

Rômulo Carvalho Vaz de Mello

Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico

MESTRADO EM PATOLOGIA

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte, Minas Gerais

2007

Rômulo Carvalho Vaz de Mello

Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade da Faculdade de Medicina da
UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Patologia
Área de Concentração: Propedêutica Complementar**

Orientador: Professora Silvana Maria Elói Santos

Co-Orientador: Professora Suzane Pretti Figueiredo Neves

Belo Horizonte – Minas Gerais

2007

Rômulo Carvalho Vaz de Mello

Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico

Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Professora Silvana Maria Elói Santos (Orientador-Presidente)

Professora Suzane Pretti Figueiredo Neves (Co-orientador)

Professor Pedro Guatimosin Vidigal (Membro titular)

Professora Débora d'Ávila Reis (Membro titular)

Professor Luiz Armando Cunha de Marco (Membro suplente)

Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Jaime Arturo Ramírez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
Área de Concentração em Propedêutica Complementar

COORDENADOR: Professor Geovani Dantas Cassali

SUB-COORDENADORA: Professora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

MEMBROS DO COLEGIADO:

Professor Anílton César Vasconcelos

Professora Helenice Gobbi

Professora Silvana Maria Elói Santos

Professor Wagner Luiz Tafuri

Rafael Malagoli Rocha (Representante Discente Titular)

Luciene Simões de Assis Tafuri (Representante Discente Suplente)

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Felício Rocho, na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Luxemburgo, na Unidade de Cuidados Intensivos do Pronto Atendimento, na Unidade de Terapia Intensiva e na Unidade Funcional Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Professora Silvana Maria Elói Santos e da Professora Suzane Pretti Figueiredo Neves, e contou com as colaborações de:

Dr. Eduardo Pimentel Dias: Departamento de Propedêutica Complementar – Faculdade de Medicina/UFMG

Dr. Eduardo Fonseca Sad: Unidade de Terapia Intensiva – Hospitais Felício Rocho e Luxemburgo

Bertha Andrade Coelho: Faculdade de Medicina/UFMG

Julienne Borges: Hospital Felício Rocho

Dedicatória

Ao meu grande amor, minha linda e doce Inês, que me apoiou em todos os momentos. Entendeu minhas frustrações, compreendeu minhas ausências, e compartilhou minhas alegrias.

Meus pais René e Lúcia, que deram suporte para todas as coisas que fiz na vida, e permitiram que me tornasse o que sou, moral e intelectualmente. Obrigado pelo amor e carinho.

Minhas irmãs Renata e Fernanda, que sempre fizeram mais por mim do que eu por elas, e me ajudaram e me amaram sempre. Só posso agradecer ter vocês ao meu lado.

Ao meus afilhados Pedro e Lívia, por me mostrarem que nada é tão urgente que não permita mais alguns minutos com eles, brincando e vendo seus sorrisos lindos e inocentes.

Agradecimentos

Várias pessoas foram importantes para a concretização deste desafio. Antecipadamente, peço perdão àqueles que porventura eu tenha esquecido. Quem me conhece (e minha cabeça) sabe que não foi por mal.

Ao Professor Eduardo Pimentel Dias, pela colaboração, disponibilidade e apoio, sem os quais este trabalho não chegaria ao seu final.

Às orientadoras, Professora Silvana Maria Elói Santos e Suzane Pretti Figueiredo Neves, pelo apoio e dedicação.

À Bertha, pela colaboração fundamental em toda a pesquisa, principalmente na parte mais difícil desta pesquisa.

Aos coordenadores do Laboratório Central, Dra. Vânia Lino, Dra. Magda Bahia, Dra. Luciana de Gouvêa, e Sra. Maristela Brum, e das instituições onde houve seleção de pacientes, Dra. Paula Valadares, Dr. Vítor Tadeu Vaz Tostes, Dr. Eduardo Fonseca Sad, Dr. Rogério de Castro Pereira, por permitirem a realização do trabalho nas instituições que dirigem.

Aos amigos e colegas do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial os do Setor de Soro-Imunologia e Hormônios, pela ajuda com o material da pesquisa, apoio para a realização dos testes e por compartilharem comigo alguns momentos prazerosos de trabalho (e outros nem tanto).

À DPC Medlab, através do Sr. Carlos e da Sra Laudislene, e à Johnson & Johnson, através da Sra. Kelly, por terem gentilmente cedido os testes utilizados na pesquisa.

Ao Dr. Ayrton Custódio Moreira, por gentilmente ter fornecido as amostras para a avaliação dos métodos.

A todos os médicos, residentes e estudantes que auxiliaram na seleção e coleta das amostras.

Aos amigos médicos Guilherme Collares, Marcelo Luide, Sandra Guerra, Luís Fernando de Carvalho, Dayrell Andrade, Leonardo Vaz de Mello, Marcelo Ferreira, Cláudio Motta, e vários outros, pela ajuda, amizade, e pelo exemplo de como exercer a profissão com excelência.

Aos todos os meus tios, primos, sem exceção, e minhas avós, pelo carinho, apoio, em todas as fases da minha vida.

Aos amigos verdadeiros, que não me esqueceram neste período de profundo estudo e “sumiço”. Não vou nomear porque a lista é grande.

Aos amigos e colegas do Laboratório São José e da Clube Academia, em especial ao José Antônio, por permitirem que eu pudesse abrir mão de várias obrigações para realizar este projeto.

Aos grandes mestres médicos, que guiaram minha formação, em especial Dr. Osmar de Araújo Belo, Dr. Hermann Alexandre Vivacqua von Tiesenhausen, Dr. Tício Couto e Dr. Raimundo Fontenelle Mascarenhas, representando cada etapa importante da minha formação.

Por último, o mais especial dos agradecimentos, talvez uma homenagem, tardia, àquele que foi o grande mestre, Dr. Geraldo Lustosa Cabral. Seu exemplo, e a luz de sua sabedoria serão sempre meus guias.

Índice das tabelas

Índice das figuras

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1	Fisiologia do cortisol e regulação da sua síntese e secreção.....	05
2.2	Circulação do cortisol.....	07
2.3	Ações do cortisol no organismo.....	07
2.4	O cortisol durante o estímulo agudo.....	08
2.5	Insuficiência adrenal relativa.....	10
2.6	Crterios para o diagnóstico da insuficiência adrenal relativa.....	11
2.7	Avaliação da função adrenal através do cortisol livre sérico.....	13
2.8	Avaliação da função adrenal através do cortisol salivar.....	14
3	OBJETIVOS.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	Amostras.....	19
4.1.2	Amostras para validação dos testes.....	19
4.1.3	Amostras para o ensaio clínico.....	19
4.2	Coleta dos materiais.....	22
4.3	Armazenamento das amostras.....	23
4.4	Ensaio analítico.....	23

4.4.1	Cortisol sérico.....	23
4.4.2	Cortisol salivar.....	24
4.4.3	Albumina sérica.....	27
4.5	Análise estatística.....	27
4.6	Aspectos éticos.....	28
5	RESULTADOS.....	29
	Parte I – Avaliação dos testes.....	30
5.1	Avaliação dos testes para cortisol salivar.....	30
5.1.1	Correlação entre o método comparativo e o método teste 1.....	32
5.1.2	Correlação entre o método comparativo e o método teste 2.....	33
	Parte II – Estudo clínico.....	35
5.2	Avaliação dos grupos de estudo.....	35
5.2.1	Apresentação descritiva da amostra.....	35
5.2.2	Valores de cortisol sérico.....	37
5.2.3	Valores de cortisol salivar.....	38
5.2.4	Valores de albumina.....	39
5.3	Análise da correlação entre os valores de cortisol sérico e salivar.....	40
5.3.1	Correlação entre cortisol sérico e salivar em todos os pacientes.....	40
5.3.2	Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 1.....	41
5.3.3	Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 2.....	42
5.3.4	Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 3.....	43
5.4	Influência da albumina nas concentrações do cortisol sérico e do salivar.....	45
5.5	Cortisol como fator de prognóstico.....	46
5.5.1	Valores de cortisol sérico nos pacientes que evoluíram para óbito ou alta hospitalar.....	47

5.5.2	Valores de cortisol salivar nos pacientes que evoluíram para óbito ou alta hospitalar.....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	59
8	PROPOSIÇÕES.....	61
9	ANEXOS.....	63
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

Lista das tabelas

Tabela 1	Taxas de mortalidade de acordo com os níveis de cortisol sérico.....	09
Tabela 2	Valores de cortisol sérico total utilizados por diferentes autores para o diagnóstico da insuficiência adrenal relativa.....	12
Tabela 3	Critérios de sepse grave estabelecidos pelos membros do American College of Chest Physicians e Society of Critical Care utilizados para inclusão de pacientes no grupo 1 do estudo. Para o diagnóstico de sepse grave, considera-se a presença do critério 1, pelo menos dois itens do critério 2 e pelo menos um item do critério 3.....	21
Tabela 4	Valores de cortisol salivar no método de referência e nos dois métodos testados.....	31
Tabela 5	Dados descritivos da amostra.....	36
Tabela 6	Valores de cortisol salivar obtidos através das fórmulas de regressão linear encontradas na análise da correlação entre cortisol sérico e salivar, nos pacientes do grupo 1 e do grupo 3.....	44
Tabela 7	Índice de mortalidade estratificado por classes de valores de cortisol sérico. Valores de p de acordo com o teste Z para a diferença entre as classes de cortisol, conforme Sam et al: A x B: $p = 0,10$; A x C: $p = 0,50$;	

A x D: $p = 0,22$; B x C: $p = 0,15$; B x D: $p < 0,01$; C x D: $p < 0,01$ 48

Tabela 8 Índices de mortalidade, uso de glicocorticóides e prevalência de IAR na amostra dividida de acordo com alguns valores de corte propostos na literatura..... 49

Tabela 9 Índice de mortalidade estratificado por classes de valores de cortisol salivar. Valores de p de acordo com o teste Z para a diferença entre as classes: A x B: $p = 0,32$; A x C: $p < 0,05$; A x D: $p < 0,01$; B x C: $p = 0,39$; B x D: $p < 0,05$; C x D: $p = 0,10$ 51

Lista de figuras

- Figura 1 Representação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal e funções do cortisol no sistema imune. Na parte de cima, representada através das linhas contínuas, verifica-se a secreção de CRH pelo hipotálamo, que estimula a hipófise a secretar ACTH, que por sua vez, atua na adrenal, promovendo a síntese e liberação do cortisol. Os níveis elevados de cortisol exercem efeito de retro-alimentação negativa, inibindo sua liberação, tanto no hipotálamo quanto na hipófise. Na parte de baixo da figura, representada pelas linhas pontilhadas, verifica-se a atuação do cortisol como modulador do sistema imune, sendo um potente agente anti-inflamatório. Verifica-se também a ação de citocinas inflamatórias, que alteram o efeito de retro-alimentação negativa, elevando o “*set-point*”, o que permite a elevação dos níveis do cortisol durante situação de estresse do organismo (Adaptado de Dluhy, 2005)..... 06
- Figura 2 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre método comparativo e método teste 1 (n = 19). Obteve-se correlação forte, com valor de r de Pearson de 0,94, com valor de $p < 0,01$ 32
- Figura 3 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre método comparativo e método teste 2 (n = 19). Obteve-se correlação forte, com valor de r de Pearson de 0,96, com valor de $p < 0,01$. Observa-se a melhor correlação entre os métodos em comparação com o método teste

- 1, com melhor posicionamento da reta e distribuição mais linear dos valores..... 33
- Figura 4 Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol sérico nos três grupos estudados (Grupo 1: n=27, Grupo 2: n=15, Grupo 3: n=19). As amostras foram testadas pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 26,50 µg/dL; Grupo 2 = 18,70 µg/dL; Grupo 3 = 11,35 µg/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas através do valor de *p*..... 37
- Figura 5 Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol salivar nos três grupos estudados (Grupo 1: n=19, Grupo 2: n=14, Grupo 3: n=18). As amostras foram testadas pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 7,00 µg/dL; Grupo 2 = 2,71 µg/dL; Grupo 3 = 0,50 µg/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas com o valor de *p*. Dois pontos de valores do grupo 1 (55,5 e 63,3 µg/dL) foram excluídos do gráfico para facilitar a visualização dos dados..... 38
- Figura 6 Gráfico de dispersão de valores individuais de albumina sérica nos três grupos estudados (Grupo 1: n=27, Grupo 2: n=15, Grupo 3: n=19). As amostras foram testadas pelo ensaio colorimétrico em química seca – Johnson & Johnson[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 1,9 g/dL; Grupo 2 = 2,6 g/dL; Grupo 3 = 4,3 g/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas com o valor de *p*..... 39

Figura 7 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes envolvidos no estudo (n = 51). A correlação encontrada foi forte, com valor de *r* de Pearson de 0,89, e *p* < 0,01..... 40

Figura 8 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 1 (n = 19). A correlação encontrada foi forte, com valor de *r* de Pearson de 0,92, e *p* < 0,01. A fórmula da regressão linear encontrada para o grupo 1 foi: Cortisol salivar = 0,292 x cortisol sérico + 1,35..... 41

Figura 9 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 2 (n = 14). A correlação encontrada foi moderada, com valor de *r* de Pearson de 0,51, e *p* = 0,06..... 42

Figura 10 Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio

enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 3 (n = 18). A correlação encontrada foi forte, com valor de *r* de Pearson de 0,70, e *p* < 0,01. A fórmula da regressão linear encontrada para o grupo 3 foi: Cortisol salivar = 0,113 x cortisol sérico – 0,461..... 43

Figura 11 Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol sérico dos pacientes que evoluíram para alta hospitalar (n=12) e dos pacientes que evoluíram para óbito (n=15) no Grupo 1 do estudo, de pacientes com sepse grave. As amostras foram testadas pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Alta = 23,0 µg/dL x Óbito = 33,5 µg/dL). A diferença estatística está demonstrada com o valor de *p*..... 47

Figura 12 Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol salivar dos pacientes que evoluíram para alta hospitalar (n=9) e dos pacientes que evoluíram para óbito (n=10) no Grupo 1 do estudo, de pacientes com sepse grave. As amostras foram testadas pelo imunoensaio enzimático em microplacas – DSL[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Alta = 3,80 µg/dL x Óbito = 8,75 µg/dL). A diferença estatística está demonstrada com o valor de *p*..... 50

Lista de abreviaturas e símbolos

ACTH.....	Hormônio Adrenocorticotrófico
AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP.....	Adenosina Tri-fosfato
Bpm.....	Batimentos por minuto
CBG.....	Globulina Ligadora de Cortisol
CRH.....	Hormônio Liberador de Corticotropina
DP.....	Desvio padrão
DPC.....	Diagnostic Products Corporation
IAR.....	Insuficiência Adrenal Relativa
IEE.....	Imunoensaio enzimático
IL.....	Interleucina
INF.....	Interferon
INR.....	Índice relativo de normalidade
Irpm.....	Incursões respiratórias por minuto
PTTa.....	Tempo de tromboplastina parcial ativado
RIE.....	Radioimunoensaio
SNC.....	Sistema nervoso central
TNF.....	Fator de Necrose Tumoral
UTI.....	Unidade de terapia intensiva
Δ	Delta
^{125}I	Iodo 125

“Quando morremos,
nada pode ser levado conosco,
com a exceção das sementes lançadas
por nosso trabalho e do nosso conhecimento”

Dalai Lama

Resumo

VAZ DE MELLO, R.C. **Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico.**

Belo Horizonte, 2007. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

O paciente em estado crítico apresenta alterações na síntese e liberação do cortisol, com grandes elevações nos níveis séricos, que são proporcionais à gravidade do quadro. Alguns pacientes, todavia, apresentam resposta adrenal que é inadequada ao estresse pelo qual o organismo está passando, estando o cortisol elevado, porém em um nível insuficiente para exercer efeito benéfico sobre a homeostase, quadro denominado “insuficiência adrenal relativa”. Estes pacientes evoluem com doença mais grave, e maiores índices de mortalidade. Hoje, a avaliação da glândula adrenal no paciente crítico é realizada pela dosagem do cortisol sérico total, incluindo fração livre e ligada a proteínas. A avaliação pelo cortisol livre sérico parece ser mais fidedigna que a dosagem do cortisol sérico total, por se tratar da fração ativa do hormônio, e por não sofrer influência das variações nos níveis de proteínas, comuns nestes pacientes. A dosagem do cortisol salivar é um excelente índice da fração livre do cortisol. O objetivo deste estudo foi avaliar os valores de cortisol sérico e salivar no paciente em estado crítico, verificando a correlação entre os valores, e a correlação com o prognóstico. Foram selecionados sessenta e seis pacientes divididos em 3 grupos: vinte e sete pacientes com sepse grave em unidade de terapia intensiva, vinte pacientes em pós-operatório estável em unidade de terapia intensiva, e dezenove pacientes saudáveis como controle. A correlação entre o cortisol sérico e salivar foi forte, com valor de r de Pearson de 0,89, e valores elevados do cortisol sérico e salivar se associaram a maior mortalidade. Os valores de cortisol salivar apresentaram elevações mais muito mais pronunciadas e relação aos níveis basais, por não estar ligado a proteínas, e apresentaram melhor associação com a mortalidade.

Abstract

VAZ DE MELLO, R.C. **Evaluation of salivary cortisol in critical care patient.** Belo Horizonte, 2007. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Critical care patient presents important alterations in synthesis and release of cortisol, with great elevation of its serum levels, proportional to the severity of the case. Some patients, other way, presents adrenal response that is inadequate for the stress which the organism is passing through, with elevated serum cortisol, but in an insufficient level to make benefit to the homeostasis. This state is named "relative adrenal insufficiency". These patients present more severe disease, and higher mortality. To date, adrenal evaluation in critical care patients is based on serum levels of total cortisol, including, free fraction plus protein-bonded fraction. Adrenal evaluation by serum free cortisol seems to be more reliable, reflecting active fraction of hormone. Salivary cortisol represents an excellent index of serum free cortisol. The objective of the study was to evaluate values of total serum and salivary cortisol in critical care patients, evaluating correlation among values, and the correlation with patient prognosis. Sixty six patients were divided in 3 groups: twenty seven patients with severe sepsis, from intensive care unit, twenty post-operative stable patients in intensive care unit, and nineteen healthy controls. We found a strong serum and salivary cortisol correlation, with Pearson r value of 0,89, and serum total and salivary cortisol elevated levels were associated with higher mortality. Salivary cortisol levels presented more significant elevations compared with basal levels, because they are not bond to protein, and were better associated with mortality.

INTRODUÇÃO

O paciente em estado crítico apresenta importantes alterações na síntese e liberação do cortisol. Durante o processo agudo, como mecanismo de adaptação à situação de estresse sistêmico, o cortisol apresenta-se como modulador do sistema imune e possui importante papel na regulação do processo inflamatório. É um potente agente anti-inflamatório, diminuindo o acúmulo de células inflamatórias no sítio do processo inflamatório, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, e aumentando a concentração de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e TGF- β (Marik et al, 2002). Assim, observa-se aumento na secreção e liberação do hormônio, para níveis até 6 vezes acima dos valores basais. Quanto mais elevados os valores de cortisol no paciente crítico, mais grave é a doença, e maior a taxa de mortalidade (Cooper et al, 2003; Sam et al, 2004).

Por outro lado, acredita-se que pacientes que apresentam valores pouco aumentados de cortisol possam estar apresentando uma resposta da glândula adrenal que seja insuficiente ao grau de estresse a que o organismo está sendo submetido. A esta condição, dá-se o nome atualmente de insuficiência adrenal relativa (Cooper et al, 2003). Estes pacientes geralmente apresentam doença mais grave, além de pior prognóstico. Estudos randomizados têm evidenciado aumento na sobrevivência desses pacientes com uso de baixas doses de hidrocortisona (Ananue et al, 2002).

O cortisol circula, em sua maior parte, ligado a proteínas plasmáticas, globulina ligadora do cortisol e albumina – sendo 10% encontrados na forma livre, biologicamente ativa. A avaliação da função adrenal nestes pacientes, baseada na dosagem do cortisol sérico total, pode estar prejudicada pelo fato destes pacientes apresentarem, frequentemente, alterações significativas nos níveis protéicos circulante, e, conseqüentemente, nos níveis de cortisol

total. A dosagem do cortisol livre sérico é uma técnica mal-padronizada, trabalhosa, e indisponível de maneira regular (Hamrahiam et al, 2004)

A dosagem do cortisol salivar é um excelente indicador da concentração plasmática do cortisol livre. Além de não se alterar com flutuações nos níveis das proteínas que se ligam ao cortisol, as amostras podem ser obtidas várias vezes ao dia, de maneira fácil, rápida e não invasiva (Raff, 2000). Tecnicamente, a dosagem do cortisol salivar é um método padronizado, bem estabelecido e rotineiro em grandes laboratórios.

A falta de estudos sobre o uso do cortisol salivar no paciente em estado crítico como ferramenta para avaliação da função adrenal, bem como a provável maior confiabilidade do cortisol salivar, por apresentar melhor correlação com o cortisol livre plasmático, fração ativa deste hormônio, e por não sofrer interferência dos fatores pré-analíticos motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiologia do cortisol e regulação da sua síntese e secreção

O cortisol é o hormônio esteróide mais potente produzido pela glândula adrenal. É sintetizado a partir do colesterol e sua secreção está sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, sendo regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico, o ACTH, produzido pela hipófise, que por sua vez, sofre influência de outro peptídeo, o CRH ou hormônio liberador de corticotrofina, produzido pelo hipotálamo (Aron et al, 2004).

A elevação dos níveis circulantes do cortisol promove inibição do eixo, através de um mecanismo de retro-alimentação (*feedback*) negativo, tanto no hipotálamo quanto na hipófise, levando à diminuição na sua secreção. Em situações fisiológicas, os níveis plasmáticos de cortisol correlacionam-se com os do ACTH (Figura 1).

O estímulo para liberação de CRH e ACTH pelo sistema nervoso central é episódico e rítmico, encontrando-se sincronizado com o ciclo sono-vigília, o ritmo circadiano. A produção de cortisol inicia-se, geralmente, com seis a oito horas de sono, com pico entre as oito horas e dez horas da manhã, quando a demanda por glicocorticóides é maior. Durante o dia, a concentração diminui gradativamente, havendo cada vez menos picos secretórios, podendo atingir níveis indetectáveis durante as primeiras horas de sono (Aron et al, 2004).

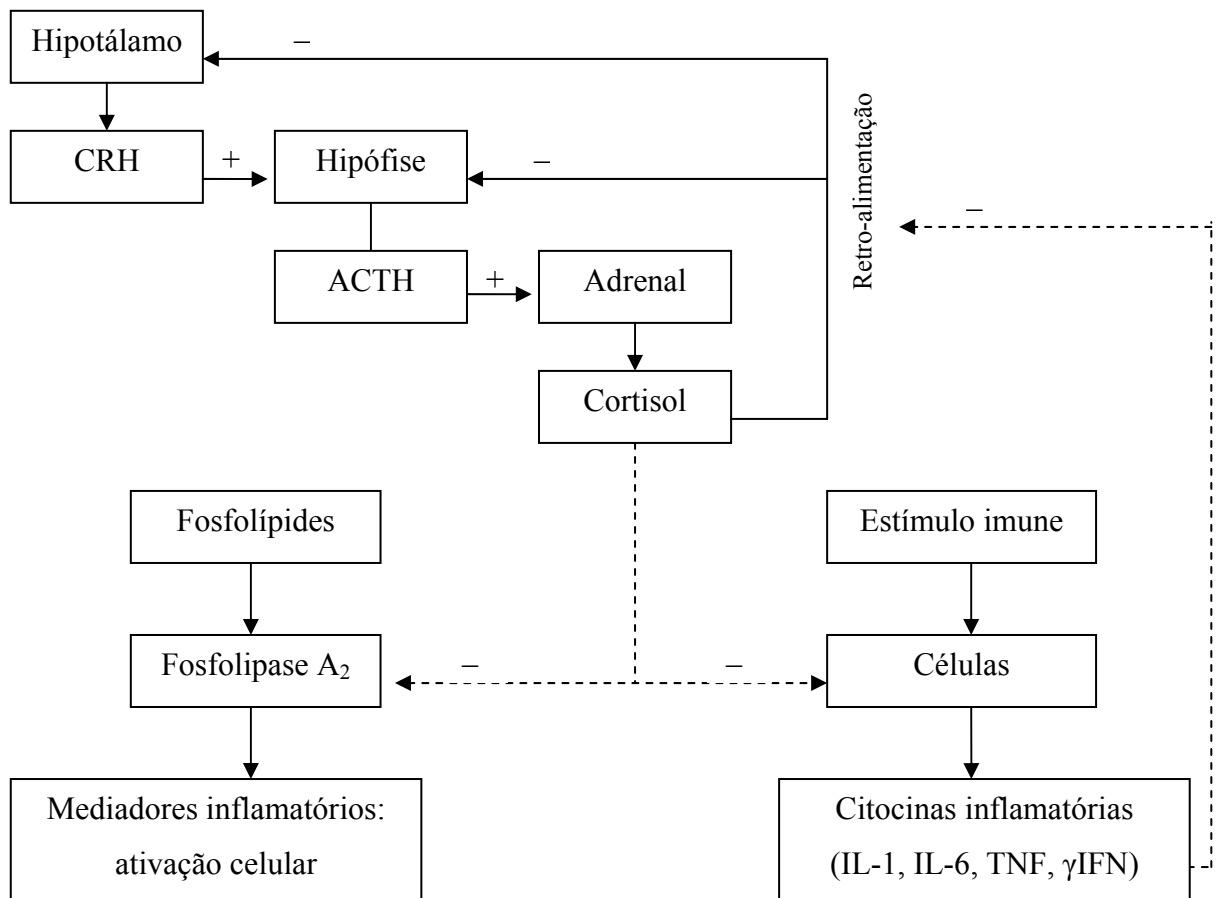


Figura 1 – Representação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal e funções do cortisol no sistema imune. Na parte de cima, representada através das linhas contínuas, verifica-se a secreção de CRH pelo hipotálamo, que estimula a hipófise a secretar ACTH, que por sua vez, atua na adrenal, promovendo a síntese e liberação do cortisol. Os níveis elevados de cortisol exercem efeito de retro-alimentação negativa, inibindo sua liberação, tanto no hipotálamo quanto na hipófise. Na parte de baixo da figura, representada pelas linhas pontilhadas, verifica-se a atuação do cortisol como modulador do sistema imune, sendo um potente agente anti-inflamatório. Verifica-se também a ação de citocinas inflamatórias, que alteram o efeito de retro-alimentação negativa, elevando o “*set-point*”, o que permite a elevação dos níveis do cortisol durante situação de estresse do organismo (Adaptado de Dluhy, 2005)

Algumas situações podem alterar este ritmo circadiano da secreção do cortisol, como alterações no padrão do sono, horários de alimentação, situações de estresse físico, como traumas, cirurgias e infecções; e psicológico, incluindo ansiedade grave, depressão e psicose, além de alterações no sistema nervoso central e hipófise, doenças hepáticas, insuficiência renal e alcoolismo (Aron et al, 2004).

2.2. Circulação do cortisol

No organismo humano, em condições basais, cerca de noventa por cento do cortisol circula ligado a proteínas (setenta e cinco por cento ligado à globulina ligadora de cortisol – CBG, e quinze por cento à albumina), e somente dez por cento circula livre no plasma, sendo esta a forma biologicamente ativa do hormônio, efetora das ações fisiológicas e da retroalimentação (Aron et al, 2004).

2.3. Ações do cortisol no organismo

O cortisol participa de vários processos homeostáticos do organismo. Destacam-se suas ações metabólicas, como elevações nos índices glicêmicos, através de estímulo à gliconeogênese hepática, que aumenta a oferta de glicose para as células, e ações catabólicas periféricas no músculo, pele e tecido adiposo, que leva à liberação de ácidos graxos, aumentando a oferta de energia, necessária para a resposta ao estresse e para a recuperação celular após algum dano (Marik et al, 2002).

Possui importante atuação no sistema cardiovascular, sendo necessário para a reatividade fisiológica do coração e vasos à angiotensina II, epinefrina, e nor-epinefrina, que contribui

para a manutenção do tônus vascular e da contratilidade miocárdica; reduzindo a vasodilatação induzida pelo óxido nítrico, modulando a permeabilidade vascular; e aumentando a síntese de angiotensinogênio, ATP e catecolaminas (Marik et al, 2002).

Além disso, destaca-se seu importante papel de modulador do sistema imune, sendo potente agente anti-inflamatório e imunossupressor. Através da inibição da enzima fosfolipase A_2 , modula a atuação de várias células que participam do processo inflamatório, como os linfócitos, neutrófilos, mastócitos e basófilos, diminuindo o acúmulo delas no sítio inflamatório, e das citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 e IL-6, o interferon gama, e o fator de necrose tumoral alfa – TNF α , e estimula a liberação de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10 (Marik et al, 2002). (Figura 1).

2.4. O cortisol durante o estímulo agudo

A presença de processo inflamatório ou de estresse sistêmico agudo leva a alteração na concentração plasmática do cortisol. Em resposta a este estímulo (liberação de citocinas, lesão tecidual, dor, hipotensão, hipoxemia), ocorre aumento na secreção deste hormônio, e os seus níveis plasmáticos podem atingir valores até seis vezes superiores em relação ao valor basal, sendo que esta elevação é proporcional à gravidade da doença (Cooper et al, 2003). Quanto maiores os níveis do cortisol no estresse agudo, pior o prognóstico, traduzido por maior taxa de mortalidade (Sam et al, 2004). (Tabela 1)

Tabela 1 – Taxas de mortalidade de acordo com os níveis de cortisol sérico

Cortisol sérico	Índice de Mortalidade
< 12,5 µg/dL	54%
12,5 – 20,0 µg/dL	53%
20,0 – 45,0 µg/dL	41%
> 45,0 µg/dL	81%**

** $p < 0,01$

Adaptado de Sam S. Clin Endocrinol, 2004;60:23-35

Em virtude dos elevados níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α , e a diminuição do feedback negativo exercido pelo cortisol sobre a produção de CRH e ACTH, observa-se perda do ritmo circadiano de sua secreção, relacionado à maior liberação dos seus reguladores (Dluhy, 2005). Ocorre também, diminuição nos níveis circulantes da albumina e da Globulina Ligadora de Cortisol – CBG, com diminuição da sua afinidade pelo cortisol, levando ao conseqüente aumento da fração livre, biologicamente ativa do cortisol. No sítio inflamatório, também são observados níveis elevados de cortisol livre, devido à quebra da CBG pela elastase dos neutrófilos. Além disso, as citocinas inflamatórias promovem aumento no número e na afinidade dos receptores intracelulares para cortisol (Cooper et al, 2003).

Estas alterações parecem ser importante mecanismo adaptativo do organismo na tentativa de regular a resposta inflamatória, levando em consideração as funções do cortisol como modulador da resposta imune (Rivers et al, 2001).

Esta resposta adaptativa pode estar alterada por fatores que prejudicam o funcionamento fisiológico da glândula, e levam à insuficiência adrenal. A secreção do cortisol pode estar diminuída ou bloqueada devido à inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, secundária ao trauma cerebral, infarto ou hemorragia hipofisária, ou o uso prévio de glicocorticóides. Doenças como a AIDS e algumas drogas podem também interferir na síntese cortisol como o cetoconazol ou o etomidato, através da inibição da enzima 21 α -hidroxilase, afetando a esteroidogênese (Marik et al, 2002).

2.5. Insuficiência adrenal relativa

Uma parte dos pacientes em estado crítico apresenta quadro que não se caracteriza como insuficiência adrenal, como descrito anteriormente, porém, eles apresentam resposta da glândula adrenal que é considerada inadequada às alterações que o organismo está apresentando. Os níveis de cortisol, apesar de estarem elevados, não são suficientes para exercer efeito benéfico sobre a homeostase do organismo, resultando em desequilíbrio entre a inflamação sistêmica e a resposta anti-inflamatória compensatória (Figura 1). Como resultado, ocorre aumento da atividade pró-inflamatória, com vasodilatação induzida pelo óxido nítrico e diminuição da expressão (down-regulation) dos receptores adrenérgicos. A esta situação clínica, dá-se o nome, atualmente, de “insuficiência adrenal relativa ou funcional”, devido ao fato de não haver um defeito estrutural no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Estes pacientes geralmente apresentam doença mais grave, além de pior prognóstico, marcado por aumento da mortalidade. Estudos randomizados têm evidenciado aumento na sobrevivência desses pacientes com uso de terapia de reposição com baixas doses de glicocorticóides (Annane et al, 2002 e 2004).

2.6. Critérios para o diagnóstico da insuficiência adrenal relativa

O método para avaliação da função da glândula adrenal neste tipo de paciente ainda não está bem estabelecido, existindo algumas divergências sobre qual o melhor parâmetro para se classificar o indivíduo criticamente doente como portador de insuficiência adrenal relativa (Marik et al, 2002) (Tabela 2).

Alguns autores preconizam a dosagem aleatória do cortisol sérico, já que ocorre perda do ritmo circadiano em sua secreção, utilizando pontos de corte que variam entre 15 e 25 $\mu\text{g/dL}$, sendo classificado como portador de insuficiência adrenal, o paciente que apresente níveis séricos de cortisol inferiores a um desses valores (Marik et al, 2003; Annane et al, 2004).

Outros preconizam estratégia diferente, baseada na dosagem do cortisol sérico antes e após estímulo com ACTH sintético (cortrosina), em doses alta (250 μg) ou baixa (1 μg). É feita dosagem do cortisol basal, trinta e sessenta minutos após injeção intravenosa da cortrosina. Neste tipo de abordagem, existem estratégias diferentes, com valores de corte escolhidos de maneira relativamente arbitrária, sendo necessário uma validação mais ampla para se chegar a valores de consenso (Cooper et al, 2003). Em uma dessas estratégias, os pacientes com cortisol abaixo de 20 $\mu\text{g/dL}$ em qualquer uma das dosagens são considerados como tendo insuficiência adrenal relativa (Manglik et al, 2003). Uma variante inclui, além dos níveis basais de cortisol inferiores a 20 $\mu\text{g/dL}$, elevação dos níveis de cortisol (Δ) inferiores a 9 $\mu\text{g/dL}$ após o estímulo, para classificar os pacientes como portadores de insuficiência adrenal (Rivers et al, 2001).

Tabela 2 – Valores de cortisol sérico total utilizados por diferentes autores para o diagnóstico da insuficiência adrenal relativa.

Autor	Valor de cortisol utilizado
Rivers et al, 2001	< 20,0 µg/dL + Δ < 9,0 µg/dL após ACTH sintético
Marik et al, 2002	< 25,0 µg/dL
Cooper et al, 2003	< 15,0 µg/dL ou Δ < 9,0 µg/dL após ACTH sintético se cortisol entre 15,0 a 34,0 µg/dL
Manglik et al, 2003	< 20,0 µg/dL após ACTH sintético
Annanne et al, 2004	< 15,0 µg/dL ou Δ < 9,0 µg/dL após ACTH sintético
Marik et al, 2005	< 15,0 µg/dL (hepatopatas altamente estressados) e < 20,0 µg/dL após ACTH sintético

Há ainda uma terceira estratégia, que leva em consideração três níveis de cortisol sérico total. Valores superiores a 34 µg/dL praticamente excluem o diagnóstico. Por outro lado, cortisol sérico inferior a 15 µg/dL tornam o diagnóstico de insuficiência adrenal relativa muito provável. Naqueles com valores intermediários, situados entre 15 e 34 µg/dL, o diagnóstico deve ser realizado baseando-se nos valores de cortisol antes e após o estímulo com cortrosina. Elevação superior ou igual a 9 µg/dL em relação ao valor basal, torna o diagnóstico menos provável, e inferior a 9 µg/dL o favorece (Cooper et al, 2003).

Devido à ausência de consenso, alguns autores consideram a resposta terapêutica ao uso empírico de doses baixas de corticosteróides como o melhor parâmetro para se classificar o indivíduo como portador de insuficiência adrenal relativa (Ligtenberg et al, 2004).

2.7. Avaliação da função adrenal através do cortisol sérico livre

Todas estas estratégias para a avaliação dos níveis circulantes deste hormônio, no paciente em estado crítico, baseiam-se na dosagem de cortisol sérico total como o parâmetro para o diagnóstico, e muitos autores consideram isto um grande equívoco neste tipo de avaliação. O cortisol circulante encontra-se, em sua maior parte, ligada a proteínas plasmáticas, sendo menos de dez por cento encontrados na forma livre, biologicamente ativa. Pacientes em estado crítico, pelos vários motivos descritos anteriormente, apresentam elevação nos valores do cortisol livre circulante, além de, freqüentemente, apresentarem alteração nos níveis de proteínas séricas, o que pode fazer com que a dosagem do cortisol sérico total não reflita o real estado de função da glândula adrenal (Hamrahian et al, 2005; Ho et al, 2006).

O cortisol sérico livre reflete de maneira mais eficaz a atividade glicocorticóide sistêmica do que o cortisol sérico total, por se tratar da fração biologicamente ativa do hormônio. Dessa forma, alguns autores têm recomendado a dosagem do cortisol sérico livre como método principal para investigação da função adrenal no paciente crítico, na tentativa de minimizar o efeito da alteração dos níveis protéicos circulantes na avaliação da função adrenal, melhor classificando como portadores ou não de insuficiência adrenal relativa, e melhor avaliando o prognóstico desses indivíduos (Annane et al, 2000; Hamrahian et al, 2005; Ho et al, 2006).

Todavia, as técnicas disponíveis atualmente para a dosagem do cortisol sérico livre não estão disponíveis nos laboratórios clínicos para uso rotineiro, pelo fato de serem demoradas, exigindo processos refinados de tratamento e extração do cortisol livre da amostra, sendo a medida realizada por métodos manuais, pouco disponíveis e altamente dispendiosos (Cohen et al, 2004).

2.8. Avaliação da função adrenal através do cortisol salivar

A dosagem do cortisol salivar é um excelente índice da concentração do cortisol livre, refletindo aproximadamente dois terços dos valores séricos. Além de não se alterar com flutuações nos níveis das proteínas que se ligam ao cortisol, as amostras podem ser obtidas várias vezes ao dia, de maneira fácil, rápida e não invasiva. Vários estudos já validaram a sua utilização na população geral, além de ter sido usado, com sucesso, no diagnóstico da Síndrome de Cushing (Castro et al, 2000; Raff et al, 2000). Entretanto, a correlação dos níveis de cortisol salivar com os níveis séricos de cortisol total ou livre, no paciente em estado crítico, não está completamente estabelecida, sendo que somente um estudo se destinou a avaliar a aplicação deste método em pacientes em estado crítico, porém sem obtenção de dados consistentes (Cohen et al, 2004). É possível que, no futuro, este teste venha a se tornar o método padrão para avaliação da função adrenal nestes pacientes.

Tecnicamente, a medida do cortisol salivar apresenta a vantagem de ser uma reação padronizada por boa parte dos grandes laboratórios clínicos, e já haver disponíveis algumas metodologias simples e fáceis de serem aplicadas à rotina diária, como os imunoenaios enzimáticos e os quimioluminescentes.

Além disto, valores para pacientes sadios já estão estabelecidos, inclusive para a população brasileira, o que facilita a sua utilização na prática diária (Castro et al, 1999).

OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar as concentrações do cortisol salivar em pacientes em estado crítico, e sua correlação com o cortisol sérico total.

3.2. Específicos

- Avaliar os métodos de dosagem do cortisol salivar para uso nesta pesquisa, frente a um método conhecido e amplamente utilizado, inclusive com valores de referência para a população sadia já estabelecidos na literatura.
- Comparar os valores de cortisol salivar com os valores de cortisol sérico total, verificando se há correlação entre esses valores, em 3 diferentes grupos de pacientes: sadios, pós-operatórios, e sépticos.
- Avaliar os valores de albumina sérica nos diferentes grupos de pacientes selecionados e verificar se existe interferência deste analito nas concentrações do cortisol salivar e sérico.
- Verificar se existe correlação dos valores de cortisol salivar e sérico com o prognóstico dos pacientes, avaliando a taxa de mortalidade no grupo dos pacientes sépticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

4.1.1. Amostras para avaliação dos testes

Para a avaliação dos ensaios de cortisol salivar a serem utilizados na pesquisa, foram utilizadas dezenove amostras de saliva, fornecidas pelo Dr. Ayrton Custódio Moreira, da Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, São Paulo, com concentração de cortisol conhecida, determinada pelo Radioimunoensaio (RIE) do tipo competição, descrito por Vieira et al, 1984. Este método é constituído por um anti-soro de coelho específico para cortisol, e reagente cortisol radiomarcado com Tritio. O cortisol contido na amostra compete com o cortisol radiomarcado pela ligação ao anti-soro. A concentração de cortisol na amostra é inversamente proporcional à leitura da marcação radioativa. O coeficiente de variação analítico do método é de 5,5 %, e a sensibilidade analítica é de 0,06 µg/dL. O valor médio encontrado em população sadia através do método foi $0,59 \pm 0,04$ µg/dL, com valor mínimo de 0,18 µg/dL e máximo de 1,04 µg/dL, descrito por Castro et al, 1999.

4.1.2. Amostras para estudo clínico

Foram selecionados sessenta e seis pacientes para a pesquisa. As coletas foram realizadas entre março e setembro de 2006. A amostra foi dividida em três grupos.

O grupo 1, foi composto por vinte e sete pacientes hospitalizados, em estado crítico, secundário a sepse grave, com alto grau de estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e idade igual ou superior a dezoito anos, provenientes das Unidades de Terapia Intensiva dos

Hospitais Luxemburgo e Felício Rocho, e da sala de cuidados intensivos do Pronto Atendimento e da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas da UFMG. O diagnóstico de sepse grave foi baseado nos critérios estabelecidos pelos membros do American College of Chest Physicians e Society of Critical Care (Tabela 3). Após a seleção dos pacientes, foi preenchida a ficha de inclusão no estudo (ANEXO A).

O grupo 2 foi composto por vinte pacientes hospitalizados, em pós-operatório, provenientes das Unidades de Terapia Intensiva dos Hospitais Luxemburgo, Felício Rocho e Hospital das Clínicas da UFMG. Todos os pacientes tinham idade igual ou superior a dezoito anos, e estavam hemodinamicamente estáveis, sem presença de complicações, sem uso de terapia de suporte (ventilação mecânica, aminas vasoativas, diálise), em estado de estresse fisiológico secundário ao trauma cirúrgico, e com previsão de alta da unidade nas vinte e quatro horas seguintes. Após a seleção dos pacientes, foi preenchida a ficha de inclusão no estudo (ANEXO B).

O grupo 3 foi composto por dezenove pacientes saudáveis, com idade igual ou superior a dezoito anos, que não estivessem apresentando nenhum dos critérios de exclusão para a participação no estudo. Após a seleção dos pacientes, foi preenchida a ficha de inclusão na pesquisa (ANEXO C).

Nenhuma vantagem ou benefício foi oferecido aos pacientes para que concordassem em participar do estudo.

Tabela 3 - Critérios de sepse grave estabelecidos pelos membros do American College of Chest Physicians e Society of Critical Care utilizados para inclusão de pacientes no grupo 1 do estudo. Para o diagnóstico de sepse grave, considera-se a presença do critério 1, pelo menos dois itens do critério 2 e pelo menos um item do critério 3.

	Critério	Parâmetro
1	Presença de infecção	Evidência clínica de foco infeccioso ou isolamento de microorganismo em cultura
2	a	Temperatura corporal > 38° C ou < 36° C
	b	Frequência cardíaca > 90 bpm
	c	Frequência respiratória > 20 irpm
	d	Leucócitos totais 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ , ou presença de 10% ou mais de bastões no sangue periférico
3	a	Falência cardiovascular Uso de amins vasoativas ou Pressão Arterial Sistólica < 90 mmHg, sem melhora após reposição de líquidos
	b	Falência respiratória Necessidade de ventilação mecânica
	c	Falência hepática INR > 1.5 ou PTTa > 60 segundos
	d	Falência renal Volume urinário inferior a 0,5 mL/kg/h
	e	Falência SNC Confusão mental ou perda da consciência

Os critérios de exclusão utilizados foram: infecção comprovada pelo vírus HIV; história de doença no eixo hipotálamo-hipofisário; de doença adrenal; uso de corticosteróides ou estrógenos no ano anterior; uso, nos últimos 6 meses, de alguma medicação que alterasse a

secreção de glicocorticóides (por ex. etomidato ou cetoconazol), mulheres grávidas ou amamentando.

Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido dos próprios pacientes ou dos familiares, nos casos de impossibilidade de obtenção do mesmo junto ao paciente (ANEXOS D, E e F).

4.2. Coleta dos materiais

Realizou-se a coleta de sangue através de punção venosa, preferencialmente em veias dos membros superiores, que não estivessem sendo utilizadas para soroterapia. Simultaneamente, coleta de saliva, utilizando-se sistema próprio para a coleta - Sallivette[®] (Sarstedt, Austrália) - que consiste em um rolo de algodão prensado em forma cilíndrica, que é colocado na cavidade oral do paciente, e após a saturação, retirado e colocado dentro de um tubo para centrifugação. Após a centrifugação, a saliva se deposita no fundo do tubo, sendo armazenada neste recipiente, após a eliminação do rolo de algodão. O tempo de coleta com o Salivette[®] foi preconizado como sendo o suficiente para que houvesse saturação do rolo de algodão, respeitando limite máximo de vinte minutos.

Para o grupo 1, as coletas foram realizadas imediatamente após o diagnóstico de sepse grave, e não havia horário pré-estabelecido para coleta.

Para o grupo 2, as amostras foram colhidas no pós-operatório, durante o período de internação na UTI, em pacientes com alta da unidade prevista para as vinte e quatro horas seguintes. Também não havia horário pré-estabelecido para a coleta.

Todas as amostras do grupo 3 foram colhidas entre as oito horas e as dez horas da manhã, na Faculdade de Medicina da UFMG.

4.3. Armazenamento das amostras

Após as coletas, as amostras de sangue poderiam permanecer em temperatura ambiente por até 6 horas antes do processamento. Todas foram centrifugadas por cinco minutos a 3000 rpm e o soro separado das células. Foi respeitado limite de quarenta e oito horas para que os soros, após separados, pudessem permanecer em temperatura entre 2°C e 8°C, sendo então congelados a -70°C, assim podendo permanecer por período de até dois anos. As amostras de saliva poderiam permanecer em temperatura ambiente por até 6 horas antes do processamento. Todas foram centrifugadas por cinco minutos a 3000 rpm., e estocadas em temperatura entre 2°C e 8°C por até quarenta e oito horas e depois mantidas congeladas a -70°C por até dois anos.

4.4. Ensaio analítico

Antes da realização dos testes, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e homogenizadas em aparelho tipo Vórtex.

4.4.1. Cortisol sérico

Os ensaios para cortisol sérico total foram realizados através de imunoensaio quimioluminescente do tipo competição, no sistema Immulite[®] - DPC[®] (Los Angeles, CA) totalmente automatizado. São utilizados para a reação: amostra e materiais de controle,

reagente conjugado com fosfatase alcalina, unidade teste, substrato, tampão de lavagem e luminômetro. A unidade teste é constituída por fase sólida composta por uma pérola de poliestireno recoberta com anticorpo policlonal de coelho específico para cortisol. A amostra e o reagente composto por cortisol conjugado com fosfatase alcalina são colocados na unidade teste simultaneamente, incubadas por trinta minutos, e competem pelo sítio de ligação na fase sólida. As substâncias não ligadas são removidas por uma etapa de lavagem e centrifugação, sendo então adicionado substrato quimioluminescente, composto por éster fosfato de adamantil dioxetano. A fosfatase alcalina degrada o substrato, gerando a emissão de fótons de luz, medidos pelo luminômetro. A emissão de luz é, portanto, inversamente proporcional à concentração de cortisol na amostra. Os valores da medição são comparados com a curva-padrão, e transformados em $\mu\text{g/dL}$.

As dosagens foram realizadas na mesma corrida analítica, após realização de teste com material de controle com valores conhecidos, em dois níveis distintos (normal e alto), fornecidos pelo fabricante. Para a validação da corrida analítica através dos materiais de controle, foram considerados os valores de média e de desvio-padrão estipulados nas instruções de uso. O volume mínimo de amostra necessário para realização dos testes foi de 100 μL . As análises foram realizadas no setor de Soro-Imunologia e Hormônios da Unidade Funcional Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte.

4.4.2. Cortisol salivar

O cortisol salivar foi analisado por dois métodos diferentes. O primeiro método utilizado foi o radioimunoensaio (RIE) da marca DPC[®] (Los Angeles, CA.), do tipo competição.

Para a reação são necessários: amostras, controles, calibradores, reagente cortisol conjugado com Iodo¹²⁵, unidade teste, composta por tubo de polipropileno recoberto por anticorpo específico para cortisol e contador gama. As amostras e o reagente conjugado com ¹²⁵I são colocados simultaneamente no tubo de polipropileno e incubadas por duas horas. Ocorre competição pelo sítio de ligação na fase sólida entre o cortisol da amostra e o cortisol marcado. Após a incubação, faz-se a decantação do sobrenadante, e procede-se a leitura em contador gama. A emissão radioativa é, portanto, inversamente proporcional à concentração de cortisol na amostra. Os valores da medição são comparados com a curva-padrão, e transformados em µg/dL.

As dosagens foram realizadas em duas corridas analíticas, após realização de teste com material de controle com valores conhecidos, em dois níveis distintos (normal e alto), fornecidos pelo fabricante. Para a validação da corrida analítica através dos materiais de controle, foram considerados os valores de média e de desvio-padrão estipulados nas instruções de uso. O volume mínimo de amostra necessário para realização dos testes foi de 200 µL. As análises foram realizadas no setor de Soro-Imunologia e Hormônios da Unidade Funcional Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte, e a pipetagem das amostras, controles e reagentes foi realizada manualmente, sendo que a leitura da radiomarcagem em contador de raios gama foi realizada no Laboratório Hemobel, em Belo Horizonte.

O segundo método utilizado foi o imunoenensaio enzimático (IEE) de microplacas da marca DSL[®], (Texas, USA) do tipo competição. São utilizados para a reação: amostras, controles, calibradores, microplacas de poliestireno com unidades teste recobertas por anticorpos contra imunoglobulinas de coelho, antisoro contendo anticorpos de coelho específicos para

cortisol, reagente cortisol conjugado com peroxidase, substrato cromogênico, tampão de lavagem, solução de paragem e leitor de microplacas. As amostras, controles e calibradores são pipetados nas unidades teste simultaneamente com o reagente cortisol conjugado com peroxidase e o antisoro de coelho anti-cortisol. Os anticorpos de coelho são capturados pelo anticorpo fixado à fase sólida. O cortisol da amostra e o reagente cortisol competem pelo sítio de ligação. O material não ligado é removido pela etapa de lavagem. É adicionado substrato cromogênico, a peroxidase degrada o substrato, havendo formação de cor no poço de reação. A absorbância é lida no leitor de microplacas e a quantidade de cor formada é inversamente proporcional à concentração de cortisol na amostra. Os valores de absorbância das amostras são comparados com a curva-padrão traçada com a avaliação da absorbância dos calibradores, e transformados em $\mu\text{g/dL}$.

As dosagens foram realizadas em duas corridas analíticas. Para a validação das corridas analíticas, através da avaliação do material de controle com valores conhecidos, em dois níveis distintos (normal e alto), fornecidos pelo fabricante, junto com o kit, foram considerados os valores de média e desvio-padrão estipulados nas instruções de uso. O volume mínimo de amostra necessário para realização dos testes foi de 25 μL . As análises foram realizadas no setor de Soro-Imunologia e Hormônios da Unidade Funcional Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte. Foi realizada pipetagem manual de amostras e reagentes, com lavagem e leitura da microplaca realizada em lavadora e leitora automática de microplacas da marca Thermo Plate[®].

4.4.3. Albumina sérica

A albumina sérica foi dosada pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol, em química seca no sistema automatizado Vitros Fusion[®] (Johnson & Johnson[®], USA). A albumina da amostra, em contato com o Verde de Bromocresol reage com o composto e desenvolve coloração verde no *slide*-teste. A cor é lida pelo fotômetro e transformada em concentração através da comparação com a curva padrão. A concentração de albumina na amostra é diretamente proporcional à formação de cor na reação.

As dosagens foram realizadas em uma única corrida analítica, após realização de teste com material de controle com valores conhecidos, em dois níveis distintos (normal e alto), fornecidos pela Johnson & Johnson[®]. Para a validação da corrida analítica através dos materiais de controle, foram considerados os valores de média e de desvio-padrão estipulados pela Johnson & Johnson[®]. O volume mínimo de amostra necessário para realização dos testes foi de 100 µL. As análises foram realizadas no setor de Bioquímica Soro-Imunologia e Hormônios da Unidade Funcional Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFMG, em Belo Horizonte.

4.5. Análise estatística

A Análise dos dados foi realizada empregando-se o “*software*” Minitab[®] para Windows[®], versão 13.2. A análise de correlação dos valores foi obtida através de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r), com obtenção do valor de p . Coeficiente de correlação inferior a 0,4 foi classificado como fraco; acima de 0,4 até 0,7 como moderado, e acima de 0,7 como forte. Para comparação entre valores com

distribuição não-normal, foi utilizado teste não-paramétrico. Para comparação entre proporções, utilizou-se o teste Z. Considerou-se o valor de 5% como limiar de significância estatística.

4.6. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, cujo parecer recebeu o número 282/05.

RESULTADOS

Parte I – Avaliação dos ensaios

5.1. Avaliação dos ensaios para cortisol salivar

Para avaliação de ambos os métodos de dosagem de cortisol salivar empregados nesse estudo, o radioimunoensaio – DPC[®], denominado método teste 1, e o imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], denominado método teste 2, procedemos à análise e comparação das 19 amostras de saliva com concentrações de cortisol previamente conhecidas, fornecidas pelo Dr. Ayrton Custódio Moreira. Essas amostras haviam sido testadas na Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, pelo método de Radioimunoensaio (RIE), conforme descrito por Vieira et al, 1984. (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de cortisol salivar no método comparativo e nos dois métodos testados

Identificação	Método comparativo	Método teste 1	Método teste 2
RI 01	2,35 µg/dL	0,09 µg/dL	3,10 µg/dL
RI 02	6,96 µg/dL	3,95 µg/dL	6,00 µg/dL
RI 03	6,10 µg/dL	3,33 µg/dL	5,14 µg/dL
RI 04	3,40 µg/dL	1,89 µg/dL	3,96 µg/dL
RI 05	2,85 µg/dL	1,24 µg/dL	3,19 µg/dL
RI 06	2,62 µg/dL	0,26 µg/dL	1,20 µg/dL
RI 07	0,56 µg/dL	0,09 µg/dL	0,08 µg/dL
RI 08	0,41 µg/dL	0,03 µg/dL	0,51 µg/dL
RI 09	1,48 µg/dL	0,46 µg/dL	1,42 µg/dL
RI 10	0,10 µg/dL	0,03 µg/dL	0,03 µg/dL
RI 11	0,06 µg/dL	0,02 µg/dL	0,02 µg/dL
RI 12	2,24 µg/dL	0,65 µg/dL	1,73 µg/dL
RI 13	0,32 µg/dL	0,02 µg/dL	0,57 µg/dL
RI 14	1,26 µg/dL	0,19 µg/dL	0,99 µg/dL
RI 15	0,19 µg/dL	0,04 µg/dL	0,05 µg/dL
RI 16	1,00 µg/dL	0,27 µg/dL	1,31 µg/dL
RI 17	0,40 µg/dL	0,07 µg/dL	0,14 µg/dL
RI 18	0,06 µg/dL	0,03 µg/dL	0,07 µg/dL
RI 19	0,06 µg/dL	0,04 µg/dL	0,02 µg/dL

5.1.1. Correlação entre o método comparativo e o método teste 1

A média dos valores de cortisol pelo método comparativo foi de 1,70 $\mu\text{g/dL}$, enquanto no método teste 1 foi de 0,67 $\mu\text{g/dL}$, com um bias médio negativo de 63%. A correlação encontrada entre os métodos foi forte, com coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,95, e valor de $p < 0,01$ (Figura 2). A fórmula encontrada na regressão linear foi: Método teste 1 = 0,544 x Método comparativo – 0,257.

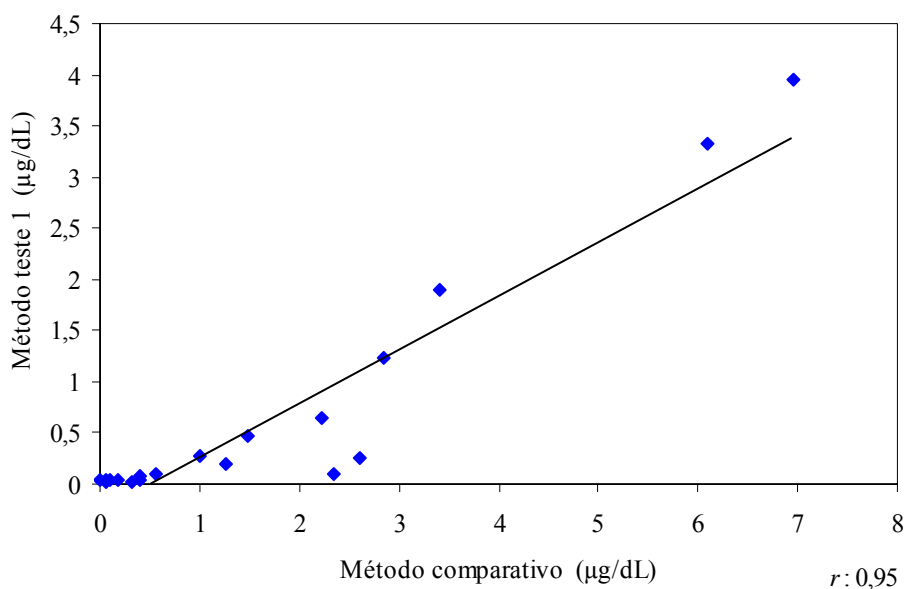


Figura 2 – Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre método comparativo e método teste 1 ($n = 19$). Obteve-se correlação forte, com valor de r de Pearson de 0,95, com valor de $p < 0,01$.

O coeficiente de variação analítica intra-ensaio segundo o fabricante é de 4%, e a sensibilidade analítica do método de 0,02 $\mu\text{g/dL}$.

5.1.2. Correlação entre o método comparativo e o método teste 2

A média dos valores de cortisol pelo método comparativo foi de 1,70 $\mu\text{g/dL}$, enquanto no método teste 2 foi de 1,55 $\mu\text{g/dL}$, apresentando um bias médio negativo de 15%. A correlação encontrada entre os métodos foi forte, com valor de r de 0,96, e valor de $p < 0,01$ (Figura 3). A fórmula encontrada na regressão linear foi: Método teste 2 = 0,886 x Método comparativo + 0,0441.

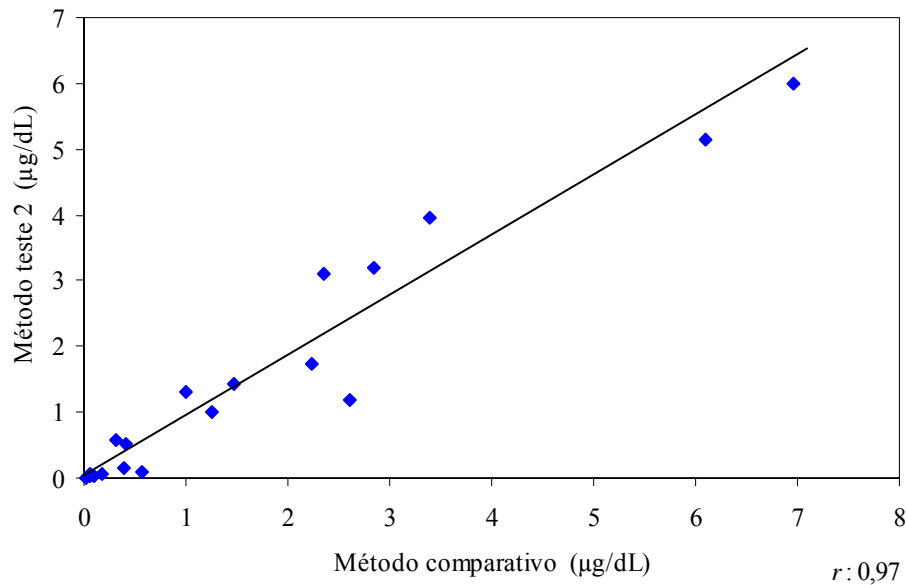


Figura 3 - Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre método comparativo e método teste 2 ($n = 19$). Obteve-se correlação forte, com valor de r de Pearson de 0,97, com valor de $p < 0,01$. Observa-se a melhor correlação entre os métodos em comparação com o método teste 1, com melhor posicionamento da reta e distribuição mais linear dos valores.

O coeficiente de variação analítica intra-ensaio segundo o fabricante é de 2%, e a sensibilidade analítica do método é de 0,01 $\mu\text{g/dL}$.

O método teste 2 foi o escolhido para a avaliação dos pacientes incluídos na pesquisa, em virtude de ter apresentado melhor grau de concordância com o método comparativo (figura 3), e, principalmente, por exigir um volume de amostra significativamente menor (25 μL) que o método teste 1 (200 μL), permitindo a inclusão de maior número de pacientes no estudo. Além disso, destaca-se a facilidade de realização dos testes, sem necessidade de grandes automações, com reagentes seguros, e não tóxicos.

Parte II – Estudo clínico

5.2. Avaliação dos grupos do estudo

Após a definição do método de ensaio para cortisol salivar, procedeu-se à avaliação dos três grupos propostos: grupo 1: pacientes hospitalizados, em estado crítico, secundário a sepse grave; grupo 2: pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva, em pós-operatório; grupo 3: grupo controle, composto por pacientes saudáveis.

5.2.1. Apresentação descritiva da amostra

As medianas das idades entre os pacientes dos três grupos foram, com significância estatística, diferentes entre si, através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Não houve diferença, através do teste de Mann-Whitney, entre a idade dos pacientes dos grupos 1 e 2, porém, os valores destes dois grupos foram mais elevados do que do grupo 3, com valor de $p < 0,01$, pelo teste de Mann-Whitney. Não houve diferença estatística entre sexo nos três grupos avaliados (Tabela 5). Os principais critérios para inclusão de pacientes no grupo 1 do estudo foram as alterações cardiovasculares, presentes em aproximadamente 90% dos pacientes; e respiratórias, presentes em mais de 70% dos pacientes. O índice de mortalidade no grupo 1 ao final da pesquisa foi de 56% (Tabela 5).

Dos incluídos inicialmente no estudo, oito dos vinte e sete pacientes do grupo 1 (30%), seis dos vinte pacientes do grupo 2 (30%) e um dos dezenove pacientes do grupo 3 (5%), apresentaram volume insuficiente de saliva para realização da dosagem do cortisol.

Tabela 5 – Dados descritivos da amostra

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	Sepse	Pós-operatório	Sadios
<i>n</i>	27	20	19
Idade	57,7 ± 14,2	60,4 ± 12,8	40,1 ± 10,3*
Homens	55%	47%	28%
Evidência de infecção	100%	–	–
Temperatura axilar < 36 ou > 38o. C	44%	–	–
Frequência cardíaca > 90 bpm	89%	–	–
Frequência respiratória > 20 irpm	78%	–	–
Leucócitos: < 4000 ou > 12000/mm3 ou > 10% bastões	67%	–	–
Falência – Cardíaca	93%	–	–
– Respiratória	74%	–	–
– Sistema nervoso central	26%	–	–
– Renal	19%	–	–
– Hepático	7%	–	–
Uso de antibióticos	100%	–	–
Terapia de suporte – Aminoácidos vasoativos	93%	–	–
– Ventilação mecânica	78%	–	–
– Diálise	11%	–	–
Uso de corticosteróides	37%	–	–
Mortalidade	56%	–	–
Cortisol salivar (µg/dL) – Média + DP	11,90 ± 17,00	2,18 ± 1,46	1,00 ± 0,87
– Mediana	7,00*	2,71*	0,50*
– Min-Máx	1,20 – 63,30	0,30 – 4,83	0,30 – 3,20
Cortisol sérico (µg/dL) – Média + DP	39,20 ± 34,80	19,44 ± 6,4	13,02 ± 4,95
– Mediana	26,50*	18,70*	11,35*
– Min-Máx	11,80 – 142,00	10,70 – 33,80	5,70 – 22,50
Albumina sérica (g/dL) – Média + DP	1,90 ± 0,43	2,64 ± 0,69	4,24 ± 0,23
– Mediana	1,9*	2,60*	4,30*
– Min-Máx	1,30 – 3,10	1,70 – 4,30	3,90 – 4,60

**p* < 0,05

5.2.2. Valores de cortisol sérico

Foi realizada comparação dos valores de cortisol sérico entre os três grupos de pacientes incluídos no estudo. As medianas dos valores de cortisol sérico foram, com significância estatística, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, diferentes entre si, com valor de $p < 0,01$. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney demonstrou que os valores foram mais elevados no grupo 1 em relação aos grupos 2 e 3, e no grupo 2, mais elevados que no grupo 3, com valor de $p < 0,05$ em todas as medidas. Em relação aos valores medianos apresentados pelos pacientes do grupo 3, considerados como basais, a mediana dos valores do grupo 1 apresentou-se cerca de duas vezes mais elevada.

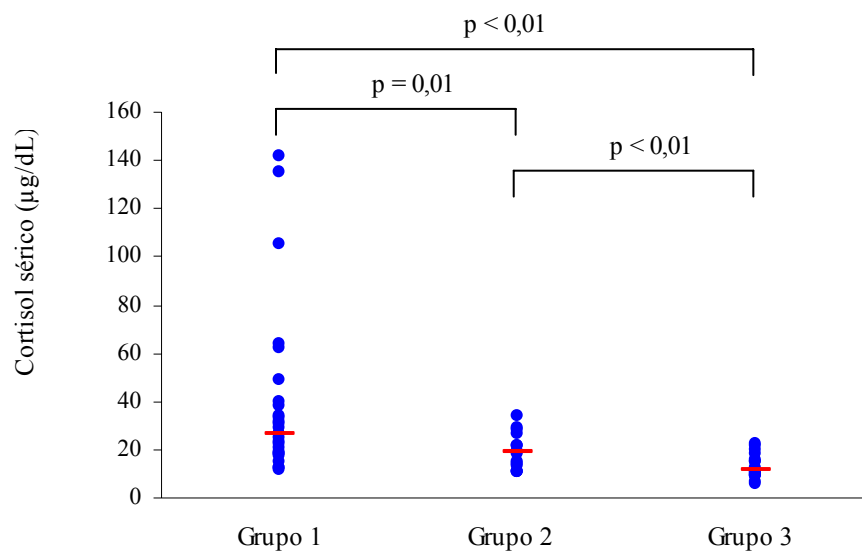


Figura 4 – Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol sérico nos três grupos estudados (Grupo 1: $n=27$, Grupo 2: $n=15$, Grupo 3: $n=19$). As amostras foram testadas pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC®. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 26,50 µg/dL; Grupo 2 = 18,70 µg/dL; Grupo 3 = 11,35 µg/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas através do valor de p .

5.2.3. Valores de cortisol salivar

Foi realizada, também, avaliação dos valores de cortisol salivar dos pacientes incluídos no estudo. Assim como os valores de cortisol sérico, as medianas dos valores de cortisol salivar foram, com significância estatística, diferentes entre si através pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com valor de $p < 0,01$. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney demonstrou que os valores foram mais elevados no grupo 1 em relação aos grupos 2 e 3, e no grupo 2, mais elevados que no grupo 3, com valor de $p < 0,05$ em todas as medidas. Em relação aos valores medianos basais apresentados pelos pacientes do grupo 3, a mediana dos valores do grupo 1 apresentou-se quatorze vezes mais elevada.

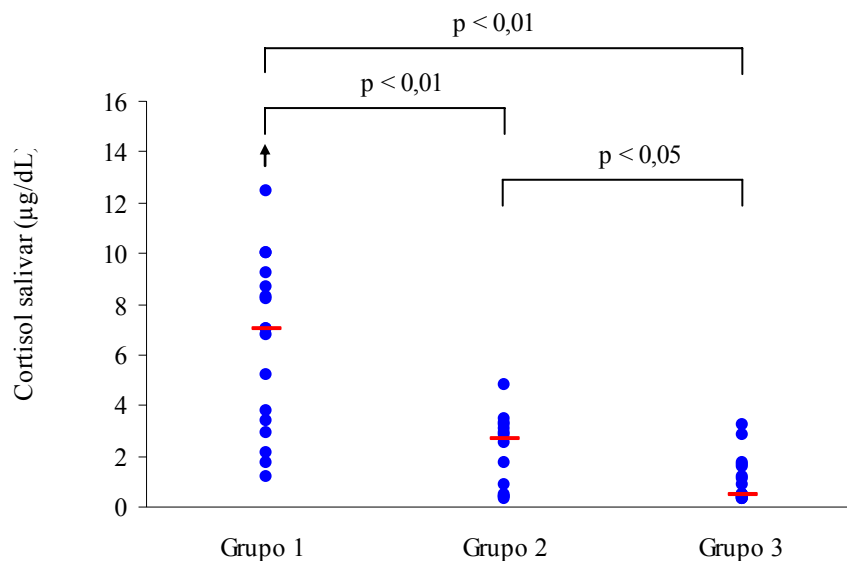


Figura 5 – Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol salivar nos três grupos estudados (Grupo 1: n=19, Grupo 2: n=14, Grupo 3: n=18). As amostras foram testadas pelo imunoenensaio enzimático de microplacas – DSL[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 7,00 µg/dL; Grupo 2 = 2,71 µg/dL; Grupo 3 = 0,50 µg/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas com o valor de p . Dois pontos de valores do grupo 1 (55,5 e 63,3 µg/dL) foram excluídos do gráfico para facilitar a visualização dos dados.

5.2.4. Valores de albumina sérica

A avaliação dos valores de albumina sérica (figura 6) mostrou que, as medianas dos valores nos três grupos foram diferentes entre si, com significância estatística, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com valor de $p < 0,01$. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney demonstrou que, ao contrário do cortisol sérico e do salivar, esses valores foram mais baixos, no grupo 1 em relação aos grupos 2 e 3, e mais baixos no grupo 2 em relação ao grupo 3, com valor de $p < 0,01$.

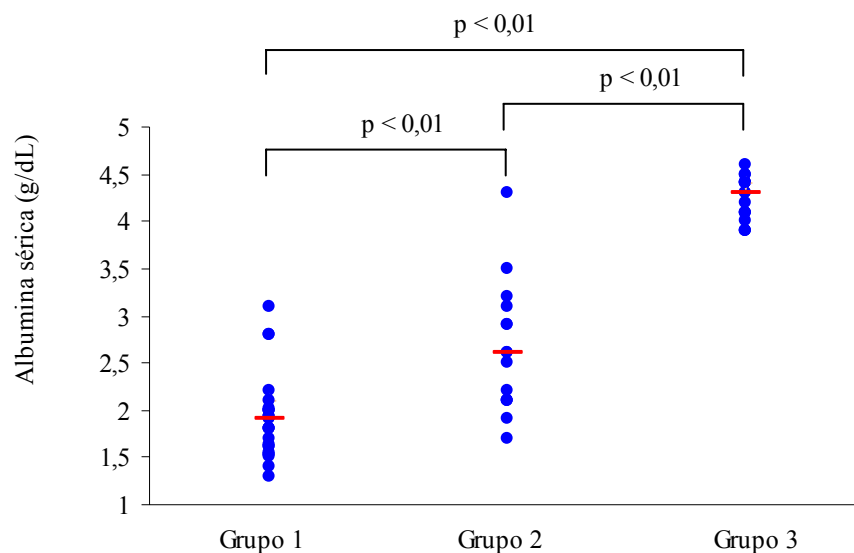


Figura 6 – Gráfico de dispersão de valores individuais de albumina sérica nos três grupos estudados (Grupo 1: $n=27$, Grupo 2: $n=15$, Grupo 3: $n=19$). As amostras foram testadas pelo ensaio colorimétrico em química seca – Johnson & Johnson[®]. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Grupo 1 = 1,9 g/dL; Grupo 2 = 2,6 g/dL; Grupo 3 = 4,3 g/dL). As diferenças estatísticas estão demonstradas com o valor de p .

5.3. Análises das correlações entre os valores de cortisol sérico e salivar

Após a avaliação dos valores de cortisol sérico, salivar e da albumina nos diferentes grupos, procurou-se verificar a correlação entre os valores de cortisol sérico e salivar nos pacientes incluídos no estudo.

5.3.1. Correlação entre cortisol sérico e salivar em todos os pacientes

A correlação encontrada entre os valores de cortisol sérico e cortisol salivar em todos os pacientes incluídos na pesquisa foi forte, com valor de r de Pearson de 0,89, e valor de $p < 0,01$ (figura 7).

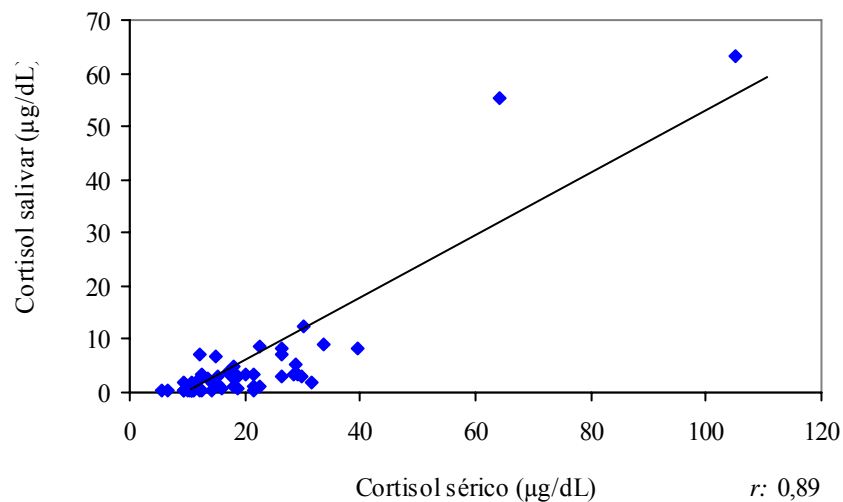


Figura 7 – Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes envolvidos no estudo (n = 51). A correlação encontrada foi forte, com valor de r de Pearson de 0,89, e $p < 0,01$.

5.3.2. Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 1

Analisando a correlação entre os valores de cortisol sérico e salivar no grupo 1, composto por pacientes em sepse grave, foi encontrada correlação forte, com valor de r de Pearson de 0,92, e $p < 0,01$ (figura 8).

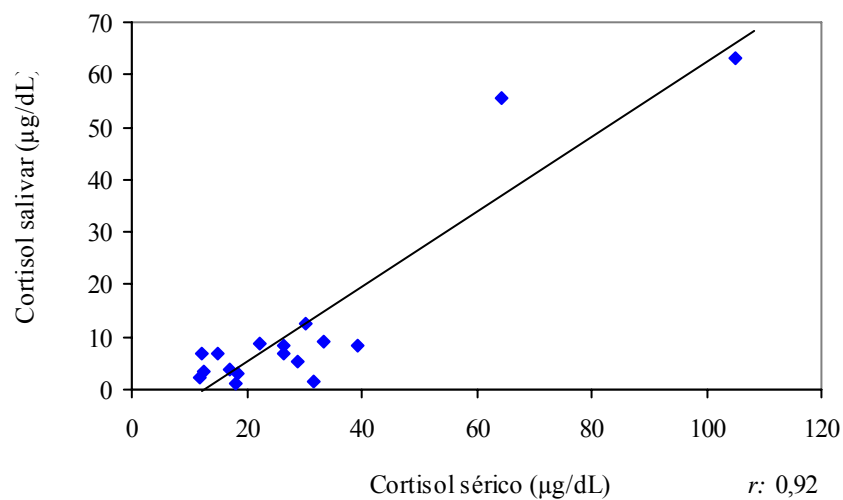


Figura 8 – Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 1 ($n = 19$). A correlação encontrada foi forte, com valor de r de Pearson de 0,92, e $p < 0,01$. A fórmula da regressão linear encontrada para o grupo 1 foi: Cortisol salivar = $0,292 \times$ cortisol sérico + 1,35.

5.3.3. Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 2

A correlação entre os valores de cortisol sérico e salivar no grupo 2, composto por pacientes em pós-operatório, foi apenas moderada, com valor de r de Pearson de 0,51, e $p = 0,06$ (figura 9).

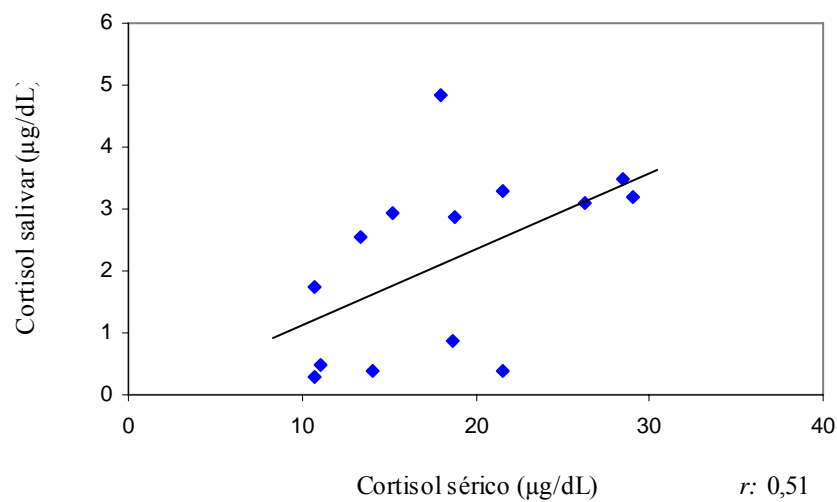


Figura 9 – Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 2 ($n = 14$). A correlação encontrada foi moderada, com valor de r de Pearson de 0,51, e $p = 0,06$.

5.3.4. Correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 3

A correlação entre os valores de cortisol sérico e salivar no grupo 3, composto por pacientes saudáveis, foi forte, com valor de r de Pearson de 0,70, e $p < 0,01$ (figura 10).

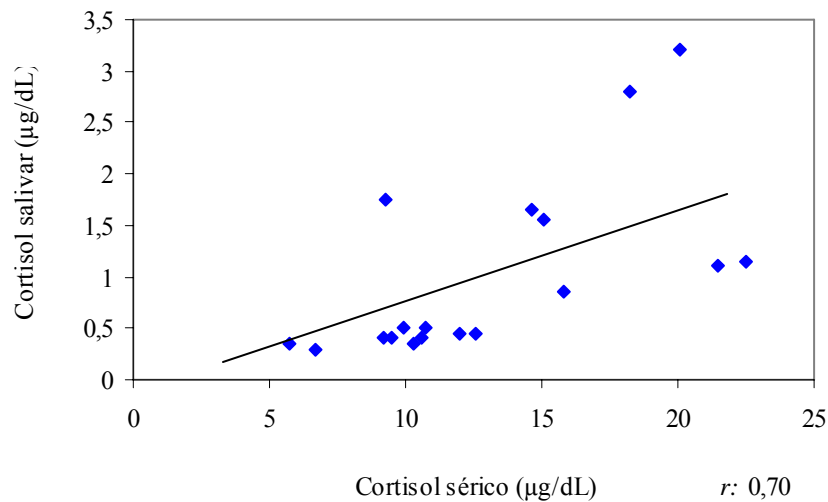


Figura 10 – Gráfico de dispersão evidenciando a correlação entre os valores de cortisol sérico dosados pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC[®], no eixo X, e os valores de cortisol salivar dosados pelo imunoensaio enzimático de microplacas – DSL[®], no eixo Y, dos pacientes do grupo 3 (n = 18). A correlação encontrada foi forte, com valor de r de Pearson de 0,70, e $p < 0,01$. A fórmula da regressão linear encontrada para o grupo 3 foi: Cortisol salivar = 0,113 x cortisol sérico – 0,461.

Utilizando-se as fórmulas de regressão linear encontradas para a correlação entre cortisol sérico e salivar nos grupos 1 e 3, verifica-se que valores de cortisol salivar obtidos pela transformação dos valores de cortisol sérico através duas fórmulas são muito maiores nos pacientes do grupo 1 do que nos pacientes do grupo 3, refletindo o aumento da fração livre do cortisol nos pacientes em estado crítico (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de cortisol salivar obtidos através das fórmulas de regressão linear encontradas na análise da correlação entre cortisol sérico e salivar, nos pacientes do grupo 1 e do grupo 3.

Valores de cortisol sérico	Valor de cortisol salivar correspondente por grupo	
	Grupo 1	Grupo 3
25,0 µg/dL	8,75 µg/dL	2,36 µg/dL
20,0 µg/dL	7,19 µg/dL	1,80 µg/dL
15,0 µg/dL	5,73 µg/dL	1,23 µg/dL

5.4. Influência da albumina nas concentrações do cortisol sérico e do salivar

De acordo com o projeto inicial, para avaliar a influência da albumina nas concentrações do cortisol sérico e do salivar, o grupo 1 do estudo, dos pacientes com quadro clínico de sepse grave, seria dividido em dois sub-grupos: o primeiro, composto pelos participantes com valores de albumina inferiores a 2,5 g/dL e o segundo, por aqueles com valores superiores a 2,5 g/dL, como realizado por Hamrahian et al, 2005. Seria realizada avaliação dos valores médios de cortisol sérico e salivar nos dois sub-grupos.

Em virtude dos critérios de inclusão no grupo terem sido muito rígidos, selecionando pacientes extremamente graves, a análise da amostra revelou que no grupo 1, todos os integrantes apresentaram níveis de albumina abaixo do valor mínimo de referência – 3,5 g/dL – e 89% deles, níveis abaixo do valor estabelecido para sub-divisão do grupo – 2,5 g/dL – não permitindo a realização desta análise.

5.5. Cortisol como fator de prognóstico

Para avaliar a correlação entre os valores do cortisol, tanto sérico quanto salivar, com o prognóstico dos pacientes, foi feita análise da taxa de mortalidade no grupo 1, dos pacientes com diagnóstico de sepse grave. A amostra foi dividida entre pacientes que tiveram alta hospitalar, e pacientes que evoluíram para óbito ao final do estudo. A taxa de mortalidade no grupo 1, ao final da pesquisa, foi de 56%.

5.5.1. Valores de cortisol sérico nos pacientes que evoluíram para óbito ou alta hospitalar

Foi demonstrado, através da análise comparativa pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que os valores medianos de cortisol sérico (figura 11) foram, com significância estatística, mais elevados nos pacientes que evoluíram para óbito, do que nos pacientes que tiveram alta hospitalar, com valor de $p < 0,05$.

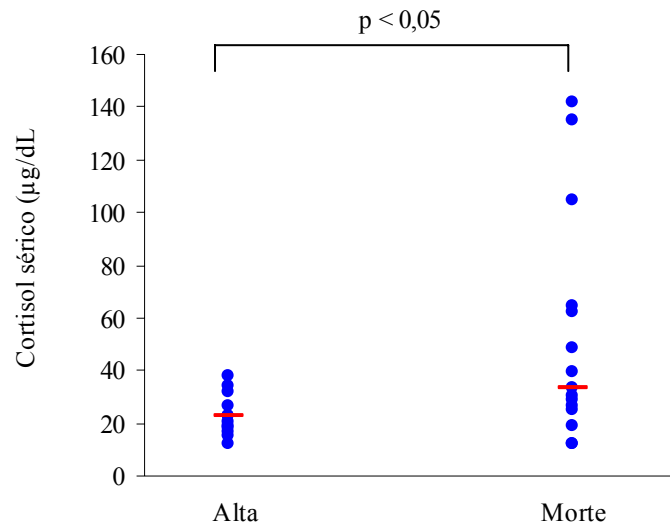


Figura 11 – Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol sérico dos pacientes que evoluíram para alta hospitalar (n=12) e dos pacientes que evoluíram para óbito (n=15) no Grupo 1 do estudo, de pacientes com sepse grave. As amostras foram testadas pelo imunoensaio quimioluminescente – DPC®. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Alta = 23,0 µg/dL x Óbito = 33,5 µg/dL). A diferença estatística está demonstrada com o valor de p .

Seguindo a classificação proposta por Sam et al, 2004, o índice de mortalidade foi estratificado de acordo com os valores de cortisol sérico. (Tabela 7). Observa-se um índice variável de mortalidade entre as classes. O teste Z para comparação entre proporções mostrou que o índice de mortalidade de 100%, observado nos pacientes com níveis de cortisol superiores a 45 µg/dL, foi com significância estatística, superior ao índice de 48% encontrado para pacientes com níveis abaixo de deste corte, com valor de $Z = 5,29$, e $p < 0,01$. Não houve diferença estatística em relação ao uso de terapia de reposição de glicocorticóides entre as classes. Não houve diferença significativa em relação à mortalidade entre as outras classes de valores.

Tabela 7 - Índice de mortalidade estratificado por classes de valores de cortisol sérico. Valores de p de acordo com o teste Z para a diferença entre as classes de cortisol, conforme Sam et al: A x B: $p = 0,10$; A x C: $p = 0,50$; A x D: $p = 0,22$; B x C: $p = 0,15$; B x D: $p < 0,01$; C x D: $p < 0,01$.

Classe	Cortisol sérico	n	Mortos	Índice
A	< 12,5 µg/dL	3	2	66%
B	12,5 – 20,0 µg/dL	6	1	16%
C	20,0 – 45,0 µg/dL	13	6	46%
D	> 45,0 µg/dL	6	6	100%*

* $p < 0,01$

Foi realizada ainda, avaliação dos índices de mortalidade e do índice de uso de terapia de reposição de glicocorticóides, dividindo-se a amostra entre portadores ou não de insuficiência adrenal relativa, de acordo com alguns valores de corte disponíveis na literatura (Tabela 8). Não foi observada diferença estatística em relação aos dois parâmetros em nenhum dos pontos de corte avaliados.

Tabela 8 – Índices de mortalidade, uso de glicocorticóides e prevalência de IAR na amostra dividida de acordo com alguns valores de corte propostos na literatura.

Valor de corte	IAR	Mortalidade		Uso de glicocorticóide		Prevalência de IAR
		n	Índice	n	Índice	
15,0 µg/dL	SIM	2/4	50%	2/4	50%	15%
	NÃO	13/23	56%	8/23	35%	
20,0 µg/dL	SIM	3/8	37%	2/8	25%	30%
	NÃO	13/19	68%	7/19	37%	
25,0 µg/dL	SIM	3/10	30%	2/10	20%	37%
	NÃO	10/17	59%	9/17	53%	

5.5.2. Valores de cortisol salivar nos pacientes que evoluíram para óbito ou alta hospitalar

Assim como aconteceu com o cortisol sérico, foi demonstrado, através da análise comparativa pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que os valores medianos de cortisol salivar (figura 12) foram, com significância estatística, mais elevados nos pacientes que evoluíram para óbito, do que nos pacientes que tiveram alta hospitalar, com valor de $p < 0,05$. Não houve diferença estatística em relação ao uso de terapia de reposição de glicocorticóides entre os pacientes que evoluíram para alta hospitalar ou óbito.

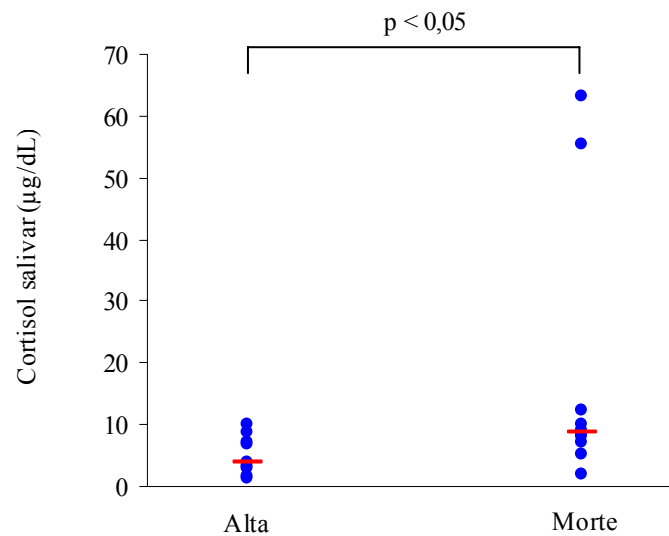


Figura 12 – Gráfico de dispersão de valores individuais de cortisol salivar dos pacientes que evoluíram para alta hospitalar (n=9) e dos pacientes que evoluíram para óbito (n=10) no Grupo 1 do estudo, de pacientes com sepse grave. As amostras foram testadas pelo imunoensaio enzimático em microplacas – DSL®. Os traços vermelhos representam as medianas dos valores (Alta = 3,80 µg/dL x Óbito = 8,75 µg/dL). A diferença estatística está demonstrada com o valor de p .

Utilizando a fórmula de regressão linear encontrada para a correlação entre cortisol sérico e salivar nos pacientes do grupo 1, foi realizada transformação dos valores de cortisol sérico propostos por Sam el al, 2004 (tabela 6) para cortisol salivar, e foi avaliado o índice de mortalidade estratificado pelos valores de cortisol salivar. Foi observada elevação diretamente proporcional entre os valores de cortisol salivar as taxas de mortalidade (Tabela 9). O teste Z para comparação entre proporções mostrou que o índice de mortalidade de 77% nos pacientes com níveis de cortisol salivar superior a 7,2 µg/dL foi, com significância estatística, superior ao índice dos pacientes com níveis inferiores a este corte, com valor de Z de 2,38, e $p < 0,05$.

Tabela 9 – Índice de mortalidade estratificado por classes de valores de cortisol salivar. Valores de p de acordo com o teste Z para a diferença entre as classes: A x B: $p = 0,32$; A x C: $p < 0,05$; A x D: $p < 0,01$; B x C: $p = 0,39$; B x D: $p < 0,05$; C x D: $p = 0,10$.

Classe	Cortisol salivar	n	Mortos	Índice
A	< 5,0 µg/dL	5	1	20%
B	5,0 - 7,2 µg/dL	4	2	50%
C	7,2 - 14,5 µg/dL	8	6	75%*
D	> 14,5 µg/dL	2	2	100%*

$p < 0,05$

DISCUSSÃO

A avaliação da função da glândula adrenal no paciente em estado crítico tem dois objetivos principais: a busca pelo diagnóstico da insuficiência adrenal relativa, e a tentativa de se verificar a gravidade do quadro, correlacionando valores de cortisol com o prognóstico. A dosagem do cortisol salivar traz benefícios nesta abordagem, mesmo com as dificuldades relacionadas ao procedimento.

Vieira et al, 1984, desenvolveram método de radioimunoensaio para a dosagem de cortisol salivar. Durante a validação deste método, foi verificada a correlação com os valores de cortisol sérico livre, onde foi obtido coeficiente de correlação forte, com índice r de Pearson de 0,94. Após este estudo, uma série de outras pesquisas foram realizadas utilizando este mesmo método, corroborando seu uso na prática clínica, destacando-se os estudos de Castro et al, 1999 e 2003, e Santiago et al, 1996. A verificação da correlação dos métodos de dosagem do cortisol salivar utilizados na pesquisa frente a este método permitiu a escolha daquele que apresentou a combinação de grau de correlação forte com o método comparativo com facilidade de realização. Por este motivo, o método teste 2, representado pelo imunoensaio enzimático em microplacas da marca DSL[®] foi o escolhido. O teste apresentou elevado índice de correlação ($r = 0,97$), além de ser de realização fácil, e utilizar pequeno volume de amostra, o que permitiu a inclusão de maior número de pacientes na pesquisa.

A coleta da saliva nos pareceu o principal fator limitante para a utilização do cortisol salivar no paciente em estado crítico, devido ao fato de que freqüentemente, estes indivíduos encontram-se em estado de choque, com diminuição do volume circulante e vasoconstrição periférica, o que diminui a secreção de saliva drasticamente. Cohen et al, 2004, em estudo destinado a avaliar o cortisol salivar no paciente em estado crítico, obteve

índice de material insuficiente de 60%, concluindo que este problema praticamente inviabiliza a utilização cortisol salivar no paciente crítico. Não está descrito que método de dosagem foi utilizado pelos autores, somente o volume necessário para a dosagem: 500 µL. Mesmo com a utilização do imunoenensaio enzimático de microplacas, que necessita de um volume de amostra de apenas 25 µL, e de termos adaptado o sistema de coleta, aumentado o tempo no qual o Salivette[®] foi deixado na cavidade oral dos pacientes, permitindo a inclusão de um maior número de participantes, a perda por material insuficiente foi de 30% (8/27), considerada alta, porém, bem menor que a de Cohen et al, 2004. Estes autores relatam ainda, como fator de confusão, o efeito da contaminação da saliva com sangue, o que, poderia resultar em elevação artificial dos níveis de cortisol. Kivlighan et al 2004, demonstraram, através de estudo experimental, que a contaminação da saliva com sangue, após micro-traumas na cavidade oral, possui efeito insignificante nos valores do cortisol. Considerando esta análise, somada ao fato de que nenhum dos pacientes incluídos possuía contaminação visível da saliva com sangue proveniente da cavidade oral, não foi realizado nenhum teste para avaliar a possibilidade de contaminação, e nenhum paciente foi excluído do estudo por este motivo.

Segundo Aron et al, 2004, o cortisol não apresenta diferenças em suas concentrações dependentes de idade e sexo, assim, não foi realizado pareamento da amostra para constituição dos grupos seguindo estes parâmetros, e não foi considerada a diferença apresentada entre o grupo 3, de sadios, e os grupos 1 e 2 com relação à idade.

Os valores de cortisol sérico e salivar nos três grupos da pesquisa apresentaram-se da maneira esperada, tendo em vista que a constituição dos grupos foi realizada incluindo-se pacientes com graus distintos de estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Para o

grupo 1, que apresentou valores mais elevados, foram selecionados pacientes com quadro de sepse grave, condição clínica que cursa com altas taxas de mortalidade, como relatado por Angus et al, 2001, caracterizada por elevado grau de estresse sistêmico, e grande estímulo para secreção do cortisol. Para o grupo 2, que apresentou valores intermediários, composto por pacientes estáveis hemodinamicamente, com nível de estresse mais moderado, secundário principalmente ao evento operatório; e o grupo 3, que apresentou valores mais baixos, constituído por pessoas saudáveis, sem qualquer condição de estresse sistêmico que pudesse levar a elevação dos níveis de cortisol. Nossos achados corroboram os de Cohen et al, 2004, que encontraram valores de cortisol salivar acima dos valores de referência em pacientes críticos.

Verificamos ainda que, em relação aos valores basais, tendo como referência os valores medianos apresentados pelos pacientes do grupo 3, a elevação dos níveis de cortisol salivar nos pacientes do grupo 1 (14,0x) foi significativamente mais destacada do que a elevação do cortisol sérico total (2,2x), mostrando o aumento da fração livre do cortisol durante o processo agudo.

O escalonamento no quadro de gravidade dos pacientes refletiu-se nos valores de albumina sérica. Silverman et al, 1996, relataram que valores baixos de albumina, correlacionam-se com aumento do catabolismo sistêmico, resultado de lesões teciduais e inflamação, sendo o único reagente de fase aguda que apresenta diminuições nos seus valores durante o evento de estresse. Como visto, os valores foram extremamente baixos nos pacientes do grupo 1, (média = $1,9 \pm 0,4$ g/dL), dentro da referência nos pacientes do grupo 3 (média = $4,2 \pm 0,2$ g/dL), e variáveis nos pacientes do grupo 2 (média = $2,7 \pm 0,7$ g/dL), constituído por uma população mais heterogênea.

A forte correlação entre cortisol sérico e salivar no grupo 1, com valor de r de Pearson de 0,92, era, de certa forma, esperada, pelo fato dos critérios de inclusão terem sido bastante rígidos, promovendo homogeneização da população, que refletiu nos valores de albumina, todos abaixo do valor de referência. Da mesma forma, podemos ver a forte correlação nos pacientes do grupo 3, com r de Pearson de 0,70, composto por pessoas saudáveis, sem fatores para alterar a relação do cortisol com as proteínas circulantes, conforme descrito por Vieira, 1984. Devido à heterogeneidade dos integrantes do grupo 2, refletida nos valores bastante dispersos de albumina, foi observada correlação moderada.

Segundo Hamrahian et al, 2005, e Ho et al, 2006, avaliação dos níveis circulantes de albumina é importante na verificação dos valores de cortisol sérico nos pacientes em estado crítico, já que valores baixos de proteínas, comuns nestes pacientes, podem levar a diminuição dos valores de cortisol sérico total, porém com manutenção de valores de cortisol livre e salivar dentro da normalidade. O grupo 2 que teve a pior correlação entre os valores de cortisol sérico e de cortisol salivar, foi o que apresentou resultados mais heterogêneos em relação aos valores da albumina, diferente da homogeneidade observada no grupo 1, com todos os pacientes apresentando resultados abaixo do valor de referência, e no grupo 3, no qual todos os participantes apresentaram resultados dentro dos valores de referência. Estes grupos apresentaram correlação forte entre o cortisol. A formação de um grupo de estudo mais heterogêneo, composto por pacientes em diferentes situações clínicas, com valores de albumina apresentando maior variação, como realizado por Hamrahian et al, 2005, que separou a mostra em pacientes com albumina inferior ou superior a 2,5 g/dL, pode ajudar na verificação do papel da albumina nas concentrações do cortisol sérico e do salivar, bem como na correlação entre esses dois parâmetros.

Cooper et al, 2003, relatam que pacientes em estado crítico apresentam elevações do cortisol, principalmente da fração livre do hormônio, como efeito da diminuição da albumina sérica, somado a outros fatores como o aumento da resistência periférica à ação hormonal. Nossos achados demonstram, esta elevação do cortisol livre, observada pela a avaliação dos valores de cortisol salivar obtidos com a conversão de valores de cortisol sérico através das fórmulas de regressão linear dos grupos 1 e 3. A tabela 6 mostra que para os mesmos valores de cortisol sérico, tem-se valores bem mais elevados de cortisol salivar nos pacientes do grupo 1 do que nos participantes do grupo 3.

Da mesma forma que Sam et al, 2004, que observaram valores mais elevados de cortisol sérico associados a maior taxa de mortalidade, também encontramos esta correlação nos pacientes com sepse grave que evoluíram para óbito. Esta associação, todavia, ficou muito melhor caracterizada através da dosagem do cortisol salivar. Os valores de cortisol salivar, diferente do cortisol sérico, apresentaram uma evolução gradativa, associada diretamente com a mortalidade. Valores mais baixos correlacionaram-se a menor taxa de mortalidade e valores mais altos, a uma taxa maior. Para os valores de cortisol sérico total, não se observou a mesma gradação, e de maneira paradoxal, a classe com a menor taxa de mortalidade foi composta por pacientes com valores de cortisol sérico total entre 12,5 e 20 $\mu\text{g/dL}$, que seriam classificados como portadores de insuficiência adrenal, utilizando-se como critério o valor aleatório de cortisol sérico total inferior a 25 $\mu\text{g/dL}$, proposto por Marik et al, 2003.

A divisão da amostra do grupo 1 em portadores ou não de IAR, baseada em valores aleatórios de cortisol sérico total (cortisol sérico total inferior a 25, 20 ou 15 $\mu\text{g/dL}$), não mostrou diferenças quanto ao índice de mortalidade e quanto ao uso de terapia de

reposição com glicocorticóides entre portadores ou não de IAR. Valores tão baixos de albumina, como os encontrados nesses indivíduos, promovem diminuição dos níveis de cortisol sérico total, como demonstrado por Hamrahian et al, 2005, e isto pode ter influenciado a análise das taxas de mortalidade, já que estes valores de corte podem ser altos para estes pacientes.

A grande diferença encontrada entre os valores medianos basais do cortisol salivar dos pacientes saudáveis e dos pacientes sépticos, reflexo da elevação da fração livre do cortisol, não influenciada pela albumina, demonstra que a dosagem do cortisol salivar pode classificar com melhor exatidão os pacientes portadores ou não de IAR, sendo necessários estudos com desenhos experimentais direcionados para este fim.

Consideramos adequada a verificação dos nossos achados em outra amostra com número maior de integrantes. A utilização de outros critérios de inclusão, contemplando a formação de amostra mais heterogênea, poderá permitir a investigação da influência da albumina nos valores de cortisol sérico e salivar, e poderá ainda, reduzir o índice de perda de amostra por dificuldade de coleta da saliva, único fator limitante ao uso do cortisol salivar. Novos estudos poderão avaliar o desempenho do cortisol salivar no diagnóstico da insuficiência adrenal relativa, inclusive com utilização de valores após o teste de estímulo da glândula adrenal com ACTH sintético como critério de diagnóstico, avaliando a resposta ao uso de glicocorticóides, e a sobrevida final.

CONCLUSÕES

Os achados encontrados pelas dosagens de cortisol sérico e salivar e de albumina em pacientes em estado crítico, permitem concluir que:

- Os valores de cortisol salivar se correlacionam bem com os de cortisol sérico nos pacientes em estado crítico, secundário a sepse grave, e nos pacientes saudáveis, por se tratar de populações homogêneas em relação aos níveis de proteínas plasmáticas.
- Pacientes em estado crítico apresentam elevações de cortisol salivar significativamente mais pronunciadas do que de cortisol sérico total, que está influenciado pelos baixos níveis de albumina. Por refletir a elevação dos níveis da fração livre do hormônio, o cortisol salivar é um método mais fidedigno para avaliação da função adrenal destes pacientes.
- Valores elevados de cortisol salivar e sérico, em pacientes com sepse grave estão associados a pior prognóstico, caracterizado por maior mortalidade.
- Os valores de cortisol salivar se correlacionaram melhor com o prognóstico dos pacientes em estado crítico, apresentando elevações diretamente proporcionais à taxa de mortalidade.

PROPOSIÇÕES

- Avaliar em uma população mais heterogênea de pacientes em estado crítico, pareada, dividida pelos valores de albumina acima ou abaixo de 2,5 g/dL, o efeito da proteína na correlação entre cortisol sérico e salivar.
- Tentar estabelecer valores de corte para o diagnóstico de insuficiência adrenal relativa no paciente em estado crítico, baseando-se na resposta à terapia de reposição de baixas doses de glicocorticóide exógeno.

ANEXOS

“Avaliação do Cortisol Salivar no Paciente em Estado Crítico”

Ficha de Inclusão – Grupo 1

1 – Identificação

Nome (iniciais) _____ Identificação : _____

Sexo: M F Idade: ___ anos Data de admissão UTI: __/__/__

2 – Diagnóstico na admissão

3 – Diagnóstico de sepse

- evidência de infecção
+
- Temperatura > 38° C ou < 36° C
- Frequência cardíaca > 90 bpm
- Frequência respiratória > 20 irpm
- Leucócitos totais > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³, ou > 10% bastões
+
- Falência de órgão: Cardiovascular Renal SNC Respiratório Hepático

4 – Tratamento

- antimicrobianos
- terapia de suporte: ventilação mecânica aminas vasoativas diálise

5 – Administração de corticosteróides

Droga _____ Dose _____ mg Posologia __/__/__ hs

6 – Evolução

- Alta (melhora clínica) Óbito

“Avaliação do Cortisol Salivar no Paciente em Estado Crítico”

Ficha de Inclusão – Grupo 2

1 – Identificação

Nome (iniciais) _____ Identificação : _____

Sexo: M F Idade: ___ anos Data de admissão UTI: __/__/__

2 – Diagnóstico na admissão

3 – Evolução

Alta

“Avaliação do Cortisol Salivar no Paciente em Estado Crítico”

Ficha de Inclusão – Grupo controle

1 – Identificação

Nome (iniciais) _____ Identificação : _____

Sexo: M F

Idade: ___ anos

Data da coleta: __/__/__

▪ **Termo de Esclarecimento**

Você está sendo convidado a participar do estudo *Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico*. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Caso você participe, será necessário coleta de sangue e de saliva. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida. Você poderá ter algum desconforto ao ter a veia puncionada para colher o sangue mas procuraremos fazê-lo quando formos colher exames necessários ao seu tratamento no CTI.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

▪ **Termo de consentimento livre, após esclarecimento**

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu concordo em participar do estudo.

Ass.: _____

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__.

▪ **Termo de Esclarecimento**

O (a) Sr (a). _____ está sendo convidado a participar do estudo *Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico*. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a participação dele é importante. Caso você autorize a participação dele (a), será necessário coleta de sangue e de saliva. Não será feito nenhum procedimento que traga a ele (a) qualquer desconforto ou risco à sua vida. Ele (a) poderá ter algum desconforto ao ter a veia puncionada para colher o sangue, mas procuraremos fazê-lo quando formos colher exames necessários ao tratamento no CTI.

Você e ele (a) poderão ter todas as informações que quiser e poderão não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento. Pela participação no estudo, não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome dele (a) não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois ele (a) será identificado com um número.

▪ **Termo de consentimento livre, após esclarecimento**

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que _____ será submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que o nome dele não será divulgado, que não terei despesas e não receberemos dinheiro por participar do estudo.

Eu concordo em participar do estudo.

Ass.: _____

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__.

▪ **Termo de Esclarecimento**

Você está sendo convidado a participar do estudo *Avaliação do cortisol salivar no paciente em estado crítico*. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Caso você participe, será necessário coleta de sangue e de saliva. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida. Você poderá ter algum desconforto ao ter a veia puncionada para colher o sangue.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

▪ **Termo de consentimento livre, após esclarecimento**

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Eu concordo em participar do estudo.

Ass.: _____

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and association costs of care. **Crit Care Med**, 29:1303-1310, 2001.

Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Brigel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. **BMJ**, doi:10.1136/bmj.38181.482222.55, 2004.

Annane D, Sebille V, Charpentier C. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. **JAMA**, 288:862-71, 2002.

Annane D, Sebille V, Trouche G, et al. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. **JAMA**, 283:862-871, 2000.

Aron, DC, Findling, JW, Tyrrell, B. Glucorticoids & Adrenal Androgens. In: Greenspan, FS, Gardner, DG. **Basic and Clinical Endocrinology**. 7a. ed. San Francisco: McGraw-Hill, 362-413, 2004.

Bouachour G, Tirot P, Gouello JP, Mathieu E, Vincent JF, Alquier PH. Adrenocortical function during septic shock. **Inten Care Med**, 21:57-62, 1995.

Castro M, Elias PCL, Quidute ARP, Halah FPB, Moreira AC. Out-Patient screening for Cushing Syndrome: The sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. **J Clin Endocrinol Metabol**, 84(3): 878-882, 1999.

Castro M, Elias LLK, Elias PCL, Moreira AC. A dose-response study of salivary cortisol after dexametasone suppression test in Cushing's disease and its potential use in the differential diagnosis of Cushing syndrome. **Clin Endocrinol**, 59:800-805, 2003.

Cohen J, Venkatesh B, Galligan J, Thomas P. Salivary cortisol concentration in the intensive care population: correlation with plasma cortisol values. **Anaesth Inten Care**, 32(6):843-845 (correspondence), 2004.

Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. **N Eng J Med**, 348:727-34, 2003.

Dluhy, RJ. Adrenal Insufficiency & Relative Adrenal Insufficiency in Critical Illness. **Clin Endocrinol Update**, 65-72. Ed. Leskiw Sue, 2005.

Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurement of serum free cortisol in critically ill patients. **N Eng J Med**, 350:1629-38, 2004.

Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, Lewis JG, Torpy DJ. Septic shock a sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. **J Clin End Metabol**, 91(1):105-114, 2006

Kivlighan KT, Granger DA, Schwartz EB, Nelson V, Curran M, Shirtcliff E. Quantifying blood leakage into oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. **Hormon Behav**; 46:39-46, 2004.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. **Crit Care Med**, 31(4):1250-1256, 2003.

Ligtenberg JJM, Zijlstra JG. The relative adrenal insufficiency syndrome revisited: which patients will benefit from low-dose steroids? **Curr Opin Crit Care**,10:456-460, 2004.

Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. **Crit Care Med**, 33(6):1254-59, 2005.

Marik, PE, Zaloga, GP. Adrenal insufficiency in the critically ill. **Chest**, 122:1784-1796, 2002.

Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency during septic shock. **Crit Care Med**, 31:141-45, 2003.

Raff H. Salivary cortisol: a useful measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome and the evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinologist**, 10:9-17, 2000.

Raff H, Homar PJ, Skoner DP. New enzyme immunoassay for salivary cortisol. **Clin Chem**, 49(1):203-4 (correspondence), 2003.

Rivers EP, Gaspari M, Saad GA, Mlynarek M, Fath J, Horst HM, et al. Adrenal insufficiency in high-risk surgical ICU patients. **Chest**,19:889-96, 2001.

Sam S, Corbridge TC, Mokhlesi B, Cornellas AP, Molitch, ME. Cortisol levels and mortality in severe sepsis. **Clin Endocrinol**, 60:29-35, 2004.

Santiago LB, Salim JM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. **Clin Endocrinol**, 44:157-161, 1996.