



Artigo Original

Cortisol Livre na Urina: Interferências no seu Doseamento



Susana Prazeres^a, Sofia M. Bruno^{b*}, Tiago Nunes da Silva^c, Conceição Godinho^d, Helena Proença^e, Isaura Rodrigues^d, Jorge Pinheiro^f, Ricardo Castro^f, Sónia Mendo^b, Deolinda Madureira^{g**}

^a Laboratório de Endocrinologia, Serviço de Patologia Clínica, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG), Lisboa, Portugal

^b Departamento de Biologia, CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

^c Serviço de Endocrinologia, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal

^d Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar Lisboa Central, Lisboa, Portugal

^e Serviço de Patologia Clínica, Hospital St^a Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

^f Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar Leiria, Leiria, Portugal

^g Grupo de Estudos de Laboratório, Sociedade Portuguesa Endocrinologia Diabetes e Metabolismo, Lisboa, Portugal

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Recebido a 17 de maio de 2016

Aceite a 27 de outubro de 2016

Online a 30 de junho de 2017

Palavras-chave:

6 beta-hidroxycortisol
Cromatografia Gasosa
Hidrocortisona/urina

R E S U M O

Introdução: A excreção do cortisol livre urinário (CLU) é um indicador sensível de hipercortisolismo. No entanto, a diminuta concentração de CLU em relação ao total dos seus metabolitos urinários e a grande semelhança molecular entre eles, dificultam o seu doseamento. Um exemplo paradigmático é a medição falsamente elevada do CLU secundária ao aumento do 6β-hidroxycortisol (6β-OHF), um dos metabolitos do cortisol. Como a sua excreção pode aumentar até 60 vezes pela administração de fármacos metabolizados pelo citocromo p450 existe, nestes casos, a possibilidade de interferência com importância no diagnóstico.

Este problema tem sido ultrapassado submetendo a amostra de urina a uma extracção com solvente orgânico, antes de proceder ao doseamento do CLU. No entanto, alguns imunoensaios dispensam o passo de extracção e optam por indicar valores de referência obtidos pelo método directo.

Objectivos: (1) Avaliar o impacto da extracção com diclorometano nos níveis de CLU; (2) Avaliar a interferência do 6β-OHF no doseamento do CLU, por cinco imunoensaios; (3) Confirmar a ausência do 6β-OHF na fase orgânica após extracção.

Métodos: Determinação do CLU por imunoensaio, utilizando os métodos directo (D) e com extracção com diclorometano (E), em amostras de urina de doentes e numa amostra de urina após adição de 6β-OHF. Identificação do 6β-OHF por cromatografia gasosa (CG).

Resultados: (1) A diferença entre os níveis de CLU em 47 amostras doseadas pelo método directo e após extracção, variou entre -7% e 878%; (2) O nível de CLU nas amostras sem adição de 6β-OHF varia entre 56-90 μg/24 h (E) e 71-671 μg/24 h (D) e, após a adição de 6β-OHF, entre 53-231 μg/24 h (E) e 71-2842 μg/24 h (D); (3) Após extracção, a CG só identificou 6β-OHF na fase aquosa.

Conclusão: Demonstra-se a existência de diferentes graus de interferência induzida pela presença de 6β-OHF no doseamento do CLU por imunoensaio. Cada laboratório deverá confirmar a necessidade de submeter a urina a extracção com solvente orgânico, antes de proceder ao doseamento do CLU.

Urinary Free Cortisol: Interference in the Determination

A B S T R A C T

Introduction: The excretion of urinary free cortisol (UFC) is a sensitive indicator of hypercortisolism. However, the low concentration of UFC compared with its total urinary metabolites and the molecular

* Autores Correspondentes.

Correio eletrónico: sbruno@ua.pt (Sofia M. Bruno*); ge.laboratorio@gmail.com (Deolinda Madureira**)

Sofia M. Bruno

Departamento de Química

CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro

Universidade de Aveiro - Campus Universitário de Aveiro

3810-193 Aveiro

Portugal

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2016.10.015>

1646-3439/© 2017 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Publicado por Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords:6 beta-hydroxycortisol
Chromatography, Gas
Hydrocortisone/urine

similarity between them, make a reliable UFC measurement difficult. A typical example is the increase in the measurement of UFC secondary to an increase in 6 β -hydroxycortisol (6 β -OHF), an unconjugated metabolite of cortisol. Since 6 β -OHF excretion may increase up to 60 more by the administration of drugs whose metabolism is also carried out by p450 cytochrome, exists the possibility of interference with importance for the diagnosis.

This problem has largely been overcome, by submitting the urine sample to a previous extraction with an organic solvent. Nevertheless, some immunoassay methods dispense the extraction step and choose to indicate reference values obtained without extraction.

Aim: (1) To evaluate the influence of dichloromethane extraction in UFC levels; (2) To evaluate the interference of 6 β -OHF in the measurement of UFC using five immunoassays; (3) To confirm the absence of 6 β -OHF in the organic phase after extraction.

Methods: The UFC concentration was determined by immunoassay, before (D) and after (E) dichloromethane extraction, in patient's urine samples and in one urine sample after addition of known amounts of 6 β -OHF. The presence of 6 β -OHF was evaluated by gas chromatography analysis.

Results: (1) The difference between UFC results before and after extraction showed a variation between -7 and 878%; (2) The UFC levels in samples without exogenous 6 β -OHF, showed a variation of 56-90 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ (E) and 71-671 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ (D). The range of UFC values after the addition of increasing amounts of 6 β -OHF was 53-231 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ (E) and 71-2842 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ (D); (3) After extraction, gas chromatography analysis only showed the presence of 6 β -OHF in the aqueous phase.

Conclusion: It was demonstrated the existence of variable degrees of interference induced by the presence of 6 β -OHF in CLU measurement by immunoassay. Each laboratory should confirm the need to submit the urine samples to a previous extraction with an organic solvent.

Introdução

O cortisol, hormona sintetizada na zona fasciculada do córtex da glândula supra-renal, tem um papel fundamental na regulação homeostática do metabolismo basal, do sistema imunitário e da resposta ao *stress*.¹

Em concentrações fisiológicas o cortisol plasmático está predominantemente ligado à transcortina e, em menor quantidade, à albumina (ligação variável, dependente da avidez da albumina).² A fracção livre, responsável pelas acções fisiológicas desta hormona, corresponde a cerca de 5-10% do cortisol plasmático total e a sua acção local é regulada pela interconversão cortisol/cortisona e mediada pelas enzimas 11- β -hidroxiesteróide desidrogenases, com expressão em diferentes tecidos.^{3,4}

Nas situações em que os níveis de cortisol plasmático se elevam para valores superiores aos da capacidade de ligação da transcortina (20 μg cortisol/dL), a concentração da forma livre aumenta e, por consequência, também, a sua excreção urinária.² Interessa ainda referir que o termo “cortisol livre” é geralmente utilizado para designar tanto a forma livre plasmática como a fracção urinária não metabolizada, a qual será, neste trabalho, designada por cortisol livre urinário (CLU).

O processo de metabolização do cortisol/cortisona visa a obtenção de compostos mais hidrossolúveis, facilitando a sua rápida excreção urinária. Assim, os principais metabolitos – tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisona, cortol e cortolona – resultantes da redução do anel A do cortisol, são rapidamente conjugados com ácido glucurónico ou sulfúrico e excretados na urina. Por outro lado, a oxidação do cortisol, mediada pelo citocromo p450 (CYP3A4), origina o 6 β -hidroxicortisol (6 β -OHF), único metabolito com um átomo de oxigénio suplementar, o que lhe confere maior polaridade e, por consequência, maior hidrossolubilidade⁵ (Fig. 1).

A determinação do CLU na urina de 24 horas é um método de eleição no rastreio do hipercortisolismo endógeno, uma vez que a excreção do cortisol na urina reflecte a sua produção diária, integrando as flutuações circadianas e não estando sujeito às variações das proteínas de transporte.^{6,7} No entanto, este doseamento encerra algumas dificuldades. Por um lado, a própria amostra de urina pode estar associada a uma colheita incorrecta,

a alterações da função renal e a uma enorme diversidade de componentes, em especial os resultantes do metabolismo das hormonas esteróides e glicocorticóides sintéticos. Por outro lado, os imunoensaios utilizados no doseamento do CLU estão sujeitos a interferências decorrentes da grande semelhança estrutural entre o cortisol e os seus metabolitos.

Contudo, a configuração espacial da molécula de cortisol, o seu baixo peso molecular e, conseqüentemente, a simplicidade do seu epítipo, limitam a sua capacidade antigénica, dificultando a obtenção de anticorpos com a capacidade de reconhecerem unicamente o cortisol e que minimizem a ocorrência de reacções cruzadas resultantes da ligação a epítipos estruturalmente similares.⁸ Um dos metabolitos do cortisol, que merece especial referência é o 6 β -OHF, dado que a sua habitual baixa concentração, pode sofrer um aumento significativo associado à administração de fármacos igualmente metabolizados pelas oxidases do citocromo p450 (CYP3A4), localizado no retículo endoplasmático dos hepatócitos.⁹⁻¹⁴ Estas oxidases exibem uma baixa especificidade de substrato sendo a sua actividade induzida não só pelo cortisol mas, também, por um grande número de fármacos como fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, pentobarbital, rifampicina e outros agentes tuberculostáticos, probenidica, amiodorona, mitotano e *Hypericum perforatum* (erva de São João).^{9,15-18}

De salientar, ainda, que os níveis de excreção urinária de 6 β -OHF dependem da expressão do CYP3A4, a qual, segundo os trabalhos de Forrester *et al*, em fígados humanos, pode variar até 60 vezes.^{9,19} Como consequência, a variabilidade inter e intra-individual do 6 β -OHF é considerável, dificultando a predição da relevância da sua interferência no doseamento do cortisol e a obtenção de um intervalo de referência, mesmo em indivíduos saudáveis.^{9,10} Numa tentativa de minimizar estas interferências, há fabricantes de imunoensaios que optam por submeter a amostra de urina a uma extracção com solvente, a qual permite a separação do cortisol dos interferentes mais hidrossolúveis^{20,21} (Fig. 2), antes de efectuar o doseamento do CLU.

Com este trabalho pretende-se avaliar o comportamento das metodologias de imunoensaio mais utilizadas no doseamento de CLU, identificando o impacto da extracção e a interferência do 6 β -OHF, um dos metabolitos do cortisol presentes na urina. Adicionalmente, a abordagem de alguns conceitos básicos

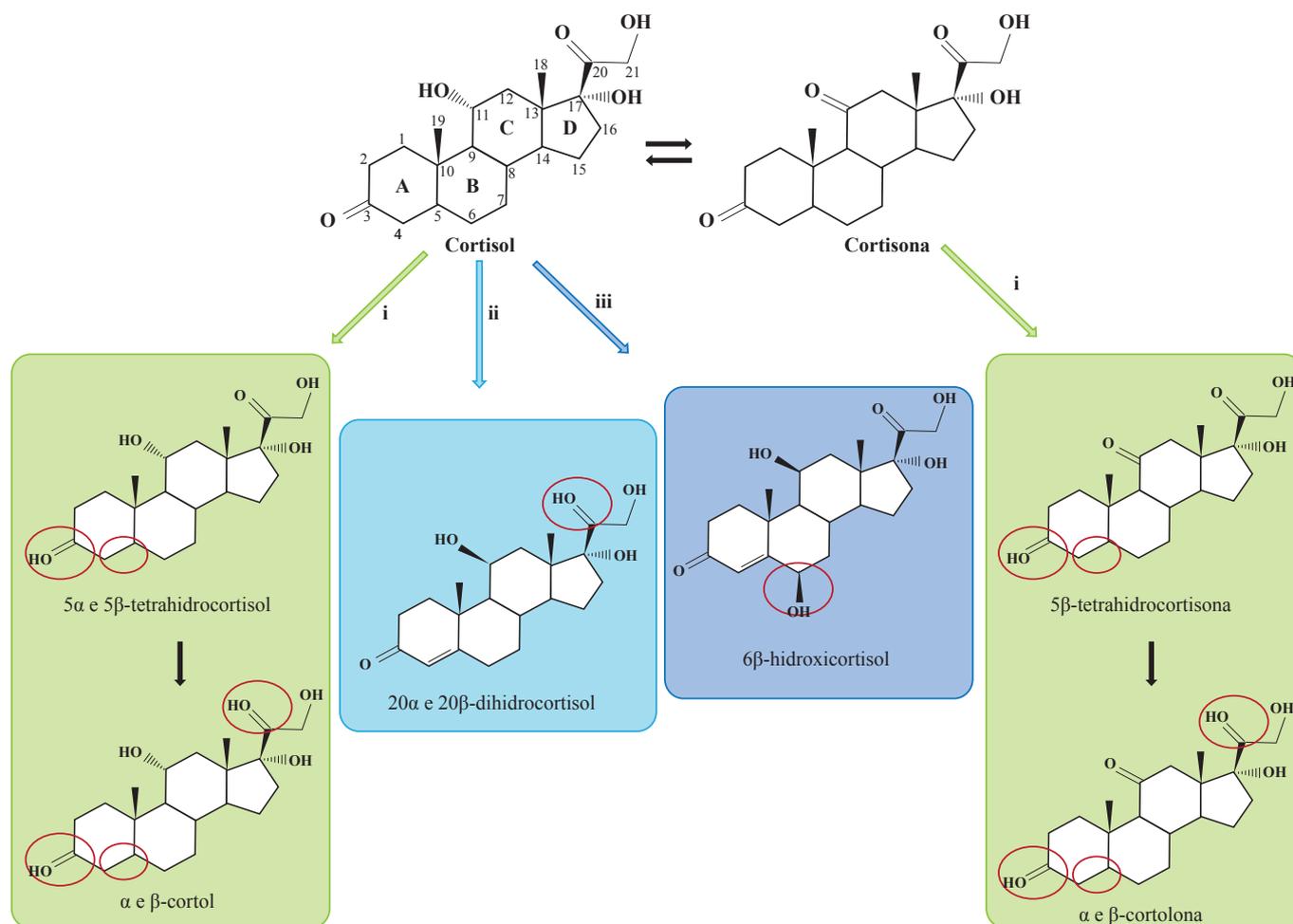


Figura 1. Estrutura das moléculas de cortisol/cortisona e principais produtos do seu metabolismo.

O metabolismo do cortisol e cortisona é semelhante e realizado através de três processos: i-Redução do anel A; ii- Redução do carbono 20, sem redução do anel A e iii-Oxidação do carbono 6¹. Os círculos indicam as alterações ocorridas nas moléculas de cortisol e cortisona.

relacionados com a problemática do doseamento do CLU, poderá ter utilidade na formação dos jovens internos de Endocrinologia.

Métodos

A avaliação do impacto da extracção nos níveis de CLU foi realizada em quarenta e sete amostras de urina de doentes, escolhidas aleatoriamente. Todas as amostras foram analisadas por radioimunoensaio, através do método directo (D) e do método com extracção (E).

Para a avaliação da interferência do 6β-OHF no doseamento do CLU, por imunoensaio, adicionaram-se quantidades conhecidas de 6β-OHF (≥ 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a quatro alíquotas de uma mesma urina, de modo a obter as concentrações de 62,5; 125; 500 e 1000 ng/mL (as excreções fisiológicas de 6β-OHF indicadas na literatura são muito variadas, pelo que, neste trabalho considerámos o intervalo referido por Galteau⁹ 137 a 726 µg/24 h). Preparou-se uma quinta alíquota com a mesma urina e sem adição exógena de 6β-OHF. Cada alíquota foi analisada por cinco imunoensaios competitivos (Tabela 1): ensaio 1: radioimunoensaio (Cort-CT2/Cisbio®); ensaios 2 e 3: quimioluminescência directa (Architect/Abbott® e Advia Centaur/Siemens®); ensaio 4: electroquimioluminescência (ElecSys/Roche®); ensaio 5: quimioluminescência enzimática (Access/Beckman Coulter®), através do método directo e do método com extracção.

Extracção do cortisol da urina

Adicionou-se a 5 mL de cada uma das alíquotas de urina, 10 mL de diclorometano (Riedel-de Haën®, Seelze, Germany). Incubou-se durante 15 minutos num agitador horizontal (400 rpm) e em seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 1800 x g. Após aspiração da fase superior (aquosa), transferiu-se 5 mL da fase orgânica para um tubo de vidro e evaporou-se sob azoto. O extracto evaporado foi reconstituído com 1 mL de PBS (Calbiochem®, Darmstadt, Germany), agitado num vortex e mantido 30 minutos à temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. Separou-se em 5 alíquotas que foram congeladas a -20°C até ao doseamento do cortisol por cada um dos cinco imunoensaios. Deste modo, todos os doseamentos de CLU puderam ser efectuados na mesma amostra.

A extracção do cortisol nas quarenta e sete amostras de urina de doentes seguiu o procedimento atrás descrito, respeitando as proporções indicadas para um volume de urina de 500 µL.

O protocolo adoptado para a extracção do cortisol da urina foi o utilizado por alguns autores deste trabalho durante vários anos, com resultados concordantes com a clínica. Em alguns estudos recentes, este protocolo continua a ser utilizado.²²

Cromatografia gasosa

Realizada com um cromatógrafo 6890N (Agilent Technologies®) equipado com coluna capilar do tipo DB-1 (J&W, 30 m x 0,25 mm; 0,1 µm) e um detector FID. Foi utilizado hélio

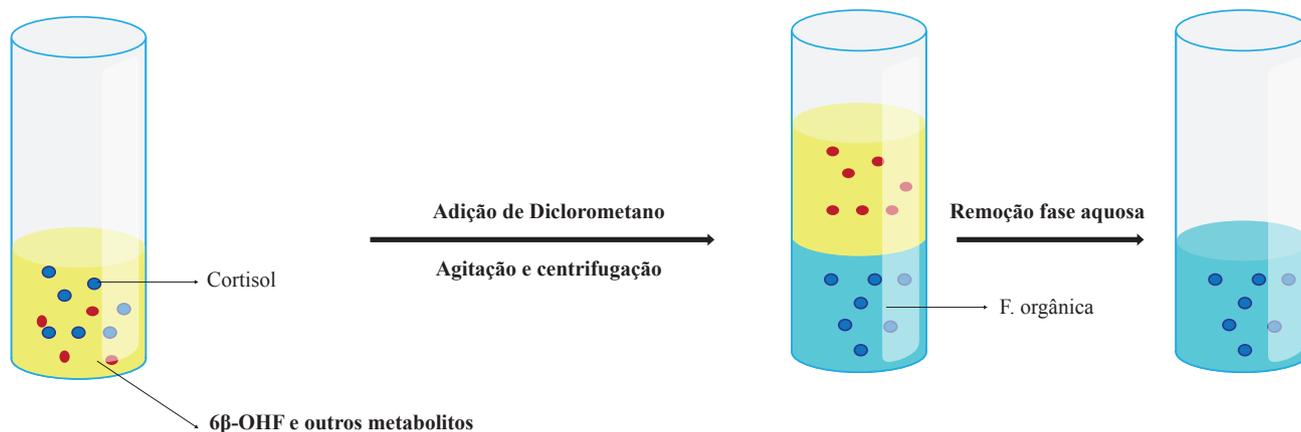


Figura 2. Processo de extração do cortisol urinário.

A adição de diclorometano a uma amostra de urina (solução aquosa) origina uma solução constituída por duas fases distintas – a fase superior, aquosa, contendo todos os metabolitos hidrossolúveis e a fase inferior, orgânica, que contém o cortisol extraído da fase aquosa. Após eliminação da fase aquosa, evaporação do solvente da fase orgânica e reconstituição da amostra com uma solução tampão, esta, está pronta a ser analisada²¹.

Tabela 1. Principais características dos imunoenaios (dados fornecidos pelos fabricantes)

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
Anticorpo^a	PC de coelho anti-cortisol	MC de rato anti-cortisol	PC de ratinho anti-cortisol	PC ovino anti-cortisol	PC de coelho anti-cortisol
Extração recomendada	Não	Não	Não	Sim	Sim/Não ^b
Urina: solvente^c	-	-	-	600 µL: 3 mL diclorometano	1 mL: 1 mL acetato de etilo
Intervalo de referência (mg/24 h)^d	D: 20–90	D: 4–176	D: 21–292	E: 36–137	D: 39–348 E: 21–143

^a PC-policlonal; MC-monoclonal. ^b A bula do ensaio indica ser possível dosar o CLU com ou sem extração. ^c Proporção urina *versus* solvente. ^d D-método directo; E-método com extração.

como gás de arraste com fluxo de 0,8 mL/min. Programa de temperaturas: temperatura inicial do forno a 80°C durante 3 minutos ; aquecimento a 30°C/min até 265°C; aquecimento a 2°C/min até 285°C; a temperatura final foi mantida durante 5 minutos. Temperatura do injector: 260°C. Modo *splitless*.

Uma vez que as concentrações de 6β-OHF utilizadas nos imunoenaios (62,5 a 1000 ng/mL) são inferiores ao limite de detecção do equipamento (0,5 mg/mL), o estudo foi efectuado com uma solução mais concentrada (1 mg/mL).

Tratamento estatístico

Os resultados foram analisados através da média ± desvio padrão e do coeficiente de variação (CV). Um valor de CV < 15% é considerado aceitável, com base na nossa prática laboratorial.

Resultados

1 - Impacto da extração nos níveis de CLU

A variação na concentração de CLU, entre o método directo e o método com extração, situa-se entre -7% e 878% (Tabela 2). Foram avaliados os processos dos doentes assinalados na Tabela 2, nenhum dos quais apresentava clínica suspeita de hipercortisolismo.

2 - Interferência do 6β-OHF no doseamento do CLU, por imunoensaio

Amostras sem adição de 6β-OHF

Na ausência de adição exógena de 6β-OHF, os níveis de CLU obtidos pelos diferentes imunoenaios, através do método

directo, são muito variáveis (CLU entre 71-671 mg/24 h). Situação diversa da observada quando as mesmas amostras são submetidas ao processo de extração prévia do cortisol (CLU entre 56-90 mg/24 h) (Tabela 3).

Amostras com adição de 6β-OHF

A adição de quantidades crescentes de 6β-OHF à urina, não altera as concentrações de CLU obtidas com os ensaios 2 e 5 (método directo), como o comprovam os valores de CV (8 e 10%). No entanto, a concentração média de CLU obtida com estes dois ensaios é muito diferente: 77 ± 6 e 284 ± 28 mg/24 h, respectivamente (Tabela 3). Nos ensaios 1, 3 e 4 o nível de CLU aumenta em função da concentração de 6β-OHF adicionado à urina, porém, com grande diferença entre os valores médios de CLU: 207 ± 59; 417 ± 94 e 1573 ± 904 µg/24 h, respectivamente. Após extração, os níveis de CLU obtidos no ensaio 2, são os que apresentam maior semelhança com os obtidos com o método directo: 55 ± 1 vs 77 ± 6 mg/24 h e CV de 2 e 8%. Os ensaios 1, 3 e 5 apresentam concentrações médias de CLU muito semelhantes: 83 ± 8, 91 ± 9 e 87 ± 6 mg/24 h, respectivamente e todos com coeficientes de variação inferiores a 15%.

No caso do ensaio 4, observa-se um marcado aumento no nível de CLU, com a adição de quantidades crescentes de 6β-OHF (94-231 mg/24 h).

3 - Ausência do 6β-OHF na fase orgânica após extração com diclorometano

A cromatografia gasosa de uma solução de 6β-OHF (1 mg/mL), com um elevado grau de pureza e sem a adição de qualquer outro metabolito do cortisol, apresentou um pico com um tempo

de retenção de 21,5 minutos e uma área média de 728 000. Após extracção com diclorometano, as fases orgânica e aquosa foram, também, analisadas por cromatografia gasosa. Foi identificada a presença de 6β-OHF na fase aquosa, através de um pico com o mesmo tempo de retenção e uma área média de 676 000, correspondendo a cerca de 93% deste composto. Confirma-se, assim, a afinidade do 6β-OHF para a fase aquosa.

Discussão

Este trabalho pretende verificar a necessidade de submeter as amostras de urina ao processo de extracção, antes de se proceder ao doseamento do CLU. Não teve como objectivo a identificação do immunoensaio mais adequado para a determinação do CLU.

A influência do 6β-OHF foi investigada utilizando um único protocolo de extracção com diclorometano. Assim, por opção metodológica, não foram seguidas as recomendações do fabricante, quando existentes.

Como já referido, uma das interferências a considerar no doseamento do CLU por immunoensaio é a possibilidade de reacção cruzada entre o cortisol e produtos estruturalmente semelhantes. Ela é característica de cada immunoensaio, advém da especificidade dos anticorpos utilizados e reflecte-se na diversidade dos intervalos de referência propostos por cada fabricante. Na ausência do processo de extracção, o doseamento do CLU fica ainda mais dependente das características dos anticorpos utilizados pelos diferentes immunoensaios e do nível de interferentes existentes na urina, originando uma grande variabilidade nos resultados laboratoriais. Enquanto em alguns casos esta variabilidade não apresenta significado clínico, noutras pode propiciar uma incorrecta avaliação clínica do doente (Tabela 2).

A possibilidade de reacção cruzada com metabolitos do cortisol ou outras substâncias é comprovada pelos resultados obtidos nos ensaios sem adição de 6β-OHF onde a ausência de

extracção pode originar aumentos de CLU de 692%.

Como já referido, o doseamento do CLU efectuado por immunoensaio depende da especificidade do anticorpo. Nos ensaios 1, 3 e 4, o aumento progressivo de CLU com a adição de 6β-OHF (método directo), permite concluir que os anticorpos utilizados nesses ensaios são sensíveis à presença do contaminante em estudo. Contrariamente ao que sucede com os ensaios 2 e 5, em que a concentração de CLU não varia com a adição daquele interferente, sugerindo, assim, a inexistência de reactividade cruzada. No entanto, no ensaio 5, a grande diferença dos níveis de CLU entre o método directo e o método com extracção, indiciam a presença de outros interferentes, reconhecidos pelos anticorpos do ensaio.

A eficácia do processo de extracção com diclorometano foi comprovada pela cromatografia gasosa onde cerca de 93% do 6β-OHF fica retido na fase aquosa. A identificação da restante fracção de 6β-OHF na fase orgânica é inexequível por ser inferior ao limite de detecção do equipamento. No entanto, a sua presença poderá explicar os resultados obtidos no ensaio 4-método com extracção: a pequena quantidade de 6β-OHF extraída para a fase orgânica aliada à elevada reactividade cruzada dos anticorpos deste ensaio (158%)²³ podem justificar o aumento progressivo de CLU. De notar que o fabricante deste ensaio aconselha a realização de extracção prévia, utilizando uma proporção urina:solvente superior à usada neste trabalho (1:5 vs 1:2) com vista a assegurar que todos os interferentes fiquem retidos na fase aquosa.

Neste trabalho, recorreu-se a uma extracção líquido-líquido com a finalidade de eliminar a interferência do 6β-OHF no doseamento do CLU por immunoensaio. É também possível utilizar uma extracção em fase sólida, igualmente eficaz na eliminação do 6β-OHF. Em ambas as abordagens, a eficiência de extracção depende da quantidade de interferentes presentes na amostra.^{24,25} Os únicos métodos que permitem um doseamento do CLU livre destas interferências são os cromatográficos, em especial se acoplados à espectrometria de massa. Com eles é possível combinar as vantagens da cromatografia (alta selectividade e eficiência de separação)

Tabela 2. Valores de CLU (µg/24 h) obtidos por radioimmunoensaio (ensaio 1), através do método directo (D) e do método com extracção (E)

Amostras	CLU (µg/24 h)			Amostras	CLU (µg/24 h)			Amostras	CLU (µg/24 h)		
	D	E	% ^a		D	E	% ^a		D	E	% ^a
1	20	22	-7	17	188	111	70	33	12	6	100
2	60	47	27	18	104*	61	70	34	59	27	120
3	153	116	32	19	237	137	73	35	79	35	125
4	325	240	35	20	77	44	74	36	46	20	129
5	51	37	38	21	138	77	80	37	105	45	135
6	74	52	41	22	85	46	85	38	134*	56	140
7	249	175	42	23	85	45	87	39	48	20	144
8	40	28	43	24	67	35	90	40	83	33	156
9	280	194	45	25	145*	76	90	41	76	28	170
10	255	171	49	26	205	107	91	42	298	110	171
11	34	22	55	27	190	99	91	43	196*	71	174
12	58	36	59	28	58	30	95	44	90	32	179
13	49	30	65	29	167*	86	95	45	171*	50	240
14	57	34	66	30	236	117	101	46	544	120	354
15	71	43	67	31	142*	70	104	47	264*	27	878
16	71	42	70	32	206	101	104	M±DP	136±101	69±53	

^a Aumento da concentração de cortisol, quando não é efectuada a extracção prévia. * Doentes sem clínica suspeita de hipercortisolismo.

Tabela 3. Níveis de CLU obtidos por cada um dos cinco imunoensaios, através do método directo (D) e do método com extracção (E).

Concentração de 6β-OHF adicionado	Cortisol livre urinário (mg/24 h)														
	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			Ensaio 5		
	D	E	% ^a	D	E	% ^a	D	E	% ^a	D	E	% ^a	D	E	% ^a
0 ng/mL	131	73	80	71	56	27	374	90	317	671	85	692	246	79	211
62,5 ng/mL	152	80	89	71	55	29	342	78	336	853	94	809	258	79	228
125 ng/mL	176	77	130	76	53	44	355	92	286	1005	101	895	266	85	214
500 ng/mL	214	78	173	76	55	38	424	100	326	1593	162	885	291	91	220
1000 ng/mL	286	95	200	86	56	54	547	95	476	2842	231	1129	319	92	246
M±DP	207±59	83±8		77±6	55±1		417±94	91±9		1573±904	147±64		284±28	87±6	
CV	28%	10%		8%	2%		23%	10%		58%	43%		10%	7%	

A média (M), desvio padrão (DP) e CV foram calculados para as amostras com adição exógena de 6β-OHF.

^a Aumento da concentração de CLU quando não é efectuada a extracção prévia

com as da espectrometria de massas resultando num aumento adicional de especificidade. As técnicas de cromatografia mais utilizadas são a cromatografia líquida (LC-MS) e a cromatografia gasosa (GC-MS). Esta última, considerada a “*gold-standard*” no doseamento das hormonas esteróides, é utilizada apenas em centros especializados devido ao seu elevado custo e tempo de execução. O método que alia uma excelente exactidão à rapidez de execução é, sem dúvida, LC-MS/MS (cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas). Esta técnica apresenta uma alta sensibilidade, especificidade e precisão, e permite obter um valor preditivo de 90% na identificação da doença/síndrome de Cushing. Contudo, a sua utilização em Portugal está ainda pouco difundida, para este tipo de análises.²⁶⁻³¹

Conclusões

Ficou, inequivocamente demonstrada, a existência de diferentes graus de interferência induzidos pela presença de 6β-OHF no doseamento do CLU por imunoensaio, o que se traduz na obtenção de resultados laboratoriais falsamente elevadas. Assim, e com excepção do ensaio 2, a etapa de extracção com diclorometano é indispensável para eliminar os interferentes existentes na urina.

A dispersão de valores de CLU obtidos com o método directo, mesmo na ausência de 6β-OHF exógeno, reforça a possibilidade de outros metabolitos contribuírem, também, para níveis de cortisol urinário falsamente elevados.

Este trabalho sugere a necessidade de realizar outros estudos, utilizando a metodologia de extracção proposta por cada fabricante, e com um número suficiente de amostras, que permitam uma comparação estatística dos resultados.

Agradecimentos / Acknowledgments

Os autores agradecem à Associação de Endocrinologia Oncológica as verbas disponibilizadas para a aquisição de reagentes. Agradecem, também, à Dr^a Catarina Senra Moniz a avaliação da história clínica dos doentes – Estudo Prévio (trabalho desenvolvido no âmbito do Estágio de Laboratório de

Endocrinologia do Internato Médico de Endocrinologia, realizado no IPOLFG) e a Sofia Gomes (Laboratório de Endocrinologia, Serviço de Patologia Clínica, IPOLFG) a ajuda prestada na execução de alguns doseamentos de CLU.

Responsabilidades Éticas

Conflitos de Interesse: Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

Fontes de Financiamento: Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Proteção de Pessoas e Animais: Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos Dados: Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Ethical Disclosures

Conflicts of Interest: The authors report no conflict of interest.

Funding Sources: No subsidies or grants contributed to this work.

Confidentiality of Data: The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data.

Protection of Human and Animal Subjects: The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and with those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Referências

1. Walker BR, Seckl JR. Charter 18 - Cortisol metabolism. In: Björntorp P, editor. International Textbook of Obesity. Chichester: John Wiley & Sons; 2001. p. 241-68.
2. Khurana I. Textbook of Medical Physiology. Haryana: Elsevier; 2009.
3. Young Jr WFY. Sistema Endócrino-Volume 2. Coleção Netter de Ilustrações Médicas. Rio de Janeiro; Elsevier Brasil; 2015.
4. Toralles MB, Kalil JR, Cerqueira LA, Alves CD. A ação das isoenzimas 11 β hidroxisteróide desidrogenase tipo 1 e tipo 2 na patogênese da Síndrome de Cushing. Rev Brasil Promoção Saúde. 2012;20:104-10.
5. Abboud JLM, Notario R. Critical compilation of scales of solvent parameters. Part I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents. Pure Appl Chem. 1999;71:645-718.
6. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 13rd ed. Philadelphia : Elsevier; 2015.
7. Alves M, Neves C, Medina JL. Laboratorial diagnosis of Cushing's syndrome. Acta Med Port. 2010;23:63-76.
8. Sperling MA, editor. Pediatric endocrinology. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014.
9. Galteau M, Shamsa F. Urinary 6 β -hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. Eur J Clin Pharmacol. 2003;59:713-33.
10. Santiago C, Bandrés F, Gómez-Gallego F. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. Med Trabajo. 2002;11:130-40.
11. Mann HJ. Drug-associated disease: cytochrome P450 interactions. Crit Care Clin. 2006;22:329-45.
12. Lee C, Goeger DE. Interference of 6 β -hydroxycortisol in the quantitation of urinary free cortisol by immunoassay and its elimination by solid phase extraction. Clin Biochem. 1998;31:229-33.
13. Remer T, Maser-Gluth C, Wudy SA. Glucocorticoid measurements in health and disease-metabolic implications and the potential of 24-h urine analyses. Mini Rev Med Chem. 2008;8:153-70.
14. Ged C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Bories P, et al. The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450IIIa induction. Br J Clin Pharmacol. 1989;28:373-87.
15. Bansal V, Asmar NE, Selman WR, Arafah BM. Pitfalls in the diagnosis and management of Cushing's syndrome. Neurosurg Focus. 2015;38:E4.
16. Mičuda S, Hodač M, Šišpera L, Pařízek P, Pleskot M, Zimová G, et al. Influence of amiodarone on urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol in humans. Physiol Res. 2001;50:191-6.
17. Koup JR, Anderson GD, Loi CM. Effect of troglitazone on urinary excretion of 6beta-hydroxycortisol. J Clin Pharmacol. 1998;38:815-18.
18. Chortis V, Taylor AE, Schneider P, Tomlinson JW, Hughes BA, O'Neil DM, et al. Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5 α -reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement. J Clin Endocrinol Metab. 2012;98:161-71.
19. Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, et al. Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. Biochem J. 1992;281:359-68.
20. Boarder M, Newby D, Navti P, editors. Pharmacology for pharmacy and the health sciences: a patient-centred approach. New York: Oxford University Press; 2010.
21. Queiroz SC, Collins CH, Jardim IC. Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Química Nova. 2001;24:68-76.
22. Galeandro L, Sieber-Ruckstuhl NS, Riond B, Hartnack S, Hofmann-Lehmann R, Reusch CE, et al. urinary corticoid concentrations measured by 5 different immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry in healthy dogs and dogs with hypercortisolism at home and in the hospital. J Vet Int Med. 2014;28:1433-41.
23. Krasowski MD, Drees D, Morris CS, Maakestad J, Blau JL, Ekins S. Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. BMC Clin Pathol. 2014;14:1-13.
24. Morineau G, Gosling J, Patricot MC, Soliman H, Boudou P, Halnak A, et al. Convenient chromatographic prepurification step before measurement of urinary cortisol by radioimmunoassay. Clin Chem. 1997;43:786-93.
25. Lee C, Goeger DE. Interference of 6 β -hydroxycortisol in the quantitation of urinary free cortisol by immunoassay and its elimination by solid phase extraction. Clin Biochem. 1998;31:229-33.
26. Chiaradia MC, Collins CH, Jardim IC. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. Química Nova. 2008;31:623-36.
27. Deutschbein T, Petersenn S. Screening for Cushing's syndrome: new immunoassays require adequate normative data. Horm Metab Res. 2013;45:118-23.
28. 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. 2014;100:395-7.
29. Ceccato F, Barbot M, Zilio M, Frigo AC, Albiger N, Camozzi V, et al. Screening tests for Cushing's syndrome: urinary free cortisol role measured by LC-MS/MS. J Clin Endocrinol Metab 2015;100:3856-61.
30. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory-where to from here. Clin Biochem Rev. 2011;32:5-31
31. Fong BM, Tam S, Leung KS. Improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in clinical utility for the diagnosis of Cushing's syndrome. Anal Bioanal Chem. 2010;396:783-90.