

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**DETERMINAÇÃO DO VALOR DE REFERÊNCIA PARA O CORTISOL BASAL  
SÉRICO EM POPULAÇÃO PEDIÁTRICA SEM DOENÇA ADRENAL**

**CRISTINA BOTELHO BARRA**

**Belo Horizonte**

**2012**

**CRISTINA BOTELHO BARRA**

**DETERMINAÇÃO DO VALOR DE REFERÊNCIA PARA O CORTISOL BASAL  
SÉRICO EM POPULAÇÃO PEDIÁTRICA SEM DOENÇA ADRENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Ivani Novato Silva

**Belo Horizonte**

**2012**

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor:** Prof. Clélio Campolina Diniz

**Vice-reitora:** Prof<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-reitor de Pós-Graduação:** Prof. Ricardo Santiago Gomez

**Pró-reitor de Pesquisa:** Prof. Renato de Lima Santos

### **Faculdade de Medicina:**

**Diretor:** Prof. Francisco José Penna

**Vice-diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

**Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:** Prof<sup>a</sup>. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

### **Departamento de Pediatria:**

**Chefe:** Prof<sup>a</sup>. Benigna Maria de Oliveira

### **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:**

**Coordenadora:** Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões e Silva

**Subcoordenador:** Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

### **Membros do Colegiado da Pós-graduação:**

Prof<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof. Francisco José Penna

Prof<sup>a</sup>. Ivani Novato Silva

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof. Marcos José Burle de Aguiar

Prof<sup>a</sup>. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

*Ao Pedro,  
por adocicar a minha vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Ivani Novato Silva, minha orientadora, por incentivar meus primeiros passos na vida acadêmica e pelos ensinamentos e confiança de sempre.

Ao Professor Enrico Colosimo, pela disponibilidade e auxílio com a análise estatística.

Aos professores Suzane, Miriam, Leonardo e aos funcionários Alan, Olga e Regiane pela ajuda no Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas.

À Tânia e Jovita pela parceria na coleta de dados. À Giselle, pela delicadeza com as crianças e adolescentes.

À diretoria e aos professores do Instituto de Educação de Minas Gerais por terem me acolhido. A todas as crianças e adolescentes participantes, aos voluntários e suas respectivas famílias que contribuíram tão generosamente para a consolidação deste projeto.

Aos amigos do Hospital Infantil João Paulo II (Elizabeth, Camila, Juliana Goulart, Cristiane Dias, Rosiléa, Mirian e Alexandre), Núcleo de Investigação em Anorexia e Bulimia e Hospital Nossa Senhora de Lourdes (Fátima Teles) pelo apoio na fase final do projeto e pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao meu amigo Ronaldinho, pela ajuda na busca dos artigos científicos.

Ao Pedro, pela atenção e paciência e a sua família, pelo incentivo a minha vida profissional.

Aos meus pais, pelo carinho e suporte. Ao meu querido irmão, que me motiva através de suas próprias conquistas. A minha mãe, particularmente, pelos chás e companhia em frente ao computador, aos sábados.

## NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da dissertação foi organizada sob a forma convencional, de acordo com o regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. É constituída dos seguintes tópicos: introdução (justificativa do trabalho), revisão da literatura, objetivos, casuística e métodos, análise estatística, resultados, discussão, conclusão, anexos e apêndices. As referências bibliográficas estão dispostas ao final do trabalho. Para as citações foi utilizado o sistema Vancouver, elaborado por um grupo de editores das principais publicações biomédicas internacionais na cidade de Vancouver, no Canadá, em 1979 e atualizado periodicamente (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* - [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)). Este trabalho foi revisado de acordo com as novas normas ortográficas.

Un physicien éminent me disait un jour à propos de la loi des erreurs: “Tout le monde y croit fermement parce que les mathématiciens s’imaginent que c’est un fait d’observation et les observateurs que c’est un théorème de mathématique.”

*Jules Henri Poincaré*

## RESUMO

A medida do cortisol basal reflete a atividade hipotalâmica-hipofisária-adrenal. É utilizada na avaliação da integridade da resposta do eixo, principalmente em pacientes submetidos a longos períodos de tratamento glicocorticoide, por apresentarem maior risco de supressão adrenal. Em pediatria, a supressão adrenal deve ser sempre considerada em crianças que receberam doses suprafisiológicas de glicocorticoides por mais de duas semanas. Nessas condições, há risco de crise adrenal mesmo em vigência de agentes estressores moderados. Os valores de cortisol obtidos abaixo do intervalo de referência são sugestivos de disfunção adrenal. Sendo assim, a dosagem do cortisol basal pode ser crucial no processo de tomada de decisão. Os mesmos valores de referência de normalidade do cortisol basal sérico para adultos e crianças têm sido utilizados na prática. Contudo, resultados obtidos a partir de uma população adulta podem não ser adequados para a faixa etária pediátrica, comprometendo a qualidade das avaliações feitas na infância. Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo é contribuir para essa adequação. Os valores de referência para o cortisol basal sérico foram determinados para indivíduos da faixa etária pediátrica. O método utilizado para a dosagem do cortisol pelo laboratório de referência foi o imunoensaio enzimático quimioluminescente. A casuística foi fundamentada em 120 indivíduos de referência de 4-19 anos. Os resultados obtidos para o cortisol foram correlacionados com o gênero, idade e grau de maturação sexual. O perfil de variações do cortisol basal também foi estudado em 95 crianças e adolescentes de 0-19 anos saudáveis ou com asma persistente e síndromes sibilantes, previamente à terapia inalatória. Na casuística, o cortisol basal sérico aumentou com a idade e com a maturação sexual e não apresentou diferenças baseadas no gênero. Crianças com asma ou síndromes sibilantes de 0-3 anos apresentaram grande amplitude de valores de cortisol, conquanto crianças mais velhas apresentaram menor variação. A correlação positiva entre idade e cortisol sérico foi observada apenas após os 3 anos, sendo mais expressiva após os 5 anos. Adolescentes de 16 a 19 anos apresentaram valores de cortisol sérico mais elevados que indivíduos mais jovens e com desenvolvimento sexual incompleto. Os limites de referência (percentis 2,5 e 97,5) para o cortisol basal sérico na população de indivíduos saudáveis foram: 2,97  $\mu\text{g/dL}$  [IC 90% (1,44; 3,69)] e 23,4  $\mu\text{g/dL}$  [IC 90% (16,3; 24,6)]. Dessa forma, o intervalo para o cortisol basal sérico de 4,46-22,7  $\mu\text{g/dL}$ , utilizado até o momento no serviço de referência, foi considerado inadequado para a população pediátrica em estudo. Os resultados apresentados e a experiência na literatura sugerem que intervalos de referência para o cortisol sérico, específicos para a população pediátrica, devem ser determinados.

Palavras chave: sistema hipófise-suprarrenal; valores de referência; glucocorticóides; hidrocortisona; supressão.



## ABSTRACT

The basal cortisol measurement reflects the hypothalamic-pituitary-adrenal activity. It is used in assessing the integrity of the axis response, mainly in patients undergoing long periods of glucocorticoid treatment, because they have a higher chance of adrenal suppression. In pediatrics, adrenal suppression should always be considered in children who received supra-physiologic glucocorticoid doses for more than two weeks. Under these conditions, there is an increased risk of adrenal crisis, even in the presence of moderate stressors. The cortisol values below the reference range are suggestive of adrenal dysfunction. Therefore, this evaluation may be crucial in the decision-making process. The same reference values of normal serum cortisol have been used, in practice, for adults and children. However, results obtained from an adult population may not be suitable for pediatric patients and can negatively impact the quality of this evaluation in childhood. Thus, the main objective of this study was to contribute to the assessment of basal cortisol levels in pediatric subjects. The assay method used by the reference laboratory for serum cortisol was the chemiluminescent enzyme immunoassay. The series was based on 120 reference individuals from 4-19 years old. The results obtained for cortisol were correlated with gender, age and pubertal maturation. The cortisol results profile was also studied for 95 children and adolescents from 0-19 years old, healthy or with persistent asthma and wheezing, prior to inhalation therapy. In the study, baseline serum cortisol increased with age and pubertal maturation. Serum cortisol showed no differences based on gender. Children from 0-3 years old with asthma and wheezing showed a great range of cortisol values, whereas older children showed less variation. The positive correlation between age and serum cortisol was observed only in children older than 3 years and it was more evident after 5 years old. Adolescents who were 16 to 19 years old had higher serum cortisol values than younger ones and also than those with incomplete pubertal development. The reference limits (2.5 and 97.5 percentiles) for the basal serum cortisol in the population of healthy subjects were: 2.97  $\mu\text{g/dL}$  [90% CI (1.44, 3.69)] and 23.4  $\mu\text{g/dL}$  [90% CI (16.3, 24.6)]. Thus, the interval for baseline serum cortisol of 4.46 to 22.7  $\mu\text{g/dL}$  being used up until now by the reference service was considered inappropriate for the pediatric population under study. The results presented here and the literature research suggest that reference intervals for serum cortisol should be determined specifically to the pediatric population.

Key-words: pituitary-adrenal system; reference values; glucocorticoids; hydrocortisone; suppression.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT: colesterol aciltransferase

ACO: anticoncepcional oral

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico

AVP: arginina vasopressina

CA: crise adrenal

CALIPER: *Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference*

CAR: *cortisol awakening response* (cortisol ao despertar)

CBG: globulina ligadora de cortisol

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CRH: fator liberador de corticotropina

CS: choque séptico

FNA: fator natriurético atrial

GH: hormônio de crescimento

GHRH: hormônio liberador de hormônio do crescimento

GR: receptor glicocorticoide

GREs: elementos responsivos a glicocorticoide

HHA: hipotalâmico-hipofisário-adrenal

HMG-CoA: hidroxí-3-metilglutaril-coenzima A redutase

IAR: insuficiência adrenal relativa

ICRDC: insuficiência corticosteroide relacionada a doença crítica

IL-6: interleucina-6

IMC: índice de massa corporal

ITT: teste de tolerância à insulina

LDL: lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade

LHS: lipase hormônio sensível

LC/ NE: *locus ceruleus*/ noradrenérgico (sistema simpático-adrenomedular eferente)

LDSST: teste com dose baixa de Synacthen (ACTH) 1 µg

MDR: transportador multidroga resistente

MR: receptor mineralocorticoide

NPY: neuropeptídeo Y

PACAP: polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase

PHRS: período de hiporresponsividade ao estresse

POMC: pro-opiomelanocortina

PVN: núcleo paraventricular

SA: supressão adrenal

SNA: sistema nervoso autônomo

SP: substância P

SREBPs: proteínas ligadoras ao elemento responsivo a esterol

SRIS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SST: teste com Synacthen (ACTH) 250 µg

TNF: fator de necrose tumoral

TRH: hormônio liberador de tireotropina

5HT: serotonina

11β-HSD: 11β-hidroxiesteroide desidrogenase

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Biossíntese esteroide.....	18
Figura 2	A interconversão de glicocorticoides.....	21
Figura 3	Isoformas GR: GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A, GR-P.....	23
Figura 4	Subdivisões do núcleo paraventricular hipotalâmico.....	25
Figura 5	Componentes centrais e periféricos da resposta ao estresse.....	32
Figura 6	Glicocorticoides sintéticos e farmacocinética.....	34
Figura 7	Modelos de sobrecarga alostática.....	37
Figura 8	Estados de hiper e hipoativação do eixo HHA.....	38
Figura 9	Distribuição dos indivíduos em faixas etárias - grupo A.....	52
Figura 10	Distribuição dos indivíduos em faixas etárias - grupo B.....	52
Figura 11	Porcentagem de indivíduos conforme os estágios puberais - grupo A.....	53
Figura 12	Box plot: cortisol e faixas etárias - grupo A.....	54
Figura 13	Box plot: cortisol e estágios puberais - grupo A.....	56
Figura 14	Frequências relativas acumuladas de níveis de cortisol sérico por idade - grupo A.....	57
Figura 15	Frequências relativas acumuladas de níveis de cortisol sérico por grau de maturação sexual - grupo A.....	57
Figura 16	Box plot: cortisol e sexo masculino, feminino - grupo A.....	58
Figura 17	Curva de probabilidade do cortisol - grupo A.....	59
Figura 18	Box plot: Valores atípicos representados por pontos externos - grupo A.....	60
Figura 19	Gráfico de dispersão do cortisol <i>versus</i> a idade (em anos) - grupo B.....	62
Figura 20	Box plot: cortisol e faixas etárias - grupo B.....	62
Figura 21	Box plot: cortisol e sexo - grupo B.....	63
Figura 22	Estabelecimento de intervalos de referência.....	69

## LISTA DE TABELAS

1	Divisão da amostra estudada conforme o ensaio utilizado para o cortisol sérico.....	51
2	Grupo A: Apresentação de dados. Cortisol sérico nas faixas etárias.....	54
3	Grupo A: Apresentação de dados. Cortisol sérico nos estágios puberais de 1 a 5.....	55
4	Grupo B: Apresentação de dados. Cortisol sérico nas faixas etárias.....	61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1	A secreção de glicocorticoides.....	17
2.2	O metabolismo glicocorticoide.....	19
2.2.1	Biodisponibilidade.....	19
2.2.2	Receptores.....	22
2.3	Controle da secreção glicocorticoide em condições basais.....	24
2.3.1	Fisiologia.....	24
2.3.2	Aspectos genéticos.....	26
2.3.3	Programação epigenética.....	27
2.3.4	Estabelecimento do ritmo circadiano.....	28
2.4	A dosagem do cortisol basal.....	29
2.4.1	Variáveis analíticas.....	29
2.4.2	Amostra (cortisol sérico <i>versus</i> cortisol salivar).....	30
2.4.3	Interpretação dos resultados na faixa etária pediátrica.....	30
2.5	Controle da secreção glicocorticoide no estresse.....	31
2.5.1	O eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal.....	31
2.5.2	O <i>feedback</i> inibitório da resposta ao estresse.....	33
2.5.3	Estresse crônico.....	35
2.6	Disfunções do eixo em condições basais e no estresse.....	37
2.6.1	Insuficiência adrenal.....	39
2.6.1.1	Insuficiência corticosteroide relacionada à doença crítica.....	39
2.6.1.2	Supressão adrenal por uso crônico de glicocorticoides.....	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
3.1	Objetivo geral.....	45
3.2	Objetivos específicos.....	45
<b>4</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	46
4.1	Casuística.....	46

4.2	Métodos.....	47
4.2.1	Avaliação clínica.....	47
4.2.2	Avaliação laboratorial.....	48
4.2.3	Especificações para o cortisol basal sérico.....	48
4.2.4	Questões éticas.....	49
4.2.5	Análise estatística.....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1	Descrição dos grupos amostrais.....	51
5.2	Grupo A.....	53
5.2.1	Cortisol e idade.....	53
5.2.2	Cortisol e grau de maturação sexual.....	55
5.2.3	Cortisol e gênero.....	58
5.2.4	Distribuição do cortisol.....	59
5.2.5	Valores atípicos.....	59
5.2.6	Valores correspondentes aos percentis 2,5 e 97,5.....	60
5.3	Grupo B.....	61
5.3.1	Cortisol e idade.....	61
5.3.2	Cortisol e gênero.....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
6.1	Cortisol basal sérico na população pediátrica.....	64
6.2	Valores de referência para o cortisol basal sérico.....	68
6.3	Adequação do intervalo de referência para o cortisol basal sérico.....	71
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
	<b>ANEXOS E APÊNDICES</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi motivado pela necessidade de adequação dos valores de referência para o cortisol basal sérico na população pediátrica. No serviço de medicina laboratorial de referência, a dosagem do cortisol basal sérico é frequentemente utilizada para a avaliação da integridade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) em crianças que receberam tratamento prolongado com glicocorticoides.

Os mesmos valores de referência de normalidade do cortisol para os adultos têm sido utilizados na prática para as crianças. Contudo, sabe-se que resultados obtidos a partir de uma população adulta podem não ser adequados para a faixa etária pediátrica, comprometendo a interpretação das avaliações feitas na infância. Espera-se que os resultados apresentados a seguir neste trabalho sejam uma contribuição para essa adequação.

Na literatura, há estudos que discutem a interferência de variáveis clínicas nas respostas do cortisol na infância e adolescência, mas existem poucos trabalhos que de fato estabelecem intervalos de referência para o cortisol basal sérico na faixa etária pediátrica.

Paralelamente, a medicina laboratorial lida com o atual desafio de determinar referências específicas para a pediatria também para outros analitos. Dessa forma, alguns estudos estão sendo recentemente desenvolvidos com esse objetivo<sup>1-5</sup>. O projeto piloto CALIPER<sup>4</sup> - *Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference* - estabeleceu o intervalo de referência para vários analitos. Os limites de referência para o cortisol basal sérico foram determinados para crianças e adolescentes canadenses de até 14 anos.

A metodologia mais utilizada até o momento para o processo de determinação de intervalos de referência está descrita nas diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI C28-A3)<sup>6</sup>, em que um  $n$  mínimo de 120 indivíduos é necessário, após um método rigoroso de seleção da amostra.

Assim, a verificação dos resultados e intervalos deve ser feita por cada laboratório. No passado, programas de computador como o RefVal foram utilizados especificamente para este fim, atualmente não disponíveis; métodos alternativos têm sido também discutidos<sup>7,8</sup>.

A carência de referências atuais para o cortisol basal sérico na endocrinologia pediátrica se deve provavelmente às grandes variações do cortisol nessa população e às particularidades do grupo. Sabe-se que crianças estão em constante processo de desenvolvimento, conquanto um único intervalo de referência pode não se encaixar para todas.



Além disso, crianças podem apresentar respostas diferenciadas ao processo de venopunção, o que pode dificultar a interpretação das medidas séricas do cortisol. A validação de ensaios para o cortisol salivar pode contribuir para a melhora das avaliações feitas na infância, contudo, não há previsão para sua utilização no serviço de medicina laboratorial do presente estudo. Dessa forma, há necessidade de se estabelecer referências mais adequadas para o cortisol sérico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente, a dosagem do cortisol basal é utilizada para diversos fins, como na pesquisa de transtornos cognitivos e disfunções metabólicas, adicionalmente à avaliação clássica para a confirmação da integridade de resposta hipotalâmica-hipofisária-adrenal (HHA).

No presente trabalho, a revisão da literatura terá como foco principal de estudo o eixo HHA e a avaliação de sua função. Serão abordados os seguintes temas: a secreção e o metabolismo glicocorticoide; a fisiologia, aspectos genéticos e epigenéticos do eixo HHA; o estabelecimento do ritmo circadiano; a dosagem do cortisol basal; e a resposta do eixo e suas disfunções no estresse, os impasses na sua avaliação e interpretação. O objetivo é apresentar o embasamento teórico necessário para a atual discussão sobre intervalos de referência para o cortisol basal sérico na população pediátrica.

### 2.1 A secreção de glicocorticoides

Os glicocorticoides são uma classe de hormônios esteroides produzidos na zona fasciculada da glândula adrenal. Distinguem-se dos outros hormônios esteroides, como os mineralocorticoides e esteroides sexuais, por apresentarem receptores específicos, células alvo e efeitos biológicos peculiares. A secreção do cortisol da glândula adrenal para a circulação se faz sob o controle neuroendócrino por uma alça de regulação, isto é, sistema de *feedback* hipotalâmico-hipofisário.

O colesterol é o precursor de toda a produção adrenal de esteroides, possui o clássico arranjo de quatro anéis. A adrenal pode sintetizar o colesterol *de novo* a partir de acetato, porém, a maior parte de seu fornecimento vem de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) derivadas do colesterol da alimentação.

O balanço do colesterol intracelular é, em grande parte, atribuído a proteínas ligadoras ao elemento responsivo a esterol (SREBPs) que funcionam como fatores de transcrição reguladores dos genes envolvidos na biossíntese do colesterol e ácidos graxos.

As concentrações adequadas de colesterol suprimem a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA), enzima limitante na síntese do colesterol. O hormônio

adrenocorticotrófico pituitário (ACTH), por sua vez, aumenta a atividade da HMG-CoA, estimula os receptores de LDL e a recaptação de colesterol.

O colesterol é esterificado pela ação da acil-coenzima A. A colesterol aciltransferase (ACAT) promove o armazenamento do colesterol em gotículas lipídicas. Por outro lado, o colesterol torna-se disponível por ativação da lipase hormônio sensível (LHS). O ACTH estimula a LHS e inibe a ACAT, aumentando a disponibilidade de colesterol livre para a síntese de hormônios esteroides<sup>9</sup>.

O primeiro passo na esteroidogênese ocorre dentro da mitocôndria. Os mecanismos pelos quais o colesterol é transportado para a membrana mitocondrial não são totalmente conhecidos, sabe-se contudo que a proteína reguladora StAR parece atuar na migração do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, especificamente nas células esteroidogênicas, respondendo a estímulos agudos.

A regulação crônica é determinada pela concentração de proteínas P450sc, CYP, localizadas no retículo endoplasmático das células<sup>10</sup>. A CYP cataliza a 17 $\alpha$ -hidroxilação dos esteroides delta4-C21 (derivados da progesterona), delta5-C21 (derivados da pregnenolona) e promove a produção de esteroides C19 através da atividade 17,20-liase (figura 1).

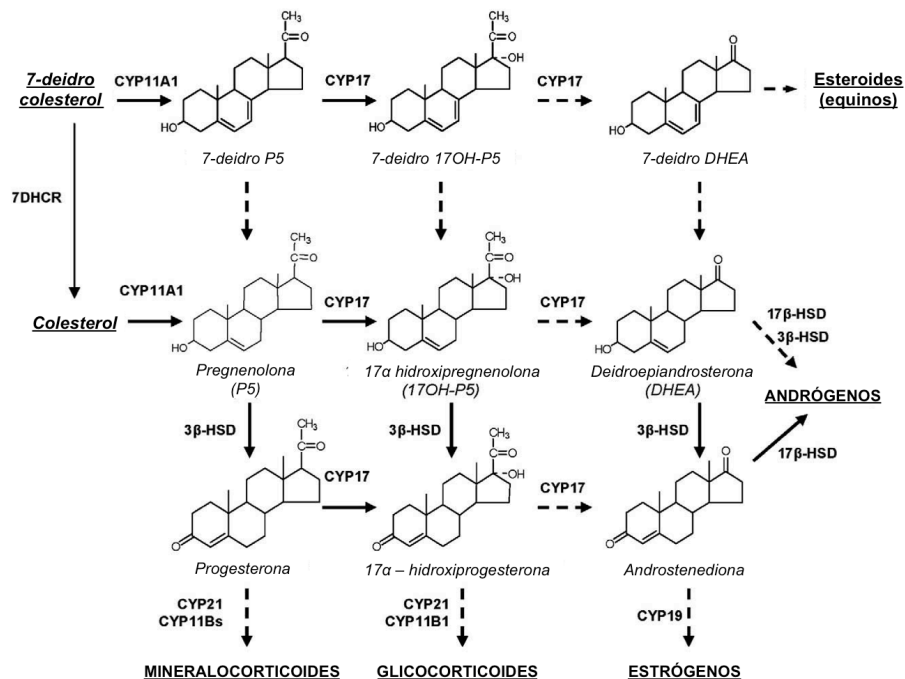


FIGURA 1 - Biossíntese esteróide (adaptada da referência 11)

Na zona fasciculada, após a captação pela mitocôndria, o colesterol é convertido a pregnenolona no citoplasma. A pregnenolona é convertida a progesterona pela  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2. Por sua vez, a progesterona é hidroxilada a 17-hidroxiprogesterona para seguir a produção de desoxicorticosterona ou 11-desoxicortisol e, finalmente, a de cortisol pela enzima  $11\beta$ -hidroxilase<sup>12</sup>.

De forma geral, o zoneamento funcional do córtex adrenal determina que na ausência de P450c17 na zona glomerulosa, desoxiesteroides C21 são produzidos, levando ao mineralocorticoide aldosterona. Na presença da  $17\alpha$ -hidroxilase, sem a atividade 17,20-liase na zona fasciculada, o cortisol é produzido. Quando ambas atividades estão presentes, na zona reticular se produz o precursor andrógeno dehidroepiandrosterona<sup>13</sup>.

## **2.2 O metabolismo glicocorticoide**

### **2.2.1 Biodisponibilidade**

A biodisponibilidade glicocorticoide na corrente sanguínea é regulada por diversos mecanismos. Grandes quantidades de glicocorticoides estão ligados a proteínas ligadoras e, dessa forma, encontram-se biologicamente indisponíveis<sup>14</sup>.

Na corrente sanguínea, 4% do cortisol é encontrado na sua forma livre e 96% ligado a proteínas. Destes, 80-90% estão associados à globulina ligadora de cortisol (CBG).

A CBG não se liga especificamente ao cortisol, mas também a todos os esteroides adrenais. Trata-se de uma glicoproteína monomérica de 55-kDa, produzida principalmente por hepatócitos, mas também pela placenta, rins, endométrio e pulmões. É detectada por imunohistoquímica na hipófise e hipotálamo<sup>15</sup>. Atua como uma carreadora de hormônios esteroides hidrofóbicos, diminuindo a degradação e o clareamento hormonal.

De acordo com a “hipótese do hormônio livre”<sup>16</sup>, proteínas carreadoras plasmáticas funcionam como reservatórios de hormônios esteroides biologicamente inativos e apenas a forma livre desempenha ações hormonais. Alguns estudos, contudo, sugerem que tais proteínas apresentam função extracarreadora e que, de fato, estão intimamente correlacionadas à cascata sinalizadora intracelular dos hormônios esteroides. Camundongos

geneticamente modificados, com a deficiência de CBG, apresentam hiporresponsividade tecidual a glicocorticoides, bem como maiores níveis de ACTH e uma tendência à diminuição da expressão de genes alvo de glicocorticoides e resposta comprometida ao estresse agudo, como na sepse<sup>17,18</sup>.

Alterações semelhantes são observadas *in vivo* nas mutações envolvendo a CBG: quatro variantes genéticas, já identificadas, reduzem a afinidade de ligação do cortisol e os níveis proteicos. As mutações *Leuven* e *Lyon* promovem a redução da afinidade de ligação três e quatro vezes, respectivamente, e compartilham manifestações clínicas semelhantes. A mutação nula/ *Adelaide* resulta em 50% de redução (heterozigoto) e 100% (homozigoto) nos níveis de CBG. A deficiência completa não é letal, mas pode estar associada à hipotensão e fadiga crônicas<sup>15</sup>. Recentemente, foi descrita uma quinta alteração genética, *Santiago*, que leva à fadiga crônica e cefaleia<sup>19</sup>.

As concentrações plasmáticas de CBG, em condições fisiológicas, mostram pequenas variações diurnas e diferenças pouco significativas de acordo com idade, gênero e ciclo menstrual. No cordão umbilical, o nível é cerca de metade daquele encontrado no adulto. Ocorre um aumento de CBG na infância<sup>20</sup>.

Terapia com estrógenos e alterações hormonais da gravidez estão relacionadas a maiores níveis de CBG. O uso de mitotane no tratamento de tumores adrenocorticais promove estímulo à expressão e secreção de CBG, o que possui significado no manejo e acompanhamento clínico, já que medidas do cortisol plasmático são irrelevantes nesta condição<sup>21</sup>.

Em contrapartida, níveis baixos de CBG são observados em várias situações clínicas: hipoproteinemia, síndrome nefrótica, cirrose hepática, Síndrome de Cushing, uso terapêutico de glicocorticoide e em alguns casos de deficiência da vitamina B12.

Em condições de extrema gravidade clínica, níveis baixos de CBG (cerca de 50% no choque séptico, por exemplo) foram descritos, bem como aumento da fração livre do cortisol

. Na prática, esses efeitos superestimam o *feedback* hipotalâmico-hipofisário<sup>16</sup>. Em queimados, a interleucina-6 (IL-6) é uma mediadora da supressão de CBG. É produzida precocemente e possui correlação negativa com os níveis de CBG<sup>22</sup>.

A biodisponibilidade glicocorticoide intracelular depende da atividade e dos níveis de expressão da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD), que cataliza a interconversão de formas ativas a inativas de glicocorticoides (figura 2).

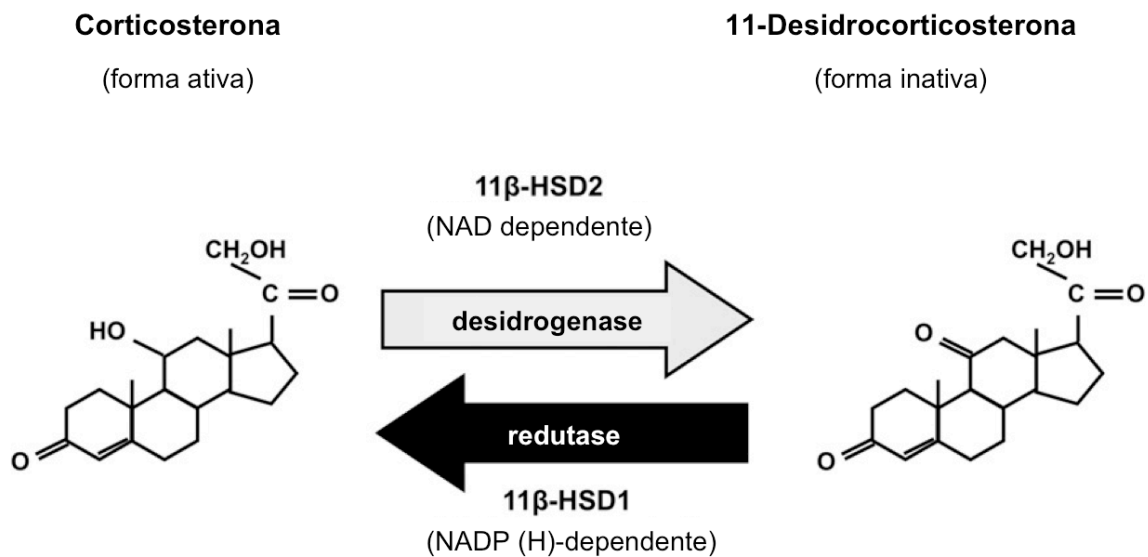


FIGURA 2 - A interconversão de glicocorticoides (ativos e inativos); 11β-hidroxiesteroide desidrogenase (11β-HSD) 1 e 2 (adaptada da referência 24)

Existem duas isoformas da enzima 11β-HSD. A 11β-HSD-1 atua prioritariamente como redutase, convertendo cortisona em cortisol (ativadora), quando a 11β-HSD-2 atua como oxidase e desidrogenase convertendo cortisol em cortisona (inativadora).

A 11β-HSD-1 é expressa principalmente no fígado, pulmões, tecido adiposo e cérebro. A 11β-HSD-2 é encontrada predominantemente nos órgãos alvos para aldosterona, como rins, cólon, glândulas sudoríparas e placenta, impedindo a ligação de glicocorticoides ao receptor mineralocorticoide (MR)<sup>23</sup>.

Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), promovem a regulação da atividade e expressão para cima (*upregulation*) de 11β-HSD-1 e para baixo (*downregulation*) de 11β-HSD-2 em numerosas células, favorecendo a formação de glicocorticoides ativos e contrabalanceando o processo inflamatório. O aumento de 11β-HSD-2 e diminuição de 11β-HSD-1 em células imunes geram um perfil pró-inflamatório de citocinas por níveis reduzidos de glicocorticoides<sup>25</sup>.

A expressão da 11β-HSD em vários sítios cerebrais, responsáveis pelo *feedback* glicocorticoide negativo (córtex cerebral, hipocampo e hipófise), sugere que esta enzima possui grande importância na regulação do eixo HHA. Paralelamente, estudos recentes correlacionam a 11β-HSD-1 ao processo de envelhecimento e resistência insulínica. Já a 11β-HSD-2 parece atuar na programação no período fetal, no que se refere ao desenvolvimento posterior de distúrbios comportamentais<sup>26</sup>.

Nos órgãos-alvo, a regulação glicocorticoide parece depender de um transportador glicoproteico denominado transportador multidroga resistente (MDR), uma bomba de efluxo de multidrogas ATP-dependente. O transportador é expresso no cérebro, fígado, intestino e adrenais. Na barreira hemato-encefálica, a bomba MDR1 Pgp, por exemplo, transporta o cortisol e a dexametasona, mas não a corticosterona, através das células endoteliais. Dessa forma, a modulação da expressão e função da MDR determina também a atividade glicocorticoide<sup>27</sup>.

### 2.2.2 Receptores

Os glicocorticoides foram nomeados por sua habilidade em promover a conversão de proteínas e lípidos a glicose durante a ativação do sistema hipotalâmico-hipofisário. Exercem funções tecido-específicas, atuando no sistema imune, resposta inflamatória, embriogênese e proliferação celular. A obesidade, a síndrome metabólica e o *diabetes mellitus* tipo 2 estão associados a disfunções deste processo<sup>28</sup>.

Os glicocorticoides agem através dos receptores para glicocorticoides (GRs). O GR é um fator ligante de ativação de transcrição pertencente à grande família de receptores nucleares e à subfamília de receptores esteroides, assim como os receptores para estrógenos, andrógenos, progesterona e mineralocorticoides.

Os GRs possuem baixa afinidade por corticosteroides endógenos e alta afinidade para dexametasona. Participam da regulação do pico matinal e da resposta ao estresse, tendo em vista que são ativados apenas por níveis elevados de glicocorticoides endógenos<sup>29</sup>, alcançados após um estressor ou durante um pico de pulsos ultradianos. São expressos difusamente, em células da glia e neurônios, com níveis elevados no núcleo paraventricular (PVN) e hipocampo.

Os receptores mineralocorticoides (MRs), por sua vez, possuem alta afinidade para corticosteroides e, por isso, estão associados à regulação das flutuações circadianas do cortisol. A expressão de MRs ocorre predominantemente nos neurônios de áreas límbicas. Encontram-se em níveis moderados na área pré-frontal e amígdala e em níveis elevados no hipocampo.

Os receptores MR possuem a função primordial de manter a integridade da homeostase e a estabilidade dos circuitos límbicos mesmo fora dos pulsos ultradianos<sup>30</sup>.

Recentemente, evidências *in vivo* demonstram que os MR possuem importante mediação na via rápida de resposta ao estresse agudo sobre mecanismos de memória<sup>31</sup>.

A sensibilidade à ação glicocorticoide no nível dos receptores GRs pode ser determinada por seu número, afinidade, função e habilidade para translocação e interação com o núcleo.

O glicocorticoide ao se ligar ao receptor promove a dissociação de proteínas de choque térmico (e de outras proteínas)<sup>32</sup> no citoplasma. Ocorre a translocação para o núcleo e interação com sequências de DNA. Em conjunto, vão formar os elementos responsivos a GRs (GREs) que, subsequentemente, modulam a ativação de uma grande quantidade de genes alvo<sup>33</sup>.

Efeitos na transcrição de cerca de dois mil genes podem ocorrer após ativação dos GREs. O efeito genômico pode ser transativador ou transrepressor.

Na prática clínica, os efeitos transativadores são aqueles responsáveis pelos efeitos adversos do uso de glicocorticoides. Os efeitos transrepressores são ações desejáveis: anti-inflamatórias e imunossupressoras. Efeitos transrepressores ocorrem na vigência de menores concentrações de glicocorticoides em relação aos transativadores<sup>34,35</sup>.

A ação glicocorticoide por GRs é definida pela expressão das suas isoformas, a partir de um único gene (NR3C1): GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A, GR-P (figura 3).

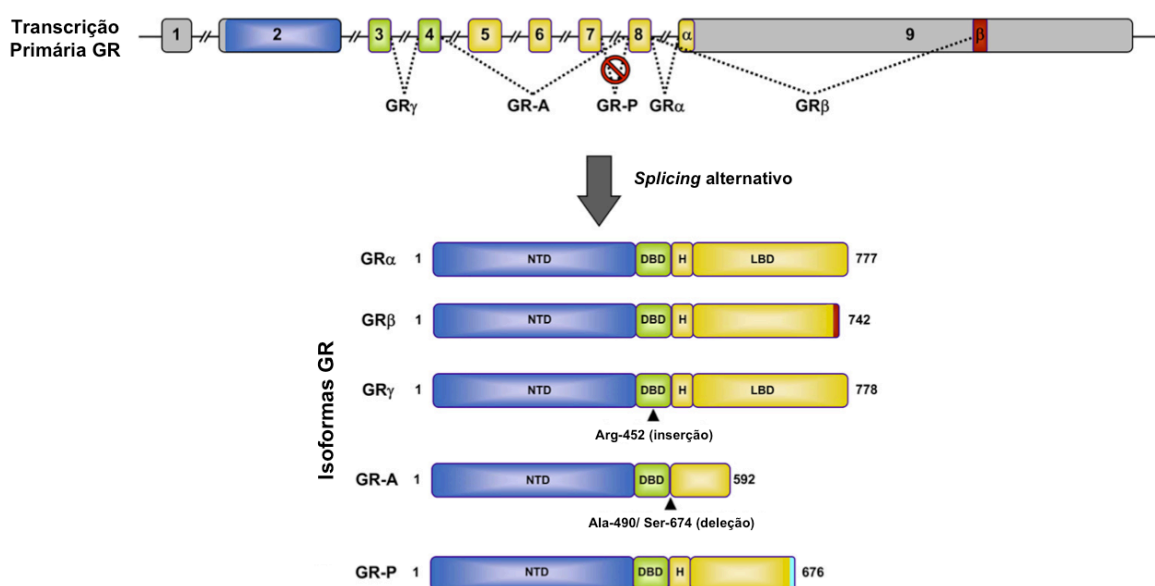


FIGURA 3 - Isoformas GR: GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A, GR-P (adaptada da referência 36)



De forma geral, são os GR $\alpha$  que participam do mecanismo glicocorticoide, enquanto GR $\beta$  e GR-P controlam a atividade de GR $\alpha$ .

Os receptores GR $\beta$  inibem a atividade transcricional dos GR $\alpha$ , sugerindo uma importante função na modulação da sensibilidade a glicocorticoides pelos primeiros. São expressos em níveis muito baixos nos tecidos diversos, contudo, estão aumentados em algumas células de defesa, como as epiteliais e neutrófilos, e em vigência de doenças inflamatórias.

Alguns pacientes com formas resistentes de asma, artrite reumatoide, colite ulcerativa, polipose nasal, lúpus eritematoso sistêmico, leucemias linfoblástica aguda e crônica apresentam elevados níveis de GR $\beta$ . O aumento de GR $\beta$  está também associado ao componente inflamatório de algumas doenças: doenças autoimunes, infarto agudo do miocárdio e doença coronariana.

A expressão de GR $\gamma$  está associada à resistência glicocorticoide no carcinoma pulmonar de pequenas células e na leucemia linfoblástica aguda em crianças<sup>36</sup>. Sabe-se pouco a respeito dos GR-A; o aumento de GR-P está associado a vários tipos de câncer insensíveis a glicocorticoides<sup>37</sup>.

## **2.3 Controle da secreção glicocorticoide em condições basais**

### **2.3.1 Fisiologia**

O hipotálamo controla a secreção da hipófise anterior que, por sua vez, estimula a secreção pelo córtex adrenal de hormônios glicocorticoides, principalmente o cortisol, em humanos. O estímulo hipotalâmico principal é o fator liberador de corticotropina (CRH), um peptídeo de 41 aminoácidos. Em modelos animais<sup>38</sup>, de forma geral, a liberação de CRH promove aumento da atividade eletroencefalográfica, mantendo o estado vigil, diminuindo o tempo de sono.

A maior concentração de neurônios produtores de CRH é encontrada no núcleo paraventricular (PVN). Existem três subdivisões deste núcleo, descritas (figura 4)<sup>39</sup>:

1) Na zona anterior e medial-dorsal, as projeções de neurônios fazem conexão com capilares portais hipofisários na zona externa da eminência mediana. Os neurônios

parvocelulares (do latim “parvus”, pequeno) coexpressam peptídeos como vasopressina, encefalinas, colecistocina e angiotensina II e são cercados por outros neurônios que expressam tirosina hidroxilase;

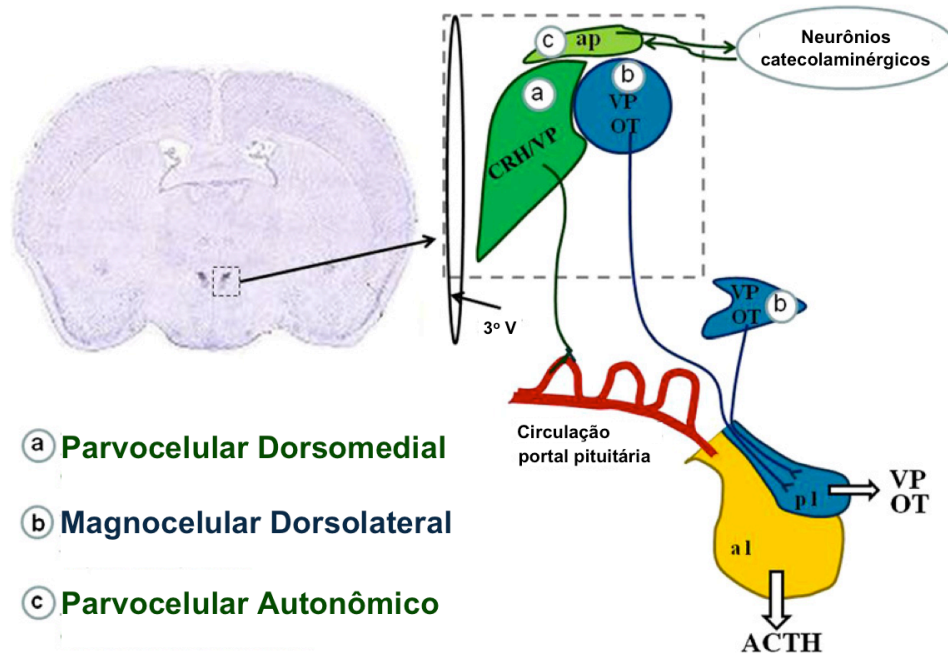


FIGURA 4 - Subdivisões do núcleo paraventricular hipotalâmico: Parvocelular dorsomedial, contendo CRH e vasopressina VP; dorsolateral contendo vasopressina VP e oxitocina OT e autonômico contendo neurônios autonômicos (ap). Correlações anômicas com o terceiro ventrículo (3º V). Conexões hipofisárias, lobos anterior (al) e posterior (pl) (Adaptado da referência 39)

2) Na zona dorsolateral magnocelular, os neurônios contêm vasopressina e oxitocina e possuem projeções axonais para a hipófise posterior através da zona interna da eminência mediana. Neurônios oxitocinérgicos também expressam CRH e respondem a estímulos osmóticos e não osmóticos, enquanto neurônios magnocelulares vasopressinérgicos respondem a estímulos osmóticos mas não ao estresse;

3) Na zona de neurônios parvocelulares autonômicos, os neurônios produzem CRH e pequenas quantidades da maioria dos peptídeos encontrados nas subdivisões dorsomedial e dorsolateral.

Os estressores físicos e metabólicos que requerem resposta imediata, como hipovolemia, dor e hipoglicemia utilizam vias monossinápticas com projeções diretas para o PVN. Em contraste com estressores sistêmicos, a resposta ao estresse psicológico dispõe de

vias complexas que são polissinápticas, integradas com estruturas límbicas, sendo as mais importantes o córtex frontal medial, o hipocampo, a amígdala e a estria terminal.

O núcleo central da amígdala, que expressa níveis elevados de CRH, é essencial para respostas relativas ao comportamento, especialmente o medo. Permite o gatilho da resposta autonômica após o estresse de cunho psicológico. As regiões basolateral e medial da amígdala modulam positivamente o eixo HHA, uma vez que as lesões dessas áreas reduzem a resposta a estressores psicogênicos. O hipocampo possui ação predominantemente inibitória sobre o eixo HHA e diminui a duração da sua resposta.

São encontrados ligantes para CRH em vários tecidos periféricos, como medula adrenal, coração, próstata, intestinos, rins, fígado e testículos.

Os receptores para CRH (CRH-R) pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G, estimulam o acúmulo intracelular de AMP cíclico. Existem dois tipos de receptores, transcritos por diferentes genes. CRH-R1 é encontrado em maiores quantidades na hipófise e no restante do encéfalo. CRH-R2 é encontrado em tecidos periféricos e em estruturas subcorticais cerebrais<sup>40</sup>.

A arginina vasopressina (AVP) é um potente agente sinérgico do CRH no estímulo da secreção de ACTH; por outro lado, a AVP possui pequena atividade, se individualmente produzida<sup>41</sup>. O ACTH pituitário é um peptídeo de 39 aminoácidos derivado da pro-opiomelanocortina (POMC).

Em estados fisiológicos, ambos CRH e AVP são secretados no sistema portal em um ritmo circadiano de forma pulsátil, com uma frequência de pulsos de dois a três episódios por hora<sup>42</sup>.

A amplitude dos pulsos de CRH e AVP aumenta cedo pela manhã, às 4:00, levando ao pico de ACTH e de cortisol na circulação. Os picos de ACTH são observados entre 04:00-06:00 e do cortisol às 8:00. Ambos ACTH e cortisol são liberados em pulsos a cada 30-120 minutos ao longo do dia, mas a amplitude é maior pela manhã. Essas variações diurnas são determinadas por exposição à luz, alimentação e grau de atividade física<sup>43</sup>.

### **2.3.2 Aspectos genéticos**

A resposta individual do eixo HHA é determinada por múltiplos fatores, dentre os quais a herança genética, com moderada importância. O padrão é poligênico, de forma que

disfunções dessa resposta passam por um *continuum* de tendências desde a extrema vulnerabilidade à resistência ao estresse<sup>44</sup>.

O cortisol ao despertar (*cortisol awakening response* – CAR) é um marcador da resposta individual do eixo HHA, ou seja, dispõe de estabilidade intraindividual<sup>45</sup>. Corresponde a elevações do cortisol produzidas pelo despertar, sendo 38-75% dos níveis alcançados até 30 minutos após<sup>46</sup>.

O gênero influencia de forma significativa os níveis de CAR. Apesar de um incremento proporcional em ambos sexos, mulheres adultas apresentam uma queda mais lenta de níveis de cortisol após o pico matinal. Durante o período da ovulação, os níveis de CAR são mais elevados<sup>47</sup>.

Fatores como idade, uso de anticoncepcional oral, tabagismo, horas de sono e momento do despertar não alteram o padrão<sup>48</sup>. O padrão do CAR é fruto de herança genética, possui correlação de 60% entre gêmeos<sup>49,50</sup>.

Em condições habituais, a relação dose-resposta entre a potência de um estressor e a responsividade do sistema é representada por uma curva do tipo sigmoide, que difere de indivíduo para indivíduo. Pode ocorrer um deslocamento para esquerda ou para a direita com relação à curva da média dos indivíduos. O primeiro padrão denota uma reação excessiva e o último uma reação deficitária.

Igualmente, a relação dose-resposta entre o desempenho ou bem-estar do indivíduo e a atividade do sistema de resposta ao estresse é representada por uma curva em forma de U invertido<sup>51</sup>, mostrando que não há resposta adequada após determinado patamar.

Supõe-se que a resposta do eixo possa variar amplamente entre indivíduos diferentes e até em um mesmo indivíduo, dependendo do agente estressor.

O desenvolvimento de distúrbios relacionados a estes padrões pode ser modificado pelo meio, o que leva a crer que a genética e o desenvolvimento definem a vulnerabilidade ao estresse. Porém, o ambiente é que funciona como gatilho para distúrbios e doenças correlacionadas.

### **2.3.3 Programação epigenética**

O DNA pode ser estruturalmente modificado (sem alterações na sequência) através de influências ambientais, levando a alterações da expressão gênica<sup>52</sup>. O impacto do ambiente no

fenótipo é mais significativo quanto mais próximo do período neonatal precoce foram os estímulos<sup>53</sup>. É dependente também da capacidade de resposta e maturidade neuronal.

Em estudos com roedores, observou-se que esta fase crucial na infância coincide com o período de hiporresponsividade ao estresse (PHRS). Este período finaliza ao redor do 14º dia de vida. Durante o PHRS, o cuidado materno possui a função reguladora e minimiza o impacto dos estressores<sup>54</sup>.

Assim, longos períodos de ausência materna teriam efeitos deletérios e seriam responsáveis pela predisposição a psicopatologias na vida adulta<sup>55</sup>. Por outro lado, não se compreende bem por que lactentes que estão em aleitamento materno apresentam níveis de cortisol (detectado em saliva) 40% maiores, sendo este efeito ainda mais significativo no sexo masculino (57%) com relação ao feminino (32%)<sup>56</sup>.

Possíveis influências no período neonatal parecem também modificar o padrão de resposta<sup>45,57</sup>: recém-nascidos de mães com história de depressão durante a gravidez (principalmente no terceiro trimestre) revelam possível programação epigenética do eixo HHA, observada pela metilação dos genes de receptores GR (NR3C1)<sup>58</sup>.

### 2.3.4 Estabelecimento do ritmo circadiano

O ciclo sono-vigília, a temperatura corporal, a circulação renal, a atividade cardiovascular e uma gama de outros processos<sup>59</sup> são influenciados pela regulação circadiana central. São observados também relógios biológicos locais, mesmo no âmbito celular, que determinam um controle periférico.

Os glicocorticoides endógenos dispõem de efeitos estabilizadores do relógio biológico, tendo em vista que a ablação da glândula adrenal (ou da expressão de GR em órgãos alvo) promove a dissociação do *timing* periférico com relação ao relógio biológico central<sup>60</sup>. Dessa forma, a regulação circadiana é determinada no sistema nervoso central e parece ser estabilizada pela resposta adrenal.

A idade do estabelecimento do ritmo circadiano HHA em humanos, contudo, não é consenso, estudos sugerem seu início a partir de duas semanas após o nascimento, com média aos oito meses de idade<sup>61,62</sup>. O ritmo tomará o formato daquele do adulto apenas mais tardiamente<sup>63</sup>, quando então parece ocorrer a definição entre sono e vigília<sup>64</sup>.

Após o estabelecimento do ritmo, as respostas a um mesmo estressor podem variar conforme a idade<sup>65</sup>. Vacinação e coletas de sangue, por exemplo, são considerados estressores moderados dependendo da faixa etária. São utilizados para avaliar a reatividade do eixo HHA em lactentes com até seis meses de idade porque tais procedimentos promovem elevações significativas do cortisol. Após o segundo ano de vida, contudo, crianças e adolescentes não apresentam mais ativação significativa do eixo após o mesmo estímulo<sup>66,67</sup>.

Ao longo da vida adulta, possíveis variações do eixo HHA têm sido observadas em condições basais<sup>68</sup> e após estresse social<sup>69</sup>, conforme o gênero, idade e índice de massa corporal (IMC).

## **2.4 A dosagem do cortisol basal**

### **2.4.1 Variáveis analíticas**

A análise de esteroides para investigação diagnóstica em endocrinologia pediátrica sempre foi um desafio para os serviços laboratoriais<sup>70</sup>. Existem divergências entre os resultados de laboratórios diversos atribuídas, em parte, à utilização de diferentes anticorpos e à ausência de padronização de reagentes até o presente momento.

Na análise quantitativa de esteroides houve, nos últimos anos, progressiva substituição de bioensaios por ensaios colorimétricos, devido às mínimas concentrações hormonais, paralelamente à necessidade de coleta de grande volume para a dosagem. Contudo, a metodologia utilizada no passado foi substituída e atualmente o imunoensaio tem sido de maior valor.

O radioimunoensaio, pelas próprias dificuldades técnicas e ainda pela possibilidade de reação cruzada, tem sido substituído pela quimioluminescência e imunofluorescência.

O advento da espectrometria de massa garantiu uma maior especificidade para as avaliações, mas ainda com custo muito elevado para justificar sua ampla utilização em alguns centros<sup>71</sup>.

### **2.4.2 Amostra (cortisol sérico *versus* cortisol salivar)**

O cortisol secretado pelas adrenais é dispensado para todos os compartimentos corporais contendo líquidos e pode ser detectado na urina, soro e saliva.

O cortisol urinário de 24 horas é uma das ferramentas na triagem apenas para estados de hipercortisolismo e parece estar sujeito a variações conforme o gênero<sup>72</sup>.

O cortisol salivar e sérico são rotineiramente utilizados em adultos na avaliação da função HHA em pacientes com possível supressão adrenal, bem como na determinação do ritmo circadiano e na avaliação da sensibilidade ou responsividade do eixo, em testes de estímulo e supressão.

O cortisol salivar representa a fração livre do cortisol total que é biologicamente ativo e seu emprego parece dispor de vantagens técnicas e clínicas.

Na medida pareada do cortisol basal sérico e salivar, quando ocorre aumento do cortisol total além da capacidade de ligação da CBG, por exemplo após administração de CRH<sup>73</sup>, o cortisol salivar pode oferecer informações mais fidedignas sobre o funcionamento do eixo.

Além disso, existem dificuldades na interpretação dos resultados do cortisol sérico devido à influência da punção venosa<sup>74</sup>, sendo assim, o cortisol medido na saliva possui certamente maior vantagem com relação ao sérico. Em pediatria, o uso do cortisol salivar parece ser promissor e ensaios têm sido recentemente validados para a faixa etária<sup>75</sup>.

Na literatura, o valor de referência do cortisol salivar em crianças possui enorme variabilidade. Essa variabilidade, que tem causado dificuldades no estabelecimento de uma faixa de normalidade, deve-se a diferenças entre ensaios e metodologias adotadas nos diversos estudos, possivelmente, no que toca à amostragem e a fatores clínicos como idade, gênero e grau de maturação sexual<sup>76</sup>.

### **2.4.3 Interpretação dos resultados na faixa etária pediátrica**

A presença de pulsatilidade do eixo em lactentes jovens é discutível. Ainda sim, valores de referência para recém-nascidos, inclusive para prematuros, têm sido propostos levando em conta fatores como a idade gestacional e o peso ao nascimento. Dados sugerem

que recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG) tem níveis significativamente mais elevados de cortisol sérico com relação aos nascidos com peso adequado (AIG)<sup>77</sup>.

No primeiro ano de vida, o cortisol basal apresenta ampla variabilidade inter<sup>78</sup> e intraindividual<sup>79</sup>. A variabilidade intraindividual é mais expressiva dos cinco aos oito meses de idade e se mantém mesmo após controle de fatores como sono e alimentação. Estudos sugerem que este comportamento seja mesmo um reflexo do padrão de desenvolvimento. Por isso, até seis meses de idade, é difícil estabelecer de fato um valor de referência para o cortisol basal<sup>80</sup>.

Em lactentes, observa-se claramente uma estabilidade do ritmo circadiano após um ano de idade. A seguir, percebe-se uma diminuição do cortisol matinal progressivamente até os três anos, mas este efeito não apresenta relevância estatística na maioria dos estudos<sup>63,80,81</sup>.

Em escolares, a taxa de produção de cortisol é em média  $6,8 \pm 1,9$  mg/m<sup>2</sup>/dia<sup>82</sup>. A maioria dos estudos aponta para o aumento do cortisol conforme a idade<sup>83,84,85,86</sup> mas os resultados ainda são conflitantes<sup>87,88,89</sup>.

Acima dos seis anos de idade, parece haver um incremento sutil do cortisol conforme a progressão também do grau de maturação sexual. Estudos sugerem a possibilidade de uma reação de estresse crônico durante a puberdade inicial (estágios puberais 2 e 3), o que justificaria o aumento em ambos sexos nessa fase.

Nos estágios finais de maturação sexual, meninas após a menarca parecem apresentar níveis mais elevados de cortisol em relação a meninas da mesma idade pré menarca<sup>90,91</sup> e também em relação a meninos<sup>85,92,93</sup>. Sugere-se um mecanismo de sensibilização da resposta do eixo pelo estradiol<sup>94,95</sup>.

Há dúvidas se os níveis de cortisol, de forma geral, são mais elevados em usuárias de anticoncepcional oral (ACO). Questiona-se um mecanismo de aumento da CBG e diminuição do clareamento hormonal<sup>96,97</sup> dentre as usuárias. Por outro lado, o uso de ACO combinado pode bloquear a resposta habitual do CAR<sup>98</sup>.

## **2.5 Controle da secreção glicocorticoide no estresse**

### **2.5.1 O eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal**

O estresse, seja de ordem física ou emocional, desencadeia um padrão estereotipado de



manifestações clínicas, descrito inicialmente por Selye como síndrome de adaptação geral<sup>99</sup>.

Atualmente, sabe-se que as respostas adaptativas têm suas especificidades dependendo do agente estressor. Essa especificidade é perdida, contudo, progressivamente com o aumento da gravidade do evento. O eixo HHA, em conjunto com *locus ceruleus* e o sistema simpático-adrenomedular eferente (sistema LC/ NE), representa o agente efetor que promove a resposta sistêmica.

Durante o estresse agudo (figura 5), a amplitude e sincronização dos pulsos de CRH e AVP no sistema porta-hipofisário aumentam marcadamente, resultando em elevações do ACTH e secreção do cortisol.

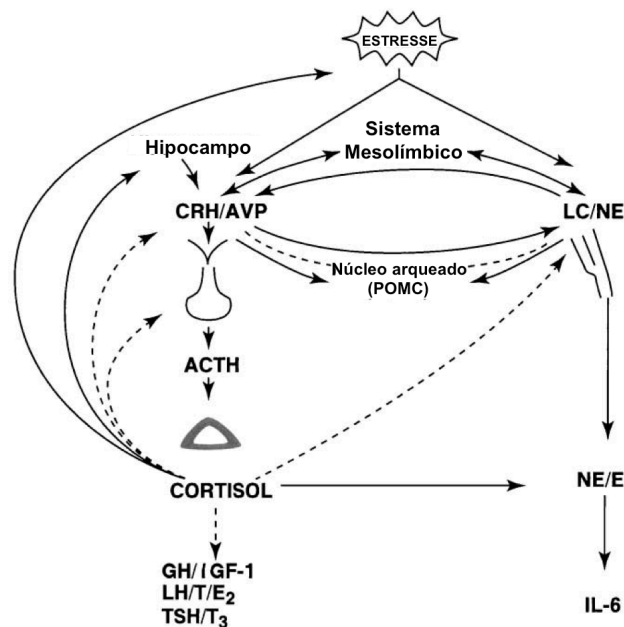


FIGURA 5 - Componentes centrais e periféricos da resposta ao estresse

Outros fatores, como AVP de neurônios magnocelulares, angiotensina II e várias citocinas e mediadores inflamatórios, em dependência do agente estressor, são liberados, atuando em componentes diversos do eixo HHA, potencializando sua atividade.

O sistema nervoso autônomo (SNA) promove um mecanismo de rápida resposta. As subdivisões simpática e parassimpática contêm várias subpopulações de neurônios que expressam neuropeptídeos, ATP, óxido nítrico e mediadores lipídicos inflamatórios.

Encefalina e neurotensina parecem interferir também na transdução do estímulo. No estresse hemorrágico, especificamente, existe uma ativação adicional do sistema renina-angiotensina<sup>100</sup>.

CRH é o peptídeo de maior ação orexigênica, cuja secreção é estimulada pelo neuropeptídeo Y (NPY). NPY inibe o sistema LC/ NE simpático. A substância P (SP) possui ações semelhantes ao NPY, contudo, é ativadora do sistema LC/ NE. A leptina, um peptídeo relacionado à saciedade, é um potente inibidor do NPY<sup>101</sup>.

Os sistemas CRH e LC/ NE estimulam o estado de atenção, assim como o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (processos motivacionais e de antecipação e recompensa) e o sistema  $\beta$ -endorfina-hipotalâmico, que age suprimindo a sensação de dor, aumentando assim, a analgesia.

O CRH aumenta a termogênese via ação catecolamínica. Interações recíprocas ocorrem entre amígdala/ hipocampo e o sistema CRH-LC/NE<sup>102</sup>.

O CRH inibe a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) durante o estresse. Pela via da somatostatina inibe o GH, TRH e TSH, suprimindo assim o eixo do crescimento e as funções reprodutora e tireoideana. Todos os três sistemas recebem e dependem do estímulo de catecolaminas.

O *feedback* local é realizado através de alças ultracurtas autorregulatórias nos próprios neurônios produtores de CRH, da mesma forma como ocorre no sistema LE/ NE por receptores  $\alpha_2$ -noradrenérgicos.

Estudos recentes demonstram, em áreas corticolímbicas, um *feedback* negativo terminal por via endocanabinoide não genômica<sup>103</sup>. Neurotransmissores como glutamato, serotonina (5HT) e acetilcolina, por outro lado, estimulam os sistemas CRH e LE/ NE<sup>104</sup>.

### **2.5.2 O *feedback* inibitório da resposta ao estresse**

O *feedback* glicocorticoide inibitório minimiza os efeitos catabólicos e imunossupressores dos hormônios hipotalâmico e hipofisário.

Na hipófise, os glicocorticoides regulam a expressão de hormônios pro-opiomelanocortícos (POMC), incluindo ACTH, assim como a expressão de receptores para CRH e AVP pelos hormônios adrenocorticotróficos pituitários, controlando assim a quantidade de ACTH secretado para a corrente sanguínea, em resposta ao CRH e

vasopressina portais. Regulam os níveis de expressão de peptídeos nos neurônios hipotalâmicos, bem como estímulos GABA-érgicos inibitórios nos neurônios produtores de CRH do PVN.

Glicocorticoides sintéticos compartilham os mesmos mecanismos de ação com hormônios endógenos, exceto por disporem de eficácia, potência, duração de atividade dependentes de sua farmacocinética (figura 6).

<b><u>Duração da Ação</u></b>		
<b>Meia-vida plasmática</b>	<b>Glicocorticoide</b>	<b>Dose (mg)</b>
Curta ( $t_{1/2}$ 8-12h)	Cortisol	20
	Deflazacort	6
	Prednisona	5
Média ( $t_{1/2}$ 12-36h)	Prednisolona	5
	Metilprednisolona	4
	Triamcinolona	4
Longa ( $t_{1/2}$ 36-72h)	Dexametasona	0,75
	Betametasona	0,6

FIGURA 6 - Glicocorticoides sintéticos e farmacocinética (adaptada da referência 26)

Os glicocorticoides influenciam uma gama de comportamentos e de respostas endócrinas, mas que são ativadas em minutos, não explicados por efeitos genômicos, alterando rapidamente o funcionamento neuronal e a excitabilidade de áreas cerebrais.

A rápida inibição de ACTH hipofisário, que ocorre após a administração de glicocorticoides, é vista apenas quando estes se elevam rápida e significativamente, sugerindo um *feedback* central sensível à amplitude de elevação glicocorticoide.

Se a prednisolona, um glicocorticoide sintético, for administrada interpulso, o próximo pulso endógeno de cortisol ocorrerá no tempo previsto, contudo com menor amplitude. Tal efeito é tanto maior quanto mais duradouro o período entre a administração da prednisolona e o pulso endógeno de cortisol<sup>105</sup>.

O saldo entre ações, induzidas através da ativação dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide, determina a resposta central sítio-específica estimulatória ou inibitória. Embora ambos receptores sejam conhecidos por sua participação na via genômica e tardia, torna-se cada vez mais evidente a interface com a membrana plasmática e citosol e com mediadores de sinalização rápida<sup>106</sup>.

Os efeitos rápidos gerados por corticosteroides não são atribuídos estritamente aos receptores MR e GR. Múltiplas ações não genômicas permanecem na presença de antagonistas de MR e GR. Supõem-se receptores acoplados à membrana, provavelmente acoplados à proteína G<sup>106</sup>.

### 2.5.3 Estresse crônico

Durante o estresse crônico, as modificações que ocorrem na expressão do CRH no PVN dependem da natureza do estresse. Tais mudanças vão determinar o padrão de resposta do ACTH a estímulos que se repetem (ou que persistem) e suas correlações com outros sistemas.

O eixo HHA possui várias correlações neste contexto, o que pode ser observado, por exemplo, no processo inflamatório de caráter crônico, em que há estimulação do eixo via sistema imune, principalmente pela IL-6<sup>107</sup>. Outras citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  promovem também estimulação do eixo HHA individualmente ou em sinergismo.

Em modelos animais, o hipotálamo apresenta respostas diferenciadas no estresse crônico. Ocorre, em geral, um aumento de AVP e redução da resposta ao estresse pelo CRH. Os ritmos circadianos declinam ou são perdidos e a frequência de pulsos praticamente dobra<sup>108</sup>.

Determinados estímulos psicogênicos subsequentes em cobaias (contenção e frio, por exemplo) estão associados à imediata dessensibilização da resposta ao ACTH, evidenciada pela transcrição de CRH e pelo aumento de RNA mensageiro (RNAm), logo após os primeiros estímulos e retorno à condição basal. Contudo, se não ocorrer a dessensibilização da resposta ao ACTH (por exemplo, após injeção de solução salina hipertônica e imobilização), a transcrição de CRH e aumento de RNAm ocorrem apenas após 14 dias de exposição ao estresse.

Distúrbios consequentes a este mecanismo parecem ocorrer em humanos. Na depressão, a resposta rápida está ausente, apesar de níveis mais elevados de cortisol<sup>109</sup>. Vias específicas foram identificadas e correlacionadas a um importante mediador do estresse emocional, o polipetídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (PACAP), no PVN e amígdala<sup>110</sup>.

A preservação da capacidade de resposta do neurônio produtor de CRH é necessária para manter a resposta via ACTH durante um mesmo estressor (homotípico). Por outro lado, no estresse crônico, ocorre hipersensibilidade a um novo agente estressor (heterotípico), o que demonstra a existência de uma plasticidade cerebral com o possível recrutamento de novas vias neuronais, que não estão envolvidas na resposta ao estresse agudo habitual.

A exposição repetida ao estresse altera gradualmente as características elétricas, a morfologia e a capacidade proliferativa das células cerebrais: após várias semanas de exposição, ocorrem modificações das propriedades neuronais basais e induzidas por estresse.

Algumas simulações demonstram que a dinâmica do cortisol ultradiano pode se modificar e até se inverter diante de um estressor crônico<sup>111</sup>. A maior liberação de hormônio ativo durante a noite ao invés do dia parece possuir implicação em determinados casos de insônia primária<sup>112</sup>. Mecanismos semelhantes são observados na privação do sono, atualmente também relacionada à predisposição para distúrbios do metabolismo de carboidratos e resistência insulínica<sup>113</sup>.

Por fim, dependendo da duração e da frequência da exposição crônica ao estresse, vão ocorrer reações diferenciadas e persistentes no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Sob determinadas condições, estes mecanismos regulatórios dinâmicos (alostase) passam a não ser mais eficientes, caracterizando um estado chamado de sobrecarga alostática<sup>114</sup> (ver figura 7, para modelos de sobrecarga alostática).

Distúrbios do cortisol têm sido estudados na depressão<sup>115,116,117</sup>, esquizofrenia<sup>118</sup> e estresse pós-traumático<sup>119</sup>, onde o cortisol participa de vias metabólicas, envolvendo diversas funções.

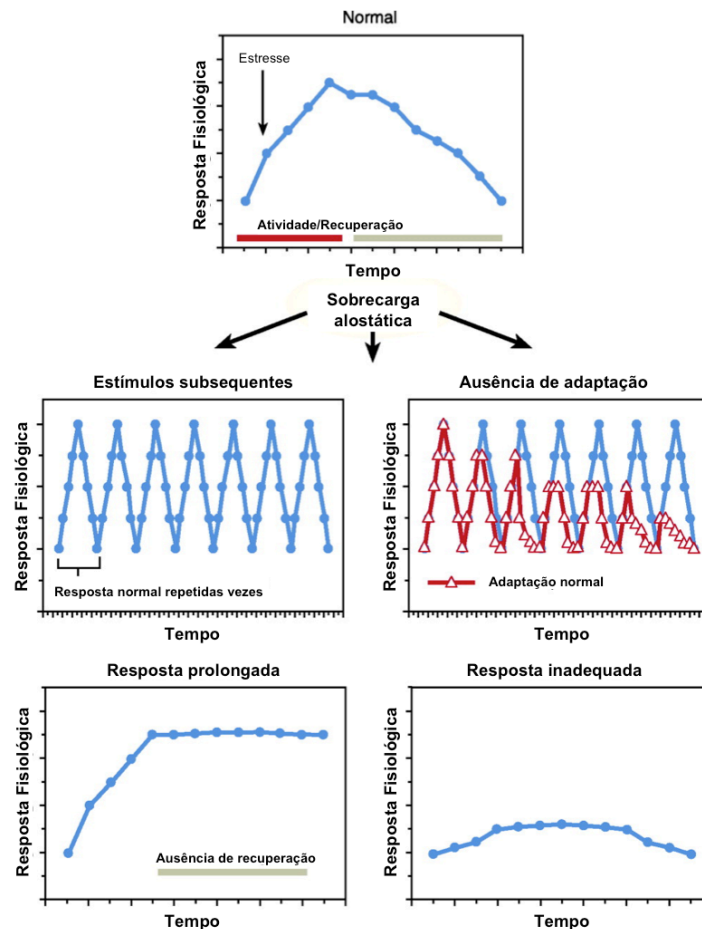


FIGURA 7 - Modelos de sobrecarga alostática (adaptada de referência 120)

## 2.6 Disfunções do eixo em condições basais e no estresse

Estados de hiper e hipoativação do eixo HHA são associados a determinadas moléstias e síndromes clínicas, levando a alteração do cortisol e ritmo circadiano (figura 8). Recentemente, vários estudos sobre a hiperatividade glicocorticoide tem correlacionado a obesidade central<sup>121</sup> e síndrome metabólica a um estado de hipercortisolismo tecidual, onde ocorre aumento significativo do cortisol urinário de 24 horas.

Estudos com o cortisol basal em condições de não estresse não confirmam a correlação com a obesidade em adultos<sup>122</sup> e crianças<sup>123</sup>, apesar da correlação positiva entre o cortisol e a cintura em gupos eutróficos e com sobrepeso. É possível que pacientes obesos já tenham tido durante o ganho de peso alterações significativas do eixo, apresentando, em

estágio posterior de obesidade, uma sobregarga alostática e consequente *burnout* do eixo HHA.

Com relação ao risco cardiovascular, o cortisol basal não parece ser um bom preditor da doença<sup>124</sup>, apesar de estar mais elevado em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 que têm história de evento cardiovascular (angina e infarto agudo do miocárdio)<sup>125</sup>.

<u>Aumento da Atividade HHA</u>	<u>Diminuição da Atividade HHA</u>
Depressão melancólica / psicótica	Depressão atípica
Anorexia nervosa	Depressão sazonal
Transtorno obsessivo-compulsivo	Síndrome de fadiga crônica
Síndrome do Pânico	Fibromialgia
Atividade física em excesso	Hipotireoidismo
Desnutrição	Pós-estresse
<i>Diabetes mellitus</i>	Abstinência (nicotina, álcool)
Hipertireoidismo	Pós-parto
Obesidade central	Menopausa
Abuso sexual na infância	Artrite reumatoide
Gravidez	Supressão adrenal

FIGURA 8 - Estados de hiper e hipoativação do eixo HHA (adaptada de referência 126)

A síndrome de depressão melancólica do adulto representa um exemplo de típica desregulação da resposta generalizada ao estresse, com ativação do eixo HHA-LC/ NE e relativa imunossupressão<sup>127</sup>. Ocorre aumento do cortisol urinário de 24 horas, diminuição da resposta do ACTH ao CRH e, por outro lado, aumento do CRH no líquido cérebro-espinhal.

O abuso sexual na infância é associado a aumento da incidência de psicopatologias na vida adulta, assim como anormalidades da função HHA: diminuição do ACTH sob estímulo, com preservação dos níveis de cortisol. Algumas outras moléstias estão associadas à persistência da ativação do eixo, como transtorno obsessivo compulsivo, pânico e alcoolismo crônico<sup>128</sup>.

Na anorexia nervosa (AN) e desnutrição ocorre diminuição da leptina circulante e, por outro lado, aumento do NPY. Observa-se, particularmente na AN, um estado de hiperativação

do eixo HHA com simultânea hipoativação do sistema LC/ NE. O hipercortisolismo é uma consequência da restrição alimentar crônica e parece ser um indicador de gravidade da doença<sup>129</sup>.

O uso de glicocorticoides promove hiperfagia, obesidade e resistência à leptina. Na ruptura do eixo, como ocorre na síndrome de Cushing, por exemplo, são observadas manifestações de depressão atípica, fadiga e anergia consistentes com a supressão do CRH pelo cortisol elevado.

O pós-parto, o período após cura do hipercortisolismo e o período após o estresse são associados a supressão da secreção de CRH pelo PVN e diminuição da atividade do eixo HHA.

Pacientes com fibromialgia queixam de fadiga crônica e apresentam diminuição do cortisol urinário de 24 horas. Hipotireoideus apresentam nítida hiposecreção de CRH e parecem mais susceptíveis à depressão atípica. Na abstinência à nicotina, ocorre diminuição do CRH, com consequente hiperfagia e ganho de peso.

### **2.6.1 Insuficiência adrenal**

A insuficiência adrenal é uma entidade que resulta em níveis plasmáticos de cortisol basal e pós-estresse inadequados.

A insuficiência adrenal primária (doença de Addison) refere-se à deficiência glicocorticoide resultante de doença da glândula adrenal. As insuficiências secundária e terciária decorrem de alterações pituitárias e hipotalâmicas, respectivamente. A longo prazo, a supressão adrenal é comumente observada após corticoterapia prolongada (iatrogênica). Quadros intermediários (insuficiência adrenal relativa) podem ser observados em pacientes gravemente enfermos.

#### **2.6.1.1 Insuficiência corticosteroide relacionada à doença crítica (insuficiência adrenal relativa)**



Sepse, cirurgia, sangramentos e trauma podem cursar com insuficiência adrenal relativa (IAR)<sup>130</sup>. A incidência de IAR em adultos é de cerca de 20% em pacientes críticos e está associada a maior mortalidade. Apesar disso, o uso de corticosteroides em condições críticas não deve ser indiscriminado<sup>131</sup>.

Em crianças, não há correlação direta entre mortalidade e IAR. Contudo, a IAR está associada ao choque refratário a catecolaminas.

A insuficiência corticosteroide relacionada à doença crítica (ICRAC) é atualmente preferível ao termo IAR nos casos mais graves, sendo definida como atividade HHA inadequada para a gravidade da doença e caracterizada por resistência tecidual glicocorticoide, juntamente com níveis circulantes inadequados de cortisol livre<sup>132</sup>.

Pacientes com ICRAC apresentam apenas hipotensão refratária e dependência de vasopressores, em contraste com as clássicas manifestações da insuficiência adrenal crônica (Doença de Addison): anorexia, letargia, vômitos, dor abdominal e hipotensão ortostática.

Em pacientes com quadro agudo (menos de sete dias de doença grave), como visto anteriormente, a resposta fisiológica é a elevação do CRH, ACTH, AVP e cortisol. Essas alterações parecem objetivar um aumento do fornecimento de energia aos tecidos. Na doença crônica, apesar de níveis elevados de cortisol, os hormônios CRH, AVP e ACTH diminuem, o que parece ser vantajoso para freiar o estado hipercatabólico. Este mecanismo é mantido por interleucinas, endotelinas e fator natriurético atrial (FNA).

Tendo em vista que a resposta fisiológica ao estresse inicial é o aumento dos níveis de cortisol, a primeira estratégia para o diagnóstico de disfunção adrenal seria a medida ao acaso do cortisol total sem estímulo exógeno (*random cortisol*). A própria vivência do estado crítico seria por si só um potente estimulador do eixo HHA. Sabe-se que pacientes sob estresse, com cortisol basal superior a 18 µg/dL exibem mínima probabilidade de falência adrenal.

Em pacientes críticos, porém, este ponto de corte tem se mostrado ineficaz e estudos mostram uma tendência a níveis mais elevados, como 25 µg/dL<sup>133</sup>, sugerindo este valor como uma das referências para excluir a hipótese de IAR em adultos.

Não existe, contudo, até o momento, consenso sobre a definição bioquímica da ICRAC. A mais utilizada é o incremento < 9 µg/dL após 30 a 60 minutos (ou apenas uma coleta com 60 minutos<sup>134</sup>) em teste de estímulo curto com ACTH 250 µg (SST)<sup>135</sup> e teste com metirapona<sup>136</sup>.

O teste com dose baixa de ACTH 1 µg (LDSST) é recentemente recomendado para o diagnóstico de formas parciais. Proporciona dados para o diagnóstico de insuficiência adrenal no adulto com melhor sensibilidade e com os mesmos pontos de corte<sup>137</sup>.

O teste com ACTH em crianças<sup>138</sup> parece mostrar, contudo, diferente ponto de corte para o cortisol fora do estado crítico (no teste convencional > 18 µg/dL e com dose baixa > 14 µg/dL). A correlação com o choque refratário ocorre com valores de cortisol < 6 µg/dL, pós teste com dose baixa<sup>139</sup>.

A reprodutibilidade do teste convencional em pacientes com choque séptico (CS) é ruim porque as rápidas modificações da produção e secreção glicocorticoide podem dificultar o acesso do real estado funcional adrenal. Além disso, como próprio efeito do teste, podem ocorrer modificações do eixo, principalmente com doses supra-fisiológicas de ACTH.

O mesmo não é observado na sepse sem choque e em estados críticos não sépticos, mostrando que há particularidades do eixo HHA nas fases de instabilidade do choque séptico<sup>140</sup>. No neutropênico febril, por exemplo, há uma correlação entre o cortisol sérico e a resposta inflamatória (medida por proteína C reativa). Contudo, se perde tal associação quando há evolução do quadro para a sepse grave<sup>141</sup>.

Em estudo multicêntrico, randomizado, duplo cego, controlado, 251 pacientes adultos que receberam hidrocortisona 50 mg 6/6 horas foram comparados a um grupo com 248 pacientes que receberam placebo 6/6 horas por cinco dias. Não houve um desfecho significativamente diferente na mortalidade após 28 dias, mesmo para aqueles não responsivos ao SST que receberam o tratamento<sup>142</sup>.

Existem ainda maiores dificuldades no diagnóstico da insuficiência adrenal relativa quando o teste com ACTH não é disponível. Curvas ROC demonstram que não há um único valor preditor para falha no SST do cortisol basal com ambas sensibilidade e especificidade adequadas. Um cortisol basal de 420 nmol/L (15,2 µg/dL) tem sensibilidade de 100% com apenas 54% de especificidade; um valor de 142 nmol/L (5 µg/dL) tem 100% de especificidade e apenas 35% de sensibilidade. Se o SST for realizado apenas com a primeira referência do cortisol basal, ou seja, apenas para pacientes com cortisol basal < 15,2 µg/dL, 44% de SST normais deixariam de ser realizados e ainda sim não se perderia nenhum paciente com IAR<sup>143</sup>.

O teste de indução de hipoglicemia com insulina (teste de tolerância à insulina, ITT) apesar de ser o padrão ouro para o diagnóstico de insuficiência adrenal secundária e terciária, não tem sido recomendado no estado crítico, devido ao risco de hipoglicemia grave com

aumento da morbimortalidade. Além disso, observa-se na sepse a presença de resistência insulínica, que pode comprometer a interpretação dos resultados do ITT.

Em pacientes fora do estresse relacionado à doença crítica, ou seja, com suspeita de insuficiência adrenal não-ICRAC, o teste com CRH apresenta boa correlação com o ITT (mesmo em pacientes com supressão do eixo induzida por corticoterapia). Contudo, sua utilização tem sido uma ferramenta pouco útil no cenário clínico, principalmente pelos custos e por sua baixa sensibilidade como segundo teste.

O teste com CRH é realizado com 1mg/kg EV e parece estimular a secreção de ACTH menos fortemente que o teste com metirapona e insulina<sup>144</sup>. Os níveis de cortisol devem ser mensurados a cada 15 minutos entre 60 e 90 minutos, o pico ocorre usualmente entre 30 e 45 minutos. Tendo como padrão o ITT, o teste com CRH e cortisol basal não apresentam iguais valores de sensibilidade e especificidade.

Em comparação com o ITT, o cortisol basal  $< 3,5 \mu\text{g/dL}$  possui especificidade de 100% com sensibilidade de 50%, e o cortisol basal  $> 10,3 \mu\text{g/dL}$  sensibilidade de 100% e especificidade de 61%. Dessa forma, valores  $< 3,5 \mu\text{g/dL}$  confirmariam a hipótese de insuficiência adrenal e valores  $> 10,3 \mu\text{g/dL}$  afastariam sua possibilidade, mas em pacientes fora de estado crítico<sup>145</sup>.

Existem diversas dificuldades no diagnóstico e também no tratamento da ICRAC<sup>146</sup>. O primeiro impasse decorre dos variados níveis de cortisol total basal encontrados em pacientes com IAR e a não correlação com o cortisol livre<sup>147,148,149</sup>, intersticial ou tecidual. Outro fator é a heterogeneidade dos pacientes nos estudos: idade, gênero e gravidade do quadro clínico diferentes. Por fim, há dificuldades de comparação interensaio<sup>149</sup>.

Possivelmente, dentre os pacientes com ICRAC ocorre um mecanismo de resistência glicocorticoide. Os seguintes mecanismos são postulados<sup>122</sup>: 1) elevação de citocinas e diminuição do número de receptores GR ou sua afinidade de ligação; 2) aumento da expressão de isoformas como GR- $\beta$ ; 3) modificações na atividade de vias MAPK que interferem na função GR; 4) presença de toxinas indutoras de resistência levando então à diminuição da ação GR transativadora.

Em pediatria, segundo as atuais evidências, é difícil argumentar a favor ou contra o uso de corticosteroides na síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e choque dependente de vasopressores<sup>142</sup>. A incidência de insuficiência adrenal completa e relativa parece ser importante e aumenta com a idade nessas condições.

O uso de corticosteroide exógeno de fato reduz o tempo de utilização de vasopressores pelas crianças em choque, mas não há especificidade para o grupo de IAR<sup>151</sup>. Contudo, o teste da integridade do eixo, com as mais variadas provas, parece ser pouco útil para determinar quem deve se beneficiar do uso de esteroides e, em muitas vezes, não estará prontamente disponível.

### 2.6.1.2 Supressão adrenal por uso crônico de glicocorticoides

Os glicocorticoides são o pilar do tratamento de inúmeras doenças crônicas, autoimunes e inflamatórias. Contudo, quanto maior a dose e mais duradouro o tratamento, mais significativos são seus efeitos metabólicos adversos (como resistência insulínica, dislipidemia e atrofia muscular) e maiores os riscos de supressão adrenal (SA)<sup>152</sup>.

De fato, a *Pediatric Endocrine Society*<sup>153</sup> propõe que a supressão adrenal deve ser considerada na faixa etária pediátrica, em todas as crianças que receberam doses supra-fisiológicas, em geral terapêuticas, de corticosteroide oral (maiores que 8-12 mg/m<sup>2</sup>/dia – equivalente à hidrocortisona) por mais de duas semanas. Se a possibilidade de SA não é aventada nessas condições, há risco de crise adrenal mesmo perante agentes estressores moderados, como infecção e procedimentos cirúrgicos de pequeno porte.

A crise adrenal (CA) é definida como insuficiência adrenal grave tratável, caracterizada por hipotensão e ou hipoglicemia, com complicações como crises convulsivas e coma. Na insuficiência adrenal crônica por supressão glicocorticoide, a integridade do sistema renina-angiotensina parece permanecer intacta, sendo a hipovolemia supostamente rara.

Em pacientes asmáticos, por exemplo, apesar de infrequente, a incidência de crise adrenal no grupo que utiliza glicocorticoide inalatório é subestimada<sup>151</sup>. Na asma, de forma geral, ocorre uma atividade diminuída do eixo HHA, independente do uso de glicocorticoide inalatório. Apesar de determinados casos graves estarem relacionados à resistência glicocorticoide<sup>154</sup>, a maioria dos estudos aponta para uma resposta diminuída ao teste convencional com ACTH e maior variabilidade de resposta em relação a controles<sup>124</sup>, além de níveis basais de cortisol mais baixos.

Apesar do teste com baixa dose de ACTH apresentar melhor sensibilidade e especificidade na supressão adrenal por glicocorticoide, o cortisol medido às 8:00 é mais prático e pode ser considerado, na asma persistente, o primeiro passo na identificação dos

casos suspeitos de SA. A especificidade é quase 100% com valores  $< 3 \mu\text{g/dL}$ , contudo a sensibilidade está em torno de 60%. Se um valor alterado é obtido, deve-se proceder ao teste funcional, mas um valor normal de cortisol basal não exclui a possibilidade de supressão adrenal, sendo a clínica mandatória para tomada de decisão de um segundo teste.

A triagem é duvidosa tendo em vista que em adultos não há correlação confiável entre a falha no teste com ACTH em condições basais e maior risco de fato de supressão adrenal em situações de estresse<sup>155</sup>. Pode ser considerado em pediatria, na asma, contudo, o grupo com maior risco: 1) crianças assintomáticas tratados por 3-6 meses com glicocorticoide potente (fluticasona  $\geq 500 \mu\text{g/dia}$  ou  $\geq 1000 \mu\text{g/dia}$  de budesonida/ beclometasona); 2) crianças que receberam corticoterapia oral por mais de duas semanas e 3) crianças que receberam múltiplas doses por mais de três semanas nos passados seis meses<sup>156</sup>.

Do ponto de vista prático, deve-se ter em mente que com o cortisol  $> 22 \mu\text{g/dL}$ , após teste com baixa dose de ACTH, afasta-se a possibilidade de supressão adrenal. O cortisol basal  $> 13 \mu\text{g/dL}$  (14,5 segundo o *Williams Textbook of Endocrinology*) sugere um desfecho semelhante, afastando a supressão adrenal com 85% de certeza, contudo<sup>157</sup>.

Crianças com leucemia linfóide aguda recebem altas doses de corticosteróides, como parte de seu tratamento, podendo levar à supressão do eixo HHA e crise adrenal, com risco de morte. Estudo recente<sup>158</sup> com 96 crianças, após cessar a terapia de indução de remissão com glicocorticoide, mostrou que há correlação significativa entre o valor do cortisol e a falha de resposta ao SST. Essa correlação é medida pela baixa amplitude de elevação do cortisol ( $p < 0,0001$ ) com o tempo de supressão adrenal, chegando até 67% a incidência de SA. A média para a recuperação do eixo foi de 8,5 meses [IC 95% (6,3; 10,7)] e o valor de referência utilizado para o cortisol basal foi de  $18 \mu\text{g/dL}$ .

Devido à incongruência dos dados na literatura, foi realizada metanálise<sup>159</sup> avaliando estudos com adultos no período de 1966-2006, com dosagens pareadas de cortisol ao SST e LDSST e ajuste para o tamanho amostral e ensaio, demonstrando que o LDSST é preferível ao SST. Recomendam-se três passos: 1) medida do cortisol basal; 2) se cortisol indeterminado 5-23  $\mu\text{g/dL}$ , realizar LDSST; 3) se cortisol indeterminado em segundo teste 16-22  $\mu\text{g/dL}$ , realizar teste com metirapona ou ITT. Contudo, a população envolvida neste estudo de referência é composta por poucos pacientes em uso crônico de glicocorticoídes, apenas 7%.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o perfil de variações das concentrações séricas do cortisol basal (valores de referência) em crianças e adolescentes de população sem doença adrenal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Correlacionar os valores do cortisol basal obtidos com idade, gênero e grau de maturação sexual;
2. Determinar valores de referência para o cortisol basal sérico para a população de crianças e adolescentes saudáveis;
3. Avaliar a adequação do intervalo de referência utilizado até o momento no serviço de referência, a partir dos valores observados na população de crianças e adolescentes saudáveis.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente trabalho é um estudo do tipo transversal com amostras de conveniência.

### 4.1 Casuística

A casuística é formada por população pediátrica sem doença adrenal.

Os sujeitos da pesquisa são crianças e adolescentes saudáveis, provenientes do Instituto de Educação de Minas Gerais, Belo Horizonte. Foram utilizados dados de 151 crianças e adolescentes desta população para o presente estudo. A coleta de dados foi realizada em dois períodos: 01/2009 a 07/2009 e 11/2010 a 09/2011.

O critério de inclusão utilizado foi idade menor que 20 anos. Os critérios de exclusão estão descritos a seguir:

- Uso de medicamentos contínuos (exceção: anticoncepcional oral);
- Uso de glicocorticoides nos últimos trinta dias anteriores à avaliação;
- Presença ou passado de doença crônica (anemia grave, neoplasia, doença renal, doença hepática, doença intestinal inflamatória, epilepsia, síndrome de ovários policísticos);
- Apresentar ou ter apresentado doença febril ou com necessidade de uso de medicamentos nas últimas 48 horas anteriores à avaliação;
- Apresentar excesso de peso (segundo avaliação clínica, descrita a seguir).

Uma segunda população, composta por 64 crianças e adolescentes com asma ou síndromes sibilantes, também foi estudada, proveniente de um projeto prévio intitulado: “Estudo da função do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal através do nível sérico de cortisol em crianças com asma ou síndromes sibilantes tratadas com beclometasona”. Compuseram essa amostra crianças assistidas na atenção primária, entre 02/2004 e 01/2008, integrantes de um programa de assistência pública ao asmático, antes da introdução da corticoterapia inalatória, no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. O critério de inclusão utilizado para a seleção dessa amostra foi idade menor que 20 anos e o critério de exclusão foi uso de glicocorticoide oral nos últimos trinta dias anteriores à avaliação.

## 4.2 Métodos

O incentivo financeiro foi realizado pela FAPEMIG.

Os sujeitos da pesquisa foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial.

Os alunos do Instituto de Educação de Minas Gerais (crianças saudáveis) foram convidados a participar do estudo através de uma carta entregue na escola e os interessados convocados posteriormente por telefone.

### 4.2.1. Avaliação clínica

Os pacientes asmáticos ou com síndromes sibilantes foram examinados pelo médico pediatra assistente no Centro de Saúde de referência.

As crianças e adolescentes saudáveis foram avaliados por endocrinologista pediátrico, no ambulatório São Vicente de Paulo do HC-UFG.

Foi realizado exame físico completo, incluindo aferição da pressão arterial sistêmica<sup>161</sup> (por manômetro Tycos® devidamente calibrado e estetoscópio Littmann® pediátrico), estadiamento puberal<sup>161,162</sup> e medida de altura por estadiômetro de parede e peso por balança digital portátil com calibração confirmada por peso conhecido, marca G-Tech®. Os indivíduos vestiram roupas leves fornecidas no ambulatório para a avaliação.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela relação  $\text{peso}/(\text{altura})^2$ . O percentil para o IMC foi determinado através da curva conforme a idade, padronizada pela Organização Mundial de Saúde – OMS<sup>163</sup>. Foram excluídos 33 integrantes por apresentar sobrepeso ou obesidade (percentil para o IMC maior que 85).



#### 4.2.2 Avaliação laboratorial

Foi solicitado jejum de 12 horas para o exame laboratorial. A coleta de sangue para o cortisol foi realizada entre 8:00 e 9:00 horas da manhã, após repouso de quinze minutos, no setor de coleta do Laboratório Central, do Serviço de Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas.

Amostras de 5 mL de sangue para o cortisol foram coletadas em tubos à vácuo, sem anticoagulante. A seguir, foram centrifugadas no próprio setor e analisadas no mesmo dia, no setor de sorologia ou de bioquímica (após 11/2010) do mesmo serviço.

O transporte do material do setor de coleta do Laboratório Central ao laboratório de análise foi realizado segundo procedimentos de rotina.

#### 4.2.3 Especificações para o cortisol basal sérico

Foram utilizados dois ensaios na análise do cortisol sérico, em dependência do período da coleta, no mesmo serviço de referência.

O princípio do método de ambos ensaios para o cortisol sérico foi o **imunoensaio enzimático quimioluminescente do tipo competitivo**. O método depende de uma competição entre o cortisol presente na amostra e um conjugado marcado com peroxidase HRP para um número limitado de locais de ligação. É formado um complexo antígeno-anticorpo, captado pela estreptavidina existente em poços. O conjugado é medido por uma reação luminescente. A quantidade de conjugado de HRP se correlaciona com a concentração presente de cortisol.

Foram utilizados os seguintes ensaios com as respectivas características:

- Immulite® da Siemens Medical Solutions Diagnostic (Los Angeles - EUA, 2006): intervalo de referência para o cortisol sérico 5-25 µg/dL, limite de detecção (sensibilidade) de 0,2 µg/dL e intervalo de trabalho 1-50 µg/dL.
- Sistema Integrado Vitros® 5600, plataforma Microwell da Johnson & Johnson (Buckinghamshire - Reino Unido, 2009): intervalo de referência para o cortisol

sérico 4,46-22,7 µg/dL, limite de detecção (sensibilidade) de 0,1 µg/dL e intervalo de trabalho 0,16-61,6 µg/dL.

O Sistema Integrado Vitros® 5600 foi submetido ao processo de validação no serviço de medicina laboratorial de referência, em que foram determinadas as características de desempenho a seguir, para o cortisol sérico:

- Precisão: coeficiente de correlação de 0,994 em comparação ao método ECiQ VITROS.
- Exatidão: Biais ou erro sistemático de -3,01% (nível 1 com coeficiente de variação de 2,65) e -2,26% (nível 2 com coeficiente de variação de 1,49). Erros totais de 7,38% e 4,72% (erro total permitido desejável de 29,8% e ótimo de 14,9%).

A variação biológica do cortisol sérico foi determinada em estudo prévio<sup>164</sup> pelo coeficiente intraindividual (CVi%) de 20,9% e o geral (CVg%) de 45,6%, não calculada para o presente trabalho.

#### **4.2.4 Questões éticas**

O presente trabalho foi realizado a partir de dois projetos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), anexos A e B. As crianças e adolescentes participantes, bem como pais ou responsáveis, após informação, deram seu consentimento por escrito para a realização da avaliação.

#### **4.2.5 Análise estatística**

A variável em estudo foi o cortisol basal sérico - variável quantitativa e contínua, com distribuição estatística que não segue a normal. Correlações desta variável foram estabelecidas conforme o sexo feminino ou masculino (variável qualitativa dicotômica), a idade em anos (variável quantitativa discreta) e o estágio puberal 1, 2, 3, 4 ou 5 (variável qualitativa, tipo escala). A idade foi utilizada como uma variável tipo escala ao se criarem 5 grupos etários: 0-3 anos; 4-7 anos; 8-11 anos; 12-15 anos e 16-19 anos.

Por meio do Microsoft® Excel® 2008 para Mac, versão 12.2.7 (100910) realizaram-se tabelas e gráficos. A ferramenta *Formula Builder* do mesmo programa permitiu a descrição da composição da amostra (conforme o gênero, idade e estágio puberal) e o cálculo das medidas de tendência central e dispersão. Os testes estatísticos foram realizados através do pacote estatístico R (*A Language and Environment Computing - R Foundation for Statistical*), Viena 2005.

O teste de Shapiro-Wilks foi utilizado para determinar numericamente a suposição de normalidade do cortisol, sendo o valor-p  $< 0,05$  sinal de desvio da normalidade. A avaliação de *outliers* seguiu dois critérios: o limite de 1,5 vezes o intervalo interquartil e a relação  $D/R < 1/3$ , onde D é a diferença entre o valor extremo e o valor inferior mais próximo deste e R a amplitude de todas as observações (teste de Dixon).

A distribuição do cortisol em dependência do estágio puberal foi estudada pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (KW) e teste F sendo o valor-p  $< 0,05$  sugestivo de diferença do padrão de distribuição nos subgrupos. Comparações múltiplas entre os estágios foram realizadas através do teste de Tukey. A mesma metodologia foi utilizada para a análise do cortisol em dependência dos grupos etários.

A distribuição do cortisol baseada no gênero foi estudada pela análise de Mann-Whitney, sendo p-valor  $< 0,05$  sugestivo de diferença entre os subgrupos feminino e masculino.

A dependência linear do cortisol em relação à idade foi testada pela correlação de postos de Spearman ( $r_s$ ), sendo p-valor  $< 0,05$  significativo.

A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para avaliar a extensão com que o cortisol está relacionado à idade e ao grau de maturação sexual, sendo p-valor  $< 0,05$  significativo.

O estabelecimento de limites e intervalos de referência foram realizados segundo o consenso do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI C28-A3)*<sup>6</sup>. Foram estabelecidos os percentis 2,5 e 97,5 como limites de referência, que contêm 95% dos valores. Os intervalos de confiança de 90% para os limites de referência do cortisol foram estabelecidos utilizando os valores dos postos 1-7 e 114-120, respectivamente (10% da distribuição).

## 5 RESULTADOS

A amostra foi dividida para análise em dois grupos conforme o ensaio utilizado para o cortisol sérico: Grupo A (ensaio Vitros) e Grupo B (ensaio Immulite), tabela 1.

TABELA 1

Divisão da amostra estudada conforme o ensaio utilizado para o cortisol sérico

<b>Grupo amostral</b>	<b><u>Ensaio Vitros</u></b>	<b><u>Ensaio Immulite</u></b>	<b>Total</b>
	<b><i>Grupo A</i></b>	<b><i>Grupo B</i></b>	
Asma e síndromes sibilantes	0	64	64
Escolares saudáveis	120	31	151
<b>Total</b>	120	95	215

### 5.1 Descrição dos grupos amostrais

Foram analisados os dados de 120 estudantes saudáveis (figura 9) no grupo A. A idade média dos indivíduos é de 12,4 anos, a mediana de 12 anos, com amplitude de 4 a 19 anos e desvio-padrão de 3 anos. 42% são do sexo masculino e 58% do feminino. A distribuição em estágios de desenvolvimento puberal de 1 a 5 está representada na figura 11.

No grupo B, foram avaliados dados de 95 integrantes (figura 10). Compuseram o grupo: 64 pacientes asmáticos ou com síndromes sibilantes de 0-13 anos (com mediana de 2 anos) e 31 escolares saudáveis de 9-18 anos (com mediana de 11 anos). A idade média do grupo B foi de 7,5 anos, a mediana 7,3 anos, com amplitude de 0,3 a 18 anos e desvio-padrão de 6 anos. 47% são do sexo masculino e 53% do feminino.

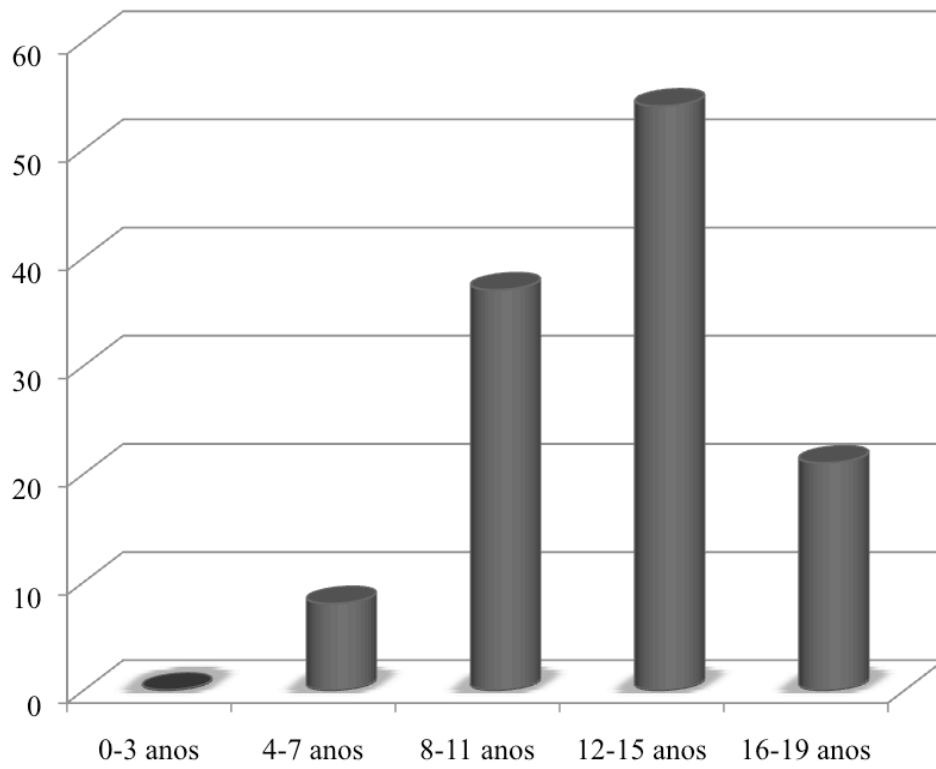


FIGURA 9 - Distribuição dos indivíduos em faixas etárias (n = 120) - grupo A

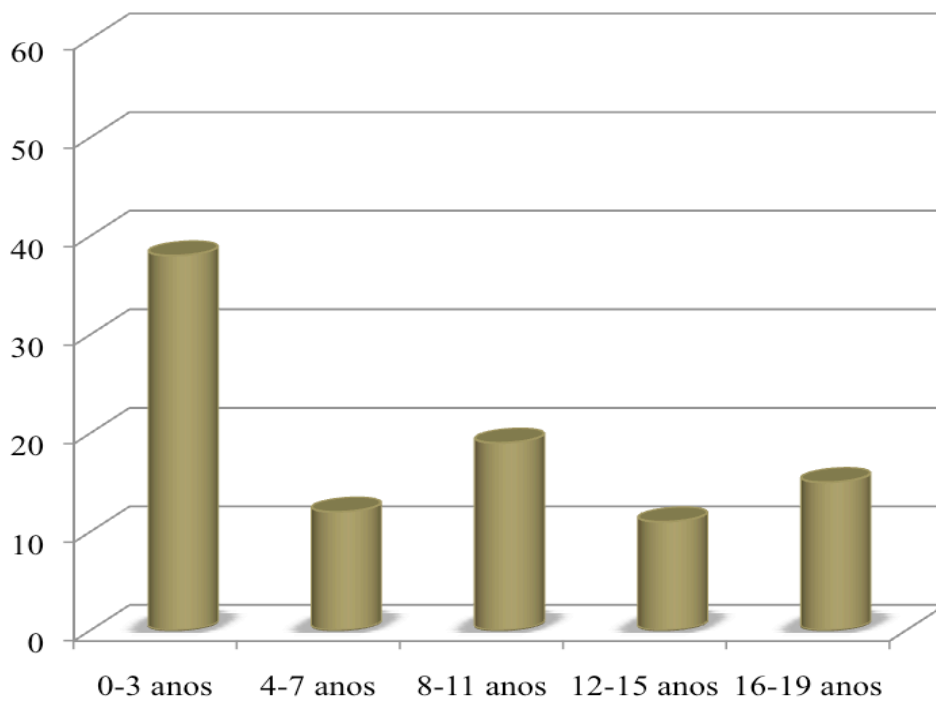


FIGURA 10 - Distribuição dos indivíduos em faixas etárias (n = 95) - grupo B

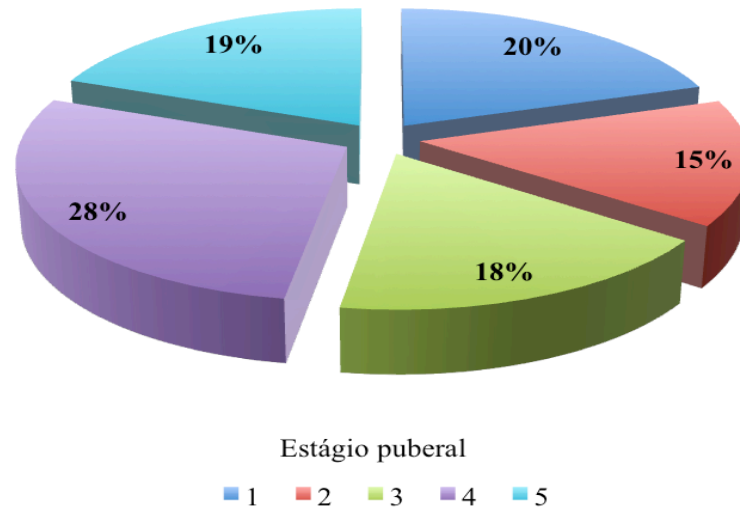


FIGURA 11 - Porcentagem de indivíduos conforme os estágios puberais (n = 120) - grupo A

## 5.2 Grupo A

A média dos valores de cortisol sérico nessa população foi 8,68  $\mu\text{g/dL}$ , mediana 7,3  $\mu\text{g/dL}$ , amplitude de 1,44 a 26,3  $\mu\text{g/dL}$  e desvio-padrão de 4,36  $\mu\text{g/dL}$ .

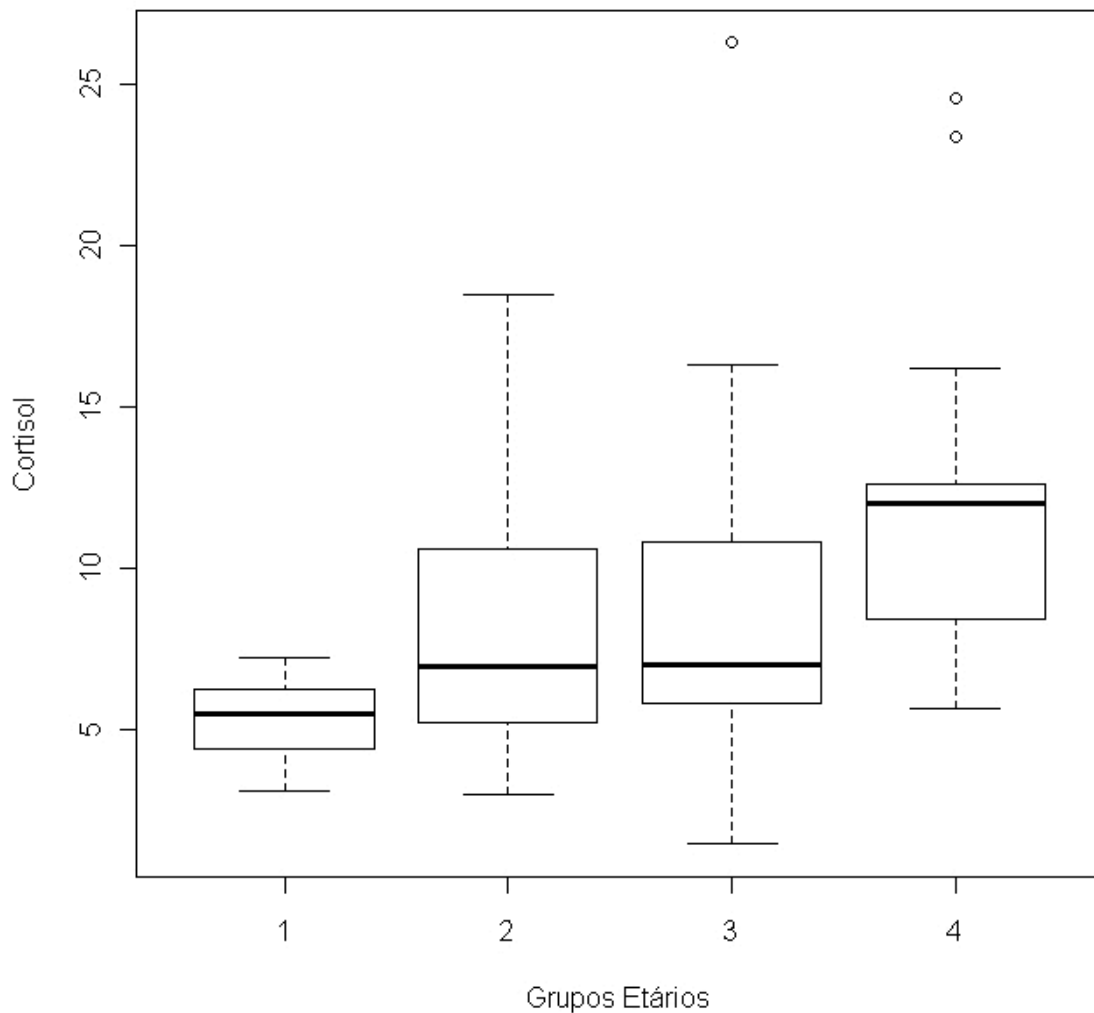
### 5.2.1 Cortisol e idade

O cortisol sérico aumenta com a idade ( $r_s = 0,32$ ; p-valor 0,0003245; n = 120) e é significativamente mais elevado a partir dos 16 anos (p-valor 0,0002608). A distribuição do cortisol nos grupos etários está apresentada na tabela 2, nas figura 12 e 14.

TABELA 2

Grupo A: Apresentação de dados. Cortisol sérico (em  $\mu\text{g/dL}$ ) nas faixas etárias.

Faixas etárias	n	Média	Mediana	Desvio-padrão	Amplitude
4-7 anos	8	5,32	5,49	1,38	3,1-7,25
8-11 anos	37	8,35	6,97	4,02	2,97-18,5
12-15 anos	54	8,23	7,02	4,12	1,44-26,3
16-19 anos *	21	11,7	12	4,82	5,67-24,6

\* Aumento significativo do cortisol em  $> 16$  anos ( $p$ -valor  $< 0,001$  por KW)FIGURA 12 - Box plot: cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) e faixas etárias. 1: 4-7 anos; 2: 8-11 anos; 3: 12-15 anos e 4: 16-19 anos - grupo A

### 5.2.2 Cortisol e grau de maturação sexual

Os valores de cortisol sérico variam com o grau de maturação sexual (p-valor 0,034). Os indivíduos no estágio puberal 5 apresentam valores mais elevados que indivíduos nos estágios 1 e 2. A distribuição do cortisol conforme o grau de maturação sexual está apresentada na tabela 3 e nas figura 13 e 15.

TABELA 3

Grupo A: Apresentação de dados. Cortisol sérico (em  $\mu\text{g/dL}$ ) nos estágios puberais de 1 a 5

<b>Estágios puberais</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Amplitude</b>
Estágio 1	24	7,89	6,85	3,95	3,1-18,5
Estágio 2*	18	7,49	6,57	3,38	2,97-16,3
Estágio 3	21	8,46	7,01	4,12	3,52-17
Estágio 4	34	8,36	7,73	4,44	1,44-26,3
Estágio 5*	23	11,39	10,8	4,83	4,98-24,6

\* Diferença significativa do cortisol entre indivíduos nos estágios 1-2 e 5 (p-valor < 0,05 por KW)



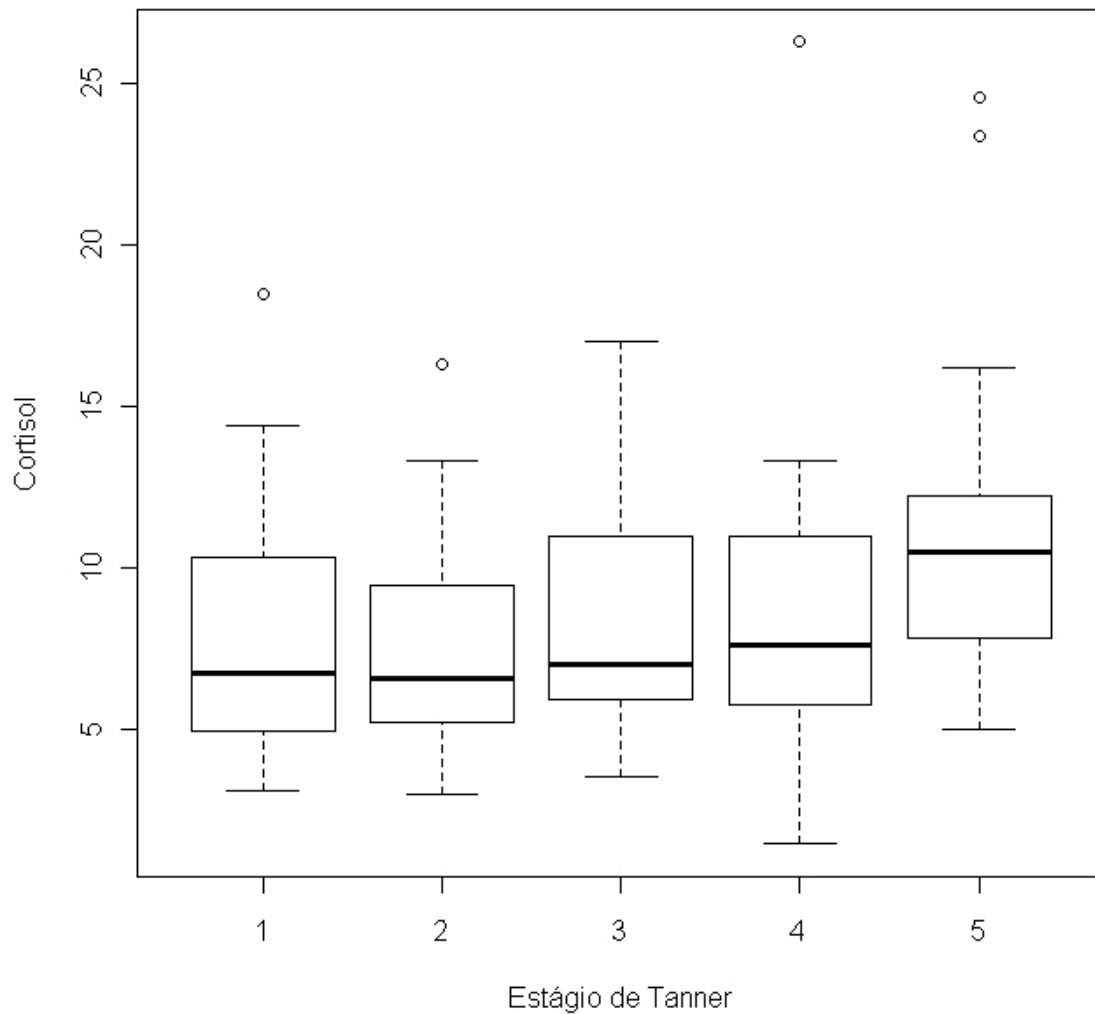


FIGURA 13 - Box plot: Cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) e estágios puberais - grupo A

Dessa forma, o cortisol sérico varia com a idade e com o grau de maturaco sexual. A regressão linear múltipla, utilizando os estágios de Tanner 1-5 e a idade, sugere que a idade  mais importante que o grau de maturaco sexual para a determinao dos valores de cortisol sérico ( $p\text{-valor} = 0,02$  para a idade). Este resultado parece explicar a diferença significativa do cortisol encontrada entre indivíduos nos estágios puberais iniciais e indivíduos no estágio final.

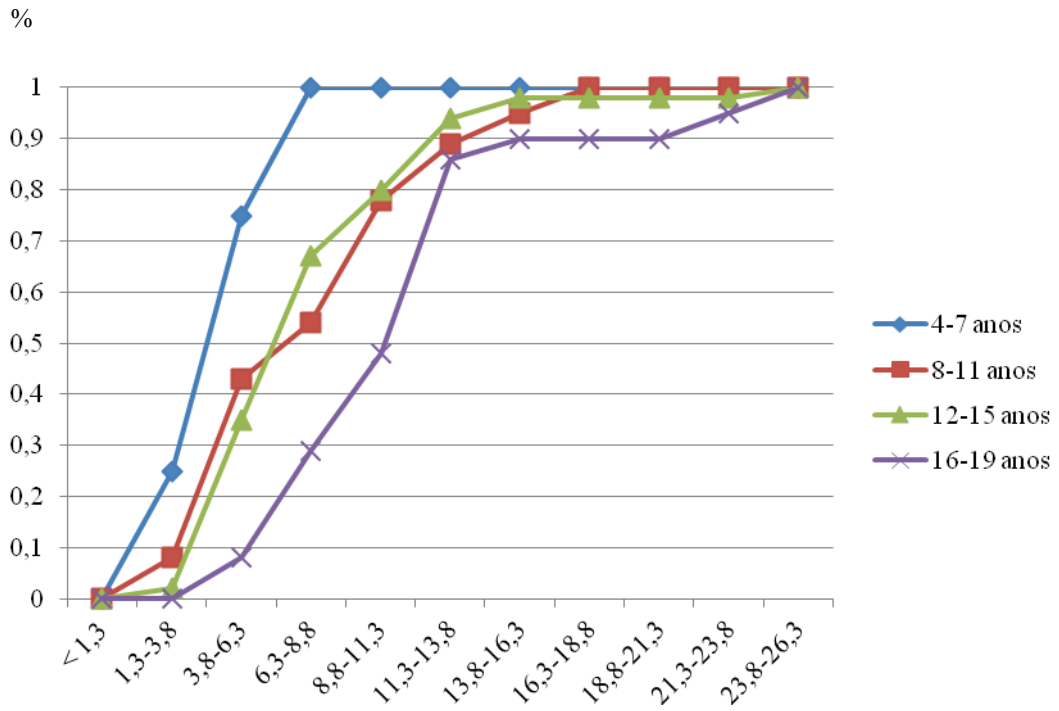


FIGURA 14 - Polígono de frequência acumulada: frequências relativas acumuladas de níveis de cortisol sérico (em µg/dL) por idade - grupo A.

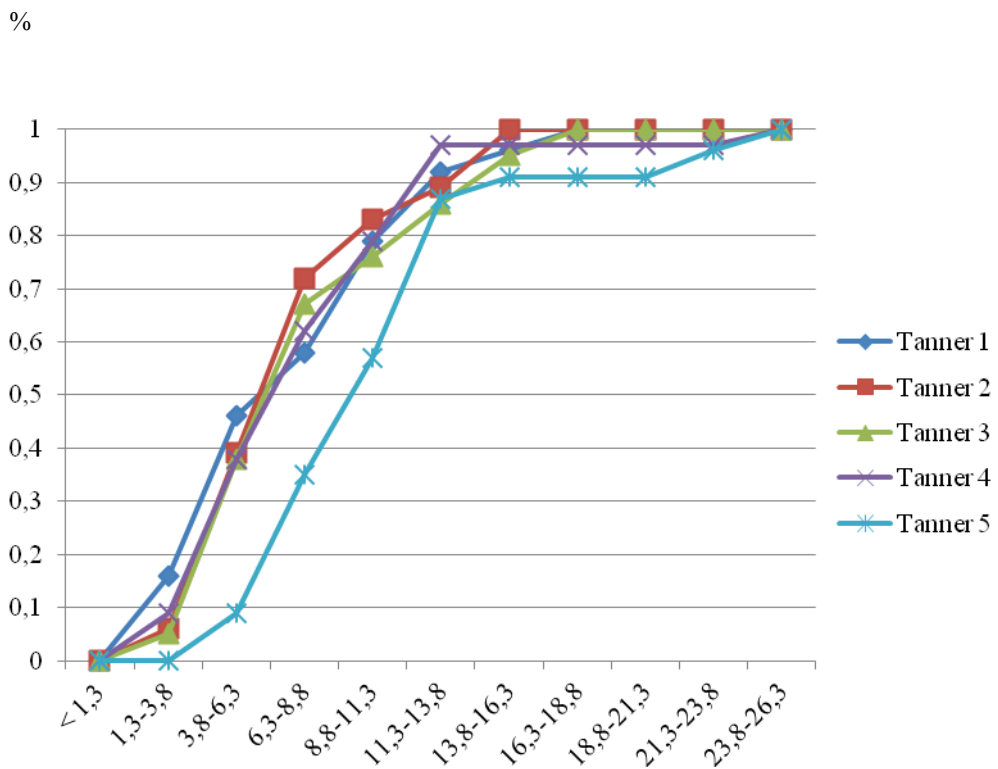


FIGURA 15 - Polígono de frequência acumulada: frequências relativas acumuladas de níveis de cortisol sérico (em µg/dL) por grau de maturação sexual - grupo A.

### 5.2.3 Cortisol e gênero

O cortisol sérico é semelhante no sexo feminino e masculino ( $p$ -valor  $> 0,05$ ). A distribuição do cortisol nos sexos feminino e masculino está apresentada na figura 16.

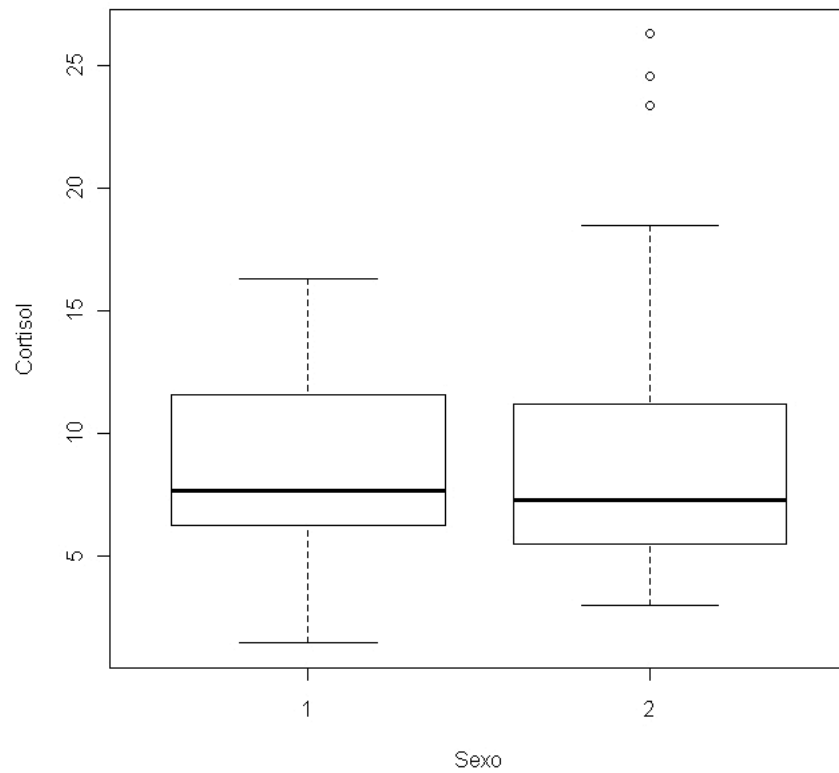


FIGURA 16 - Box plot: cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) e sexo: masculino 1; feminino 2 - grupo A

### 5.2.4 Distribuição do cortisol

A distribuição do cortisol está representada na figura 17 (não suposição de normalidade, p-valor  $10^{-7}$ ).

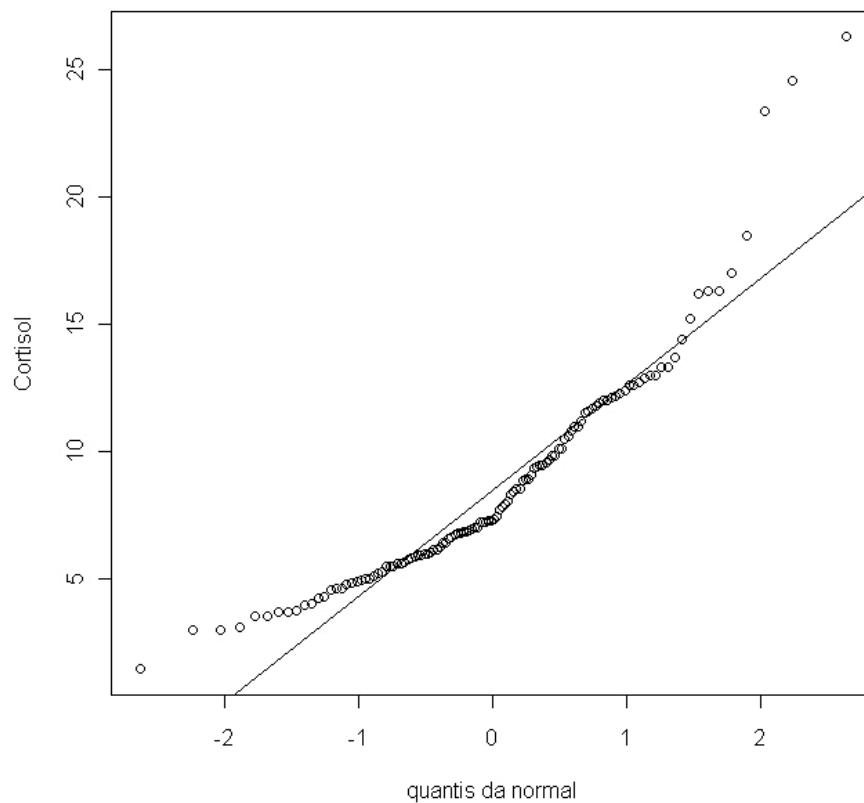


FIGURA 17 - Curva de probabilidade do cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) - grupo A

### 5.2.5 Valores atípicos

Os valores de cortisol 23,4  $\mu\text{g/dL}$ , 24,6  $\mu\text{g/dL}$  e 26,3  $\mu\text{g/dL}$ , referentes aos postos 118, 119 e 120 respectivamente, comportam-se como valores atípicos de toda a distribuição e estão representados na figura 18.

*Outliers* multivariados (associados a variáveis) foram detectados associados aos estágios puberais 1 (18,5  $\mu\text{g/dL}$ ) e 2 (16,3  $\mu\text{g/dL}$ ).

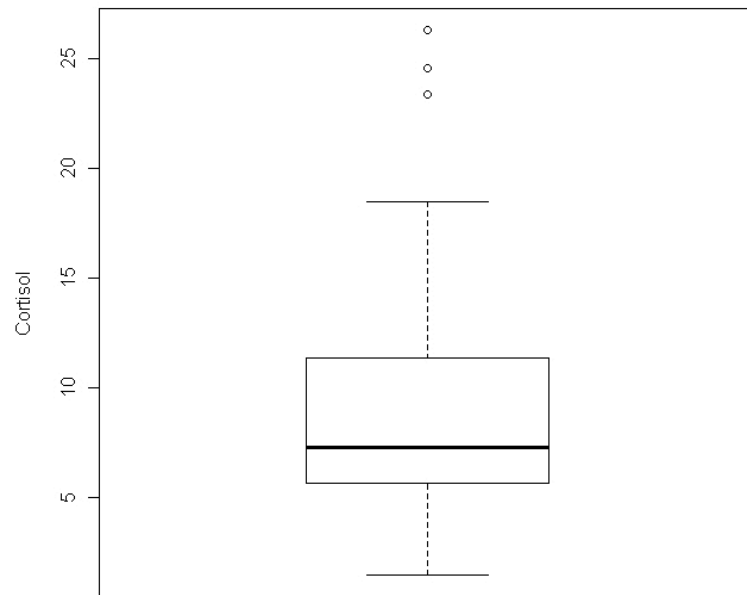


FIGURA 18 - Box plot: cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ). Valores atípicos representados por pontos externos - grupo A

### 5.2.6 Valores correspondentes aos percentis 2,5 e 97,5

Os limites de referência ( $r_1$ ) e ( $r_2$ ) para os valores do cortisol basal sérico em amostra de 120 indivíduos foram determinados a seguir:

- $r_1 = 0,025 \cdot (n+1) = 0,025 \cdot (121) = 3^\circ$  posto: 2,97  $\mu\text{g/dL}$
- $r_2 = 0,975 \cdot (n+1) = 0,975 \cdot (121) = 118^\circ$  posto: 23,4  $\mu\text{g/dL}$

### 5.3 Grupo B

Nessa amostra, a média dos valores de cortisol sérico foi 13,55 µg/dL, mediana de 12 µg/dL, com desvio-padrão de 6,37 µg/dL e amplitude de 4,3 a 38,1 µg/dL.

#### 5.3.1 Cortisol e idade

O cortisol aumenta com a idade. A correlação positiva entre os valores de cortisol e a idade ocorre a partir dos 3 anos ( $r_s = 0,27$ ; p-valor 0,038;  $n = 61$ ), sendo mais significativa após os 8 anos ( $r_s = 0,55$ ; p-valor  $10^{-4}$ ;  $n = 45$ ), figura 19.

Nas faixas etárias (0-3 anos, 4-7 anos, 8-11 anos, 12-15 anos e 16-19 anos) os valores de cortisol são significativamente diferentes apenas entre as idades 8-11 anos e 16-19 anos (p-valor 0,001258), figura 20.

A distribuição do cortisol nas faixas etárias está apresentada na tabela 4.

TABELA 4

Grupo B: Apresentação de dados. Cortisol sérico (em µg/dL) nas faixas etárias.

<b>Faixas etárias</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Amplitude</b>
0-3 anos	38	14,1	19,8	7,2	4,6-38,1
4-7 anos	12	13,9	14,5	3,79	7,3-19,1
8-11 anos	19	9,7	9,41	2,96	4,3-15
12-15 anos	11	11,8	11,2	5,55	5,4-26,1
16-19 anos	15	18,4	18,3	6,67	9,97-33,2

<b>Faixas etárias</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Amplitude</b>
< 1 ano	12	13,4	12,1	5,7	8,3-25,7
1 ano	14	12,8	13,1	6,03	6,4-29,8
2 e 3 anos	12	15	12,45	9,87	4,6-38,1

Cortisol e idade (> 8 anos):  $r_s = 0,55$ ; p-valor < 0,001; n = 45

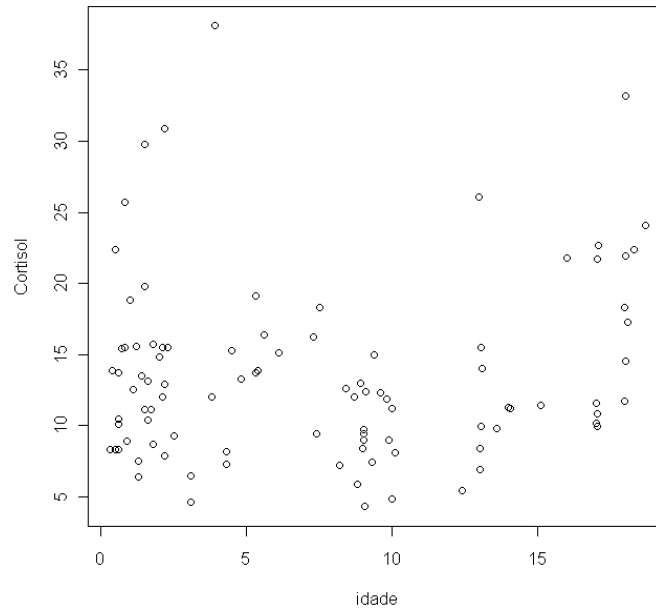


FIGURA 19 - Gráfico de dispersão do cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) versus a idade (em anos) - grupo B

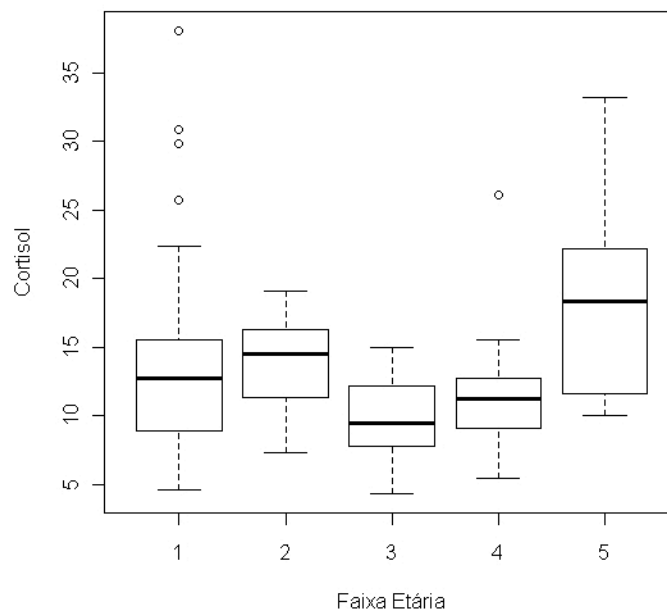


FIGURA 20 - Box plot: cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) e faixas etárias. Faixa 1: 0-3 anos; faixa 2: 4-7 anos; faixa 3: 8-11 anos; faixa 4: 12-15 anos e faixa 5: 16-19 anos - grupo B. Diferença significativa do cortisol entre as faixas 8-11 e 16-19 anos (p-valor < 0,005 por KW).

### 5.3.2 Cortisol e gênero

O cortisol sérico é semelhante no sexo feminino e masculino ( $p$ -valor  $> 0,05$ ). A distribuição do cortisol nos sexos feminino e masculino está apresentada na figura 21.

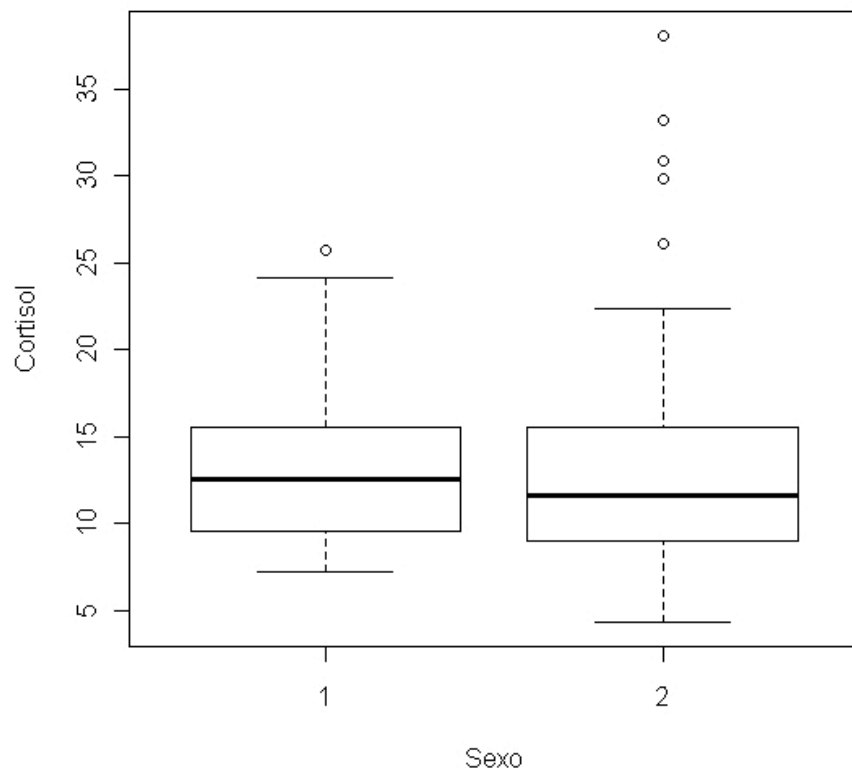


FIGURA 21 - Box plot: cortisol (em  $\mu\text{g/dL}$ ) e sexo: masculino 1; feminino 2 - grupo B



## 6 DISCUSSÃO

A avaliação do eixo HHA, por meio da dosagem do cortisol, é realizada em várias situações clínicas. Na prática, têm sido utilizados, com frequência, os mesmos valores de referência de normalidade do cortisol basal para adultos e crianças, comprometendo as avaliações pediátricas. Sabe-se que os desenvolvimentos psíquico e físico na infância e adolescência promovem modificações no padrão individual de resposta do eixo, de forma que a idade e a fase do crescimento biológico podem determinar padrões específicos para os valores do cortisol basal.

### 6.1 Cortisol basal sérico na população pediátrica

Na casuística, a medida do cortisol sérico aumentou com a idade e com o grau de maturação sexual. A distribuição dos valores de cortisol sérico em faixas etárias e em estágios puberais foi realizada para estudar essas tendências, discutidas a seguir.

A distribuição do cortisol sérico foi avaliada em crianças com idades de 4-19 anos no grupo A e 0-19 anos no grupo B. Alguns aspectos diferenciados para o cortisol foram observados no grupo B. Em crianças abaixo de 3 anos observou-se, em concordância com a literatura<sup>78,79</sup>, uma maior variabilidade entre indivíduos dos valores de cortisol com relação às outras idades. Os valores de cortisol sérico para crianças de 0-3 anos variaram de 4,6 a 38,1  $\mu\text{g/dL}$ . O intervalo de referência na literatura<sup>89</sup> mais próximo para essa idade é  $< 1-35 \mu\text{g/dL}$  (idade 0-2 anos,  $n = 149$ ). A partir dos 3 anos, a medida do cortisol sérico aumenta progressivamente com a idade.

De fato, os dispositivos cerebrais de lactentes possuem aspectos fisiológicos peculiares e sensibilidades diferentes ao impacto do estresse. Análises transversais demonstram que o cortisol parece ser mais elevado nos primeiros anos de vida, tendo em vista a maior sensibilidade aos estressores, incluindo a venopunção. A imaturidade do eixo, e a instabilidade dos processos diários de alimentação, sono e vigília justificam variabilidades maiores tanto inter quanto intraindividuais do cortisol basal nesse grupo<sup>63,78,79,80,81</sup>.

Além disso, nessa fase há a possibilidade de modificação da previsão genética por fatores e exposições ambientais. Assim, a primeira infância é uma fase de grande plasticidade com relação ao estabelecimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal<sup>53</sup>.

Com os anos, o padrão do cortisol basal atinge estabilidade (na fase escolar), com aumento na puberdade inicial<sup>86</sup> e diferenciação de gênero nesse estágio e nos estágios finais da puberdade<sup>92,93</sup>.

Em Kiess W<sup>61</sup> e colaboradores, o cortisol foi avaliado em 138 crianças e adolescentes saudáveis, sendo maior no primeiro ano de vida e após os 6 anos de idade, progressivamente. No presente estudo, no grupo B (idade 0-19 anos), essa tendência pode ser observada a partir dos 8 anos de idade, de forma mais significativa.

Contudo, a evolução do perfil individual de variações do cortisol ao longo dos anos permanece ainda obscura. Estudos longitudinais<sup>165,166</sup> têm procurado decifrar essa questão, medindo o cortisol nos mesmos indivíduos, em idades subsequentes, esclarecendo como a idade e a puberdade afetam os níveis de cortisol. Em estudo preliminar<sup>166</sup>, com 203 meninos e 158 meninas, observou-se uma correlação positiva do cortisol ao despertar com a idade, dos 15 a 17 anos.

No presente estudo, os adolescentes de 16-19 anos do grupo A apresentam valores de cortisol significativamente mais elevados que os demais. Não se sabe se a idade e o grau de maturação sexual constituem mecanismos independentes na determinação dos níveis mais elevados de cortisol, porque o grau de maturação sexual também aumenta com a idade.

No grupo B, a correlação positiva entre idade e cortisol sérico foi menos expressiva quando os resultados foram agrupados de acordo com grupos ou faixas etárias. Contudo, os indivíduos com 16-19 anos têm níveis de cortisol significativamente maiores, assim como no grupo A.

Apesar do provável aumento do cortisol basal ao longo da infância, crianças e adolescentes parecem ser mais susceptíveis ao estresse que adultos<sup>167</sup>. Com a progressão da vida adulta, contudo, o envelhecimento passa a potencializar as respostas do eixo HHA. Uma metanálise recente compara 670 adultos jovens com 625 idosos ( $28 \pm 5$  x  $69 \pm 6$  ano). A idade acentuou a resposta ao estresse em 2,4 vezes, em média, sendo nas mulheres um aumento de no mínimo 2,7 vezes<sup>168</sup>.

Na presente análise, os valores de cortisol variam com o grau de desenvolvimento puberal. O cortisol aumenta dos estágios 1 e 2 ao estágio 5, em que os maiores níveis foram observados.

Na literatura, variações do cortisol têm sido observadas conforme a idade biológica e

grau de maturação sexual<sup>82,95</sup>. Na adolescência os mecanismos da puberdade promovem mudanças significativas na função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Contudo, modificações mais sutis são observadas também no eixo adrenal (HHA), levando a respostas específicas em situações cotidianas e diante estressores psiconeurogênicos.

O incremento do LH, FSH e estradiol nas meninas em início de puberdade são observados em paralelo a moderadas elevações do cortisol em estudo prévio<sup>89</sup>. O aumento do cortisol nas fases iniciais de desenvolvimento puberal é descrito pela literatura<sup>85,91</sup> associada a uma reação de estresse crônico. Na presente casuística, os indivíduos em estágios de maturação sexual 2 e 3 não apresentam resultados de cortisol basal sérico mais elevados que indivíduos nos estágios 4 e 5.

A medida do cortisol basal sérico não variou com o gênero. Porém, os valores mais elevados na cauda superior da distribuição do cortisol no grupo A se referiram a resultados de adolescentes de 15-17 anos do sexo feminino.

Estudos sugerem que o cortisol parece ser mais elevado realmente em meninas, conforme a progressão da idade. Não se sabe sobre a real participação da sua maturação mais precoce neste aspecto.

Observa-se, contudo, uma diferenciação entre os sexos determinada por picos de cortisol mais intensos e maior sustentação do estímulo matinal em adolescentes do sexo feminino<sup>169</sup>. Supõe-se um mecanismo de sensibilização da resposta do eixo pelo hormônio estradiol. Por isso, meninas após menarca parecem apresentar níveis mais elevados de cortisol<sup>85,90,91,92,93</sup>. Segundo resultados de Jonetz-Mentzel e colaboradores<sup>83</sup>, as adolescentes apresentam diferenciações dos valores de cortisol a partir dos 14 anos.

Durante o estresse social, meninas de 13-15 anos parecem também apresentar níveis de cortisol mais elevados que meninos<sup>170</sup> o que pode justificar, em parte, a maior vulnerabilidade observada para determinados eventos psíquicos em meninas, nessa faixa etária. Suposições podem ser feitas sobre essas possíveis diferenças de resposta e de como o adolescente, seja do sexo feminino ou masculino, vivencia sua transição da adolescência para a vida adulta.

Netherton C e colaboradores<sup>92</sup> avaliaram 129 crianças e adolescentes de 9-16 anos e observaram que meninas em estágio puberal 3, 4 e 5 apresentavam níveis 20-30% maiores que meninos. A diferença observada a partir do estágio puberal 3 pode indicar a divergência na atividade do eixo HHA nessa fase do desenvolvimento e que persiste em grande parte da vida adulta.

Tendo em vista a ocorrência de variações do cortisol basal em função das flutuações hormonais do ciclo menstrual<sup>47</sup>, é possível pensar em uma correlação entre receptores de estrógenos e receptores glicocorticoides<sup>171</sup>, no mecanismo de *feedback* negativo central. Tais mecanismos explicariam as respostas dependentes do gênero e do grau de maturação sexual.

O estradiol promove profundas influências em vários circuitos cerebrais, mediadas por receptores de estrógeno *alpha* (ER $\alpha$ ). Contudo, receptores *beta* (ER $\beta$ ) são altamente expressos em neurônios do PVN. Esta via parece se comportar como um importante sistema regulador neuroendócrino<sup>172</sup>. *In vivo*, estudos demonstram que agonistas ER $\beta$  atenuam o estímulo induzido por estresse sobre o ACTH e cortisol<sup>173</sup>. Em condições basais, roedores apresentam grandes diferenças entre os sexos feminino e masculino, ainda a nível pré-sináptico cerebral (neurônios da amígdala e hipotálamo)<sup>174</sup>.

As concentrações plasmáticas de CBG, em condições fisiológicas, mostram pequenas variações. Contudo, o pico matinal de cortisol parece exceder a capacidade de ligação da CBG e, por isso, aumenta o cortisol livre que é biologicamente ativo.

Sabe-se que o estrógeno aumenta as concentrações de CBG, enquanto a testosterona promove efeito contrário. O gênero parece influenciar também a disponibilidade de GR e MR e o metabolismo local de glicocorticoides<sup>175</sup>.

## 6.2 Valores de referência para o cortisol basal sérico

As modificações do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal são dinâmicas e o ritmo circadiano possui grande influência nos níveis de cortisol. Dessa forma, a dosagem do cortisol sérico em horários diferentes da manhã pode justificar parte das discordâncias dos valores de referência nos estudos.

A recomendação é que cada serviço de medicina laboratorial confirme as próprias referências para os analitos, inclusive para o cortisol<sup>176</sup>. Os métodos de análise laboratorial para o cortisol são na maioria das vezes comparáveis, mas os resultados de uma única amostra podem variar em até 30%, conforme o local de análise. Além disso, existe uma variabilidade biológica considerável para o cortisol, estimada em até 45% entre indivíduos e de cerca 20% para um mesmo indivíduo<sup>164</sup>. Na pediatria, conforme a faixa etária, essa variabilidade pode ser ainda maior<sup>76,79,105</sup>.

No presente trabalho, as correlações clínicas estudadas para o cortisol nos grupos A e B são semelhantes. Contudo, os valores de cortisol para indivíduos com a mesma idade variaram consideravelmente em dependência do ensaio utilizado. No grupo B, poderia se pensar que os valores foram maiores porque foram incluídas crianças e adolescentes com asma ou síndromes sibilantes neste grupo. Contudo, a tendência se mantém mesmo após a exclusão dos dados destes pacientes da análise. No grupo B, por exemplo, os adolescentes saudáveis de 16-19 anos têm resultados de cortisol mais elevados (cerca de 1,5 vezes) que os adolescentes da mesma faixa etária, no grupo A. Com isso, é possível pensar que os dois ensaios para o cortisol sérico utilizados na presente casuística não são comparáveis, apesar de compartilharem a mesma metodologia e apresentarem intervalos de referência similares.

Os fatores que poderiam interferir nos resultados do cortisol basal sérico foram afastados ou controlados. No grupo A, foram excluídos crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade e indivíduos com doenças crônicas ou que apresentaram eventos agudos recentes (infecções, febre, etc). Contudo, adolescentes em uso de anticoncepcional oral (ACO) foram mantidas, tendo em vista a inconsistência da literatura<sup>96,97</sup> sobre a interferência do seu uso no cortisol basal. Os dados dessas adolescentes estão em destaque no banco de dados em anexo.

Na literatura, técnicas estatísticas sofisticadas já foram determinadas<sup>176,177</sup> para a partição da amostra completa em subgrupos, a partir de discussões sobre proporções, segundo o método inicial proposto por Harris e Boyd<sup>178</sup>. Diante de tais recomendações, optou-se pelo

teste U de Mann-Whitney não paramétrico como avaliação preliminar de partição da amostra em subgrupos conforme o gênero.

Na validação do processo diagnóstico, além do âmbito laboratorial, cada resultado deve ser analisado dentro do contexto clínico e valores críticos podem ser criados a partir de um limite de referência. O limite inferior de referência para o cortisol constitui um valor crítico na avaliação da integridade do eixo HHA (figura 22).

População de referência



Amostra de referência



Distribuição de referência  
(valores de referência)



Limites de referência



Intervalos de referência



Valores críticos

FIGURA 22 - Estabelecimento de intervalos de referência, adaptado da referência 176

Em análises de variáveis de distribuição não gaussiana, os métodos de detecção habituais de valores atípicos<sup>179</sup> podem mascarar resultados não verdadeiros ou, por outro lado, excluir resultados relevantes. Dessa forma, a não ser que os pontos sejam considerados aberrantes por motivos sabidamente conhecidos, é preferível mantê-los.

A avaliação de resultados atípicos na presente pesquisa mostrou que os três últimos valores extremos da distribuição combinada comportaram-se como *outliers*. Os dados se referem a meninas em estágios puberais 4-5.

Como discutido, há indícios na literatura de que meninas, em fase avançada do desenvolvimento puberal, possam apresentar valores fisiologicamente mais elevados em comparação àquelas mais jovens. Portanto, os dados foram mantidos para análise preliminar, apesar de duas dentre as três participantes estarem em uso de anticoncepcional oral. Segundo CLSI C28-A3, indivíduos com valores atípicos podem ser substituídos por outros com a mesmas características clínicas, em posterior avaliação.

O projeto piloto *Canadian Laboratory Initiative in Pediatric Reference – CALIPER*<sup>4</sup> - determinou valores de referência para 471 crianças e adolescentes. Avaliado por método similar àquele do presente estudo (imunoensaio competitivo - Roche cobas® 6000), o cortisol basal sérico apresentou o mesmo padrão de distribuição nas idades de 0 a 14 anos (n = 419), em ambos sexos. Assim, foi possível estabelecer um intervalo de referência único. Os valores encontrados dos percentis 2,5 e 97,5 em  $\mu\text{g/dL}$  ( $\text{nmol/L} \times 0,03625$ ) foram: 2,11 e 20,5. Acima desta idade (> 14 anos), foram observadas diferenças quanto ao gênero, contudo, o tamanho da amostra é pequeno para o estabelecimento de intervalos de referência que sejam confiáveis para os subgrupos.

Observações semelhantes ocorreram entre os grupos etários, na presente casuística. Supondo o mesmo padrão de distribuição do cortisol observado no estudo CALIPER, até os 14 anos, a população do grupo A teria os valores dos percentis 2,5 e 97,5 para o cortisol: 2,97 e 17 (n = 89). Após os 14 anos anos, as amplitudes de variação seriam: 2,96 e 15,2 para meninos (n = 16) e 4,76 e 26,3 para meninas (n = 15). Esses resultados sustentam a hipótese de que crianças e adolescentes jovens parecem ter valores de cortisol de fato menores que adolescentes 16-19 anos, com maturação sexual completa. É possível que o último grupo compartilhe o mesmo intervalo de referência com adultos jovens.

Segundo dados da literatura expostos e correlações clínicas postuladas no presente estudo, a validação do intervalo de referência para o cortisol basal na população pediátrica deve ser adequada para a idade, o gênero e o grau de maturação sexual.

### 6.3 Adequação do intervalo de referência para o cortisol basal sérico

O intervalo de referência, utilizado até o presente momento no contexto do serviço de medicina laboratorial do estudo, se baseia em uma população adulta e parece pouco adequado para a avaliação da integridade do eixo HHA em crianças e adolescentes. Algumas considerações devem ser realizadas, a respeito destes limites 4,46-22,7  $\mu\text{g/dL}$ , em comparação com os valores encontrados para a população de referência, em estudo.

O intervalo de referência combinado (percentil 2,5 e 97,5) para ambos sexos foi de 2,97-23,4  $\mu\text{g/dL}$ . Levando em conta que este intervalo pode deixar de lado dados relevantes de um ou ambos grupos feminino e masculino, optou-se por criar um intervalo de confiança que contemplasse todos os dados da amostra, segundo orientações do CLSI C28-A3. Assim, na amostra de 120 indivíduos, o intervalo de confiança de 90% para o limite de referência inferior constitui os postos 1 a 7 e para o limite superior os postos de 114 a 120 (~ 10% dos extremos da distribuição).

Dessa forma, pode-se assumir com 90% de certeza de que os verdadeiros limites de referência para o cortisol basal sérico na população de estudo são:

- IC 90% (1,44-3,69  $\mu\text{g/dL}$ ) para o percentil 2,5;
- IC 90% (16,3-26,3  $\mu\text{g/dL}$ ) para o percentil 97,5.

Pode-se observar, com relação ao valor de referência preconizado, contudo, que o limite superior de 22,7  $\mu\text{g/dL}$  encontra-se apropriado (entre 16,3-26,3  $\mu\text{g/dL}$ ), mas que o inferior de 4,46  $\mu\text{g/dL}$  está fora do intervalo de confiança construído, 1,44-3,69  $\mu\text{g/dL}$ .

Dessa forma, pode-se pensar que mais de 5% dos resultados normais serão considerados como alterados, mantendo-se a referência padronizada no serviço de medicina laboratorial. Entende-se, portanto, que esta parece não se constituir uma referência para a população pediátrica em estudo. Se testes dentro da normalidade serão considerados alterados, há perda da especificidade da avaliação.

A medida do cortisol basal sérico é utilizada na clínica pediátrica de referência para avaliações diversas do eixo HHA. Dessa forma, sugere-se que resultados abaixo do intervalo de referência para o cortisol basal podem ser encarados como decisivos para a tomada de conduta, em condições basais.



A amostra do presente estudo é formada por indivíduos referência, por isso, os valores encontrados para a população podem ser utilizados para outras crianças e adolescentes, em investigação no serviço laboratorial de referência.

Dessa forma, sugere-se que os resultados para o cortisol basal sérico (de indivíduos na faixa etária de 4-19 anos, colhidos entre 8:00 e 9:00, mediante jejum de 12 horas) podem ser avaliados da seguinte maneira, no serviço de medicina laboratorial de referência, com 90% de segurança:

- entre 1,44 e 3,69  $\mu\text{g/dL}$  podem ser considerados alterados;
- valores abaixo de 1,44  $\mu\text{g/dL}$  devem ser considerados alterados.

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo cumpriu com os objetivos iniciais propostos.

Na presente casuística, a medida do cortisol sérico aumenta com a idade e com o grau de maturação sexual.

Os maiores valores de cortisol encontrados são de adolescentes de 16-19 anos com maturação sexual completa e de lactentes.

Os lactentes apresentam grande variabilidade de valores de cortisol. Após os 3 anos de idade, o cortisol sérico dos indivíduos possui correlação positiva com a idade.

A medida do cortisol basal sérico não variou com o gênero.

O intervalo de referência apresentado para o cortisol sérico de 2,97-23,4  $\mu\text{g/dL}$  é considerado mais apropriado para a população pediátrica em comparação ao intervalo de referência utilizado até o presente momento, no serviço de medicina laboratorial de referência.

Como complemento deste estudo, sugere-se um aumento da amostra para uma análise mais detalhada de partição em subgrupos, baseada no gênero e em grupos etários.

## REFERÊNCIAS

1. Blasutig IM, Jung B, Kulasingam V, Baradaran S, Chen Y, Chan MK, et al. Analytical evaluation of the VITROS 5600 Integrated System in pediatric setting and determination of pediatric reference intervals. *Clin Biochem*. 2010 Sep;43(13-14):1039-44.
2. Ghoshal AK, Soldin SJ. Evaluation of the Dade Behring Dimension RxL: integrated chemistry system-pediatric reference ranges. *Clin Chim Acta*. 2003 May;331(1-2):135-46.
3. Kohse KP, Thamm M. KiGGS the German survey on children's health as data base for reference intervals. *Clin Biochem*. 2011 May;44(7):479.
4. Kulasingam V, Jung BP, Blaustig IM, Baradaran S, Chan MK, Aytekin M, et al. Pediatric reference intervals for 28 chemistries and immunoassays on the Roche cobas 6000 analyzer: a CALIPER pilot study. *Clin Biochem*. 2010 Sep;43(13-14):1045-50.
5. Lang T. Reference intervals: the GB data. *Clin Biochem*. 2011 May;44(7):477-8.
6. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti, F, Garg U, Horn P, et al. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline third edition. Clinical Laboratory and Standards Institute. 2008;28(30):1-59.
7. Goldschmidt HM. The NEXUS vision: an alternative to the reference value concept. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):868-73.
8. Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way? *Am J Clin Pathol*. 2010 Feb;133(2):180-6.
9. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011 Feb;32(1):81-151.
10. Miller WL. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Endocr Dev*. 2011;20:1-19.
11. Gilep AA, Sushko TA, Usanov SA. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: the role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1814(1):200-9.
12. Stewart PM. The adrenal cortex. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 446-460.
13. Flück CE, Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*. 2008;13:1-18.
14. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1991 Dec;20(4):697-720.
15. Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ. Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar;316(1):24-34.
16. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev*. 1989 Aug;10(3):232-74.

17. Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, et al. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*. 2010 Feb;151(2):649-59.
18. Sorensen MV, Praetorius HA, Nykjaer A, Willnow T, Leipziger J. Impaired aldosterone responsiveness in corticosteroid binding globulin deficient mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Jan; 201(1):169-77.
19. Torpy DJ, Lundgren BA, Ho JT, Lewis JG, Scott HS, Mericq V. CBG Santiago: a novel CBG mutation. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2012 Jan; 97(1):E151-5.
20. Oppl B, Kofler A, Schwarz S, Rainer J, Kofler R. Establishing a sensitive and specific assay for determination of glucocorticoid bioactivity. *Wien Klin Wochenschr*. 2011 Apr; 123(7-8):222-9.
21. Nader N, Raverot G, Emptoz-Bonneton A, Déchaud H, Bonnay M, Baudin E, et al. Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jun;91(6):2165-70.
22. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR. Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med*. 1998 Mar;26(3):452-60.
23. Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 2001 Apr;142(4):1371-6.
24. Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol*. 2011 Aug;31(3):256-86.
25. Chapman KE, Seckl JR. 11 $\beta$ -HSD1, inflammation, metabolic disease and age-related cognitive (dys)function. *Neurochem Res*. 2008 Apr;33(4):624-36.
26. Fietta P, Fietta P, Delsante G. Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Oct;63(5):613-22.
27. Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt IC, Lucassen PJ, de Lange EC, de Boer AG, et al. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology*. 2001 Jun;142(6):2686-94.
28. Reynolds RM. Corticosteroid-mediated programming and the pathogenesis of obesity and diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Oct;122(1-3):3-9.
29. Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann NY Acad Sci*. 2009 Oct;1179:167-78.
30. Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Dec;102(52):19204-7.
31. Dorey R, Piérard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Béracochéa D. Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropharmacology*. 2011 Dec;36(13):2639-49.

32. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulation the function, foldind and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1993 Oct;268(29):21455-8.
33. Cohen J, Venkatesh B. Assessment of tissue cortisol activity. *Crit Care Resusc*. 2009 Dec;11(4):278-9.
34. Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Oct;(10):525-33.
35. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev*. 2011 Apr;10(6):305-10.
36. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*. 2011 Feb;286(5):3177-84.
37. de Lange P, Segeren CM, Koper JW, Wiemer E, Sonneveld P, et al. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res*. 2001 May;61(10):3937-41.
38. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001 Sep;(3):695-728.
39. Aguilera G, Liu Y. The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol*. 2011 Aug:1-18.
40. Turnbull AV, Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 May;215(1):1-10.
41. Lamberts SW, Verleun T, Oosterom R, de Jong F, Hackeng WH. Corticotrophin-releasing factor (ovine) and vasopressin exert a synergic effect on adrenocorticotropin release in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984 Feb;58(2):298-303.
42. Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke IJ. Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. I. Effects of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinology*. 1989 Apr;49(4):367-81.
43. Chrousos GP, Kino T, Charmandari E. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in childhood and adolescence. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16(5):272-83.
44. Cole SW. Elevating the perspective on human stress genomics. *Psychoneuroendocrinology*. 2010 Aug;35(7):955-62.
45. Glover V, O' Connor TG, O' Donnell K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Sep;35(1):17-22.
46. Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol*. 2009 Apr;72(1):67-73.

47. Wolfram M, Bellingrath S, Kudielka BM. The cortisol awakening response (CAR) across the female menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology*. 2011 Jul;36(6):905-12.
48. Wüst S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C. The cortisol awakening response: normal values and confounds. *Noise Health*. 2000;2(7):79-88.
49. Steptoe A, van Jaarsveld CH, Semmler C, Plomin R, Wardle J. Heritability of daytime cortisol levels and cortisol reactivity in children. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Feb;34(2):273-80.
50. Bartels M, de Geus EJ, Kirschbaum C, Sluyter F, Boomsma DI. Heritability of daytime cortisol levels in children. *Behav Genet*. 2003 Jul;33(4):421-33.
51. Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. *Stress*. 2010 Jan;13(1):1-14.
52. Wright RJ. Epidemiology of stress and asthma: from constricting communities and fragile families to epigenetics. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2011 Feb;31(1):19-39.
53. Claessens SE, Daskalakis NP, van der Veen R, Oitzl MS, de Kloet ER, Champagne DL. Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychoneuropharmacology*. (Berl) 2011 Mar;214(1):141:54.
54. Schmidt MV. Molecular mechanisms of early life stress: lessons from mouse models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 May;34(6):845-52.
55. Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2005 Nov;30(10):939-46.
56. Cao Y, Rao SD, Phillips TM, Umbach DM, Bernbaum JC, Archer JI, Rogan WJ. Are breast-fed infants more resilient? Feeding method and cortisol in infants. *J Pediatr*. 2009 Mar;154(3):452-4.
57. Pawluski JL, Brain UM, Underhill CM, Hammond GL, Oberlander TF. Prenatal SSRI exposure alters neonatal corticosteroid binding globulin, infant cortisol levels and emerging HPA function. *Psychoneuroendocrinology* 2011 Dec.
58. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*. 2008 Mar-Apr;3(2):97-106.
59. Cermakian N, Boivin DB. The regulation of central and peripheral circadian clocks in humans. *Obes Rev*. 2009 Nov; 10(2):25-36.
60. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1812(5):581-91.
61. Kiess W, Meidert A, Dressendörfer RA, Schriever K, Kessler U, König A, et al. Salivary cortisol levels throughout childhood and adolescence: relation with age, pubertal stage and weight. *Pediatr Res*. 1995 Apr;37(4 Pt 1):502-6.

62. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996 Feb;44(2):157-61.
63. Silva ML, Mallozi MC, Ferrari GF. Salivary cortisol to assess the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in healthy children under 3 years old. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Mar-Apr;83(2):121-6.
64. de Weerth C, Zijl RH, Buitelaar JK. Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Hum Dev*. 2003 Aug;73(1-2):39-52.
65. Dickerson SS, Kemeny ME. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integrative and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull*. 2004 May;130(3):355-91.
66. Gunnar MR, Talge NM, Herrera A. Stressor paradigms in developmental studies: what does and does not work to produce mean increases in salivary cortisol. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Aug;34(7):953-67.
67. Kudielka BM, Hellhammer DH, Wüst S. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Jan;34(1):2-18.
68. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Roelfsema F, Aoun P, Takahashi P, Miles JM, et al. Tripartite Control of dynamic ACTH-cortisol dose responsiveness by age, body mass index and gender in 111 healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Sep;96(9):2874-81.
69. Kudielka BM, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer DH, Kirschbaum C. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: impact of age and gender. *Psychoneuroendocrinology*. 2004 Jan;29(1):83-98.
70. Paton LT, de Villiers LS, Geldenhuys FG, Bieler EU, Hoog JM. Trends in steroid analysis. *S Afr Med J*. 1972 Feb;46(8):177-82.
71. Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Aug;121(3-5):481-90.
72. Deutschbein T, Broecker-Preuss M, Hartmann MF, Althoff R, Wudy SA, Mann K, Petersenn S. Measurement of urinary free cortisol by current immunoassays: need for sex-dependent reference ranges to define hypercortisolism. *Horm Metab Res*. 2011 Sep;43(10):714-9.
73. Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML, Kohrt WM. Salivary cortisol determined by enzyme immunoassays is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Sep;63(3):336-41.
74. Meeran K, Hattersley A, Mould G, Bloom SR. Venepuncture causes rapid rise in plasma ACTH. *BR J Clin Pract*. 1993 Sep-Oct;47(5):246-7.
75. Kiess W, Pfaeffle R. Steroid analysis in saliva: a noninvasive tool for pediatric research and clinical practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Mar-Apr;83(2):97-9.
76. Jessop DS, Turner-Cobb JM. Measurement and meaning of salivary cortisol: a focus on health and disease in children. *Stress*. 2008;11(1):1-14.

77. Heckmann M, Wudy SA, Haack D, Pohlandt F. Reference range for serum cortisol in well preterms infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1999 Nov;81(3):F171-4.
78. Soldin SJ, Murthy JN, Agarwalla PK, Ojeifo O, Chea J. Pediatric reference ranges for creatine kinase, CKMB, Troponin I, iron and cortisol. *Clin Biochem.* 1999 Feb;32(1):77-80.
79. de Weerth C, van Geert P. A longitudinal study of basal cortisol in infants: intra-individual variability, circadian rhythm and developmental trends. *Infant Behav Dev.* 2002 Apr;25:375-398.
80. Gunnar MR, Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology.* 2002 Jan-Feb;27(1-2):199-220.
81. Watamura SE, Donzella B, Kertes DA, Gunnar MR. Developmental changes in baseline cortisol activity in early childhood: relations with napping and effortful control. *Dev Psychobiol.* 2004 Nov;45(3):125-33.
82. Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, Cassorla F. Cortisol production rate in childhood and adolescence. *J Pediatr.* 1990 Dec;117(6):892-6.
83. Jonetz-Mentzel L, Wiedemann G. Establishment of reference ranges for cortisol in neonates, infants, children and adolescents. *Eur J Clin Chem Biochem.* 1993 Aug;31(8):525-9.
84. Ceglarek U, Werner M, Kortz L, Körner A, Kiess W, Thiery J, et al. Preclinical challenges in steroid analysis of human samples. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Aug;121(3-5):505-12.
85. Törnåge CJ. Reference values for morning salivary cortisol concentrations in healthy school-aged children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002 Feb;15(2):197-204.
86. Törnåge CJ. Salivary cortisol for assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Neuroimmunomodulation.* 2009 Jun;16(5):284-9.
87. Gröschl M, Rauh M, Dörr HG. Circadian rhythm of salivary cortisol, 17alpha-hydroxyprogesterone and progesterone in healthy children. *Clin Chem.* 2003 Oct;49(10):1688-91.
88. Koupil I, Mann V, Leon DA, Lundberg U, Byberg L, Vågerö D. Morning cortisol does not mediate the association of size at birth with blood pressure in children born from full-term pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Jun;62(6):661-6.
89. Soldin OP, Hoffman EG, Waring MA, Soldin SJ. Pediatric reference intervals for FSH, LH, estradiol, T3, free T3, cortisol, and growth hormone on the DPC IMMULITE 1000. *Clin Chim Acta.* 2005 May;355(1-2):205-10.
90. Stroud LR, Papandonatos GD, Williamson DE, Dahl RE. Sex differences in cortisol response to corticotropin releasing hormone challenge over puberty. *Pittsburgh Pediatric Neurobehavioral Studies. Psychoneuroendocrinology.* 2011 Sep;36(8):1226-38.
91. Törnåge CJ, Alfvén G. Diurnal salivary cortisol concentration in school-aged children: increased morning cortisol concentration and total cortisol concentration negatively correlated to body mass index children with recurrent abdominal pain of psychosomatic origin. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006 Jun;19(6):843-54.



92. Netherton C, Goodyer I, Tamplin A, Herbert J. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology*. 2004 Feb;29(2):125-40.
93. Hardie TL, Moss HB, Vanyukov MM, Yao JK, Kirillovac GP. Does adverse family environment or sex matter in the salivary cortisol responses to anticipatory stress? *Psychiatry Res*. 2002 Oct;112(2):121-31.
94. Young EA, Altemus M. Puberty, ovarian steroids, and stress. *Ann NY Acad Sci*. 2004 Jun;1021:124-33.
95. Matchock RL, Dorn LD, Susman EJ. Diurnal and seasonal cortisol, testosterone and DHEA rhythms in boys and girls during puberty. *Chronobiol Int*. 2007;24(5):969-90.
96. Wiegratz I, Jung-Hoffmann C, Kuhl H. Effect of two oral contraceptives containing ethinylestradiol and gestodene or norgestimate upon androgen parameters and serum binding proteins. *Contraception*. 1995 Jun;51(6):341-6.
97. Ågren UM, Anttila M, Mäenpää-Liukko K, Rantala ML, Rautiainen H, Sommer WF, et al. Effects of a monophasic combined oral contraceptive containing nomegestrol acetate and 17 $\beta$ -oestradiol in comparison to one containing levonorgestrel and ethinylestradiol on markers of endocrine function. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2011 Dec;16(6):458-67.
98. Bouma EM, Risese H, Ormel J, Verhulst FC, Oldehinkel AJ. Adolescents' cortisol responses to awakening and social stress; effects of gender, menstrual phase and oral contraceptives. The TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Jul;34(6):884-93.
99. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*. 1950 Jun;1(4667):1383-92.
100. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992 Mar;267(9):1244-52.
101. Raposinho PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Dec;185(1-2):195-204.
102. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 2002 Oct;53(4):865-71.
103. Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, et al. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*. 2011 Jul;31(29):10506-15.
104. Wong ML, Licinio J, Pasternak KI, Gold PW. Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Endocrinology*. 1994 Nov;135(5):2275-8.
105. Russell GM, Henley DE, Leendertz J, Douthwaite JA, Wood SA, Stevens A, et al. Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci*. 2010 Apr;30(17):6106-15.

106. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar;350(2):299-309.
107. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995 May;332(20):1351-62.
108. Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Lightman SL, Ingram CD, Harbuz MS. Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol*. 2001 Oct;(10):905-11.
109. Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Aug;48(8):693-9.
110. Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A. PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress*. 2011 Jul;14(4):368-75.
111. Markovic VM, Cupic Z, Vukojevic V, Kolar-Anic L. Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response to acute and chronic stress. *Endocr J*. 2011 Oct;58(10):889-904.
112. Riemann D, Kloepfer C, Berger M. Functional and structural brain alterations in insomnia: implications for pathophysiology. *Eur J Neurosci*. 2009 May(9):1754-60.
113. Aldabal L, Bahammam AS. Metabolic, endocrine, and immune consequences of sleep deprivation. *Open Respir Med J*. 2011 Jun;5:31-43.
114. Coleman LS. A stress repair mechanism that maintains vertebrate structure during stress. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2010 Jun;10(2):111-37.
115. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*. 2011 Aug;476(7361):458-61.
116. Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Res*. 2005 May; 4(2):141-94.
117. Lopez-Duran NL, Kovacs M, George CJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Oct;34(9):1272-83.
118. Beaton EA, Simon TJ. How might stress contribute to increase risk for schizophrenia in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome? *J Neurodev Disord*. 2011 Mar;(1):68-75.
119. Zhang L, Li H, Hu X, Li XX, Smerin S, Ursano R. Glucocorticoid-induced p11 overexpression and chromatin remodeling: a novel molecular mechanism of traumatic stress? *Med Hypotheses*. 2011 Jun;76(6):774-7.
120. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):873-904.

121. Pasquali R, Cantobelli S, Casimirri F, Capelli M, Bortoluzzi L, Flaminia R, Labate AM, Barbara L. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns of body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Aug;77(2):341-6.
122. Alvarez-Castro P, Sangiao-Alvarellos S, Brandón-Sandá I, Cordido F. Endocrine function in obesity. *Endocrinol Nutr.* 2011 Oct;58(8):422-32.
123. Hill EE, Eisenmann JC, Gentile D, Holmes ME, Walsh D. The association between morning cortisol and adiposity in children varies by weight status. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(9-10):709-13.
124. Reynolds RM, Ilyas B, Price JF, Fowkes FG, Newby DE, Webb DJ, Walker BR. Circulating plasma cortisol concentrations are not associated with coronary artery disease or peripheral vascular disease. *QJM* 2009. Jul;102(7):469-75.
125. Reynolds RM, Labad J, Strachan MW, Braun A, Fowkes FG, Lee AJ et al. Elevated fasting plasma cortisol is associated with ischemic heart disease and its risk factors in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;95(4):1602-8.
126. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res.* 2003;59(4):161-79.
127. Harald B, Gordon P. Meta-review of depressive subtyping models. *J Affect Disord.* 2011 Aug;1-15.
128. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:259-84.
129. Shibuya I, Nagamitsu S, Okamura H, Komatsu H, Ozono S, Yamashita Y, et al. Changes in salivary cortisol levels as a prognostic predictor in children with anorexia nervosa. *Int J Psychophysiol.* 2011 Nov;82(2):196-201.
130. Reddy P. Clinical approach to adrenal insufficiency in hospitalised patients. *Int J Clin Pract.* 2011 Oct;65(10):1059-66.
131. Sprung CL, Brezis M, Goodman S, Weiss YG. Corticosteroid therapy for patients in septic shock: some progress in a difficult decision. *Crit Care Med.* 2011 Mar;39(3):571-4.
132. Marik PE. Critical illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest.* 2009 Jan;135(1):181-93.
133. Magnotti M, Shimshi M. Diagnosing adrenal insufficiency: which test is best, the 1 microg or the 250 microg cosyntropin stimulation test? *Endocr Pract.* 2008 Mar;14(2):233-8.
134. Mansoor S, Islam N, Siddiqui I, Jabbar A. Sixty-minute post-Synacthen serum cortisol level: a reliable and cost-effective screening test for excluding adrenal insufficiency compared to the conventional short Synacthen test. *Singapore Med J.* 2007 Jun;48(6):519-23.
135. Toma A, Stone A, Green RS, Gray S. Steroids for patients in septic shock: the results of the CORTICUS trial. *CJEM.* 2011 Jul;13(4):273-6.

136. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Dec;174(12):1319-26.
137. Kozyra EF, Wax RS, Burry LD. Can 1 microg of cosyntropin be used to evaluate adrenal insufficiency in critically ill patients? *Ann Pharmacother* 2005. Apr;39(4):691-8.
138. Cemeroglu AP, Kleis L, Postellon DC, Wood MA. Comparison of low-dose and high dose cosyntropin stimulation testing in children. *Pediatr Int*. 2011 Apr;53(2):175-80.
139. Sarthi M, Lodha R, Vivekanandhan S, Arora NK. Adrenal status in children with septic shock using low-dose stimulation test. *Pediatr Crit Care Med*. 2007 Jan;8(1):23-8.
140. Loisa P, Uusaro A, Ruokonen E. A single adrenocorticotrophic hormone stimulation test does not reveal adrenal insufficiency in septic shock. *Anesth Analg*. 2005 Dec;101(6):1792-8.
141. Juutilainen A, Hämäläinen S, Niemenpää J, Kuittinen T, Pulkki K, Koivula I, et al. Serum cortisol and inflammatory response in neutropenic fever. *Ann Hematol*. 2011 Dec;90(12):1467-75.
142. Kisson N. Yes, SIRS: I think we have come full circle. *Crit Care med* 2011 May;39(5):1232-3.
143. Kadiyala R, Kamath C, Baglioni P, Geen J, Okosieme OE. Can a random serum cortisol reduce the need for short synacthen tests in acute medical admissions? *Ann Clin Biochem*. 2010 Jul;47(Pt 4):378-80.
144. Orth DN. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr Rev*. 1992 May;13(2):164-91.
145. Schmidt IL, Lahner H, Mann K, Petersenn S. Diagnosis of adrenal insufficiency: evaluation of the corticotropin-releasing hormone test and basal serum cortisol in comparison to insulin tolerance test in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Sep;88(9):4193-8.
146. Venkatesh B, Cohen J. Adrenocortical (dys)function in septic shock – a sick euadrenal state. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Oct;25(5):719-33.
147. Molenaar N, Johan Groeneveld AB, Dijkstra HM, de Jong MF, Girbes AR, Heijboer AC, Beishuizen A. Assessing adrenal insufficiency of corticosteroid secretion using free versus total cortisol levels in critical illness. *Intensive Care Med* 2011 Dec;37(12):1986-93.
148. Marik PE. The diagnosis of adrenal insufficiency in critically ill patient: does it really matter? *Crit Care*. 2006;10(6):176.
149. Zimmerman JJ, Barker RM, Jack R. Initial observations regarding free cortisol quantification logistics among critically ill children. *Intensive Care Med*. 2010 Nov;36(11):1914-22.
150. Venkataraman S, Munoz R, Candido C, Witchel SF. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Dec;8(4):365-73.

151. Hebbar KB, Stockwell JA, Leong T, Fortenberry JD. Incidence of adrenal insufficiency and impact of corticosteroid supplementation in critically ill children with systemic inflammatory syndrome and vasopressor-dependent shock. *Crit Care Med*. 2011 May;39(5):1145-50.
152. van Raalte DH, Brands M, van der Zijl NJ, Muskiet MH, Pouwels PJ, Ackermans MT, et al. Low-dose glucocorticoid treatment affects multiple aspects of intermediary metabolism in healthy humans: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2011 Aug;54(8):2103-12.
153. Shulman DI, Palmert MR, Kemp SF; Lawson Wilkins Drug and Therapeutics Committee. Adrenal insufficiency: still a cause of morbidity and death in childhood. *Pediatrics*. 2007 Feb;119(2):e484-94.
154. Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest*. 2008 Aug;134(2):394-401.
155. Pugnet G, Sailler L, Astudillo L, Vernet J, Bennet A, Arlet P. Frequency and risk factors of biological adrenal insufficiency screened by the 250 microg Synacthene stimulation test after a prolonged course of systemic glucocorticoid therapy. A study of 100 patients. *Artigo em francês. Rev Med Interne*. 2010 May;31(5):332-6.
156. Ahmet A, Kim H, Spier S. Adrenal suppression: A practical guide to the screening and management of this under-recognized complication of inhaled corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011 Aug;7:13.
157. Satre TJ, Kovach F. Clinical inquiries. What's the most practical way to rule out adrenal insufficiency? *J Fam Pract*. 2009 May;58(5):281a-b.
158. Vestergaard TR, Juul A, Lausten-Thomsen U, Lausen B, Hjalgrim H, Kvist TK, et al. Duration of adrenal insufficiency during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011 Aug;33(6):442-9.
159. Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, Abdu TA, Ambrosi B, Atkinson AB, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Nov;93(11):4245-53.
160. Sociedade Brasileira de Cardiologia-SBC; Sociedade Brasileira de Hipertensão-SBH; Sociedade Brasileira de Nefrologia-SBN. V Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension. Artigo em português. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Sep;89(3):e24-79.
161. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
162. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
163. Organização mundial de saúde [acesso em 5 fev 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/childgrowth/standards>.
164. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jimenez CV, et al. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra and inter-individual biologic variation. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491-500. Atualizado em 2012. [acesso em 5 fev 2012] Disponível em: <http://www.westgard.com.biodatabase1.htm>.

165. Shirtcliff EA, Allison AL, Armstrong JM, Slattery MJ, Kalin NH, Essex MJ. Longitudinal stability and developmental properties of salivary cortisol levels and circadian rhythms from childhood to adolescence. *Dev Psychobiol*. 2011 Sep. No prelo.
166. Platje E, Vermeiren RRJM, Doreleijers THAH, Meeus W, Koot HM, van Lier PAC, et al. P.1.f.005 The cortisol awakening response during adolescence. *European Neuropsychopharmacology*. 2011 Sep;21(3):328-329.
167. Romeo RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Apr;31(2):232-40.
168. Veldhuis JD, Keenan DM, Roelfsema F, Iranmanesh A. Aging-related adaptations in the corticotropic axis: modulation by gender. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2005 Dec;34(4):993-1014.
169. Oskis A, Loveday C, Hucklebridge F, Thorn L, Clow A. Diurnal patterns of salivary cortisol across the adolescence period in healthy females. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Apr;34(3):307-16.
170. Gunnar MR, Wewerka S, Frenn K, Long JD, Griggs C. Developmental changes in hypothalamus-pituitary-adrenal activity over the transition to adolescence: normative changes and associations with puberty. *Dev Psychopathol*. 2009 Winter;21(1):69-85.
171. Essau CA, Lewinsohn PM, Seeley JR, Sasagawa S. Gender differences in the developmental course of depression. *J Affect Disord*. 2010 Dec;127(1-3):185-90.
172. Weiser MJ, Foradori CD, Handa RJ. Estrogen receptor beta activation prevents glucocorticoid receptor-dependent effects of the central nucleus of the amygdala on behavior and neuroendocrine function. *Brain Res*. 2010 Jun;1336:78-88.
173. Isgor C, Cecchi M, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Estrogen receptor beta in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the neuroendocrine response to stress and is regulated the neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience*. 2003;121(4):837-45.
174. Carvalho-Netto EF, Myers B, Jones K, Solomon MB, Herman JP. Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress. *Physiol Behav*. 2011 Aug; 104(2):242-7.
175. Veldhuis JD, Keenan DM, Roelfsema F, Iranmanesh A. Aging-related adaptations in the corticotropic axis: modulation by gender. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2005 Dec;34(4):993-1014.
176. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta*. 2003 Aug;334(1-2):5-23.
177. Lahti A. Partitioning biochemical reference data into subgroups: comparison of existing methods. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):725-33.
178. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem*. 1990 Feb;36(2):265-70.
179. Horn PS, Feng L, Li Y, Pesce AJ. Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. *Clin Chem*. 2001 Dec;47(12):2137-45.

## ANEXOS E APÊNDICES

**Anexo A** - Documento de aprovação do projeto intitulado “Perfil metabólico em crianças e adolescentes com deficiência da enzima 21-hidroxilase e possíveis implicações clínicas” pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 302/08**

**Interessado(a): Profa. Ivani Novato Silva**  
**Departamento de Pediatria**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de setembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Perfil metabólico em crianças e adolescentes com deficiência da enzima 21-Hidroxilase e possíveis implicações clínicas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

**Anexo B** - Documento de aprovação do projeto intitulado “Estudo da Função do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal através do nível sérico de cortisol basal em crianças com asma ou síndromes sibilantes tratadas com beclometasona” pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG).

  
UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


**Parecer nº. ETIC 185/03**

**Interessada: Profa. Dra. Maria Jussara Fernandes Fontes**  
**Departamento de Pediatria**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP após cumprimento das solicitações da diligência, aprovou no dia 02 de abril de 2004 o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo da Função do Eixo Hipofisário-Adrenal Através do Nível Sérico de Cortisol Basal em Crianças com Asma ou Síndrome Sibilantes Tratadas com Beclometasona.** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto, com a recomendação de que seja anexado no TCLE o telefone do COEP/UFMG.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**



## Apêndice A – Banco de dados completo grupo A

Marcação em vermelho: valores atípicos

Marcação em amarelo: indivíduos em uso de ACO

Nome (iniciais)	Cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ )	Sexo	Idade (anos)	Estágio puberal
AAMB	7,23	M	12	2
ACAN	6,85	M	11	1
ACAS	7,84	F	14	3
ACRS	3,1	F	6	1
AFBS	3,95	F	12	4
AGC	6,4	M	11	2
AHSM	4,25	M	12	3
AJA	10,1	F	15	4
ALCS	9,45	F	9	2
ALPS	4,57	F	12	4
AMAMR	4,89	F	11	2
AVSN	7,23	M	16	5
BCCS	8,52	F	12	5
BCRS	2,96	M	15	4
BPO	4,76	F	15	4
BPR	9,65	M	14	4
BRSM	12,7	F	14	4
CCFS	18,5	F	8	1
CDF	8,06	M	17	4
CGLN	12,3	M	16	5
CGS	11	M	15	4
CLPL	6,39	F	12	4
CMS	7,01	F	12	3
CNS	13	M	19	5
CPM	5,67	F	17	5
CVAS	12,6	M	11	1
DBB	5,92	M	12	3
DBOA	4,82	M	9	1
DCSP	5,02	M	12	1
DGSM	6,13	F	13	4
DJSS	6,79	M	15	5
DMCP	7,03	M	12	3
EAF	12	M	18	5
ECFS	8,3	F	13	4
ECR	5,49	F	11	2
EKBS	10,8	F	15	5
ESD	4,01	F	11	3
ESO	11,6	M	12	2
FALF	2,97	F	9	2

FGPS	5,8	F	12	4
FHFB	6,58	F	7	1
FHSS	12,9	M	18	5
FMRP	10,6	F	8	1
GAA	7,73	F	12	4
GBS	14,4	F	8	1
GESM	11,8	M	10	1
GHLF	6,85	M	12	3
GLG	9,82	F	17	5
GVFF	10,5	M	18	5
ICSA	13,7	F	12	3
IDMP	6,24	M	13	2
ILJF	5,99	M	11	2
ILOC	13,3	M	10	2
ILS	5,46	F	6	1
IMRV	12	F	16	5
IRVR	10,1	M	11	1
JCLF	6,78	M	14	5
JCPC	7,31	F	14	4
JHDG	4,62	M	11	1
JHFA	9,47	M	9	1
JHJ	9,09	M	15	4
JKFB	11	F	11	3
JLMC	7,25	M	4	1
JMPC	3,75	F	12	4
JMSCL	5,94	F	7	1
JPBG	12,4	F	12	4
JPMC	8,88	M	8	1
KLSG	9,41	F	12	3
KRFT	5,58	F	15	4
LAAA	9,84	F	9	1
LAPC	17	F	11	3
LATS	7,29	F	11	2
LBOA	12,6	F	16	4
LBS	11,7	F	13	3
LCES	12,2	F	16	5
LESR	8,92	F	11	5
LFL	4,98	F	14	5
LGB	4,64	F	11	3
LGMB	8,4	M	19	5
LLMB	6,61	F	12	4
LMC	6,16	F	13	3
LOM	23,4	F	16	5
LPMX	9,54	F	10	2
LSL	3,69	F	7	1
LSMB	9,35	M	16	5
LSN	4,96	F	11	2
MALO	1,44	M	14	4

MAS	15,2	M	15	3
MEFA	5,21	F	11	2
MGAR	5,49	F	6	1
MLFT	5,61	F	13	4
MSNP	6,01	F	11	4
PBS	24,6	F	17	5
PDFB	6,74	F	12	2
PGO	12,1	F	17	5
PLB	6,97	M	11	2
PSCS	11,2	F	14	4
RAAO	7,92	M	14	3
RAP	8,55	F	13	4
RCA	5,96	F	10	3
RDR	11,5	F	12	4
RTCS	16,3	F	11	2
RTFT	7,43	M	17	4
SCCS	3,52	F	12	3
SCFS	5,75	F	11	4
SGBF	3,54	F	9	1
SHMCP	13	M	14	4
SKFS	26,3	F	15	4
TISD	16,2	F	16	5
TMSD	11,9	M	10	1
TOAL	5,29	M	11	3
TSM	7,3	F	18	5
VAA	5,09	M	7	1
VCRS	5,84	F	12	4
WCA	13,3	M	14	4
WHSC	16,3	M	13	3
WJCS	6,91	M	14	3
WSAR	8,93	M	16	4
YSL	3,7	M	8	1
YVAT	4,29	M	13	2

**Apêndice B – Banco de dados grupo A (valores de cortisol em ordem crescente)**

Posto	Cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ )
1	1,44
2	2,96
3	2,97
4	3,1
5	3,52
6	3,54
7	3,69
8	3,7
9	3,75
10	3,95
11	4,01
12	4,25
13	4,29
14	4,57
15	4,62
16	4,64
17	4,76
18	4,82
19	4,89
20	4,96
21	4,98
22	5,02
23	5,09
24	5,21
25	5,29
26	5,46
27	5,49
28	5,49
29	5,58
30	5,61
31	5,67
32	5,75
33	5,8
34	5,84
35	5,92
36	5,94
37	5,96
38	5,99
39	6,01
40	6,13
41	6,16
42	6,24
43	6,39

44	6,4
45	6,58
46	6,61
47	6,74
48	6,78
49	6,79
50	6,85
51	6,85
52	6,91
53	6,97
53	7,01
55	7,03
56	7,23
57	7,23
58	7,25
59	7,29
60	7,3
61	7,31
62	7,43
63	7,73
64	7,84
65	7,92
66	8,06
67	8,3
68	8,4
69	8,52
70	8,55
71	8,88
72	8,92
73	8,93
74	9,09
75	9,35
76	9,41
77	9,45
78	9,47
79	9,54
80	9,65
81	9,82
82	9,84
83	10,1
84	10,1
85	10,5
86	10,6
87	10,8
88	11
89	11
90	11,2
91	11,5

92	11,6
93	11,7
94	11,8
95	11,9
96	12
97	12
98	12,1
99	12,2
100	12,3
101	12,4
102	12,6
103	12,6
104	12,7
105	12,9
106	13
107	13
108	13,3
109	13,3
110	13,7
111	14,4
112	15,2
113	16,2
114	16,3
115	16,3
116	17
117	18,5
118	23,4
119	24,6
120	26,3