

Metodologia para determinação de cortisol em pacientes portadores de incidentalomas adrenais do HUCFF por CLAE-EM/EM.

Andressa C. dos S. Marques¹ (PG), Veronica G. Telles¹ (IC), Marcio V. da S. Gomes¹ (PQ), Gabriel R. A. Carneiro¹ (PQ), Aline B. Moraes (PQ)², Leonardo V. Neto (PQ)², Monica C. Padilha^{1*} (PQ).

*email: monicapadilha@iq.ufrj.br

¹Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), Universidade Federal do Rio de Janeiro.

²Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Palavras Chave: Incidentaloma adrenal, cortisol, CLAE-EM/EM.

Introdução

Um incidentaloma adrenal é a presença de uma lesão nas glândulas suprarrenais, de tamanho superior a um centímetro, identificada em exames rotineiros de imagem. Os casos nos quais o tumor leva ao aumento do nível de cortisol no organismo são caracterizados como síndrome de Cushing. Em muitos casos, o fenótipo do paciente já apresenta indícios da síndrome. Entretanto, alguns pacientes apresentam apenas um aumento discreto da taxa desse hormônio endógeno, levando a sintomas inespecíficos. Neste caso, a síndrome é chamada de Síndrome de Cushing subclínica (SCS)¹.

Existem atualmente algumas metodologias utilizadas para confirmação da síndrome, porém são realizadas por imunoenaios, os quais apresentam baixa especificidade e baixa sensibilidade¹.

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento e posterior validação de uma metodologia sensível o suficiente para detectar pequenas alterações de cortisol na urina de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) que apresentam suspeita da SCS, de forma que facilite o diagnóstico destes pacientes.

Resultados e Discussão

A quantificação do cortisol foi realizada por construção de curvas analíticas tanto em urina sintética quanto em urina real isenta de cortisol, sendo esta obtida através de um processo de extração em fase sólida.

Os pontos da curva foram construídos em triplicata com 2 mL de urina, fortificados com padrão de cortisol e cortisol-D4 (padrão interno – PI). Anterior à cromatografia, as amostras citadas acima foram submetidas a um processo de hidrólise enzimática e *clean up* por extração em fase sólida.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um espectrômetro de massas em série (EM/EM); os principais parâmetros estão na Tabela 1.

Como resultados, o cortisol apresentou tempo de retenção de 5,78 minutos (Figura 1) e PI em 5,77 minutos. Foi observada que as curvas com urina sintética e urina real (Figura 1) apresentam ótimos coeficientes de determinação.

Tabela 1. Parâmetros da CLAE-EM/EM.

Coluna analítica		C8 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)
Fase móvel	Fase A	Água deionizada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio.
	Fase B	Metanol com 0,1% (v/v) de ácido fórmico.
Volume de injeção		5 µL
Temperatura do forno da coluna		40°C
Modo de ionização		Positivo
Modo de varredura		Monitoramento de íons selecionados (SIM) – m/z 121 para quantificação de cortisol e PI.

Não foram apresentados pontos aberrantes e as curvas mostraram-se homocedásticas, confirmados através dos testes estatísticos de Grubbs e de Cochran ($\alpha = 0,05$ para ambos).

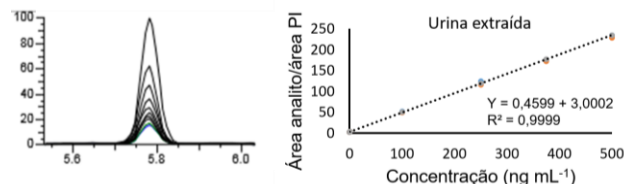


Figura 1. Íons produto de cortisol e curva em triplicata utilizando urina real isenta de cortisol.

A comparação da resposta das curvas foi dada através dos resultados da quantificação de cortisol na urina real e em um controle positivo. O teste T pareado ($\alpha=0,05$) e a análise do intervalo de confiança (99%) mostrou que ambas as curvas fornecem a mesma resposta. Sendo assim, na próxima etapa do projeto serão utilizadas as urinas sintéticas para a validação da metodologia.

Conclusões

Como perspectiva futura, espera-se a otimização do tempo de hidrólise para posterior validação e aplicação da metodologia para as urinas dos pacientes do hospital universitário.

Agradecimentos

CAPES, CNPq e LBCD-UFRJ.

¹ Zavatta, G.; Di Dalmazi, G. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2018**, 47, 375.