

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**O USO DO CORTISOL SALIVAR NO TESTE DA DESMOPRESSINA
NA DOENÇA DE CUSHING E NA OBESIDADE**

Ricardo Mundim Firme

Belo Horizonte - Minas Gerais
2017

Ricardo Mundim Firme

**O USO DO CORTISOL SALIVAR NO TESTE DA DESMOPRESSINA
NA DOENÇA DE CUSHING E NA OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ciências Clínicas.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia, diagnóstico, fisiopatologia e tratamento das endocrinopatias.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Junior.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – Minas Gerais

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Firme, Ricardo

O USO DO CORTISOL SALIVAR NO TESTE DA
DESMOPRESSINA NA DOENÇA DE CUSHING E NA
OBESIDADE [manuscrito] / Ricardo Firme. - 2017.

52 f.

Orientador: Antônio Ribeiro de Oliveira Junior Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Medicina.

1.Síndrome de Cushing. 2.Doença de Cushing. 3.Teste da
desmopressina. 4.Cortisol Salivar. I.Junior, Antônio Ribeiro de
Oliveira Junior. II.Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Medicina. III.Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de pós-graduação: Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa: Ado Jório de Vasconcelos

Faculdade de Medicina

Diretor: Tarcizo Afonso Nunes

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Valeria Maria Augusto

Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto

Coordenadora: Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora: Suely Meireles Rezende

Colegiado

Sarah Teixeira Camargos

Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Gilda Aparecida Ferreira

Eduardo Garcia Vilela

Paulo Caranelli

Suely Meireles Rezende

Mônica Maria Teixeira (discente)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por minha vida.

Ao Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, orientador, por sua disponibilidade e paciência com o novo cientista.

À Dr^a. Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz, por todo apoio e disponibilidade.

A Geraldinho e Dra. Luisane Vieira, amigos do laboratório Geraldo Lustosa, pela disponibilidade, apoio e alegria nos momentos árdusos da pesquisa.

A meus pais, que apesar de curto convívio me inspiraram a viver e a perseverar sempre no bem e no bom apesar das adversidades.

A Flavia Barbosa, pelo incondicional apoio e amizade.

A todos os pacientes, que nos ensinam diariamente, com suas doenças físicas e espirituais, a superar nossos limites.

RESUMO

A doença de Cushing continua sendo, ainda nos dias atuais, importante desafio diagnóstico e terapêutico, além de implicar altíssima morbimortalidade. A obesidade primária, uma epidemia mundial, está cada vez mais presente nesse árduo diagnóstico diferencial. O teste da desmopressina clássico, com medidas do cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) séricos após administração venosa de 10 mcg de desmopressina, tem mostrado ótima acurácia no contexto da exclusão da síndrome de Cushing em pacientes portadores de hipercortisolismo não tumoral. Isso ocorre com qualidade igual ou superior ao teste do corticotrofina (CRH) sintética. Foi adicionado o cortisol salivar ao teste clássico, ao qual foram submetidos 19 indivíduos de ambulatórios específicos da Escola de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo 11 pacientes com doença de Cushing em atividade (grupo A) e oito portadores de obesidade moderada a grave (IMC > 35 kg/m² – grupo B). Todos os pacientes do primeiro grupo foram submetidos a critérios atuais de atividade do hipercortisolismo e os obesos tiveram excluída essa alteração laboratorial inicialmente. Os grupos mostraram-se homogêneos clinicamente, mas com importante diferença nos parâmetros descritivos e nos testes estatísticos. Observaram-se significativas diferenças nas análises intragrupo (Anova *two way* análises múltiplas, $p < 0,05$) e intergrupos ($p < 0,01$). Nos portadores de hipercortisolismo ocorreu um aumento do cortisol salivar em relação ao basal (aumentos de 66 a 309%) e uma correlação positiva ($p < 0,05$) entre o cortisol salivar e o cortisol sérico em alguns tempos do teste (45, 60, 120 minutos) no grupo A. O acréscimo do cortisol salivar ao teste dinâmico encontra-se bem indicado no contexto atual da neuroendocrinologia e pode, após análises futuras, adicionar acurácia diagnóstica e mesmo simplificar o teste dinâmico. Deve-se analisar uma população maior, mais diversificada e multicêntrica para se obter dados mais robustos.

Palavras-chave : Síndrome de Cushing. Doença de Cushing. Teste da desmopressina. Cortisol salivar. Obesidade.

ABSTRACT

Cushing's disease is still an important diagnostic and therapeutic challenge, as well as showing very high morbidity and mortality. Primary obesity, a worldwide epidemic, is increasingly present in this arduous differential diagnosis. The classic desmopressin test, with serum cortisol and ACTH measurements after venous administration of 10mcg of desmopressin, has been shown to have excellent accuracy in the context of exclusion of Cushing's syndrome in patients with non-tumoral hypercortisolism; this occurs with a quality equal to or greater than the synthetic corticotrophin (CRH) test. Salivary cortisol was added to the classic test, and 19 individuals from specific outpatient clinics of the UFMG medical school were added to the test: 11 patients with active Cushing's disease (group A) and 08 individuals with moderate to severe obesity (BMI greater than 35kg / m² - group B). All patients in the first group were submitted to current criteria of hypercortisolism activity and obese patients were excluded from this initial laboratory change. The groups were clinically homogeneous, but with an important difference in descriptive parameters and statistical tests. Significant differences were observed in intragroup analyzes (*Anova Two way multiple analyzes, p <0.05*) and intergroup (*p <0.01*); it was observed that in group A an increase of salivary cortisol in relation to basal (increases of 66 to 309%), and a strong positive correlation between salivary cortisol and serum cortisol in some (45, 60, 120 minutes) in Cushing disease group. The addition of salivary cortisol to the dynamic test is well indicated in the current context of neuroendocrinology, may after future analysis add diagnostic accuracy and even simplify the dynamic test. A larger, more diverse and multicentric population should be analyzed and more robust data obtained.

Keywords: Cushing's syndrome. Cushing's disease. Desmopressin test. Salivary Cortisol Obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
ANOVA	Análise de variância
AVP	Vasopressina
AVPR	Receptor da vasopressina
BIPSS	Cateterismo de seios petrosos inferiores
CLU	Cortisol livre urinário
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPD	Cortisol pós-dexametasona
CPDD	Cortisol após altas doses de dexametasona
CRH	Hormônio corticotrófico
CS	Cortisol salivar da meia-noite
CTE	Cirurgia transesfenoidal
DC	Doença de Cushing
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HHAA	Eixo hipotálamo hipófise adrenal aldosterona
IMC	Índice de massa corporal
mcg/dL	Micrograma por decilitro
mg	Miligrama
NEM	Neoplasias endócrinas múltiplas
Ns	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pg/mL	Picograma por mililitro
PSC	Pseudocushing
SC	Síndrome de Cushing
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Figura esquemática do material Salivette®.....	24
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação entre o cortisol salivar dos dois grupos: média e erro-padrão.....	34
Gráfico 2 - Comparação entre o cortisol sérico dos dois grupos: média e erro-padrão.....	35
Gráfico 3 - Comparação entre o ACTH dos dois grupos: erro-padrão e média..	35
Gráfico 4 - Áreas sob a curva do cortisol salivar dos dois grupos.....	36
Gráfico 5 - Áreas sob a curva dos dois grupos.....	36
Gráfico 6 - Áreas sob a curva dos dois grupos.....	37
Gráfico 7 - Representação da correlação entre o cortisol salivar e o cortisol sérico em cada tempo.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Achados clínicos na síndrome de Cushing e ocorrência.....	15
Quadro 2 - Classificação do IMC da OMS (1995).....	19
Quadro 3 - Alocação dos grupos com critérios de inclusão/exclusão.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de pacientes.....	31
Tabela 2 - Caracterização dos indivíduos de ambos os grupos.....	32
Tabela 3 - Dados laboratoriais e medidas de tendência central em cada tempo do teste.....	33
Tabela 4 - Variação do cortisol salivar entre os tempos do teste nos dois grupos.....	38

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A síndrome de Cushing e seu diagnóstico diferencial.....	15
1.2 A doença de Cushing.....	17
1.3 A obesidade.....	19
1.4 A vasopressina e seus análogos.....	20
1.5 O teste da vasopressina.....	22
1.6 O cortisol salivar.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 MÉTODOS.....	26
3.1 Delineamento do estudo.....	26
3.2 Aspectos éticos.. ..	26
3.3 Seleção da amostra.....	26
3.4 Protocolo para o teste da desmopressina.....	27
3.5 Amostras e ensaios laboratoriais.....	29
3.6 Análise estatística dos dados.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Características dos grupos A e B.....	31
4.2 Comparação entre os dois grupos.....	33
4.3 O cortisol salivar nos dois grupos.....	37
4.4 A correlação entre o cortisol salivar, ACTH e o cortisol séricos.....	38
5 DISCUSSÃO.....	41

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com o Manual de Orientação para Defesas de teses e dissertações da UFMG, 2016.

REFERÊNCIAS..... 43

ANEXOS E APÊNDICE..... 47

1 INTRODUÇÃO

1.1 A síndrome de Cushing e seu diagnóstico diferencial

A síndrome de Cushing (SC) refere-se à entidade clínica caracterizada pelo excesso de hormônios glicocorticoides. Pode ser classificada como exógena (uso externo de glicocorticoides tópicos ou sistêmicos) ou endógena (produção excessiva de glicocorticoides por tumores hipofisários ou adrenais ou, mais raramente, por produção ectópica de ACTH). Essa doença é classificada para fins clínicos e diagnósticos em SC ACTH dependente (tumor hipofisário ou produção ectópica de ACTH – 80 a 85% dos casos nos adultos) ou SC ACTH independente (tumores adrenais).

Dependendo da população estudada, a incidência da síndrome varia de 0,7 a 2,4 por milhão¹⁻⁴.

O hipercortisolismo crônico promove um conjunto de sinais e sintomas inespecíficos e na maioria das vezes permanece não diagnosticado por anos até sua identificação (QUADRO 1).

Quadro 1 – Achados clínicos na síndrome de Cushing e ocorrência

Achados	Proporção (%)
Obesidade e ganho de peso	95
Pletora facial	90
Fácies arredondada	90
Libido diminuída	90
Pele adelgada	85
Diminuição de crescimento linear	70-85
Irregularidade menstrual	80
Hipertensão	75
Hirsutismo	75
Depressão/labilidade emocional	70
Fragilidade capilar	65
Intolerância a glicose	60
Fraqueza proximal	60
Osteopenia ou fratura	50
Nefrolitíase	50

Fonte: adaptado de Newell-Price (2006)³.

O hipercortisolismo crônico descontrolado ocasiona importante aumento da morbimortalidade dos pacientes⁵⁻⁷. Além de mortalidade geral aumentada cinco a

seis vezes¹, tem sido descrito importante aumento do risco cardiometabólico (doença coronariana e cerebrovascular, diabetes *mellitus*, obesidade), do risco trombótico e da incidência de novas neoplasias nesses pacientes⁷.

A maioria dessas complicações pode não ser totalmente reversível mesmo após o controle hormonal mantido por muitos anos⁷.

O diagnóstico da SC endógena ocorre em duas etapas, que se inicia após a exclusão do uso exógeno de glicocorticoides: na primeira fase confirma-se o hipercortisolismo endógeno e na segunda tenta-se determinar a etiologia desse excesso hormonal^{1,2,5}.

Na identificação inicial do estado de hipercortisolismo, usam-se como exames de primeira linha: cortisol salivar da meia-noite (CS), cortisol livre urinário em urina de 24h (CLU) e o cortisol sérico dosado às 8h da manhã após 1 mg de dexametasona administrada no dia anterior às 23h (CPD).

O CPD tem sido bastante utilizado na triagem do hipercortisolismo. Essa triagem é considerada positiva para valores acima de 1.8 µg/dL (50 nmol/L) com sensibilidade superior a 95% e especificidade de 80% no contexto de exclusão do hipercortisolismo.

Na segunda fase diagnóstica, tenta-se identificar a fonte da produção excessiva de glicocorticoide. As etiologias são classificadas em ACTH dependente: a hiperprodução por adenoma hipofisário produtor de ACTH (doença de Cushing - DC) e a secreção tumoral ectópica de ACTH; por sua vez, são classificadas como SC ACTH independentes as causas de origem nas glândulas adrenais.

Nessa segunda fase diagnóstica são utilizados principalmente o ACTH sérico, a ressonância nuclear magnética de sela túrcica, o cortisol sérico após administração de altas doses de dexametasona (CPDD) e o cateterismo de seios petrosos inferiores (BIPSS).

Como cerca de 80% dos hipercortisolismo endógenos advêm de um adenoma produtor de ACTH (DC), o cateterismo de seios petrosos tem sido considerado o padrão-ouro no diagnóstico etiológico da síndrome.

Eventualmente podem-se utilizar alguns testes dinâmicos nos casos laboratorialmente duvidosos ou em populações específicas para aumentar a acurácia diagnóstica: teste do CRH, teste da desmopressina, entre outros.

Uma vez que os achados laboratoriais e clínicos não são específicos, para que ocorra o diagnóstico correto é preciso mais de dois exames alterados em mais de duas medidas em ocasiões diferentes da maioria dos testes^{1,2}.

Além disso, outras síndromes e condições clínicas podem dificultar esse diagnóstico laboratorial: a gravidez, obesidade primária, o diabetes *mellitus* descompensado, os distúrbios psiquiátricos moderados a graves, o uso contínuo de medicações (anticoncepcional, anticonvulsivantes e outras com metabolismo hepático), a insuficiência renal crônica, o uso crônico do álcool etílico e a síndrome de apneia obstrutiva do sono.

Além dessas, a síndrome de Cushing pode se apresentar com formas clínicas peculiares que dificultam ainda mais o diagnóstico, tais como: as formas cíclicas, as formas subclínicas da doença e a SC pediátrica.

1.2 A doença de Cushing

A doença de Cushing (DC) é a principal causa de hipercortisolismo endógeno (cerca de 80% em adultos) e de síndrome de Cushing ACTH dependente. Ocorre devido a um adenoma hipofisário produtor de ACTH, que é em sua maioria um microadenoma, definido como tumores menores que 1 cm de diâmetro.

Como componente dessa síndrome têm-se os seus sinais e sintomas inespecíficos do hipercortisolismo crônico, além de possível hipopituitarismo por compressão tumoral e raro efeito de massa relacionado à presença tumoral.

A DC tem prevalência de 40:1.000.000 de pessoas, sendo mais comum em mulheres (9:1) e correspondendo a 10 a 12% de todos os tumores hipofisários funcionais e não funcionais².

Em sua maioria, é encontrada de modo esporádico, mas pode também estar associada a outras síndromes endocrinológicas ou genéticas tais como as neoplasias endócrinas múltiplas (NEM), a síndrome de McCune-Albright, entre outras.

Após a confirmação diagnóstica da hiperprodução hipofisária de ACTH e com a ideal identificação do adenoma hipofisário, pode-se traçar o plano terapêutico.

A adenomectomia cirúrgica transesfenoidal (CTE) é o tratamento de escolha. A radioterapia e as medicações para o controle da hipercortisolemia são utilizadas como tratamento complementar.

Geralmente as medicações são usadas no preparo pré-operatório de alguns pacientes e em casos de recidiva ou ausência da cura cirúrgica da doença.

Entre as medicações utilizadas no Brasil podem-se citar o cetoconazol (droga que inibe a estereoidogênese adrenal), a cabergolina (inibidor da liberação de ACTH nos corticotrófos) e, mais recentemente, o pasireotide (inibidor da produção ACTH nos corticotrófos)¹.

Além de um diagnóstico diferencial difícil e dispendioso, a definição de “cura” ou remissão do hipercortisolismo depende de acompanhamento continuado e especializado e com múltiplas avaliações clínicas, laboratoriais e radiológicas.

Além disso, os neurocirurgiões de referência devem ser experientes na abordagem hipofisária^{1,2}. As medicações utilizadas não são curativas, podem causar efeitos colaterais por vezes muito graves para o controle hormonal, são caras e não são aprovadas para o tratamento da doença de Cushing (uso *off label*).

O CLU, o CPD e CS são os mais utilizados no acompanhamento pós-operatório dos pacientes. Caso algum dos testes se apresente positivo nesse acompanhamento, novos testes são solicitados para confirmar o *status* da doença^{1,2}.

As definições de cura, remissão e recidiva da DC ainda são pouco consistentes na literatura, mas de modo geral devem-se considerar pacientes em remissão laboratorial da doença aquele que mantém todos os principais testes dentro da normalidade em seu seguimento^{1,2,8}.

Recidiva do hipercortisolismo pode ocorrer anos após o controle laboratorial mantido. Existem relatos de recidiva clínico-laboratorial após 20 anos de normocortisolemia continuada. Daí a importância do diagnóstico em tempo hábil, tratamento cirúrgico curativo otimizado e vigilante acompanhamento periódico.

1.3A obesidade

A obesidade é uma síndrome clínica de incidência crescente no mundo e está associada ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, de doenças articulares e da incidência de neoplasias.

Classifica-se a obesidade, segundo a Organização Mundial de Saúde, pelo índice de massa corporal (IMC). Acima de 30 kg/m² o indivíduo é considerado obeso; de 30 a 34,9 kg/m² a obesidade é grau I; de 35 a 39,9 kg/m², grau II; e acima de 40 kg/m², grau III ou obesidade grave⁹ (QUADRO 2).

Quadro 2 – Classificação do índice de massa corporal da Organização Mundial da Saúde (1995)⁹

IMC (kg/m ²)	Classificação	Grau de obesidade
≤ 18,5	Magro ou desnutrido	0
18,5-24,9	Normal	0
25,9-29,9	Sobrepeso	0
30,0-34,9	Obesidade	I
35,0-39,9	Obesidade	II
≥ 40,0	Obesidade grave	II

O risco relativo de doenças cardiometabólicas aumenta progressivamente com o aumento do grau de obesidade¹⁰.

Essa síndrome clínica pode ser classificada de modo geral em obesidade primária (sem etiologia identificada ou suspeita) ou obesidade secundária (secundária a doença ou condição clínica).

A obesidade primária pode cursar com estado de hipercortisolismo dito fisiológico¹¹⁻¹⁴. Assim como a síndrome de Cushing pode cursar com a obesidade secundária ao hipercortisolismo, a obesidade primária entra no diagnóstico diferencial com o hipercortisolismo tumoral^{11,15}.

A obesidade, principalmente nos graus II e III, pode trazer armadilhas para a investigação e exclusão do hipercortisolismo endógeno: aumento dos falso-positivos nos testes de CPD (5% dos pacientes), alteração sérica dos níveis de proteínas carreadoras e aumento da excreção urinária na coleta do CLU¹.

Principalmente nesses pacientes confirma-se a necessidade de múltiplas amostras laboratoriais, dosadas em momentos diferentes e mesmo o uso dos testes dinâmicos para diagnóstico diferencial com a SC.

Tem sido recomendada a pesquisa do hipercortisolismo tumoral em obesos que têm alta probabilidade pré-teste, ou seja, aqueles pacientes que apresentam outros achados sugestivos da síndrome de Cushing tais como: o ganho progressivo e rápido de peso, as estrias violáceas e largas, a fragilidade capilar, a fraqueza proximal progressiva, o hirsutismo e outros^{1,2,11,15}.

1.4A vasopressina e seus análogos

A vasopressina (AVP) ou hormônio antidiurético (ADH) é um nonapeptídeo sintetizado pelos neurônios magnocelulares, dos núcleos supraópticos e paraventriculares do hipotálamo. É estocado em grânulos neurosecretórios nos áxions desses neurônios com prolongamento para a hipófise posterior. O proAVP é cossecretado com o hormônio liberador da corticotropina (CRH), assim os dois terão função na secreção da corticotropina¹⁶.

O ADH promove sua ação por meio de receptores: AVPR1A (V1B ou V3) presente nos vasos e células adrenocorticais (vasoconstrição e liberação do cortisol e aldosterona), AVPR1B, presente nos corticotrófos, e o AVPR2 (VR2), presente nos túbulos coletores renais e no endotélio vascular (ação antidiurética via migração de canais aquaporinas 2 e modulação da liberação de fator VIII e Von Willebrand)¹⁶⁻¹⁷.

O uso da vasopressina e seus análogos na avaliação hipofisária e na liberação do ACTH foi descrito desde a década de 1950¹⁷⁻¹⁸ em estudos *in vivo* e *in vitro* e se mantém ainda, principalmente nos mercados europeu e sul-americano.

A desmopressina (1-deamino, 8-darginina vasopressina) é um composto análogo de longa ação do ADH e preferencialmente tem ação no AVPR2. Tem sido utilizado há vários anos na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HHAA) para análise de reserva glandular ou nos estados de hipersecreção¹⁹⁻²⁴.

Essa droga bem mais barata é de mais fácil acesso que a corticotrofina sintética, bastante usada na América do norte.

Os efeitos colaterais do uso continuado da desmopressina são raros e na maioria das vezes ocorrem devido às suas ações vasoconstritoras, hipertensivas e ao aumento da agregação plaquetária. Poucos pacientes hígidos tiveram dor abdominal, flatulência e náusea e 50% tiveram rubor facial após desmopressina, dois de oito tiveram náusea, um ficou anúrico por 36h¹³.

Não foram descritos efeitos do uso episódico dessa droga ou em testes dinâmicos, porém recomenda-se evitar os testes dinâmicos em pacientes com hipertensão grave, portadores de doença arteriosclerótica grave e com história prévia de hipersensibilidade à medicação. Além disso, deve-se solicitar ao paciente que se evite o uso excessivo de água, para que não ocorra intoxicação.

Foram identificados receptores da vasopressina nas células tumorais corticotrófas de adenomas hipofisário, mas também em tumores ectópicos produtores de ACTH^{19-22,26}.

1.5O teste da desmopressina

O teste clássico consiste na coleta sérica de ACTH e cortisol nos tempo basal e após administração endovenosa de 2,5 ampolas (10 mcg) dessa droga^{18,20,27}.

A quantidade de tempo utilizado varia segundo o serviço ou o laboratório. A sensibilidade e especificidade do teste variam segundo a população em questão (obesos, pseudocushing, SC subclínica) e o objetivo do estudo. Os pacientes portadores de doença de Cushing respondem com aumentos percentuais e absolutos maiores em comparação aos indivíduos sem hipercortisolismo.

Esse teste tem sido utilizado no diagnóstico diferencial da SC ACTH dependente, na exclusão dos casos de pseudocushing, nos critérios de remissão pós-operatório, entre outros²³⁻²⁵. Em 1993 foi utilizado na diferenciação entre a síndrome de Cushing ACTH dependente e a independente, por grupo brasileiro²⁶. Em 1996, o mesmo grupo brasileiro estudou o teste dinâmico na diferenciação entre a DC e o pseudocushing - PSC X DC¹⁴. Em 2000 pesquisa demonstrou a baixa acurácia do teste no contexto de diagnóstico da síndrome de Cushing na população geral, uma vez que até 50% dos indivíduos normais podiam apresentar um teste falso-positivo²⁷.

Utilizando o critério de ACTH $\Delta >27$ (diferença do pico basal de ACTH), um grupo italiano encontrou acurácia de 89%, bem melhor que o critério anterior utilizado, baseado na variação de cortisol sérico²⁸. Receptores V2 foram identificados em Tu de hipófise, demonstrando o mecanismo de liberação exacerbada de ACTH nos pacientes após a administração da desmopressina^{20,21}.

Em 2007 um grupo italiano obteve acurácia semelhante entre o teste da desmopressina e o do CRH, utilizando o critério de Δ ACTH >27 – com acurácia de 84 a 85%²⁸. Em 2010 outro grupo italiano registrou especificidade de 86,6 a 100% e sensibilidade de 92,8% do teste da desmopressina em comparação ao CRH na diferenciação entre a SC leve e o PSC. Utilizou os critérios de cortisol sérico basal acima de 12 e variação de ACTH $\Delta > 18$ pg/mL (pico até tempo 30 minutos)²⁹.

Já em 2011, o mesmo grupo comparou o teste da desmopressina com o teste do CRH na exclusão do pseudocushing. Utilizando os mesmos critérios anteriores, encontrou sensibilidade e especificidade de 96,6% e 100%, respectivamente³⁰.

Desse modo, pode-se afirmar que o teste da desmopressina tem ótima acurácia e sua principal indicação atual é na diferenciação entre a SC e o PSC, com sensibilidade e especificidade idênticas às do teste do CRH. Já sua utilização na definição etiológica da SC ACTH dependente e na diferenciação de indivíduos normais tem pouca empregabilidade devido à alta taxa de falso-positivos.

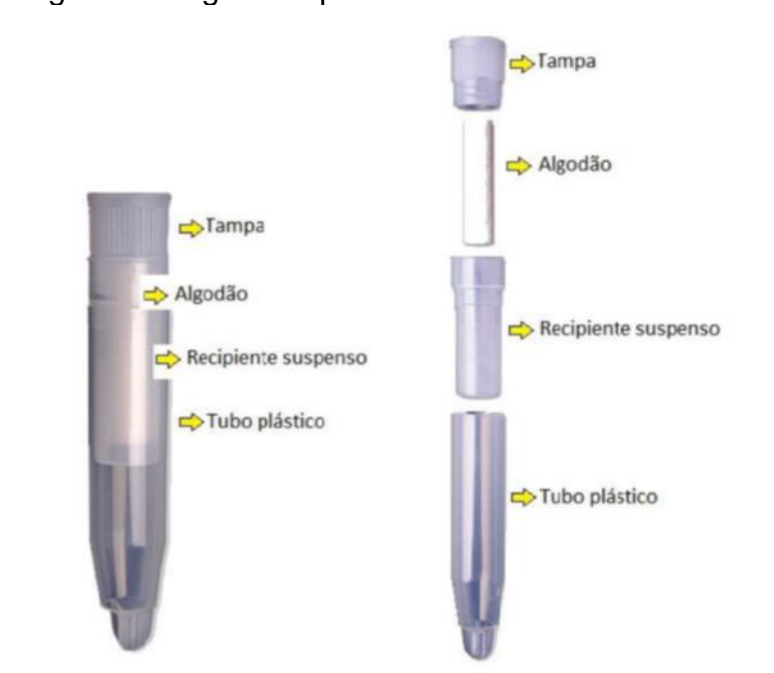
1.6O cortisol salivar

O cortisol salivar tem sido utilizado na avaliação do hipercortisolismo há cerca de três décadas³¹⁻³⁵, As amostras são independentes de flutuações na transcortina sérica e refletem a fração livre plasmática (cerca de 70%), além de não sofrer influência da alteração de fluxo salivar^{36,37}.

As amostras são coletadas sem procedimentos estressantes que podem ser repetidos várias vezes no dia facilmente. É coletado de modo passivo (mais em crianças) ou por meio de coletor comercial (Salivette®).

Para sua coleta acurada os pacientes devem ser orientados sobre o uso de salivette (FIGURA 1), sobre a escovação dentária e tabagismo horas antes da coleta, além de excluir os processos inflamatórios orais crônicos ou agudos para minimizar resultados falsos.

Figura 1 – Figura esquemática do material Salivette®



Comumente determinado por radioimunoensaio, por *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), por eletroquimioluminescência automática ou, mais recentemente, por cromatografia líquida de espectrometria por massa. Idealmente deveria ser feito em centros com *cutoff* específicos para diferentes populações, tais como obesos, crianças e outros^{1,2}.

Atualmente, tem sido considerado o principal método de rastreamento do hipercortisolismo, para o seguimento de pós-operatório tardio de adenomas corticotrófos e no controle de tratamento³⁸⁻⁴⁴.

Não está descrito na literatura, até a presente revisão, o uso do cortisol salivar em testes dinâmicos com a administração da desmopressina. Seria uma maneira bem menos invasiva de dinamicamente avaliar-se o eixo hipofisário e suas disfunções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento do cortisol salivar colhido durante o teste da desmopressina padrão em indivíduos com doença de Cushing em atividade e em indivíduos obesos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Fazer correlação inicial em cada tempo do teste do cortisol salivar com o cortisol sérico e o ACTH sérico.
- b) Descrever possíveis diferenças significativas em portadores de doença de Cushing em atividade e em obesos.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo seccional de acurácia com objetivo analítico, no qual foi avaliado o teste da desmopressina acrescido do cortisol salivar em pacientes portadores de doença de Cushing em atividade e em pacientes obesos.

3.2 Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com as normas e diretrizes do Conselho Nacional de Saúde que regulamentam a pesquisa com envolvimento de seres humanos. Foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) sem ressalvas (CAAE 30850514.9.0000.5149), sob o parecer de número 743.265 (ANEXO A).

Os indivíduos selecionados receberam informações verbais e por escrito sobre o estudo e foram convidados a participar do mesmo. Aqueles que se dispuseram a participar leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

3.3 Seleção da amostra

A população-alvo deste estudo foi composta por usuários do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e, mais especificamente, dos ambulatórios de Neuroendocrinologia e de Obesidade.

Foram avaliados indivíduos no período de julho de 2013 a fevereiro de 2016 para a obtenção da amostra, sendo esta realizada por recenseamento e conveniência, visto que os indivíduos com os diagnósticos em estudo estão presentes nesse serviço.

Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, sem distinção de raça, classe social ou nível de escolaridade, com características que os distinguem entre os grupos: 11 indivíduos portadores de doença de Cushing em atividade (**grupo A**) e oito indivíduos portadores de obesidade (**grupo B**).

Como critérios de inclusão e exclusão nesses grupos foram utilizadas as características clínicas e laboratoriais citadas a seguir, com revalidação de critérios no momento de processamento de dados e das amostras (QUADRO 3).

Para o **grupo A** foi definido como critério de inclusão obrigatório a doença de Cushing ativa, com ou sem tratamento prévio (cirurgia transesfenoidal, radioterapia, medicamentos), mas em atividade de doença. Foram excluídos os pacientes com condições clínicas que pudessem interferir nas análises propostas ou que apresentassem contraindicações ao teste da desmopressina e portadores de lesões orais. No **grupo B** foram incluídos os obesos graus II e III (índice de massa corporal - acima de 35 m/kg²) com idade superior a 18 anos. Foram excluídos os portadores de doenças agudas, cirurgias ou traumas recentes nos últimos seis meses, usuários crônicos de glicocorticoides e pacientes com valores de CPD positivos e portadores de lesões orais.

Quadro 3 – Alocação dos grupos com critérios de inclusão/exclusão

Grupo	Característica	Inclusão	Exclusão
A	Pacientes portadores de doença de Cushing em atividade (n=11).	-Idade maior de 18anos; -atividade laboratorial da doença; -aceitação e assinatura no TCLE;	-Contraindicações à realização de teste dinâmico ou ao uso da desmopressina.
B	Pacientes portadores de obesidade (n=8).	- Idade maior de 18anos -obesidade graus II ou III (IMC acima de 35 kg/m ²); -triagem negativa para hipercortisolismo; -aceitação e assinatura no TCLE;	-Contraindicações à realização de teste dinâmico ou ao uso da desmopressina; -usuários crônicos de glicocorticoides sistêmicos; - positividade do CPD

3.4 Protocolo para o teste da desmopressina

Previamente ao teste, em todos os pacientes do **grupo A** foram aplicados os critérios de atividade laboratorial do hipercortisolismo^{1,2,8}. Foram utilizados para essa

classificação o CPD, o CS e o CLU, com valores acima dos valores de referência em mais de uma medida.

Todos os pacientes do **grupo B** foram submetidos à CPD para a triagem inicial do hipercortisolismo^{1,2}. Em caso de positividade eles foram excluídos.

Após essa avaliação inicial, todos os pacientes foram orientados a jejum noturno de oito horas e, entre sete e oito horas da manhã do dia seguinte, foram submetidos ao teste da desmopressina tradicionalmente, descrito a seguir²⁶⁻³⁰, acrescido de coletas salivares de cortisol em todos os tempos correspondentes.

Além do jejum padrão, os pacientes foram orientados a evitar a ingestão excessiva de água e líquidos no dia anterior ao teste.

O médico e o pesquisador principal, assim como o mesmo técnico laboratorial, estiveram presentes em todos os testes dinâmicos de ambos os grupos.

Pacientes foram questionados sobre a ausência de tabagismo na última hora e tiveram a mucosa oral reexaminada por pesquisador médico para excluir processos inflamatórios que pudessem influenciar a análise do cortisol salivar.

Na chegada do paciente à sala de coleta, o mesmo foi orientado a realizar repouso de 15 minutos. Após esse repouso, o paciente foi posicionado em cadeira adequada para venopunções. Foram obtidos dois acessos venosos periféricos, um em cada antebraço, na fossa antecubital.

Em um dos acessos foi posicionado um cateter com salina estéril (*BD Posiflush Syringe*) e o outro acesso foi utilizado para administração da desmopressina. Foram colhidas amostras laboratoriais basais de cortisol sérico e ACTH, além de amostras salivares do cortisol em recipiente específico (*Salivette®*).

Para a determinação do ACTH foi coletado 0,7 mL de plasma (ácido etilenodiaminotetracético - EDTA). O material foi coletado e transportado em tubo plástico, congelado imediatamente (-20°C).

Para o cortisol sérico foi utilizado 0,5 ml de soro e o material foi transportado refrigerado entre 2° e 8°C.

O cortisol salivar foi colhido com recipiente específico (Salivette®) e os participantes foram orientados a colocar o algodão na boca e mastigá-lo por cerca de dois a três minutos até que este ficasse bem molhado. Após a coleta foram respeitadas as medidas de transporte e conservação. As amostras séricas foram coletadas a vácuo com o objetivo de mensurar o nível sérico de cortisol e ACTH basais e o nível salivar do cortisol (tempo zero). Após a coleta basal para cortisol, ACTH e cortisol salivar (tempo zero), foi realizada a administração intravenosa de 10 mcg de desmopressina (DDAVP®) (ampolas 1 mL / 4 mcg - 2,5 ampolas).

Novas amostras séricas e salivares foram coletadas em cada um dos tempos subsequentes: 15, 30, 45, 60 e 120 minutos para as mesmas determinações. Todas foram identificadas com o número do paciente, o grupo de estudo e o tempo de coleta avaliação.

3.5 Amostras e ensaios laboratoriais

Todas as amostras foram processadas em uma mesma unidade do laboratório Geraldo Lustosa.

Para a determinação do ACTH sérico foi utilizado o ensaio Elecsys ACTH® da fabricante Roche, um imunoensaio *in vitro* com intervalo de medição de 1.5-2000 pcg/mL (0.330-440 pmol/L),

Para o cortisol sérico usou-se o ensaio ADVIA Centaur® Cortisol da Siemens, um imunoensaio competitivo que utiliza a tecnologia quimioluminescente direta. São necessários 20 µL de amostra para uma determinação única; é altamente específico para o cortisol e mede as concentrações de cortisol até 75 µg/dL (2.069 nmol/L) com um intervalo de ensaio de nível baixo de 0,50 µg/dL (13,80 nmol/L).

Para o cortisol salivar foi empregado o ensaio Elecsys cortisol II® da Roche, um imunoensaio de electroquimioluminescência para a determinação quantitativa *in vitro*

do cortisol em soro, plasma e saliva humanos. Esse ensaio apresenta como intervalo de medição de 0.054-63.4 µg/dL (1.5-1.750 nmol/L).

3.6 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística e produção gráfica foram utilizados os programas *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 23 para *Windows* (Armonk, NY, USA) e o *Graphpad prism* versão 7 (La Jolla, CA, USA).

Os dados foram avaliados inicialmente em relação à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e o Kolmogorov Smirnov e a homogeneidade pelo teste qui-quadrado. Foram aplicados testes estatísticos diferentes para a análise intra e inter grupo: os valores basais laboratoriais foram comparados pelo Teste T não pareado, já para os outros tempos do teste a análise foi feita pelo teste two-way análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Holm Sidak para múltiplas amostras.

A análise das áreas individuais sob a curva para cada parâmetro laboratorial, foi calculada pela regra do trapezoide e posteriormente pelo teste T não pareado com a correção de Welch. As análises de correlação entre o cortisol sérico, ACTH e cortisol salivar foram realizadas por Pearson. Os resultados foram mostrados em média e erro-padrão da média.

Para a representação gráfica foram adotados os símbolos * e ** para respectivos valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%, considerando-se intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos grupos A e B

Foram testados 19 indivíduos, sendo 11 indivíduos com doença de Cushing (A) em atividade e oito indivíduos obesos (B) em pré-operatório de cirurgia bariátrica com as características vistas a seguir.

Estão discriminadas em tabela as características individuais de cada indivíduo dos dois grupos – idade, sexo, IMC e comorbidades (hipertensão, diabetes), além do valor do cortisol pós-dexametasona (CPD) de cada indivíduo em período pré-teste da desmopressina (TABELA 2).

Como os pacientes do grupo A têm suas peculiaridades, foram analisados aqueles virgens de tratamento (sem CTE prévio) e os que já haviam sido submetidos à cirurgia transesfenoidal, mas ainda estão em atividade da doença.

As características individuais e análise completa estão em ilustradas nas TABELAS 1 e 2).

Tabela 1 – Grupos de pacientes

GRUPO	Amostra(n)	Idade média (anos)	Sexo (n)	IMC (kg/m ²)
A (Cushing)	11	32,45	2 homens 9 mulheres	32,48
B (Obesos)	8	41,50	2 homens 6 mulheres	50,16

Tabela 2 – Caracterização dos indivíduos de ambos os grupos

Paciente Grupo	Idade	Sexo 1(H), 2(M)	IMC	DM2		HAS		CPD Mcg/dL	CTE prévio	
				Sim (1)	Não (2)	Sim (1)	Não (2)		Sim (1)	Não (2)
A1	18	2	19,55	2		2		13,9		2
A2	51	2	35,06	2		1		12,3		1
A3	37	1	26,00	1		2		2,80		1
A4	27	2	28,01	1		2		1,90		1
A5	26	2	30,00	1		1		27,4		2
A6	46	2	29,56	1		1		5,00		1
A7	35	1	46,59	2		1		27,8		2
A8	38	2	38,5	1		2		8,58		1
A9	20	2	31,80	2		2		9,30		1
A10	36	2	32,00	1		1		16,67		2
A11	24	2	40,20	1		1		11,6		2
Média	32,45	2:9	32,48	63,6%		54,6%		15,11		45,5%
B1	35	1	35,50	2		2		0,30		-
B2	50	2	44,15	1		2		0,42		-
B3	41	2	43,01	2		1		0,29		-
B4	46	1	66,70	1		1		0,11		-
B5	44	2	67,60	1		1		0,32		-
B6	26	2	38,02	2		2		0,29		-
B7	37	2	44,80	2		1		0,24		-
B8	53	2	60,56	1		1		0,50		-
Média	41,50	2:6	50,16	50%		62,5%		0,30		-

IMC: índice de massa corporal; HAS: hipertensão arterial sistêmica; CPD: cortisol pós-dexametasona; CTE: cirurgia transesfenoidal.

Foi realizada amostragem de conveniência e oportunidade em ambulatórios específicos. Apesar das amostras pequenas, os grupos apresentaram resultados muito diferentes no teste dinâmico da desmopressina. Todos os testes e seus resultados ocorreram sem intercorrências. Nenhum indivíduo foi eliminado do estudo por critérios pós-teste.

Todos os pacientes do grupo A tiveram a resposta esperada no teste da desmopressina padrão, atualmente utilizado para a doença de Cushing – variação do ACTH entre os tempos basal e 30-60 minutos acima de 18 pcg/dL e cortisol sérico basal acima de 12 mg/dL²⁴.

Todos os pacientes do grupo B tiveram resposta esperada para indivíduos normais ou em obesos, com aumentos muito discretos ou mesmo diminuição desses parâmetros clássicos, como descrito a seguir.

4.2 Comparação entre os dois grupos

Após a obtenção e análises descritivas dos dados laboratoriais obtivemos as principais medidas de tendência central de cada grupo (TABELA 3).

Tabela 3 - Dados laboratoriais e medidas de tendência central em cada tempo do teste

Exame/Medidas descritivas	Grupo A				Grupo B			
	Média	Mediana	Desvio-padrão	Erro-padrão	Média	Mediana	Desvio-padrão	Erro-padrão
Cortisol salivar mcg/dL								
Basal	0,89	0,98	0,31	0,29	0,28	0,3	0,11	0,04
15	1,48	1,49	0,73	0,22	0,29	0,27	0,13	0,04
30	2,82	1,76	1,67	0,5	0,29	0,5	0,11	0,04
45	3,29	1,79	2,49	0,84	0,23	0,2	0,1	0,03
60	3,64	2,02	3,1	0,93	0,26	0,25	0,14	0,05
120	2,39	1,37	2,41	0,41	0,21	0,2	0,1	0,04
Cortisol sérico mg/dL								
Basal	23,54	24,4	6,51	1,96	9,6	9,85	2,2	0,78
15	26,87	25	7,38	2,22	9,1	9,82	2,1	0,74
30	31,88	30,33	7,11	2,14	10,31	11,14	2,35	0,83
45	32,52	30,96	7,86	2,37	10,32	10,36	3,11	0,11
60	33,3	33,74	7,06	2,13	9,21	9,21	2,6	0,92
120	31,98	31,98	8,86	2,67	9,49	9,96	3,12	1,1
ACTH pcg/mL								
Basal	53,98	42	43,27	13,07	15,07	12	8,89	3,15
15	181,6	92,8	160,45	51,6	17,77	15,2	10,78	3,82
30	179,7	134,7	132,1	42,48	16,86	15,3	9,79	3,47
45	143,57	119,4	90,01	27,02	17,7	16	11	3,9
60	123,59	96,9	76,6	23,14	17,25	18,08	11,99	4,25
120	79,9	46,8	65,54	19,8	15,81	13,9	9,95	3,52

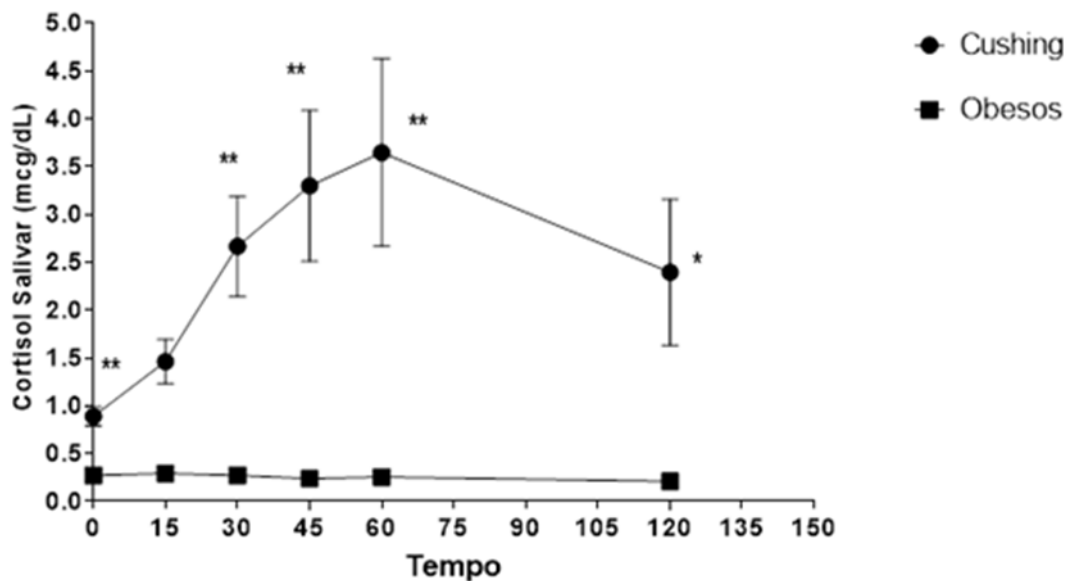
Os dois grupos se mostraram com distribuição homogênea, e apresentaram distribuição normal em todos os tempos e análises.

Os grupos foram comparados estatisticamente para os três parâmetros laboratoriais (cortisol salivar, cortisol sérico e ACTH sérico).

A comparação entre os grupos mostrou ótima significância estatística em todos os tempos: sendo * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ para valores não significativos (GRÁFICOS 1, 2 e 3).

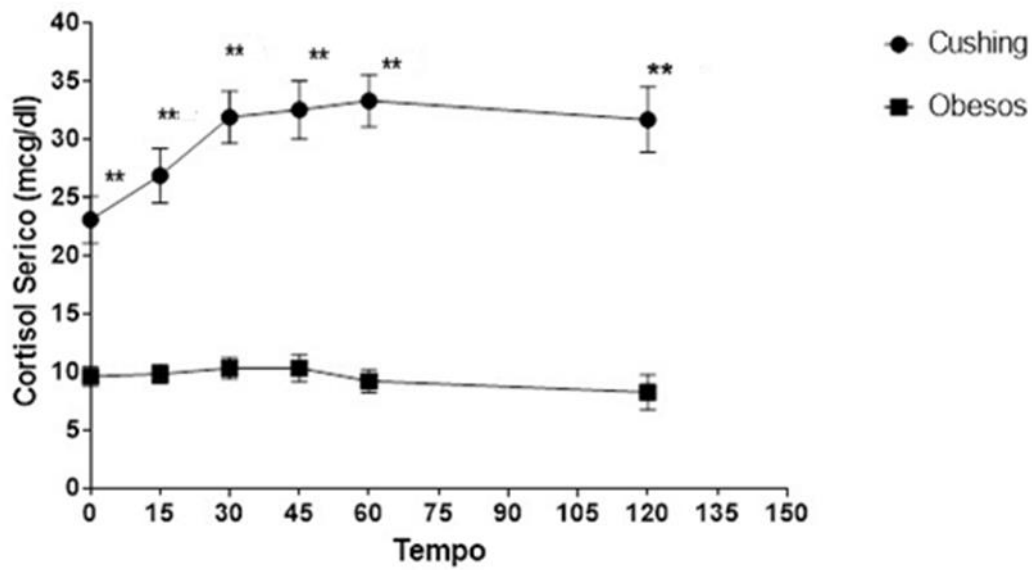
A área sob a curva de variação entre os grupos foi calculada e comparada nos dois grupos. Foi estatisticamente diferente para os três parâmetros laboratoriais: cortisol salivar, cortisol sérico e o ACTH (Teste T não pareado com correção de Welch – $p:0,0092$ $p:0,0044$ $p:0,0355$, respectivamente) (GRÁFICOS 4, 5 e 6).

Gráfico 1 – Comparação entre o cortisol salivar dos 02 grupos – média e erro-padrão



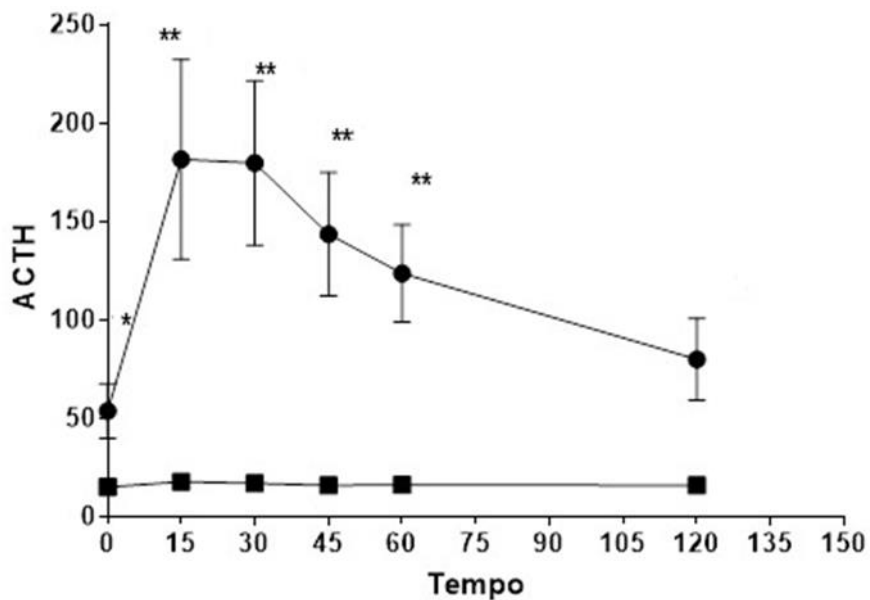
Basais – Teste T Não pareado ,
 -15,30,45,60,120 – 2way Anova/ Teste de Holm-Sidak's de múltiplas comparações
 * $p < 0,05$ ** $P < 0,01$

Gráfico 2 - Comparação entre o cortisol sérico dos dois grupos: média e erro-padrão



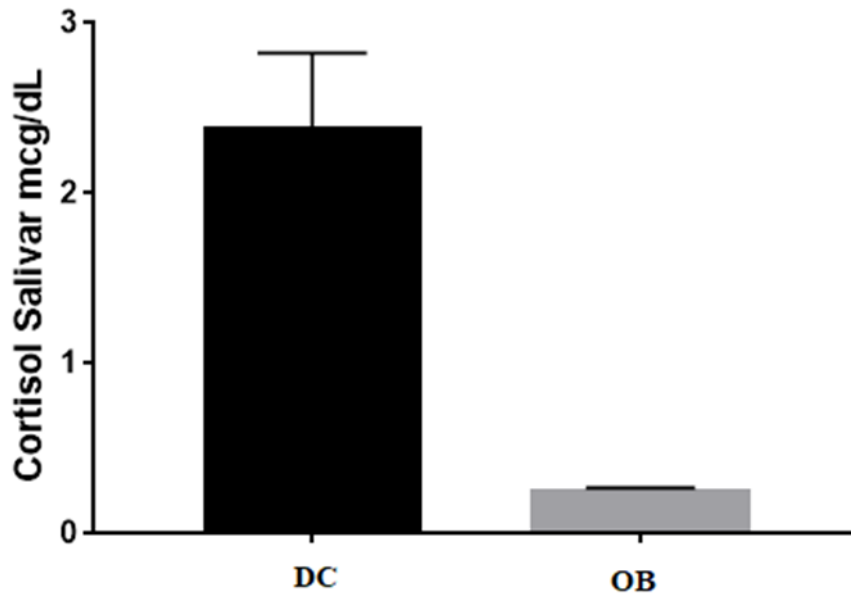
Basais - Teste T Não pareado,
 -15,30,45,60,120 - 2way Anova/ Teste de Holm-Sidak's de múltiplas comparações
 * p<0,05 ** P<0,01

Gráfico 3 - Comparação entre o ACTH dos dois grupos: erro-padrão e média



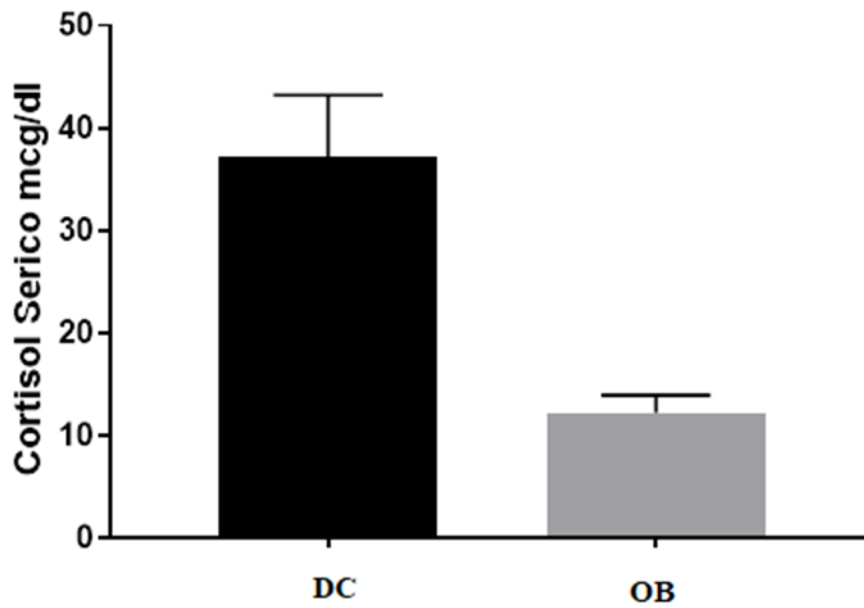
-Basais - Teste T Não pareado,
 -15,30,45,60,120 - 2way Anova/Teste de Holm-Sidak's de múltiplas comparações
 * p<0,05 ** P<0,01

Gráfico 4 – Áreas sob a curva do cortisol salivar dos dois grupos



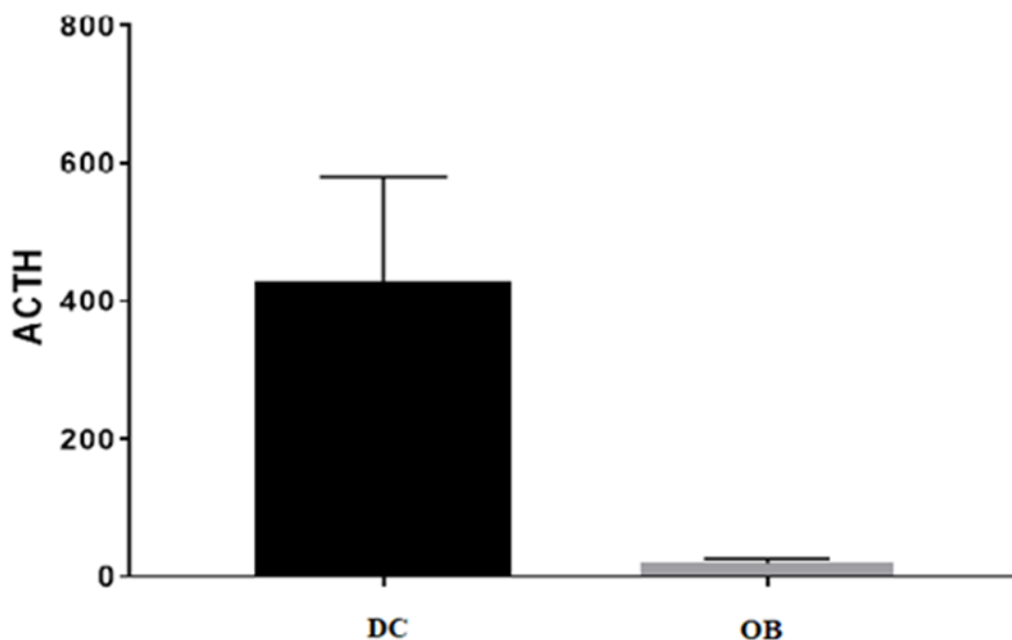
Comparação áreas sob a curva - Teste T não pareado com correção de Welch - $p:0,0092$ **

Gráfico 5 - Áreas sob a curva dos dois grupos



Comparação áreas sob a curva - Teste T não pareado com correção de Welch - $p:0,0044$ **

Gráfico 6 - Áreas sob a curva dos dois grupos



Comparação áreas sob a curva – Teste T não pareado com correção de Welch – p:0,0355 *

4.3 O cortisol salivar nos dois grupos

O cortisol salivar comportou-se de modo diferente com significância estatística em todos os tempos, como já descrito.

O cortisol salivar aumentou progressivamente no grupo A durante a maioria do teste dinâmico, sendo observada redução apenas na relação dos últimos tempos (45/60 e 60/120). O maior aumento ocorreu entre os tempo basal e 60 minutos, aumento de 309% ou quatro vezes o valor (TABELA 4)

No grupo B, o cortisol salivar iniciou-se estatisticamente menor nos valores basais e declinou em todas as comparações dos tempos, com exceção de 45/60, relação em que ocorreu aumento de 11%.

Para a análise comparativa entre os valores em cada tempo dentro do mesmo grupo foi utilizado o Anova Two way para análise multivariada e descritos os dados analíticos (TABELA 4).

Foi utilizado para a análise comparativa entre grupos diferentes: o teste T não pareado para a comparação dos valores basais e o teste o *two way* Anova seguido do teste de Holm Sidak para comparação multivariada das médias de cada tempo em relação aos tempos subsequentes do cortisol salivar.

Foram significativas as diferenças entre os tempos basais (p^{**}), 0/30 (p^{**}), 0/45 (p^{**}), 0/60 (p^{**}), 0/120 (p^*) no grupo A. Os outros comparativos dos tempos do grupo A e todas do grupo B não foram significativas (GRAFICO 1).

Todas as diferenças entre os tempos estão discriminadas na TABELA 4. Valores negativos indicam diminuição e positivos os aumentos entre os tempos.

Tabela 4 - Variação do cortisol salivar entre os tempos do teste nos dois grupos

Exame/Medidas descritivas	Grupo A			Grupo B			<i>p</i> valor Grupo A
	Diferença absoluta	Variação %	Razão	Diferença absoluta	Variação %	Razão	
Cortisol Salivar							
0-15	0,59	66	1,66	0,01	3,6	1,04	ns
0-30	1,93	216	3,16	0	0	0	**
0-45	2,4	269	3,7	-0,05	-21	0,79	**
0-60	2,75	309	4,08	0,03	-7	0,93	**
0-120	1,5	169	2,69	-0,07	-25	0,75	*
15-30	1,01	17	1,17	0	0	0	ns
15-45	2,4	67,6	1,67	-0,06	-21	0,79	**
15-60	2,16	146	2,45	-0,03	-10	0,9	**
15-120	0,91	61	1,61	-0,08	-18	0,72	ns
30-45	0,47	17	1,17	-0,06	-21	0,79	ns
30-60	0,82	29	1,29	-0,03	-11	0,89	ns
30-120	-0,43	-15	0,85	-0,08	-28	0,72	ns
45-60	0,35	11	1,11	0,03	13	1,13	ns
45-120	-1	-30	0,7	-0,02	-9	0,91	ns
60-120	-1,25	-34	0,66	-0,05	-20	0,8	ns

Anova *two way* ** $p < 0,001$ * $p < 0,005$ ns: não significativo.

4.4 A correlação entre o cortisol salivar, ACTH e o cortisol séricos

Foram analisadas a correlação de Pearson para observar os tempos mais significativos de correlação entre o cortisol salivar com os valores séricos de cortisol e ACTH.

Observou-se correlação entre o cortisol salivar e o cortisol sérico nos tempos 60 e 120 minutos com p de 0,382 * e 0,0032 **.

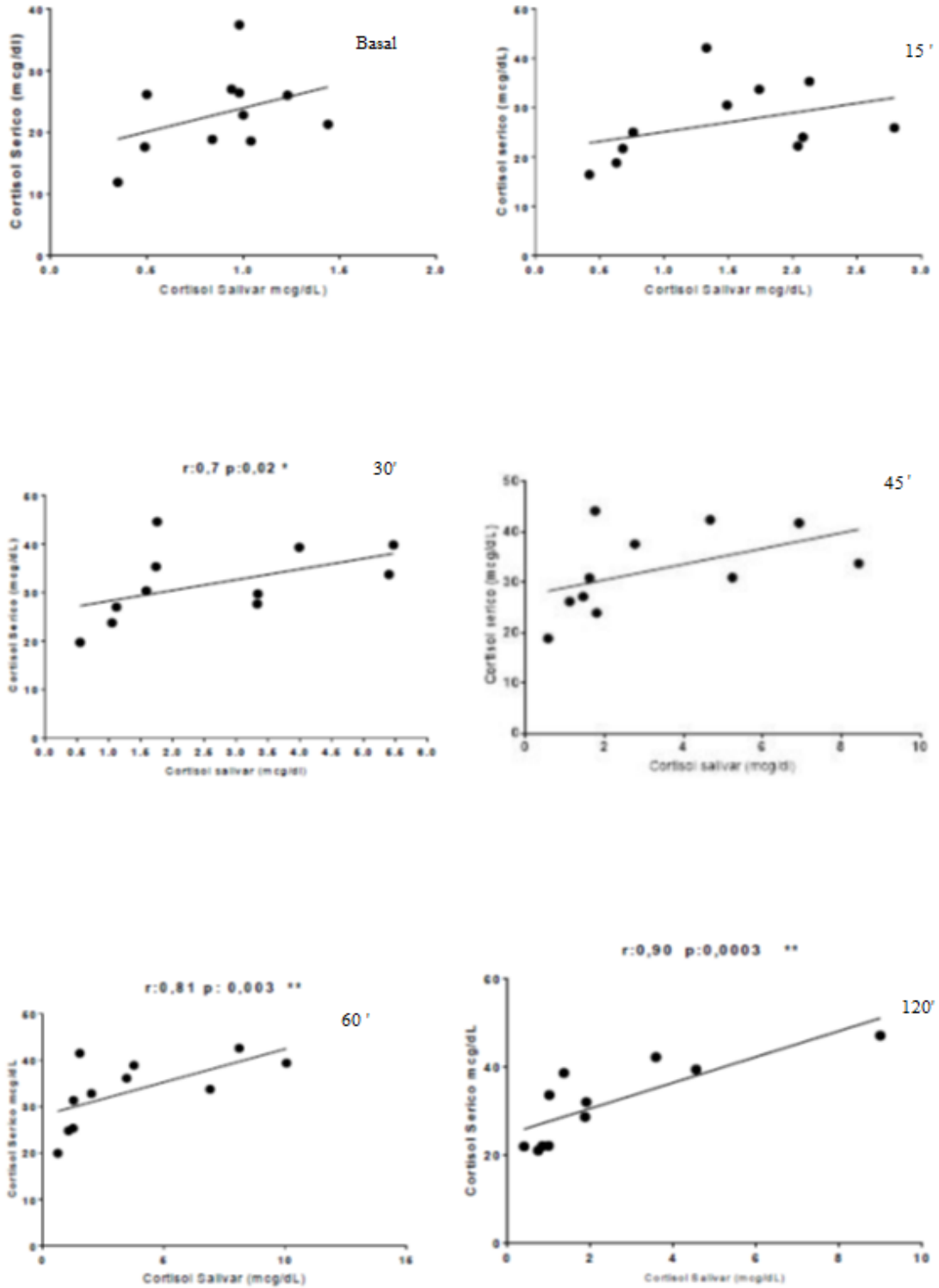
Observou se a correlação entre o cortisol salivar e o ACTH apenas no tempo 45 minutos com p de 0,0154 *

A correlação mais significativa foi entre o cortisol salivar e sérico no tempo 120 minutos (GRAFICO 7).

No Grupo B não foi observada correlação entre os valores laboratoriais significativa em nenhum dos tempos

Foi realizada a regressão linear simples para traçar a reta de relação entre os parâmetros, como expressa o GRÁFICO 7

Gráfico 7 – Representação da correlação entre o cortisol salivar e o cortisol sérico em cada tempo



5 DISCUSSÃO

A doença de Cushing e seu diagnóstico diferencial continuam sendo um desafio diário para os profissionais que lidam com a doença no dia a dia, apesar de todo o avanço técnico científico da atualidade.

Doença com altíssima morbimortalidade, nem sempre reversível com o tratamento, com altos índices de recidiva, e sem testes diagnósticos específicos para seu acurado diagnóstico e acompanhamento.

O hipercortisolismo fisiológico da obesidade tem sido muito estudado e muitos testes analisados na exclusão da secreção tumoral nesses indivíduos.

O estudo em questão objetivou descrever o comportamento do cortisol salivar em populações diversas (Cushing em Atividade e obesidade simples) após a administração da desmopressina.

O teste da desmopressina padrão tem sido utilizado nos últimos anos com acurácia crescente nesse contexto, em virtude de estudos epidemiológicos e apurada análise estatística dos parâmetros.

Assim como descrito em diversos estudos europeus e alguns americanos, apurou-se o excepcional desempenho do teste da desmopressina na diferenciação de portadores de doença de Cushing em comparação aos obesos e em portadores do pseudocushing.

O teste da desmopressina foi realizado com todos os tempos de coleta para descrever a variação do cortisol salivar basal e após estímulo, e correlacionar esse parâmetro ao cortisol sérico e ACTH sérico nos mesmos tempos.

Todos os indivíduos portadores de DC em atividade tiveram uma resposta esperada no teste dinâmico padrão com pontos atualmente preconizados: cortisol sérico basal

acima de 12 mg/dL e variação de ACTH acima de 18 pg/mL (até 30 minutos). Os indivíduos obesos controle do grupo B apresentaram resposta normal a esse teste, com os mesmos critérios^{14,30}.

O comportamento do cortisol salivar no teste dinâmico também variou de modo muito diferente entre a população de indivíduos com a doença de Cushing em atividade (grupo A) e indivíduos obesos (grupo B), com importante diferença estatística na maioria dos tempos ($p < 0,001$ – Mann Whitney).

Os grupos foram muito heterogêneos em seus valores basais e nos tempos após a administração da desmopressina, sendo que na maioria dos tempos o cortisol salivar se elevou em comparação ao basal, com aumentos percentuais de 66 a 309%.

Pode-se correlacionar o cortisol salivar com o cortisol sérico nos tempos 30, 45, 60 e 120 minutos com respectivos rho de Spearman de 0,700/ 0,609/0,818/0,909. O tempo 120 minutos teve a melhor correlação com o nível sérico de cortisol, podendo indicar possível ponto de corte em um teste simplificado.

Possivelmente pode se promover um teste da desmopressina bem mais simples: com a coleta de um cortisol sérico basal, a variação de ACTH (basal – pico) e um cortisol salivar com 120 minutos para um aumento da acurácia diagnóstica.

A limitação da amostragem de conveniência, critérios de seleção, a gravidade da doença em atividade, além do alto custo dos testes influenciaram o tamanho da amostra. Para análise mais apurada seria necessária uma amostra de controle maior e mais diversificada, podendo ser avaliados dados de sensibilidade e especificidade das populações.

Futuramente pode-se ainda testar com o nosso teste ampliado de modo multicêntrico uma população mais diversificada: indivíduos sem doença ativa, mas com índice de massa corporal variado, indivíduos com o outro extremo de índice de massa corporal (anorexia nervosa, baixo peso), indivíduos com síndrome de secreção ectópica de ACTH, além de obesos pré e pós-cirurgia bariátrica.

REFERÊNCIAS

1. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:1526-40.
2. Machado MC, Fragoso MCBV, Moreira AC, Boguszewski CL, Vieira Neto L, Naves LA, et al. Cushing's disease diagnosis recommendations. *Arch Endocrinol Metab.* 2016; 60(3).
3. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006; 367:1605-17.
4. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 2015; 386:91327.
5. Pappachan JM, Hariman C, Edavalath M, Wladron J, Hanna FW, et al. Cushing's syndrome: a practical approach to diagnosis and differential diagnoses. *Clin Pathol* 2017; 0:1-10. Doi:10.1136/jclinpath-2016-203933
6. Ferràu F, Korbonits M. Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2015;173:M133-57.
7. Newell-Price. Pituitary gland: Mortality in Cushing disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2016 Sep; 12(9):502-3.
8. Fleseriu M, Hamrahian H, Hoffman AR, Kelly DF, Katznelson L. Diagnosis of recurrence in Cushing's disease: American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review. *Endocr Pract.* 2016 Sep; 22(12):1436-1448.
9. Norgan NG, Jones PRM. The effect of standardizing the body mass index for relative height. *Int J Obesity Rel Metabol Dis.* 1995; 19:206-208.
10. Fierabracci P, Pinchera A, Martinelli S, Scartabelli G, Salvetti G, Giannetti M, et al. Prevalence of endocrine diseases in morbidly obese patients scheduled for bariatric surgery: beyond diabetes. *Obes Surg.* 2011; 21(1):54-60.
11. Baid SK, Rubino D, Sinaii N, Ramsey S, Frank A, Nieman LK. Specificity of screening tests for Cushing's syndrome in an overweight and obese population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(10):3857-64.
12. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev.* 1998; 19(5):647-72.

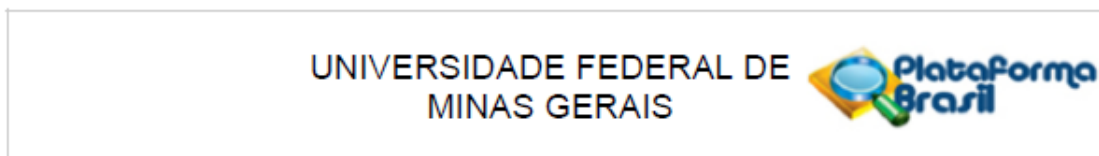
13. Tsagarakis S, Vasiliou V, Kokkoris P, Stavropoulos G, Thalassinos N. Assessment of cortisol and ACTH responses to the desmopressin test in patients with Cushing's syndrome and simple obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 51(4):473-477.
14. Malerbi DA, Fragoso MC, Vieira Filho AH, Brenha EM, Mendonça BB. Cortisol and adrenocorticotropin response to desmopressin women with Cushing's disease compared with depressive illness. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(6):2233.
15. Findling JW, Raff H. Differentiation of pathologic/neoplastic hypercortisolism (Cushing's syndrome) from physiologic/non-neoplastic hypercortisolism (formerly known as pseudo-Cushing's syndrome). *Eur J Endocrinol*. 2017 May; 176(5).
16. Gallo-Payet N, Guillon G. Regulation of adrenocortical function by vasopressin. *Horm Metab Res*. 1998 Jun-Jul; 30(6-7):360-7.
17. Liddle GW. Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1960; 20:1539-60.
18. Scott LV, Medbak S, Dinan TG. ACTH and cortisol release following intravenous desmopressin: a dose-response study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999; 51(5):653-8.
19. Keyzer Y, René P, Beldjord C, Lenne F, Bertagna X. Overexpression of vasopressin (V3) and corticotrophin-releasing hormone receptor genes in corticotroph tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998; 49(4):475-82.
20. Arnaldi G, Gasc JM, de Keyzer Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, et al. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jun; 83(6):2029-35.
21. Wang FF, Tang KT, Yen YS, Ho DM, Yang AH, Huang CI, et al. Plasma corticotrophin response to desmopressin in patients with Cushing's disease correlates with the expression of vasopressin receptor 2, but not with that of vasopressin receptor 1 or 3, in their pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012; 76(2):253-63.
22. Tsagarakis S, Tsigos C, Vasiliou V, Tsiotra P, Kaskarelis J, Sotiropoulou C, et al. The desmopressin and combined CRH desmopressin tests in the differential diagnosis of ACTH dependent Cushing's syndrome: constraints imposed by the expression of V2 vasopressin receptors in tumors with ectopic ACTH secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(4):1646-53.
23. Colombo P, Dall'Asta C, Barbetta L, Re T, Passini E, Faaglia G, Ambrosi B. Usefulness of the desmopressin test in the postoperative evaluation of patients with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2000; 143(2):227-234.

- 24.Losa M, Bianchi R, Barzaghi R, Giovanelli M, Mortini P. Persistent adrenocorticotropin response to desmopressin in the early postoperative period predicts recurrence of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(9):3322–3328.
- 25.Romanholi DJPC, Machado MC, Pereira CC, Danilovic DS, Pereira MAA, Cescato VAS, et al. Role for postoperative cortisol response to desmopressin in predicting the risk for recurrent Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;69(1): 117–122.
- 26.Malerbi DA, Mendonça BB, Liberman B, Toledo SP, Corradini MC, Cunha-Neto MB, et al. The desmopressin stimulation test in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993; 38(5):463-72.
- 27.Moro M, Putignano P, Losa M, Invitti C, Maraschini C, Cavagnini F. The desmopressin test in the differential diagnosis between cushing's disease and pseudo-cushing states. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(10).
- 28.Pecori Giraldi F, Pivonello R, Ambrogio AG, De Martino MC, De Martin M, Scacchi M, et al. The dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone stimulation test and the desmopressin test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007; 66(2):251-7
- 29.Tirabassi G, Faloia E, Papa R, Furlani G, Boscaro M, Arnaldi G. Use of the desmopressin test in the differential diagnosis of pseudo-Cushing state from Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(3):1115-22.
- 30.Tirabassi G, Papa R, Faloia E, Boscaro M, Arnaldi G. Corticotrophin releasing hormone and desmopressin tests in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing state: a comparative study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; 75(5):666-72.
- 31.Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem.* 1983; 29:1752-1756.
- 32.Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem.* 1983 Nov; 20:329-35.
- 33.Evans PJ, Peters JR, Dyas J, Walker RF, Riad-Fahmy D, Hall R. Salivary cortisol levels in true and apparent hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1984 Jun; 20(6):709-15.
- 34.Luthold WW, Marcondes JAM, Wajchenberg BL. Salivary cortisol for the evaluation of Cushing's syndrome. *Clin Chim Acta.* 1985; 151:33-9.
- 35.Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP. Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66:343-8.

- 36.Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem*. 2008 Nov; 54(11):1759-69.
- 37.Garde AH, Hansen AM. Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005; 65(5):433-6.
- 38.Castro M, Elias LL, Elias PC, Moreira AC. A dose-response study of salivary cortisol after dexamethasone suppression test in Cushing's disease and its potential use in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59(6):800-5.
- 39.Nonino-Borges CB, Martins Borges R, Bavaresco M, Suen VM, Moreira AC, Marchini JS. Influence of meal time on salivary circadian cortisol rhythms and weight loss in obese women. *Nutrition*. 2007; 23(5):385-91.
- 40.Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4(6):344-50.
- 41.Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing syndrome: a meta-analysis. *Endocr Pract*. 2009; 15:335–342.
- 42.Doi SA, Clark J, Russell AW. Concordance of the late night salivary cortisol in patients with Cushing's syndrome and elevated urine free cortisol. *Endocrine*. 2013; 43(2):327-33.
- 43.Erickson D, Singh RJ, Sathananthan A, Vella A, Bryant SC. Late night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012; 76(4):467-72.
- 44.Carrasco CA, García M, Goycoolea M, Cerda J, Bertherat J, Padilla O, et al. Reproducibility and performance of one or two samples of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome using an automated immunoassay system. *Endocrine*. 2012; 41(3):487-93.
- 45.Valéro R, Vallette-Kasic S, Conte-Devolx B, Jaquet P, Brue T. The desmopressin test as a predictive factor of outcome after pituitary surgery for Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2004; 151(6):727-733.

ANEXO E APÊNDICES

Anexo A – Parecer ético



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O USO DO TESTE DA DESMOPRESSINA NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CUSHING E DO PSEUDOCUSHING

Pesquisador: Antonio Ribeiro de Oliveira Junior

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30850514.9.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 743.265

Data da Relatoria: 28/05/2014

Apresentação do Projeto:

A desmopressina é um análogo da vasopressina que tem sido usado com boa confiabilidade no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing e os estados de pseudocushing. O teste da desmopressina tem sido assim executado com igual acurácia ao tradicional teste do CRH (teste da cortrosina) na determinação da etiologia da síndrome de Cushing ACTH (Hormônio adrenocorticotrófico) dependente.

Trata-se de um estudo seccional de acurácia com objetivo analítico, no qual será avaliado o potencial do teste da desmopressina para o diagnóstico diferencial da Síndrome de Cushing. Pacientes de diferentes grupos serão submetidos ao teste dinâmico da desmopressina - Serão dosados o ACTH, o cortisol sérico e o cortisol salivar nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de 10mcg de desmopressina sérica para posterior análise clínica e estatística dos dados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a confiabilidade e a aplicabilidade do teste da desmopressina no diagnóstico diferencial da Síndrome de Cushing.

Objetivo Secundário:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 743.265

*Verificar a acurácia do uso do teste da desmopressina nos casos de Síndrome de Cushing ACTH dependente;

*Observar a resposta dos pacientes obesos mórbidos ao teste dinâmico;

*Confirmar a viabilidade e segurança do teste na rotina diagnóstica da clínica endocrinológica;

*Avaliar a correlação e utilidade do cortisol salivar dosado no teste dinâmico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A aplicação da desmopressina pode gerar náuseas e possível vermelhidão nos olhos e, raramente ocorrem efeitos como alergia e baixa de cálcio. A coleta de sangue não oferece riscos, somente o desconforto habitual da punção da veia. Para minimizar estes riscos e desconfortos, todo o procedimento será realizado e acompanhado por um médico.

Benefícios: Avaliação e afirmação da utilidade do teste da desmopressina no diagnóstico diferencial da Síndrome de Cushing e nos critérios de cura ou remissão da doença. Comparado ao tradicional teste do CRH o teste da desmopressina oferece menor custo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante no âmbito em que será desenvolvida. A desmopressina seria uma droga de menor custo e mais acessível para a realização do teste dinâmico, entretanto, é necessário a aplicação de protocolo com segurança e eficácia para utilização mais rotineira deste teste diagnóstico. Os pesquisadores tem experiência nesta área de pesquisa e se os resultados forem positivos poderão enriquecer a literatura e propiciar maior exequibilidade do referido teste na prática médica rotineira.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram adequadamente apresentados

1. folha de rosto assinada pelo Diretor da Faculdade de Medicina da UFMG
2. Projeto de pesquisa anexado
3. Parecer da Câmara Departamental
4. Declaração da DEPE
5. TCLE em linguagem acessível.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de pesquisa relevante no âmbito em que será desenvolvida. Não há impedimentos éticos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 743.285

para a sua realização. Portanto, somos favoráveis à aprovação do Projeto "O USO DO TESTE DA DESMOPRESSINA NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CUSHING E DO PSEUDOCUSHING" do Pesquisador Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado segundo parecer.

BELO HORIZONTE, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:

Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

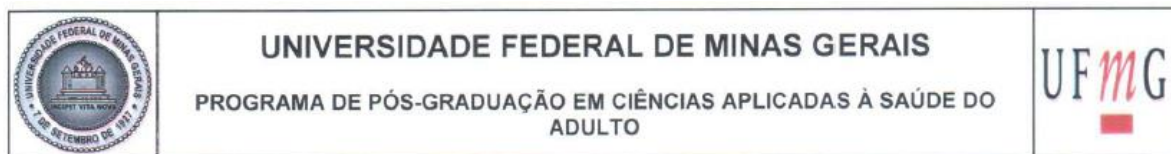
Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 8627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo B – Folha de Aprovação**FOLHA DE APROVAÇÃO**

O USO DO CORTISOL SALIVAR NO TESTE DA DESMOPRESSINA NA DOENÇA DE CUSHING E EM OBESOS

RICARDO MUNDIM FIRME

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 27 de setembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Antonio Ribeiro de Oliveira Junior - Orientador
UFMG



Prof. Beatriz Santana Soares Rocha
UFMG



Prof. Paulo Augusto Carvalho Miranda
UniBH

Belo Horizonte, 27 de setembro de 2017.

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

Prezado(a) Sr(a), esta pesquisa busca avaliar o teste da desmopressina como forma de confirmação da doença de Cushing.

Para que possamos desenvolver esta pesquisa será necessário que você preencha uma ficha juntamente com um médico, onde algumas perguntas serão feitas em relação às suas características, sua saúde geral e uso de medicamentos. Ainda, serão realizados testes com a medicação desmopressina, no qual serão realizados dois acessos venosos, um para aplicação da desmopressina e outro para coleta de sangue para análise, sendo essa coleta realizada em cinco momentos. Caso você seja diagnosticado com doença de Cushing, você será encaminhado para tratamento da doença presente, na própria universidade. A aplicação da desmopressina pode gerar náuseas e possível vermelhidão nos olhos e raramente ocorrem efeitos como alergia e baixa de cálcio. A coleta de sangue não oferece riscos, somente o desconforto habitual da punção da veia. Para minimizar esses riscos e desconfortos, todo o procedimento será realizado e acompanhado por um médico. Suas respostas não influenciarão o seu atendimento no local. Os resultados desta pesquisa serão muito importantes para que possamos melhorar a forma de diagnóstico dessa doença, beneficiando os pacientes.

Nós asseguramos que você não será identificado, sendo mantido o sigilo da informação, de modo que seu nome não será citado. Gostaríamos de informar também que se você quiser desistir da pesquisa poderá fazê-lo a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade do tratamento.

Você não vai pagar por algo que está sendo realizado. Você também não receberá qualquer outro benefício a não ser o tratamento. Se tiver dúvidas, pode entrar em contato com o pesquisador Ricardo Mundim Firme, pelo telefone: 031-84535605, ou se quiser esclarecer dúvidas com pessoas que não participam do estudo pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG no telefone 31-3409-4592, situado na Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005, CEP: 31270-901, *e-mail*:

coep@prpq.ufmg.br

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado sobre os métodos utilizados no estudo, as inconveniências, riscos e benefícios que podem vir a ocorrer. Declaro que tive tempo suficiente para ler e entender as informações acima.

Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo a qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante ou representante legal

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, para o(a) participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o(a) participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em linguagem adequada e compreensível e que ele(a) compreendeu essa explicação.

Assinatura do pesquisador

Apêndice B - Tabela de valores laboratoriais individuais de cortisol salivar (sa), cortisol sérico (ser) e ACTH (ac), dos grupos A e B nos 06tempos (T1-T6)

Grupo	T1sa	T2sa	T3sa	T4sa	T5sa	T6sa	T1ser	T2ser	T3ser	T4ser	T5ser	T6ser	T1ac	T2ac	T3ac	T4ac	T5ac	T6ac
A1	0,84	0,63	0,55	0,56	0,63	0,75	18,84	18,78	19,7	18,87	19,95	20,99	172,5	201,6	209,5	201,6	215,9	226,8
A2	0,35	0,42	1,05	1,79	2,02	1,91	11,89	16,4	23,73	23,93	32,8	31,98	15,2	75,9	107	38,9	70,3	36,2
A3	0,49	0,68	1,12	1,45	1,26	1	17,62	21,7	26,99	27,16	25,32	22,08	66,6	92,8	134,7	119,4	120	46,8
A4	0,94	0,76	1,59	1,61	1,28	0,41	26,99	25	30,33	30,89	31,33	21,93	42	79	82,9	98,8	96,9	81
A5	0,98	1,49	1,74	2,76	3,47	1,37	26,4	30,5	35,3	37,6	36,1	38,6	38,1	52	58,9	59,4	45,8	26
A6	0,98	1,33	1,76	1,75	1,54	1,02	37,45	42,12	44,57	44,19	41,48	33,6	45,1	69,8	63,1	56,2	53,5	40,8
A7	1	2,04	3,33	5,23	6,91	4,56	22,8	22,2	27,66	30,96	33,74	39,39	15,5	629,7	529,5	391,5	280,8	70,9
A8	1,04	2,08	3,34	1,11	1,07	0,85	18,57	24	29,7	26,2	24,8	22	17,4	74,7	79	69,3	42	39,7
A9	0,5	1,74	3,99	4,67	3,77	3,59	26,14	33,7	39,3	42,4	38,9	42,2	86,8	209,4	190,7	160,3	132,8	103,8
A10	1,44	2,79	5,4	8,43	10,06	1,88	21,3	25,9	33,7	33,76	39,38	28,62	32,5	251	247,6	145,7	77,5	17,3
A11	1,23	2,13	5,47	6,92	8,11	9	26	35,3	39,8	41,8	42,6	47,1	61,8	261,7	273,9	238,1	224	189,7
B1	0,3	0,22	0,17	0,16	0,15	0,1	12,05	9,12	8,12	7,37	6,17	6	8,3	9,1	9	7,9	1,9	5,7
B2	0,1	0,14	0,18	0,15	0,1	0,09	8,93	9,89	12,1	11,54	9,52	6,06	19,8	39,3	28,3	23,3	18,4	20,8
B3	0,2	0,45	0,21	0,18	0,27	0,22	5,86	9,76	11,45	9,29	8,91	11,83	30,1	16,2	21,9	23,7	19,2	16,9
B4	0,17	0,14	0,22	0,19	0,23	0,16	7,77	5,89	8,05	11,43	10,23	14,13	12,1	14,6	11,6	8,7	19,7	27,9
B5	0,24	0,23	0,23	0,24	0,26	0,1	10,78	12,24	11,3	13,52	12,74	12,33	26,8	31,2	33,4	36,4	39	32,7
B6	0,33	0,35	0,28	0,24	0,22	0,2	7,73	7,7	6,48	4,96	4,91	11,42	3,6	7,8	5,3	6,2	5,3	7,7
B7	0,41	0,31	0,37	0,33	0,25	0,27	12,3	11,81	10,99	9,19	8,56	5,72	8	8,1	6,4	6,2	6,5	3,9
B8	0,42	0,5	0,51	0,4	0,56	0,4	11,35	12,08	14	15,3	12,7	8,5	11,9	15,8	19	14	12,2	10,9