

MEDICIÓN DE CORTISOL Y SUS FRACCIONES UNA PUESTA AL DÍA

PATRICIA MAIDANA^{1,2}, OSCAR D. BRUNO², VIVIANA MESCH¹

¹Área Endocrinología, Departamento de Bioquímica Clínica, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, ²Estudios Metabólicos y Endocrinos, Buenos Aires

Resumen La determinación del cortisol sérico total forma parte fundamental de la exploración bioquímica de la función adrenocortical. Dado que esta hormona circula en plasma, en parte unida a proteínas de transporte y en parte en estado libre, existe la posibilidad de realizar la determinación de sus diferentes fracciones no solo en sangre sino también en orina, saliva y otros fluidos biológicos. Es posible realizar tanto determinaciones basales como pruebas funcionales y de esta manera evaluar la secreción de cortisol en un momento dado del día, estudiar su variación circadiana y analizar su relación con el resto de los componentes del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Las mediciones habituales de cortisol en sangre, saliva y orina reflejan los niveles de esta hormona en el momento de la recolección o durante un período de 24 horas. Recientemente han aparecido trabajos en los cuales se propone la determinación de cortisol en cabello y uñas como potenciales marcadores del estatus hormonal en períodos más prolongados. El objetivo de esta revisión es realizar una puesta al día acerca de la metodología disponible actualmente en nuestro medio para la evaluación del eje adrenal, haciendo hincapié en su aplicación para el diagnóstico clínico.

Palabras clave: cortisol sérico, cortisol libre urinario, cortisol salival, proteína ligadora de corticosteroides, síndrome de Cushing, insuficiencia adrenal

Abstract *A critical analysis of cortisol measurements: an update.* Serum cortisol measurement is a very useful tool in the biochemical evaluation of adrenocortical function. Since this hormone circulates in blood mainly linked to binding globulins but is also partially free, it can be measured not only in the blood but also in urine, saliva and other biological fluids and tissues. Basal determinations as well as dynamic testing may be performed to evaluate the circadian variations, to estimate the diurnal cortisol secretion and to analyze its relations with other components of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Measurements of cortisol in blood, saliva and urine may reflect the cortisol secretion at the time of sample collection or during a 24 h span. Recently, it has been proposed the determination of cortisol in tissues such as hair and nails like a means of evaluating the hormonal status during prolonged periods. The aim of this paper is to update the methodology for measuring cortisol and its usefulness for the clinical diagnosis of troubles of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.

Key words: serum cortisol, urinary free cortisol, salivary cortisol, corticosteroid binding protein, Cushing syndrome, adrenal insufficiency

El eje hipotálamo-hipófiso-adrenal es crítico para la adaptación y supervivencia de los vertebrados. Brevemente, puede decirse que su activación está comandada principalmente por la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) secretada a nivel hipofisario como resultado de la estimulación de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y de la arginina vasopresina (AVP) a nivel central, para finalizar con la secreción de cortisol en la glándula suprarrenal (Fig. 1). El núcleo paraventricular, sitio de síntesis tanto del factor liberador de ACTH como de vasopresina, interacciona fuertemente con el núcleo supraquiasmático, que es el regulador de los ritmos biológicos.

El primer paso en la exploración bioquímica de la función adrenocortical se basa en la determinación del cortisol sérico total. No obstante, la interpretación de su medición requiere un análisis cuidadoso. El cortisol presenta un ritmo circadiano característico: en una persona normal con períodos sueño/vigilia estables, se presenta con episodios secretorios a lo largo de las 24 horas. La concentración plasmática de cortisol es más alta al despertar y declina durante el día, hasta llegar a un mínimo durante la primera y segunda horas del sueño. Luego, sus niveles suben en forma gradual en las fases posteriores del sueño para volver a un máximo al despertar (Fig. 2). Este ritmo circadiano puede modificarse alterando el patrón del sueño, pero sólo si la alteración persiste varios días¹. Los ciclos de luz y oscuridad también influyen sobre el ritmo circadiano. Por otra parte, este ritmo es modulado por el estrés, la actividad física, la dieta y la ingesta de fármacos.

Recibido: 8-IV-2013

Aceptado: 29-VII-2013

Dirección postal: Patricia N. A. Maidana, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54- 11) 59508691 e-mail: pnamaidana@gmail.com

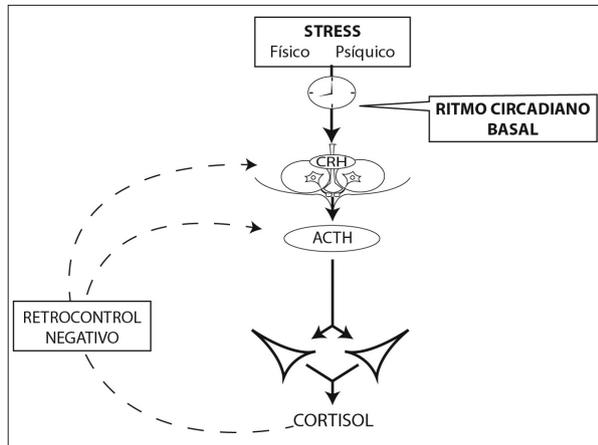


Fig. 1.- Regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal

Tomada de: Bruno OD. "Corticoterapia". Separata Montpellier, 2003. <http://www.montpellier.com.ar/separatasR1.asp>

En humanos, el cortisol circula en sangre principalmente unido a la proteína ligadora de corticosteroides (*corticosteroid binding globulin*; CBG) y a la albúmina, con una cantidad mucho menor de hormona no unida a proteínas, que es la responsable de sus efectos metabólicos.

La CBG es la principal proteína de transporte para glucocorticoides en sangre. Presenta alta afinidad para cortisol, y une con menor afinidad otros esteroides tales como progesterona, desoxicorticosterona, corticosterona y algunos corticosteroides sintéticos análogos. Es producida por el hígado como una proteína de 50 a 60 KDa con un solo sitio de unión para esteroide, y su afinidad es de cuatro órdenes de magnitud más alta que la de la albúmina. Su constante de afinidad para glucocorticoides² es $2,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Como resultado, aproximadamente el 80% del cortisol se une a CBG en el plasma humano, mientras que 10-15% se une a la albúmina y aproximadamente el 5% circula en estado libre³. Sin embargo, el rol biológico de la CBG puede extenderse más allá que el de una simple molécula carrier⁴. Así, como miembro de la familia de inhibidor de serina proteasa (serpina), la CBG lleva a cabo un cambio conformacional, interacciona con la elastasa de los neutrófilos, interrumpe la unión al esteroide y promueve la liberación de cortisol a los tejidos blanco durante la inflamación⁵. Cambios en los valores de CBG también influyen en la exposición de tejidos a glucocorticoides durante estadios específicos del desarrollo y en ciertas patologías. En este contexto, la CBG que se produce en el hígado y en otros tejidos está altamente regulada, tanto durante el desarrollo fetal como postnatal, y tales cambios pueden influir sobre los bien conocidos efectos de los glucocorticoides sobre la maduración de órganos como riñón y pulmón. Además, la CBG se comporta como una proteína de fase aguda negativa durante la inflamación aguda, así como también en pacientes con infección sistémica, sepsis, quemaduras severas e infarto

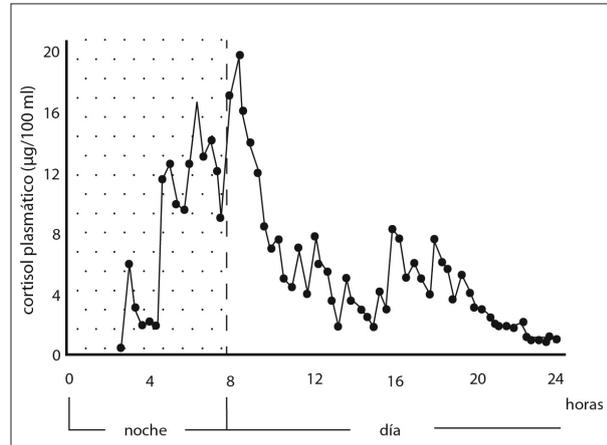


Fig. 2.- Ritmo circadiano del cortisol sérico extrapulado de muestras obtenidas cada 20 minutos, durante 24 h, en un sujeto normal

Modificado de Weitzman y col.¹

de miocardio, y ello probablemente asegura que el órgano final reciba una cantidad máxima de glucocorticoides para controlar la inflamación, gluconeogénesis y estrés⁶. El entendimiento del rol fisiológico de la CBG ha avanzado por la descripción de variantes genéticas con anomalías cuali y cuantitativas en humanos y algunos modelos animales. En humanos, el gen de esta proteína consta de 5 exones (4 codificantes: 2-5) y está localizado muy próximo a otros genes de serpina sobre el cromosoma 14q32.1. La deficiencia de CBG es un desorden recesivo y se han descrito solamente dos variantes con reducida afinidad a esteroide y una mutación nula que resulta en la completa ausencia de la proteína. El fenotipo asociado con la más pronunciada de estas deficiencias incluye hipotensión y fatiga, aunque el mecanismo fisiopatológico se mantiene incierto^{7, 8}. La frecuencia relativa de estas variantes en la población humana no se ha establecido, debido sobre todo a que la medida de CBG no es una determinación rutinaria y que sólo se estudia en pacientes con valores discordantes de cortisol respecto a la clínica. Algunas situaciones como el embarazo, el tratamiento con estrógenos exógenos (anticonceptivos, terapia hormonal de reemplazo) estimulan la síntesis hepática de CBG. La concentración de la misma se encuentra disminuida en el hipotiroidismo, la nefropatía con pérdida de proteínas en orina, la insuficiencia hepatocelular y el *shock* séptico.

Concepto de fracción activa

El concepto de fracción activa, la hormona libre, es un dogma de la endocrinología, desde su propuesta hace cincuenta años. La concentración intracelular es proporcional a la concentración en la sangre de la hormona libre y no a la concentración de hormona unida a proteína, la fracción libre es la entidad que se une al receptor y que tiene la acción biológica. La unión de la hormona a la proteína

transportadora es reversible y sigue la ley de acción de masas. Bajo ese concepto se desarrollaron diversas técnicas para la determinación de las hormonas libres considerando que el cortisol débilmente unido a la albúmina puede ser considerado como libre (cortisol biodisponible)⁹.

Una dificultad fundamental en la determinación de hormona libre es la perturbación del sistema de análisis de equilibrio proteína-ligando como ocurre *in vivo*. Si una cierta cantidad de hormona inicialmente unida a las proteínas plasmáticas se secuestra en el sistema de ensayo, la concentración del compuesto libre se altera. El alcance de esta alteración depende de la afinidad y capacidad de unión de las proteínas transportadoras. La dilución del suero y la presencia de aditivos que pueden unirse a proteínas transportadoras (conservadores, proteínas, disolventes, compuestos presentes en el medio de reacción) son condiciones que también pueden alterar el equilibrio proteína-ligando en la muestra.

Determinaciones bioquímicas para evaluar la fracción activa

Medida de cortisol libre urinario

La determinación de cortisol libre urinario (CLU) es una determinación habitual en la evaluación bioquímica del eje adrenal que se usa desde los años 60¹⁰. Representa la fracción de cortisol que no se metaboliza para ser eliminado por orina, y que se filtra como cortisol libre. Esta fracción es muy sensible para detectar hipercortisolismo debido a que la CBG se satura a una concentración de 25 µg/dl de cortisol. Superando ese valor, aumenta la cantidad de cortisol libre que se elimina en orina¹¹. Se puede realizar en orina de una hora o en orina de 24 horas. Este último constituye un ensayo integrado de la secreción de cortisol de 24 horas, siempre y cuando se efectúe una correcta recolección de la muestra. De las determinaciones en una hora, la medición más usada es la de CLU de 22-23 h que se utiliza para establecer la presencia o pérdida del ritmo circadiano¹²⁻¹⁴.

Esta determinación puede dar resultados elevados en todas aquellas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas que estimulen las neuronas productoras de CRH que activarán el eje adrenal con el consiguiente aumento de cortisol libre. Además, puede aumentar por interferencias medicamentosas. Por otra parte, como el cortisol libre urinario refleja la filtración renal, sus valores serán más bajos en pacientes con deterioro renal moderado o severo. Así, un valor anormalmente disminuido puede ocurrir cuando el *clearance* es menor a 60 ml/min y esta disminución va a ser mayor cuando la falla renal sea más grave¹⁵.

La determinación de cortisol libre urinario y sus distintas alternativas resulta un método más específico y sensible que la medición de los metabolitos urinarios del cortisol que eran detectados clásicamente por colorimetría.

Medida de cortisol salival

La medida de cortisol en saliva constituye un método no invasivo para medir cortisol libre¹⁶. El cortisol difunde libremente a través de los ácidos celulares de las glándulas salivales y su concentración es independiente de la tasa de flujo salival. Las principales ventajas son que el paciente puede obtener la saliva en su casa en situación libre de estrés, que es una muestra muy adecuada para niños en los cuales la venopunción puede resultar traumática, y que es una muestra estable. No obstante, se deben tomar algunos recaudos para su recolección como no cepillarse los dientes por lo menos 30 minutos antes de la obtención, evitar comer, beber y no realizar actividad física por lo menos 3 horas antes.

Existen diferentes opciones para la medición de cortisol en saliva. Ellas incluyen inmunoensayos como radioinmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (ELISA), electroquimioluminiscencia (ECQLIA) automatizado y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem (LC/TMS)¹⁷⁻²⁰.

La ventaja de los inmunoensayos es que son de costo relativamente bajo y que requieren poco volumen de muestra. La desventaja es la potencial reactividad cruzada con esteroides sintéticos como prednisona. El análisis mediante LC/TMS, por su parte, requiere equipamiento costoso y sofisticado.

Medida de cortisol libre plasmático

Equilibrio de diálisis

El método de diálisis es el método de referencia para la medida de hormonas esteroides libres en general y en particular de cortisol libre. El dispositivo de diálisis usado consiste en dos compartimentos separados uno de otro por una membrana semipermeable que permite que moléculas pequeñas circulen libremente y que moléculas grandes no lo hagan. El método histórico de cuantificación de cortisol consiste en evaluar el porcentaje de distribución entre ambos compartimentos de una pequeña cantidad de cortisol marcado con tritio, luego de una incubación en un agitador durante 30 minutos a 37 °C de una muestra de suero a la cual se le adiciona además un buffer adecuado. De esa manera, el dializado se mantiene en contacto físico con la membrana que retiene las proteínas de unión. Una vez que se alcanza el equilibrio (dentro de 16 a 24 horas), la concentración de hormona libre es igual en ambos compartimentos²¹. Luego se cuantifica la radiactividad en ambas fracciones. El porcentaje de radiactividad en el dializado multiplicado por la concentración de cortisol total equivale a la concentración de cortisol libre. La técnica de diálisis de equilibrio no es apropiada para el uso habitual en la práctica diaria, debido a que es una técnica laboriosa y que insume mucho tiempo de realización. Sin embargo, algunos autores sugieren utilizar la técnica de ultrafiltración, que arrojaría resultados equivalentes y es más simple de implementar²².

Método de ultrafiltración

Se usa un dispositivo de ultrafiltración desechable, en el cual se coloca plasma y se centrifuga a 37 °C. El suero se equilibra 30 minutos a 37 °C en un tubo de vidrio donde previamente se evaporó una solución etanólica de cortisol tritado. Esta técnica no introduce ninguna modificación o dilución del suero y requiere un corto período de incubación, en contraste con la diálisis que requiere dilución de la muestra, utiliza un buffer que puede cambiar la capacidad de unión de suero y es de incubación prolongada. Una de las desventajas de la ultrafiltración, así como de la diálisis de equilibrio, es la necesidad de trabajar a 37 °C debido a que la afinidad de la proteína depende de la temperatura. El efecto de la temperatura en la unión de cortisol ha sido descrito por Vogeser y Briegel que comprobaron que se puede obtener un aumento de 80% en el cortisol libre cuando la temperatura de incubación de la muestra durante la diálisis de equilibrio aumenta de 37 a 41 °C²³. Esto explicaría el aumento de la disponibilidad de cortisol libre en la fase aguda de enfermedades asociadas con fiebre. La elección de la membrana de ultrafiltración es crítica: debe permitir la difusión de moléculas pequeñas solamente. Además, antes de utilizar una membrana de ultrafiltración o de diálisis se debe lavar con agua destilada para eliminar los agentes conservantes. Por otra parte, el cortisol tritado utilizado debe tener alta pureza. De hecho, los productos de radiólisis no se unen a las proteínas plasmáticas o lo hacen débilmente y se encuentran principalmente en el ultrafiltrado. También se puede medir la fracción libre del dializado o ultrafiltrado usando un inmunoensayo o espectrometría de cromatografía líquida de masa. Recientemente, un inmunoensayo automatizado basado en electroquimioluminiscencia mostró resultados reproducibles y una buena correlación entre la ultrafiltración y la diálisis de equilibrio²⁴. La implementación de un inmunoensayo enzimático propuesto por Christ-Crain y col.²⁵ ofrece una muy buena reproducibilidad en estas concentraciones de cortisol (coeficientes de variación interensayo e intra-ensayo por debajo del 10%).

TABLA 1.- Valores de referencia del cortisol

| Determinación | Rango de referencia | Unidades |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Cortisol plasmático matinal (8-9 h) | 5-25 | µg/dl |
| CLU 7-8 h | 80-200 | ng/ mg de creatinina |
| CLU 22-23 h | hasta 28 | ng/ mg de creatinina |
| CLU 24 h | 20-100 | µg/24 h |
| Cortisol salival matutino | 1.9-19 | nmol/l |
| Cortisol salival nocturno | Hasta 7.0 | nmol/l |

Nota: cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia de acuerdo al método utilizado.

Cálculo de cortisol libre mediante la ecuación de Coolens En el año 1987 Coolens y col.²⁶ propusieron la siguiente ecuación para determinar la concentración de cortisol libre: $U^2 \times K (1 + N) + U [1 + N + K (G - T)] - T = 0$, donde T es cortisol total, G es CBG, U es cortisol no unido, K es la constante de afinidad de CBG para cortisol a 37 °C ($3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), N es la relación de albúmina unida a cortisol libre y 1.74 es el valor convencionalmente usado para este parámetro. Este método presenta limitaciones tales como la existencia de una variante genética de CBG con afinidad reducida, estados de enfermedad con disminución de la afinidad de la proteína como el *shock* séptico y la presencia de concentraciones anormales de albúmina (alta o baja), ya que el examen sólo tiene en cuenta la interacción de cortisol con la CBG.

El valor de N debería cambiar cuando cambia la concentración de albúmina plasmática, como ocurre en algunas situaciones clínicas. Así, Ho y col.²⁷ usando la fórmula de Coolens pero variando el valor de N, con un valor constante de cortisol (600 nmol/litro) en distintas concentraciones de soluciones de albúmina purificada, obtuvieron distintos valores de cortisol libre medido por diálisis de equilibrio.

En la Tabla 1 se indican los valores de referencia para cada una de las fracciones de cortisol descritas en el presente trabajo

Aplicaciones clínicas

La medición de cortisol en muestras aisladas puede ser de valor en ciertas circunstancias aunque diversos factores fisiológicos y patológicos pueden influenciar el valor observado y la interpretación del mismo. La medición se efectúa habitualmente en muestras de sangre extraídas entre las 8-9 h, horario que se ha estandarizado clásicamente para disminuir la variabilidad originada en los cambios circadianos. La Tabla 2 muestra un listado de las condiciones en que pueden hallarse concentraciones bajas o elevadas de la hormona.

TABLA 2.- Situaciones fisiológicas y patológicas en las que pueden hallarse valores alterados del cortisol sérico

| Valores disminuidos (< 5 µg/dl) | Valores elevados (> 25 µg/dl) |
|--|-------------------------------|
| Muestras nocturnas | Embarazo |
| Corticoterapia | Anticonceptivos |
| Enfermedad de Addison | Cirugía, trauma |
| Panhipopituitarismo | Síndrome de Cushing |
| Insuficiencia corticotropa aislada | Resistencia receptor GC |
| Hiperplasia adrenal congénita | |
| Posoperatorio de cirugía exitosa por síndrome de Cushing | |

GC: glucocorticoides

Deben distinguirse las causas fisiológicas tales como el aumento de valores en el embarazo, por toma de anticonceptivos orales, debidos al incremento normal de la CBG o en situaciones de gran estrés orgánico por aumento de la secreción adrenal, e inversamente su disminución hasta valores indetectables a medianoche. En el síndrome de Cushing pueden observarse a veces concentraciones supranormales de cortisol sérico aunque no es lo habitual, siendo de mucho mayor valor su determinación en orina de 24 h. La corticoterapia habitualmente realizada con corticoides sintéticos no medibles como cortisol ya sea prolongada o por pocos días pero reciente, induce una inhibición del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal de duración variable según la circunstancia, que se expresa en valores bajos de cortisol sérico.

La medición aislada de cortisol sérico tiene por lo general escaso valor diagnóstico. Por ello, se recurre generalmente al empleo de pruebas dinámicas de estimulación (inyección de ACTH sintética, metopirona, hipoglucemia insulínica, tests de CRH o desmopresina) o de supresión del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (test de inhibición nocturna con 1 mg o con 8 mg de dexametasona)²⁸. Asimismo, la determinación de cortisol en muestras salivales o urinarias nocturnas permite investigar la normalidad o pérdida de la variación circadiana que se produce en el síndrome de Cushing. Un análisis detallado de los diversos estudios dinámicos empleados para investigar la función adrenal está más allá del alcance de esta revisión, pudiendo el lector orientarse para ello a otras publicaciones²⁹⁻³⁰.

Aplicaciones del cortisol salival

Hay numerosas evidencias que avalan el uso de cortisol salival como determinación diagnóstica, ya que se correlaciona de manera predecible con el cortisol total. La mayoría de los estudios publicados referidos al cortisol salival involucran sus aplicaciones en trabajos de investigación en psiconeuroendocrinología y en el diagnóstico del síndrome de Cushing^{31, 32}.

La medida de cortisol salival nocturno tiene una sensibilidad y especificidad mayor del 90% para el diagnóstico de síndrome de Cushing endógeno³³. Esta determinación realizada durante varios días o semanas se propuso como una manera eficaz de evaluar pacientes con síndrome de Cushing cíclico o intermitente. Este es un trastorno raro, de fisiopatología desconocida, caracterizado por episodios repetidos de exceso de cortisol intercalados con períodos de secreción normal. Sus síntomas clínicos pueden ser complejos y variables y los hallazgos bioquímicos discrepantes³⁴.

Con respecto al diagnóstico de insuficiencia adrenal, la medida de cortisol salival luego de una estimulación con ACTH puede ser valiosa, particularmente en pacientes con aumento de CBG debido a embarazo o terapia estrogénica o con disminución de CBG por enfermedad crítica^{35, 36}.

Asimismo, se puede realizar la medición de cortisol y aldosterona salival luego de una dosis convencional de

250 µg de ACTH para demostrar indemnidad de la reserva adrenal o luego de una dosis de 25 µg de ACTH en el caso de estadios subclínicos de insuficiencia adrenal³⁷.

Nuevas perspectivas en la medida de cortisol

Las mediciones habituales de cortisol en sangre, saliva y orina reflejan los niveles de cortisol en el momento de la recolección o durante un máximo de 24 horas pero no proveen información más allá de este lapso. Recientemente han aparecido trabajos en los cuales se propone la medida de cortisol en cabello y uñas como potenciales marcadores del estatus hormonal en períodos más prolongados^{38, 39}. El pasaje de cortisol al pelo ocurre por difusión desde la sangre durante la formación del tallo del mismo y dado que el pelo crece a razón de un centímetro por mes, la determinación del cortisol en este medio representaría la exposición de los tejidos a esta hormona durante semanas y meses.

En cuanto a su aplicación clínica, algunos investigadores midieron cortisol en pelo en pacientes con síndrome de Cushing y documentaron que esta herramienta refleja de manera más objetiva la exposición sistémica del paciente al cortisol durante meses e incluso años⁴⁰. Otros autores lo midieron en pacientes con síndrome de Cushing cíclico, con el objeto de ver si la medida de cortisol en pelo sirve como marcador de la exposición retrospectiva al mismo y si se correlaciona con el período sintomático de la enfermedad⁴¹. Algunos trabajos publicados mencionan también la medida de cortisol en pelo como nuevo biomarcador de estrés prolongado⁴².

Sin embargo, a pesar de resultados promisorios sobre el uso de la medida de cortisol en pelo para investigación y/o aplicación clínica, se requiere un mayor entendimiento de los mecanismos de difusión de dicha hormona al cuero cabelludo. Finalmente, en cuanto a la determinación del cortisol en uñas, la bibliografía aún no aporta datos concretos en relación a su aplicabilidad clínica.

En conclusión, la medición del cortisol y sus fracciones para la evaluación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal está siendo empleada tanto para investigación como para diagnóstico clínico, siendo los inmunoensayos los métodos más corrientemente usados para su determinación. Más allá de las condiciones preanalíticas que deben ser estrictamente respetadas, es fundamental que cada laboratorio establezca su performance analítica y sus propios rangos de referencia. En los últimos tiempos se ha intentado realizar una evaluación del eje adrenal que permita obtener información retrospectiva, capaz de evaluar la clínica del paciente de manera integrada. Las determinaciones de cortisol libre en uña y cabello están dando resultados promisorios pero aún faltan muchos estudios para avalar su uso como complemento de las determinaciones más universalmente utilizadas.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar.

Bibliografía

- Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher T and Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 14-22.
- Hammond GL, Smith CL, Underhill DA. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 755-62.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachman AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 2005; 359: 189-94.
- Lin HY, Muller YA, Hammond GL. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 3-12.
- Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW. Hormone binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 71: 34-9.
- Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR. Decreased corticosteroid-globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 1998; 26: 452-60.
- Underhill DA, Hammond GL. Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5'-flanking region. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1448-54.
- Torpy DJ, Bachman AW, Grice JE, et al. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metabolism* 2001; 86: 3692-700.
- Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990; 11: 5-46.
- Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism* 1979; 28: 955-77.
- Mengden T, Hubmann P, Muller J, Greminger P, Vetter W. Urinary free cortisol versus 17-hydroxycorticosteroids: a comparative study of their diagnostic value in Cushing's syndrome. *Clin Investig* 1992; 70: 545-8.
- Nieman L, Biller B, Findling J, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1526-40.
- Rossi MA, Albiero C, Juárez-Allen L, Bruno OD. Evening 10:00-11:00 PM urinary cortisol/creatinine ratio: an alternative to midnight salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. Workshop on: Novel insights in the management of Cushing's syndrome. European Neuroendocrine Association, Napoli, Italy, December 4-6, 2009.
- Bruno OD, Rossi MA, Albiero MC, Juárez-Allen L. Usefulness of the 10:00-11:00 PM urinary cortisol/creatinine ratio versus late-night salivary cortisol to diagnosing Cushing's syndrome. The Endocrine Society Annual Meeting, Boston, USA, June 4-7, 2011.
- Chan KC, Lit LC, Law EL, et al. Diminished urinary free cortisol excretion in patients with moderate and severe renal impairment. *Clin Chem* 2004; 70: 767-8
- Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983; 20: 1752-6.
- Groschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 2008; 1759-69.
- Wood P. Salivary steroid assays-research or routine? *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 183-96.
- Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3102-7.
- Yaneva M, Kirlov G, Zacharleva S. Midnight salivary cortisol measured by highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Cent Eur J Med* 2009; 4: 59-64.
- Wolfer GK Jr, Rippon WB. Protocols for use of ultrafiltration in determination of free ligand concentration and of complexity of ligand/protein interactions. *Clin Chem* 1987; 33: 115-7.
- Sophianopoulos JA, Durham SJ, Sophianopoulos AJ, Ragsdale HL, Cropper Jr. WP. Ultrafiltration is theoretically equivalent to equilibrium dialysis but much simpler to carry out. *Arch Biochem Biophys* 1978; 187: 132-7.
- Vogeser M, Briegel J. Effect of temperature on protein binding of cortisol. *Clin Biochem* 2007; 40: 724-7.
- Vogeser M, Mohnle P, Briegel J. Free serum cortisol: quantification applying equilibrium dialysis or ultrafiltration and an automated immunoassay system. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 521-5.
- Christ-Crain M, Jutla S, Widmer L. Measurement of serum free cortisol shows discordant responsivity to stress and dynamic evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1729-35.
- Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987; 26: 197-202.
- Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, et al. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 105-14.
- Rossi MA, Chervin RA, Bruno OD. Supresión nocturna con alta dosis de dexametasona y test de metopirona en el diagnóstico etiológico del síndrome de Cushing. *Medicina (B Aires)* 1996; 56: 455-62.
- Chrousos G. (Editor) Adrenal physiology and diseases. En: Endotext—The Endocrine Source. Updated January-February 2011. En: <http://www.endotext.org>
- Lacroix A. (Section Editor) Up-To-Date. Adrenal gland. Updated May 2013. En: <http://www.uptodate.com>
- Hellhammer DH, Wist S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 163-71.
- Raff H. Utility of salivary cortisol measurement in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3647-55.
- Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 344-50.
- Meinardi J R, Woffenbuttel BHR, Dullaart R P F. Cyclic Cushing's syndrome: a clinical challenge. *Euro J Endocrinol* 2007; 157: 245-54.
- Suri D, Moran J, Hibbard JU, Kasza K, Weiss RE. Assessment of adrenal reserve in pregnancy: defining the normal response to the adrenocorticotropic stimulation test. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3866-72.
- Raff H, Brock S, Findling J W. Cosyntropin-stimulated salivary cortisol in hospitalized patients with hypoproteinemia. *Endocrine* 2008; 34: 68-74.
- Contreras LN, Arregger AL, Persi GG, Gonzalez NS, Cardoso EM. A new less-invasive and more informative low-dose ACTH test: salivary steroids in response to intramuscular corticotrophin. *Clin Endocrin* 2004; 61: 675-82.
- Warnock F, McElwee K, Seo RJ, et al. Measuring cortisol and DHEA in fingernails: A pilot study. *Neuropsychiatry Dis Treat* 2010; 6: 1-7.
- Karlen J, Ludvigsson J, Frostell A, Theodorsson E, Faresjö T. Cortisol in hair measured in young adults - a biomarker of major life stressors? *BMC Clinical Pathology* 2011; 11: 12.
- Thomson S, Koren L, Fraser M, Rieder T, Friedman C, Van Uum S. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118: 133-8.
- Manenschijn L, Koper J W, van den Akker E, et al. A novel tool in the diagnosis and follow-up of cyclic Cushing's syndrome: measurement of long-term cortisol in scalp hair. *J Clin Endocrinol Metabolism* 2012; 97, 10: 183.
- Van Uum S, Sauve B, Fraser L-A, Morley-Forster P, Paul TL, Koren G. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress* 2008; 11: 483-8.