

Avaliação dos Potenciais Problemas Pré-Analíticos e Metodológicos em Dosagens Hormonais

artigo original

RESUMO

José Gilberto H. Vieira

Dosagens hormonais são particularmente susceptíveis a potenciais interferências, que podem ser de várias origens. Estes fatores interferentes podem ser divididos em pré-analíticos, metodológicos e pós-analíticos. Nesta revisão nós procuramos abordar os dois primeiros tipos de interferentes. Os pré-analíticos incluem variações fisiológicas relativas a dieta, ritmos biológicos, estresse, doenças não endócrinas, uso de medicações hormonais, etc. Podem também englobar problemas de coleta de amostras, que incluem o tipo de material utilizado, as condições de manuseio e envio das amostras, e as conseqüências na preservação física dos analitos. Já os interferentes metodológicos podem ser de várias origens e incluem anticorpos heterófilos, anticorpos endógenos anti-hormônios e outros interferentes das mais variadas origens. Todos estes fatores devem ser analisados em conjunto quando da interpretação de uma dosagem hormonal. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/1:9-15)

Descritores: Dosagens hormonais; Interferentes pré-analíticos; Interferentes analíticos

ABSTRACT

Evaluating Potential Pre-analytical and Methodological Interference Factors in Hormone Measurements.

Hormone measurements are particularly prone to potential interferences that can be of several origins. These interference factors can be divided in pre-analytical, methodological and post-analytical. In this review we dealt with the first two forms of interference. The pre-analytical factors include physiological variations due to diet, biological rhythms, stress, non-endocrine diseases, use of hormone replacement, etc. It can also include problems in sample collection, the type of material employed in the sample collection, the handling and shipping conditions and all the consequences they can have in the integrity of the analyte. The methodological interference factors can also be of various origins, including heterophylic antibodies, endogenous anti-hormone antibodies and other factors. All these potential interference factors have to be analyzed together in order to permit a correct interpretation of the laboratory results. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/1:9-15)

Keywords: Hormone measurements; Pre-analytical interferences; Analytical interferences

*Setor de Endocrinologia do Centro de
Medicina Diagnóstica Fleury e
Disciplina de Endocrinologia Clínica
da Escola Paulista de Medicina
(UNIFESP/EPM), São Paulo, SP.*

*Recebido em 10/10/01
Aceito em 18/01/02*

TESTES LABORATORIAIS MEDEM as condições fisiológicas em que se encontra um determinado indivíduo, em determinado momento. Quando os valores encontrados estão acima ou abaixo de valores de referência, o resultado é considerado anormal, levantando-se ou confirmando-se a possibilidade de um condição patológica. Na prática, porém, existem condições onde os resultados de testes laboratoriais não se enquadram nos limites definidos como normais, e nem por isto o paciente apresenta uma condição patológica. Os testes que medem níveis séricos, plasmáticos ou urinários de hormônios são especialmente susceptíveis a estas variáveis, e as razões para que isto ocorra podem ser didaticamente divididas em três grupos:

- Fatores pré-analíticos,
- Fatores metodológicos e
- Fatores pós-analíticos.

Neste texto vamos nos prender aos fatores pré-analíticos e metodológicos. Os primeiros são os fenômenos que, ocorrendo antes da análise, podem interferir significativamente no resultado final da mesma. Incluem as condições do indivíduo, o processo de coleta da amostra e sua manipulação. Já os fatores metodológicos, ou interferentes analíticos, são aqueles que incidem durante a execução da dosagem. Não analisaremos os fatores pós-analíticos, desde que estes se prendem basicamente a problemas de comunicação de dados e resultados.

FATORES PRÉ-ANALÍTICOS

A. Variações fisiológicas que podem afetar os resultados ou a interpretação dos mesmos

Diferenças baseadas em valores de referência não representativos, ou falhas na obtenção de informações sobre o paciente.

Um quesito fundamental para a análise do resultado de uma dosagem hormonal é que os valores de referência utilizados (faixa de normalidade) sejam compatíveis com o paciente em estudo. Dependendo da dosagem, quesitos como sexo, idade, horário de coleta, jejum e outras variáveis devem obrigatoriamente ser levadas em consideração, e para que isto ocorra de maneira correta, as informações pertinentes devem ser de conhecimento do laboratório. Caso isto não ocorra o problema transforma-se de pré em pós-analítico. Como exemplo, no caso das dosagens hormonais de esteróides adrenais ou gonadais este fenômeno é particularmente evidente, vide caso do cortisol (variação circadiana), sulfato de dehidroepiandrosterona (idade), progesterona (idade e sexo) etc. Outra condição, inde-

pendente do cuidado de se empregar faixas de normalidade compatíveis com o sexo, idade ou outras variáveis pertinentes, é a própria metodologia empregada para definir a faixa de normalidade. Muitas vezes são considerados valores fornecidos pelos fabricantes do kit comercial empregado na dosagem, e estes podem não ser compatíveis com a população a ser estudada. Uma norma fundamental é a comparação entre os valores referidos pelo fabricante dos reagentes e pela literatura especializada, com os encontrados em uma amostra significativa da população a ser estudada. Sem estes cuidados, a obtenção de informações detalhadas sobre o paciente perde seu valor.

Dieta

A condição de jejum antes da coleta de uma dosagem hormonal é considerada básica sem que, na maioria das vezes, existam razões técnicas para tal. Alguns hormônios apresentam variações significativas com a ingesta alimentar, sendo os mais marcantes a insulina e o hormônio do crescimento. O cortisol também apresenta elevação significativa após uma refeição, bem como o paratormônio após a ingestão de quantidades significativas de cálcio, mas a maioria das dosagens hormonais é pouco ou nada afetada pelo jejum. Uma refeição copiosa pode no entanto induzir a um estado de hipertrigliceridemia, que potencialmente pode interferir nas dosagens, em especial de esteróides. Jejum muito prolongado pode alterar as condições fisiológicas, levando a uma condição de estresse que pode elevar alguns hormônios como cortisol e dehidroepiandrosterona (1), mas pode levar a valores mais baixos em alguns hormônios hipofisários, como TSH, LH e FSH (2).

Variações Ditadas por Ritmos Biológicos

Estas podem ser de três tipos: as induzidas por ritmos circadianos (diários), fase do ciclo menstrual e ritmos circanuais. Quanto às variações circadianas, a mais conhecida e nítida é aquela do sistema ACTH/cortisol, que exige avaliação cuidadosa do horário de coleta antes da avaliação do resultado. A informação do horário da coleta deve ser parte integrante do resultado das dosagens de ACTH e de cortisol. Outros hormônios adrenais como a dehidroepiandrosterona (mas não seu sulfato) também apresentam ritmo circadiano, assim como alguns hormônios hipofisários, como o TSH (3), e gonadais, como a testosterona (4). Estes dados reforçam a informação de que a coleta em horário pré-definido pode ser crítica para alguns hormônios. De qualquer maneira, como regra básica para o acompanhamento de um paciente, é muito interes-

sante que qualquer dosagem hormonal seja feita sempre aproximadamente no mesmo horário.

Com relação às variações decorrentes da evolução do ciclo menstrual, são muito marcantes, em especial nos níveis dos hormônios diretamente relacionados com o mesmo, como LH, FSH, progesterona e estradiol. Outros esteróides de produção ovariana parcial, como a testosterona, a androstenediona (aumentam na fase lútea e, principalmente, com o pico ovulatório) e a 17 alfa-hidroxiprogesterona (aumenta na fase lútea), também apresentam flutuações significativas e devem ser interpretados levando-se em conta a época do ciclo em que foram colhidas as amostras. Uma regra útil é efetuar a coleta de qualquer hormônio esteróide, não diretamente ligado ao ciclo menstrual, no início da fase folicular. O término das menstruações também acarreta mudanças muito significativas nos níveis dos hormônios diretamente ligados ao ciclo, mudanças estas que podem começar a ocorrer algum tempo antes do término definitivo da perda sangüínea (5). Evidentemente estes aspectos devem ser considerados quando da interpretação de resultados. Quanto às variações circanuais, estas são de menor monta e restritas a regiões onde as estações são mais marcadas, como por exemplo as variações de vitamina D em regiões de invernos longos com menor incidência de raios solares.

Variações Induzidas por Estresse Físico ou Emocional

Além das conhecidas alterações provocadas por estresse nos chamados "hormônios de estresse", como o ACTH, cortisol, catecolaminas, GH e prolactina, condições extremas podem levar a alterações nos níveis séricos de outros hormônios. Se bem que não considerada normalmente uma condição de estresse, a postura ereta por tempo significativo (horas) pode acarretar alterações significativas em algumas dosagens hormonais. As mais evidentes se relacionam aos níveis de atividade de renina plasmática e de aldosterona, mas também, se bem que menos intensamente, elevam-se os níveis dos hormônios ligados a proteínas carregadoras, desde que a condição leva a uma concentração aumentada das proteínas plasmáticas. Estas alterações são proporcionais ao fenômeno de estase venosa induzido pela postura, ou mesmo pelo garroteamento prolongado, que, apesar de não induzir alterações no sistema renina-aldosterona por ser um fenômeno induzido localmente, produz o mesmo tipo de hemoconcentração, associada a uma discreta acidose. Uma das condições de erro mais comuns é o encontro de níveis de cálcio (total e/ou ionizado) elevado pós-garroteamento por tempo prolongado. Exercício físico de

alta intensidade sabidamente leva a uma série de alterações laboratoriais, como aumento de enzimas de origem muscular, e pode também induzir alterações nos ritmos hormonais (6).

Variações Devidas a Doenças Não Endócrinas
Afora a liberação dos "hormônios de estresse" já referidos, uma série de condições clínicas graves, não endócrinas, podem levar a alterações significativas dos níveis hormonais. Uma das condições mais citadas e observadas é a chamada *euthyroid sick syndrome* que, na realidade, se compõe de uma série de alterações dos níveis de hormônios tiroideanos induzidas por alterações metabólicas não relacionadas diretamente à função tiroideana (7). A interpretação dos níveis de T4 e T3, totais e livres, e mesmo de TSH, pode ser bastante complexa em doentes graves. Pode também ocorrer a inibição da liberação de alguns hormônios hipofisários, como LH e FSH, em condições como estágios avançados da infecção por HIV (8). A lista de condições que podem potencialmente interferir em níveis hormonais é bastante extensa e variada e pode ser encontrada nas referências 9 e 10.

Efeitos Gerados por Medicamentos Hormonais

O uso de medicações hormonais traz, evidentemente, profundas alterações nas dosagens dos hormônios relacionados. As condições mais comuns se relacionam à interpretação de TSH e de hormônios tiroideanos na vigência de uso de tiroxina e/ou triiodotironina. É fundamental o conhecimento sobre o uso ou não dos hormônios tiroideanos, bem como o horário de tomada da última dose. Infelizmente esta informação nem sempre é disponível, muitas vezes por que o próprio paciente não está a par de que algumas "fórmulas naturais" incluem hormônios tiroideanos. Outra condição potencialmente problemática refere-se à dosagem de cortisol em pacientes em uso de glicocorticóide exógeno. Neste caso podemos ter duas condições distintas: se o corticóide em uso é a hidrocortisona, os valores encontrados podem ser extremamente elevados e sem valor diagnóstico; no caso do corticóide exógeno não apresentar reatividade cruzada no ensaio de cortisol, o que ocorre com praticamente todos os medicamentos utilizados (com exceção da hidrocortisona), os valores de cortisol estarão suprimidos. Caso especial é o emprego de prednisona, que apresenta reatividade cruzada variável com a maioria dos anticorpos empregados nos ensaios de rotina de cortisol (11).

Outra condição encontrada com relativa frequência é a supressão dos níveis de TSH pelo emprego de doses farmacológicas de corticóides (12), sendo

que estudos recentes demonstraram que mesmo as flutuações dos níveis de cortisol em níveis fisiológicos influenciam a secreção de TSH (13). Outra alteração reportada é a queda dos níveis de T4 total, livre e de rT3, com aumento de T3, observados em pacientes com deficiência isolada de GH ao longo dos primeiros meses de terapia com GH (14). Além dos efeitos diretos e óbvios do uso de gonadotrofinas (LH, FSH, hCG) no nível sérico das mesmas (lembrar que vários ensaios de LH apresentam reatividade cruzada com hCG), os níveis de LH e FSH podem ser suprimidos com o uso de anabólicos esteróides (15). Tal prática é cada vez mais comum, e acompanha-se nos homens de níveis suprimidos de testosterona e nas mulheres, de estradiol, simulando uma condição de hipogonadismo hipogonadotrófico. Outra condição cada vez mais frequente é o uso de testosterona por mulheres, que vem tendo aplicações cada vez mais amplas (16). Nossa experiência prática e a de outros grupos (17,18) é de que os níveis encontrados em mulheres em reposição são em geral acima da faixa de normalidade para a faixa etária, sendo nitidamente dose dependentes (18).

B. Variações devidas ao método empregado na coleta da amostra

Origem da Amostra

No caso das dosagens hormonais sangüíneas, não existem razões para que a amostra não seja de origem venosa, daí ser desnecessária a discussão sobre as possíveis diferenças entre amostras capilares, arteriais e venosas. Uma condição muito peculiar se refere ao local de punção em pacientes com autotransplante de paratiróide, onde pode ser interessante a coleta de material a jusante do implante, para avaliar a sua viabilidade, bem como em local distante, para avaliar a condição geral de secreção. Amostras obtidas através de coleta por cateterismo seletivo, como o de seio petroso, ou de veias adrenais, devem evidentemente ser cuidadosamente identificadas.

Contaminações por Fluidos Endovenosos

Em pacientes internados é comum a instalação de linhas endovenosas para infusão de fluidos e aplicação de medicações endovenosas. Um cuidado óbvio, mas algumas vezes negligenciado, é que a retirada de amostras sangüíneas para a execução de análises laboratoriais, inclusive dosagens hormonais, deve ser feita em veia afastada do local da infusão, por exemplo no braço contralateral. As dosagens mais frequentemente alteradas por erros de local de coleta são a glicemia, calcemia e cortisol, além de resultados falsamente baixos em

função de diluição com solução salina. Apesar deste ser um problema que uma metodologia de coleta coerente deve evitar, é sempre bom ter em mente a possibilidade, principalmente quando da obtenção de resultados surpreendentes.

Hemólise

A hemólise, e conseqüente contaminação do soro com o conteúdo dos eritrócitos, é fenômeno comum e que pode resultar em potenciais problemas técnicos. A razão para a ocorrência de hemólise *in vitro*, após a coleta da amostra, pode ter várias origens. As mais comuns são físicas e decorrentes de fluxos mais rápidos, a que se submetem as amostras de sangue; isto em geral decorre de problemas na coleta e conseqüente aplicação de vácuo excessivo, quer na retirada, quer na transferência da amostra. Outra razão pode ser a existência de quantidades mesmo diminutas de água no tubo, o que também ocasiona graus variáveis de hemólise. A quantificação da hemólise é teoricamente simples, existindo alguns aparelhos automáticos que avaliam o grau de hemólise por espectrometria, mas a importância prática deste procedimento é questionável, desde que mesmo pequenos níveis de hemólise podem ser importantes para algumas determinações, e não para outras. Como regra geral, a hemólise, liberando o conteúdo eritrocitário, transfere para o soro entre outras coisas uma quantidade significativa de enzimas proteolíticas, e desta maneira as determinações potencialmente mais susceptíveis são as dos hormônios peptídicos. Dentre estes destacam-se: insulina, glucagon, PTH, ACTH, calcitonina, dentre os mais sensíveis. No caso da insulina, um dos hormônios mais sensíveis à ação das enzimas liberadas, a presença de hemólise invalida a dosagem levando a resultados falsamente baixos. Recentemente o uso de inibidores tem sido testado com o intuito de evitar esse problema potencial (19). Nunca esquecer que a hemólise leva a um aumento dos níveis de potássio sérico, fato que pode ter importância numa avaliação de função adrenal.

Tipo de Tubo Empregado na Coleta e Tipo de Amostra

O tipo de tubo empregado na coleta da amostra deve, evidentemente, estar em conformidade com a metodologia empregada na determinação, e com as características do analito. Assim, a título de exemplo, a dosagem de ACTH implica numa série de cuidados no sentido de evitar a degradação enzimática do hormônio, e geralmente inicia-se com a coleta em tubos contendo EDTA, que atua como anticoagulante possibilitando a centrifugação rápida, e também como inibidor enzi-

mático. No entanto, alguns anticoagulantes são incompatíveis com algumas metodologias, como por exemplo o mesmo EDTA e ensaios imunofluorométricos, isto porque o traçador desses ensaios, o európio, é quelado pelo EDTA presente na amostra, invalidando o método. Outro exemplo prático muito comum são os problemas de coleta de amostras para cálcio ionizado, que, apesar de não ser dosagem hormonal, é rotina muito vivenciada por endocrinologistas. Inúmeros relatos de diferentes graus de interferência por diferentes preparações de heparina têm sido descritos (20-22) e uma padronização cuidadosa deve existir para permitir a obtenção de valores confiáveis.

A utilização de tubos com gel separador é, a princípio, bastante conveniente, mas traz consigo alguns problemas potenciais. Em primeiro lugar, o gel permite uma separação rápida e segura do soro, mas a estocagem a mais longo prazo exige transferência da amostra para outro tubo limpo, desde que o gel deteriora com o tempo e podemos ter contaminação entre as duas fases. Outro problema potencial é a necessidade de recentrifugação de amostras estocadas sem transferência, que em geral leva a graus variáveis de hemólise. Por último, se se empregam aparelhos de pipetagem automática, a calibração deve ser cuidadosa para evitar que a ponta da pipeta entre em contato com o gel, o que pode ocasionar problemas na retirada do volume correto, e possível interferência de partículas de gel na reação.

C. Variações devidas a problemas pós-coleta

Este grupo de possíveis interferências se prende basicamente a problemas de acondicionamento das amostras. Em ambiente hospitalar, em especial em Hospitais Universitários, é comum a "Síndrome do Bolso do Avental", caracterizada pelo esquecimento de amostras no bolso do avental em condições em geral nada ideais para a preservação de analitos raros (temperatura ambiente, não separação de soro/plasma, agitação). Em ambiente laboratorial o problema basicamente se prende ao envio de amostras para laboratórios de referência em outras cidades/estados. Mesmo com a embalagem correta, muitas vezes as amostras são submetidas a condições não usuais durante o transporte (atraso de vôos, manipulação não cuidadosa das embalagens, exposição ao sol, etc.). Uma das condições que traz mais preocupação ao laboratório é o recebimento de amostras, que deveriam chegar congeladas, mas que são recebidas já em processo de descongelamento, parcial ou total. As perguntas de sempre são: há quanto tempo o processo está ocorrendo? Qual a influência no resultado da

análise? A primeira pergunta é, na maioria das vezes, impossível de ser respondida, e a segunda depende basicamente de uma resposta correta à primeira. Do ponto de vista prático, uma atitude rígida quanto às condições de recebimento das amostras é a única maneira de se evitar gastos desnecessários e, mais importante, diagnósticos errôneos.

FATORES METODOLÓGICOS

Entendendo como fatores metodológicos aqueles que, presentes na amostra, vão atuar durante o ensaio levando a resultados falsos, eles existem em várias formas e incidem em diferentes ensaios com diferentes intensidades. Os resultados são em geral falsamente elevados, mas podemos encontrar circunstâncias onde resultados falsamente baixos serão encontrados. A causa mais genérica e comum de interferência é a presença de anticorpos heterofílicos.

Anticorpos Heterofílicos

São anticorpos dirigidos contra imunoglobulinas de diferentes espécies, sendo que os que mais nos interessam são os dirigidos contra imunoglobulina de camundongo, desde que a maioria dos anticorpos empregados atualmente são monoclonais. A presença destes anticorpos é mais freqüente do que gostaríamos e potencialmente pode interferir em todos os ensaios imunométricos (23). Os anticorpos interferem principalmente por sua capacidade de ligar os dois anticorpos que compõe o ensaio, o de captura e o de revelação, na ausência do antígeno específico, gerando então um falso sinal. Esta ligação é em geral entre as porções Fc das imunoglobulinas que compõe o ensaio. A razão pela qual algumas pessoas possuem este tipo de anticorpo não é bem esclarecida. No entanto, os métodos imunométricos têm evoluído no sentido de se tornarem mais imunes a este tipo de fenômeno, quer seja pela adição de IgG de camundongo ao tampão do ensaio, pelo uso de anticorpos de diferentes espécies (carneiro, galinha), ou pela modificação dos anticorpos (24). No entanto, o problema é encontrado até hoje em algumas pessoas e com alguns ensaios, de maneira que deve ser sempre investigado quando da obtenção de resultados surpreendentemente altos em qualquer ensaio imunométrico (25).

Anticorpos Anti-Hormônios

Desde a descrição dos primeiros imunoensaios para a dosagem de insulina, a presença de anticorpos contra insulina em pacientes tratados com insulina exógena e sua interferência nos resultados da dosagem do hor-

mônio foram reportados (26). Genericamente o que se observa num indivíduo com anticorpos endógenos contra determinado hormônio são valores inesperadamente elevados do respectivo hormônio, fenômeno este devido ao aumento da concentração circulante em função da existência de uma fração ligada ao anticorpo. Esta fração tem em geral meia vida biológica mais prolongada e não apresenta atividade biológica, sendo a intensidade do fenômeno diretamente relacionado com a quantidade e afinidade dos anticorpos presentes. O fenômeno já foi descrito para todos os hormônios de maior interesse prático, e pode se transformar num problema diagnóstico de grande relevância (27,28). No caso específico da insulina a solução encontrada foi a medida da insulina "livre" obtida após precipitação com polietilenoglicol (29), técnica que pode potencialmente ser aplicada a qualquer outra dosagem. Quanto à presença de anticorpos anti-prolactina, o fenômeno é aparentemente muito freqüente e é abordado em artigo mais adiante neste número sobre macroprolactinemia.

Outra área onde os anticorpos específicos contra hormônios trazem problemas é na dosagem dos hormônios tiroideanos (30,31). Este fenômeno é mais freqüente em pacientes que apresentam anticorpos anti-tiroglobulina e pode resultar em resultados elevados de T3 e/ou T4. O fenômeno depende da afinidade dos anticorpos, podendo ser muito sutil e passar despercebido. A maior incidência de interferência nos ensaios de T3 se deve provavelmente à sua maior susceptibilidade devida à menor quantidade de hormônio circulante em relação ao T4.

Outros Interferentes

Considerando ainda a dosagem de hormônios tiroideanos, outro fator que pode levar a valores falsamente elevados ou baixos são as variações na concentração da globulina ligadora de tiroxina (TBG). Estas variações interferem principalmente nas dosagens dos hormônios totais, mas em condições extremas também nas dosagens de hormônios livres, em especial se forem realizadas por técnica de diálise (32). Outra área onde os interferentes são freqüentes e de várias origens é na dosagem de hormônios esteróides. Esta área do laboratório em endocrinologia está sendo abordada com maior extensão em outro artigo deste número da revista, porém um tipo de interferente, que deve ser abordado em separado, refere-se a fatores inespecíficos que resultam em valores falsamente elevados de alguns esteróides (33). São mais comuns nas dosagens de progesterona, estradiol e testosterona, muito provavelmente porque estas

dosagens, pela sua alta demanda, foram sendo automatizadas e simplificadas tornando-as mais suscetíveis a interferentes. Tanto isto é verdade que a solução para este tipo de problema em geral passa pela introdução de um processo de extração prévia, tornando a amostra mais apropriada para a análise.

CONCLUSÕES FINAIS

As dosagens hormonais são parte integrante da prática endocrinológica moderna, sendo indispensáveis em uma série de condições. Seu uso, no entanto, implica em que uma série de premissas de preparo do paciente, metodologia de coleta e compreensão de limitações técnicas, sejam incorporadas ao raciocínio interpretativo dos resultados. A evolução tecnológica tende a nos dar uma falsa segurança de que todos os problemas técnicos estão resolvidos, o que não é verdade. O raciocínio crítico sobre o resultado de uma dosagem hormonal é absolutamente fundamental para uma conclusão segura. Tão fundamental quanto a boa prática laboratorial na coleta, transporte e execução da dosagem, que deveria ser a norma.

REFERÊNCIAS

1. Tegelman R, Lindeskog P, Carlstrom K. Peripheral hormone levels in healthy subjects during controlled fasting. *Acta Endocrinol* 1986;113:457-62.
2. Fichter MM, Pirke MM, Holsboer F. Weight loss causes neuroendocrine disturbances: experimental study in healthy starving subjects. *Psychiat Res* 1986;17:61-72.
3. Abucham J, Castro V, Maccagnan P, Vieira JGH. Increased thyrotropin levels and loss of nocturnal thyrotropin surge in Sheehan's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:515-22.
4. Lejeune-Lenain C, Van Cauter E, Desir D. Control of circadian and episodic variations of adrenal androgens secretion in man. *J Endocrinol Invest* 1987;10:267-76.
5. Sherman BM, West JH, Korenman SG. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:629-36.
6. Opstad PK. Circadian rhythm of hormones is extinguished during prolonged physical stress, sleep and energy deficiency in young men. *Eur J Endocrinol* 1994;131:56-66.
7. Chopra IJ. Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer? *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:329-34.
8. Dobs AS, Dempsy MA, Ladenson PW. Endocrine disorders in men infested with AIDS. *Am J Med* 1988;84:611-6.
9. Friedman RB, Young DS. *Effect of disease on clinical laboratory tests*. 3rd ed. 1997; Washington, DC: AACC Press.
10. Tietz NW (ed). *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. 1995; Philadelphia: WB Saunders.

11. Vieira JGH, Russo EMK, Germek AO, Antunes LN. Método radioimunológico para a dosagem de cortisol sérico. **Rev Bras Patol Clin** 1979;15:125-31.
12. Wilber JF, Utiger RD. The effects of glucocorticoids on thyrotropin secretion. **J Clin Invest** 1969;48:2096-103.
13. Samuels MH. Effects of metyrapone administration on thyrotropin secretion in healthy subjects – a clinical research center study. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85:3049-52.
14. Wyatt DT, Gesundheit N, Sherman B. Changes in thyroid hormone levels during growth hormone therapy in initially euthyroid patients: lack of need for thyroxine supplementation. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:3493-7.
15. Alen M, Rahkila P, Reinila M. Androgenic-anabolic steroid effects on serum thyroid, pituitary and steroid hormone in athletes. **Am J Sports Med** 1987;15:357-61.
16. Davis S. Androgen replacement in women: a commentary. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:1886-91.
17. Shifren JL, Braunstein GD, Simon JA, Casson PR, Buster JE, Redmond GP, et al. Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy. **N Engl J Med** 2000;343:682-8.
18. Slater CC, Stanczyk FZ, Zhang C, Paulson RJ, Mishell DR. Excessive serum testosterone levels are found during testosterone replacement therapy in postmenopausal women. **Fertil Steril** 2001;75:S8.
19. Sapin R, Ongagna JC, Gasser F, Grucker D. Insulin measurements in haemolysed serum: influence of insulinase inhibitors. **Clin Chim Acta** 1998;274:111-7.
20. Nikolakakis NI, De Francisco AM, Rodger RSC, Gaiger E, Goodship THJ, Ward MK. Effect of storage on measurement of ionized calcium in serum of uremic patients. **Clin Chem** 1985;31:287-9.
21. Bowers Jr GN, Brassard C, Sena SF. Measurement of ionized calcium in serum with ion-selective electrodes: a mature technology that can meet the daily service needs. **Clin Chem** 1986;32:1437-47.
22. Landt M, Hortin GL, Smith CH, McClellan A, Scott MG. Interference in ionized calcium measurements by heparin salts. **Clin Chem** 1994;40:565-70.
23. Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. **Clin Chem** 1998;34:27-33.
24. Reisenberg J. Different efficacy of various blocking reagents to eliminate interference by human anti-mouse antibodies with two-site immunoassay. **Clin Biochem** 1996;29:145-8.
25. Lauberg P. Persistent problems with the specificity of immunometric TSH assays. **Thyroid** 1993;3:279-83.
26. Berson AS, Yalow RS. Insulin in blood and insulin antibodies. **Am J Med** 1966;40:676-90.
27. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:3107-10.
28. Cavaco B, Leite V, Loureiro MM, Ferreira MF, Pereira MC, Santos MA, et al. Spontaneously occurring anti-PTH autoantibodies must be considered in the differential diagnosis of patients with elevated serum PTH levels. **J Endocrinol Invest** 1999;22:829-34.
29. Hanning I, Home PD, Alberti KG. Measurement of free insulin concentrations: the influence of timing of extraction of insulin antibodies. **Diabetologica** 1985;28:831-5.
30. Després N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. **Clin Chem** 1998;44:440-54.
31. Ramos HE, Alberti GC, Hauk PR, Graf H, Carvalho GA. Interferência de anticorpos em testes de função tireoideana: relato de caso. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2001;45:199-201.
32. Vieira JGH, Tachibana TT, Obara LH, Nishida SK, Lombardi MT, Maciel RMB. Desenvolvimento de ensaio imunofluorométrico para a medida da proteína carreadora de tiroxina (*Thyroxine-Binding Globulin*, TBG) e sua aplicação em casos de deficiência da proteína. **J Bras Patol** 2002 (no prelo).
33. Vieira JGH, Tachibana TT, Noguti KO, Ferrer CM, Maciel RMB. Valores falsamente elevados em ensaios diretos para a medida de hormônios esteróides no soro. **J Bras Patol** 1999;35:1-74.

Endereço para correspondência:

José Gilberto H. Vieira
Setor de Endocrinologia
Fleury - Centro de Medicina Diagnóstica
Av. General Waldomiro de Lima, 508
04344-070 São Paulo, SP
e.mail: jose.vieira@fleury.com.br