



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LORENA ALMEIDA SILVA

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ENSAIO
AUTOMATIZADOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA
DOSAGEM DE TSH (*HORMÔNIO ESTIMULANTE DA TIREÓIDE*)**

CAMPINA GRANDE-PB

2011

LORENA ALMEIDA SILVA

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ENSAIO
AUTOMATIZADOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA
DOSAGEM DE TSH (*HORMÔNIO ESTIMULANTE DA TIREÓIDE*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de artigo científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de bacharel no curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Josimar dos Santos

Medeiros

CAMPINA GRANDE-PB

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

S586c Silva , Lorena Almeida.

Comparação de dois métodos de ensaio automatizados por quimioluminescência para dosagem de TSH (hormônio estimulante da tireóide) [manuscrito] / Lorena Almeida Silva. – 2011.

26 p.: il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros, Departamento de Farmácia”.

1. Dosagem hormonal. 2. Imunoensaios Quimioluminescentes.
3. Tireóide. I. Título.

21. ed. CDD 571.74

LORENA ALMEIDA SILVA


**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ENSAIO
AUTOMATIZADOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA
DOSAGEM DE TSH (HORMÔNIO ESTIMULANTE DA TIREÓIDE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de artigo científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de bacharel no curso de Farmácia.

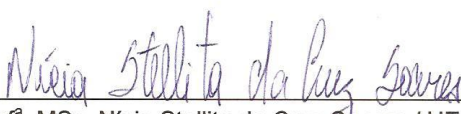
Orientador: Prof. Dr. Josimar dos Santos

Medeiros

Aprovado em: 09 de Junho de 2011.



Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros / UEPB
Orientador



Prof.ª MSc. Nícia Stellita da Cruz Soares / UEPB
Examinadora



Prof. Espec. André Luiz Correia Ramos / UEPB
Examinador

***Aos meus queridos pais, João e Zoraide,
pela ajuda incondicional na minha
formação, amor, dedicação e incentivo.***

Essa conquista tão sonhada,
dedico a vocês. O meu carinho e
minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu companheiro de todas as horas, meu Pai amado, Luz da minha vida, a quem dedico tudo que sou e tudo que tenho.

Aos meus pais, **João e Zoraide**, pelo amor e apoio incondicional. Por fazerem do meu sonho, o seu sonho. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Carol, João Paulo e Érica**, fonte de amor, incentivo e carinho em minha vida. Vocês também fazem parte dessa conquista.

À minha avó, **Zélia**, por seu amor e atenção incansáveis.

À minha amada e numerosa **Família**, Tios, Tias, primos e primas, meu maior tesouro, por todo o apoio, amor e união. Obrigada por acreditarem e confiarem na minha luta.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Josimar dos Santos Medeiros**, que, com muita dedicação, me orientou, incentivou e acreditou no desenvolvimento desta pesquisa, e me apoiou em toda minha jornada da graduação. Muito obrigada por toda a paciência e colaboração.

Aos Professores, **André Ramos e Nícia Stellita**, por quem tenho grande respeito e admiração. Agradeço pelo apoio e carinho durante toda a minha jornada nesta Universidade.

Às Dras. **Yette Cruz, Marta Gouveia e Nifrance**, pela ajuda na realização desta pesquisa. Muito obrigada pelo carinho e atenção dispensados.

A toda equipe do **Centro de Endocrinologia e Metabologia Ltda – Pró-Sangue Diagnóstico**, por viabilizar a realização desta pesquisa e por transmitir tanto carinho e confiança.

Às minhas colegas e grandes amigas, **Alexsandra, Anna Flávia e Marília**, pela amizade, incentivo e carinho compartilhado nesta jornada. Vocês estarão sempre em meu coração. Obrigada por tudo.

Aos meus **colegas de turma**, perseverantes na busca pelo sonho comum: tornar-se FARMACÊUTICO! Obrigada por todos os momentos compartilhados.

Ao meu namorado, **Fabício**, pelo amor, companheirismo e apoio irrestrito em todos os momentos.

Às minhas **amigas e amigos**, pela amizade verdadeira e apoio constante.

À minha **família EJC**, Rosas para Cristo, dom de Deus em minha vida.

Obrigada pelo carinho e torcida.

Às minhas primeiras professoras, **Maria e Ana Querubina**, que me apresentaram o mundo das palavras e por sempre me apoiarem na realização deste sonho. Muito obrigada.

A todos os **funcionários do Departamento de Farmácia** da Universidade Estadual da Paraíba, por toda ajuda durante a Graduação.

A tantos outros amigos, professores, que, de algum modo e em algum momento da minha vida, colaboraram para que eu pudesse concluir este trabalho. O meu sincero agradecimento.

COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ENSAIO AUTOMATIZADOS POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA PARA DOSAGEM DE TSH (*HORMÔNIO ESTIMULANTE DA TIREÓIDE*)

Comparison of two automated test methods for determination of chemiluminescent TSH (thyrotropin)*

Lorena Almeida Silva¹ & Josimar dos Santos Medeiros²

RESUMO – Para a pesquisa patológica, diagnóstico clínico e para a avaliação do curso da terapia da doença da tireóide, é necessário determinar, com precisão, a concentração plasmática do hormônio TSH (tireotrofina). Os imunoenaios quimioluminescentes representam uma ferramenta importante nesta determinação. Assim, este estudo objetivou avaliar o doseamento do hormônio TSH frente a dois aparelhos de fabricantes e metodologia de testes distintos: o Immulite 1000® (Siemens Healthcare Diagnostics, United Kingdom) e o Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Itália), comparando seus valores. O trabalho foi realizado no Centro de Endocrinologia e Metabologia Ltda, no município de Campina Grande, Paraíba, por meio de uma pesquisa transversal e experimental de caráter quantitativo no período de março a maio de 2011. Participaram da pesquisa 47 pacientes de ambos os sexos, escolhidos aleatoriamente, que realizaram dosagens hormonais de TSH no período. O Liaison® apresentou valores de coeficiente de variação, desvio-padrão e amplitude ligeiramente superiores aos do Immulite 1000®, porém estes valores ainda estão dentro da faixa aceitável, ainda houve diferença nos parâmetros tempo, volume de amostra e espectro de análise. Deste modo, é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados emitidos pelos dois aparelhos, e especialmente estabelecer um valor de referência normal para a população atendida pelo laboratório.

PALAVRAS-CHAVE – Dosagem hormonal, TSH, Imunoenaios Quimioluminescentes.

SUMMARY - For the pathological search for clinical diagnosis and for assessing the course of therapy of thyroid disease, it is necessary to accurately determine the plasma concentration of the hormone TSH (thyrotropin). Chemiluminescent immunoassays represent an important tool in this determination. This study aimed to evaluate the assay of the hormone TSH in the face of two aircraft manufacturers and testing methodology distinct Immulite 1000® (Siemens Healthcare Diagnostics, United Kingdom) and Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Italy), comparing their values. The study was conducted at the Center for Endocrinology and Metabolism, Inc., in Campina Grande, Paraíba, through a cross-sectional quantitative character of the period from March to May 2011. Study participants 47 patients of both sexes, randomly selected, who underwent hormone levels of TSH in the period. The Liaison® showed coefficients of variation, standard deviation and range slightly higher than the Immulite 1000®, however, these values are still within the acceptable range, although there was no difference in the parameters time, sample volume and spectrum analysis. Thus, care must be taken in interpreting the results issued by the two devices, and especially to establish a normal reference value for the population served by the laboratory.

KEYWORDS – Dosage hormone, TSH, Chemiluminescent Immunoassays.

*Pesquisa realizada no Centro de Endocrinologia e Metabologia Ltda., Campina Grande, Paraíba, Brasil.

¹ Discente do Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

² Doutor, Docente do Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

INTRODUÇÃO

As funções do organismo são reguladas por dois grandes sistemas de controle: o sistema nervoso e o sistema hormonal ou endócrino. Em geral, o sistema hormonal está relacionado principalmente ao controle das diferentes funções metabólicas do organismo através da secreção de hormônios. Estes podem ser definidos como hormônios locais, exercem efeitos locais específicos, e hormônios gerais, que são, em sua grande maioria, secretados por glândulas endócrinas específicas (GUYTON e HALL, 2006).

Os Hormônios funcionam como mensageiros químicos, regulando diversas atividades corpóreas, sendo produzidos pelo organismo em células ou glândulas especiais. A hipófise ou pituitária é a que realiza maior número de funções; seus hormônios têm desempenho sobre diversas outras glândulas endócrinas, estimulando-as nas suas atividades. O TSH (*Thyroid Stimulating Hormone* ou hormônio estimulador da tireóide ou tirotrófina) é um desses hormônios e tem a função de regular a glândula tireóide (HEDGE e cols., 1988), além de aumentar a velocidade da maioria das reações químicas ocorridas no organismo (CASTRO, 2001).

A função tiroideana é regulada pelo hormônio liberador de tirotrófina (TRH) produzido no hipotálamo que, por meio do sistema porta hipotálamo-hipofisário, se dirige à adeno-hipófise, ligando-se em receptores específicos no tirotrofo e induzindo a síntese e secreção de hormônio tirotrófico (TSH). Este, por sua vez, interage com receptores presentes na membrana da célula folicular tiroideana induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de hormônios tiroideanos, aumentando a atividade da célula tiroideana e estimulando a secreção hormonal (NUNES, 2003).

O TSH é um hormônio pertencente à família dos hormônios glicoproteicos, que inclui o hormônio luteinizante (LH), o folículo estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica humana (HCG). Ele compartilha com essa família a mesma subunidade alfa, tendo uma subunidade beta específica (MILHORANSA & SOARES, 2009).

A tireóide secreta dois hormônios indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos, a tiroxina e a triiodotironina, conhecidos

comumente como T_4 e T_3 , respectivamente (GUYTON e HALL, 2006). A importância dos hormônios tireoideanos (HTs) no desenvolvimento, homeostase, proliferação e diferenciação celular tem sido bem documentada. Sabe-se que, nos mamíferos, os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, como o do sistema nervoso central, consumo de oxigênio, regulação da temperatura corporal, frequência cardíaca e também o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, participam da síntese e a degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários (BARRA e cols., 2004).

A secreção hipofisária de TSH regula a secreção de T_4 (tiroxina) e T_3 (triiodotironina), que por sua vez exercem "feedback" negativo no controle de secreção dos hormônios da tireóide, sendo que, a medida que ocorre um aumento na secreção de T_3 e T_4 , o metabolismo celular aumenta. Este aumento promove, no hipotálamo, redução na secreção de TRH (fator de liberação da tirotrófina), provocando uma redução na secreção de TSH pela adeno-hipófise e, redução de T_3 e T_4 pela tireóide, reduzindo o metabolismo basal celular. Desta forma, quando a função hipotálamo-hipofisária está intacta, pequenas alterações nas concentrações dos hormônios tireoideanos livres resultam em grandes concentrações séricas de TSH, tornando o mesmo, melhor indicador de alterações discretas da produção tireoideana. A secreção do TSH possui um ritmo circadiano com os pulsos da secreção ocorrendo entre 22hs e 4hs da madrugada sendo seus níveis médios entre cerca de, 1,3 e 1,4 $\mu\text{UI/mL}$, com limites inferiores entre 0,3 e 0,5 $\mu\text{UI/mL}$ e limites superiores entre 3,9 e 5,5 $\mu\text{UI/mL}$ (AMATO e cols., 2009).

O diagnóstico de desordens endócrinas e o entendimento de como os hormônios são regulados fisiologicamente, fizeram com que vários métodos de dosagens de hormônios fossem desenvolvidos. Antes da década de 60, substâncias presentes em pequenas quantidades no sangue e em outros fluidos, eram extremamente difíceis de serem dosadas. Até então, quimio e bioensaios dessas substâncias, usualmente hormônios, eram realizados, obtendo-se respostas com pouca precisão.

A técnica utilizando anticorpo como ligante (Imunoensaio) foi descrito pela primeira vez por Yallow e Berson em 1960. O trabalho de Yallow e Berson

começou com os estudos sobre o comportamento do Iodo 131, marcando proteínas in vivo. O trabalho consistiu na injeção de insulina marcada e não marcada, verificando que o antígeno não-marcado, por competição, inibia a ligação do antígeno marcado ao anticorpo. Desenvolveram um ensaio para detectar e quantificar a insulina no soro de pacientes utilizando anticorpos antiinsulina, baseando numa nova técnica de ensaios de ligação por competição. Neste mesmo ano (1960), Ekins, na Inglaterra, desenvolveu um método similar para a determinação das concentrações da tiroxina no plasma, o qual era também baseado no princípio da ligação competitiva, embora ele empregasse uma proteína carreadora ao invés de anticorpo (BREUER e col., 1976).

Em 1971, Engvall e Perlmann determinaram quantitativamente a imunoglobulina G através da técnica de enzima imunoensaio.

A partir destes eventos, surgiram várias técnicas na medição de hormônios e outras substâncias presentes em quantidades mínimas nos fluidos corpóreos (drogas, enzimas e hormônios), sendo utilizado amplamente o radioimunoensaio (BURDON e col., 1990).

.Ao longo do tempo o radiomonoensaio, desenvolvido inicialmente para dosagem de insulina por Yallow e Berson, em 1959, foi sendo substituído gradativamente por outros métodos imunológicos, como os ensaios que utilizam compostos fluorogênicos, quimiluminogênicos e enzimáticos como marcadores (MOURA e col., 2001; STEINBECK & WYNER, 1993).

No imunoensaio quimioluminescente, o anticorpo sinalizador é marcado com um composto quimioluminescente, que emite luz quando combinado a um reagente disparador, como resultado de uma reação química. O luminol e o isoluminol foram os primeiros compostos quimioluminescentes a serem usados em imunoensaios e, atualmente, há vários compostos disponíveis, entre eles os ésteres de acridina e sulfonamida, que reage com uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio, e a fosfatase alcalina, cujos reagentes “disparadores” podem ser o éster fosfatado do adamantildioxetano ou fosfato acridaneno (DUDLEY, 1990). Trabalhos recentes comprovam que o emprego de fase sólida e marcação com acridina proporcionam a obtenção de maior sensibilidade, além do detalhe de que receptores humanos recombinantes auxiliam na obtenção dessa maior sensibilidade. O grande problema que limita

o ensaio é o fato de que ele não é capaz de distinguir anticorpos estimuladores dos inibidores, desde que o fenômeno observado é apenas a competição com TSH marcado (VIEIRA, 2003).

O ensaio quimioluminescente apresenta o formato “sanduíche”. A amostra biológica em que se deseja pesquisar o analito é incubada com o anticorpo de fase sólida e o anticorpo de fase líquida, sinalizador, ligado ao marcador quimioluminescente e, em seguida, o material não ligado é removido por uma etapa de lavagem. É adicionado então reagente “disparador”, e a emissão de luz, proporcional à quantidade de analito (antígeno) presente na amostra, é quantificada por um detector de luz. Esse método é amplamente empregado em dosagens hormonais, assim como em outras finalidades, incluindo-se sequenciamento de DNA e determinação da atividade enzimática de proteínas codificadas por genes repórteres. Suas vantagens incluem a elevada sensibilidade e a rapidez com que é efetuado (DUDLEY, 1990).

Uma variação desse ensaio é a quimioluminescência magnética, em que os anticorpos de captura são ligados a micropartículas magnéticas, e os imunocomplexos, anticorpo de captura-analito-anticorpo sinalizador, são separados dos anticorpos sinalizadores não ligados por um campo magnético (DUDLEY, 1990).

O Immulite 1000® é um equipamento de grande porte utilizado em exames de imunoensaio por quimioluminescência. É totalmente automatizado em relação à amostra clínica e ao manuseio de reagente, incubação, lavagem e adição de substrato. A emissão de luz é detectada por um tubo fotomultiplicador e os relatórios impressos, para cada amostra, são gerados por um sistema computadorizado integrado ao equipamento. Apresenta capacidade de realização de 200 testes por hora. É utilizado para o doseamento quantitativo da tirotrófina (TSH) em soro, em diagnósticos *in vitro*, para avaliação clínica da função tireóidea, sendo um ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente de duas voltas, com ciclos de incubação de 1x 60 minutos (SIEMENS, 2008).

O Liaison® é um equipamento de imunoensaio por quimioluminescência magnética. É utilizado para dosagem de diversos hormônios, incluindo TSH, sendo o único equipamento automatizado capaz de realizar a dosagem de

vitamina D. Apresenta Capacidade de realização de 180 testes por hora (IMUNOTECH, 2008).

Para a pesquisa patológica, diagnóstico clínico e para a avaliação do curso da terapia da doença da tireóide, é necessário determinar, com precisão, a concentração plasmática dos hormônios TSH, T₃ e T₄ livre (VIEIRA, 2002).

O Doseamento do TSH sérico tem sido utilizado como um teste primário no diagnóstico diferencial do hipotireoidismo e como ajuda na monitorização da terapêutica de substituição dos hormônios da Tireóide.

Condições de hipertireoidismo e hipotireoidismo são situações graduais, isto implica que nem todos os doentes nestas categorias de doenças tenham níveis de TSH fora da zona de eutireoidea normal. Por outro lado, os níveis de TSH saem da zona de referência eutireoidea em fases muito precoces do desenvolvimento da doença, mesmo que esta ainda esteja na fase subclínica e os níveis dos hormônios tireóideos se encontrem em valores normais (VIEIRA, 2010).

Estudos de investigação têm mostrado que indivíduos aparentemente saudáveis com TSH > 2,0 µUI/ml, têm um risco acrescido de desenvolver doenças da Tireóide nos próximos 20 anos. Isto sugere que o limite superior para o TSH no soro para eutireoideos será reduzido para 2,5 µUI/ml porque mais de 95% dos voluntários testados em várias pesquisas pelo mundo, têm valores séricos de TSH entre 0,4 e 2,5 µUI/ml (BALOCH e cols., 2003).

Garantir que aparelhos específicos para a dosagem do TSH doseem valores com precisão e confiabilidade, favorece um diagnóstico mais preciso das enfermidades tireoidianas, bem como permite que a escolha da terapia de reposição hormonal seja melhor acompanhada e segura para o paciente (WARD, 2008).

Este trabalho tem por objetivo avaliar o doseamento do hormônio TSH frente a dois aparelhos de fabricantes e metodologia de testes distintos: o Immulite 1000® (Siemens Healthcare Diagnostics, United Kingdom) e o Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Itália).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido por meio de uma pesquisa transversal, experimental, de caráter quantitativo, no período de março 2011 a maio de 2011. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba (CAAE 0202.0.133.000-11), conforme as recomendações da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que normatiza pesquisas em seres humanos. Foram selecionados aleatoriamente 47 indivíduos de ambos os sexos e faixa etária de 18 a 70 anos, que realizaram dosagens hormonais do TSH no Centro de Endocrinologia e Metabologia Ltda., em Campina Grande, Paraíba.

A dosagem de TSH foi realizada com base em um ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente, utilizado no doseamento da tireotrofina em soro. O princípio básico do imunoenensaio quimioluminescente consiste na detecção da reação antígeno-anticorpo utilizando uma enzima e uma molécula sintentizada ou mistura de moléculas que atuará como substrato para a enzima e como emissor de luz. Nesta metodologia, a molécula de TSH faz uma ponte entre 2 ou mais anticorpos anti-TSH distintos. O primeiro anticorpo, de origem monoclonal, é direcionado à sub-unidade específica, e é ancorado ao sistema de separação em fase sólida. O anticorpo anti-TSH está presente em excesso e imunoextrai seletivamente a maioria das moléculas de TSH do soro. O TSH ligado é a seguir dosado através de um segundo anticorpo, de origem monoclonal ou policlonal, contra o TSH. Esse segundo anticorpo é direcionado contra um local antigênico distintamente diferente da molécula de TSH, por exemplo, a sub-unidade α . O anticorpo de detecção é marcado com uma molécula sinalizadora que pode ser um radioisótopo, fluorescente ou luminescente. Os ensaios imunométricos têm uma curva padrão ascendente. Os dados foram avaliados segundo os valores de referência do TSH fornecidos pelos fabricantes.

As amostras de cada paciente foram dosadas simultaneamente nos luminômetros Immulite 1000® DPC-MEDLAB (Siemens Healthcare Diagnostics, United Kingdom) e Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Itália) para a comparação dos valores encontrados. Foi utilizado como amostra o soro dos

pacientes, após punção venosa e centrifugação do sangue total, colhido em tubos a vácuo contendo gel separador (tubos Vacuette® 5 ml produzidos pela Greiner Bio One®). Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial (frequência, média, desvio padrão, coeficiente de variação, teste t de Student e Regressão Linear para comparação das médias dos dois grupos) por meio do software Microsoft Excel Enterprise 2007®, com o suplemento da ferramenta de análise de dados VBA. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Foram ainda descritos possíveis interferentes, na obtenção dos valores finais das dosagens.

RESULTADOS

Para comparação entre os dois métodos de dosagem, o equipamento teste foi o analisador automatizado Liaison®, que utiliza o método de imunoquimioluminescência magnética. Quarenta e sete (47) amostras de soro com concentrações dentro do intervalo operacional dos métodos foram avaliadas em duplicata, nos dois equipamentos. Dez (10) outras amostras foram testadas em dez (10) repetições contínuas, para avaliar a reprodutibilidade de cada equipamento. Os dados iniciais do estudo comparativo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados do estudo comparativo

Equipamento utilizado	Liaison ®	Immulite 1000®
Número de amostras	47	47
Intervalo de concentrações (µUI/mL)	0,014 – 122,5	0,038 – 109,47
Média das estimativas	11,09	9,75
Coeficiente de correlação	0,9886	

O intervalo de concentrações foi amplo, utilizando todo o intervalo analítico de medição, partindo-se de concentrações mínimas (0,014 µUI/mL) até concentrações de 122,5 µUI/mL. A regressão linear mostrou um coeficiente de correlação (r) de 0,9886.

Alguns testes referentes à comparação entre a precisão intra-ensaio da dosagem de TSH nos dois equipamentos podem ser vistos na tabela 2. Foram realizadas 10 (dez) repetições seguidas em cada equipamento, com a mesma amostra. Foram avaliadas as médias e medianas das concentrações, o coeficiente de variação e o desvio-padrão, além da amplitude.

Tabela 2 – Comparação dos testes de precisão intra-ensaio

Equipamento utilizado	Liaison ®	Immulite 1000®
Número de repetições	10	10
Média das concentrações (µUI/mL)	15,53	14,45
Mediana	15,43	14,38
Coeficiente de variação	12,5%	8,9%
Desvio-padrão	0,504	0,463
Amplitude	1,73	1,39

Na tabela 3 podem ser observados os resultados referentes à análise estatística inferencial. Foi utilizado o teste *t* de *Student* para comparação entre os resultados obtidos nos dois equipamentos. Esta ferramenta estatística é útil quando se deseja uma comparação entre médias.

Tabela 3 – Resultados do estudo comparativo – teste *t* de *Student*

Equipamento utilizado	Liaison ®	Immulite 1000®
Número de amostras	47	47
Intervalo de concentrações (µUI/mL)	0,014 – 122,5	0,038 – 109,47
Média das estimativas	11,09	9,75
Nível de Significância (<i>p</i>)	0,378	

O nível de significância obtido está acima do ponto de corte estabelecido ($p < 0,05$).

No Quadro 1, encontram-se os valores de referência sugeridos para o TSH dosado nos dois equipamentos. Esses valores foram maiores para o TSH do Immulite 1000®, conforme pode ser visto no quadro 1.

Quadro 1 – Valores de referência para o TSH dosado nos equipamentos

Equipamentos	Liaison ®	Immulite 1000®
Valores de referência (µUI/mL)	0,3 – 3,6	0,4 – 4,0

Considerações foram feitas em relação a outras características técnicas dos dois equipamentos, explicitadas no quadro 2.

Quadro 2 – Características técnicas do analito TSH nos equipamentos

Equipamentos / características técnicas	Liaison ®	Immulite 1000®
Volume de amostra	200 µl	75 µl
Tempo de incubação	10 minutos	113 minutos
Sensibilidade analítica	< 0,004	< 0,004
Espectro de análise (range)	até 100 µUI/mL	até 75 µUI/mL
Efeito <i>hook</i> de alta dose	Acima de 1000 µUI/mL	Acima de 7.500 µUI/mL

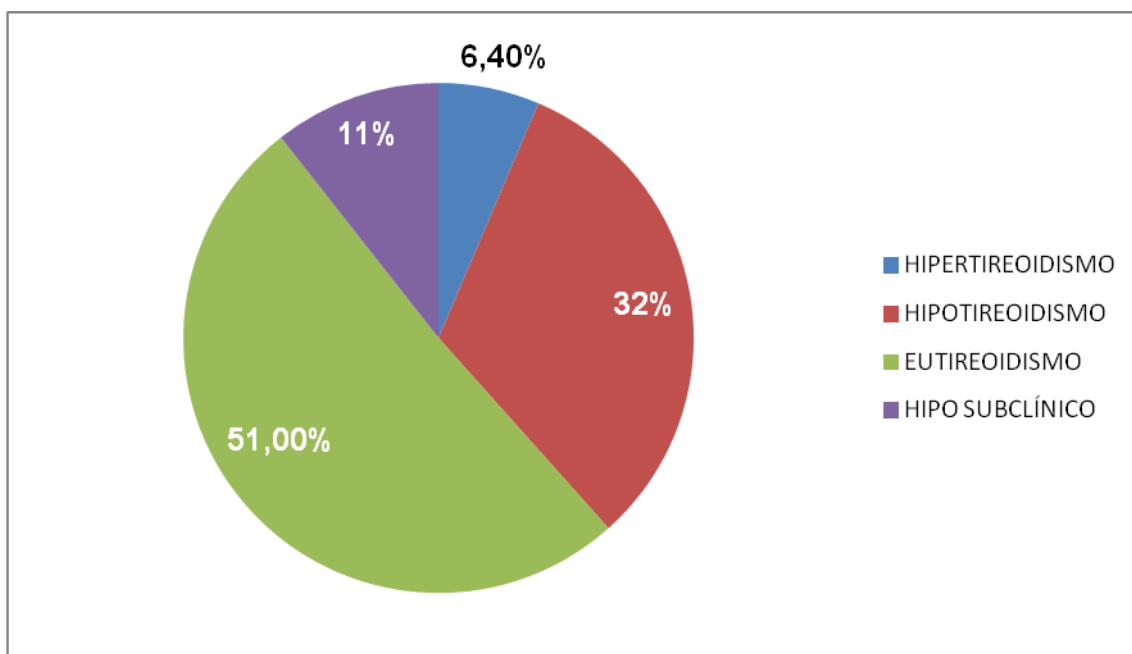
No Quadro 3, encontram-se os intervalos de referência adotados pelo Immulite 1000® e pelo Liaison®, para classificação dos valores de TSH encontrados para cada paciente.

Quadro 3 - Intervalos de Referência contidos nos protocolos técnicos de cada equipamento

Equipamento	Eutireoidismo	Hipertireoidismo	Hipotireoidismo
Immulite1000® DPC-MEDLAB	0,4 – 4 µIU/ml	< 0,01 µIU/ml	7,1 - >75 µIU/mL
Liaison ®	0,3 – 3,6 µIU/ml	< 0,01 µIU/ml	7,1 - >75 µIU/mL

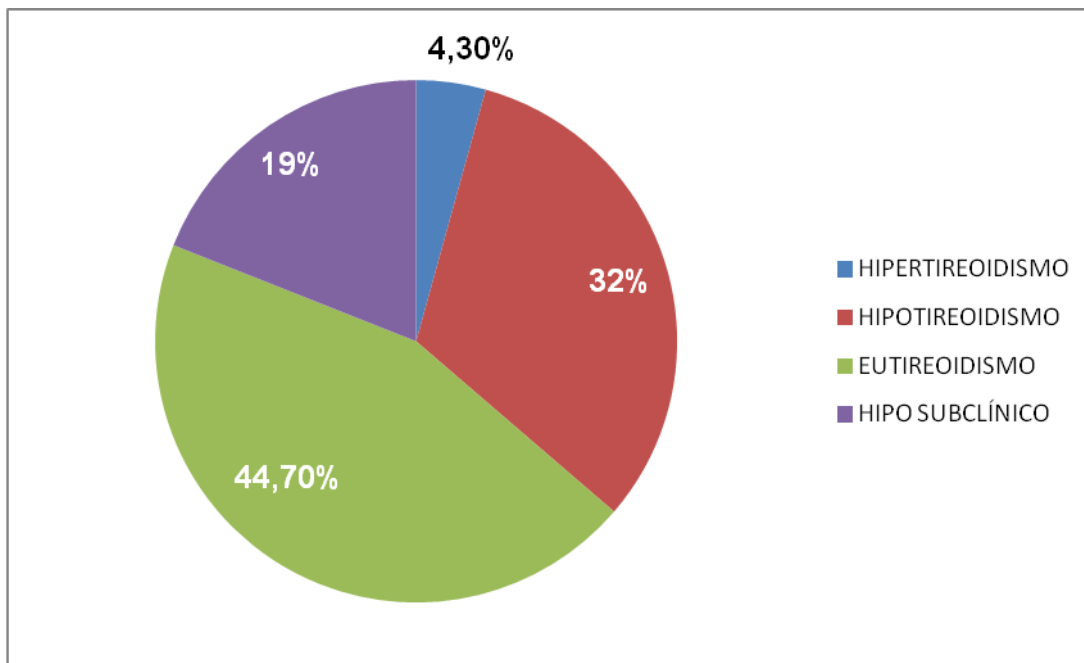
De acordo com os valores de referência contidos no quadro 3, foram analisadas as percentagens de pacientes que, supostamente, apresentaram taxas indicativas de hipertireoidismo, hipotireoidismo e eutireoidismo, e também a porcentagem de pacientes que estão na zona de transição, indicando possível hipotireoidismo subclínico ou discreto. Os valores percentuais para o Immulite 1000® encontram-se expostos no Gráfico 1.

Gráfico 1. Distribuição dos valores encontrados para o TSH no Immulite 1000®, de acordo com seus valores de referência.



No Gráfico 2, encontra-se a distribuição percentual dos valores encontrados no Liaison® de acordo com os intervalos de referência do mesmo. Os valores dispostos nos gráficos dos dois aparelhos são apenas indicativos, para um diagnóstico definitivo de alterações da função tireoidiana é necessário uma pesquisa mais apurada a cerca da clínica do paciente.

Gráfico 2. Distribuição dos valores encontrados para o TSH no Liaison®, de acordo com seus valores de referência.



DISCUSSÃO

Os avanços nos testes diagnósticos correspondem a uma das maiores inovações médicas das últimas décadas. Com a proliferação de testes diagnósticos, entretanto, a interpretação clínica e as decisões se tornaram mais complexas. A dosagem de TSH é a dosagem hormonal mais solicitada na prática clínica. Devido à sua alta sensibilidade e especificidade, é o exame de primeira linha no diagnóstico laboratorial tanto de hipo como de hipertireoidismo (COELHO, 2006). O rastreamento de doenças da tireóide é muito importante, principalmente em mulheres após 35-40 anos de idade, devido ao aumento da prevalência de doenças tireóideas a partir desta faixa etária. Além disto, não podemos esquecer o rastreamento de hipotireoidismo congênito, que é

fundamental para evitar retardo mental ou alterações psicomotoras graves nos indivíduos afetados (VIEIRA, 2002).

Para demonstrar a especificidade de um novo método para avaliação do hormônio TSH, foi realizado estudo de comparação de métodos, tendo sido empregado como método comparativo um equipamento automatizado que utiliza metodologia de quimioluminescência, o Immulite 1000®, que já vem sendo utilizado pelo serviço avaliado há mais de 12 anos.

O intervalo de concentrações entre os equipamentos foi amplo, utilizando todo o intervalo analítico de medição, partindo-se de concentrações mínimas (0,014 $\mu\text{UI/mL}$) até concentrações de 122,5 $\mu\text{UI/mL}$. A regressão linear mostrou um coeficiente de correlação (r) de 0,9886.

Este teste é importante porque verifica a relação ou grau de correlação ou associação linear entre dois métodos; de acordo com Marconi e Lakatos (1996), deve ser maior que 0,975, significando que 95% dos resultados do método teste são proporcionais aos resultados do outro método. Assim, permite decidir se a equação da regressão pode ser utilizada para estimar os erros sistemáticos do método teste; no entanto, preferencialmente o r deve ser maior que 0,990.

Nesta pesquisa, o método padrão utilizado foi representando pelo Immulite 1000®. O Coeficiente de Correlação encontrado entre este equipamento e o Liaison® foi de 0,9886. Esta correlação é satisfatória, conforme explicado anteriormente, porém poderia ser melhor.

Em uma comparação anterior entre o TSH dosado no Immulite 1000® e outro dosado pelo método de radioimunoensaio (Coat-a-count® TSH IRMA), obteve-se uma correlação de 0,992 (SIEMENS, 2008), melhor do que a encontrada em nosso estudo.

A avaliação da média e da mediana é importante para verificação do intervalo de medição e para o posterior cálculo dos demais índices. O coeficiente de variação é uma medida percentual do desvio-padrão, que representa a variabilidade de uma amostra relativamente ao seu valor médio. Já a amplitude é a medida da variabilidade de uma amostra, correspondente à diferença entre o valor máximo e o valor mínimo do conjunto de dados.

Em um estudo realizado pelo fabricante do TSH dosado no Immulite 1000® (SIEMENS, 2008), obteve-se um coeficiente de variação médio de 7,1%

(n=77), bem próximo daquele encontrado em nosso estudo (8,9%, n=10). Em relação ao desvio-padrão encontrado no Immulite 1000®, nossa pesquisa apresentou um valor de 0,463 (n=10), enquanto que no referido trabalho o desvio-padrão foi de 0,38 (n=47).

A partir do teste *t de Student*, os resultados obtidos para as médias nos dois equipamentos foram comparados. O nível de significância obtido está acima do ponto de corte estabelecido ($p < 0,05$); deste modo, pode-se inferir que os resultados da dosagem do TSH obtidos entre os dois métodos de avaliação apresentaram alteração estatisticamente significativa entre si, o que indica que os valores de referência utilizados para o equipamento padrão (Immulite 1000®) não devem ser utilizados no equipamento teste (Liaison®).

Em relação à comparação entre os equipamentos de nossa pesquisa, o Liaison® apresentou valores de coeficiente de variação, desvio-padrão e amplitude ligeiramente superiores aos do Immulite 1000®, porém próximos àqueles referidos no estudo comparativo entre o TSH dosado no Immulite 1000® e outro dosado pelo método de radioimunoensaio (Coat-a-count® TSH IRMA), mostrando que são equivalentes (SIEMENS, 2008)

No entanto, chama a atenção o fato das medidas de média e mediana serem ligeiramente superiores no Liaison® em relação ao Immulite 1000®, em torno de 7,5%. Isso porque os valores de referência sugeridos para o TSH dosado nos dois equipamentos apresenta uma relação inversa: são maiores para o TSH do Immulite 1000®, conforme pode ser visto no quadro 1.

Deste modo, é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados emitidos pelos dois aparelhos, e especialmente estabelecer um valor de referência normal para a população atendida pelo laboratório (SANTOS, 2000).

Outras considerações devem ser feitas em relação a outras características técnicas dos dois equipamentos, explicitadas no quadro 2.

Uma das principais vantagens do Liaison® é, sem dúvida, o tempo requerido para liberação dos resultados. Apenas 10 (dez) minutos contra 113 (cento e treze) minutos do Immulite 1000®. Em relação ao efeito *hook* de alta dose, há uma diferença considerável. No entanto, raríssimos pacientes apresentam valores de TSH acima de 1.000 $\mu\text{UI/mL}$ e, quando o fazem, os sintomas clínicos são tão característicos que suplantam os testes diagnósticos,

o que praticamente anula a diferença verificada entre os equipamentos, em relação a este quesito.

A sensibilidade analítica de ambos os classificam como ensaios de terceira geração, com uma sensibilidade analítica que os tornam capazes de distinguir pequenas variações entre eutiroidismo, hipo ou hipertiroidismo.

Os Intervalos de referência adotados pelos equipamentos para classificação dos valores de TSH são diferentes apenas nos casos de eutireoidismo, ou seja, valores normais para a tireotrofina. Os valores adotados para Hiper e Hipotireoidismo são os mesmos para os dois equipamentos, como mostrado no Quadro 3.

A partir disso, dos 47 (quarenta e sete) pacientes que participaram do estudo, no ensaio realizado no Liaison® 44, 7% (n=21) enquadram-se na faixa de eutiroidea normal, ou seja, apresentam valores de TSH compreendidos entre 0,3 – 3,6 uUI/mL. Já para o Immulite 1000®, por apresentar uma faixa mais ampla para a normalidade 0,4 – 4 uUI/mL, 51% (n=24) do total de pacientes, foram classificados como eutiroideos. A porcentagem de pacientes caracterizados como hipotiroideos foi igual nos dois aparelhos, 32% (n=15). No Liaison® o número de pacientes com valor presuntivo de hipertireoidismo representou 4,3% do total de pacientes (n=2) e 19% (n=9) apresentou valores que não se encontram dentro de nenhum intervalo, mas que são indicativos de hipotireoidismo subclínico ou discreto (Gráfico 2), como afirma MILHORANSA & SOARES (2009).

Para o Immulite 1000®, devido apresentar um intervalo mais amplo para normalidade, uma parcela maior de pacientes ficou na faixa de hipertireoidismo, 6,4% (n=3), enquanto que 10,6% (n=5) ficou fora do intervalo, supondo tendência a hipotireoidismo subclínico (Gráfico 1).

Os valores de referência para a quantificação sérica do hormônio tirotrófico (TSH) têm sido questionado a pelo menos duas décadas. Sociedades de Endocrinologia e de Análises Clínicas não possuem um consenso relacionado ao intervalo de referência para o TSH. A National Academy of Clinical Biochemistry dos Estados Unidos da América tem utilizado em seus guias clínicos os valores de referência de TSH normais àqueles compreendidos entre 0,4 e 4 µUI/L, o mesmo adotado pelo Immulite 1000®. Entretanto, o mesmo sugere que os limites superiores poderão, futuramente, serem

reduzidos para 2,5 $\mu\text{UI/L}$, aproximando-se assim, dos valores sugeridos pelo Liaison® devido a observação de que 95% dos indivíduos eutiroidianos apresentam valores de TSH abaixo deste nível. Ainda, há um aumento significativo de evolução para doença tireodiana naqueles indivíduos com valores de TSH superiores a 2,5 $\mu\text{UI/L}$, o que neste estudo foi representado por 55,3%. Em tratamentos clínicos, utilizam-se valores de TSH entre 0,5 e 2 $\mu\text{UI/L}$ como parâmetros para ajuste de dose na reposição de hormônio tireoidiano. Ao reduzir os níveis normais de TSH para estes novos valores, isto significaria um aumento de 5% para 20% da população com a presunção de hipotireoidismo. O que pode sugerir um número muito elevado de pacientes com exames falsos positivos. O que se observa é que, há um relativo excesso de diagnósticos de hipotireoidismo subclínicos que são, desnecessariamente, tratados (MILHORANSA & SOARES, 2009). Cabe ressaltar que o TSH pode estar suprimido em pacientes cirurgiados e em ablação com Iodo 131, tireoidectomizados total ou subtotal e pacientes com lobectomia unilateral (SCHLUMBERGER E PACINI, 1999).

Não houve diferença significativa entre pacientes do sexo feminino e masculino com relação à idade. A coleta de dados revelou um maior número de pacientes do sexo feminino em relação ao sexo masculino, podendo ter ocorrido uma diferença dos resultados devido aos fatores hormonais das mesmas.

Vários fatores podem afetar a acurácia do ensaio de TSH, podendo ser divididos em fatores ensaio-dependentes e independentes. Dentre os fatores dependentes do ensaio destacam-se falta de padronização internacional, especificidades diferentes dos anticorpos utilizados pelos diferentes kits comerciais, falta de precisão interensaio e intraensaio, sensibilidade funcional sub-ótima e variante de TSH não reconhecida pelo anticorpo utilizado no método, com isso, os reagentes utilizados na rotina do Immulite 1000® não podem ser utilizados para dosagens no Liaison®. Com relação aos fatores ensaio-independentes, destacam-se anticorpo anti-TSH, sensibilidade dependente do nível de TSH, efeito gancho, anticorpo heterofílico, além da gamapatia monoclonal e doença renal terminal (TORRÉNS e cols., 2001).

Moreira e cols. (2011) sugeriram que o rastreamento de tireopatias como o hipo e o hipertireoidismo em populações gerais, mediante as dosagens

sanguíneas de TSH e T₄ livre ou total, através dos imunoensaios quimioluminescentes, é potencialmente benéfico e viável do ponto de vista financeiro, particularmente em mulheres com idade igual ou superior a 35 anos, já que essas são as que mais apresentam distúrbios da tireóide.

Deve-se levar em consideração que a diversidade de métodos robustos e sensíveis de dosagem, como é o caso de hoje em dia para o TSH, leva a uma utilização mais segura dos resultados e a um diagnóstico bem mais apurado (VIEIRA, 2010). No entanto, não basta ter em mãos resultados seguros através das dosagens automatizadas, para classificar um paciente como fora de uma faixa normal, deve-se levar em conta diversos fatores como genética, diferenças regionais ou se o paciente possui risco aumentado de disfunção tireodiana, como àqueles que recebem lítio, amiodarona, citocinas, radiação na glândula tireóide, ou que tenham outras doenças imunes, hipercolesterolemia, apnéia do sono, depressão ou demência (MOHANDAS & KRISHAN, 2003).

CONCLUSÃO

Analisadores imunoquímicos automatizados, tornam o trabalho muito mais fácil e preciso, além de encurtar o tempo de espera pelos resultados. Permitem também um diagnóstico precoce dos distúrbios tireoideanos, além de uma monitorização mais eficaz da terapêutica.

Neste trabalho, observou-se que os dois métodos testados apresentaram um bom desempenho na dosagem do TSH.

As diferenças estatísticas entre os valores encontrados no Liaison® e no Immulite 1000®, apesar de não tão discrepantes, apontam para a importância de o laboratório definir padrões de referência, que estejam de acordo com a população em estudo. Os valores de referência utilizados para o equipamento padrão (Immulite 1000®) não devem ser utilizados no equipamento teste (Liaison®).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à direção do Centro de Endocrinologia e Metabologia de Campina Grande – Pró-Sangue Diagnóstico, por ter permitido e viabilizado a realização da pesquisa. O projeto que deu origem a esta pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual da Paraíba (CAAE 0202. 0. 133.000-11).

REFERÊNCIAS

1. AMATO, A. A, ROSSI, A, GARCIA, E.C, THOMA, I, ET AL - Dosagem de Hormônios por Métodos Imunobiológicos. *Brasília Med.* 46 (1): 63-74, 2009
2. BALOCH, Z, CARAYON, P, HENRY, J. F, ET AL. - Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Guidelines Committee, National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). *Thyroid* ; 13(1): 3-126, Jan. 2003
3. BARRA, G. B, VELASCO, L. F. R, PESSANHA, R.P, CAMPOS, A. M, MOURA, F. N, DIAS, S. M. G, POLIKARPOV, I, RIBEIRO, R. C. J, SIMEONI, L. S, NEVES, F. A. R. -Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 48 (1) : 25-39, 2004.
4. BREUER, H.; HAMEL, D.; KRÜSKEMPER, H. L. *Methods of Hormone Analysis*, Stuttgart. 1976. 520p.
5. BURDON. R. H; KNIPPENBERG, P. H.; CHARD, T. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*. 4 th ed. Elsevier. 1990. 288 p
6. CASTRO, A. V. B. Avaliação Clínica e Laboratorial de Portadores de Hiperlipidemia e Hipotireoidismo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 76 (2) : 119-122. São Paulo, 2001
7. COELHO, S. M, VAISMAN, M, CARVALHO, D. P. - Amplificação de mRNA de tireoglobulina no sangue de pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide: qual o seu verdadeiro significado?. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 50 (3) : 427-435, 2006.
8. DUDLEY, R. F. Imunoensaio por quimiluminescência: uma alternativa ao Radioimunoensaio (RIA). *Socied. Amer. Patol. Clin.* 28 (4) : 5-10. Abr. 1990.
9. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. In: _____. *Hormônios Metabólicos da Tireóide*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p 931-943.

10. HEDGE, G.A. et al. Fisiologia Endócrina Clínica. Rio de Janeiro, Interlivros Edições Ltda, 1988, p. 95-112.

11. IMUNOTECH SISTEMAS DIAGNÓSTICOS. Thyroid function test (serum), 2008. Disponível em http://www.imunotech.com.br/novo/index.php?option=com_content&view=article&id=10:how-do-i-localise-joomla-to-mylanguage&catid=34:diasorin&Itemid=18. Acesso em 02 de Maio de 2011.

12. MARCONI, M .A.; LAKATOS, E. M. Técnicas de pesquisa. 3. Ed.São Paulo: Atlas, 1996.

13. MILHORANSA, P. & SOARES, R. Hormônio de estimulação da tireóide (TSH) e correlações laboratoriais. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 41 (2): 161-161, 2009.

14. MOHANDAS. R; KRISHAN, L G. Managlng thyroid dysfunction in the elderly answers to seven common questlons. Postgraduate Medicine. Iss. 5,54-66. may, 2003. v. 113.

15. MOREIRA, T. D. et al. A Incidência do Hipotireoidismo Co-relacionado a Alterações Lipídicas e a Importância da Investigação Laboratorial. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.hipotireoidismo.htm>. Acesso em 28 de Maio de 2011.

16. MOURA, R. A. et al. Técnicas de laboratório. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

17. NUNES, M. T. - Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 47 (6): 639-643, 2003.

18. ALVES SANTOS, D. - Valores de referência para hormônios tireoidianos em Campina Grande, utilizando o método da quimioluminescência. 2000. 38 f. Dissertação (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba-UEPB. Campina Grande, Paraíba.

19. SIEMENS Healthcare Diagnostics. IMMULITE/IMMULITE 1000. Third Generation TSH. Lianberis, Gwynedd, United Kingdom, 2008.
20. SCHLUMBERGER, M. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 338:297-306, 1999
21. STEINBECK, M. J.; WYNER, L. R.- Immunoassay and Related Principles. In: ANDERSON, S. C.; COCKAYNE, S. *Clinical Chemistry: concepts and applications.* Philadelphia: HBJ International Edition; W. B. Saunders, 1993. p 96-99.
22. . TORRÉNS JI, BURCH HB, et al. Serum thyroid measurement – Utility in clinical practice. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30:429-55, 2001
23. VIEIRA, J.G.H. Avaliação dos potenciais problemas pré-analíticos e metodológicos em dosagens hormonais. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46:9-15, 2002
24. VIEIRA, J. G. H. Defining reference values for TSH: nearing perfection in a imperfect world. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 54 (7) : 589-590, 2010
25. VIEIRA, J. G. H.; KASAMATSU, T. S.; HAUACHE, O. M. and MACIEL, R. M.B.. Anticorpos anti-tiróide: aspectos metodológicos e importância diagnóstica. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 47 (5) : 612-621, 2003
26. VIEIRA JGH, MACIEL RMB, HAUACHE OM, NISHIDA SK, BOELTER DMG, PINHEIRO MFMC. Valores inesperadamente elevados de TSH: presença de isoformas de alto peso molecular ("macro TSH") deve ser investigada. *Arq Bras Endocrinol Metab* . 50:445-49, 2006
27. WARD, L. S, Devemos mudar os valores de referência para TSH normal? *Arq Bras Endocrinol Metab.* 52 (2), 2008