



CNEN/SP

ipen *Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares*

GOVERNO DO BRASIL

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

Maria Beatriz de Fonta KOHEK Berenice Bilharinho de MENDONÇA e Wilian NICOLAU

IPEN-Pub 380

JANEIRO/1993

SÃO PAULO

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

Marie Beatriz da Fonte KOHEK, Berenice Bilharinho de MENDONÇA e Wilian NICOLAU

DIVISÃO DE INTERCÂMBIO E COOPERAÇÃO TÉCNICA

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C62 00

HYDROCORTISONE
URINE
RADIOIMMUNOASSAY
DIAGNOSTIC TECHNIQUES
CUSHING SYNDROME
COMPARATIVE EVALUATIONS

IPEN Doc-4534

Aprovado para publicação em 18/11/92

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

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

Mana Beatriz da Fonte KOHEK¹ Berenice Bilhinho de MENDONÇA² Wilian NICOLAU³

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

O radioimunoensaio do cortisol urinário extraído com solvente orgânico (fração livre) têm sido largamente empregado há vários anos 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 exeqüibilidade, 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 ¹²⁵I cortisol procedente da Clinical Assays Inc. - 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 µg/dl com um coeficiente de variação intraensaio para valores alto e baixo de 8,29 ± 3,38 % e 8,19 ± 4,72 % respectivamente para o cortisol urinário não extraído e de 9,72 ± 1,94 % e 9,54 ± 4,4 % respectivamente para o cortisol urinário extraído. A precisão 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 baseis de urina de 24 horas de 43 indivíduos normais, 53 indivíduos 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

Trabalho realizado em colaboração no Laboratório de Pesquisa da 1ª Clínica Médica Setor de Radioimunoensaio do Hospital das Clínicas da FMUSP.

¹Biologista do Laboratório de Pesquisa - Setor de Radioimunoensaio da 1ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP e aluna do pós-graduação do IPEN-CNEN/SP.

²Professora Livre-Docente da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP e médica assistente de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

³Professor Livre-Docente Adjunto da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP e orientador do curso de pós-graduação do IPEN-CNEN/SP.

de 102.01 ± 48.32 ug/24h nos obesos foram de 83.87 ± 33.38 ug/24 h e nos pacientes com síndrome de Cushing foram de 892.44 ± 933.84 ug/24h respectivamente. Os valores obtidos de cortisol urinário extraído para o grupo de indivíduos normais foram de 48.51 ± 19.44 ug/24h nos obesos foram de 36.23 ± 17.32 ug/24h e nos pacientes com síndrome de Cushing foram de 444.28 ± 479.23 ug/24h respectivamente. Obtivemos uma diferença estatisticamente significativa para o grupo de pacientes com síndrome de Cushing em relação aos normais e aos obesos em ambos os métodos ($p < 0.05$). Os grupo de normais e de obesos não foram diferentes estatisticamente 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 entre os dois métodos em todos os grupos estudados ($p < 0.05$). Concluímos que os dois métodos são eficientes para a investigação do hiper-cortisolismo 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 de Fonte KONEK¹ Berenice Bithamha de MENDONÇA² Willian NICOLAU³

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05449 - São Paulo - BRASIL

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 µg/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 µg/24 h for non extracted and 48.51 ± 19.44 µg/24 h for extracted cortisol. In the group of obese patients we obtained values of 83.87 ± 33.38 µg/24 h for non extracted and 36.23 ± 17.32 µg/24 h for extracted

Work performed in collaboration at Laboratório de Pesquisa da 1ª Clínica Médica, Setor de Radiomunoensaio do Hospital das Clínicas da FMUSP.

¹Biologist of Laboratório de Pesquisa da 1ª Clínica Médica-Setor de Radiomunoensaio of Hospital das Clínicas - FMUSP and student of postgraduate course of IPEN-CNEN/SP

²MD Endocrinology Hospital das Clínicas FMUSP

³MD Endocrinology FMUSP and supervisor of postgraduate course of IPEN-CNEN/SP

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) and the specificity was the same for both methods (100 %). We noticed a positive correlation between the two methods in all the 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 done first since it's an easy to perform and affordable method to diagnose Cushing's syndrome.

1 Introdução

A dosagem do cortisol urinário livre (não conjugado) foi proposta como teste para avaliação da função adrenal por COPE e HURLOCK em 1954¹ Existem várias razões teóricas que definem a dosagem do cortisol urinário livre como um método útil no diagnóstico do hipercortisolismo 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) que empregaram um ensaio derivado com duplo isótopo (HDA) método largamente aceito como preciso no entanto lento e trabalhoso² A partir desta época muitos métodos de variada complexidade foram aplicados na tentativa de viabilizar a medida do cortisol urinário livre^{3 4 5 6 7 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^{9 10 11} A avaliação da secreção do cortisol pode ser realizada indiretamente através da determinação da excreção urinária do cortisol 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) ou da cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GCMS) que requerem equipamentos especiais nem sempre disponíveis no laboratório clínico^{12 13 14 15} RUDER e colaboradores (1972) consideraram necessária a cromatografia prévia da urina de forma a obter valores tão baixos quanto àqueles obtidos usando CBG sem cromatografia (RTA)¹⁶ No entanto não investigaram a natureza dos interferentes e concluíram que seus valores elevados eram causados por substâncias não esteróides (CHATORRA) e colaboradores (1976) utilizando radiomunoensaio e RTA obtiveram valores consideravelmente baixos para o cortisol urinário livre após cromatografia em diversos sistemas¹⁷ Este estudo sugere que os valores geralmente aceitos de média e intervalo normal possuem um erro grosseiro fato confirmado por MURPHY e col (1981)¹⁸ 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

Entretanto com o desenvolvimento do radiomunoensaio¹⁹ utilizando antissoros específicos e antígenos radiodados a dosagem do cortisol livre na urina teve grande aplicação clínica Atualmente muitos métodos de dosagem de cortisol urinário livre por radiomunoensaio envolvem a extração com um solvente orgânico para eliminar compostos interferentes A dosagem direta isto é sem extração ou purificação prévia do

cortisol urinário (FNE) utilizando antissoros altamente específicos não é um método rotineiramente empregado no diagnóstico da síndrome de Cushing. Contudo, em estudos preliminares, observamos uma correlação positiva entre os valores de cortisol urinário extraído ou livre (FE) e não extraído (FNE), sugerindo que este método possa ser útil no diagnóstico da síndrome de Cushing, considerando a facilidade de execução e o menor custo²⁰. Desta forma, propomos determinar através de um radiomimunoensaio comercialmente disponível em nosso meio, os valores de cortisol urinário extraído ou livre (FE) e não extraído (FNE) em um grupo de indivíduos normais, obesos e em pacientes com síndrome de Cushing.

2 Materiais e Métodos

2.1 Casuística

Avaliámos amostras urinárias basais de 24 horas de 43 indivíduos normais, 53 pacientes obesos e 53 pacientes com síndrome de Cushing com diagnóstico confirmado por anatomia patológica, onde 36 tinham como etiologia Doença de Cushing, 11 tumor primário de supra renal e 6 tumores com secreção ectópica de ACTH (3 carcinóide de tipo 1, feocromocitoma, 1 carcinóide de bônquio e 1 carcinoma de pâncreas) estudados no Hospital das Clínicas, na Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da USP. 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 ácido bórico e mantidas a -20°C até o momento das dosagens. Uma alíquota de cada urina foi enviada para a determinação da creatinina.

2.2 Materiais

2.2.1 Permanentes: Banho maria $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, mod. 169 Fabbe; banho de gelo, tubos de vidro (15 x 120 mm), rolhas de boracha nº 4, agitador de tubos, Élica Brasil; pipetas automáticas para volumes fixos de 10, 100, 200 e 1000 µl, Petecim Brasil e MLA USA; repipetador semi-automático Eppendorf, Alemanha; contador γ 1 KB Wallac Minigamma 1275, Wallac Oy, Finlândia.

2.2.2 Reagentes: Diclormetano-p.a., Merck; água destilada, GammaCoat ^{125}I cortisol, Clinical Assays, Incstar USA.

2.3 Métodos

A creatinina urinária foi dosada no Laboratório de bioquímica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas por um método automatizado (VP-Abbott) de acordo com Jaffé modificado sem desproteinização utilizando ácido picrico como reagente. O radioimunoensaio utilizado neste trabalho emprega 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 numa concentração da ordem de 1 $\mu\text{g}/\text{tubo}$ e com uma constante de afinidade de aproximadamente 2×10^8 L/mol. Os dados sobre a especificidade do antissoro utilizado se encontram na Tabela 1.

2.3.1 Dosagem do cortisol urinário extraído (FE)

A dosagem do cortisol urinário extraído envolve duas etapas. A primeira 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. Os valores obtidos de cortisol que ultrapassaram o ponto máximo da curva (60 $\mu\text{g}/\text{dl}$) foram repetidos em outro ensaio após diluição (1/10) da urina com água destilada antes da extração.

2.3.1.1 Extração das amostras

Numeramos 2 tubos de vidro (15 x 120 mm) por amostra sendo um deles identificado para calcular a eficiência e pipetamos 200 μl de urina previamente homogeneizada em cada um. Aos tubos de eficiência adicionamos 10 μl de padrão de cortisol 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e misturamos com o auxílio de um agitador de tubos. Acrescentamos 1000 μl de diclorometano gelado a todos os tubos e extraímos por 1 min com agitação para transferir o cortisol para a camada orgânica. Fechamos os tubos com rolha de borracha e os mantivemos em banho de gelo a fim de evitar a evaporação excessiva do diclorometano enquanto aguardamos a separação das fases. Numeramos tubos de radioimunoensaio fornecidos no kit em duplicata para cada tubo de extração. Após a separação das fases removemos 100 μl da camada inferior (orgânica) de cada tubo de extração e transferimos para os respectivos tubos de fase sólida. Evaporamos o diclorometano em capela e então adicionamos 10 μl de padrão de cortisol 0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ a fim de manter o mesmo volume de incubação da curva padrão no radioimunoensaio. A seguir procedemos ao radioimunoensaio propriamente dito.

2.3.1.2 Radioimunoensaio de cortisol

Numeramos 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). Pipetamos 10 ul dos padrões e controles aos seus respectivos tubos. Aos tubos das amostras padrões controles e NSB adicionamos 1000 ul de ^{125}I cortisol misturamos e incubamos por 45 min a 37 ± 2 °C em banho-maria. Separamos a fração ligada por decantação e deixamos os tubos em posição invertida por aproximadamente 30 min sobre papel absorvente. A seguir procedemos à radiometria em contados γ com janela para ^{125}I por 1 min.

2.3.2 Dosagem do cortisol urinário não extraído (FNE)

Dosamos diretamente em 10 ul de urina após homogeneização. O procedimento não requer nenhuma preparação prévia da amostra e consiste essencialmente no 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 o NSB. O contador γ utilizado possui um programa de computação que executa as operações de cálculo²¹ fornecendo os valores da curva padrão transferindo-os para um gráfico tendo na ordenada a relação B/B_0 expressa em % e na abscissa as concentrações dos padrões. Posteriormente ele fornece as concentrações e os coeficientes de variação (C.V.) calculado entre as duplicatas de cada amostra. As duplicatas com C.V. maior que 10 % foram rejeitadas e a amostra repetida em novo ensaio.

2.4.2 Cálculo do FNE

O valor de cortisol urinário é convertido de ug/dl para ug/24h (corrigido pelo volume total de 24 h) através da seguinte fórmula

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

onde A é a concentração de cortisol obtida na curva padrão (em ug/dl) V é o volume total de urina nas 24 h (em ml) e 100 é o fator de conversão

2.4.3 Cálculo do FE

Para converter o cortisol urinário extraído das amostras de ug/dl para ug/24 utilizamos a equação que segue que corrige pela eficiência da extração

$$FE = \frac{A \times V}{33.3(E - A)}$$

onde A é a concentração obtida na curva padrão (ug/dl) V é o volume total de urina nas 24 h (em ml) E é a concentração do tubo de eficiência de extração da amostra correspondente (ug/dl) e 33.3 é o fator de correção da diluição da amostra

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

$$E = \frac{E - A}{6.0} \times 100$$

onde E e A é a concentração de cortisol obtida na curva padrão (ug/dl) correspondente ao tubo da eficiência e da amostra respectivamente 6.0 é a diferença esperada entre as concentrações dos tubos da eficiência e da amostra e 100 é o fator de conversão

2.5 Comparação do procedimento técnico

Comparamos os dois métodos quanto a facilidade e tempo utilizado na execução rendimento como número de amostras que podem ser dosadas por kit de 100 determinações e custo por amostra (em US \$)

2.6 Sensibilidade, reprodutibilidade e precisão dos métodos

A confiabilidade de um ensaio depende de sua sensibilidade especificidade exatidão e precisão

A sensibilidade da curva padrão é definida como sendo a menor dose detectável (DMD) estatisticamente diferente do padrão zero de concentração a 95 % de limite de confiança e foi avaliada pela dosagem de 6 padrões zeros 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 C.V. apresentado pelas mesmas. Separamos 2 amostras do grupo normal e 2 amostras do grupo de síndrome de Cushing para verificar a reprodução interensaios de valores médios e altos submetidos ao processo normal do FE e do I NE

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

2.7 Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos

Sensibilidade diagnóstica de um método é definida como a habilidade do mesmo na detecção de uma patologia. É calculada através da relação entre os valores positivos no ensaio e positivos verdadeiros (nº de pacientes com diagnóstico confirmado)²²

Especificidade diagnóstica de um método por sua vez é definida como a habilidade em diferenciar de outras patologias. É calculado através da relação entre os valores negativos no ensaio (níveis normais) e negativos verdadeiros (nº de indivíduos normais)²²

2.8 Análise Estatística

Na interpretação dos resultados entre os três grupos estudados utilizamos a análise de variância e quando a diferença entre as médias foi declarada significativa pelo F-teste utilizamos o teste de Bonferroni para determinar quais tratamentos diferiam entre si considerando $\alpha = 5\%$. A relação entre as dosagens de FE e FFE nos grupos foi estudada através da medida do coeficiente de correlação (r) e foram expressas por uma reta e uma equação de regressão.

3 Resultados

3.1 Comparação do procedimento técnico e critérios de confiabilidade do ensaio

Realizamos 32 ensaios (FNE e FF) nos quais obtivemos os seguintes resultados:

Em relação ao tempo e facilidade de execução (rendimento por kit de 100 determinações e custo estimado) apresentamos os resultados na Tabela 2.

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 (dilatometano, 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 (DML) 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 $9,72 \pm 1,94\%$ e $9,54 \pm 4,4\%$, respectivamente para o FF. 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.

3.2 Valores de cortisol urinário extraído e não extraído em indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing (Tabela 3)

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. Outros autores referem o mesmo resultado^{23,24}. Portanto os valores de FNE e FE foram expressos em μg de cortisol/24 h.

Analisamos os resultados de FNE e FE do grupo normal através de um teste t entre os 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. Apresentamos os valores de cortisol urinário não extraído (FNE), extraído (FE) e a relação FE/FNE % nos três grupos estudados, considerando a média e o intervalo de valores absolutos.

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

Não houve 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. Houve 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 (Figura 1-3).

3.3 Relação FE/FNE % nos grupos de indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing (Tabela 3)

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

3.4 Avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos

Apresentamos na Tabela 4 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 em que o FE obtido encontrava-se na dentro do intervalo normal, porém com o seu FNE correspondente acima do valor normal. Este fato fez diminuir moderadamente a sensibilidade do método extraído. Quanto à especificidade diagnóstica obtivemos o mesmo resultado para ambos os métodos, garantindo uma eficiente discriminação entre os níveis patológico e normal.

Tabela 1. 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
Didrocortisona	<0,1
Progesterona	<0,1
Espironolactona	<0,1
Tetraidro cortisol (THF)	<0,1
6 β -Hidro cortisona	<0,1

Tabela 2 Comparação do procedimento técnico e custo para 100 determinações

	FNE	FE
TEMPO DE EXECUÇÃO (h)	3	5
No de tubos necessários / amostra	2	4
Material extra		Diclorometano
Rendimento por kit (100 determinações)	4 / %	Padrão 0 ug/dl 20 %
Custo estimado por amostra	US \$ 1.50	US \$ 3.00

Tabela 3 Valores de FNE, FE e relação FE/FNE (%) nos grupos de indivíduos normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing

	NORMAIS	OBESOS	SÍNDROME DE CUSHING
n	43	53	53
FNE	102.01 ± 46.32 (34.0 - 215.6)	81.87 ± 33.38 (35.0 - 150.0)	892.44 ± 933.84 (265.5 - 5933.9)
FE	48.61 ± 19.44 (14.0 - 90.4)	36.23 ± 17.32 (10.0 - 82.4)	444.28 ± 479.23 (99.2 - 2599.7)
FE/FNE	50.4 ± 12.89 (27.2 - 75.5)	43.96 ± 12.85 (18.1 - 73.6)	50.5 ± 18.07 (12.0 - 96.8)

*média ± 1 desvio padrão

* variação

Tabela 4 Sensibilidade e especificidade diagnóstica dos métodos FNE e FE

	ESPECIFICIDADE	SENSIBILIDADE
FNE	100 %	100 %
FE	100 %	98.1 %

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 estádios iniciais²⁵

A excreção urinária de cortisol reflete a secreção endógena deste hormônio e tem sido utilizada há vários anos no diagnóstico do hipercortisolismo²⁶

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 orgânico²⁶. Com o desenvolvimento de anticorpos mais específicos algumas companhias oferecem um ensaio de cortisol urinário livre sem extração. HUANG e ZWEIG (1983) 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 métodos²⁷. 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 pela correlação que mantêm em situações de hiper ou hipofunção que possuem polaridade superior ou igual ou que eluem em regiões imediatamente anteriores ou posteriores ao cortisol sendo portanto estruturalmente semelhantes a ele. MURPHY e colaboradores (1981) 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 cromatografia¹⁸. SCHONESHÖFER e colaboradores (1980) utilizando antissoro produzido contra um antígeno conjugado a 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 cortisol¹². GOUGH e ELLIS (1981) no entanto verificaram que uma única extração da amostra antes do radioimensaio resultava em níveis de cortisol mais baixos que os valores obtidos sem extração²⁸

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 no diagnóstico da síndrome de Cushing¹⁵.

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.

Foi possível diagnosticar a 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.

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. 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. Para MIKIFON²⁹ e MIYNARYK³⁰ 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 obesos³¹. 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. Esses resultados estão de acordo com STREFFEN (1969) que estudando a excreção de cortisol urinário livre em obesos não obteve diferença significativa com relação aos normais³². 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 à dosagem de metabólitos do cortisol como 20 α dihidrocortisol, 20 β dihidrocortisol e em alguma extensão 6 β hidroxycortisol nas amostras³³. 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) encontraram uma predominância destes compostos na urina de um paciente portador de síndrome de Cushing com hipercortisolemia e que apresentava níveis normais

de FE³⁴ 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^{10 11 12 16 18}.

Além disso muitos autores referem que a reprodutibilidade dos ensaios diretos (sem extração ou purificação por cromatografia) é bastante pobre^{6 16} 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 urinário³⁵.

A concentração de cortisol livre plasmático está elevada em pacientes com síndrome de Cushing. A porcentagem de 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, 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

No presente trabalho determinamos os níveis normais de FNE e de FE que podem servir como referência dos métodos. Os indivíduos obesos possuem valores de FNE e de FE dentro do intervalo normal, sendo portanto ambos os métodos capazes de afastar a suspeita de síndrome de Cushing deste grupo de pacientes. Os pacientes com síndrome de Cushing possuem valores elevados em ambos os métodos.

Além disso o FNE comparado ao FE é um método de fácil execução e de grande aplicabilidade na rotina de um laboratório clínico. O FNE é um método confiável, sensível e específico para a determinação do diagnóstico da síndrome de Cushing e propomos

que este método seja o de primeira escolha nos estados iniciais da investigação desta patologia

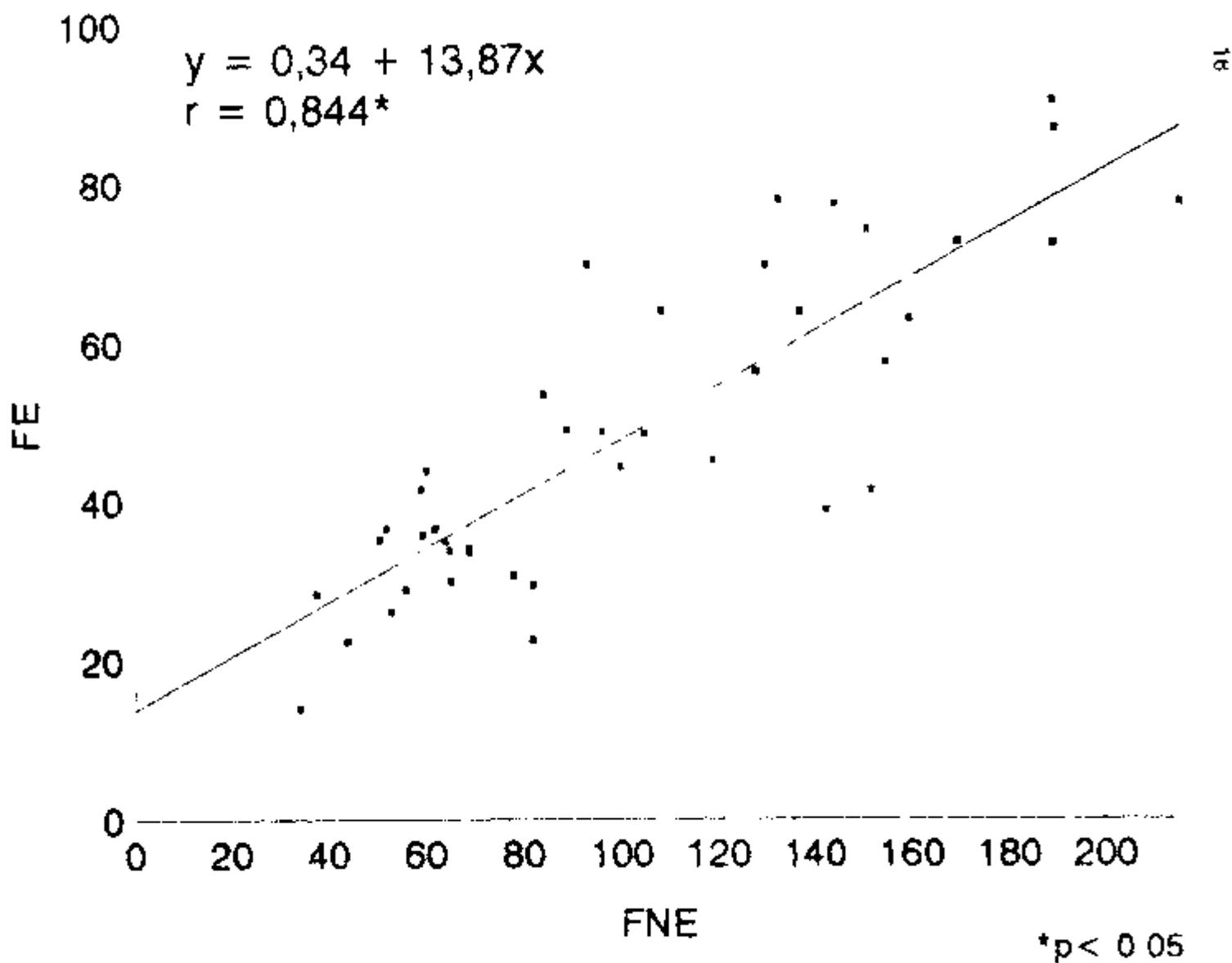


Fig 1 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo normal

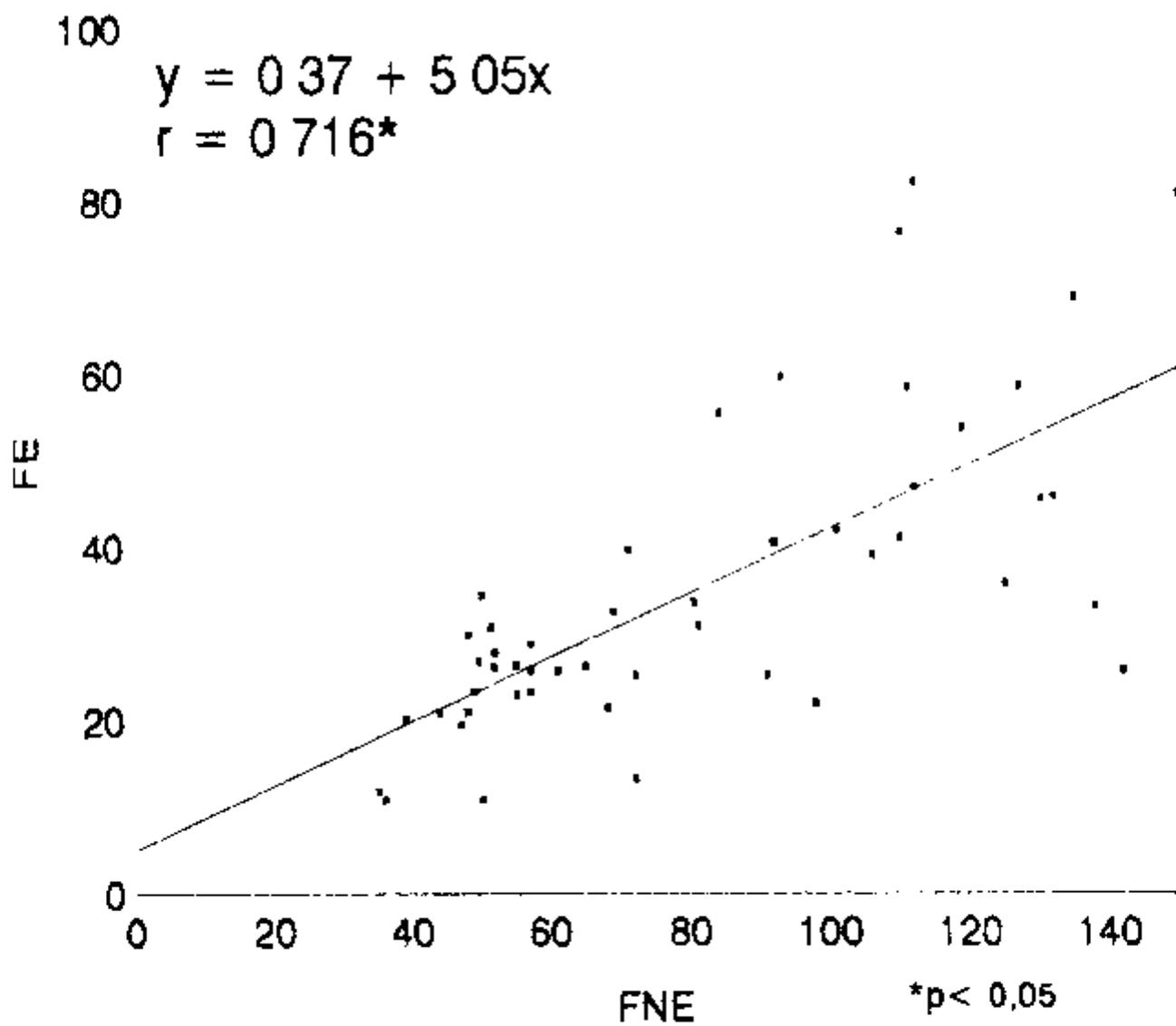


Fig 2 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo de obesos

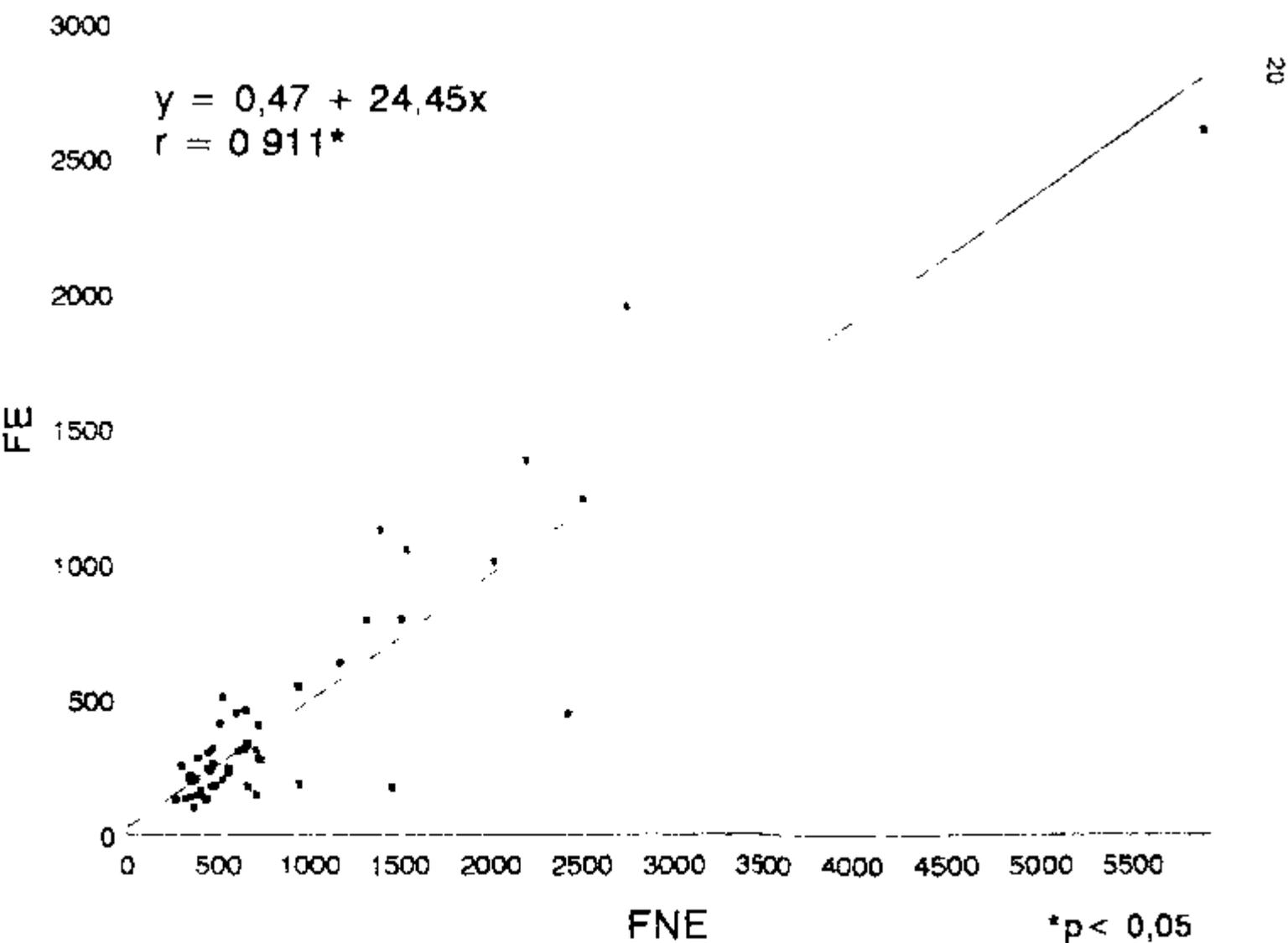


Fig 3 - Correlação entre o FNE e o FE do grupo de pacientes com síndrome de Cushing

Referências Bibliográficas

- 1 COPE C L & HURLOCK B. Some aspects of adrenal cortical metabolism. Clin Sci, 13: 69-83, 1954
- 2 COPE C L & BLACK F. The reliability of some adrenal function test. Br Med J, 2: 193-7, 1959
- 3 ROSA F F. Urinary excretion of cortisol. Cushing's syndrome: effect of corticotropin. J Clin Endocrinol Metab, 20: 1001, 1960
- 4 GRUBES R & TELLER W. Neue methodische Möglichkeiten zur klinischen Funktionsdiagnostik der Nebennierenrinde auf Urinderivaten mit einer gaschromatographischen Methode zur quantitativen Bestimmung freier C₂₁-17-Hydroxycorticosterone in plasma und urin. Acta Endocrinol (Kbt), 59: 203-17, 1968
- 5 HUBL W & BUCHNER M. Simultaneous fluorometric determination of free cortisol and corticosterone in urine after thin layer chromatography. Clin Chim Acta, 21: 461-7, 1968
- 6 APTER D, JANNE O, VIHKO R. Lipidex chromatography in the radioimmunoassay of serum and urinary cortisol. Clin Chim Acta, 63: 139-48, 1975
- 7 RATLIFF C R & EDDY R I. The fluorimetric determination of urinary 'free' cortisol. Lab Med, 3: 31-41, 1972
- 8 ROSNER J M, COS J J, BIGIHERI 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
- 9 MURPHY B E P. Some studies of the protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurements of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassays. J Clin Endocr Metab, 27: 973-90, 1967
- 10 BEARDWELL C G, BURKE C W, COPE C L. Urinary free cortisol measured by competitive protein binding. J Clin Endocr, 42: 79-89, 1968
- 11 MURPHY B E P. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein binding radioassay. J Clin Endocr Metab, 28: 343-8, 1968
- 12 SCHÖNESHÖFER M, FENNER A, DULCE H I. Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol. Clin Chim Acta, 101: 125-34, 1980

- 13 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):537-5 1988
- 14 KRAAN G P B & DEKATER N M Cortisol production rate in children by gas
chromatography-mass spectrometry using (1-¹³C) cortisol Stergids 55(4):
154-64 1990
- 15 PINSKER P BUI TASOVA H SVOBODOVA J Diagnostic value of the simultaneous
determination of urinary free and conjugated cortisol in Cushing's syndrome
Acta endocr 58 183-90 1968
- 16 RIDER H L CLYME L THSE E M R A radioimmunoassay for cortisol in plasma and
urine J Clin Endocrinol Metab 35 119-24 1972
- 17 CHAKORRAJ S C BURKE R A F PINKUS J T CHARLES D The significance of
urinary free cortisol and progesterone in normal and atypical amniocentesis pregnancy
Am J Obstet Gynecol 124:843-4 1976
- 18 MURPHY P E P OKOLINEFF M KEIN G P NGO S C Lack of specificity of
cortisol determination in human urine J Clin Endocrinol Metab 53(1):91-9 1981
- 19 BLIKSON S A & YALOW R S General principles of radioimmunoassay
Clin Chim Acta 22:51-69 1968
- 20 KOHEK M H F MENDONÇA B F FRAZZATTO E T VILARES 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
- 21 RAWLINS T G R & YRJÖNEN E Calculation of RIA results using the spline function
Intern Lab Nov/Dec 1978
- 22 SACKETT D I Interpretation of diagnostic data. 5 How to do it with simple maths
Can Med Assoc J 129 947-54 1983
- 23 PATERSON N Relative constancy of 24-hour urine volume and 24-hour creatinine
output Clin Chim Acta 18 57-8 1967
- 24 BERTRAND P V RUOD B T WELER P H DAY A J Free cortisol and creatinine
in urine of healthy children Clin Chem 33(11) 2047-51 1987

- 25 EDDY R L, LLOYD JONES A, CHELL AND DE 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.
- 26 CRAPO L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. Metabolism **28**: 955-77, 1979.
- 27 HUANG C M & ZWEIFL M. Evaluation of a radioimmunoassay of urinary cortisol without extraction. Clin Chem **35**(11): 58, 1989.
- 28 GOUGH R M & ELLIS C. The radioimmunoassay of cortisol in urine. Clin Biochem **14**: 74-81, 1981.
- 29 MURFON C J, GREEN C C, FURKEL T D. Study of adrenocortical function in obesity. Metabolism **12**: 718, 1963.
- 30 MIYNARYK P, GILLES R D, MURPHY R, PATTEE C J. Cortisol production rates in obesity. J Clin Endocrinol Metab **12**: 417, 1952.
- 31 KONISHI F. The relationship of urinary 17-hydroxy corticosteroids to creatinine in obesity. Metabolism **13**(9): 847-5, 1964.
- 32 STREETER N D H P, STEVENSON C J, DALAKOS T G, NICHOLAS J I, DENNICK L C, FELLERMAN H. The diagnosis of hypercortisolism: Biochemical criteria differentiating patients from lean and obese normal subjects and from females on oral contraceptives. J Clin Endocrinol Metab **29**: 1191-211, 1969.
- 33 MURPHY R E P, NGO S, OKUNIE T, L M. Hazards in the assay of cortisol in urine. Clin Res **28**: 674A, 1980.
- 34 SCHÖNESHOEJER M, WEHRE F, NICKAM S. Increased urinary excretion of free 20 α and 20 β dihydrocortisol in a hypercortisolemic but hypocortisolemic patient with Cushing's disease. (Case Report). Clin Chem **29**: 385-9, 1983.
- 35 KAYE T B & CRAPO L. The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests. Ann Intern Med **113**: 153-14, 1990.