenciação Sexual Masculina

Em relação aos processos de determinação e diferenciação sexuais em mamíferos, sabe-se que estão intrinsecamente associados à presença ou à ausência do cromossomo Y no cariótipo e são processos complexos, especialmente no que se refere ao sexo masculino⁽¹²⁾.

O evento inicial na determinação sexual é a especialização das gônadas; as demais diferenças entre os sexos são efeitos secundários devidos aos hormônios por elas produzidos⁽¹²⁾. O processo como um todo é classicamente dividido em quatro etapas: a determinação do sexo cromossômico (XX ou XY), que é estabelecido na fertilização; a diferenciação das gônadas em testículos ou em ovários; a diferenciação dos genitais internos e externos masculinos ou femininos a partir de estruturas indiferenciadas presentes no embrião - que é dependente da presença ou ausência de testículos - e a diferenciação sexual secundária, que é a resposta de vários tecidos aos hormônios produzidos pelas gônadas para completar o fenótipo sexual⁽¹²⁾.

A genitália interna origina-se de dutos pareados que inicialmente são indistinguíveis nos embriões XX e XY: dutos mesonéfricos (dutos de Wolff) e paramesonéfricos (dutos de Müller)⁽¹³⁾. Os testículos produzem três diferentes hormônios que são essenciais para o desenvolvimento masculino: hormônio anti-

mülleriano (AMH), testosterona e INSL3 (peptídeo insulina-símile 3). O hormônio AMH é produzido pelas células de Sertoli e induz a regressão dos dutos mullerianos que formariam as trompas, o útero e os dois terços superiores da vagina. A testosterona é produzida pelas células de Leydig e provoca a diferenciação dos dutos de Wolff em vesículas seminais, epidídimos, dutos deferentes e ejaculatórios. Ao fim da gestação as células de Leydig produzem o INSL3, importante para a descida testicular⁽¹³⁾. (Figura 2)

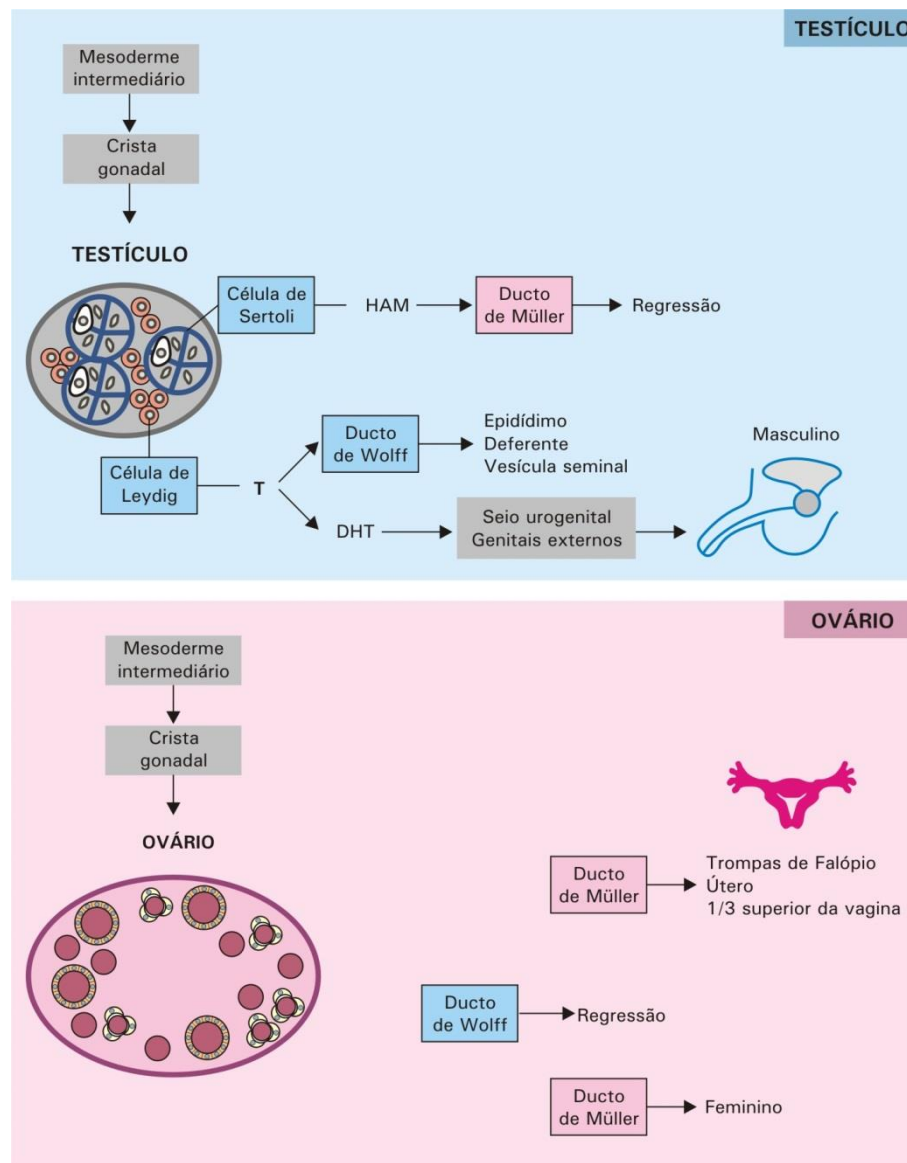


Figura 2: Importância da gônada na diferenciação sexual fetal. Acima: Testículo atua ativamente na diferenciação masculina. Abaixo: Ovário atua passivamente na diferenciação feminina. Fonte: adaptado de Rey e Grinspon (2010)⁽¹⁴⁾.

No que se refere à genitália externa, na 3ª semana de gestação são formadas, a partir do mesênquima que circunda a membrana cloacal, as pregas cloacais. Estas se fundem na porção cranial para formar o tubérculo genital, que dará origem ao falus. Já na região ventral, por volta da 6ª semana, formam-se as pregas uretrais. Ao lado de cada uma dessas, surgem elevações que se tornam as saliências labioescrotais. ⁽¹⁵⁾. Por outro lado, a cloaca dá origem, posteriormente, ao canal anorretal e, anteriormente, ao seio urogenital, entre a 4ª e 7ª semana, quando o septo urorretal cresce a partir da membrana cloacal ⁽¹⁵⁾. Para a formação da genitália externa e do seio urogenital é necessária a expressão de alguns genes, como *HOXD4* (*HOmeoboX D4*), *HOXA13* (*HOmeoboX A13*), *HOXD13* (*HOmeoboX D13*), *FGF10* (*Fibroblast Growth Factor 10*), *PTCH1* (*PaTCHed, drosophila, homolog of 1*), *ROR2* (*Receptor tyrosine Orphan kinase-like Receptor 2*) e da via de sinalização *SHH – GLI – BMP4* (*Sonic HedgeHog – GLI-kruppel family – Bone Morphogenetic Protein 4*) ^(13,15) (Figura 3).

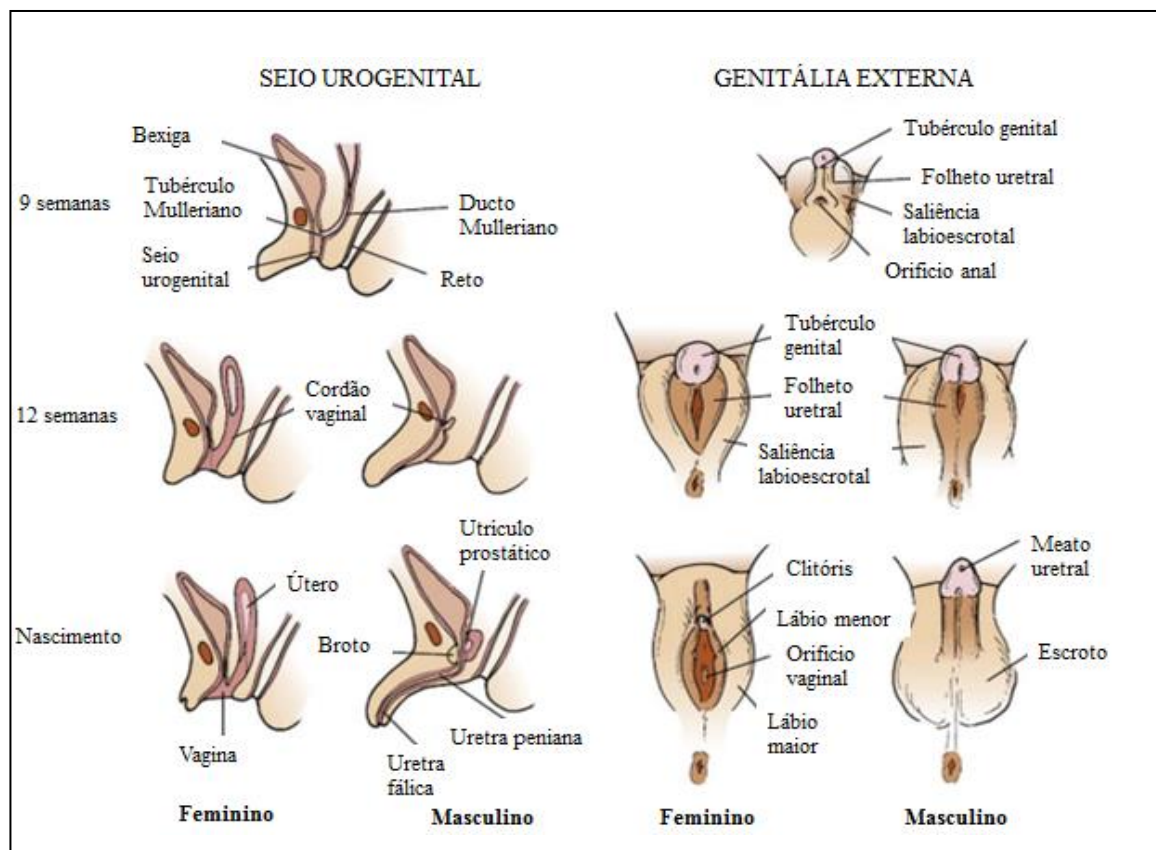


Figura 3: Diferenciação sexual do seio urogenital e da genitália externa. Fonte: adaptado de Rey e Grinspon (2014) ⁽¹⁵⁾.

A diferenciação sexual masculina depende da interação e expressão de vários genes presentes nos cromossomos autossomos e sexuais; o gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y, tem um papel fundamental na determinação do testículo a partir da gônada bissexual. Os genes *GATA4* e *WT1* controlam a expressão do gene *SRY*, assim como o gene *FOG2* que interage com o gene *GATA4* para a diferenciação testicular normal. O gene *SRY* ativa diretamente o gene *SOX9*, envolvido na manutenção e diferenciação das células de Sertoli ^(12,16). O gene *WT1* é essencial para o desenvolvimento gonadal e renal e expressa-se nas saliências das gônadas bipotenciais antes da sua diferenciação, sendo transcrito também nas células de Sertoli do testículo fetal juntamente com o gene *AMH*. O gene *NROB1* (*DAX1*) se expressa nas glândulas adrenais e nos testículos e mutações ou deleções nesse gene causam o fenótipo de hipoplasia adrenal congênita associada a hipogonadismo hipogonadotrófico ⁽¹²⁾. O gene *NR5A1* é outro gene autossômico importante na diferenciação gonadal em mamíferos, é expresso na gônada indiferenciada em ambos os sexos, regula a síntese do hormônio AMH e testosterona e regula enzimas envolvidas na esteroidogênese gonadal e adrenal; esse gene codifica o fator esteroidogênico 1 (*SF1*) e mutações em heterozigose do *NR5A1* podem levar a disgenesia gonadal em indivíduos 46,XY e menopausa precoce em indivíduos 46,XX ^(12,16)

Entre a 8ª e 9ª semana de gestação, ocorre a regressão dos dutos de Müller em uma janela específica de tempo que corresponde ao período em que os dutos de Müller ainda não estão expressando os marcadores epiteliais específicos ⁽¹⁶⁾. A ação do AMH, devido ao seu alto peso molecular, é parácrina, sendo cada testículo responsável pela regressão dos dutos de Müller ipsilateral. A diferenciação das células de Leydig é comandada pelas células de Sertoli e fatores parácrinos secretados pelas células peritubulares, como o gene *DHH* (*Desert HedgeHog*) ^(12,15). Com esse processo, a produção de testosterona pelas células de Leydig inicia-se estimulada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida no sinciotrofoblasto, e é responsável pela diferenciação dos dutos de Wolff entre a 9ª e a 13ª semana de gestação, com cada testículo sendo também responsável pela ação hormonal sobre o ducto ipsilateral ^(12,15,16). Dessa maneira, formam-se o epidídimo, a partir da parte proximal dos dutos, os dutos deferentes, a partir da parte distal, e a partir da terminação caudal dessa última são formadas as vesículas

seminais. A partir da 12^a semana de gestação, a testosterona é convertida, pela enzima 5 α -redutase tipo 2, em dihidrotestosterona (DHT), que possui alta afinidade pelo receptor de andrógenos (AR) e é o principal responsável pela virilização da genitália externa masculina, formando o pênis, uretra peniana e fundindo as saliências labioescrotais em uma bolsa escrotal entre a 10^a e 14^a semanas de gestação ⁽¹⁶⁾. Além disso, a DHT é responsável pelo desenvolvimento da próstata e da uretra prostática, a partir do seio urogenital. Por volta da 14^a a 16^a semanas, o pênis está formado e apresenta aproximadamente o mesmo tamanho de um clitóris e seu crescimento é consequência da ação da testosterona produzida pelo testículo. Essa produção inicialmente é estimulada pela hCG placentária; agora, a partir da 20^a semana, as células de Leydig já passam a produzir testosterona sob o estímulo do LH hipofisário até o fim da gestação, sendo a testosterona responsável pelo crescimento peniano e pela descida testicular ⁽¹⁶⁾.

A testosterona é o principal andrógeno testicular circulante e é sintetizada pelo estímulo do LH que aumenta o transporte e mobilização do colesterol na via esteroidogênica, além de estimular a expressão gênica e atividade das enzimas dessa via. As etapas da esteroidogênese seguem o mesmo padrão que na síntese de andrógenos nas glândulas adrenais, à exceção da conversão da androstenediona em testosterona pela enzima 17 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 3, que é exclusiva do testículo ^(16,17). A testosterona se liga ao receptor de andrógenos (AR) para executar suas ações. A DHT é um andrógeno formado a partir da conversão da testosterona pela enzima 5 α -redutase tipo 2 e tem uma capacidade 10 vezes mais potente que a testosterona de induzir o sinal no AR e é necessária para o desenvolvimento da genitália externa nos fetos masculinos e pelo crescimento da pilificação corporal na puberdade e na vida adulta ⁽¹⁸⁾.

O INSL3 é um hormônio peptídico heterodimérico, cujo gene possui apenas 2 éxons e está localizado em 16p14. O receptor desse hormônio é transcrito do gene *RXFP2* (*RelaXin Family Peptide receptor 2*) ⁽¹⁹⁾. O INSL3 está relacionado com a primeira fase de descida testicular no período intrauterino, principalmente entre a 12^a e a 14^a semana de gestação, quando seus valores máximos são encontrados no líquido amniótico. As concentrações desse hormônio vão diminuindo até os níveis mínimos no final da gestação, mantendo-se assim até a puberdade, quando volta a elevar-se a valores maiores no início da vida adulta ⁽¹⁹⁾.

Aparentemente, o INSL3 tem um papel na manutenção da espermatogênese e sua expressão é independente do mecanismo de retroalimentação do eixo gonadal-hipofisário e apresenta uma mínima variação diurna ^(19,20). Devido a isso, sugere-se que o INSL3 seja um marcador de função de células de Leydig mais fidedigno que a testosterona ⁽²⁰⁾.

Os hormônios testiculares produzidos pelas células de Sertoli - AMH e Inibina B são glicoproteínas que exercem funções importantes no processo de diferenciação sexual, cuja produção se mantém durante a puberdade, independente da ativação do eixo gonadotrófico (Figura 4) ⁽²¹⁾; entretanto sabe-se que o FSH estimula a produção hormonal dos peptídeos das células de Sertoli ⁽²¹⁾. O AMH é regulado pela ação da testosterona e seu receptor (RA) no início da vida e na puberdade e a inibina B tem sua produção estimulada pelo FSH, além de agir como regulador autócrino e parácrino da proliferação, diferenciação e esteroidogênese das células de Sertoli e das células de Leydig ⁽²¹⁾. A maturação das células de Sertoli depende da produção intra-testicular androgênica, que ocorre no início da puberdade com aumento das concentrações das gonadotrofinas ⁽²¹⁾ (Figura 4) ⁽²¹⁾.

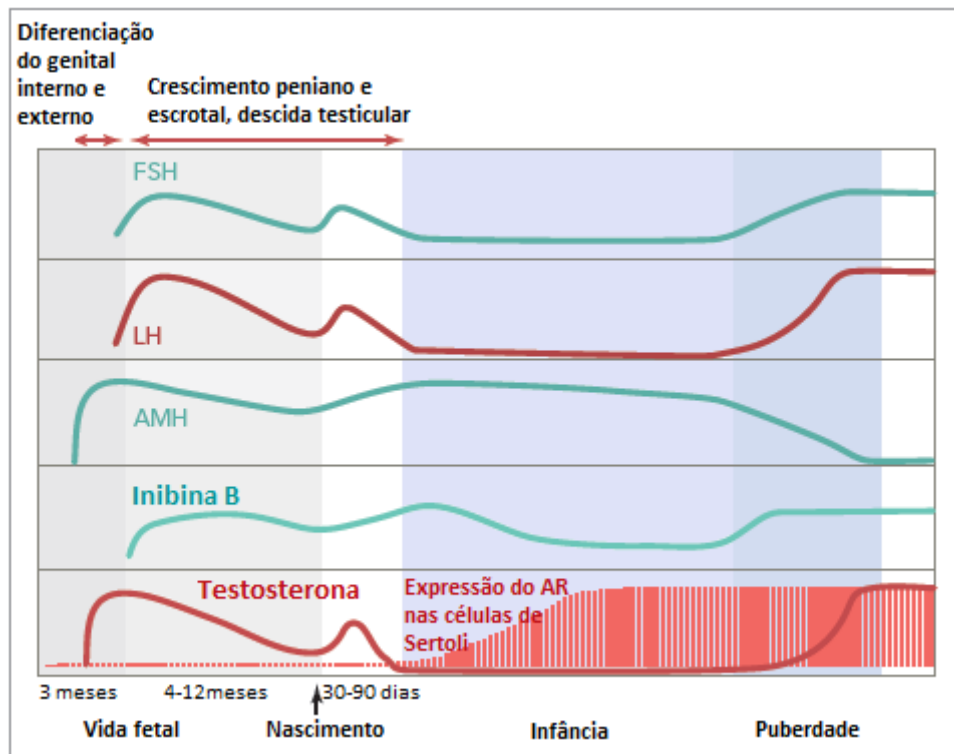


Figura 4: Apresentação gráfica dos níveis séricos hormonais do eixo reprodutivo da vida fetal até a vida adulta no sexo masculino. Fonte: adaptado de Grinspon, Urrutia e Rey (2018) ⁽²¹⁾. Legenda: AMH = hormônio anti-mulleriano; AR = receptor androgênico; LH = hormônio luteinizante; FSH = hormônio folículo-estimulante.

1.3. Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) e ambiguidade genital

A ambiguidade genital no recém-nascido configura uma situação de emergência que exige do pediatra não só preocupação com possíveis complicações em curto e longo prazo, pois falhas no processo de definição do sexo acarretam prejuízos irreparáveis ao paciente e à família ⁽²²⁾. Em genitália de aparente aspecto masculino a presença de ambiguidade genital de acordo com Danish depende da presença de um ou mais dos seguintes achados: gônadas não palpáveis, tamanho peniano esticado abaixo de -2,5 desvios-padrão em relação à média para a idade, gônadas pequenas, ou seja, maior diâmetro inferior a 8 mm, presença de massa inguinal (que poderá corresponder a útero e trompas rudimentares) e hipospádia grave ⁽²³⁾. Ainda segundo Danish, em uma genitália de aparente aspecto feminino, a

presença de ambiguidade genital depende da presença de um ou mais dos seguintes critérios: diâmetro clitoriano superior a 6 mm, gônada palpável em saliência labioescrotal, fusão labial posterior, massa inguinal que possa corresponder a testículos ⁽²³⁾.

Até o ano de 2006, as alterações no desenvolvimento das genitálias interna e externa, especialmente a ambiguidade genital, eram conhecidos, de forma geral, como intersexo, o que incluía suas variações, tais como pseudo-hermafroditismo masculino, disgenesia gonadal, hermafroditismo verdadeiro e pseudo-hermafroditismo feminino ⁽²⁴⁾. Com o avanço das técnicas de análise molecular, foi possível elucidar melhor a etiologia dessas alterações e, inclusive, ampliar seu o espectro clínico. Sendo assim, em 2006, quando publicado o Consenso de Chicago, organizado pela *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* e pela *European Society for Paediatric Endocrinology*, foi proposta a mudança da nomenclatura de intersexo para DDS, ou seja, condições congênitas em que o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou anatômico é atípico ⁽²⁵⁾. Com isso, foram incluídos não só as etiologias que causam genitália ambígua, mas também algumas causas de atraso puberal e de infertilidade. Esse consenso foi revisado e atualizado em 2016 ⁽²⁶⁾. A incidência dos casos de ambiguidade genital é na ordem de 1 para 4.500 a 5.500 nascimentos ⁽²⁶⁾

A revisão do Consenso 2016 definiu a ambiguidade genital como a forma precoce de apresentação de DDS e que compreende os seguintes aspectos: ambiguidade genital óbvia, genitália aparentemente feminina com aumento do clitóris, fusão labial posterior ou massa em região inguinal/labial ou genitália aparentemente masculina com criptorquidia bilateral, hipospádia perineal isolada, hipospádia leve com criptorquidia; ou ainda os casos de história familiar de DDS ou discordância entre a aparência genital e o cariótipo pré-natal e/ou ultrassonografia gestacional ⁽²⁶⁾. Indo mais além, o consenso definiu as formas de apresentação clínica tardia dos DDS: ambiguidade genital não reconhecida previamente, clitoromegalia progressiva, hérnia inguinal em mulher, puberdade atrasada ou incompleta, virilização puberal progressiva em mulher, amenorréia primária, desenvolvimento mamário em homem, hematúria cíclica ocasional ou franca em homem ⁽²⁶⁾.

Desde o Consenso de 2006, a etiologia dos DDS é classificada de acordo com o cariótipo dos pacientes. Dessa maneira, os indivíduos foram divididos em três grupos: DDS por alterações de cromossomos sexuais, DDS 46,XY e DDS 46,XX⁽²⁵⁾.

Dentre os casos de ambiguidade genital e cariótipo 46,XY, foco principal deste estudo, tem-se os casos de erros inatos da biossíntese de testosterona, defeitos parciais (IPA) ou totais (ICA) de ação da testosterona por mutação no gene do AR ou defeitos de metabolização da testosterona em DHT por deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 decorrente de mutações no gene *SRD5A2*⁽²⁵⁾. Há também os casos em que a produção hormonal de testosterona e seus precursores é normal e não há mutações nos genes *AR* e *SRD5A2*, que são os casos de DDS 46,XY não esclarecidos ou idiopáticos e correspondem a aproximadamente 10 a 30% nas grandes casuísticas publicadas na literatura^(27,28). Um estudo recente publicado em 2016⁽²⁹⁾ com uma casuística de 408 casos de DDS com ambiguidade genital apontou a prevalência de 46,3% de DDS 46,XY testicular e, dentre esses, 40% apresentava o diagnóstico de DDS 46,XY testicular idiopático e 22% deles com baixo peso ao nascimento (média de 1.934g).

1.4. DDS 46,XY com produção normal de testosterona

Os defeitos de sinalização androgênica resultam de alterações no AR decorrentes de mutações no gene *AR* que explicam os quadros de ICA (OMIM #300068) ou IPA (OMIM #312300), que clinicamente se apresentam com discordância entre o fenótipo feminino e o cariótipo 46,XY e presença de massas palpáveis bilateralmente (ICA) ou ambiguidade genital de graus variados (IPA) no período neonatal ou na infância^(30,31). Na puberdade ou na fase adulta, as meninas com ICA se apresentam com desenvolvimento mamário normal, ausência ou pouca pilificação pubiana e amenorréia primária com ou sem gônadas palpáveis que aumentam de volume. Os indivíduos com IPA, além da ambiguidade genital, frequentemente apresentam aumento das mamas na adolescência e fase adulta e graus variados de pilificação pubiana e aumento do falus⁽³¹⁾. Tanto os casos de ICA como de IPA criados no sexo masculino, a infertilidade é a regra⁽³¹⁾. Usualmente esses pacientes apresentam valores de testosterona e DHT normais ou aumentados em resposta ao estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) com níveis de

hormônio anti-mulleriano (AMH) normais ou elevados, em decorrência da falta da ação da testosterona sobre o AMH. Os níveis de LH também são aumentados refletindo o estado de resistência androgênica. A história familiar de herança ligada ao X é bastante informativa, apesar de 1/3 dos casos resultar de mutações *de novo*. As variações patogênicas no *AR* são encontradas em mais de 80% dos casos com quadro clínico de ICA e 30 a 50% dos casos com fenótipo de IPA ⁽³⁰⁾. O gene *AR* (OMIM *313700) é de cópia única e está localizado em Xq11-12 e apresenta 8 éxons ⁽³¹⁾.

A enzima 5 α -redutase tipo 2 é altamente expressa nos tecidos sensíveis aos andrógenos e converte testosterona em DHT, um andrógeno ainda mais potente e necessário para o desenvolvimento da genitália externa masculina ⁽³²⁾. O gene *SRD5A2* (OMIM *607306) possui 5 éxons e está localizado em 2p23 ⁽³³⁾, e suas mutações causam a deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 (OMIM #264600), de herança autossômica recessiva. Ao nascimento, a genitália externa de crianças com esta doença pode ser completamente feminina ou apresentar graus variados de hipospádia ou até mesmo micropênis isolado. Na puberdade e na vida adulta, a ginecomastia é muito rara, assim como a calvície de padrão masculino e o aumento da próstata pela falta da ação do DHT ⁽³³⁾. A produção de testosterona é normal, mas a conversão a DHT é comprometida e a relação T/DHT após estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) é normalmente (mas não obrigatoriamente) elevada (em geral acima de 30:1) e o diagnóstico precoce é importante uma vez que essas crianças podem ter o sexo social de registro como menina e mudar completamente o quadro clínico e comportamental durante a puberdade, com o aumento da produção de testosterona e virilização ^(30,32).

Os casos de DDS 46,XY testicular e produção normal de testosterona sem mutações nos genes *AR* ou *SRD5A2* são considerados não esclarecidos ou idiopáticos. Isso se deve, provavelmente, ao desconhecimento ainda de alguns genes relacionados à complexa cascata de diferenciação sexual masculina ou a efeitos ambientais na diferenciação sexual. Nos últimos anos, trabalhos têm demonstrado uma possível associação desses casos com restrição do crescimento intrauterino ^(34,35) e ambiguidade genital em indivíduos com cariótipo 46,XY, apesar dessa associação não ter sido vista em crianças com DDS e cariótipo 46,XX ⁽³⁵⁾. Também já foi mostrado que comprimento ao nascimento foi o fator mais associado

a esses quadros, indicando que o retardo de crescimento intrauterino em fases mais precoces da gestação pode resultar em DDS ⁽²⁸⁾. Demonstrou-se que o receptor de insulina, o receptor de IGF1 e o receptor relacionado com o receptor de insulina são necessários para a formação da gônada masculina e a conseqüente diferenciação sexual em camundongos, ou seja, é provável que fatores deletérios da atividade celular como a subnutrição durante o desenvolvimento embrionário podem interferir no processo de diferenciação sexual ⁽³⁶⁾. Clinicamente, os casos idiopáticos geralmente se apresentam com ambigüidade genital, com variados graus de hipospadia, podendo estar associado ou não com criptorquidia ^(28,34).

Os casos de masculinização incompleta em indivíduos com cariótipo 46,XY podem, portanto, estarem relacionados aos defeitos na síntese ou na ação da testosterona; assim, a determinação da concentração desse hormônio nesses pacientes é fundamental para o diagnóstico da doença, e também para a definição do sexo de criação, prognóstico e tratamento desses pacientes ^(24,26,30).

1.5. Teste de estímulo com hCG

O teste de estímulo com hCG é feito para avaliar de forma aguda a esteroidogênese gonadal, a fim de estabelecer a etiologia de quadros de ambigüidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY, além de identificar a presença de tecido testicular funcionante ^(30,37). Este teste é indicado quando é necessário verificar a produção hormonal testicular em um período em que o eixo gonadotrófico está inativo e os testículos são funcionalmente quiescentes em relação à produção androgênica ⁽³⁷⁾.

É importante determinar, no início da investigação dos casos de DDS 46,XY, a normalidade ou não da produção androgênica. O teste com hCG é usado para avaliar a função gonadal em relação à produção de testosterona, uma vez que o hCG se liga ao receptor de LH e hCG (LHCGR) nas células de Leydig testiculares ⁽³⁷⁾.

Muitos protocolos foram sugeridos para o teste com hCG na sua forma nativa, ou seja, extraído da urina de mulheres grávidas ⁽³⁷⁾, por via intramuscular, na dose de 1.000 a 1.500 UI por dia por três dias consecutivos, que é considerado suficiente em crianças e adolescentes ^(37,38,39), sendo que boa resposta ao estímulo

com hCG seria o aumento de testosterona acima de duas vezes o valor basal ou acima do limite superior da referência para pré-púberes ^(30,39). Em outros protocolos, com pequenas variações da dose do hCG urinário e feito por até 5 dias consecutivos em dose única diária ou semanalmente por 6 semanas consecutivas, o valor de resposta de testosterona considerado satisfatório é acima de 110 a 140 ng/dL ^(37,38,41).

Um estudo publicado em 2016 verificou que o estímulo gonadal feito com hCG na sua forma recombinante (hCGr), em pacientes com criptorquidia isolada e produção de testosterona considerada normal, foi comparável ao hCG urinário para a produção de testosterona, sendo que o valor referente ao percentil 10 considerado boa resposta ao estímulo com hCGr foi de 106 ng/dL (p10). Nesse protocolo o hCGr foi feito em dose única independente do peso do paciente e os hormônios coletados sete dias após aplicação do hCGr ⁽³⁷⁾.

Ainda nos dias atuais, apesar de o teste com hCG ser invasivo e de se conhecer a importância da dosagem de peptídeos gonadais como o AMH, inibina B e INSL3 e sua importância para o diagnóstico dos casos de DDS 46,XY, a dosagem desses hormônios é pouco disponível na prática clínica pelo alto custo e pela limitação de métodos confiáveis de dosagem, ainda de difícil interpretação pelos valores de referência ⁽³⁰⁾. Sabe-se que um valor de AMH baixo tem alto valor preditivo para uma baixa resposta de testosterona ao hCG mas valores normais de AMH não tem alta correlação com a normalidade do teste do hCG, por isso esses resultados devem ser analisados com cuidado ⁽⁴⁰⁾.

O teste do hCG ainda é bastante utilizado para avaliação da esteroidogênese testicular, e a forma da medicação recombinante está disponível com maior facilidade, menor custo e de aplicação mais simples (dose única) ^(37,41).

Ainda durante o teste de estímulo, um ponto importante a ser considerado é a medida de hormônios esteroides e sua interpretação, uma vez que os resultados são de grande impacto para o diagnóstico e condução dos casos em questão ^(30,41). As análises são geralmente obtidas por imunoenaios sem extração, sem cromatografia, ou seja, diretos de plataformas automáticas ^(30,42). Sabe-se que a técnica de LC-MS/MS permite a análise de múltiplas substâncias de uma simples amostra mantendo a especificidade analítica ^(30,42,43,44). Portanto, em casos de DDS

acredita-se que os esteroides plasmáticos devam ser medidos preferencialmente por LC-MS/MS ou por imunoenaios após extração com solvente orgânico ^(30,42,45).

1.6. Laboratório em Endocrinologia

A análise de esteroides para investigação em endocrinologia pediátrica é um desafio para os laboratórios ⁽⁴³⁾. Sabe-se que a acurácia dos métodos de dosagens de esteroides é variável e resulta em dados não tão seguros e uniformes particularmente quando a análise é feita em crianças devido às baixas concentrações hormonais ^(43,44).

Nos casos de DDS, a análise de esteroides é de grande relevância não só para o diagnóstico, mas para o manejo clínico, o monitoramento da doença e para o entendimento das diferenças nas expressões fenotípicas. Apesar de o diagnóstico molecular ter se tornado cada vez mais presente na avaliação de doenças raras como DDS, o perfil de esteroides continua essencial na abordagem inicial desses distúrbios, uma vez que permite a compreensão dos resultados da análise molecular, do quadro clínico e orienta o diagnóstico diferencial ⁽⁴²⁾.

Os imunoenaios são utilizados desde 1960 e representaram uma revolução para dosagem de esteroides plasmáticos. O princípio de qualquer imunoenensaio é a ligação antígeno-anticorpo ⁽⁴²⁾, e a dosagem hormonal é feita diretamente no plasma, ou por meio de um marcador ou associada à extração prévia por cromatografia, o que demanda mais tempo para análise. Desde então, essa técnica tem se aprimorado e evoluído, mas os problemas de acurácia e especificidade em relação às dosagens hormonais, principalmente de esteroides, têm sido cada vez mais reportados ⁽⁴³⁾.

A especificidade de um imunoenensaio para a medida de um analito não é assegurada dentro de uma amostra específica, ou seja, a variabilidade entre ensaios é frequente ⁽⁴³⁾. Isso é atribuído às diferenças entre os anticorpos usados nos ensaios e também à falta de padronização dos anticorpos e dos padrões. Nos últimos anos, técnicas de GC e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) associadas à MS têm sido utilizadas de rotina em alguns laboratórios de pesquisa assim como em alguns hospitais e centros especializados para dosagem de esteroides, com vantagens e desvantagens em relação às técnicas convencionais.

Uma grande vantagem parece ser em relação à acurácia da MS por utilizar a dupla seletividade da separação dos componentes da mistura – cromatografia e detecção iônica pela massa do analito, evitando interferência de componentes de cargas e massas diferentes da que se quer medir ^(44,45,46).

Ao contrário da MS, os imunoenaios omitem a extração do analito ou a separação por cromatografia antes da reação imune ⁽⁴⁷⁾. A MS para medida de esteroides é uma técnica promissora, assim como para medida de drogas, aminoácidos, ácidos orgânicos e pequenas moléculas, no entanto, novos intervalos de referência e padronização dessa técnica são hoje um desafio para os laboratórios ⁽⁴⁸⁾, uma vez que os métodos de LC-MS/MS representam um grupo de ensaios muito heterogêneo com diferentes procedimentos operacionais, condições de instrumentação e operação ⁽⁴⁷⁾.

A MS é uma técnica de análise físico-química para análise de esteroide que propõe a medida dos analitos de acordo com sua relação massa-carga e quando associada à cromatografia em tandem de alta performance permite a separação prévia dos componentes da mistura pela especificidade iônica de cada um deles, através de um meio líquido ou gasoso ^(42,49). A MS analisa, portanto, as moléculas do analito e seus fragmentos no estado ionizado ^(43,48).

A LC-MS/MS tem potencial para análise de esteroides em crianças e a técnica em tandem significa uma combinação de espectrômetros de massas para melhorar a performance de análise. Essa técnica prevê a sequência de filtração, fragmentação e concentração dos íons, ou seja, os íons são misturados e fragmentados no primeiro espectrômetro de massa e em seguida são misturados com alta intensidade no segundo espectrômetro. A combinação dessa técnica feita após a separação dos componentes da mistura por LC adiciona sensibilidade e especificidade ao método ⁽⁴³⁾, além de permitir a dosagem de diferentes substâncias de uma única vez ⁽⁴⁸⁾.

Em termos gerais, os principais componentes da LC são a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra através da coluna; uma coluna, que contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas, esféricas e diâmetro em torno de 35 µm, e um detector que mostra os tempos de retenção das moléculas, sendo que o tempo de retenção varia de acordo com as interações da

amostra com as fases estacionária e móvel ⁽⁴⁹⁾. O uso do espectrômetro de massa como detector é capaz de aumentar a sensibilidade e especificidade do método ^(48,49)

Na prática clínica, um número cada vez maior de laboratórios tem utilizado o espectrômetro de massa e HPLC, sendo que o tempo reduzido de análise, assim como a otimização da preparação da amostra são objetivos importantes para a maior praticidade desse método. Importante lembrar que sangue, saliva e urina são fluidos disponíveis para medida de esteroides e que no sangue eles se encontram largamente ligados a proteínas de transporte como albumina e proteínas específicas como SHBG (proteína ligadora de hormônios sexuais). Na saliva e na urina esses hormônios se encontram na sua forma livre ^(42,43). Isso é particularmente importante para medida plasmática de testosterona. A dosagem de esteroides sexuais como a testosterona por imunoensaio em recém-nascidos têm mostrado resultados grosseiramente elevados devido a interferências de esteroides fetais e placentários ^(42,50).

Em pediatria, deve-se considerar as mudanças nos valores de referência de diversos hormônios de acordo com a idade, gênero e estágio de desenvolvimento puberal que influenciam na mistura de esteroides presentes na amostra ⁽⁵⁰⁾. Existem problemas com amostras de pré-termos e neonatos por interferência de esteroides da zona fetal adrenal, na adrenarca por aumento da secreção androgênica adrenal e na puberdade por mudanças nas concentrações de proteínas ligadoras, assim como para esteroides pituitários e gonadais. A padronização de ensaios deve considerar, portanto, uma ampla variação de condições clínicas ⁽⁴³⁾.

Sabe-se que a dosagem direta de esteroides por imunossaios convencionais não possui alta acurácia e especificidade, especialmente para dosagem de estradiol e andrógenos em crianças; isso é de elevada importância quando se avalia crianças menores em investigação de DDS ^(43,50).

2. JUSTIFICATIVA

Os métodos de dosagem para esteroides sexuais têm sido alvo de discussões, uma vez que a LC-MS/MS tem sido cada vez mais utilizada para esse fim na prática laboratorial e hoje é considerada a técnica padrão-ouro para a dosagem de esteroides por apresentar maior especificidade de medida ^(8,9).

Dentro desse contexto, considerando que os valores de referência bem estabelecidos para esteroides sexuais em crianças por LC-MS/MS são pouco conhecidos e que os imunoenaios convencionais continuam amplamente utilizados ^(43,64), optou-se por comparar a dosagem de esteroides sexuais em um grupo específico de indivíduos com produção sabidamente normal de testosterona sob a condição de estímulo da produção hormonal (estímulo com hCGr), mimetizando uma condição fisiológica.

Sabemos que a diferenciação sexual masculina envolve um maior número de eventos geneticamente determinados que a feminina e que as ambiguidades genitais com cariótipo 46,XY apresentam uma maior complexidade para uma definição etiológica ^(14,15,16). A maioria dos pacientes com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY apresentam produção normal de testosterona, que são os casos de IPA, deficiência da enzima 5-alfa-redutase tipo 2 e casos idiopáticos ^(14,15,16). Ao nascimento e nos primeiros anos de vida muitos desses casos são clinicamente muito parecidos em relação ao aspecto da genitália externa e também quanto a avaliação laboratorial, mesmo considerando a dosagem de peptídeos testiculares (AMH e Inibina B) e o padrão de esteroides após estímulo com hCG. Por outro lado, o diagnóstico precoce é de extrema importância para a escolha do sexo de criação, abordagem cirúrgica e tratamento hormonal que podem ser necessários já na infância. O diagnóstico de certeza de cada um desses quadros só é possível pela identificação da alteração molecular no gene específico responsável por cada condição ⁽¹²⁾, o que não é de fácil acesso na prática clínica. Assim, podemos afirmar que a análise de esteroides por métodos confiáveis e específicos de dosagem são importantes para o diagnóstico dessas doenças e seguimento desses pacientes.

Na literatura há artigos comparando limites, vantagens e desvantagens da dosagem de esteroides utilizando imunoenaios e LC-MS/MS, mas nenhum deles comparou os dois métodos sob condições de estímulo com hCG na população

pediátrica. Além disso, o teste de estímulo com o hCGr permite mimetizar uma situação fisiológica ⁽¹⁰⁾.

Portanto, faz-se necessário mostrar a eficácia do teste de estímulo agudo da esteroidogênese gonadal com hCGr, o que, de forma ideal, deve ser feito avaliando um grupo de indivíduos que não apresenta alterações da produção esteroidogênica, como os pacientes DDS 46,XY da presente casuística, que incluiu meninos diagnosticados com IPA, deficiência da enzima 5-alfa-redutase tipo 2 ou DDS 46,XY idiopático com produção normal de testosterona demonstrada previamente pelo teste com hCG urinário.

3. OBJETIVOS

Principal: comparar os resultados de esteroides androgênicos avaliados por imunoensaios convencionais e por LC-MS/MS antes e após estímulo com hCGr em meninos pré-púberes e diagnóstico de DDS 46,XY sem alterações da esteroidogênese gonadal.

Secundário: verificar a eficácia do teste do hCGr para estímulo agudo da esteroidogênese testicular, mostrando a eficácia da medicação recombinante em pacientes com comprovada produção normal de testosterona.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram incluídos no estudo 19 pacientes com diagnóstico de DDS 46,XY testicular e comprovada produção normal de testosterona por imunoensaio convencional (testosterona total acima de 1,5 ng/mL ou 150 ng/dL) ^(41,51) após o teste com hCG urinário ou pela avaliação hormonal feita na minipuberdade ^(41,51). A amostra foi composta por cinco casos de IPA, quatro casos de deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 e 10 casos de DDS 46,XY testicular idiopático. Estes casos idiopáticos tinham produção normal de testosterona e estudo molecular para os genes do *AR*, *SRD5A2* e *NR5A1* (OMIM *184757) sem alterações e os casos de deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 e IPA apresentavam alteração molecular do gene específico da doença.

Os critérios de inclusão foram meninos pré-púberes, não gonadectomizados, com estudo molecular dos genes *SRD5A2* e *AR*, e teste do hCG urinário feito à época do diagnóstico sem alteração da produção de testosterona, e cujos responsáveis concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os pacientes desse estudo foram selecionados da casuística de 408 pacientes descrita em 2016 ⁽²⁹⁾, com diagnóstico de DDS do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) entre 1989-2016, dentre os quais 189 apresentavam cariótipo 46,XY e dois testículos e 107 com produção normal de testosterona. Dentre esses 107 pacientes, 10 deles foram diagnosticados com IPA (cinco pré-púberes, quatro púberes e um gonadectomizado), 20 deles com diagnóstico de deficiência da enzima 5-alfa-reductase tipo 2 (cinco pré-púberes, oito púberes e sete gonadectomizados), e 77 deles com diagnóstico de DDS 46,XY idiopático (15 pré-púberes, 61 púberes e um gonadectomizado). Assim, 25 pacientes dessa casuística preenchiam critérios de inclusão para o estudo e 19 aceitaram participar.

Todos os pacientes foram avaliados no Ambulatório GIEDDS do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e estavam

acompanhados de um adulto responsável, que assinou o TCLE. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 48063115.4.0000.5404) e feito de acordo com os princípios da declaração de Helsinki.

4.2. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal e analítico, com pacientes pré-púberes e não gonadectomizados, e que foram avaliados em duas visitas: uma no momento da avaliação clínica com coleta hormonal basal e aplicação do hCGr e outra sete dias após a primeira para nova coleta hormonal e reavaliação.

Na consulta inicial, cada paciente foi submetido à coleta de sangue para dosagem de testosterona total, DHT, DHEA e androstenediona, e imediatamente após a coleta basal foi aplicada pelo investigador principal do estudo uma ampola de hCGr (Ovidrel[®] - Merck) na dose de 250 µg (6.500 UI) via subcutânea. Sete dias após a aplicação do medicamento foi coletada nova amostra de sangue para avaliação dos mesmos andrógenos e do beta-hCG. O intervalo de 7 dias entre as dosagens seguiu o modelo proposto por Oliveira et al ⁽³⁷⁾, que sugeriu a padronização do teste de estímulo agudo com o hCGr acordo com a resposta hormonal de meninos pré-púberes sem alterações da esteroidogênese gonadal.

4.3. Avaliações hormonais

Por imunoensaio, a testosterona total foi avaliada por ECLIA (Roche, Germany, Cobas E, 05200067190, limite de detecção: 0,03 - 15 ng/mL), a DHT por ELISA (DBC- Diagnostic Biochem Canada Inc, CAN-DHT-280, sensibilidade de 6 pg/mL), a DHEA por ELISA (DBC – Diagnostic Biochem Canada Inc., CAN-DH-490, sensibilidade de 0,15 ng/mL); a androstenediona por ELISA (DBC – Diagnostic Biochem Canada Inc., CAN-AD-208, sensibilidade de 0,04 ng/mL); o beta-hCG por ECLIA (Roche, Germany, Cobas E, 03271749190, limite de detecção: 0,1 - 10000 UI/L).

Na técnica de LC-MS/MS, para os esteroides testosterona total, androstenediona e DHEA, os calibradores e controles foram preparados em soro fetal bovino isento de hormônios, sendo o intervalo dinâmico de concentração para

os calibradores de 0,05 a 20 ng/mL com exceção de DHEA que foi de 0,25 a 20 ng/mL. A extração dos esteroides das amostras de soro dos pacientes, dos calibradores e controles foi feita utilizando 500 µL de amostra, que foi transferida para tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL, adicionado 25 µL de solução de padrão interno (testosterona-D3 e dehidroepiandrosterona-D5, 10 ng/mL em metanol), extraído com 4 mL de éter metil-terc-butílico, homogeneizado por inversão dez vezes e em agitador de tubos por 1 minuto (min), e centrifugado a 4.000 rpm por 5 min. A fase orgânica foi transferida para tubo cônico de vidro, e evaporada a secura sob fluxo de nitrogênio (40°C, 5 psi/12 min). O extrato seco foi ressuscitado com 150 µL de solução acetonitrila: água ultrapura (1:1) e injetado 30 µL no sistema LC-MS/MS⁽⁵²⁾. As análises foram realizadas em sistema LC-MS/MS composto por cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo 5500-QTRAP[®] (ABSciex, Concord, ON, Canada). A separação foi realizada em coluna cromatográfica com fase estacionária bifenil (Kinetex 2,6u biphenyl 100 A, 100 x 2,1 mm, Phenomenex, USA), termostaticada a 40°C. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado iniciou-se com 10% de B, seguido por aumento linear desta porcentagem até 95% em 2 min, mantido em 95% de B por 4,5 min, retornando à condição inicial em 0,2 min e mantido nesta condição por 6 min para reequilíbrio. O fluxo da fase móvel foi ajustado em 0,3 mL/min. O espectrômetro de massas foi ajustado para operar em modo de ionização positiva (electrospray). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e colisão. Os parâmetros instrumentais foram: temperatura da fonte de ionização, 600°C; voltagem do electrospray, 5,5 kV; potencial de entrada (EP), 10 V; gás de nebulização (GS1-nitrogênio), 70 psi; gás auxiliar (GS2 - ar sintético), 40 psi; e gás de dessolvatação, 10 psi. As análises foram realizadas por monitoramento de reação múltiplas (MRM), sendo monitoradas duas transições para cada analito. A aquisição de dados foi realizada no software Analyst 1.6.2 e o processamento dos dados foi realizado no software MultiQuant 3.0.1 (ABSciex, Concord, Ontario, Canada).

Em relação às dosagens hormonais por LC-MS/MS, para uma concentração de 0,1 ng/mL, os valores do coeficiente de variação intraensaio, interensaio e viés (em porcentagem) foram: 9,1; 1,4 e 10 para a testosterona, 12,5;

4,4 e 10 para a androstenediona, 19,5; 7,3 e 10 para a DHEA. Na concentração de 1 ng/mL os valores foram: 8,4; 2,6 e -1,7 para a testosterona, 10,9; 3,6 e -8,5 para androstenediona, 10,6; 2,6 e -6,2 para a DHEA. Na concentração de 10 ng/mL os coeficientes, nessa mesma ordem, foram 5,8; 2,1 e 11,1 para a testosterona, 6,0; 1,7 e 10,2 para a androstenediona e 3,2; 1,5 e 7,2 para a DHEA (Tabela 1).

Para a dosagem de DHT por LC-MS/MS, o limite de quantificação foi de 1,7 ng/dL, linearidade de 280 ng/dL, e os coeficientes de variação intraensaio, interensaio e o total (em porcentagem) foram, respectivamente: 6,1; 4,5 e 7,5 na concentração de 11 ng/dL, de 3,1; 6,7 e 7,4 na concentração de 32 ng/dL e de 5,2, 4,7 e 7,0 na concentração de 93 ng/dL, sendo que o viés foi de 12,1% em relação à referência (Tabela 1). As amostras de soro foram submetidas à diluição isotópica seguida de enriquecimento do analito. A separação da amostra foi realizada por cromatografia líquida e a detecção por espectrometria de massa em tandem. A presença de fosfolipídios foi realizado pela monitoração de precursores do íon de relação m/z 184. O processo de extração foi padronizado para a remoção máxima desses interferentes e não foi constatada coeluição do DHT com fosfolipídios e outros compostos de baixo peso molecular (m/z 50-500). Foram analisadas mais de 50 amostras sequencialmente. Foram ainda testados alguns isômeros específicos do DHT encontrados endogenamente (androsterona e etiocholanolona) além da testosterona que é um dos principais interferentes deste analito endogenamente (presente em concentrações muito maiores que o DHT no soro). Considerando as concentrações endógenas destes esteroides, não foi possível observar interferência. As dosagens de DHT por LC-MS/MS foram feitas pelo laboratório Fleury de São Paulo.

Para as dosagens hormonais feitas por imunoenaios convencionais os valores dos coeficientes de variação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Dados dos coeficientes de variação e viés de todos os hormônios analisados para as diferentes concentrações (controles de qualidade).

		TT		DHT		ANDRO		DHEA	
	QC	IA	MS	IA	MS	IA	MS	IA	MS
CV intra-ensaio %	Baixo	4,7	9,1	11,4	6,1	4,9	12,5	10,9	19,5
CV inter-ensaio %		14,8	1,4	12,1	4,5	8,7	4,4	13,3	7,3
Viés %		NI	10	NI	12,1	NI	10	NI	10
CV intra-ensaio %	Médio	1,9	8,4	5,5	3,1	5,8	10,9	6,5	10,6
CV inter-ensaio %		2,8	2,6	7,5	6,7	9,7	3,6	9,9	2,6
Viés %		NI	-1,7	NI	12,1	NI	-8,5	NI	-6,2
CV intra-ensaio %	alto	1,2	5,8	3,9	5,2	5	6	4,1	3,2
CV inter-ensaio %		2,1	2,1	5,9	4,7	7,7	1,7	8,4	1,5
Viés %		NI	11,1	NI	12,1	NI	10,2	NI	7,2

Legenda: TT = testosterona total; DHT = di-hidrotestosterona; Andro = androstenediona; DHEA = dehidroepiandrosterona; QC=controle de qualidade; IA= imunoensaio; MS=espectrometria de massa. NI=não informado.

Em relação aos dados dos hormônios avaliados: precursor, íons-produto e energia de colisão, foram vistos para a testosterona: MRM 288.8 >97.1 (energia de colisão 27V), 288.8 >79 (energia de colisão 63V), 288.8 > 109.1 (energia de colisão 29V), sendo que o precursor possuiu a massa de 291 Daltons. Para o DHEA: MRM 288.8 > 91 (energia de colisão 57V), 288.8 > 253.1 (energia de colisão 13V), 288.8 > 213.2 (energia de colisão 21V), sendo que o precursor apresentou massa de 288.8 Daltons. Para a androstenediona: MRM 286.2 > 97.1 (energia de colisão 25V), 286.8 > 109.1 (energia de colisão 27V), 286.8 > 79.1 (energia de colisão 57V), sendo que o precursor apresentou massa de 290.8 Daltons.

4.4. Análise estatística

Quando o valor da dosagem hormonal foi quantificado como abaixo do limite de detecção do método, foi considerado o valor desse limite para fins de cálculos e análise estatística para todos os hormônios.

Foi verificada a distribuição de cada esteroide por imunoensaio e LC-MS/MS antes e após o hCGr utilizando o teste de Kolmogorov-Sminorv. Como todas as distribuições não foram normais, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparar as diferenças dos esteroides entre os três grupos em ambos os ensaios e em cada tempo do estudo, e o teste de Wilcoxon de forma pareada para verificar as diferenças de cada esteroide em cada ensaio entre os dois tempos do estudo (basal e após o hCGr). Todos os casos nos dois tempos de coleta foram agrupados para analisar a correlação e a concordância entre o imunoensaio e a LC-MS/MS. Para análise da correlação foram utilizados os testes de coeficiente de correlação intraclassa (ICC) e o coeficiente de correlação de Spearman (CCS), e para a análise da concordância foram utilizados a regressão de Passing & Bablok (PB) ⁽⁵³⁾ e o método de Bland & Altman (BA) ⁽⁵⁴⁾. As análises de correlação e concordância foram realizadas assumindo a LC-MS/MS como método de referência. Para o ICC foram utilizados os seguintes critérios para análise ⁽⁵⁵⁾: < 0,30 = desprezível; entre 0,30 e 0,50 = pobre; entre 0,50 e 0,70 = moderada; entre 0,70 e 0,90 = boa e > 0,90 = excelente. Para o CCS foram utilizados os seguintes critérios ⁽⁵⁶⁾: < 0,50 = pobre; entre 0,50 e 0,75 = moderada; entre 0,75 e 0,90 = boa e > 0,90 = excelente.

Para cálculo da sensibilidade especificidade da testosterona total por LC-MS/MS no teste com hCGr foi calculada a curva ROC.

Para avaliação do tamanho amostral após o estudo foi feito a análise do poder do teste pos-hoc para amostras pareadas com teste de diferenças entre duas médias dependentes utilizando os seguintes parâmetros: um lado, tamanho do efeito = 0,5 e probabilidade de erro alfa = 0,05. Utilizou-se o software GPower (colocar o site e a versão do software).

Para todas as análises, exceto PB e BA, foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 20.0, e para as análises de PB e BA foi utilizado o programa MedCalc (2018 MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica) versão 18.0 ⁽⁵⁷⁾. Em todas as análises foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Observou-se que não houve diferença entre os valores de testosterona total, DHT, DHEA e androstenediona e da relação testosterona total e DHT (T/DHT) antes ou após o teste com hCGr comparando-se os grupos de diagnósticos de forma independente - pacientes com DDS 46,XY idiopático, IPA e deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 - em cada tempo do estudo (Teste de Kruskal-Wallis: testosterona total imunoensaio antes $p = 0,846$; testosterona total imunoensaio após $p=0,726$; testosterona total LC-MS/MS antes $p=0,868$; testosterona total LC-MS/MS após $p = 0,452$; DHT por imunoensaio antes $p=0,091$; DHT imunoensaio após $p = 0,284$; DHT LC-MS/MS antes $p=0,993$; DHT LC-MS/MS após $p=0,259$, T/DHT imunoensaio antes $p=0,273$; T/DHT imunoensaio após $p=0,599$; T/DHT LC-MS/MS antes $p=0,903$; T/DHT LCMS/MS após $p=0,051$; DHEA imunoensaio antes $p=0,322$; DHEA imunoensaio após $p=0,214$; DHEA LC-MS/MS antes $p=0,486$; DHEA LC-MS/MS após $p=0,763$; androstenediona imunoensaio antes $p=0,145$; androstenediona imunoensaio após $p=0,595$; androstenediona LC-MS/MS antes $p=0,368$; androstenediona LC-MS/MS após $p=0,321$). Assim, os casos de IPA, deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 e idiopáticos foram analisados como um único grupo.

A única análise cuja estatística foi próxima de ser significativa ($p=0,051$) foi a da T/DHT por LC-MS/MS após hCGr. Os dados mostram que os valores desta relação foram maiores no grupo de deficiência de 5 α -redutase tipo 2 com média e mediana acima de 30, enquanto que no grupo IPA o valor máximo foi 26,1 e nos idiopáticos o valor máximo foi 17,8 (Tabela 2).

Tabela 2: Dados da relação entre testosterona total (T) e dihidrotestosterona (DHT) (T/DHT) por LC-MS/MS após a gonadotrofina coriônica humana recombinante (hCGr) de acordo com o diagnóstico de DDS 46,XY.

T/DHT (LC-MS/MS após hCGr)			
Diagnóstico	IPA	Deficiência de 5α-redutase tipo 2	Idiopático
N	5	4	9
Média	9,0	32,6	9,6
Mediana	5,2	38,1	8,8
Desvio-padrão	5,9	15,1	6,8
Mínimo	4,7	10,3	3,0
Máximo	17,8	44,0	26,1

Analisando os pacientes da amostra como um único grupo, observou-se que os valores de testosterona total, DHT, T/DHT, DHEA e androstenediona foram significativamente maiores após o teste com hCGr em relação ao basal (Teste de Wilcoxon: testosterona total imunoensaio $p < 0,001$; testosterona total LC-MS/MS $p < 0,001$; DHT imunoensaio $p < 0,001$; DHT LC-MS/MS $p < 0,001$, T/DHT imunoensaio $p < 0,001$; T/DHT LC-MS/MS $p < 0,001$; DHEA LC-MS/MS $p < 0,001$; androstenediona imunoensaio $p = 0,033$; androstenediona LC-MS/MS $p = 0,007$), com exceção da DHEA por imunoensaio (Teste de Wilcoxon: $p = 0,107$).

Avaliando-se somente os valores de DHT e da relação T/DHT antes e após o estímulo com hCGr, para os dois métodos de estudo (Imunoensaio e LCMS/MS) e analisando cada grupo separadamente, observou-se que para o grupo de deficiência da enzima 5-alfa-redutase tipo 2 não houve diferença significativa entre os dois tempos do estudo (DHT imunoensaio $p = 0,068$; DHT LC-MS/MS $p = 0,180$; T/DHT imunoensaio $p = 0,068$ e T/DHT LC-MS/MS $p = 0,068$). Para o grupo dos indivíduos com IPA não houve diferença entre os valores antes e após estímulo apenas para o DHT dosado por imunoensaio ($p = 0,08$). No grupo de DDS 46,XY

idiopático os valores de DHT e da relação T/DHT foram significativamente maiores no tempo após estímulo com hCGr (DHT IA $p=0,012$; DHT LC-MS/MS $p=0,008$; T/DHT IA $p=0,012$; T/DHT LC-MS/MS $p=0,008$).

A Tabela 3 mostra os valores de média, mediana, desvio-padrão, valores mínimo e máximo e o valor correspondente ao percentil (p10) dos andrógenos por imunoensaio e LC-MS/MS dos 19 casos de DDS 46,XY antes e 7 dias após a aplicação do hCGr. Apenas três dos 19 casos (todos idiopáticos) não apresentaram resposta de aumento da testosterona total (acima de 1,0 ng/mL) sete dias após a medicação recombinante, quer por imunoensaio (0,11; 0,44 e 0,66 ng/mL) quer por LC-MS/MS (0,18; 0,67 e 0,83 ng/mL). Além disso, um caso de IPA de 13 anos já apresentava valores de testosterona total basal acima de 1,5 ng/mL por ambos os ensaios e LH também acima de 1,5 UI/L mostrando já estar em puberdade laboratorialmente apesar de clinicamente pré-púbere (testículos $< 4 \text{ cm}^3$). Esse caso não foi excluído da amostra pois todos os dados foram analisados de forma pareada e os valores não se mostraram discordantes entre os métodos.

Tabela 3: Valores de testosterona total (ng/mL), DHEA (ng/mL), androstenediona (ng/mL), DHT (pg/mL) e relação T/DHT antes e após hCG recombinante por imunoensaio e LC-MS/MS dos pacientes da amostra (n=19).

T	TT ¹		TT ²		DHEA ¹		DHEA ²		Andro ¹		Andro ²		DHT ¹		DHT ²		T/DHT ¹		T/DHT ²	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
M	0,22	2,81	0,27	2,66	1,03	1,13	0,75	1,84	0,43	0,54	0,13	0,21	78,90	166,82	71,11	316,67	2,92	20,63	2,91	14,59
MD	0,03	2,12	0,05	2,05	0,8	0,87	0,39	1,61	0,25	0,31	0,07	0,15	45,60	127,80	50,00	260,00	1,50	13,00	1,00	9,77
DP	0,44	2,23	0,49	1,86	0,8	0,77	0,69	1,1	0,53	0,45	0,12	0,14	86,48	114,53	52,90	265,50	3,61	15,67	4,80	13,01
Mín	0,03	0,11	0,05	0,18	0,2	0,24	0,25	0,46	0,10	0,15	0,05	0,05	6,70	42,90	50,00	50,00	0,15	0,65	1,00	2,97
Máx	1,76	7,41	1,77	6,81	2,88	3,00	2,21	4,26	2,20	1,91	0,38	0,50	346,60	538,70	240,00	1050,00	13,58	50,50	20,83	44,00
p10	0,03	0,44	0,05	0,67	0,22	0,32	0,25	0,56	0,10	0,16	0,05	0,06	9,02	60,00	50,00	50,00	0,27	4,10	1,00	3,50

Legenda: TT = testosterona total; DHEA = deidroepiandrosterona; Andro = androstenediona; ¹ = imunoensaio; ² = LC-MS/MS; DHT = dihidrotestosterona; T/DHT = relação T/DHT; T = tempo; M = média; MD = mediana; DP = desvio-padrão; Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo; p10 = percentil 10

A Tabela 4 mostra as correlações entre o imunoensaio e a LC-MS/MS. Pelos coeficientes ICC e CCS, a testosterona total mostrou excelente correlação em ambos, o DHT uma correlação inexistente entre os dois métodos no ICC e moderada no CCS, o DHEA moderada em ambos e para androstenediona as correlações foram pobre no ICC e moderada no CCS. Para a relação T/DHT as correlações foram: pobre no ICC e moderada no CCS.

Tabela 4: Análise dos coeficientes de correlação intraclasse (ICC) e de correlação de Spearman (CCS) entre os valores de testosterona total, DHEA, androstenediona, DHT e T/DHT pelo imunoensaio versus LC-MS/MS de 19 crianças com DDS XY.

	Testosterona Total	DHEA	Androstenediona	DHT	T/DHT
ICC	0,960 (IC95%: 0,925 a 0,979)	0,585 (IC95%: 0,331 a 0,760)	0,363 (IC95%: 0,053 a 0,609)	0,222 (IC95%: -1,160 a 0,514)	0,441 (IC95%: 0,131 a 0,673)
CCS	$r=0,964$; $p<0,001$	$r=0,716$; $p<0,001$	$r=0,735$; $p<0,001$	$r=0,631$; $p<0,001$	$r=0,690$; $p<0,001$

Legenda: IC = intervalo de confiança; r = coeficiente de correlação; p = nível de significância.

OBS: Para análise de correlação os dados foram agrupados nos dois tempos do estudo.

Todos os resultados de testosterona total, DHEA e androstenediona (ng/mL), DHT (pg/mL) e relação T/DHT por imunoensaio e LC-MS/MS antes e após hCGr estão na Tabela Suplementar. Os resultados da análise por PB e BA mostraram os resultados a seguir (Figuras 5 a 8).

Para a testosterona total, a regressão de PB não excluiu a relação de linearidade ($p=0,09$) e não apresentou erros proporcionais (slope: 1,0540; IC 95%: 0,9641 a 1,1098) apesar de apresentar erros sistemáticos (intercepto: -0,0227; IC 95%: -0,0626 a -0,0182) (Figura 5A). Apesar do gráfico de BA mostrar uma diferença média entre os métodos de apenas 0,05 unidades (IC 95%: -1,12 a 1,02 ng/mL) e de o intervalo de confiança dessa média incluir a linha de igualdade entre os métodos (linha referente ao ponto zero do eixo y), observa-se que há uma tendência ao imunoensaio estimar para cima os valores de testosterona total em comparação com a LC-MS/MS quando se aumenta a média entre os métodos, causando uma variância não constante em todas as concentrações (Figura 5B).

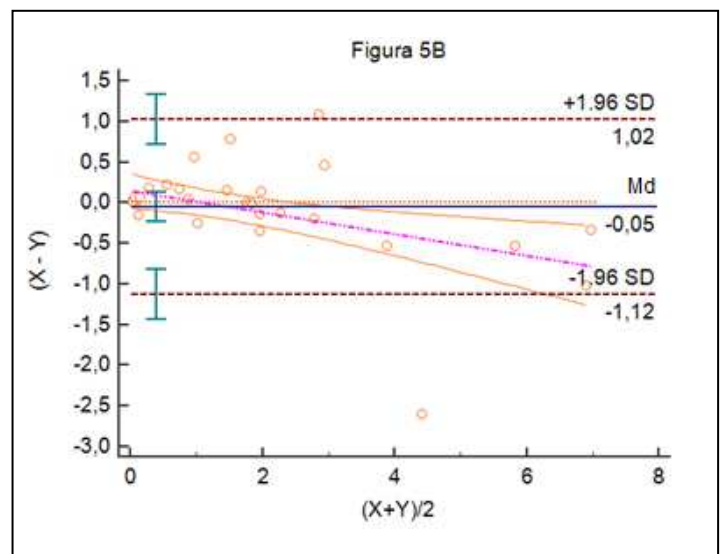
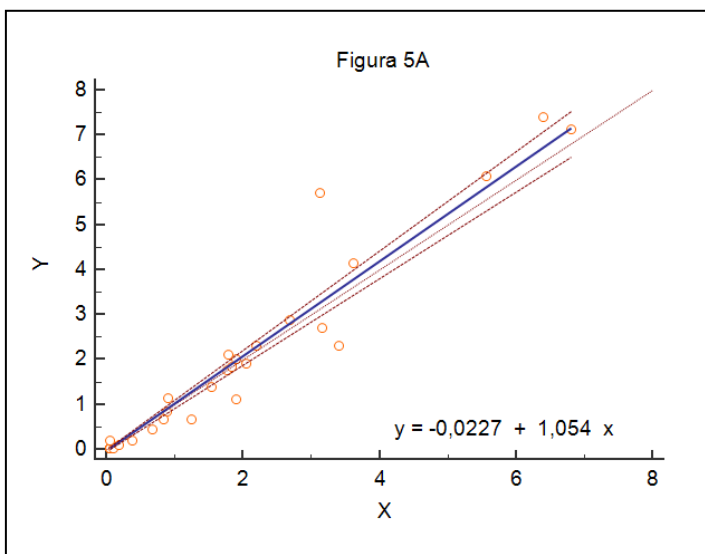


Figura 5: Testosterona total (T) (ng/mL) (n=38). **5A:** Regressão de Passing & Bablok para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **5B:** Gráfico de Bland & Altman para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). SD = desvio-padrão. Legenda: x = método de espectrometria de massa (MS); y = método de imunoensaio (IA); Md = média da diferença entre os métodos, SD = desvio-padrão.

Para a DHT a regressão de PB não excluiu a relação de linearidade ($p=0,10$) e não apresentou erros proporcionais (slope: 0,4729; IC 95%:0,3650 a 1,6675) ou sistemáticos (intercepto: 12,7857; IC 95% -63,3750 a 29,35) (Figura 6A), apesar de uma ampla diferença entre os desvios-padrão da média das diferenças entre os métodos e do largo intervalo de confiança de cada linha de referência mostrada no gráfico da figura 6B. No gráfico de BA pode-se observar uma importante diferença média entre os métodos de 73,9 unidades e uma tendência de valores altos por MS em relação aos valores por imunoenensaio quando se aumenta a média entre os métodos (6B). Além disso, percebe-se que o intervalo de confiança da linha da média de diferença entre os métodos (Md) não inclui a linha de igualdade entre eles.

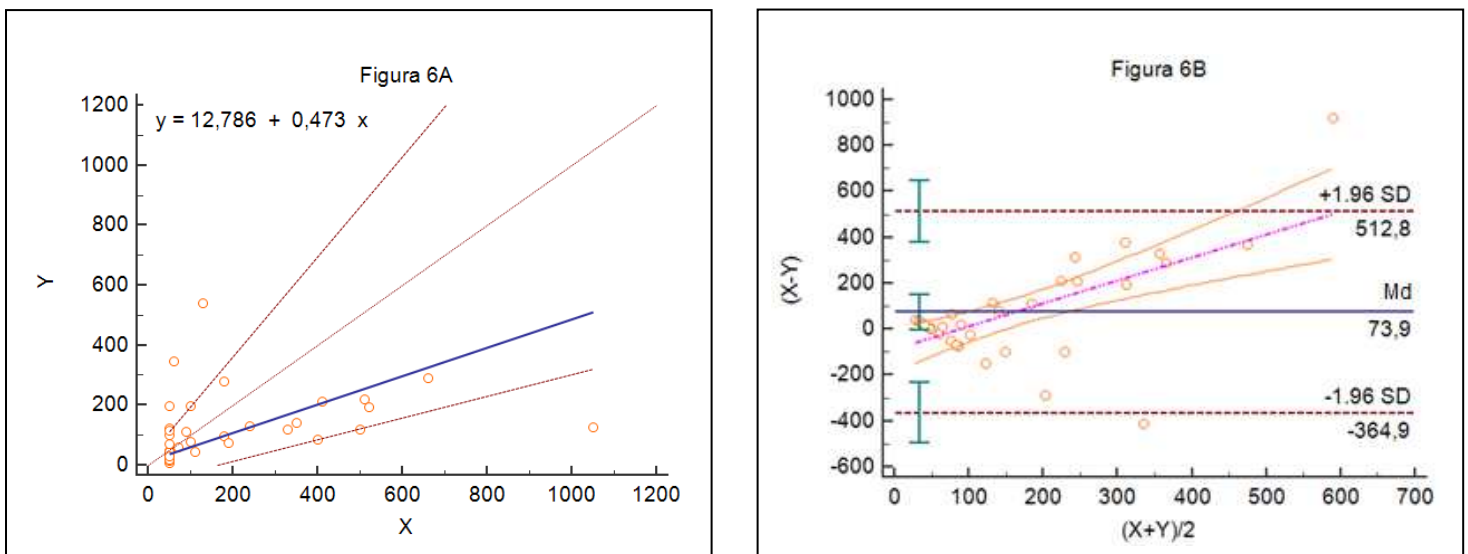


Figura 6: Dihidrotestosterona (DHT) (ng/mL) (n=35). **6A:** Regressão de Passing & Bablok para análise de concordância entre imunoenensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **6B:** Gráfico de Bland & Altman para análise de concordância entre imunoenensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). Legenda: x = método de espectrometria de massa (MS); y = método de imunoenensaio (IA); Md = média da diferença entre os métodos; SD = desvio-padrão.

Para a DHEA, a regressão de PB não excluiu a relação de linearidade ($p = 0,50$) e não apresentou erros proporcionais (slope: 0,7704; IC 95%: 0,5287 a 1,0000) ou sistemáticos (intercepto: 0,1293; IC 95%: -0,0400 a 0,3427) (Figura 7A). Apesar do gráfico de BA mostrar uma diferença média entre os métodos de apenas 0,2 ng/mL (IC 95%: -1,4 a 1,9 ng/mL), observou-se que há uma tendência ao imunoensaio estimar para baixo os valores de DHEA em comparação com a LC-MS/MS quando se aumenta a média entre os métodos, causando uma variância não constante em todas as concentrações (Figura 7B).

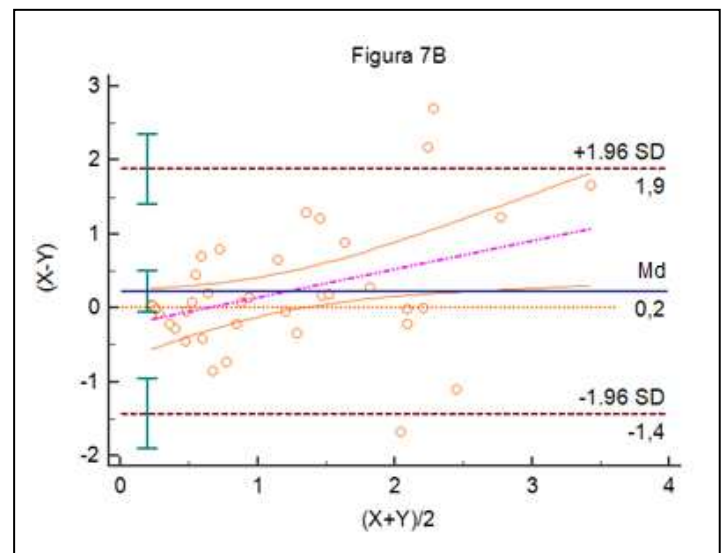
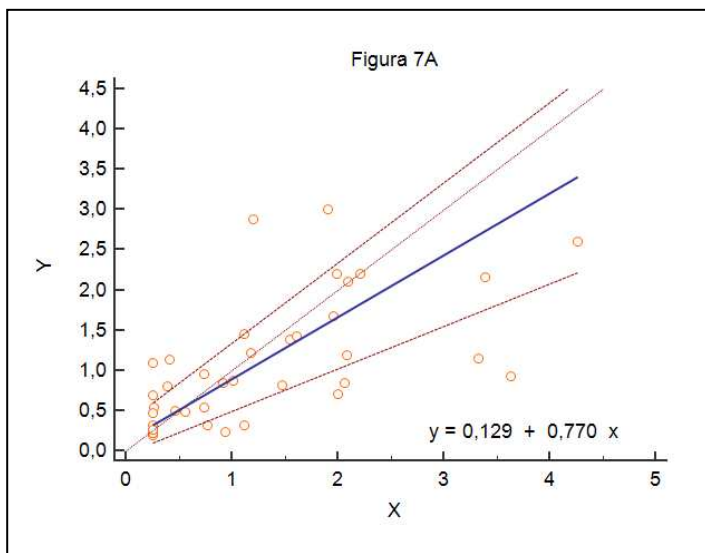


Figura 7: DHEA total (ng/mL) (n=38). **7A:** Regressão de Passing & Bablok para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **7B:** Gráfico de Bland & Altman para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). Legenda: x = método de espectrometria de massa (MS); y = método de imunoensaio (IA); Md = média da diferença entre os métodos; SD = desvio-padrão.

Para a androstenediona, a regressão de PB não excluiu a relação de linearidade ($p=0,07$), porém apresentou erros proporcionais (slope: 2,9470; IC 95%: 2,1667 a 4,4706) e sistemáticos (intercepto: -0,04735; IC 95%: -0,2282 a -0,0083) (Figura 8A). Apesar do gráfico de BA mostrar uma diferença média entre os métodos de apenas -0,31 unidades (IC 95%: -1,10 a 0,48 ng/mL), o intervalo de confiança da linha da média das diferenças entre os métodos (Md) está bem distante da linha de igualdade entre eles. Observou-se que há uma tendência acentuada do imunoensaio estimar para cima os valores de androstenediona em comparação com a LC-MS/MS quando se aumenta a média entre os métodos, causando uma variância não constante em todas as concentrações (Figura 8B).

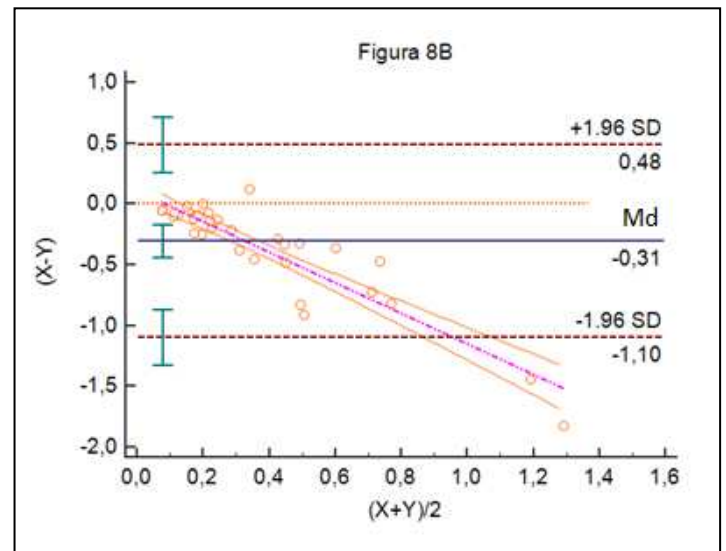
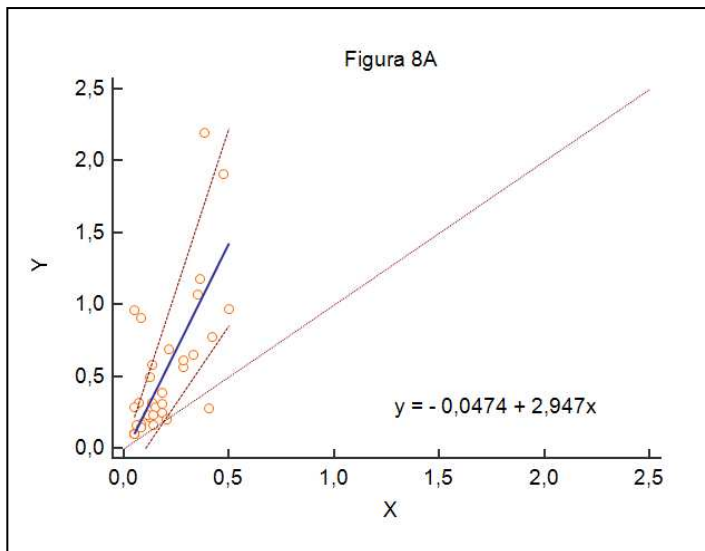


Figura 8: Androstenediona (A) (ng/mL) ($n = 38$). **A:** Regressão de Passing & Bablok para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). **B:** Gráfico de Bland & Altman para análise de concordância entre imunoensaio (IA) e LC-MS/MS (MS). Legenda: x = método de espectrometria de massa (MS); y = método de imunoensaio (IA); Md = média da diferença entre os métodos; SD = desvio-padrão.

Em relação ao ponto de corte de testosterona após estímulo com hCGr por LC-MS/MS discriminatório entre os pacientes, foi realizada a curva ROC (Figura 9) mostrando que os valores de testosterona são realmente diferentes no tempo basal e após estímulo. Para determinar um ponto de corte de testosterona por LC-MS/MS com boa sensibilidade e especificidade para diferenciar produção normal de testosterona, foi excluído o paciente 14, que apresentou baixa resposta hormonal ao teste com hCGr. Dessa forma, a área sobre a curva apresenta um valor de 0,972, com erro padrão de 0,022 e significância $< 0,001$, e IC 95% da área de 0,93 a 1,0.

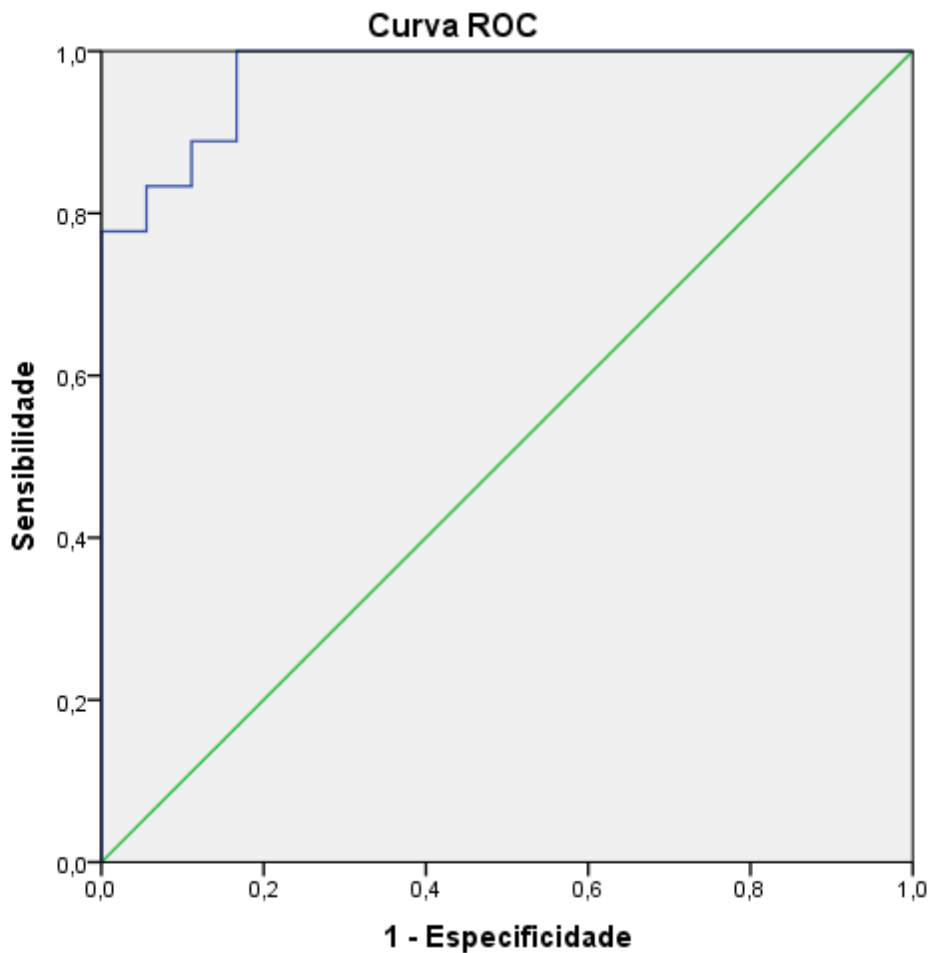


Figura 9: Curva ROC mostrando a sensibilidade e a especificidade da testosterona total pré e pós hCGr por LC-MS/MS em discriminar os pacientes com produção normal de testosterona (Área sob a curva = 0,972; Erro padrão = 0,022; IC 95% = 0,93 – 1,00; $p < 0,001$).

O valor de corte de 0,89 ng/mL pode diferenciar esses pacientes com 88,9% de sensibilidade e 88,9% de especificidade. Ou seja, valores de resposta de testosterona acima desse ponto de corte podem indicar uma produção hormonal adequada. Esse valor é próximo ao valor de P10 de resposta desse grupo (n=18) (p10 = 0,81 ng/mL).

A correlação entre os valores de hCG e idade dos pacientes mostrou-se negativa (-0,05) e significativa (p=0,029, teste de correlação de Pearson) (Tabela suplementar).

O poder do teste post-hoc para duas amostras pareadas e dependentes foi de 0,67, o que significa que 67% dos resultados foram de acordo com o esperado, com aumento significativo da produção de andrógenos após o estímulo com hCGr. Isso equivale à representatividade do teste ou o poder de acerto. Para um poder de teste de 80%, seria necessária uma amostra de 26 pacientes (que era a que tínhamos se todos tivessem aceito participar do estudo).

6. DISCUSSÃO

Os DDS são condições raras e os pacientes de forma geral requerem cuidados especializados de uma equipe multidisciplinar. O diagnóstico correto dessas doenças é essencial para o aconselhamento sobre prognóstico e terapia adequada para as comorbidades associadas, especialmente em neonatos em relação ao sexo de criação ⁽⁵⁸⁾. Atualmente a definição de DDS inclui uma variedade de condições dentro da sua classificação, como condições congênitas que envolvem um amplo espectro de fenótipos gonadais como disgenesias gonadais parciais, completas e ovotestis, ou fenótipos genitais externos como hipospadias, clitoromegalia e genitália ambígua ou genitália completamente masculinizada ou feminizada discordante com o cariótipo e/ou com o fenótipo gonadal. Dentro desse contexto, a incidência de DDS pode ser próximo de 1:100 nascidos vivos ⁽⁵⁹⁾.

Nos últimos anos muito se tem discutido sobre a melhora da avaliação laboratorial em DDS; o aumento expressivo do número de laboratórios em uso da técnica de LC-MS/MS para dosagem de esteroides sexuais reflete a necessidade da melhora da sensibilidade e especificidade para essas medidas, visto que a análise laboratorial de esteroides é considerada uma ferramenta importante para as decisões clínicas nos casos de DDS ⁽⁵⁸⁾. Sabe-se que estrógenos e andrógenos são importantes para o início da puberdade e para a maturação sexual e que a maioria dos imunoenaios atualmente utilizados não são sensíveis o suficiente para a medida acurada de baixos níveis de esteroides circulantes em crianças sem sinais de puberdade, apesar de eles já estarem presentes em crianças pré-púberes antes do início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários ⁽⁶⁰⁾.

Recentemente as técnicas de sequenciamento de nova geração tornaram-se disponíveis e a introdução de painéis genéticos tornou possível analisar um grande número de genes em um curto período de tempo. Entretanto a investigação laboratorial é necessária, uma vez que uma mutação em determinado gene pode levar a um fenótipo variável, como as mutações no gene NR5A1 em indivíduos 46,XY, que podem resultar em fenótipos que variam de disgenesia gonadal à infertilidade masculina ^(58,61). Além disso, quando variantes não classificadas são encontradas no teste genético, as avaliações hormonais também

podem ser úteis para verificar a probabilidade de que essas variantes sejam ou não patogênicas ⁽⁵⁸⁾. Outro exemplo da importância da acurácia da avaliação laboratorial é o encontro de variantes no gene que codifica a enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 3 em que o valor da relação androstenediona com testosterona pode sugerir o diagnóstico da deficiência enzimática, o que pode ser detectado no teste de hCG, que pode identificar uma deficiência de testosterona característica dessa condição. Além disso, a avaliação de vários hormônios esteroides é útil no monitoramento do desenvolvimento puberal espontâneo e da terapia de reposição hormonal ⁽⁵⁸⁾

Em crianças com DDS e cariótipo 46,XY, a dosagem de AMH e um teste de hCG com a determinação de testosterona e seus precursores é sugerido para investigar o desenvolvimento testicular e a síntese de andrógenos ⁽⁶²⁾. Habitualmente no teste agudo da aplicação do hCG para avaliação da esteroidogênese testicular devem ser dosados, no mínimo, os hormônios testosterona, androstenediona e DHT ^(62,37).

O teste do hCG é utilizado em meninos fora do período da mini-puberdade ou da puberdade para investigar a produção hormonal androgênica, visto que age nos receptores de LH das células de Leydig testiculares. O teste agudo do hCG para avaliação da esteroidogênese testicular utilizando a forma recombinante da medicação foi recentemente padronizado ⁽³⁷⁾ e os resultados do presente estudo validam a eficácia do hCGr para estímulo da produção androgênica testicular, já que a resposta da produção de todos os hormônios avaliados, testosterona total, DHT, androstenediona e a relação T/DHT foi significativamente maior sete dias após a aplicação do medicamento, com exceção do DHEA por imunoensaio. Foi utilizado o mesmo protocolo de padronização publicado por Oliveira et al. ⁽³⁷⁾ por ser o único estudo até o momento que utilizou o medicamento recombinante para avaliação da esteroidogênese testicular em meninos com produção androgênica gonadal considerada normal. A verificação desse protocolo de estímulo foi um dos objetivos do nosso estudo. Observou-se que o valor da média de testosterona obtido por imunoensaio foi parecido com a média do estudo anterior (2,81 ng/mL e 2,47 ng/mL, respectivamente), enquanto que por LC-MS/MS a média de testosterona total após estímulo foi 2,66 ng/mL. Pode-se observar que o valor de resposta ao hCGr de testosterona referente ao p10 dosado por IA no estudo de Oliveira et al ⁽³⁷⁾ (1,06

ng/mL) é maior que o valor do p10 de testosterona dosado por LC-MS/MS do nosso estudo (0,67 ng/mL), mostrando a tendência de valores mais altos medidos por IA tradicionais. Entretanto, quando consideramos a análise dos valores de resposta de testosterona total excluindo o paciente 14 que apresentou dosagens hormonais muito baixas após o teste, o valor do p10 de testosterona passa a ser 0,81 ng/mL, que poderia ser considerado um ponto de corte de resposta adequada por LC-MS/MS. A análise de sensibilidade e especificidade da testosterona total por LC-MS/MS após hCGr no presente estudo mostrou que o valor de 0,89 ng/mL (muito próximo de 0,81 ng/mL) apresentou alta sensibilidade (89%) e especificidade (89%).

Nos casos de HAC as medidas de 17OH-progesterona (17-OHP), de androstenediona e de testosterona são importantes para a adequação da terapia com glicocorticoides, assim como a dosagem de testosterona é fundamental para quem faz reposição hormonal por deficiência androgênica ⁽⁵⁸⁾. Portanto, a avaliação laboratorial e a escolha dos exames ou testes a serem feitos, considerando a disponibilidade e os métodos de dosagem, são de extrema importância para avaliação e seguimento dos casos de DDS em que o perfil androgênico deve ser acessado. A avaliação da esteroidogênese gonadal é o primeiro passo nos casos de investigação de DDS 46,XY ^(58,62).

As dosagens hormonais estão atravessando um crítico período de transição entre técnicas de determinação quantitativas como os imunoenaios nas suas versões diretas e automatizadas e a LC-MS/MS ^(63,64). Existem inúmeras diferenças entre essas técnicas em termos de princípios analíticos, benefícios e desvantagens que vêm sendo identificadas nos últimos anos, e atualmente o que se pode dizer é que a técnica de LC-MS/MS é vista como a primeira oportunidade real de atingir a harmonização global de resultados gerados entre laboratórios do mundo todo ⁽⁶³⁾. Entretanto, os dados de ensaios comerciais de LC-MS/MS com valores de referência hormonais, assim como dados na literatura mostrando valores de resposta de hormônios gonadais e adrenais por LC-MS/MS sob condições de testes funcionais de estímulo ou supressão são escassos ⁽⁶³⁾.

Várias vantagens do método de MS em relação aos imunoenaios vêm sendo apontadas. Ao contrário dos imunoenaios, os métodos de MS são independentes dos efeitos de matriz e de reação cruzada, além de analisarem várias

substâncias de uma única vez a partir de uma pequena quantidade de material, o que é interessante em se tratando da população pediátrica ^(9,43)

Esse é o primeiro estudo clínico que compara resultados de imunoensaios e LC-MS/MS em crianças pré-púberes com DDS 46,XY após estímulo com hCG. Esse também foi o primeiro estudo que avaliou a resposta das células de Leydig ao hCGr em meninos pré-púberes com diagnóstico de DDS 46,XY com produção sabidamente normal de testosterona e foi escolhido o protocolo de estímulo com hCGr demonstrado por Oliveira et al. ⁽³⁷⁾, visto que é o único estudo que utilizou o hCG como estímulo agudo da esteroidogênese gonadal na sua forma recombinante, potencialmente livre de impurezas e contaminações comparado ao extraído da urina de mulheres grávidas e com propriedades semelhantes ^(65,66).

Entre os pontos fortes do presente estudo estão a seleção rigorosa dos casos incluindo as avaliações moleculares específicas e a ampla análise de correlação e concordância adotada, o que minimiza o número pequeno de casos incluídos no estudo e tenta compensar em parte a casuística pequena, apesar de se tratar de doenças raras.

Para comparar dois ou mais métodos é necessário utilizar uma ferramenta para medir e avaliar as diferenças entre os métodos ⁽⁶⁷⁾. A validação de uma medida clínica deve incluir todos os procedimentos que demonstrem que um método específico usado para avaliação quantitativa de uma variável seja confiável e reprodutível para o uso pretendido ⁽⁶⁷⁾. Enquanto os testes de correlação quantificam o quanto duas ou mais variáveis estão correlacionadas, os testes de concordância avaliam se as diferenças entre elas são significativas ^(53,54,67). Portanto, uma boa correlação entre dois métodos não obrigatoriamente significa uma boa concordância entre ambos ^(53,54,67).

Quando se pretende avaliar a concordância entre dois métodos que deveriam medir a mesma quantidade é importante que seja evitado o uso único da análise de correlação e seja determinada uma metodologia com limites de concordância e intervalos de confiança bem estabelecidos e determinar se os limites encontrados são diferenças relevantes do ponto de vista clínico ⁽⁶⁸⁾. Se existe concordância um método pode substituir o outro. O teste estatístico ideal para avaliar a presença de concordância entre dois ou mais métodos deve avaliar a

variabilidade das diferenças entre os valores obtidos por eles (erro) e a própria diferença entre os valores (viés). Os dois métodos deveriam apresentar um viés aproximadamente igual a zero e um erro que não tivesse um impacto clínico significativo. O coeficiente de correlação não avalia a concordância e sim a correlação ⁽⁶⁸⁾. No presente estudo foi utilizado para avaliação de concordância o método de Bland-Altman, descrito em 1983 ⁽⁶⁸⁾ que avalia a diferença entre os valores de duas variáveis em relação à média desses valores e apresenta a magnitude da discordância entre dois métodos de forma gráfica. Para o uso desse método de análise de concordância, as diferenças entre os métodos devem apresentar distribuição normal, o que foi testado antes da nossa análise e visto a normalidade da distribuição por um ou mais testes de normalidade (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov) para todos os hormônios avaliados. Além desse método, a regressão de Passing and Bablock também foi usada para verificar a presença de erros sistemáticos e/ou proporcionais de concordância ⁽⁶⁹⁾. Outro coeficiente que é considerado um índice de confiabilidade é o ICC, que também mede concordância além de avaliar correlação.

Em relação aos resultados do presente estudo, observou-se correlações excelentes entre os dois métodos avaliados para a testosterona total, correlações desprezível a moderada para a DHT, correlações moderadas para a DHEA e pobre a moderada para a androstenediona. No entanto, em relação à concordância entre os dois métodos, para todos os esteroides houve uma relação de linearidade, mas para os valores de testosterona total e a androstenediona detectou-se erros sistemáticos e a análise da androstenediona também apontou erros proporcionais. Na análise de concordância da DHT não foram apontados erros sistemáticos e proporcionais, mas como os intervalos de confiança em relação à linha da média das diferenças entre os métodos e às linhas dos limites de concordância foram muito amplos, não se pode considerar que os métodos são concordantes, visto que a análise inicial de correlação entre os dois métodos já se mostrava desprezível. Além disso a visualização gráfica do Bland Altman (Figura 6B) mostra claramente a variação da inclinação da linha de regressão e a dispersão dos pontos de distribuição em relação à linha de igualdade entre os métodos. Outro dado importante é que o intervalo de confiança da média da diferença entre os dois métodos não incluiu o valor zero para a DHT e androstenediona, o que mostra que a

diferença de medida por esses métodos não pode considerada igual ou próxima de zero, ou seja, há um viés significativo.

Os dados do presente estudo estão de acordo com o estudo de Roli et al. ⁽⁷⁰⁾ de 2017 que avaliou a resposta ao hCG urinário de esteroides androgênicos gonadais e adrenais em 13 pacientes adultos com síndrome de Klinefelter e também mostrou uma boa linearidade entre os imunoensaios e a LC-MS/MS, porém uma tendência à superestimativa dos valores dos imunoensaios em relação aos da LC-MS/MS. Os resultados do presente estudo mostram uma tendência importante de valores medidos por imunoensaio superestimados em relação a valores medidos por MS para a testosterona e a androstenediona e uma tendência contrária para o DHEA e a DHT, cujos valores mais altos foram os medidos por espectrometria de massa; essa tendência é bem visível pelo gráfico de Bland Altman que mostra a inclinação da linha de regressão em relação à diferença entre os dois métodos: (Figuras 5B, 6B, 7B e 8B).

As alterações de estimativa dos resultados dos imunoensaios mostram que esta técnica pode ser inadequada em outras situações clínicas, particularmente quando pequenas variações na concentração de esteroides precisam ser avaliadas, ou seja, a dispersão entre os pontos nos gráficos das análises de concordância (Figuras 5B,6B,7B e 8B) se mostram maiores para menores valores de esteroides androgênicos. Essas situações são particularmente importante em crianças pré-púberes e mulheres.

Outro dado importante é que os 19 pacientes avaliados neste estudo apresentaram resposta ao estímulo com hCGr, mesmo que a resposta não tenha sido tão significativa em alguns casos. O estudo de Oliveira et al. ⁽³⁷⁾, que teve como objetivo padronizar os valores de testosterona total por imunoensaio após o estímulo com hCGr em meninos normais, aponta o valor do percentil 5 de 0,62 ng/mL. De acordo com este dado, somente um caso do presente estudo não apresentou boa resposta de testosterona total pelos dois métodos de dosagem (paciente 14, tabela suplementar). Entretanto a medida de testosterona livre por imunoensaio após o estímulo com hCGr foi de 2,36 ng/mL e o valor de SHBG desse paciente foi baixo de acordo com o valor de referência do método (21,5 mol/L - eletroquimioluminescência

com referência de normalidade de 55-100 mol/L para a idade do paciente). Portanto é provável se tratar de um paciente com produção androgênica satisfatória.

Observou-se no presente estudo que o intervalo de confiança para os três esteroides androgênicos (testosterona total, DHEA e androstenediona) não são muito diferentes entre os imunoenaios e a LC-MS/MS, o que não foi visto para os valores de DHT, com amplos intervalos de confiança mostrados na análise de concordância entre os métodos. Em relação à DHT, avaliou-se no estudo crianças com diagnóstico estabelecido da deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2, que apresentam sub-virilização da genitália externa masculina ao nascimento devido à falência da síntese de DHT, hormônio que possui 10 vezes mais afinidade pelo receptor androgênico do que a testosterona ⁽⁷¹⁾. Nesses casos, a genitália interna não é afetada visto que sua androgenização depende da testosterona. A maioria dos indivíduos com a doença são homocigotos (cerca de 65%) ou heterocigotos compostos para mutações com perda de função (35%) no gene *SRD5A2* ⁽⁷²⁾. Esses pacientes podem apresentar fenótipo feminino quase completo, genitália ambígua, hipospádia, micropênis, escroto bífido, abertura do seio urogenital ou a combinação desses defeitos ⁽⁷¹⁾. O diagnóstico pode ser feito na infância ou na puberdade, quando a virilização da genitália externa ocorre em meninas com cariótipo 46,XY. A bioquímica clássica consiste na concentração normal a alta de testosterona, baixa de DHT e aumento da relação T/DHT basal ou após o estímulo com hCG. Entretanto, resultados falso-positivos ou negativos são comuns ^(71,73) e os valores de referência para essa relação baseiam-se em medidas hormonais por imunoenaios.

O valor da relação T/DHT plasmática acima de 8.5 foi considerada como ponto de corte para deficiência da enzima 5-alfa-redutase especialmente no período neonatal ^(73,74). Essa relação não é considerada específica; os estudos apontam diferentes valores após estímulo com hCG. De acordo com a casuística de uma família de 4 membros afetados do estudo de Perry et al ⁽⁷⁴⁾, a bioquímica plasmática e urinária só foi sugestiva da doença em apenas um indivíduo mais gravemente afetado. No artigo de Chan et al de 2013 ⁽⁷¹⁾, dentre os 16 pacientes avaliados e com diagnóstico da doença essa relação variou de 8,8 a 28,5 após o estímulo com hCG. No presente estudo com quatro pacientes com diagnóstico molecular definido de deficiência da 5 α -redutase tipo 2 e idades entre 1 e 10,8 anos, as razões T/DHT variaram de 9,5 a 47,5 por imunoenasão e de 10,32 a 44 por LC-MS/MS. No entanto,

apesar de não apresentar significância estatística ($p=0,051$), a razão T/DHT por LC-MS/MS após hCGr mostrou valores máximos de 17,8 nos casos de IPA e 26,1 nos casos idiopáticos do presente estudo, enquanto que a média e a mediana desta relação nos casos de deficiência da 5 α -redutase tipo 2 foram 32,6 e 38,1, respectivamente, mostrando que valores de T/DHT por LC-MS/MS após hCGr acima de 30 são altamente sugestivos de deficiência da 5 α -redutase tipo 2. O valor de p nesse caso se apresenta próximo de ser significativo ($p=0,051$), e correlacionando esse dado com o que temos na literatura sobre a importância da razão T/DHT para sugerir o diagnóstico da deficiência da 5 α -redutase tipo 2 podemos sugerir esse ponto de corte de 30 por LC-MS/MS como indicativo da doença

É importante ressaltar que a média dos valores de DHT encontrada no presente estudo por LC-MS/MS após estímulo foi bem maior que a por imunoenensaio (316,67 pg/mL e 166,82 pg/mL, respectivamente), o que sugere que o método de LC-MS/MS foi mais sensível para a dosagem de DHT, o que é importante para a dosagem de hormônios em que a concentração sérica é geralmente baixa, como a DHT. Entretanto esses resultados estão em desacordo com os resultados de Kulle et al ⁽⁹⁾ que encontrou valores maiores de DHT dosados por imunoenensaio em relação a um método particular que utilizou extração em fase sólida antes da LC-MS/MS. A dosagem basal da DHT nos primeiros anos de vida ou na puberdade poderia ser informativa e confiável se utilizado um método mais sensível e específico. Diante da dificuldade do diagnóstico da doença por métodos laboratoriais, o estudo molecular é importante para o diagnóstico, embora a relação T/DHT possa ser considerada importante na seleção dos casos para análise molecular do gene *SRD5A2* ^(72,73). Considerar a utilização de um método mais sensível e específico para a dosagem de T e DHT na avaliação desses pacientes é válido, já que o estudo molecular não é amplamente disponível; assim, avaliar a relação T/DHT juntamente com o quadro clínico pode dar uma ideia de quem poderia se beneficiar do estudo molecular do gene *SRD5A2*. Isso é sugerido no estudo de Bertellini et al ⁽⁷²⁾, que revisou 24 pacientes com diagnóstico estabelecido da deficiência da 5 α -redutase tipo 2 e concluiu que o uso de valores de corte para a relação T/DHT de 10 ou 15 após estímulo permite a seleção de indivíduos para a análise genética, visto que essa relação vista após o hCG foi compatível com o diagnóstico da deficiência da enzimática em todos os pacientes da sua casuística, enquanto a relação T/DHT

basal nos primeiros meses de vida ou na puberdade foi diagnóstica em apenas 50 % dos casos. Sua sugestão é que seja utilizado o teste do hCG no período pré-puberal quando a avaliação laboratorial for feita com métodos tradicionais. Há autores que sugerem que o diagnóstico seja feito com o teste genético e o perfil urinário avaliado por GC-MS, mas essas metodologias são ainda limitadas ⁽⁷¹⁾. Como já foi dito anteriormente, o presente estudo mostrou que, em crianças pré-púberes com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY, valores da T/DHT por LC-MS/MS após hCGr acima de 30 podem ser considerados discriminatórios entre deficiência da 5 α -redutase tipo 2 e IPA ou idiopáticos.

Quanto às dosagens hormonais por LC-MS/MS, a questão mais importante continua sendo a disponibilidade de intervalos de referência calibrados em relação ao ensaio ^(75,76). Vários diagnósticos clínicos dependem das limitações específicas dos esteroides de interesse. Por exemplo, de acordo com vários estudos realizados em crianças pré-púberes com DDS 46,XY a testosterona total após estímulo com hCGu deve aumentar acima de 1,1 a 1,5 ng/mL ^(41,51), ou seja pequenas diferenças podem indicar produção normal ou não de testosterona pelas células de Leydig nestes pacientes e, portanto, determinar a investigação molecular a ser realizada. Assim, o valor de testosterona basal ou após estímulo determina a sequência da investigação em um caso de DDS 46,XY. No caso de subprodução de testosterona em crianças com DDS 46,XY, a investigação deve ser direcionada para hipogonadismo hipogonadotrófico, disgenesia gonadal, hipoplasia ou agenesia das células de Leydig (defeito no LHCGR) ou defeitos na biossíntese de testosterona, em contraponto com a produção normal de testosterona que direciona a investigação molecular para IPA ou ICA e deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 ^(25,26). Por isso a determinação adequada da medida de testosterona é importante inicialmente para o diagnóstico e a consequente abordagem e tratamento adequados dos pacientes com DDS 46,XY.

Apesar de estudos escassos sobre valores de referência por LC-MS/MS, um estudo que fez a comparação entre 7 LC-MS/MS publicados até 2015 mostrou um coeficiente de variação inter-ensaio dentro do aceitável de não mais que 10%, e concluiu que os ensaios de LC-MS/MS apresentaram uma boa concordância entre eles para medidas de testosterona, DHEA e androstenediona. Foi visto que o

coeficiente de variação inter-ensaio para os imunoenaios em relação à dosagem de testosterona foi bem maior quando comparado ao método de MS ⁽⁷⁶⁾.

Atualmente os diferentes pontos de corte são todos derivados de imunoenaios, que ainda são amplamente utilizados na prática clínica ^(42,43,64). Embora a definição de pontos de corte para testosterona total (ou DHEA ou androstenediona ou DHT) por LC-MS/MS em relação aos imunoenaios estivesse fora do escopo deste estudo, os resultados sugerem a reconsideração do diagnóstico clínico específico de determinadas doenças, como DDS 46,XY, relacionadas à análise do método em uso, uma vez que foram apontados erros de concordância entre os valores encontrados em ambos os métodos analisados para dois dos hormônios avaliados (testosterona total e androstenediona), o que está de acordo com outros estudos que já mostraram uma tendência importante de superestimativa de medidas de esteroides dosados por imunoenaios convencionais ^(9,10,60,76,77). Além disso a correlação inicial entre os métodos para a DHT foi desprezível, o que implica uma análise de concordância prejudicada.

O primeiro estudo que avaliou valores basais plasmáticos de androstenediona, testosterona e DHT em crianças normais de diferentes estágios puberais por LC-MS/MS foi Kulle et al em 2010 ⁽⁹⁾. Segundo esse estudo o valor do limite superior de referência de testosterona em meninos pré-púberes de 10-12 anos foi de 43,2 ng/mL por LC-MS/MS (72 amostras). Acima desse valor de testosterona o menino estaria em puberdade. O presente estudo, apesar de ter um número de pacientes relativamente pequeno para a determinação de valores de referência para andrógenos por um método específico, mostrou a mesma tendência de resultados superestimados de esteroides androgênicos medidos por imunoenensaio em relação à LC/MS/MS como a testosterona e a androstenediona, em concordância com o estudo de Kulle et al ⁽⁹⁾, que coloca que essa diferença se deve a especificidade insuficiente dos anticorpos utilizados nos imunoenaios e também à presença de reação cruzada entre os hormônios e outras substâncias ^(9,76).

Os resultados do presente estudo sugerem que a diferença entre os imunoenaios e a LC-MS/MS deve ser cuidadosamente avaliada em tratamentos nos quais os níveis séricos dos esteroides androgênicos são importantes para determinar a manipulação farmacológica, como por exemplo os valores destes

esteroides no tratamento de crianças com HAC. Esse limite metodológico é ainda mais importante em condições clínicas caracterizadas por níveis dos esteroides androgênicos mais baixos.

Os imunoenaios tornaram-se amplamente disponíveis nas últimas décadas e alguns desses ensaios passaram a ser precedidos da extração com solvente ou cromatografia (HPLC), o que aumentou a sensibilidade e especificidade das análises. Entretanto, o problema subsequente foi a baixa reprodutibilidade para os diferentes laboratórios. Além disso, as diferenças entre as técnicas usadas em diferentes laboratórios impedem a comparação e dificultam a implementação de intervalos de referência de normalidade e valores de corte para determinadas doenças ⁽⁹⁾.

Nos últimos anos, muitos esforços foram feitos para melhorar os dois métodos. Se por um lado, a nova geração de imunoenaios está sendo validada levando em consideração o teste de comparação com a MS, por outro lado, a LC-MS/MS está possibilitando rapidamente sua facilidade de uso e oferecendo uma ampla gama de aplicações. Por enquanto, pode ser que a MS ainda não deva substituir, mas complementar os imunoenaios tanto na pesquisa como na prática clínica. Muitos autores defendem que em casos de investigação de DDS as medidas devem ser feitas por LC-MS/MS ou IA após extração com solvente. Decisões sobre diagnóstico e tratamento são tomadas atualmente considerando os pontos de corte propostos apenas pelos imunoenaios, enquanto que o uso da LC-MS/MS em laboratórios clínicos deve ser precedido por uma revisão dos limites de diagnóstico e intervalos de confiança. A prática clínica e de pesquisa deve contribuir para melhorar a sustentabilidade e a precisão dos imunoenaios e da LC-MS/MS.

Uma limitação do presente estudo poderia ser o pequeno número de casos, mas a avaliação do poder do teste post-hoc de 67% para doenças raras é bastante aceitável; ou seja, próximo de 70%, e levando-se em consideração que para ter este poder aumentado para 80% seria aumentar a casuística de 19 para 26 casos, o que corresponderia a casuística total do serviço se todos os pacientes e familiares tivessem concordo em participar do estudo.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, apesar dos métodos de LC-MS/MS e imunoenaios apresentarem boa linearidade e alguma correlação entre eles - moderada correlação para androstenediona e DHEA, excelente correlação para testosterona total e correlação ausente ou moderada para a DHT, erros sistemáticos e/ou proporcionais foram detectados para testosterona total e androstenediona. Os valores de DHT foram muito discordantes entre os dois métodos pela análise da correlação e pela visualização dos pontos do gráfico de dispersão comparativo entre os métodos, e também os limites de concordância das linhas de referência e o intervalo de confiança dessas linhas foram muito amplos, o que é ruim para a decisão clínica sobre o uso de um método e outro como substituíveis. Diante da presença de correlações ruins entre as dosagens pelos dois métodos avaliados e a presença de erros de concordância entre eles, pode-se concluir que os resultados da medida de esteroides androgênicos por imunoenaios devem ser analisados com cautela.

Considerando que os imunoenaios convencionais são ainda amplamente utilizados na prática clínica, sugere-se que a prática da MS possa complementar e ser usada juntamente com as técnicas tradicionais quando se tratar de pacientes muito jovens em que a concentração sérica de esteroides é baixa, ou quando há dúvida sobre o diagnóstico ou sobre o quadro clínico específico, ou quando os níveis séricos dos esteroides androgênicos são importantes para determinar a manipulação farmacológica.

Além disso, foi possível verificar a eficácia do hCGr para estímulo agudo da esteroidogênese testicular, visto que houve um aumento significativo após o estímulo com o hCGr, exceto para o DHEA medido por imunensaio. Assim, pode-se, a partir deste estudo e com intenção de verificar a eficácia do hCGr para estímulo agudo da esteroidogênese gonadal demonstrada no único estudo anterior utilizando essa medicação, propor um novo protocolo para estímulo da produção androgênica testicular com a aplicação de 250 mcg (uma ampola), dose única, do hCGr e avaliação hormonal após intervalo de sete dias da aplicação. Observou-se que o aumento da testosterona total, androstenediona e DHT foi significativo para as dosagens por imunensaio e MS, com aumento também importante da relação

T/DHT. Com base nos dados do nosso estudo o valor de testosterona total de 0,89 ng/mL por LC-MS/MS em resposta ao hCGr utilizado em dose única, independente do peso, com intervalo de 7 dias para avaliação da resposta hormonal, pode ser considerada uma resposta de normalidade ao estímulo com hCGr.

Outra conclusão do presente estudo, tendo em vista as divergências de concordância e correlação entre os métodos analisados, é que, ao menos em casos de investigação de DDS as dosagens hormonais sejam feitas por LC-MS/MS ou imunoensaio após extração.

Observou-se também que valores acima de 30 de T/DHT por LC-MS/MS após hCGr são altamente sugestivos do diagnóstico de deficiência de 5 α -redutase tipo 2, o que pode ser muito útil para direcionar a escolha do estudo molecular frente a casos de DDS 46,XY e produção normal de testosterona.

8. REFERÊNCIAS

- 1- Audí L, Camats N, Fernández-Cancio M, Granada ML. Development of Laboratory Investigations in DSD. *Sex Dev.* 2018; 12:7–18.
- 2- Josso N: Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation. *Sex Dev.* 2008; 2:55-63.
- 3- Ferguson-Smith MA, Johston AW. The human chromosomes in disorders of sex differentiation. *Trans Assoc Am Physicians.* 1960; 73:60-71.
- 4- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, et al: Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature.* 1990; 348:448-50.
- 5- Shackleton CH, Charro-Salgado AL, Mitchell FR. Urinary neutral steroid profile analysis in adults and infants. *Clin Chim Acta.* 1968; 21:105-18.
- 6- Berson SA, Yalow RS. General principles of radio-immunoassay. 1968 (reprinted) *Clin Chim Acta.* 2006; 369:125-43.
- 7- Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J: Hypophyso-gonadal function in human during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest.* 1974; 53:819-28.
- 8- Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H: Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an endocrine society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:405-13.
- 9- Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM. A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-Specific Reference Data. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(5):2399-2409.
- 10- Belli S, Santi D, Leoni E, Dall'Olio E, Fanelli F, Mezzullo M, et.al. Human Chorionic Gonadotropin stimulation gives evidence of differences in testicular steroidogenesis in Klinefelter syndrome, as assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Eur J Endocrinol.* 2016; 174:801-11.

- 11- De Martino MU, Pastore R, Caprio M, Frajese G, Fabbri A: Dynamic testing in the evaluation of male gonadal function. *J Endocrinol Invest.* 2003; 26:107-13.
- 12- Mello MP, Assumpção JG, Hackel C. Genes Envolvidos na Determinação e Diferenciação do Sexo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005; 49(1):14-25.
- 13- Parker KL, Schimmer BP. Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med.* 2002; 34:171-78.
- 14- Rey, Rodolfo. RA, Grinspon RP. Determinação e diferenciação sexuais normais – Aspectos endócrinos. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. *Menino ou Menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo.* 2ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p. 27-50.
- 15- Grinspon RP, Rey RA. When Hormone Defects Cannot Explain It: Malformative Disorders of Sex Development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(4):359-73.
- 16- Mello MP, Soardi FC. Determinação e diferenciação sexuais normais – Genes envolvidos na determinação sexual. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. *Menino ou Menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo.* 2ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2010.p. 3-14.
- 17- Scott HM, Mason I, Sharpe RM. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews.* 2009; 30(7):883-925.
- 18- Cheon C. Practical approach to steroid 5alpha-reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr.* 2011;170(1):1-8.
- 19- Ivell R, Anand-Ivell R. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009;15(4):463-476.
- 20- Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R. INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod.* 2013;88(6):147,1-8.

- 21- Grinspon RP, Urrutia M, Rey RA. Male Central Hypogonadism in Paediatrics - the Relevance of Follicle-stimulating Hormone and Sertoli Cell Markers. *European Endocrinology*. 2018;14(2):67-71
- 22- Lambert SM, Vilain EJ, Kolon TF. A practical approach to ambiguous genitalia in the newborn period. *Urol Clin North Am*. 2010; 37:195-205.
- 23- Danish RK. Intersex problems in the neonate. *Indian J Pediatr*. 1982; 49:555-75.
- 24- Wilkins L. Abnormalities of sex differentiation. Classification, diagnosis, selection of gender of rearing and treatment. *Pediatrics*. 1960; 26:846-57.
- 25- Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA, International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006; 118:e488-500
- 26- Lee PA, Nordenström A, Houk CP, Ahmed SF, Auchus R, Baratz A, et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions Approach and Care. *Horm Res Paediatr*. 2016; 85(3):158-80.
- 27- Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010; 25(2):221-38
- 28- Machado-Neto FA, Morcillo AM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G. Idiopathic male pseudohermaphroditism is associated with prenatal growth retardation. *Eur J Pediatr*. 2005; 164:287-91.
- 29- De Paula G, Barros BA, Carpini S, Tincani BJ, Mazzola TN, Sanches Guaragna M, et al. 408 cases of genital ambiguity followed by single multidisciplinary team during 23 years: etiologic diagnosis and sex of rearing. *Int J Endocrinol*. 2016; 2016:4963574.
- 30- Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, et al. UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 75:12-26.

- 31- Mongan NP, Tadokoro-Cuccaro R, Bunch T, Hughes IA. Androgen insensitivity syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015; 29(4):569-80.
- 32- Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Bouchard P, Fenichel P, et al. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(2):296-307.
- 33- Cheon C. Practical approach to steroid 5 α -reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr.* 2011;170(1):1-8.
- 34- Mendonça BB, Billerbeck A, de Zegher F. Nongenetic male pseudohermaphroditism and reduced prenatal growth. *N Engl J Med.* 2001; 345(15):1135.
- 35- Cox K, Bryce J, Jiang J, Rodie M, Sinnott R, Alkhawar M, et al. Novel associations in disorders of sex development: findings from the I-DSD registry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(2):E348-E355.
- 36- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassali J-D, Efstratiadis A, Accili D, et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature.* 2003; 426(6964):291-95.
- 37- Oliveira LR, Homma TK, Woloszynek RR, Brito VN, Longui CA. Gonadal response after a single-dose stimulation test with recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in patients with isolated prepubertal cryptorchidism. *Basic Clin Androl.* 2016; 26:13.
- 38- De Martino MU, Pastore R, Caprio M, Frajeze G, Fabbri A. Dynamic testing in evaluation of gonadal function. *J Endocrinol Invest.* 2003;26(7 Suppl):107-13.
- 39- Dixon JR, Wallace AM, O'Toole S, Ahmed SF. Prolonged human chorionic gonadotrophin (hCG) stimulation as a tool for investigating and managing undescended testes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007; 67:816-21.
- 40- Ahmed SF, Keir, L., McNeilly, J. et al. The concordance between serum anti-mullerian hormone and testosterone concentrations depends on duration of hCG stimulation in boys with disorders of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 72:814-19.

- 41- Bertelloni S, Russo G, Baroncelli GI. Human Chorionic Gonadotropin Test: Old Uncertainties, New Perspectives, and Value in 46,XY Disorders of Sex Development. *Sex Dev.* 2018;12:41-9.
- 42- Kulle A, Krone N, Holterhus PM, Schuler G, Greaves RF, Juul A, et al. Action Steroid hormone analysis in diagnosis and treatment of DSD: position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. *Eur J Endocrinol.* 2017; 176:1-9.
- 43- Honour JW. Steroid Assays in Pediatric Endocrinology. *J Clin Res Ped Endo.* 2010; 2(1):1-16.
- 44- Wudy SA, Hartmann MF. Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology. *Horm Metab Res.* 2004;36:415-22.
- 45- Albrecht L, Styne D. Laboratory testing of gonadal steroids in children. *Pediatr Endocrinol Rev* 2007;5(Suppl 1):599-607.
- 46- Tomlinson C, Wallace, A.M. & Ahmed, S.F. Erroneous testosterone assay causing diagnostic confusion in a newborn infant with intersex anomalies. *Acta Paediatr.* 2004; 93:1004-5.
- 47- Cao TZ, Botelho JC, Rej R, Vesper H. Accuracy-based proficiency testing for testosterone measurements with immunoassays and liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2017; 469:31-6.
- 48- Pitt JJ. Principles and applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 2009; 30:19-34.
- 49- Malviya, R.; Bansal, V.; Pal, O. P.; Sharma, P. K. High performance liquid chromatography: a short review. *J Global Pharma Technol.* 2010; 2(5):22-6
- 50- Rahhal SN, Fuqua JS, Lee PA. The impact of assay sensitivity in the assessment of diseases and disorders in children. *Steroids.* 2008;73:1322–27.
- 51- Stuchi-Perez EG, Hackel C, Oliveira LE, Ferraz LF, Oliveira LC, Nunes-Silva D et al. Diagnosis of 5-alpha-reductase type 2 deficiency: contribution of anti-Mullerian hormone evaluation. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005;18(12):1383-89.
- 52- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Report from the Scientific Working Group for Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol.* 2013; 37:452-74.

- 53- Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983; 21:709-20.
- 54- Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res.* 1999; 8(2):135-60.
- 55- Mukaka MM. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012; 24(3):69-71.
- 56- Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med.* 2016; 15(2):155-63.
- 57- MedCalc Statistical Software version 18. MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018.
- 58- Hannema SE, Rijke YB. Improving Laboratory Assessment in Disorders of Sex Development through a Multidisciplinary Network. *Sex Dev.* 2018; 12:135-39.
- 59- Arboleda VA, Sandberg DE, Vilain E. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10(10):603-15.
- 60- Courant F, Aksglaede L, Antignac JP, Monteau F, Sorensen K, Andersson AM, et al. Assessment of circulating sex steroid levels in prepubertal and pubertal boys and girls by a novel ultrasensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(1):82-92.
- 61- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999; 22:125-26.
- 62- Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen A, Conway G, Edwards Z, et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016; 84:771-88.
- 63- Fanelli F, Baronio F, Ortolano R, Mezzullo M, Cassio A, Pagotto U, et al. Normative Basal Values of Hormones and Proteins of Gonadal and Adrenal Functions from Birth to Adulthood. *Sex Dev.* 2018; 12:46-90.

64- Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol.* 2015; 173:1-12.

65- Cailleux-Bounacer A, Reznik Y, Cauliez B, Menard JF, Duparc C, Kuhn JM. Clinical study: evaluation of endocrine testing of Leydig cell function using extractive and recombinant human chorionic gonadotropin and different doses of recombinant human LH in normal men. *Eur J Endocrinol.* 2008; 159:171-78.

66- Kenley S, Burns T, Denton G, DeVane G, O'Dea L. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: Results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2001; 76(1):67-74.

67- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb).* 2015; 25(2):141-51.

68- Hirakata VN, Camey SA. Análise de concordância entre métodos de Bland-Altman. *Rev HCPA.* 2009; 29(3):261-68.

69- Deming TT Thiel-Sen and Passing anda Bablock regression. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=deming>.2014.

70- Roli L, Santi D, Belli S, Tagliavini S, Cavalieri S, De Santis MC. The steroid response to human chorionic gonadotropin (hCG) stimulation in men with Klinefelter syndrome does not change using immunoassay or mass spectrometry. *J Endocrinol Invest.* 2017; 40:841-50.

71- Chan AOK , Wai Man But B, Lee CY, Lam YY, Leung Ng K, Tung JYL et al. Diagnosis of 5 α -reductase 2 Deficiency: Is Measurement of Dihydrotestosterone Essential? *Clin Chem.* 2013; 59(5):798-806.

72- Bertelloni S, Baldinotti F, Russo G, Ghirri P, Dati E, Michelucci A et al. 5 α -Reductase-2 Deficiency: Clinical Findings, Endocrine Pitfalls, and Genetic Features in a Large Italian Cohort. *Sex Dev.* 2016; 10(1):28-36.

73- Mendonca BB, Batista RL, Domenice S, Costa EM, Arnhold IJ, Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016; 163:206-211.

74- Perry RJ, Novikova AM, Donaldson MDC. Pitfalls in the Diagnosis of 5 - Reductase Type 2 Deficiency during Early Infancy. *Horm Res Paediatr.* 2011; 75:380-82.

75- Walter KN, Kienzle FB, Frankenschmidt A, Hiort O, Wudy SA, van der Werf-Grohmann N, et al. Difficulties in diagnosis and treatment of 5 -reductase type 2 deficiency in a newborn with 46,XY DSD. *Horm Res Paediatr.* 2010; 74:67-71.

76- Buttler RM, Martens F, Fanelli F, Pham HT, Kushnir MM, Janssen MJW et al. Comparison of 7 published LC-MS/MS methods for the simultaneous measurement of testosterone, androstenedione, and dehydroepiandrosterone in serum. *Clin Chem.* 2015; 61(12):1475-83.

77- Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J, Varshavsky M, Roberts WL, Yue B, et al. High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone e estradiol. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129:530-39.

ANEXOS

1. Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR COM ESTÍMULO AGUDO DE HCG RÉCOMBINANTE EM PACIENTES COM DDS 46,XY TESTICULAR E COMPROVADA PRODUÇÃO NORMAL DE TESTOSTERONA.

Pesquisador: LETÍCIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 48063115.4.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.113.171

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora responsável apresentou a emenda ao projeto original solicitando a retirada do CNPJ da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo como centro co-participante do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Não alterados em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não alterados em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda ao projeto de pesquisa original, solicitando a retirada do CNPJ da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo como centro co-participante da pesquisa. Nenhum participante dessa instituição foi incluído no presente estudo que já finalizou a coleta de dados.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.113.171

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 15 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da esteroidogênese testicular com estímulo agudo de hCG recombinante em pacientes com DDS 46,XY testicular e comprovada produção normal de testosterona

Pesquisadores: Prof. Dr. Gil Guerra Júnior e Dra. Letícia Ribeiro de Oliveira

Seu filho está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e de seu filho como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

O teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) é feito para avaliar de forma aguda a função testicular, a fim de estabelecer a causa da ambiguidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY (masculino). O teste padronizado atualmente é feito com hCG extraído da urina de mulheres grávidas e esse medicamento não é facilmente disponível no Brasil. Desde 2011, o hCG recombinante vem sendo produzido no Brasil por técnica de engenharia genética (DNA recombinante), portanto o objetivo deste estudo será verificar se o teste agudo com hCG recombinante comprova a produção normal de testosterona em pacientes com ambiguidade genital e cariótipo 46,XY (masculino). **Procedimentos:**

Seu filho será submetido a um teste com aplicação do medicamento hCG recombinante (Ovidrel®, Merck-Serono), em dose única de 250 microgramas (6.500 UI) por via subcutânea, após coleta de 3 mL de sangue para dosagem de LH,FSH, testosterona total, androstenediona, dehidroepiandrosterona, dihidrotestosterona e inibina B. Após sete dias será feita nova coleta de sangue de 3 mL desses mesmos exames (exceto LH e FSH) e dosagem de beta-hCG.

Desconfortos e riscos:

A medicação utilizada nesse protocolo não acarreta efeitos colaterais significantes, a não ser efeitos locais relacionados à aplicação da injeção, como dor passageira de qualquer injeção, hiperemia e edema local. Além disso, os possíveis desconfortos estão relacionados às duas coletas de sangue, que serão sempre realizadas por pessoas treinadas no Hospital de Clínicas da Unicamp, podendo eventualmente causar dor passageira, além de aparecer um pequeno hematoma (mancha roxa) que pode durar de 2 a 5 dias.

Benefícios:

Os benefícios para os sujeitos de pesquisa são referentes à contribuição para o conhecimento e esclarecimento de uma hipótese a ser investigada, mais especificamente sobre um teste de estímulo a ser padronizado, cujo resultado pode ser benéfico para outros pacientes que apresentem quadros semelhantes ao do seu filho. Apesar de não haver benefício direto ao seu filho, o teste poderá comprovar novamente que a produção de andrógenos pelo testículo de seu filho está normal.

Acompanhamento e assistência:

A participação de seu filho é isenta de despesas e será mantida a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste Serviço.

Rubrica do pesquisador:_____ Rubrica do participante:_____

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que a identidade de seu filho será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, o nome do seu filho não será citado.

Ressarcimento:

O presente estudo será realizado somente durante a rotina de atendimento de consulta médica do hospital já programada para seu filho, não havendo necessidade de comparecimentos extras ao hospital. Mesmo para a coleta de sangue após o teste, está será feita em conjunto com outras coletas já programadas para seu filho.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Gil Guerra Júnior ou Letícia Ribeiro de Oliveira – Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas da Unicamp; Rua Vital Brasil, 251; Cidade Universitária “Zeferino Vaz”; Campinas (SP); CEP 13083-888; telefones: (19)3521-7353 ou (19)35217646 de segunda à sexta-feira das 8:00 às 18:00 h; ou pelo e-mail: gilguer@fcm.unicamp.br. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 13:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; email: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, autorizo meu filho a participar:

Nome do (a) responsável:

Data: ____/____/____.

(Assinatura do responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

3. **Tabela suplementar:** Dados de idade, diagnóstico e valores hormonais antes e após aplicação do hCGr de 19 casos de DDS 46,XY.

Caso	Idade (anos)	D	TT ¹ (ng/mL)		TT ² (ng/mL)		DHT ¹ (pg/mL)		DHT ² (pg/mL)		T/DHT ¹		T/DHT ²		DHEA ¹ (ng/mL)		DHEA ² (ng/mL)		Andro ¹ (ng/mL)		Andro ² (ng/mL)		BhCG (mUI/mL)
			Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	
1	13,0	IPA	1,76	7,41	1,77	6,39	129,60	219,30	240,00	510,00	13,58	33,70	7,38	12,53	2,20	2,60	2,21	4,26	0,57	0,97	0,28	0,50	11,09
2	7,8	IPA	0,07	1,38	0,08	1,54	121,30	119,30	50,00	330,00	0,57	11,60	1,60	4,67	2,10	1,38	2,09	1,55	0,65	0,50	0,33	0,12	15,37
3	9,5	IPA	0,03	1,84	0,05	1,83	99,00	141,20	50,00	350,00	0,30	13,00	1,00	5,23	1,10	1,68	0,25	1,96	0,32	0,61	0,13	0,28	13,58
4	6,8	IPA	0,03	1,14	0,05	0,90	197,00	278,70	50,00	180,00	0,15	4,10	1,00	5,00	0,54	0,48	0,26	0,56	0,91	0,96	0,08	0,05	8,57
5	2,8	IPA	0,03	2,12	0,05	1,78	20,60	198,40	50,00	100,00	1,45	10,70	1,00	17,80	0,20	0,32	0,25	0,77	0,10	0,17	0,05	0,08	22,69
6	3,8	5alfa	0,03	2,32	0,05	2,20	9,60	69,00	50,00	50,00	3,12	33,60	1,00	44,00	0,25	0,32	0,25	1,12	0,10	0,29	0,05	0,15	21,5
7	8,3	5alfa	0,03	1,11	0,05	1,90	31,70	117,00	50,00	50,00	0,94	9,50	1,00	38,00	0,47	0,82	0,25	1,47	0,10	0,28	0,05	0,40	30,83
8	1,0	5alfa	0,03	2,87	0,05	2,68	6,70	60,40	50,00	70,00	4,48	47,50	1,00	38,29	0,22	0,24	0,25	0,94	0,10	0,20	0,05	0,20	12,24
9	10,8	5alfa	0,19	7,14	0,37	6,81	79,60	289,90	100,00	660,00	2,38	24,60	3,70	10,32	1,22	1,15	0,74	2,08	0,25	0,78	0,18	0,42	25,45
10	8,3	I	0,03	0,66	0,05	0,83	ND	112,30	50,00	90,00	ND	5,90	1,00	9,22	1,46	0,84	0,41	1,61	0,39	0,31	0,18	0,18	31,28
11	4,3	I	0,85	4,14	0,89	3,62	97,90	213,40	180,00	410,00	8,68	19,40	4,94	8,83	0,54	1,19	0,74	2,08	0,32	0,69	0,07	0,21	18,14
12	1,4	I	0,03	2,02	0,05	1,89	45,60	193,00	50,00	520,00	0,65	10,50	1,00	3,63	1,14	1,42	0,41	1,61	0,29	0,58	0,05	0,13	42,52
13	8,3	I	0,03	1,91	0,05	2,05	47,60	72,90	50,00	190,00	0,63	26,20	1,00	10,79	0,96	0,87	0,74	1,01	0,22	0,23	0,12	0,11	14,91
14	9,4	I	0,03	0,11	0,07	0,18	ND	168,30	ND	ND	ND	0,65	ND	ND	2,88	3,00	1,20	1,90	1,18	1,07	0,36	0,35	4,45
15	1,3	I	0,03	2,70	0,05	3,16	15,30	86,50	50,00	400,00	1,96	31,20	1,00	7,90	0,32	0,71	0,25	2,00	0,10	0,16	0,05	0,14	25,67
16	6,4	I	0,03	0,44	0,05	0,67	20,00	42,90	50,00	110,00	1,50	10,25	1,00	6,09	0,26	0,50	0,25	0,46	0,10	0,16	0,05	0,06	29,91
17	0,8	I	0,03	5,71	0,10	3,12	43,30	127,80	50,00	1050,00	0,69	44,70	2,00	2,97	0,80	0,84	0,39	2,06	0,10	0,15	0,05	0,08	52,11
18	10,1	I	0,68	2,31	1,25	3,40	346,60	538,70	60,00	130,00	1,96	4,30	20,83	26,15	2,20	2,16	1,99	3,39	2,20	1,91	0,38	0,47	12,64
19	1,3	I	0,20	6,09	0,05	5,56	29,90	120,60	50,00	500,00	6,60	50,50	1,00	11,12	0,69	0,93	0,25	3,63	0,10	0,23	0,05	0,14	26,02

Legenda: D = diagnóstico; IPA= insensibilidade parcial a andrógenos; 5alfa= deficiência da enzima 5 alfa-redutase tipo2; I= Idiopático; TT = testosterona total; DHT = di-hidrotestosterona; DHEA = dehidroepiandrosterona; Andro = androstenediona; BhCG=beta-hCG; ¹=imunoensaio; ²=LC-MS/MS; T/DHT=relação testosterona/dihidrotestosterona; ND = não dosado.