

Desenvolvimento e Caracterização de Método para a Dosagem de Cortisol Livre Urinário

artigo original

RESUMO

A dosagem de cortisol livre na urina de 24 horas é considerada por muitos como a dosagem mais útil na pesquisa da presença de síndrome de Cushing. Os resultados publicados são, no entanto, pouco comparáveis entre si em função de diferenças metodológicas importantes, relacionadas principalmente aos processos preparativos, sendo que a especificidade é diretamente proporcional à complexidade dos mesmos. Neste trabalho descrevemos a adaptação de um ensaio de rotina, desenvolvido originalmente para a medida de cortisol sérico, para a medida de cortisol urinário. O antisoro empregado, F-79-1, foi estudado quanto à especificidade em relação aos principais metabólitos urinários de cortisol, sendo os resultados obtidos comparáveis aos dos melhores antisoros descritos na literatura. O método preparativo utilizado faz uso de extração de alíquota de urina com diclorometano, seguida de cromatografia em coluna de Sep-Pak Diol. A recuperação média do processo foi de 63,3%; a sensibilidade do ensaio é da ordem de 1,6 µg/L e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio da ordem de 7,2 e 15,6%, respectivamente. Os resultados obtidos em 40 amostras de indivíduos normais foram de 21,9 a 74,1 µg/24hs (média de 47,8); a comparação com método semelhante de laboratório de referência internacional mostrou alta correlação ($R=0,9286$, $n=74$, $p<0,001$). Em quatro pacientes com doença de Cushing comprovada os valores foram significativamente elevados. O presente método, empregando antisoro próprio e processo preparativo simples, vai permitir uma aplicação mais ampla do teste e uma melhor avaliação de sua utilidade clínica. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/3: 233-8**)

Unitermos: Cortisol livre urinário; Radioimunoensaio; Especificidade de antisoro anti-cortisol; Doença de Cushing.

ABSTRACT

The measurement of 24-hours free urinary cortisol is considered by many authors as the best screening test for Cushing's syndrome. However, the published results are not comparable due to methodological differences between the various available techniques. These differences are related mainly to the preparative process employed, and in general there is a direct relation between the complexity of the process and the degree of specificity achieved. In this publication we describe the adaptation for free urinary cortisol measurement of a routine assay, developed originally for the measurement of serum cortisol. The specificity of the antiserum employed, F-79-1, was studied against the major urinary cortisol metabolites, and the results comparable to the best antisera described in the literature. The preparative method utilized includes dichloromethane extraction followed by a Sep-Pak Diol column chromatography. The mean recovery of the preparative process was 63.3%; the sensitivity of the assay is in the order of 1.6 µg/L, and the intra and inter-assay CVs in the order of 7.2 and 15.6%, respectively. The results obtained in 40 samples from normal adults ranged between 21.9 and 74.1 µg/24hs (mean 47.8); the comparison with a similar method from an international refer-

*José Gilberto H. Vieira
Keiko O. Noguti
Maria da Penha Rayol
Rui M.B. Maciel*

*Setor de Esteróides,
Laboratório Fleury,
São Paulo, SP,*

*Recebido em 10/11/99
Revisado em 12/02/00
Aceito em 20/02/00*

ence laboratory showed a high correlation ($R=0.9286$, $n=74$, $p<0.001$). In four patients with Cushing's disease the values were significantly above the normal range. The method described, employing our own antiserum and a simple preparative process, will allow a broader use of the test, and a better clinical evaluation of its practical value. (*Arq Bras Endocrinol Metab* 2000;44/3: 233-8)

Keywords: Free urinary cortisol; Radioimmunoassay; Anti-cortisol antiserum specificity; Cushing's disease.

APATOLOGIA ADRENAL, COM ESPECIAL ênfase para a síndrome de Cushing, engloba doenças relativamente raras em que o sucesso terapêutico é diretamente proporcional à precocidade diagnóstica. As características clínicas da síndrome de Cushing apresentam-se típicas apenas quando a doença já apresenta tempo de evolução significativo, sendo que nas fases iniciais os sinais e sintomas são comuns a condições muito mais freqüentes, como diabetes, hipertensão e obesidade. Em função disto, para o diagnóstico precoce são fundamentais um alto índice de suspeita e um teste de triagem de alta sensibilidade e, principalmente, especificidade.

A dosagem de cortisol sérico em amostra colhida pela manhã não preenche estes quesitos pois é pouco sensível e específica (1). Já o estudo do ritmo circadiano apresenta melhor performance, principalmente quando incluída amostra noturna, o que no entanto traz problemas práticos de execução. Os testes rápidos de supressão com dexametasona chegam próximo do ideal (2), sendo o único inconveniente a necessidade de ingestão da droga na noite anterior. Ultimamente uma série de publicações tem ressaltado a importância da dosagem de cortisol livre urinário como método inicial para a triagem de pacientes com suspeita de síndrome de Cushing (3), que uma vez solucionados seus potenciais problemas metodológicos parece ser método de interesse prático.

Desde a publicação dos primeiros trabalhos sobre a utilização da dosagem de cortisol livre urinário na rotina clínica, no fim da década de 60 (4), esta metodologia tem tido sua aplicação prática discutida principalmente em razão de problemas metodológicos. Tendo como base que a concentração de cortisol livre na urina de 24 horas reflete a produção de cortisol ao longo do dia, integrando as flutuações circadianas e eliminando o efeito de variações das proteínas carregadoras, sua utilidade potencial no diagnóstico e seguimento de pacientes com disfunções adrenais é óbvia. Um dos problemas potenciais com o método é o incômodo da necessidade de coleta de urina de 24 horas, que além do inconveniente para o paciente, trás consigo uma margem não desprezível de imprecisão.

Adicionalmente, a presença na urina de inúmeros esteróides potencialmente interferentes, especialmente conjugados e hidroxilados, e em concentrações relativas muito mais elevadas que o cortisol livre, faz com que o método seja particularmente problemático quanto à especificidade analítica. O método de referência existente inclui diluição isotópica, cromatografia a gás e espectrometria de massa, o que o torna não aplicável na rotina diagnóstica (5). A procura por um método alternativo, que alie especificidade a praticidade, tem sido uma constante. Métodos que incluem processos cromatográficos mais elaborados, como HPLC (6) ou outros tipos de cromatografia preparatória (7) produzem valores comparáveis aos dos métodos de referência. É de se notar que todos incluem extração prévia da amostra. Métodos diretos ou empregando apenas extração simples (8), se traduzem em valores elevados, mesmo quando empregam antiseros de alta especificidade. Um método aceitável para a rotina diagnóstica deveria incluir um antisoro de especificidade a melhor possível, extração, e processo preparativo simples e reproduzível. O recente trabalho de Morineau et al. (9) descreve um método com essas características, que emprega um processo cromatográfico simples e acessível. Neste trabalho apresentamos os dados obtidos no reestudo de ensaio por nós desenvolvido para a medida de cortisol, a longo tempo em uso para medidas séricas (10), e sua adaptação para a medida de cortisol livre urinário com base no processo preparativo descrito por Morineau et al.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de Urina:

Foram obtidas amostras de urina de 24hs de 40 indivíduos adultos normais, de 18 a 59 anos, sendo 34 do sexo feminino e 6 do masculino. Foram também empregadas no estudo 74 amostras de urina de 24hs de nossa rotina diagnóstica que foram enviadas para o Mayo Medical Laboratory (MML), Rochester, MN, USA, para dosagem de cortisol livre urinário por método competitivo (4), e 4 amostras de pacientes com diagnóstico clínico, laboratorial e radiológico de doença de Cushing.

Reagentes e Materiais

Todos os esteróides empregados no estudo foram obtidos de Steraloids Inc., Newport, RI, USA (www.steraloids.com). Os tampões empregados foram os mesmos empregados no ensaio para cortisol sérico (10) e os solventes foram obtidos da Merck Indústrias Químicas, Rio de Janeiro; o cortisol triciado (1,2,6,7

^3H -cortisol) foi fornecido por New England Nuclear, Boston, MA, USA, e as colunas de Sep-Pak Diol fornecidas por Waters Corporation, Milford, MA. O antisoro empregado no ensaio foi produzido em nosso laboratório a partir de coelho imunizado com conjugado de cortisol-3-oxima-albumina bovina (F-79-1) (10), tendo sido caracterizado quanto à reatividade cruzada de acordo com o método de Abraham (11).

Purificação Cromatográfica e Radioimunoensaio

A uma alíquota de 0,2 mL do volume de urina de 24hs, homogeneizada e centrifugada, adicionamos 0,05 mL de solução de cortisol triciado (2000 cpm). A alíquota é então extraída com 2 mL de diclorometano que é evaporado, sendo o extrato levantado em 1 mL de diclorometano que é então transferido para uma coluna de Sep-Pak Diol, pré-tratada com 5 mL de etanol seguidos de 5 mL de ciclohexana. A eluição é feita com 12 mL de solução de ciclohexana:acetato de etila 85:15, sendo este eluato desprezado; seguem-se 12 mL de ciclohexana:acetato de etila 70:30, sendo este volume recolhido e evaporado. O extrato é então levantado em 2 mL de tampão de ensaio (fosfato-gelatina), e 0,2 mL empregado em cada duplicata do ensaio e 0,4 mL para estudo da recuperação. O volume de incubação do radioimunoensaio é 0,7 mL, incluindo o antisoro num título final de 1/21.000 e 10.000 cpm de cortisol triciado. A incubação é de 12 horas a 4°C e o método de separação empregado é a adição de solução de carvão-dextran.

Métodos Estatísticos

Para comparação entre métodos, extrapolação de faixa de normalidade, estudo da recuperação e definição de sensibilidade, utilizamos o programa EP Evaluator, desenvolvido por David G. Rhoads Associates, Inc., Kennett Square, PA, USA. Este programa emprega o cálculo de regressão segundo Deming para cálculo de declividade e intercepto.

RESULTADOS

Estudo da especificidade do antisoro empregado

Os resultados obtidos no estudo da especificidade do antisoro F-79-1 contra uma série de esteróides e seus conjugados estão apresentados na tabela 1. É de se notar que reatividade cruzada significativa foi observada apenas contra alguns corticosteróides sintéticos (prednisolona e metil-prednisolona) e metabólitos do cortisol. Os resultados são comparáveis aos dos melhores antisoros descritos na literatura (9).

Estudo do processo cromatográfico

Para obtermos uma recuperação satisfatória do cortisol após a cromatografia em coluna de Sep-Pak Diol fizemos modificações nas proporções de solventes empregados originalmente por Morineau et al. (9). Este autor emprega proporções de ciclohexana:acetato de etila de 65:35 e 60:40. Com estas proporções obtivemos recuperações muito baixas, com eluição do cortisol já na primeira fase da cromatografia. A adoção das proporções 85:15 e 70:30 possibilitou resultados satisfatórios. O gráfico representativo de uma cromatografia nas condições padronizadas está mostrado na figura 1. A média das recuperações obtidas em 15 ensaios distintos foi de 63,3±4,8%, com valores entre 53 e 69%.

Características do ensaio

A sensibilidade, calculada com base na dose mínima detectável e num volume urinário de 24hs de 1 litro, foi de 1,6 µg/L. O coeficiente de variação intra-ensaio para uma urina com valor médio de 42,8 µg/24hs foi de 6,5% (n= 8), e para uma urina com valor médio de 238 µg/24hs foi de 8,0% (n= 8). Já o coeficiente de variação inter-ensaio para uma urina com valor médio de 24,1 µg/24hs foi 14,0% (n= 14) e de 17,2% para uma urina com valor médio de 56,7 µg/24hs (n= 7). O estudo da recuperação de cortisol adicionado em diferentes concentrações a uma urina de livre de cortisol mostrou recuperação média de 94,1% (85,3 a 106,7%).

Resultados obtidos nas amostras de urina

Nas 40 amostras de urina dos indivíduos normais obtivemos valores entre 21,9 e 74,1 µg/24hs (com $X \pm DP$ de 47,8±14,3). O estudo da correlação entre os resultados obtidos em 74 amostras no MML e com o nosso método (figura 2) mostrou $R = 0,9286$ ($p < 0,001$), sendo a $X \pm DP$ de 64,5±64,8 µg/24hs para o ensaio feito no MML e 53,6±52,7 µg/24hs para nosso método, valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$); em outras palavras nossa metodologia resulta em valores significativamente mais baixos que os obtidos com o método empregado no MML. Considerando o valor de referência aceito para o método do MML para adultos, de 24,0 a 108 µg/24hs, e aplicando o cálculo de Deming para inclinação e intercepto da correlação, podemos extrapolar valores de referência para nosso método como sendo entre 27 e 86 µg/24hs. Os valores encontrados nos quatro pacientes com doença de Cushing, em condições basais, foram respectivamente 136, 114, 234 e 193 µg/24hs.

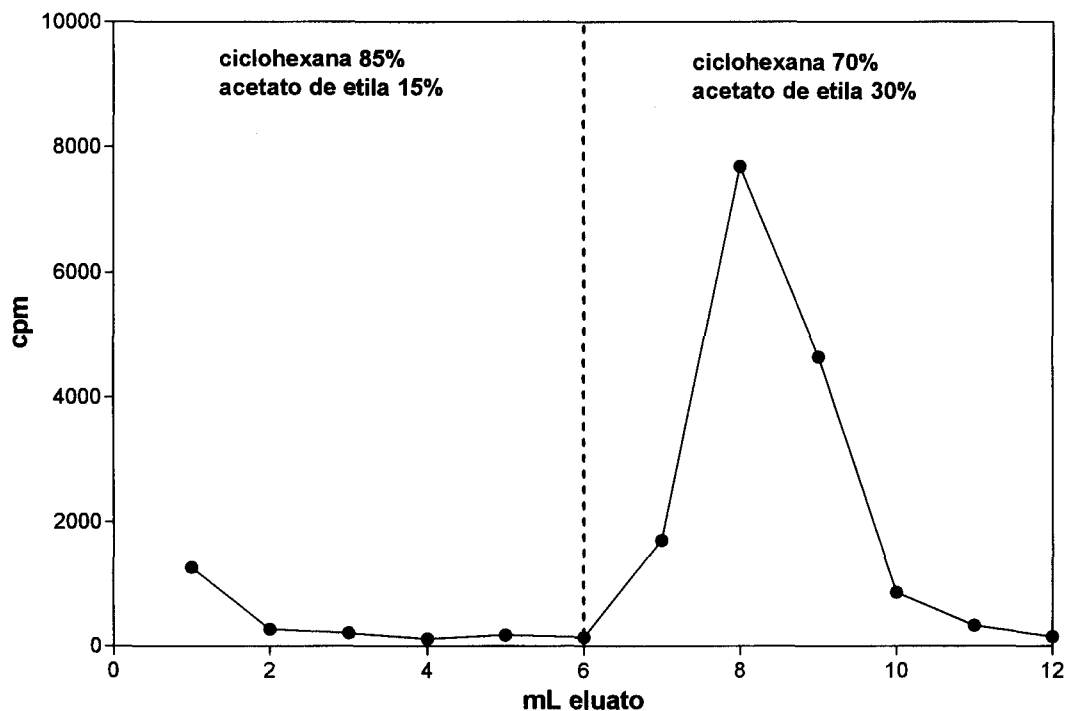


Figura 1: Perfil cromatográfico obtido com a eluição de cortisol triciado em coluna de Sep-Pak Diol com o emprego das misturas de solventes referidas no texto.

Tabela 1: Níveis de reatividade cruzada do antisoro F79-1, calculada percentualmente segundo Abraham (11), dos vários esteróides estudados.

Esteróides	% Reatividade Cruzada
Cortisol	100,0
Aldosterona	<0,012
Corticosterona	1,6
DOC	0,42
Cortisona	8,5
5β-tetrahydrocortisona	<0,012
Cortisol-21-gluconato	0,26
Cortisol-21-sulfato	0,37
21-deoxicortisol	12,2
5α-dihidro cortisol	10,0
5β-dihidro cortisol	2,8
20α-dihidro cortisol	0,09
20β-dihidro cortisol	0,82
6β-hidroxicortisol	2,5
5α-tetrahydrocortisol	5,0
5β-tetrahydrocortisol	0,03
11-desoxicortisol	7,9
5α-tetrahydro-11-desoxicortisol	0,26
5β-tetrahydro-11-desoxicortisol	0,11
Betametasona	0,075
Dexametasona	<0,012
Prednisolona	52,0
6α-metilprednisolona	17,7
Prednisona	3,1
Triancinolona	<0,012

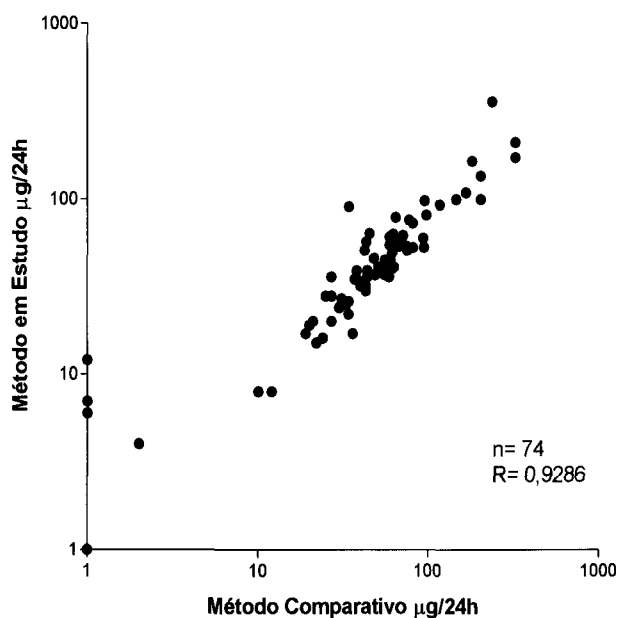


Figura 2: Correlação obtida com a dosagem de 74 amostras de urina pelo método descrito e pelo método empregado no MML.

DISCUSSÃO

O cortisol é o principal produto de secreção das adrenais, e o aumento de sua produção, por causas primárias ou secundárias, o fenômeno básico que dá origem aos sinais e sintomas da síndrome de Cushing. O cortisol circula em sua maior parte ligado a proteínas carregadoras, em especial a globulina ligadora de hormônios corticosteróides (Corticosteroid-Binding Globulin, CBG), sendo sua fração livre, em condições normais, da ordem de 4% (12). A medida do cortisol, com o intuito de caracterizar um aumento de secreção, pode ser efetuado em diferentes fluidos biológicos e de diferentes maneiras. A medida de cortisol total sérico é a mais óbvia e tradicional, apresentando no entanto baixa sensibilidade diagnóstica em função de dois fatores: as variações nas concentrações da CBG e o ritmo circadiano de sua produção (10). Uma alternativa pouco explorada em função de dificuldades metodológicas é a medida da fração livre, que apresenta maior sensibilidade diagnóstica (13). Já a medida do cortisol na saliva seria uma maneira simples de se avaliar a fração livre sérica (14) e sua aplicação, apesar de descrita na década de 60 (15), só ultimamente vem tendo maior aplicação em nosso meio (16).

Quanto à medida da fração livre excretada na urina, teria a vantagem de não sofrer interferência das proteínas ligadoras associada ao fato de, sendo realizada na urina de 24hs, representar uma integração da produção ao longo do dia, afastando os problemas do ritmo de secreção. No entanto esta dosagem também apresenta potenciais problemas, sendo o primeiro o fato de necessitar coleta de urina de 24hs com seus problemas intrínsecos de imprecisão e desconforto. Adicionalmente, problemas metodológicos de especificidade tornam a comparação dos diferentes métodos descritos muito difícil. É atualmente consenso que o ensaio de cortisol livre na urina necessita de um processo de extração seguido de algum processo preparativo adicional, se quisermos obter valores próximos aos dos métodos de referência (8). Outros problemas se referem a valores falsamente baixos em pacientes com queda da função renal (17) ou portadores da síndrome de fadiga crônica (18), falsamente elevados em pacientes com ingestão hídrica acima do normal (19), com depressão (20) e após exercício físico (21). Além disso parece haver uma diferença de excreção urinária de cortisol entre os dois sexos, sendo pouco mais elevada em homens do que em mulheres (22); nossos dados não permitiram este estudo por incluírem um número pequeno de indivíduos do sexo masculino. Apesar de todos estes senões, e uma série

de controvérsias (23-26), a medida de cortisol livre na urina de 24hs vem sendo considerado por muitos autores como o método mais adequado para a investigação inicial de pacientes suspeitos de serem portadores de síndrome de Cushing.

Os resultados por nós obtidos mostraram que o antisoro estudado, produzido contra um derivado de cortisol acoplado a albumina bovina via posição 3, apresenta níveis de reatividade aceitáveis contra os principais interferentes encontrados na urina. Estes resultados são comparáveis aos dos melhores antisoros descritos na literatura (9), e demonstram a impossibilidade de uso deste método em pacientes em uso de alguns corticosteróides sintéticos, em especial prednisolona e metil-prednisolona, em função dos altos níveis de reatividade cruzada. O ensaio em si apresenta bons níveis de sensibilidade, praticidade, reprodutibilidade e recuperação. Os resultados encontrados em uma população normal são comparáveis aos descritos por Morineau et al. (9) para um método equivalente, e os estudos de correlação com método semelhante, porém com processo preparativo mais simples, empregado pelo MML, mostrou altos índices de correlação. Os valores significativamente mais baixos podem ser devidos ao processo preparativo mais elaborado por nós empregado, ou à maior especificidade do nosso antisoro em relação à proteína ligadora empregada no método do MML (4). Os valores encontrados nos quatro pacientes com doença de Cushing foram compatíveis com o diagnóstico.

Em resumo, neste trabalho descrevemos o estudo detalhado de um antisoro contra cortisol e seu emprego no desenvolvimento de um ensaio para a medida de cortisol livre na urina de 24hs. Como método preparativo empregamos o descrito por Morineau et al. (9) que utiliza extração em solvente orgânico e cromatografia em microcolunas pré-fabricadas Sep-Pak Diol. Os resultados obtidos mostraram ser o método sensível, reprodutível e comparável aos descritos na literatura e empregados por laboratórios internacionais de referência. O método propiciará uma difusão maior do emprego da medida de cortisol urinário no diagnóstico de patologias adrenais e propiciará, com o tempo, sua maior validação clínica.

AGRADECIMENTO

Esta publicação também finaliza, do ponto de vista metodológico, as possíveis utilizações de uma série de antisoros produzidos em nossos laboratórios contra um derivado de cortisol-3-oxima-albumina bovina por nós sintetizado em 1975 no laboratório de esteróides

da Universidade do Arizona, em companhia do Prof. Dr. Toshio Ogihara, da Universidade de Osaka, e sob orientação do Prof. Dr. Charles A. Nugent.

REFERÊNCIAS

1. Kater CE, Vieira JGH, Furlanetto RP, Chacra AR, Lima MPC. Determinação do cortisol sérico por radioimunoensaio e sua aplicação no diagnóstico da síndrome de Cushing. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1979;23:155-65.
2. Vieira JGH, Accursio WL, Russo EMK, Maciel RMB, Kater CE, Chacra AR. Estudo do valor do teste rápido de supressão com dexametasona na triagem de pacientes suspeitos de síndrome de Cushing. **Rev Ass Med Brasil** 1985;31:129-32.
3. Invitti C, Giraldi FP, Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:440-8.
4. Murphy BEP. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay. **J Clin Endocrinol Metab** 1968;28:343-8.
5. Palermo M, Shackleton CH, Mantero F, Stewart PM. Urinary free cortisol and the assessment of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. **Clin Endocrinol** 1996;45:605-11.
6. Schöneshöfer M, Fenner A, Dulce JK. Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol. **Clin Chim Acta** 1980;101:125-34.
7. Murphy BEP, Okouneff L, Klein GP, Ngo SC. Lack of specificity of cortisol determinations in human urine. **J Clin Endocrinol Metab** 1981;53:91-9.
8. Murphy BEP. Lack of specificity of urinary free cortisol determinations: why does it continue? **J Clin Endocrinol Metab** 1999; 84:2258-9.
9. Morineau G, Gosling J, Patricot M-C, Soliman H, Boudou P, Halnak AA, et al. Convenient chromatographic pre-purification step before measurement of urinary cortisol by radioimmunoassay. **Clin Chem** 1997;43:786-93.
10. Vieira JGH, Russo EMK, Germek OA, Antunes LAN. Método radioimunológico para a dosagem de cortisol sérico. **Rev Bras Patol Clin** 1979; 15:125-130.
11. Abraham GE. Radioimmunoassay of steroids in biological materials. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1974;183(Suppl):1-42.
12. Dunn JF, Nisula BC, 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** 1981;53:58-6.
13. Vieira JGH, Noguti KO, Russo EMK, Hidal JT, Maciel RMB. Adaptação de um radioimunoensaio de cortisol para a dosagem da fração livre do soro obtida por diálise. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1982;26:105-8.
14. Vieira JGH, Noguti KO, Hidal JT, Russo EMK, Maciel RMB. Ensaio do cortisol na saliva como método para a avaliação da fração livre sérica. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1984;28:8-10.1.
15. Kats FH, Shannon I. Identification and significance of parotid fluid corticosteroids. **Acta Endocrinol (Copenh)** 1964;46:393-8.
16. Martinelli CE, Sader SL, Oliveira EB, Daneluzzi JC, Moreira AC. Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1999;51:67-71.
17. Issa BG, Page MD, Read G, John R, Douglas-Jones A, Scanlon MF. Undetectable urinary free cortisol concentration in a case of Cushing's disease. **Eur J Endocrinol** 1999;140:148-51.
18. Scot LV, Dinan TG. Urinary free cortisol excretion in chronic fatigue syndrome, major depression and healthy volunteers. **J Affect Disord** 1998;47:49-54.
19. Merica MV, Cuttler Jr GB. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:682-4.
20. Diebold K, Kick H, Schmidt G. Urinary free cortisol excretion in endogenously depressed and schizophrenic patients. **Psychiatr Clin (Basel)** 1981;14:43-8.
21. Bonen A. Effects of exercise on excretion rates of urinary free cortisol. **J Appl Physiol** 1976;40:155-8.
22. Raven PW, Taylor NF. Sex differences in human metabolism of cortisol. **Endocr Res** 1996;22:751-5.
23. Montwill J, Igoe D, McKenna TJ. The overnight dexamethasone test is the procedure of choice in screening for Cushing's syndrome. **Steroids** 1994;59:296-8.
24. Tsigos C, Chrousos GP. Differential diagnosis and management of Cushing's syndrome. **Annu Rev Med** 1996;47:443-61.
25. Gorges R, Knappe G, Gerl H, Ventz M, Stahl F. Diagnosis of Cushing's syndrome: re-evaluation of midnight plasma cortisol vs urinary free cortisol and low-dose dexamethasone suppression test in a large patient group. **J Endocrinol Invest** 1999;22:241-9.
26. Goldfarb DA. Contemporary evaluation and management of Cushing's syndrome. **World J Urol** 1999;17:22-5.

Endereço para correspondência

José Gilberto H. Vieira
Laboratório Fleury
Rua Cincinato Braga 282
01333-910, São Paulo, SP
Fax: 0xx11-287-2482,
e-mail: josé.vieira@fleury.com.br