

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SECRETARIA DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE CORTISOL POR
RADIOIMUNOENSAIO ATRAVÉS DE DOIS MÉTODOS
(EXTRAÍDO E NÃO EXTRAÍDO)

Maria Beatriz da Fonte Kohek

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
"Mestre em Tecnologia Nuclear".

Orientador: Prof. Dr. Willem Nicolau

São Paulo
1992

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

18/3/88

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE CORTISOL POR
RADIOIMUNOENSAIO ATRAVÉS DE DOIS MÉTODOS
(EXTRAÍDO E NÃO EXTRAÍDO)**

MARIA BEATRIZ DA FONTE KOHEK



Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.

Orientador: Prof.Dr. Wilian Nicolau

SÃO PAULO

1992

À minha mãe
(in memoriam)

Ao Prof. Dr. Wilian Nicolau, pela disposição em nos orientar, por seu apoio constante e por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Radioimunoensaio do Hospital das Clínicas da FMUSP.

À Prof^{ca}. Dr^a. Berenice Bilharinho de Mendonça, por seu entusiasmo e apoio constante, por seu interesse em nos formar na ciência, por sua amizade e , sobretudo pelo seu exemplo profissional e humano.

À Dr^a. Vânia Caira Borghi pelo seu apoio e disponibilidade em todas as horas.

À Dr^a. Terezinha Rockman pelo incentivo e contribuições valiosas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Roberto Rockman por sua contribuição valiosa no tratamento estatístico dos dados.

À M.Sc. Maria Gloria Peig Ginabreda, por sua atenção, disponibilidade e carinho na avaliação de nosso trabalho.

Às Dr^{as}. Maria Cândida B.Villares Fragoço e Teresa Segura pela valiosa contribuição na revisão dos prontuários dos pacientes.

Ao Dr. Elias Kirschbaum, Dr^a. Vânia Fróes e bióloga Ana Cristina Miéli, do Setor de Bioquímica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela disponibilidade em realizar as dosagens de creatinina.

Aos Srs. Cláudio Sanches e equipe da SISLAB e José Roberto Lima da LABCARE, por sua atenção e esforço no contato mantido com a Incstar Co.

Ao pessoal do Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da FMUSP pela cooperação no levantamento dos prontuários dos pacientes.

Às colegas Francineide Pereira Alves, Alexandra Tinoco e Maria Conceição Soares da recepção de material do Laboratório de Radioimunoensaio pelo cuidado e atenção quando do recebimento das amostras.

À Francinilda Pereira Oliveira pela orientação sobre as referências bibliográficas.

À Valéria Lando e Maria Angélica Xavier Oliveira pelo companheirismo e apoio durante a fase de cumprimento de créditos.

À todos os voluntários que participaram das coletas para a formação do grupo normal.

À todos os pacientes do Hospital das Clínicas, particularmente aos da Endocrinologia, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

nosso sincero agradecimento.

AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE CORTISOL POR RADIOIMUNOENSAIO ATRAVÉS DE DOIS MÉTODOS (EXTRAÍDO E NÃO EXTRAÍDO)

MARIA BEATRIZ DA FONTE KOHEK

RESUMO

O radioimunoensaio do cortisol urinário após extração com solvente orgânico (fração livre) têm sido há vários anos largamente empregado no diagnóstico do hipercortisolismo. Com o advento de antissoros mais específicos, houve possibilidade de medir o cortisol urinário sem necessidade de extração. Entretanto não encontramos na literatura trabalhos avaliando a dosagem do cortisol urinário não extraído no diagnóstico do hipercortisolismo. É nosso objetivo comparar a exequibilidade, a sensibilidade e a especificidade dos dois métodos de dosagem de cortisol urinário (extraído versus não extraído) no diagnóstico do hipercortisolismo. Utilizamos o kit GammaCoat 125 I-cortisol procedente da Clinical Assays, Incstar, USA para os dois métodos, procedendo à extração da urina com diclorometano para dosagem do cortisol extraído. Foram realizados 32 ensaios, nos quais obtivemos uma sensibilidade que variou de 0,1 a 0,47 ug/dl, com um coeficiente de variação intraensaio para valores alto e baixo de $8,29 \pm 3,38 \%$ e $8,19 \pm 4,72 \%$, respectivamente, para o cortisol urinário não extraído e de $9,72 \pm 1,94 \%$ e $9,54 \pm 4,4 \%$, respectivamente, para o cortisol urinário extraído. O coeficiente de variação interensaio foi de $15,98 \%$ para o controle alto e de $17,25 \%$ para o controle baixo no método não extraído e de $16,15 \%$ para o controle alto e $18,59 \%$ para o controle baixo no método extraído. Avaliamos

amostras basais de urina de 24 horas de 43 indivíduos normais, 53 pacientes obesos (com índice de massa corpórea > 30) e 53 pacientes com diagnóstico confirmado de síndrome de Cushing. Os valores obtidos de cortisol urinário não extraído para o grupo de indivíduos normais foram de $102,01 \pm 48,32$ ug/24h , nos obesos foram de $83,87 \pm 33,38$ ug/24 h e nos pacientes com síndrome de Cushing foram de $892,44 \pm 933,84$ ug/24h, respectivamente. Os valores obtidos de cortisol urinário extraído para o grupo de indivíduos normais foram de $48,51 \pm 19,44$ ug/24h, nos obesos foram de $36,23 \pm 17,32$ ug/24h e nos pacientes com síndrome de Cushing foram de $444,28 \pm 479,23$ ug/24h, respectivamente. Obtivemos uma diferença estatisticamente significativa dos níveis de cortisol urinário no grupo de pacientes com síndrome de Cushing em relação aos normais e aos obesos em ambos os métodos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores do grupo de normais e obesos em nenhum dos métodos ($p > 0,05$). A relação cortisol urinário extraído/cortisol urinário não extraído foi semelhante nos três grupos ($p > 0,05$). A sensibilidade diagnóstica dos métodos foi semelhante (100 % e 98,1 %, respectivamente, para o método não extraído e extraído) e a especificidade foi igual em ambos os métodos (100 %). Observamos uma correlação positiva e significativa entre os dois métodos em todos os grupos estudados ($p < 0,05$). Concluímos que os dois métodos são eficientes para a investigação do hipercortisolismo, e pela facilidade de execução e custo mais baixo, sugerimos que a dosagem do cortisol urinário não extraído deva ser o método de primeira escolha no diagnóstico da síndrome de Cushing.

EVALUATION OF URINARY CORTISOL EXCRETION BY RADIOIMMUNOASSAY THROUGH TWO METHODS (EXTRACTED AND NON-EXTRACTED)

MARIA BEATRIZ DA FONTE KOHEK

ABSTRACT

The radioimmunoassay of urinary cortisol extracted by organic solvent (free cortisol) has been used for a long time in the hypercortisolism diagnosis. With the development of more specific antisera it became possible to measure urinary cortisol without extracting it. However, we didn't find any literature about this method in the diagnosis of hypercortisolism. Our objective is to compare the feasibility, sensitivity and specificity of both methods (extracted versus non-extracted) in the hypercortisolism diagnosis. We used GammaCoat ¹²⁵I - cortisol kit provided by Clinical Assays, Incstar, USA, for both methods extracting it with methylene chloride in order to measure the extracted cortisol. We performed 32 assays from which we obtained from 0.1 to 0.47 ug/dl of sensitivity. The intra-run precision varied from 8.29 ± 3.38 % and 8.19 ± 4.72 % for high and low levels, respectively, for non-extracted cortisol, and 9.72 ± 1.94 % and 9.54 ± 4.4 % for high and low levels, respectively, for extracted cortisol. The inter-run precision was 15.98 % and 16.15 % for high level of non-extracted and extracted cortisol, respectively. For the low level, we obtained 17.25 % and 18.59 % for non-extracted and extracted cortisol, respectively. We evaluated 24-hour urine basal

samples from 43 normal subjects, and 53 obese (body mass index > 30) and 53 Cushing's syndrome patients. In the group of normal subjects we obtained values of 102.01 ± 48.32 ug/24 h for non-extracted and 48.51 ± 19.44 ug/24 h for extracted cortisol. In the group of obese patients we obtained values of 83.87 ± 33.38 ug/24 h for non-extracted and 36.23 ± 17.32 ug/24 h for extracted cortisol. In the group of Cushing's syndrome patients we obtained values of 892.44 ± 933.84 ug/24 h for non-extracted and 444.28 ± 479.23 ug/24 h for extracted cortisol. The difference we obtained in both methods for the group of patients with Cushing's syndrome in relation to the normal subjects and obese patients was statistically significant ($p < 0.05$). The group of normal subjects and the group of obese patients were not statistically different in any of the methods ($p > 0.05$). The ratio extracted urinary cortisol/ non-extracted urinary cortisol was alike in the three groups ($p > 0.05$). The sensitivity of the methods were similar (100 % and 98,1 %, for non-extracted and extracted methods, respectively). A positive correlation between the two methods was noticed in all groups we studied ($p < 0.05$). We conclude that both methods are efficient for the investigation of hypercortisolism. However, we suggest that non-extracted urinary cortisol measurement should be the method of choice since it's an easy-to-perform and affordable method to diagnose Cushing's syndrome.

ABREVIATURAS

CBG	- Globulina transportadora de cortisol
THF	- Tetraidrocortisol
17-OHCS	- 17-hidroxicorticosteróides
DIDA	- ensaio derivado com duplo isótopo
RTA	- ensaio de ligação competitiva com proteínas nativas
HPLC	- cromatografia líquida de alta pressão
GCMS	- cromatografia gasosa/espectrometria de massa
FNE	- cortisol urinário não extraído
FE	- cortisol urinário extraído
kg	- quilos
m	- metros
IMC	- índice de massa corporal
h	- horas
ml	- mililitros (10^{-3} litros)
g	- gramas
^{125}I	- iodo radioativo
mm	- milímetros (10^{-3} metros)
ug	- microgramas (10^{-6} gramas)
L	- litros
dl	- decilitros (10^{-1} litros)
ul	- microlitros (10^{-6} litros)
min	- minutos
D.M.D.	- dose mínima detectável
cpm	- contagens por minuto

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1. Casuística	9
2.2. Materiais	11
2.2.1. Materiais permanentes	11
2.2.2. Reagentes	11
2.3. Métodos	12
2.3.1. Dosagem do cortisol urinário extraído (FE)	12
2.3.1.1. Extração das amostras	14
2.3.1.2. Radioimunoensaio de cortisol	15
2.3.2. Dosagem do cortisol urinário não extraído (FNE)	15
2.4. Cálculos	16
2.4.1. Cálculo do radioimunoensaio	16
2.4.2. Cálculo do cortisol urinário não extraído (FNE)	16
2.4.3. Cálculo do cortisol urinário extraído (FE)	17
2.5. Comparação do procedimento técnico	17
2.6. Sensibilidade, reprodutibilidade e precisão dos métodos	18
2.7. Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos	18
2.8. Análise estatística	19

3.RESULTADOS	
3.1.Dados clínicos	20
3.2.Comparação do procedimento técnico e critérios de confiabilidade do ensaio	20
3.3.Valores de cortisol urinário extraído e não extraído em indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing	22
3.4.Relação FE/FNE % nos grupos de indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing	25
3.5.Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos	29
4.DISSCUSSÃO	31
5.CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. Introdução

O cortisol é um hormônio esteróide com ação glicocorticóide, sintetizado na zona fasciculada do córtex da supra-renal pela via 17-hidroxilada, a partir do colesterol (25,32).

Sua biossíntese envolve uma série de reações catalizadas pelas enzimas do complexo P-450 (20,22-desmolase, 21-hidroxilase e 17- α -hidroxilase) e pela 3- β -hidroxi-esteróide desidrogenase e 11- β -hidroxilase, sob controle do ACTH(Figura 1).

Uma vez secretado o cortisol liga-se à globulina transportadora de cortisol (CBG ou transcortina), uma α -globulina produzida no fígado que possui alta afinidade pelo cortisol. Em circunstâncias normais aproximadamente 80 % do cortisol plasmático total está fortemente ligado à CBG, 15 % fracamente ligado à albumina e 5 a 10 % circula na forma livre(8). A fração livre do cortisol move-se para o interior das células para exercer seus efeitos metabólicos. Desta maneira, a CBG funciona como um reservatório circulante de cortisol que mantém os níveis estáveis e constantes independentemente das variações fisiológicas no ritmo de secreção. Em condições fisiológicas, todos os sítios da CBG que se ligam ao cortisol estão ocupados. Ocorrendo algum estímulo que eleve a secreção de cortisol, a capacidade de ligação da CBG é saturada e observa-se um aumento na fração livre do cortisol circulante. Da mesma forma, qualquer alteração na concentração da CBG também causa uma mudança na distribuição plasmática de cortisol. Assim, o aumento na concentração da CBG resulta no aumento percentual de cortisol que se liga à ela, diminuindo a fração ligada à albumina e a fração livre. Os níveis de CBG estão aumentados durante a gravidez aproximadamente 2 a 3 vezes. Assim, apesar dos níveis de cortisol plasmático total estarem aumentados nesta situação, a concentração de cortisol na forma

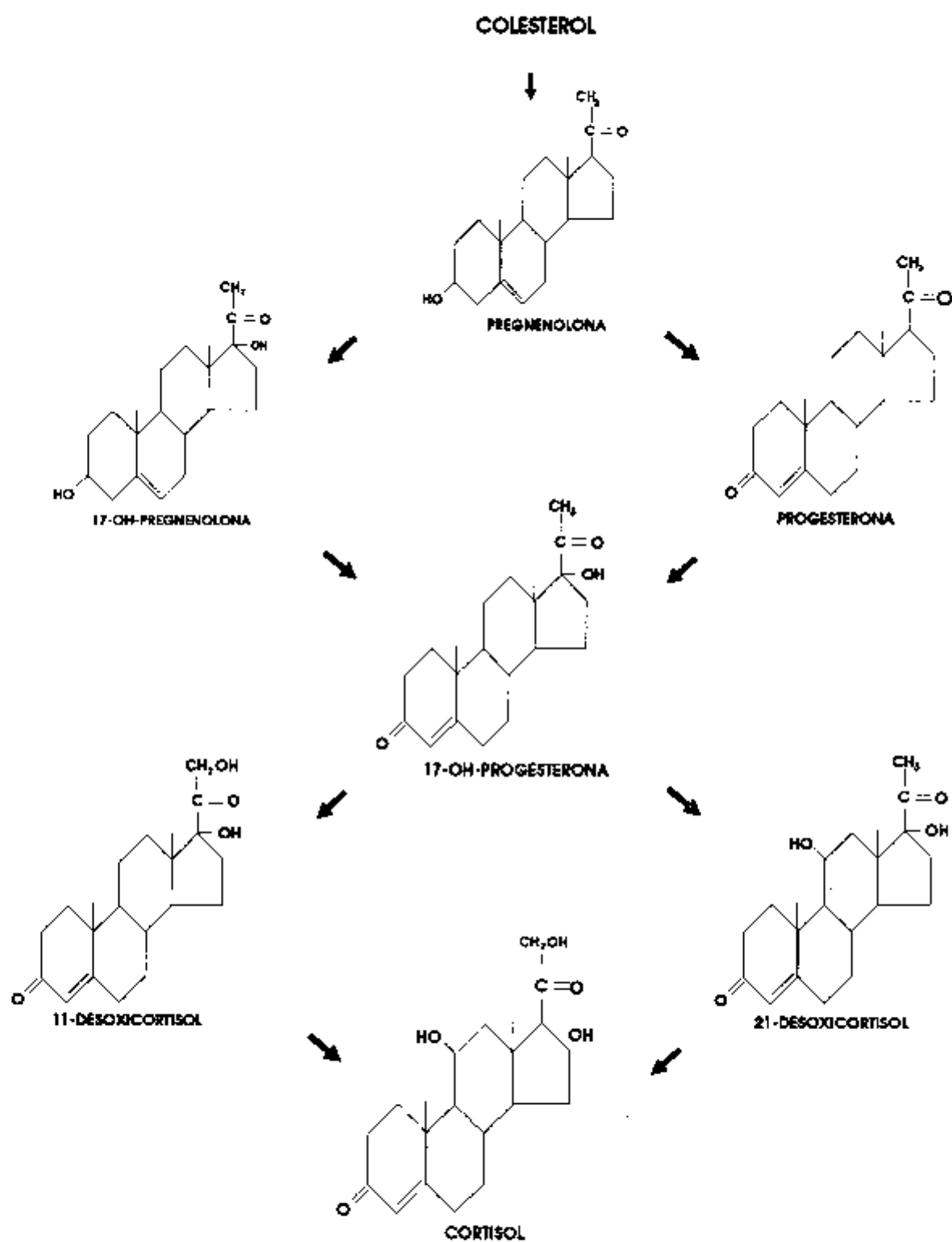


Fig. 1 - Biossíntese do Cortisol

livre é essencialmente semelhante à da mulher normal devido ao aumento de cortisol ligado à CBG, presente em maior concentração(13). Na síndrome de Cushing, a hipersecreção de cortisol satura a capacidade de ligação da CBG, com conseqüente elevação da fração livre(8,22). Como esta fração é excretada pelos rins, os pacientes com síndrome de Cushing possuem níveis distintamente acima do normal. A ligação às proteínas plasmáticas limita a filtração glomerular à fração livre. Assim, apenas uma pequena fração de cortisol não metabolizada é excretada na urina na forma nativa não conjugada e está diretamente relacionada à fração livre do plasma biologicamente ativa(5).

O fígado é o sítio primário de metabolização e inativação dos esteróides adrenocorticais. O primeiro passo da inativação do cortisol é a redução no anel A transformando-o em diidro-cortisol seguido de nova redução no carbono-3 resultando em tetraidro-cortisol (THF) que se conjuga ao ácido glicurônico formando glicuronidato de THF. Uma redução adicional pode ocorrer no carbono-20 produzindo o cortol que sofre conjugação com o ácido glicurônico e é excretado na urina (25)(Figura 2). Estes compostos formam uma fração expressiva e constante dos metabólitos de cortisol e podem ser dosados coletivamente como 17-hidroxicorticosteróides (17-OHCS) pela reação de Porter-Silber(43). A dosagem dos cromógenos de Porter-Silber têm sido utilizada na avaliação da função adrenal(8,18,22,30,34,35,40,52), porém a maior limitação desta dosagem é a falta de especificidade dos ensaios e os valores aumentados encontrados em situações comuns como na obesidade(8,14,18,30,34,35,40,52). Na conversão hepática do cortisol aos seus diidro- e tetraidro-metabólitos o primeiro passo é dependente de um sistema enzimático, Δ^4 -dehidrogenase. A atividade deste sistema enzimático pode ser alterada por patologias do fígado, tais como cirrose, hepatite, etc, e levar a um aumento ou diminuição do metabolismo do cortisol plasmático(5). Outra via metabólica menos importante é a

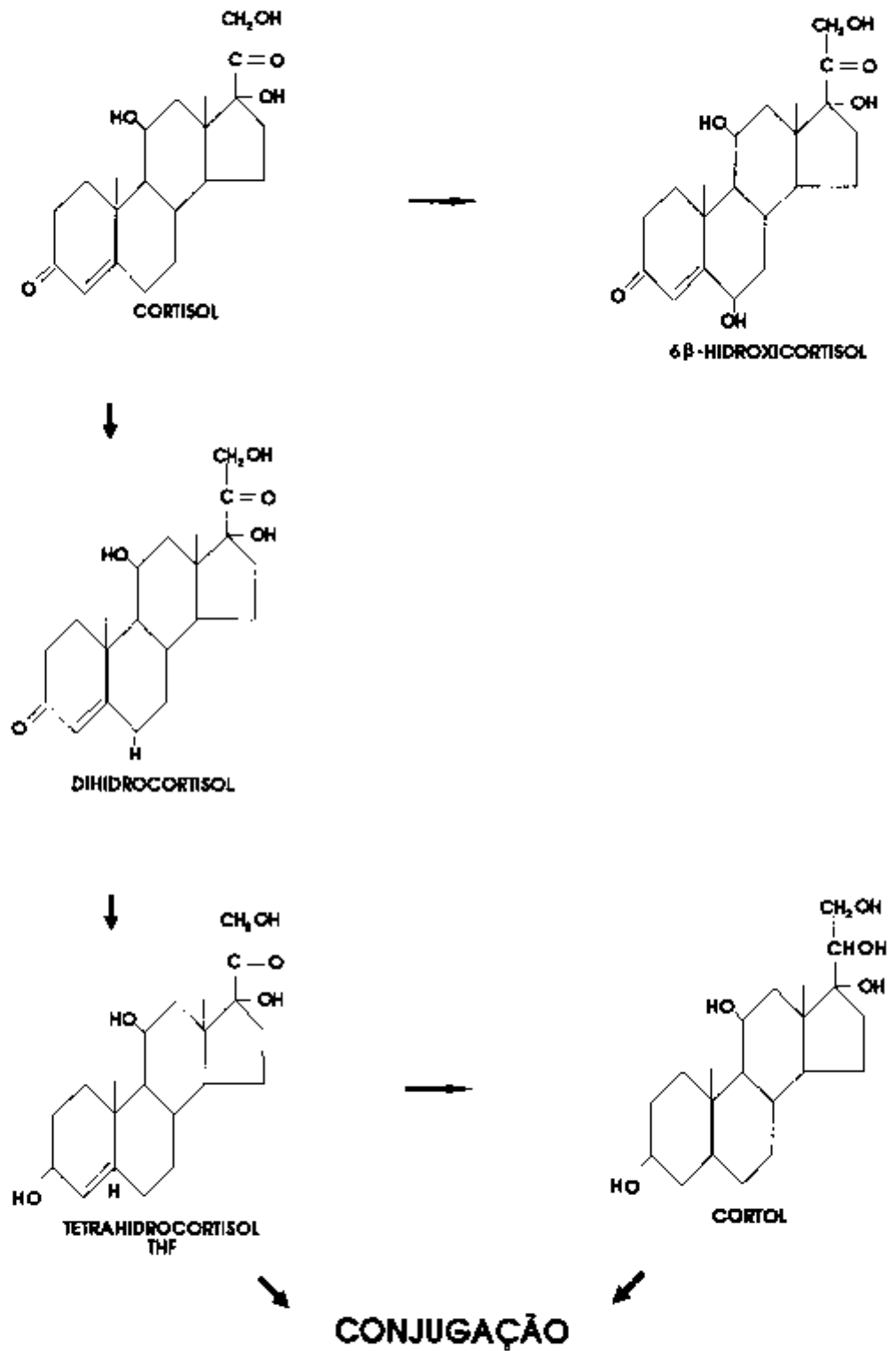


Fig. 2 - Metabolismo do Cortisol

hidroxilação do cortisol no carbono-6 produzindo 6- β -hidroxicortisol, composto que não é reduzido no anel A, mas é excretado na urina na forma não conjugada(25). O 6- β -hidroxicortisol é o principal corticosteróide não conjugado presente na urina e foi proposto como um indicador da produção excessiva de cortisol(27,55,57). Contudo, o ensaio direto para este composto não teve aceitação porque sua excreção urinária aumenta durante o tratamento com diversos compostos (fenobarbital, difenilhidantoína, fenilbutazona, etc.) não correspondente ao aumento da secreção de cortisol(25). Assim, os metabólitos do cortisol excretados na urina como glicuronidatos são: o THF (5β e α) e o cortol, e na forma livre (não conjugada) temos o cortisol (fração livre) e o 6- β -hidroxicortisol.

O termo "cortisol livre" tem ampla utilização para designar tanto a forma livre plasmática, não ligada a proteína, como seu metabólito urinário não conjugado(5,8). No presente trabalho optamos pelo termo "cortisol urinário extraído"para designar a fração de cortisol excretada na urina na forma não conjugada, enquanto que o termo "cortisol urinário não extraído" refere-se aos produtos do metabolismo do cortisol que podem ou não se apresentar na forma conjugada juntamente com o cortisol não conjugado.

A dosagem do cortisol urinário livre (não conjugado) foi proposta como teste para avaliação da função supra-renal por COPE e HURLOCK (10),em 1954. Existem várias razões teóricas que definem a dosagem do cortisol urinário livre como um método útil no diagnóstico do hipercortisolismo(8). De fato esta medida se correlaciona bem com a quantidade de cortisol plasmático livre. Posteriormente sua utilidade clínica foi reconhecida por COPE e BLACK (1960)(11), que empregaram um ensaio derivado com duplo isótopo (DIDA), método de grande dificuldade técnica porém largamente aceito como preciso. A partir desta época, muitos métodos de variada complexidade foram aplicados na tentativa de

viabilizar a medida do cortisol urinário livre(3,16,19,24,33,42,44,46,47). Todos concluem que a dosagem é um teste útil para o diagnóstico da síndrome de Cushing, no entanto é impossível avaliar qual dos métodos reflete a verdadeira excreção do cortisol(8). Com o surgimento dos ensaios de ligação competitiva com proteínas nativas (RTA) a determinação urinária dos corticóides tornou-se mais prática, eliminando a complexidade dos sistemas anteriores(4,36). A quantificação e identificação dos metabólitos urinários do cortisol pode ser realizada por métodos cromatográficos geralmente dispendiosos e lentos e atualmente através da cromatografia de alta pressão (HPLC) (23,50) ou da cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GCMS) (31,46,56,58), que requerem equipamentos especiais nem sempre disponíveis no laboratório clínico. RUDER e colaboradores (1972) (48) consideraram necessária a cromatografia prévia da urina de forma a obter valores tão baixos quanto àqueles obtidos usando CBG sem cromatografia (RTA). No entanto, não investigaram a natureza dos interferentes e concluíram que seus valores elevados eram causados por substâncias não esteróides. CHATORRAJ e colaboradores (1976) (9) utilizando radioimunoensaio e RTA obtiveram valores consideravelmente baixos para o cortisol urinário livre após cromatografia em diversos sistemas. Este estudo sugere que os valores geralmente aceitos de média e intervalo normal possuem um erro grosseiro, fato confirmado por MURPHY e col (1981) (39). No entanto, os métodos que definiram e preconizam a dosagem do cortisol urinário livre foram descritos quando a especificidade dos antissoros disponíveis era menor e por isso exigiam preparação da amostra para diminuir ou eliminar a reação cruzada com substâncias relacionadas.

Com o desenvolvimento do radioimunoensaio(6) utilizando antissoros específicos e antígenos radioiodados, a dosagem do cortisol livre na urina teve grande aplicação clínica. Entretanto, a maioria dos métodos de dosagem de

cortisol urinário livre por radioimunoensaio envolve a extração com um solvente orgânico para eliminar compostos interferentes(2,9,21,48,53). A dosagem direta, isto é, sem extração ou purificação prévia do cortisol urinário utilizando antissoros altamente específicos, não é um método rotineiramente empregado no diagnóstico da síndrome de Cushing. Contudo, em estudos preliminares(29), observamos uma correlação positiva entre os valores de cortisol urinário extraído ou livre e não extraído, sugerindo que este método possa ser útil no diagnóstico da síndrome de Cushing, considerando a facilidade de execução e o menor custo. Desta forma propomos determinar, através de um radioimunoensaio comercialmente disponível em nosso meio, os valores de cortisol urinário extraído ou livre e não extraído em um grupo de indivíduos normais, obesos e em pacientes com síndrome de Cushing.

Objetivos

1. Determinar os níveis de cortisol urinário extraído (livre) e não extraído em indivíduos normais.
2. Determinar e analisar os valores de FNE e FE em indivíduos obesos e pacientes com síndrome de Cushing.
3. Comparar o procedimento técnico dos dois métodos.
4. Analisar a especificidade e sensibilidade diagnóstica dos métodos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Casuística

Avaliamos amostras urinárias basais de 24 horas de três grupos classificados da seguinte forma (Tabela 1):

GRUPO 1 - constituído por 43 indivíduos normais, 32 mulheres e 11 homens, com idade de $35,2 \pm 10,9$ anos, com peso de $65,73 \pm 11,1$ kg, altura de $1,64 \pm 0,09$ m, e índice de massa corporal (IMC) de $24,56 \pm 3,34$ kg/m².

GRUPO 2 - constituído por 53 indivíduos obesos, 47 mulheres e 6 homens, com idade de $38,6 \pm 12,6$ anos, peso de $91,77 \pm 14,45$ kg, altura de $1,57 \pm 0,08$ m e IMC de $36,96 \pm 4,75$ kg/m².

GRUPO 3 - constituído por 53 pacientes com síndrome de Cushing, 44 mulheres e 9 homens, com idade de $32,4 \pm 10,4$ anos, peso de $70,38 \pm 12,78$ kg, altura de $1,57 \pm 0,09$ m, e IMC $28,52 \pm 4,23$ kg/m², com diagnóstico confirmado por exame anátomo-patológico, onde 35 tinham como etiologia Doença de Cushing, 11 tumor primário de supra-renal e 6 tumores com secreção ectópica de ACTH (3 carcinóide de timo, 1 feocromocitoma, 1 carcinóide de brônquios e 1 carcinoma de pâncreas), estudados no Hospital das Clínicas, na Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP. Deste grupo foram coletadas 2 amostras basais de 28 pacientes, as quais foram avaliadas na análise estatística segundo a média dos valores obtidos.

Os pacientes foram orientados a desprezar a primeira diurese e colher toda a restante por 24 h, inclusive a primeira da manhã seguinte, mantendo a urina em geladeira, sem conservantes.

No laboratório, a urina foi homogeneizada e medida em proveta. A estocagem foi feita em alíquotas de 10 ml em tubos de vidro contendo 1 g de

Grupos	n	IC (anos)	Sexo		Peso (kg)	Altura (m)	IMC kg/m ²
			M	F			
Normais	43	35,2 ±	11	32	65,73 ±	1,64 ±	24,56 ±
Obesos	53	38,6 ±	6	47	91,77 ±	1,57 ±	36,96 ±
Síndrome Cushing	53	32,4 ±	9	44	70,38 ±	1,57 ±	28,52 ±
		10,4					

Tabela 1 - Dados clínicos dos indivíduos estudados nos três grupos

ácido bórico e mantidas a -20° até o momento das dosagens. Uma alíquota de cada urina foi enviada para a determinação da creatinúria.

2.2. Materiais

2.2.1. Materiais permanentes

- Banho-maria, $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, modelo 169, marca Fabbe, Brasil
- Banho de gelo
- Tubos de vidro, 15 x 120 mm
- Rolhas de borracha n.º 4
- Agitador de tubos, marca Ética, Brasil
- Pipetas automáticas para volumes fixos de 10 ul e 1000 ul, marca Petcelm, Celm, Brasil
- Pipetas automáticas para volumes fixos de 100 ul e 200 ul, marca MLA, USA
- Repipetador semi-automático com ponteiras para os volumes de 10 ul e 1000 ul, marca Eppendorf, West Germany
- Ponteiras plásticas para pipetas automáticas
- Contador γ , LKB - Wallac Minigamma 1275, marca Wallac - Oy, Turku, Finland

2.2.2. Reagentes

- Diclorometano p.a., marca Merck
- Água destilada para diluição das amostras, quando necessário
- Kit de radioimunoensaio para determinação de cortisol, marca GammaCoat ^{125}I -cortisol, procedente de Clinical Assays, Incstar, Cambridge, MA, USA

2.3.Métodos

A creatinina urinária foi dosada no Laboratório de Bioquímica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP por um método automatizado (VP-Abbott) de acordo com JAFFÉ modificado, que utiliza o ácido pícrico como reativo.

O kit de radioimunoensaio utilizado neste trabalho emprega o traçador marcado com ^{125}I e o método da fase sólida para separação da fração ligada, dispensando a centrifugação. O antissoro foi produzido em coelho contra o antígeno Prednisolona-3-carboximetil-oxima acoplado à BSA e reveste os tubos plásticos (12 x 75 mm) numa concentração da ordem de 1 $\mu\text{g}/\text{tubo}$. A constante de afinidade calculada para este antissoro é de aproximadamente $2 \times 10^8 \text{ L/mol}$. A especificidade do antissoro , fornecida pelo fabricante, se encontra na Tabela 2.

2.3.1.Dosagem do cortisol urinário extraído (FE)

A dosagem do cortisol urinário extraído envolve duas etapas. A primeira etapa consiste na extração do cortisol da fase aquosa para a fase orgânica por agitação com diclorometano. Neste processo é necessário controlar a eficiência da extração para que se possa corrigir o valor obtido na dosagem. Isto é feito por meio da adição de uma quantidade conhecida de cortisol à urina antes da mesma ser submetida à extração. A segunda etapa consiste no radioimunoensaio propriamente dito do extrato da amostra. Os valores de cortisol obtidos que ultrapassaram o ponto máximo da curva padrão (60 $\mu\text{g}/\text{dl}$) foram repetidos em outro ensaio após diluição prévia da urina (1/10) com água destilada antes da extração.

Tabela 2 - Especificidade do antissoro, expressa como a razão da concentração de cortisol pela concentração da substância necessária para o deslocamento de 50% do marcado.

Composto	Reação Cruzada (%)
Cortisol	100
Prednisolona	77
6-Metilprednisolona	43
11-Deoxicortisol	6.3
17-Hidroxiprogesterona	1.2
Corticosterona	<0.4
Dexametasona	0.2
Prednisona	0.2
Deoxicorticosterona	0.1
Tetraidro cortisona (THE)	0.1
Aldosterona	<0.1
β -Cortol	<0.1
β -Cortolona	<0.1
Cortisona	<0.1
Dihidro cortisona	<0.1
Progesterona	<0.1
Espironolactona	<0.1
Tetraidro cortisol (THE)	<0.1
6- β -Hidro cortisona	<0.1

2.3.1.1-Extração das amostras

- Preparar um banho de gelo de tamanho suficiente para acomodar a estante com tubos de vidro para extração e um becker contendo diclorometano em volume adequado para o numero de amostras a serem extraidas.
- Para a determinação da eficiência da extração identificar dois tubos de vidro 15 x 120 mm por amostra mais a letra A, para a amostra e a letra E para o tubo da eficiência.
- Adicionar 200 ul de amostra de urina , previamente homogeneizada, a cada tubo A e E.
- Aos tubos E sómente, adicionar 10 ul de padrão de cortisol 60 ug/dl.
- Misturar rapidamente com o auxílio de um agitador de tubos.
- Acrescentar 1000 ul de diclorometano gelado a cada tubo A e E e extrair por 1 min. , com agitação, para transferir o cortisol para a camada orgânica .Para facilitar a pipetagem do diclorometano, lavar as ponteiras 3 ou 4 vezes com o solvente gelado antes de transferi-lo para os tubos.
- Fechar os tubos com rolha de borracha e manter em banho de gelo a fim de evitar a evaporação excessiva do diclorometano.
- Marcar os tubos do radioimunoensaio, fornecidos no kit de dosagem, em duplicata, para cada tubo A e E, enquanto se aguarda a completa separação das fases.
- Após a separação das fases remover , com cuidado, 100 ul da camada orgânica (inferior) de cada tubo e transferir para os respectivos tubos de radioimunoensaio.
- Evaporar o diclorometano, em capela.

-Após a evaporação do diclorometano adicionar aos tubos 10 ul de padrão de cortisol 0 ug/dl, a fim de assegurar que as amostras contenham o mesmo volume de incubação da curva padrão.

-Proceder ao radioimunoensaio propriamente dito.

2.3.1.2. Radioimunoensaio de cortisol

-Numerar tubos de radioimunoensaio em duplicata para a curva padrão (0 - 1 - 3 - 10 - 25 - 60 ug/dl) , amostras , controles (alto e baixo) e tubos sem antissoro para determinar a ligação inespecífica (NSB).

-Pipetar 10 ul dos padrões, controles e padrão 0 ug/dl aos respectivos tubos.

-Aos tubos das amostras, padrões, controles e NSB, adicionar 1000 ul de 125 I-cortisol, misturar e incubar por 45 min. a 37 ± 2 °C , em banho-maria.

-Decantar os tubos e deixar em posição invertida por aproximadamente 30 min. sobre papel absorvente.

-Proceder à radiometria em contador γ , com janela ajustada para 125 I, por 1 min.

2.3.2. Dosagem do cortisol urinário não extraído (FNE)

Dosamos o cortisol urinário não extraído diretamente em 10 ul de urina após homogeneização. O procedimento não requer nenhuma preparação prévia da amostra e é essencialmente o mesmo descrito em 2.3.1.2., com exceção da adição de 10 ul de padrão 0 ug/dl aos tubos das amostras que na dosagem direta não é necessária. Os valores obtidos que ultrapassaram o ponto máximo da curva padrão também foram previamente diluídos (1/10) com água destilada e repetidos em outro ensaio.

2.4. Cálculos

2.4.1. Cálculo do Radioimunoensaio

Após a determinação da radioatividade das frações ligadas (em cpm) em contador γ , foram calculadas as razões entre as contagens específicas de cada padrão, controles e amostras e as contagens específicas obtidas para o padrão 0 ug/dl (B_0), descontando-se a ligação inespecífica (NSB). O contador γ utilizado possui um programa de computação que executa as operações de cálculo(45), fornecendo os valores da curva padrão transferidos para um gráfico tendo na ordenada a relação B/B_0 expressa em % e na abcissa as concentrações dos padrões. Posteriormente, ele fornece as concentrações e os coeficientes de variação calculado entre as duplicatas para cada amostra. As duplicatas que apresentaram um coeficiente de variação maior que 10 % foram desprezadas e repetidas em outro ensaio.

2.4.2. Cálculo do cortisol urinário não extraído (FNE)

O valor de cortisol urinário é convertido de ug/dl (fornecido com base na curva padrão) para ug/24h (corrigido pelo volume total de 24 horas), através da seguinte fórmula:

$$FNE = \frac{A \times V}{100}$$

onde:

A = concentração de cortisol em ug/dl , obtida na curva padrão ;

V = volume total de urina nas 24 h;

100 = fator de conversão.

2.4.3. Cálculo do cortisol urinário extraído (FE)

Para converter o cortisol urinário extraído das amostras de ug/dl (obtido na curva padrão) para ug/24 h (corrigido pelo volume total de urina de 24 h), utilizamos a seguinte equação:

$$FE = \frac{A \times V}{33,3(E-A)}$$

onde :

A = concentração de cortisol urinário em ug/dl , obtida na curva padrão;

V = volume total de urina nas 24 h;

E = concentração da eficiência de extração da amostra correspondente em ug/dl;

33,3 = fator de correção da diluição da amostra.

Para o cálculo da eficiência do procedimento da extração da urina utilizou-se a seguinte fórmula :

$$E = \frac{E - A}{6,0} \times 100$$

onde:

A = concentração de cortisol em ug/dl;

E = concentração da eficiência da extração para a amostra correspondente em ug/dl;

6,0 = diferença esperada entre as concentrações dos tubos A e E em ug/dl;

100 = fator de conversão

2.5. Comparação do procedimento técnico

Avaliamos a facilidade e o tempo utilizado na execução dos dois ensaios. Calculamos o rendimento como número de amostras que podem ser dosadas em um kit de 100 determinações e o custo por amostra (em dólar).

2.6. Sensibilidade, reprodutibilidade e precisão dos métodos

A confiabilidade de um ensaio depende de sua sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão(1).

A sensibilidade da curva padrão é definida como a menor dose detectável (D.M.D.) estatisticamente diferente do padrão zero de concentração a 95 % de limite de confiança, e foi avaliada pela dosagem de 6 padrões zero em duplicata em cada ensaio.

A reprodutibilidade dos ensaios (ou exatidão) foi avaliada pela dosagem de 4 amostras em duplicata em ensaios diferentes, observando o coeficiente de variação apresentado pelas mesmas. Separamos 2 amostras do grupo controle (Grupo 1) e 2 amostras do grupo de pacientes com síndrome de Cushing (Grupo 3) com o objetivo de observar a reprodução interensaios de valores médios e altos, submetidos ao processo normal de extração e radioensaio (FE e FNE), respectivamente.

A precisão dos ensaios foi avaliada pelo coeficiente de variação intra e interensaio apresentado pela dosagem de controles (soro) alto e baixo em duplicata. Dosamos 3 amostras de controle de cada nível em duplicata em cada ensaio.

2.7. Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos

Sensibilidade diagnóstica de uma metodologia é definida como a habilidade do método na detecção de uma patologia. É calculada através da relação entre os valores positivos no ensaio (valores acima dos valores normais do método) e positivos verdadeiros (valores de pacientes com diagnóstico confirmado de síndrome de Cushing)(17,49).

Especificidade diagnóstica de uma metodologia é definida como a habilidade que o método possui em diferenciar de outras patologias. É calculado através da relação entre valores negativos no ensaio (valores nos níveis normais) e negativos verdadeiros(17,49).

2.8.Análise Estatística

Na interpretação dos resultados entre os três grupos estudados utilizamos a análise de variância por ser o método mais indicado na comparação de mais de duas médias. Quando a diferença entre as médias dos tratamentos foi declarada significativa pelo F-teste utilizamos o teste de Bonferroni para determinar quais tratamentos diferiam entre si. Em todos os testes foi considerado um $\alpha = 5 \%$.

A relação entre as dosagens de FNE e FE nos três grupos foi estudada através da medida do coeficiente de correlação, designado por r . Simbolicamente as relações foram expressas por uma equação de regressão e graficamente por uma curva de regressão.

3. Resultados

3.1. Dados Clínicos

A Tabela 1 apresenta os dados referentes aos indivíduos pertencentes aos três grupos estudados segundo a idade cronológica, sexo, peso, altura e índice de massa corporal (IMC), considerando média \pm 1 DP.

3.2. Comparação do procedimento técnico e critérios de confiabilidade do ensaio

Realizamos um total de 32 ensaios (FNE e FE) nos quais obtivemos os seguintes resultados:

Avaliamos os métodos em relação ao tempo e facilidade de execução, rendimento por kit de 100 determinações, e custo estimado. (Tabela 3)

Observamos que quanto ao procedimento técnico a metodologia não extraída apresentou melhores resultados em termos de facilidade de execução, por não haver necessidade de nenhuma preparação prévia da amostra a ser ensaiada e por ter consumido menos tempo para sua realização. Além disso mostrou ser o método de menor custo, pois não necessita de material extra (diclorometano, padrões 0 ug/dl adicionais), e utilizando duplicatas das amostras teve o maior rendimento por kit de 100 determinações (42 % do kit é utilizado para amostras).

A sensibilidade dos ensaios (D.M.D.) variou de 0,1 a 0,47 ug/dl.

A precisão dos ensaios resultou num coeficiente de variação intraensaio para valores alto e baixo de $8,29 \pm 3,38$ % e $8,19 \pm 4,72$ %, respectivamente, para o FNE e num coeficiente de variação intraensaio para valores alto e baixo de

	FNE	FE
Tempo de Execução (h)	3	5
Nº de tubos necessários/amostra	2	4
Material extra	-	Diclorometano Padrão 0 ug/dl
Rendimento po kit (100 determinações)	42%	20%
Custo estimado por amostra	US\$ 1,50	US\$ 3,00

Tabela 3 - Comparação do procedimento técnico e custo para 100 determinações

9,72 ± 1,94 % e 9,54 ± 4,4 %, respectivamente, para o FE. A precisão interensaio foi de 15,98 % para o controle alto e de 17,25 % para o controle baixo no FNE e de 16,15 % para o controle alto e 18,59 % para o controle baixo no FE .

A reprodutibilidade das amostras foi avaliada pela dosagem de 4 amostras em diferentes ensaios, nas quais obtivemos um coeficiente de variação de 7,6 % para o FNE e de 19,0 % para o FE.

A eficiência do procedimento de extração foi de 95,4 ± 21%.

3.3. Valores de cortisol urinário extraído e não extraído em indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing (Tabela 4 e Gráfico 1)

Os valores de creatinina urinária não foram utilizados para expressar os resultados em g creatinina/24 h pois esta não se mostrou como um bom índice de confiabilidade da coleta. Obtivemos um índice de 46 % dos valores de creatinúria do grupo normal fora dos limites normais (0,76 a 2,35 g/volume urinário). Outros autores referem o mesmo resultado (7,15,26,41). Portanto os valores de FNE e FE foram expressos em ug de cortisol /24 h .

Analizamos os resultados de FNE e FE do grupo normal através de um teste-t em relação aos sexos, e após verificarmos que os valores de ambas as dosagens no sexo masculino e feminino não diferiam entre si ($p > 0,05$) agrupamos os resultados(2).

Apresentamos os valores de cortisol urinário não extraído (FNE), extraído (FE) e da relação FE/FNE % nos três grupos estudados, expressos em média ± 1 desvio padrão e pelo intervalo de valores absolutos.

Estabelecemos como valor normal das duas dosagens a média ± 3 desvios padrão do grupo controle, de forma a obter 99% do limite de confiança e assim abranger todos os resultados do grupo normal.

Tabela 4 - Valores de FNE, FE e da relação FE/FNE (%)

	NORMAIS	OBESOS	SINDROME DE CUSHING
n	43	53	53
FNE	102,01 ± 48,32* (34,0 - 215,6)**	83,87 ± 33,38 (35,0 - 150,0)	892,44 ± 933,84 (265,5 - 5933,9)
FE	48,51 ± 19,44 (14,0 - 90,4)	36,23 ± 17,32 (10,9 - 82,4)	444,28 ± 479,23 (99,2 - 2599,7)
%FE FNE	50,43 ± 12,89 (27,2 - 75,5)	43,96 ± 12,85 (18,1 - 73,6)	50,50 ± 18,07 (12,0 - 96,8)

*média ± 1 desvio padrao

**variação

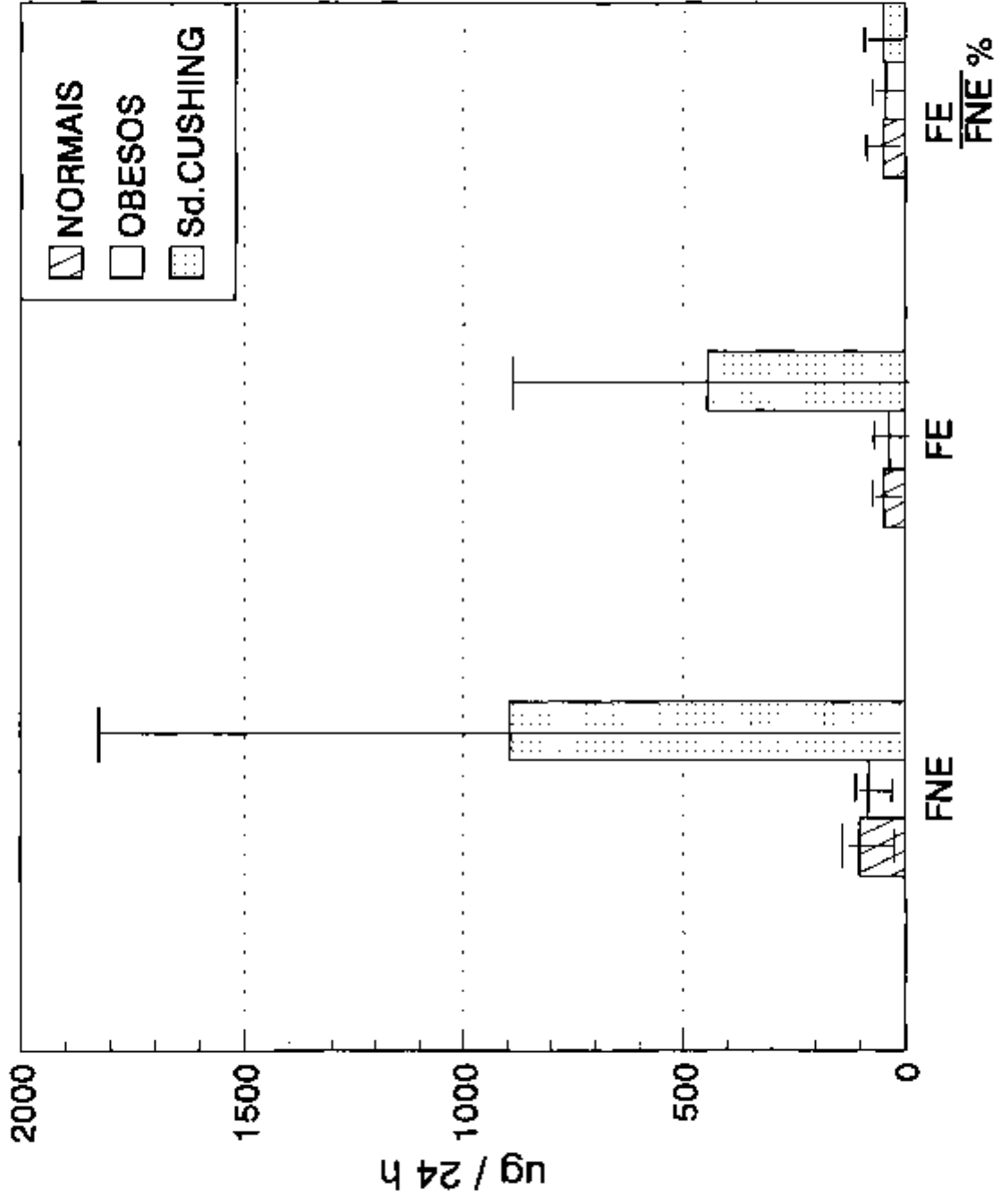


Gráfico 1- Valores de FNE, FE e FE/FNE(%) nos três grupos.

Os valores da média de FNE são aproximadamente o dobro dos valores médios de FE em todos os grupos.

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo de normais e obesos nos valores de FNE e nos valores de FE ($p > 0,05$).

O grupo de pacientes com síndrome de Cushing apresenta valores distintamente elevados em ambos os métodos. Encontramos apenas um caso onde o FE obtido (99,2 ug/24h) estava dentro da faixa normal estabelecida (até 106,83 ug/24h), porém com um FNE elevado (366,50 ug/24h). Há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de normais e obesos com relação ao grupo de pacientes com síndrome de Cushing nos valores de FNE e de FE ($p < 0,05$).

Verificamos uma correlação positiva e significativa entre os valores de FNE e FE em todos os grupos (Figuras 3 - 4 - 5).

3.4. Relação FE/FNE % nos grupos de indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing (Tabela 4)

Verificamos que a relação FE/FNE % não foi estatisticamente diferente em nenhum grupo, e que houve uma sobreposição acentuada dos valores entre os grupos (Gráfico 1).

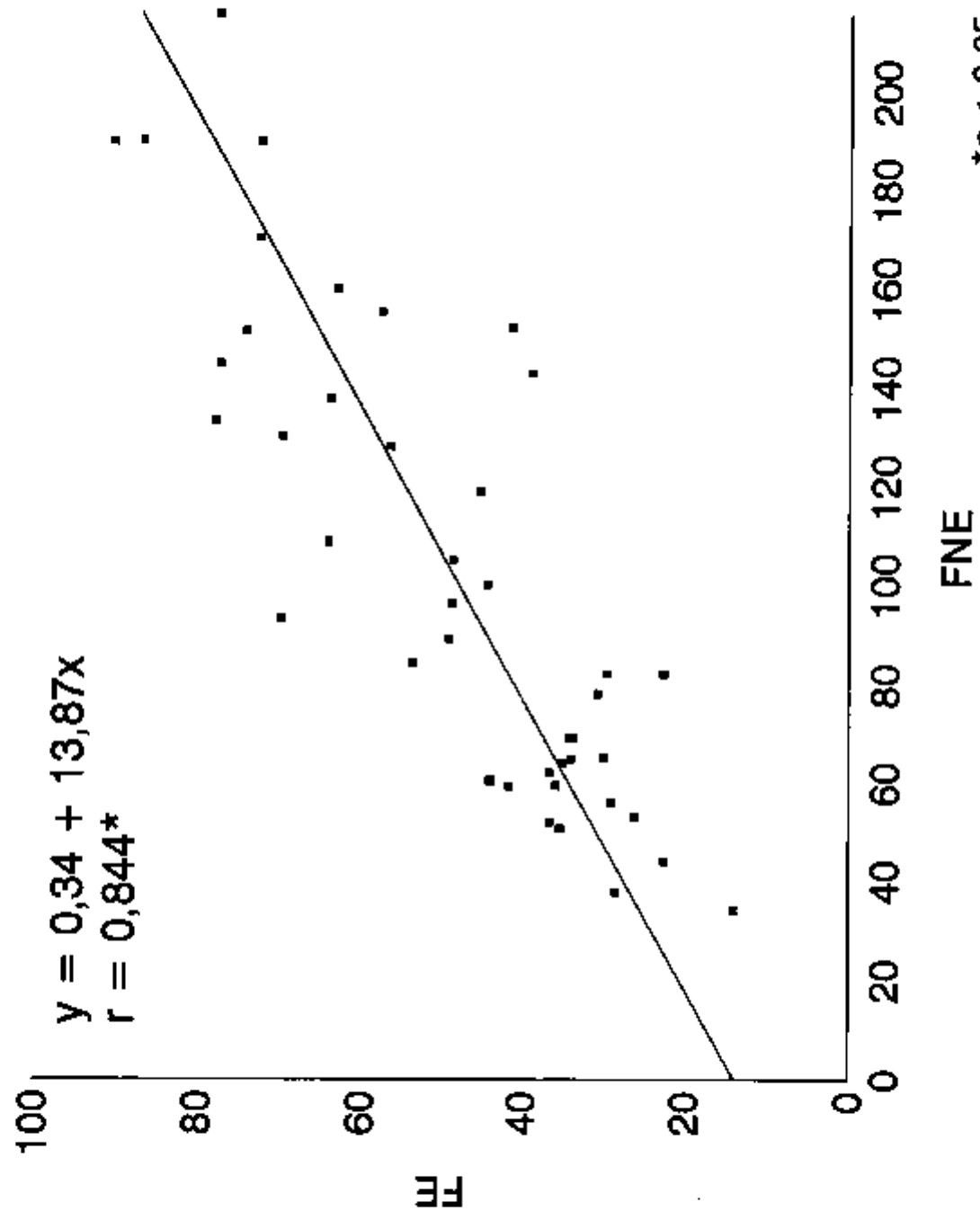


Fig. 1 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo normal

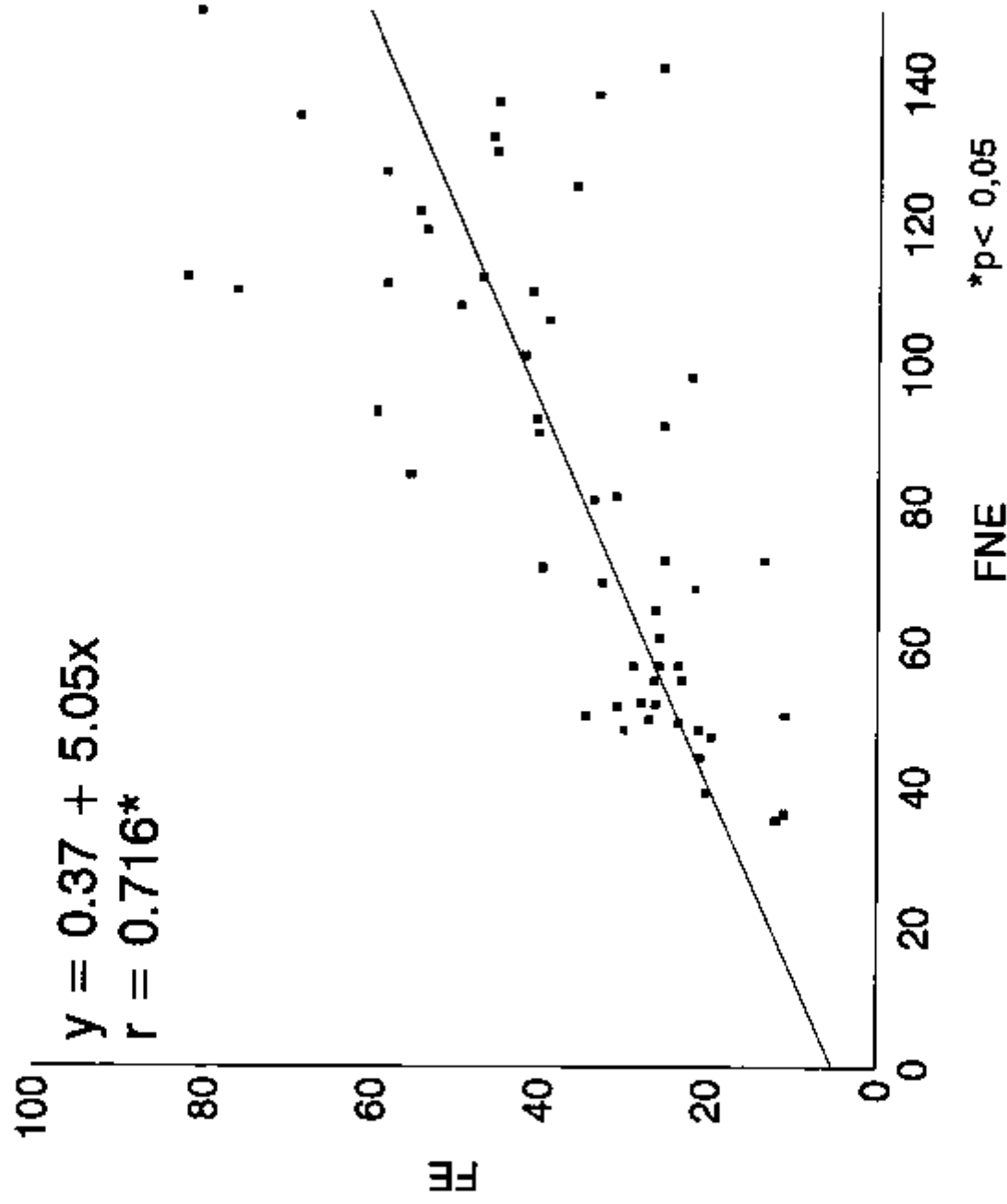


Fig. 2 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo de obesos

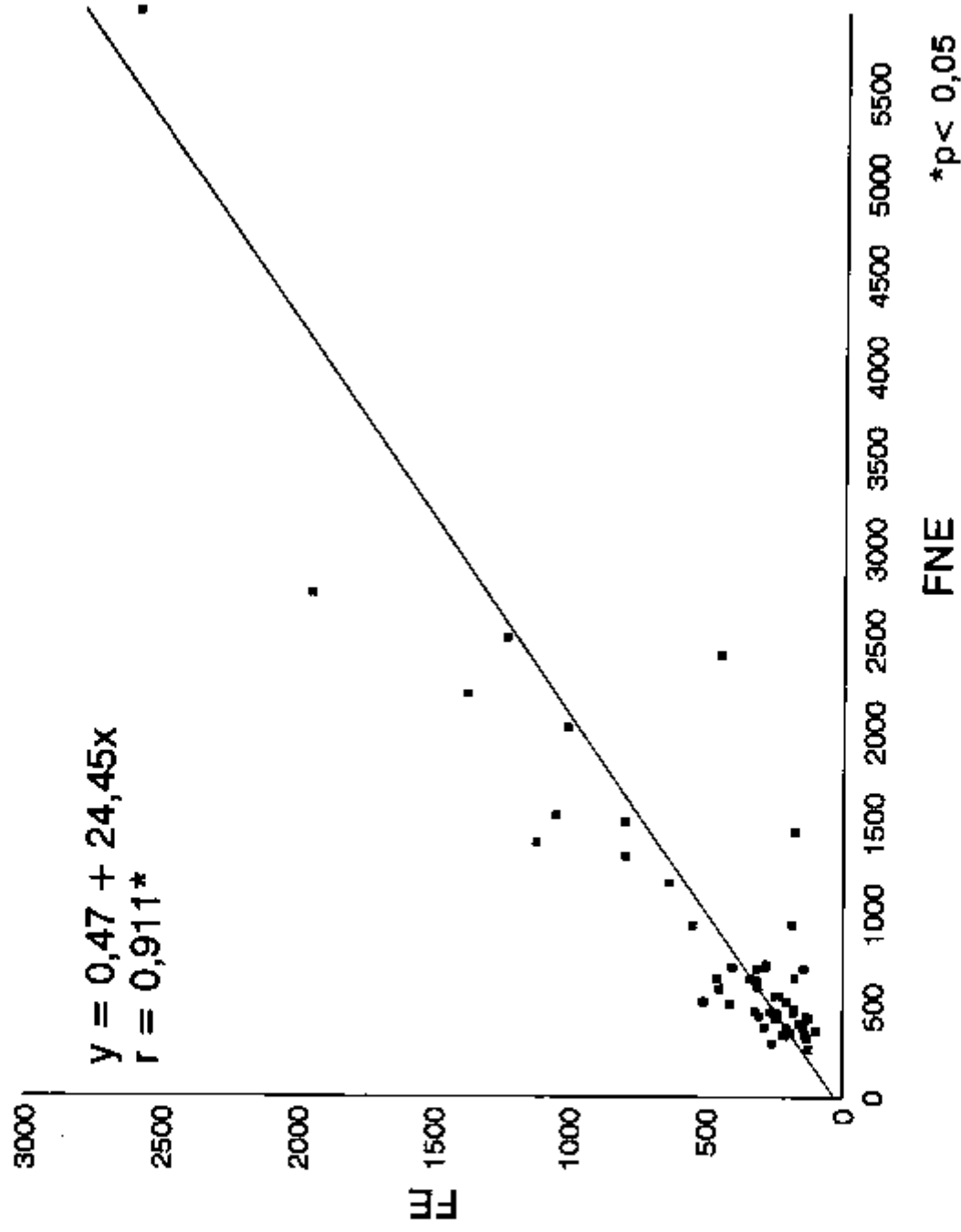


Fig. 3 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo de pacientes com síndrome de Cushing

3.5. Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos

Apresentamos na Tabela 5 os dados obtidos na avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos extraído e não extraído quanto ao diagnóstico.

Os dois métodos possuem uma excelente capacidade em detectar a síndrome de Cushing. Houve apenas um caso desta patologia que apresentou valor de FE dentro do intervalo normal, diminuindo um pouco a sensibilidade deste método. Quanto à especificidade diagnóstica, obtivemos o mesmo resultado para ambos os métodos, garantindo uma acentuada discriminação entre os níveis patológico e normal.

	ESPECIFICIDADE	SENSIBILIDADE
FNE	100%	100%
FE	100%	98,1%

Tabela 5 - Sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos FNE e FE.

4. Discussão

As manifestações clínicas da síndrome de Cushing estão relacionadas ao grau e à duração da secreção excessiva de cortisol. Porém, os sintomas e sinais característicos podem estar ausentes ou somente aparecer num estágio tardio da doença, sendo a investigação laboratorial essencial para sua detecção nos estágios iniciais(14).

A excreção urinária de cortisol reflete a secreção endógena deste hormônio e tem sido utilizada há vários anos no diagnóstico do hipercortisolismo.

A grande maioria dos trabalhos relativos ao diagnóstico do hipercortisolismo se refere à fração urinária livre do cortisol como o melhor índice da secreção do cortisol, considerando que a fração livre é a fração ativa do hormônio e que substâncias potencialmente interferentes poderiam ser retiradas após extração com solvente orgânico(8,20,21,22). Com o desenvolvimento de anticorpos mais específicos alguns laboratórios comerciais oferecem um ensaio de cortisol urinário livre sem extração. HUANG e ZWEIG (1989) compararam esta dosagem sem extração com um método extraído e, mesmo com a simplificação do método, concluíram que a dosagem direta do cortisol urinário livre é passível de erro devido a interferentes pois não obtiveram correlação positiva entre os métodos(23). Outros trabalhos referem a presença de interferentes na dosagem do cortisol urinário livre sem extração porém nenhum deles identifica com precisão estas substâncias interferentes sugerindo que elas sejam de origem adrenal, que possuem polaridade superior ou igual ou que eluem em regiões imediatamente anteriores ou posteriores ao cortisol sendo portanto estruturalmente semelhantes a ele(48,50). MURPHY e colaboradores (1981) (39), em estudo anterior sobre a quantificação do cortisol urinário livre em 7 métodos diferentes, mostraram que havia falta de especificidade, pois todos eles

superestimaram a concentração de cortisol quando comparado com um ensaio que fazia uso de cromatografia. SCHONESHÖFER e colaboradores (1980)(50), utilizando antissoro produzido contra um antígeno conjugado à BSA no carbono-21, observou que uma única extração com solvente orgânico não foi suficiente para eliminar toda a interferência de substâncias que possuem polaridade e propriedades cromatográficas semelhantes às do cortisol. GOUGH e ELLIS (1981)(21), no entanto verificaram que uma única extração da amostra antes do radioimunoensaio resultava em níveis de cortisol mais baixos que os valores obtidos sem extração.

A determinação do cortisol urinário não extraído oferece grandes vantagens técnicas em relação à determinação do cortisol extraído (fração livre): menor custo, menor tempo de execução, não ser necessário adquirir materiais além dos fornecidos pelo kit, maior precisão, uma vez que a dosagem é realizada diretamente na urina sem extração prévia que pode consistir em fator de erro, e melhor reprodutibilidade. Entretanto, poucos trabalhos clínicos publicados fazem uso da dosagem do cortisol urinário não extraído. Em extensa revisão da literatura, que abrangeu aproximadamente 30 anos, encontramos apenas um trabalho que utiliza esta dosagem simultânea ao cortisol urinário extraído na avaliação da síndrome de Cushing. PINSKER (1968) (41) utilizou um método menos específico para as duas dosagens e obteve um índice maior de falso-negativo para o FE que foi diminuído com a dosagem concomitante do FNE.

Neste trabalho determinamos os níveis normais de cortisol urinário não extraído e extraído num grupo de 43 indivíduos normais e observamos correlação positiva significativa entre os níveis de FE e FNE sugerindo uma interrelação direta entre os métodos(Gráfico 1).

Foi possível diagnosticar síndrome de Cushing em todos os casos (sensibilidade de 100 e 98,1% para o FNE e o FE, respectivamente) em ambos os

métodos. Da mesma maneira que no grupo controle, as duas dosagens correlacionaram-se diretamente, o que sugere uma interrelação entre as duas formas de dosagem do hormônio, também em condições patológicas(Gráfico 1).

No grupo de obesos, cujo quadro clínico pode se assemelhar ao quadro de hipercortisolismo, foi possível afastar a suspeita clínica também através dos dois métodos. Nosso objetivo em estudar indivíduos obesos se deve ao fato de que este grupo é potencialmente confundido com portadores de síndrome de Cushing(18). A obesidade produz mudanças fisiológicas, particularmente no sistema endócrino e quando associada à diabetes ou hipertensão exibe muitos sintomas e sinais clínicos semelhantes aos da síndrome de Cushing(30). Para MIGEON (34) e MLYNARYK(35) o peso estaria relacionado à elevação da taxa de produção de cortisol. Os níveis de 17OHCS e outros metabólitos, utilizados na investigação da função adrenal, estão elevados em indivíduos obesos (30). Dessa maneira, é importante que um método que se propõe a diferenciar pacientes com síndrome de Cushing de outras situações, tenha especificidade suficiente. Nossos resultados verificaram que todos os indivíduos obesos apresentaram níveis de cortisol extraído e não extraído dentro dos valores normais(Gráfico 1). Esses resultados estão de acordo com MURPHY (1968)(37), STREETEN (1969)(54), e JUSELIUS(1974)(26) que estudando a excreção de cortisol urinário livre em obesos não obtiveram diferença significativa com relação aos normais. Assim, ambos os métodos foram eficientes na discriminação entre obesidade e síndrome de Cushing.

Obtivemos valores de FNE aproximadamente 2 vezes maiores que os valores de FE em todos os grupos estudados. Estes valores mais altos de FNE provavelmente se devem a dosagem de metabólitos do cortisol como 20- α -diidroocortisol, 20- β -diidroocortisol e, em alguma extensão, 6- β -hidroxicortisol nas amostras (38,39). Estes metabólitos do cortisol são extraídos com menor

eficiência pelo diclorometano, mas apresentam interferência, ainda que menor, na determinação do cortisol não extraído. SCHONESHÖFER e colaboradores (1983)(51) encontraram uma predominância destes compostos na urina de um paciente portador de síndrome de Cushing com hipercortisolemia e que apresentava níveis normais de FE. Nesta condição, muito especial a dosagem do FNE identificaria níveis elevados de cortisol urinário e o FE seria normal. Em nossa casuística com síndrome de Cushing observamos este padrão em apenas um caso.

Os trabalhos que se referem à dosagem sem purificação prévia são anteriores ao surgimento de antissoros mais específicos, considerando os estudos de especificidade do antissoro que apresentaram níveis de reação cruzada superiores aos do antissoro utilizado neste trabalho (4,37,39,48,50).

Além disso, muitos autores referem que a reprodutibilidade dos ensaios diretos (sem extração ou purificação por cromatografia) é bastante pobre (2,48), fato este não confirmado por este trabalho onde obtivemos índices satisfatórios de reprodutibilidade (7,6% de variação para o FNE).

Na verdade, nos últimos 10 anos houve poucos avanços na precisão dos testes ou simplificação da metodologia para determinação do cortisol urinário(28).

A concentração de cortisol livre plasmática está elevada em pacientes com síndrome de Cushing (12,22). A porcentagem da relação FE/FNE não se mostrou diferente estatisticamente entre os três grupos estudados. Desta forma concluímos que esta relação não é útil para o diagnóstico da síndrome de Cushing, uma vez que a variação que ela pode apresentar é encontrada nos três grupos estudados com frequência semelhante.

Um fator que limita a confiança na dosagem do cortisol urinário são os poucos dados disponíveis na literatura avaliando a excreção em indivíduos

normais(40), principalmente no que se refere a comparação entre métodos extraídos e não extraídos.

Questionamos o porquê da literatura se referir apenas à fração extraída de cortisol urinário como melhor índice de secreção do cortisol na ausência de trabalhos comparativos e propomos com este trabalho que o diagnóstico de hipercortisolismo seja inicialmente realizado com a dosagem urinária do FNE.

5. Conclusão

1. Determinamos os níveis normais de FNE e FE que podem servir como referência dos métodos.
2. Os indivíduos obesos possuem valores de FNE e FE dentro do intervalo normal.
3. Os pacientes com síndrome de Cushing possuem valores distintamente elevados em ambos os métodos.
4. O FNE comparado ao FE é um método de fácil execução e de grande aplicabilidade na rotina do laboratório clínico.
5. O FNE é um método confiável, sensível e específico para a determinação do diagnóstico da síndrome de Cushing.

Referências Bibliográficas

1. ABRAHAM, G. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. *Acta Endocr. (Copenh.)*, 75(Suppl.183): 1-42, 1974.
2. APTER, D.; JANNE, O.; VIHKO, R. Lipidex chromatography in the radioimmunoassay of serum and urinary cortisol. *Clin. Chim. Acta.*, 63: 139-48, 1975.
3. AYRES, P.J.; GARROD, O.; SIMPSON, S.A.; TAIT, J.F. A method for the determination of aldosterone, cortisol and corticosterone in biological extracts, particularly applied to human urine. *Biochem. J.*, 65: 639-46, 1957.
4. BEARDWELL, C.G.; BURKE, C.W.; COPE, C.L. Urinary free cortisol measured by competitive protein binding. *J. Endocr.*, 42:79-89, 1968.
5. BEISEL, W.R.; DiRAIMONDO, V.C.; FORSHAM, P.H. Cortisol transport and disappearance. *Ann. Intern. Med.*, 60:641-52, 1964.
6. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. General principles of radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta.*, 22:51-69, 1968.
7. BERTRAND, P.V.; RUDD, B.T.; WELLER, P.H.; DAY, A.J. Free cortisol and creatinine in urine of healthy children. *Clin. Chem.*, 33(11) : 2047-51, 1987.
8. BURKE, C.W. & BEARDWELL, C.G. Cushing's syndrome. An evaluation of the clinical usefulness of urinary free cortisol and other measurements in diagnosis. *Q. J. Med.*, 165:175-204, 1973.

9. CHATORRAJ, S.C.; TURNER, A.K.; PINKUS, J.L.; CHARLES, D.. The significance of urinary free cortisol and progesterone in normal and anencephalic pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 124:848-54, 1976.
10. COPE, C.L. & HURLOCK, B. Some aspects of adrenal cortical metabolism. *Clin. Sci.*, 13 :69-83, 1954
11. COPE, C.L. & BLACK, E. The reliability of some adrenal function test. *Br. Med. J.*, 2:193-7, 1959.
12. CRAPO, L.: Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism*, 28: 955-77, 1979.
13. DUNN, J.F.; NISULA, B.C.; RODBARD, D. Transport of steroid hormones: binding of 21-endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53(1):58-75, 1981.
14. EDDY, R.L.; LLOYD JONES, A.; GILLILAND, P.F.; IBARRA, J.D.; THOMPSON, J.Q.; McMURRY, J.F. Cushing's syndrome: a prospective study of diagnostic methods. *Am. J. Med.*, 55 : 621-30, 1973.
15. EDWARDS, O.M. & BAYLISS, R.I.S. Urinary creatinine excretion as an index of the completeness of 24-hour urine collections. *Lancet, II* : 1165-6, 1969.
16. ESPINER, E.A. Urinary cortisol excretion in stress situations and in patients with Cushing's syndrome. *J. Endocr.*, 35: 29-44, 1966.

17. FLACK, M.R.; OLDFIELD, E.H.; CUTLER, G.B.; ZWEIG, M.H.; MALLEY J.D.; CHROUSOS, G.P.; LORIAUX, D.L.; NIEMAN, L.K. Urine free cortisol in the high-dose dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of the Cushing syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 116(3): 211-7, 1992.
18. GALVÃO-TELES, A.; GRAVES, L.; BURKE, C.W.; FOTHERBY, K.; FRASER, R. Free cortisol in obesity; effect of fasting. *Acta Endocr.*, 81: 321-9, 1976.
19. GERDES, H. & TELLER, W. Neue methodische möglichkeiten zur klinischen funktiondiagnostik der nebennierenrinde erfahrungen mit einer gaschromatographischen methode zur quantitativen bestimmung freier C21-17-hydroxycorticosterone in plasma und ham. *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, 59:203-17, 1968.
20. GRUA, J.R. & NELSON, D.H. ACTH-producing pituitary tumors. In: NELSON, D.H., ed. *New aspects of adrenal cortical disease*. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 1991. v. 20(2), p. 319-57.
21. GOUGH, R.M. & ELLIS, G. The radioimmunoassay of cortisol in urine. *Clin. Biochem.*, 14:74-81, 1981.
22. HANKIN, M.E.; THEILE, H.M.; STEINBECK, A.W. An evaluation of laboratory tests for the detection and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 6: 185-96, 1977.
23. HUANG, C.M. & ZWEIG, M. Evaluation of a radioimmunoassay of urinary cortisol without extraction. *Clin. Chem.*, 35(1):125-6, 1989.
24. HUBL, W. & BÜCHNER, M. Simultaneous fluorometric determination of free cortisol and corticosterone in urine after thin-layer chromatography. *Clin. Chim. Acta.*, 21:461-7, 1968.

25. JAMES, V.H.T. & FEW, J.D. Adrenocorticosteroids: chemistry, synthesis and disturbances in disease. *Clin. Endocr. Metab.*, 14(4):867-91, 1985.
26. JUSELIOUS, R.E. & BARNHART, F. Competitive-protein-binding radioassay of urinary cortisol. *Clin. Chem.*, 20(11): 1470-4, 1974.
27. KATZ, F.H.; LIPMAN, M.M.; FRANTZ, A.G.; JAILER, J.W.. The physiologic significance of 6- β -hydroxycortisol i human corticoid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 22: 71-7, 1962.
28. KAYE, T.B. & CRAPO, L. The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests. *Ann. Intern. Med.*, 112 : 434-44, 1990.
29. KOHEK, M.B.F.; MENDONÇA, B.B.; FRAZZATTO, E.T.; VILLARES, S.M.; NICOLAU, W.. Comparação entre os níveis de cortisol urinário não extraído (FNE) e livre (FE) no diagnóstico da síndrome de Cushing. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e metabologia: anais do 18º congresso brasileiro de ... realizado no Rio de Janeiro, 12 a 17 de junho de 1988, p.109
30. KONISHI, F. The relationship of urinary 17-hydroxycorticosteroids to creatinine in obesity. *Metabolism*, 13(9): 847-51, 1964.
31. KRAAN, G.P.B. & DRAYER, N.M.. Cortisol production rate in children by gas chromatography/mass spectrometry using (1,2,3,4,- ^{13}C) cortisol. *Steroids*, 55(4):159-64, 1990.
32. LIDDLE, G.W. The Adrenals. In: Williams, R.H. ed. *Textbook of endocrinology*, 6 ed., 1981, p.249-90.
33. MARTIN, M.M. & HAMMAN, B.L. Patterns of urinary excretion of steroids in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocr.*, 26: 257-67 , 1966.

34. MIGEON, C.J.; GREEN, O.C.; ECKERT, J.P. Study of adrenocortical function in obesity. *Metabolism*, 12: 718, 1963.
35. MLYNARYK, P.; GILLIES, R.R.; MURPHY, B.; PATTEE, C.J. Cortisol production rates in obesity. *J.Clin.Endocr.Metab.*, 22: 587, 1962.
36. MURPHY, B.E.P. Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultra micro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 27:973-90,1967.
37. MURPHY, B.E.P. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28:343-8, 1968.
38. MURPHY, B.E.P.; NGO, S.; OKOUNEFF, L.M. Hazards in the assay of cortisol in urine. *Clin.Res.*, 28 : 674A, 1980.
39. MURPHY, B.E.P.; OKOUNEFF, L.M.; KLEIN, G.P.; NGO, S.C.. Lack of specificity of cortisol determinations in human urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53(1):91-9,1981.
40. NICHOLS, T.; NUGENT, C.A.; TYLER, F.H. Steroid laboratory tests in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Am.J.Med.*, 45: 116-28, 1968.
41. PATERSON, N. Relative constancy of 24-hour urine volume and 24-hour creatinine output. *Clin.Chim.Acta*, 18 : 57-8, 1967.
42. PINSKER, P.; BULTASOVÁ, H.; SVOBODOVÁ, J. Diagnostic value of the simultaneous determination of urinary free and conjugated cortisol in Cushing's syndrome. *Acta endocr.*, 58 : 183-90, 1968.

43. PORTER, C.C. & SILBER, R.H. A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids. *J. Biol. Chem.*, 185:201-7, 1950.
44. RATLIFF, C.R. & EDDY, R.L. The fluorimetric determination of urinary "free" cortisol. *Lab. Med.*, 3 : 31-41, 1972.
45. RAWLINS, T.G.R. & YRJÖNEN, T. Calculation of RIA results using the spline function. *Intern. Lab.*, Nov/Dec, 1978.
46. ROSNER, J.M.; COS, J.J.; BIGLIERI, E.G.; HANE, S.; FORSHAM, P.H. Determination of urinary unconjugated cortisol by glass fibre chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 23 : 820-7, 1963.
47. ROSS, E.J. Urinary excretion of cortisol in Cushing's syndrome: effect of corticotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20:1360-5, 1960.
48. RUDER, H.J.; GUY, R.L.; LIPSETT, M.B. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 35:219-24, 1972.
49. SACKETT, D.L. Interpretation of diagnostic data: 5. How to do it with simple maths. *Can. Med. Assoc. J.*, 129 : 947-54, 1983.
50. SCHÖNESHÖFER, M.; FENNER, A.; DULCE, H.J. Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol. *Clin. Chim. Acta.*, 101: 125-34, 1980.
51. SCHÖNESHOFER, M.; WEBER, B.; NIGAM, S. Increased urinary excretion of free 20 α - and 20 β -dihydrocortisol in a hypercortisolemic but hypocortisoluric patient with Cushing's disease [Case Report]. *Clin. Chem.*, 29 : 385-9, 1983.

52. SIMKIN, B. Urinary 17-ketosteroids and 17-ketogenic steroid excretion in obese patients. *N.Engl.J.Med.*, 264: 974, 1961.
53. SONINO,N.; BOSCARO,M.; PAOLETTA,F.M.; ZILIOOTTO,D.
Ketoconazole treatment in Cushing's syndrome: experience in 34 patients. *Clin. Endocr.*, 35: 347-52, 1991.
54. STREETEN, D.H.P.; STEVENSON, C.T.; DALAKOS, T.G.; NICHOLAS, J.J.; DENNICK, L.G.; FELLERMAN, H. The diagnosis of hypercortisolism. Biochemical criteria differentiating patients from lean and obese normal subjects and from females on oral contraceptives. *J.Clin.Endocr.Metab.*, 29 : 1191-211, 1969.
55. TOUCHSTONE, J.C. & BLAKEMORE, W.S. Urinary 6- β -hydroxycortisol in adrenal hyperfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21:263-70, 1961
56. ULICK, S.; TEDDE, R.; WANG, J.Z. Defective ring A reduction of cortisol as the major metabolic error in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J.Clin.Endocr.Metab.*, 74(3): 593-9, 1992.
57. VOCCIA, E.; SAENGER, P.; PETERSON, R.E.; RAUH, W.;
GOTTESDIENER, K.; LEVINE, L.S.; NEW, M.I. 6- β -hydroxycortisol excretion in hypercortisolemic states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48:467-71, 1979.
58. WESTON, H.L.; FENNESSEY, P.V.; MORELLI, J.; SCHWAB, H.;
MOONEY,J.; SAMSON,C.; HUFF, L.; HARRISON, M.; GOTLIN, R..
Comparison of hypothalamus-pituitary-adrenal axis suppression from superpotent topical steroids by standard endocrine function testing and gas chromatographic mass spectrometry.*J. Invest. Dermatol.* , 90(4):532-5, 1988.