

## Il cortisolo libero urinario nell'ipercortisolismo e nell'insufficienza surrenalica

Alessandro Mondin<sup>1,2</sup>, Carla Scaroni<sup>1,2</sup>, Filippo Ceccato<sup>1,2</sup>, Giorgia Antonelli<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di medicina DIMED, Università degli studi di Padova

<sup>2</sup>Endocrinologia, Azienda Ospedale-Università di Padova

<sup>3</sup>Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale-Università di Padova

### ABSTRACT

#### The urinary free cortisol in corticotroph axis diseases

Cortisol is a steroid hormone secreted from the adrenal glands. It follows a daily circadian rhythm, normally featuring a morning peak followed by a progressive decrease towards a nocturnal nadir. Circadian rhythm in humans arises from the activity of a principal oscillator (master clock) in the hypothalamic supra-chiasmatic nucleus, strictly related to the alternating light-dark cycle. The circadian trend of cortisol guides the diagnostic approach to diseases of the corticotroph axis, in case of both hormone excess and defect.

Here we provide an overview of the clinical applications of urinary free cortisol, an indicator of the global daily cortisol exposure in the human body.

**Parole chiave:** cortisolo, insufficienza surrenalica, analisi urine

### INTRODUZIONE

Il cortisolo è un ormone steroideo che viene secreto dal surrene. Presenta un ritmo circadiano, con un picco al mattino, cui fa seguito una progressiva diminuzione che raggiunge il minimo durante la notte.

Il ritmo circadiano origina dalla attività di un "master clock" che si trova nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo, strettamente legato all'alternanza giornaliera luce-buio. Il ritmo circadiano del cortisolo guida l'approccio diagnostico alle patologie dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, sia in caso di un eccesso che di un deficit dell'ormone.

Scopo di questa rassegna è di presentare una sintesi delle applicazioni cliniche della misura del cortisolo libero urinario, come indicatore dell'esposizione giornaliera dell'organismo al cortisolo.

### IL CORTISOLO LIBERO URINARIO

#### La cortisoloria nell'ipercortisolismo

Il cortisolo libero urinario (UFC) trova il suo principale impiego nella diagnostica di primo livello per la sindrome di Cushing (Cushing's syndrome, CS).

La CS endogena si caratterizza per un eccesso di cortisolo originato da un'autonomizzazione primitiva della secrezione surrenalica o secondaria ad un eccesso dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) ad origine

ipofisaria (causa più frequente) o ectopica (come ad esempio nella sindrome paraneoplastica). Le forme floride si caratterizzano per un fenotipo clinico evidente, con rubeosi, *facies* a luna piena, ipotrofia muscolare, *striae rubrae*, facilità alle ecchimosi, gibbo dorsale; nella donna si manifestano anche acne, irsutismo ed irregolarità mestruali. Le forme lievi possono invece avere fenotipo clinico sfumato, che le rende più difficili da individuare (1,2). La CS comporta un aumentato rischio di eventi cardiovascolari (anche per lo sviluppo di ipertensione arteriosa, diabete mellito, dislipidemia e obesità), un maggior rischio di osteoporosi e fratture, predispone a calcolosi renale, infezioni ed eventi tromboembolici, che nell'insieme concorrono ad una ridotta aspettativa di vita (3). L'eccesso di cortisolo va inoltre ad influire negativamente sulle funzioni cognitive e sulla qualità di vita dei soggetti, con un aumentato rischio di sindrome depressiva (4). Il corretto riconoscimento e trattamento della CS migliora l'aspettativa e la qualità di vita dei pazienti trattati.

La Figura 1 illustra l'algoritmo per la diagnosi della CS endogena. La premessa per tale diagnosi è l'esclusione dell'assunzione di steroidi esogeni per qualsiasi via; a seguire le linee guida suggeriscono di utilizzare una combinazione degli esami disponibili per la dimostrazione dell'ipercortisolismo: UFC, misurazione del cortisolo salivare notturno (late night salivary cortisol, LNSC) e test di soppressione con basse dosi di desametasone (low dose dexamethasone suppression

Corrispondenza a: Filippo Ceccato, Dipartimento di medicina DIMED, Università di Padova, email: [filippo.ceccato@unipd.it](mailto:filippo.ceccato@unipd.it)

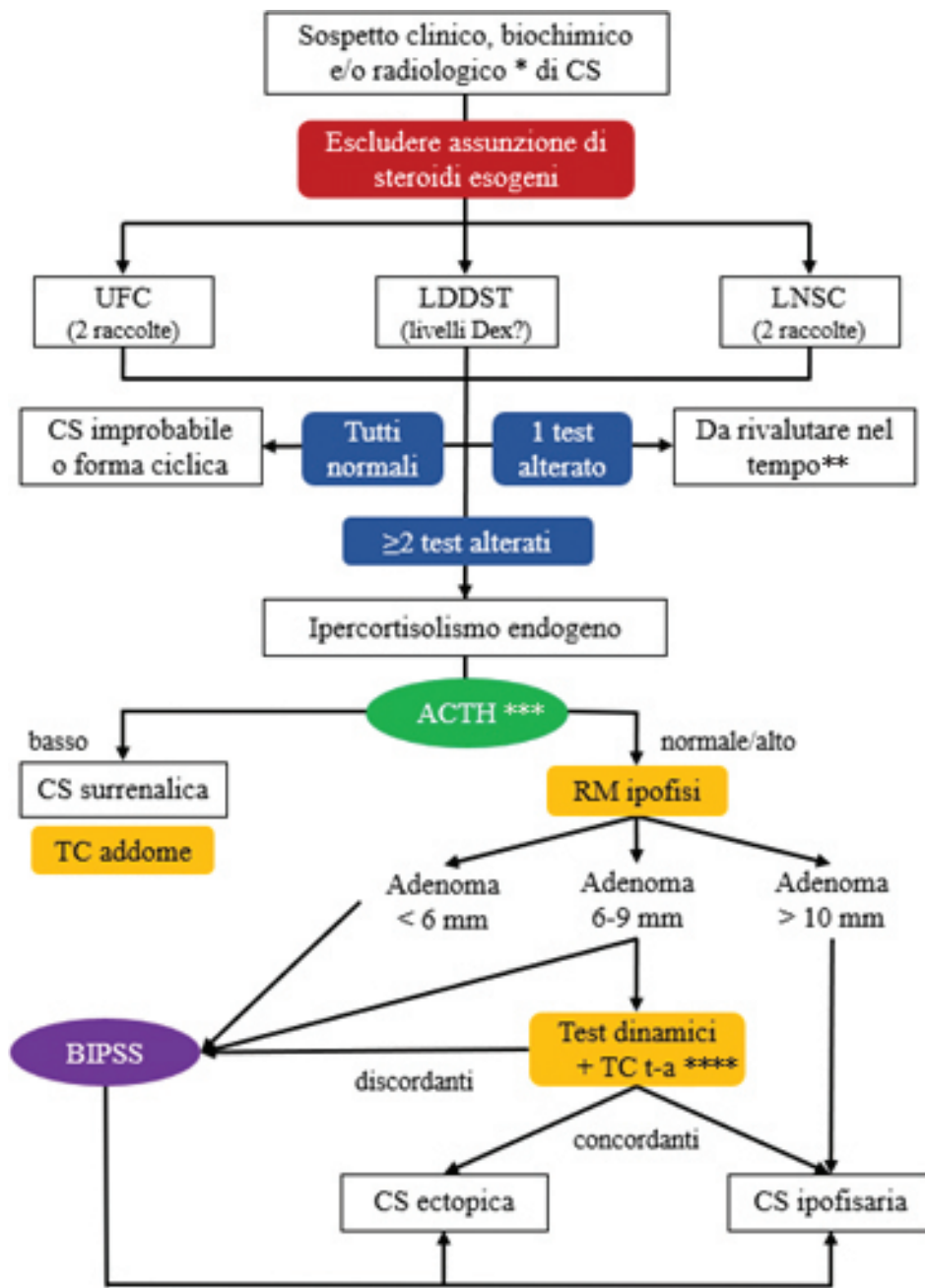
Ricevuto: 08.06.23

Revisionato: 15.06.23

Accettato: 28.06.23

Pubblicato on-line: 03.08.2023

DOI: 10.19186/BC\_2023.055



**Figura 1**

Algoritmo diagnostico per la diagnosi di ipercortisolismo endogeno e per l'identificazione della sede di origine della sindrome di Cushing (surrenalica, ipofisaria o ectopica). Le informazioni rappresentate originano dalle linee guida per la diagnosi di sindrome di Cushing (5) e dal consensus sulla malattia di Cushing (6).

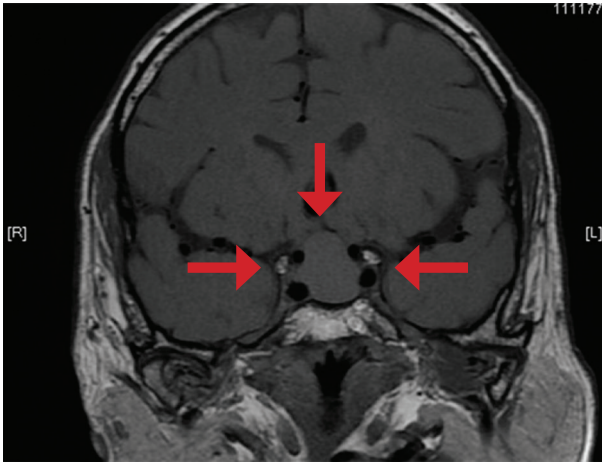
CS, sindrome di Cushing; Dex, desametasone; UFC, cortisolo libero urinario; LDDST, test di soppressione con basse dosi di Desametasone; LNSC, misurazione del cortisolo salivare notturno; TC, tomografia computerizzata; RM, risonanza magnetica; BIPSS, cateterismo dei seni di petrosi; t-a, torace-addome.

\* e.g., incidentaloma surrenalico o ipofisario.

\*\* considerare anche un ipercortisolismo non-neoplastico (7).

\*\*\* valutare un test con corticotropina nei casi dubbi (6).

\*\*\*\* test con corticotropina e test con desmopressina



**Figura 2**

*Risonanza magnetica ipofisaria che mostra un macroadenoma ipofisario.*

test, LDDST) per il cortisolo sierico (5). L'alterazione di due test su tre è indicativa di CS. Una recente metanalisi ha dimostrato come tutti questi test presentino ottime e simili prestazioni, ma con maggior sensibilità del test di soppressione con desametasone (8). La normalità dei test rende poco probabile la presenza di una CS, anche se non si possono escludere le forme cicliche (9). Una volta confermato l'ipercorticismismo, i livelli di ACTH guidano la successiva diagnostica, mirata ad identificare l'origine dell'eccesso di cortisolo (Figura 1). In caso di valori bassi, nel sospetto di una forma ACTH dipendente, va eseguito un imaging surrenalico. In caso di ACTH normale o elevato, il proseguo dipende dall'esito della risonanza magnetica (Figura 2). In caso di macroadenoma si presume una CS ad origine ipofisaria, negli altri casi è indicata l'esecuzione di un cateterismo dei seni di petrosi (bilateral inferior sinus petrous sampling, BIPSS) per stabilire l'origine dell'eccesso di ACTH. In caso di microadenoma di almeno 6 mm, in centri con adeguata competenza, è possibile percorrere una via non invasiva che prevede l'esecuzione di test dinamici (test con corticotropina e test con desmopressina) e di una tomografia (TC) torace-addome. Una risposta ai test con TC negativa suggerisce una CS ipofisaria, mentre l'assenza di risposta ai test con identificazione di lesione sospetta alla TC suggerisce una CS ectopica. Esiti discordanti richiedono comunque l'esecuzione di un cateterismo dei seni petrosi (6).

L'applicazione dei test di primo livello per l'ipercorticismismo richiede la conoscenza dei rispettivi punti di forza e di debolezza, come esposto di seguito.

Il LNSC dimostra la perdita del fisiologico ritmo circadiano del cortisolo caratteristica della CS. È un test pratico (specie nel paziente ambulatoriale), che misura il cortisolo direttamente nella sua forma libera e può essere utile per l'individuazione di forme cicliche di CS (9). Tale esame non è adatto in caso di soggetti con turno lavorativo notturno, che possono presentare un dato falsamente alterato. La raccolta deve inoltre essere effettuata correttamente: il dispositivo (Salivette®) va

impiegato come illustrato in scheda tecnica, prima di coricarsi, evitando fattori interferenti (ad esempio, fumo, assunzione di liquirizia) e a distanza dal lavaggio dei denti (rischio di falso positivo da campionamento del cortisolo plasmatico legato, dopo traumatismo gengivale). Data l'ampia variabilità intra-personale inter-giornaliera del parametro è opportuno valutarlo in almeno due occasioni (10). Metodi in spettrometria di massa sono preferibili per limitare il rischio di esiti falsamente positivi per cross-reazione con metaboliti steroidei (*vide infra*). È inoltre stato descritto un aumento del cortisolo salivare notturno in soggetti eucortisolemici con diabete, ipertensione o età avanzata (11), che presentano quindi un rischio di esito falsamente positivo.

Nel LDDST viene valutato il cortisolo sierico al risveglio dopo assunzione del desametasone per os (1 mg la sera precedente o 2 mg nelle 48 ore precedenti). Una mancata soppressione del cortisolo è indicativa di un'autonomia nella secrezione di cortisolo, svincolata dal fisiologico feedback ipotalamo-ipofisario. Il test però dipende fortemente da molteplici fattori:

- proteine leganti il cortisolo. Il cortisolo plasmatico è infatti legato in circolo alle proteine plasmatiche e risente di modifiche nella concentrazione di queste ultime. Terapia estrogenica, gravidanza ed epatite acuta aumentano le proteine leganti il cortisolo, con possibile risultato falsamente positivo; viceversa, nella sindrome nefrosica per la perdita proteica e la conseguente riduzione della frazione legata del cortisolo si può avere un valore falsamente negativo;
- assorbimento del desametasone. La presenza di malassorbimento (ad esempio in caso di diarrea cronica, o celiachia) può determinare esito falsamente positivo del test;
- metabolismo del desametasone. Il citocromo CYP3A4 è deputato al metabolismo del desametasone: farmaci induttori dell'attività di tale citocromo possono dare esiti falsamente positivi al test, mentre farmaci inibitori possono dare risultati falsamente negativi.

La desametasonemia può essere un valido strumento nei casi di alterato assorbimento e/o metabolismo del desametasone (12).

Il valore dell'UFC è caratterizzato, come quello del LNSC, da ampia variabilità intra-personale inter-giornaliera (13), per cui le linee guida raccomandano la sua valutazione in almeno due occasioni. I vantaggi di tale determinazione includono la misurazione dell'ormone libero (che non risente cioè di variazioni nei livelli delle proteine leganti) e la diffusione della metodica nel territorio. Va però prestata attenzione in caso di compromissione della funzione renale (velocità di filtrazione glomerulare <60ml./min) o poliuria (diuresi giornaliera >5 L), che possono determinare esiti rispettivamente falsamente negativo e positivo. La cortisoloria risente inoltre delle caratteristiche antropometriche del paziente (sesso, età e indice di massa corporea) (14). Inoltre, il paziente va istruito per una corretta raccolta del campione al fine di evitare errori preanalitici.

I metodi maggiormente utilizzati per la misura del cortisolo sono di tipo immunometrico oppure, la più recente cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa

tandem (LC-MS/MS). I sistemi basati su anticorpi (oggi quasi esclusivamente metodi immunochemiluminescenti) possono essere soggetti a problemi di cross-reattività: steroidi endogeni o esogeni con struttura molecolare simile a quella del cortisolo possono venire legati dal sistema di rilevazione e determinare una misura falsamente elevata o falsamente diminuita, a seconda della tipologia del metodo (diretto o competitivo). Viceversa, la LC-MS/MS consente una accurata identificazione e quantificazione dei glucocorticoidi e dei loro metaboliti, tanto da essere considerato il gold-standard per gli steroidi.

Nel caso della determinazione del cortisolo urinario, Raff et al. hanno valutato l'influenza del tipo di metodo in caso di ipercorticismi lievi (15). Il cortisolo viene normalmente escreto in minima parte dal rene, sia a causa dell'importante legame con le proteine plasmatiche, sia perché ampiamente metabolizzato in sede epatica. Ne consegue che il cortisolo compare nelle urine solo se la quota circolante eccede la capacità legante plasmatica, eventualità che potrebbe non realizzarsi per un ipercorticismo lieve. Viceversa, metaboliti del cortisolo prodotti a livello epatico in corso di ipercortisolismo anche lieve, presentano una eliminazione renale significativamente maggiore e cross-reagendo con il sistema di rilevazione immunometrico potrebbero migliorare la sensibilità dell'UFC. I dati di una recente metanalisi (8) sembrerebbero suffragare tale ipotesi, mostrando una sensibilità leggermente maggiore dei metodi immunometrici rispetto a quelli in spettrometria di massa [sensibilità e intervallo di confidenza al 95% (IC95%)]: 92,5%; 87,4-95,6 *versus* 90,3%; 82,4%-94,9%. Tuttavia, l'ampiezza degli intervalli di confidenza e il limitato numero di studi disponibili sulla LC-MS/MS non permettono conclusioni definitive. Anche se ancora lontana dalla pratica clinica, la possibilità di effettuare un "profilo steroideo" attraverso l'analisi di molteplici steroidi e relativi metaboliti con metodi LC-MS/MS potrebbe migliorare le prestazioni diagnostiche dell'analisi urinaria (16).

Nell'ipercorticismo, l'eccesso di cortisolo satura l'enzima 11 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi di tipo 2, che media la sua inattivazione a cortisone. Pertanto, l'utilizzo del rapporto cortisolo/cortisone nelle urine delle 24 ore è stato proposto come possibile ulteriore marcatore diagnostico per la CS. In un precedente lavoro del nostro gruppo, i livelli di cortisoloria misurati in LC-MS/MS si sono dimostrati superiori nella diagnostica della CS rispetto al rapporto cortisolo/cortisone; dai risultati ottenuti in questo lavoro, quest'ultimo sembra avere invece un ruolo nella diagnosi differenziale delle forme di CS ACTH-dipendenti, in quanto più elevato in quelle ectopiche (17). Il dato non è stato ulteriormente confermato e quindi, sebbene i metodi in LC-MS/MS facilmente riescano a quantificare contemporaneamente i due steroidi, non è ancora raccomandabile la valutazione del rapporto cortisolo/cortisone in tutte le richieste di cortisoloria (ma solo su esplicita e motivata richiesta da parte del clinico).

Soggetti con patologia surrenalica benigna e ipercorticismo florido sono candidabili a trattamento specifico (surrenectomia nelle forme monolaterali,

terapia medica ed eventuale monosurrenectomia nelle forme bilaterali). Tuttavia, in alcuni casi si può riscontrare una condizione di secrezione autonoma di cortisolo che non si associa ad ipercorticismo florido e che presenta basso rischio di evoluzione verso quest'ultimo. Tale condizione non presenta un'indicazione univoca ad un trattamento specifico, che va considerato sulla base delle caratteristiche del paziente e delle sue comorbidità. In ogni caso è infatti indicata in questi soggetti una valutazione delle comorbidità cortisolo-correlate (ipertensione arteriosa, diabete, fragilità ossea). La diagnosi di una secrezione autonoma di cortisolo si basa sulla dimostrazione di una mancata soppressione dopo LDDST (cortisolo post >50 nmol/L), senza tuttavia altre evidenze della presenza di un franco ipercortisolismo (cortisolo post <138 nmol/L). In questa fascia grigia, l'UFC può essere un valido strumento per riconoscere la presenza di un ipercorticismo florido che richiede, come anticipato, una terapia specifica a prescindere dal quadro clinico (18). In questo contesto l'alterazione del ritmo circadiano è meno sensibile.

La cortisoloria inoltre costituisce il principale dato biochimico da utilizzare nel monitoraggio dei pazienti con CS in corso di terapia medica, con l'eccezione dei bloccanti recettoriali (ad esempio mifepristone). Anche in questo contesto è importante considerare la metodica utilizzata, in quanto i metodi immunometrici possono risentire dell'accumulo di metaboliti in corso di terapia con inibitori della steroidogenesi. In un recente lavoro, la terapia con ketoconazolo e metirapone, modificando l'escrezione urinaria di alcuni metaboliti steroidei, finiva paradossalmente col ridurre il rischio di sovrastima dei metodi immunometrici rispetto al pretrattamento, con conseguente sovrastima anche dell'efficacia terapeutica (19).

### La cortisoloria nell'insufficienza surrenalica

L'insufficienza surrenalica (adrenal insufficiency, AI) origina da una compromissione della secrezione ormonale lungo l'asse corticotropo, la cui causa può interessare i surreni o il distretto ipotalamo-ipofisario. Solo nel primo caso oltre al deficit di secrezione di cortisolo i pazienti presentano anche un deficit mineralcorticoide e manifestano iperpigmentazione cutanea. L'utilizzo prolungato di steroidi esogeni può determinare un iposurrenalismo su base funzionale alla sospensione, specie in caso di trattamento prolungato. In questi casi si richiede una graduale riduzione della posologia della terapia steroidea, con sospensione solo in caso di comprovata ripresa dell'asse corticotropo. L'insufficienza surrenalica è una condizione ad eziologia eterogenea, con quadro clinico variabile anche in funzione della riserva surrenalica residua. Si caratterizza per: calo ponderale, astenia, mialgie, addominalgie, ipotensione, ipoglicemia ed iponatriemia. Eventi stressogeni possono precipitare l'iposurrenalismo conducendo ad una crisi surrenalica, condizione potenzialmente fatale se non riconosciuta e trattata in tempo; le recenti linee guida pongono enfasi sull'educazione dei pazienti alla prevenzione e al riconoscimento precoce delle crisi. La diagnosi biochimica



si basa sulla valutazione del cortisolo sierico mattutino basale o dopo stimolo con ACTH (Synacthen®) (20,21).

Il ruolo dell'UFC è limitato in questo contesto clinico, ma un recente lavoro ha messo in evidenza una correlazione tra i livelli di cortisolemia (e di cortisone urinario delle 24 ore) e il rischio di sviluppare crisi surrenaliche in pazienti con AI secondaria (22). Inoltre, la cortisolemia può avere un ruolo nella valutazione del paziente in terapia sostitutiva, specie se si sospetta un eccesso di trattamento. Anche in questo contesto l'utilizzo della LC-MS/MS e l'esecuzione di un profilo steroideo potrebbero avere un ruolo. Un recente lavoro ha mostrato come pazienti con iposurrenalismo primitivo in trattamento sostitutivo convenzionale presentino una sovraesposizione al cortisolo rispetto ai soggetti sani, che potrebbe giustificare alcune complicanze metaboliche che caratterizzano questa patologia; l'utilizzo di formulazioni a rilascio modificato di idrocortisone sembrerebbe limitare le alterazioni dello steroidoma urinario nei soggetti iposurrenalici, con verosimile minore rischio di complicanze cortisolo-correlate (23).

### CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

### BIBLIOGRAFIA

1. Minnetti M, Hasenmajer V, Pofi R, Venneri MA, Alexandraki KI, Isidori AM. Fixing the broken clock in adrenal disorders: focus on glucocorticoids and chronotherapy. *J Endocrinol* 2020;246:R13-R31.
2. Barbot M, Zilio M, Scaroni C. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2020;34:101380.
3. Limumpornpetch P, Morgan AW, Tiganescu A, Baxter PD, Nyawira Nyaga V, Pujades-Rodriguez M, et al. The effect of endogenous Cushing syndrome on all-cause and cause-specific mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;107:2377-88.
4. Webb SM, Valassi E. Quality of life impairment after a diagnosis of Cushing's syndrome. *Pituitary* 2022;25:768-71.
5. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1526-40.
6. Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz NR, et al. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2021;9:847-75.
7. Scaroni C, Mondin A, Ceccato F. How to rule out non-neoplastic hypercortisolemia (previously known as pseudo-cushing). *Pituitary* 2022;25:701-4.
8. Galm BP, Qiao N, Klibanski A, Biller BMK, Tritos NA. Accuracy of laboratory tests for the diagnosis of Cushing syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:dga105.
9. Cai Y, Ren L, Tan S, Liu X, Li C, Gang X, et al. Mechanism, diagnosis, and treatment of cyclic Cushing's syndrome: A review. *Biomed Pharmacother* 2022;153:113301.
10. Sandouk Z, Johnston P, Bunch D, Wang S, Bena J, Hamrahian A, et al. Variability of Late-Night Salivary Cortisol in Cushing disease: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:983-90.
11. Liu H, Bravata DM, Cabacchan J, Raff H, Ryzen E. Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:642-9.
12. Ceccato F, Artusi C, Barbot M, Lizzul L, Pinelli S, Costantini G, et al. Dexamethasone measurement during low-dose suppression test for suspected hypercortisolism: threshold development with and validation. *J Endocrinol Invest* 2020;43:1105-13.
13. Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, Sen K, et al. High variability in baseline urinary free cortisol values in patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014;80:261-9.
14. Petersenn S. Biochemical diagnosis of Cushing's disease: screening and confirmatory testing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2021;35:101519.
15. Raff H, Auchus RJ, Findling JW, Nieman LK. Urine free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome: is it worth doing and, if so, how? *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:395-7.
16. Eisenhofer G, Masjkur J, Peitzsch M, Di Dalmazi G, Bidlingmaier M, Grüber M, et al. Plasma Steroid metabolome profiling for diagnosis and subtyping patients with Cushing syndrome. *Clin Chem* 2018;64:586-96.
17. Ceccato F, Antonelli G, Barbot M, Zilio M, Mazzai L, Gatti R, et al. The diagnostic performance of urinary free cortisol is better than the cortisol:cortisone ratio in detecting de novo Cushing's syndrome: the use of a LC-MS/MS method in routine clinical practice. *Eur J Endocrinol* 2014;171:1-7.
18. Ceccato F, Barbot M, Scaroni C, Boscaro M. Frequently asked questions and answers (if any) in patients with adrenal incidentaloma. *J Endocrinol Invest* 2021;44:2749-63.
19. Vega-Beyhart A, Laguna-Moreno J, Díaz-Catalán D, Boswell L, Mora M, Halperin I, et al. Ketoconazole- and Metyrapone-induced reductions on urinary steroid metabolites alter the urinary free cortisol immunoassay reliability in Cushing syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:833644.
20. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, et al. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:364-89.
21. Fleseriu M, Hashim IA, Karavitaki N, Melmed S, Murad MH, Salvatori R, et al. Hormonal replacement in hypopituitarism in adults: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3888-921.
22. Vulto A, van Faassen M, Kerstens MN, van Beek AP. Susceptibility to adrenal crisis is associated with differences in cortisol excretion in patients with secondary adrenal insufficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:849188.
23. Espiard S, McQueen J, Sherlock M, Ragnarsson O, Bergthorsdottir R, Burman P, et al. Improved urinary cortisol metabolome in Addison disease: a prospective trial of dual-release hydrocortisone. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:814-25.