

LUDMILLA MALVEIRA LIMA LOPES

Padronização dos valores de referência de cortisol salivar noturno em gestantes: comparação com os valores de mulheres não grávidas e pacientes com doença de Cushing

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Ludmilla Malveira Lima

Padronização dos valores de referência de cortisol salivar noturno em gestantes : comparação com os valores de mulheres não grávidas e pacientes com doença de Cushing / Ludmilla Malveira Lima Lopes. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientador: Marcello Delano Bronstein.

Descritores: 1.Saliva/química 2.Gravidez 3.Síndrome de Cushing
4.Hipersecreção hipofisária de ACTH

USP/FM/DBD-455/14

*Dedico este trabalho aos meus pais, Hailton e
Cira, por todo apoio e simplesmente por sempre
acreditarem nos meus projetos e sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por suas bênçãos em minha vida e por me conceder tantas conquistas. Ser médica é uma das minhas maiores paixões e agradeço a oportunidade de me permitir exercer esta profissão. Maria, minha mãe, obrigada por sempre interceder por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Delano Bronstein, por me fazer apaixonar pela Neuroendocrinologia. Obrigada por contribuir para meu aprimoramento profissional e por todo apoio nesta pesquisa.

Aos meus colegas da Neuroendocrinologia pelo convívio, pela orientação, pelo apoio e pela amizade: Dra. Cândida, Márcio, Raquel, Andrea, Cris, Mari, Thais, Carol e Felipe. Dra. Cândida e Márcio, por tantas manhãs juntos e por todo apoio sempre que precisei. Raquel, por saber ouvir e pelo exemplo de amor à pesquisa. Mari, pelo incentivo sempre. Cris e Thais, também pela participação ativa neste estudo.

À Dra. Luciana Brito e a todos que contribuíram para esta pesquisa do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42.

Meu muito obrigada, Dr. Vinícius Brito, que, com muita presteza, me auxiliou nesta pesquisa.

A todos os médicos da Obstetrícia e, em especial, a Cris por ter me recebido com tanto carinho.

A minha amiga Elaine por todas as orientações. Em comum temos a mesma cidade, a endocrinologia como paixão, colegas de pós e sobretudo a amizade.

À Roseli e a todos os funcionários do Ambulatório de Endocrinologia e Obstetrícia, pelo apoio à pesquisa.

Às secretárias Cida e Rosana, que me ajudaram sempre que precisei.

A todos os funcionários da Biblioteca da FMUSP, por serem sempre tão solícitos.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

A todos que participaram desta pesquisa e, principalmente, à gestante pela confiança e entrega em um dos momentos mais importantes de sua vida.

Aos meus irmãos, Larissa e Ciro, por serem grandes incentivadores desta conquista. E à pequena Laís, minha sobrinha, que alegra nossos dias.

A todos os meus amigos, cunhados, Cris e Pablo, e familiares, por todo incentivo e apoio em todos os momentos.

A Diego, meu amor, simplesmente por tudo. Apoiou-me intensamente e esteve ao meu lado em todos os momentos.

“Mas na profissão, além de amar tem de saber.

E o saber leva tempo pra crescer”.

(Rubem Alves)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP, no Ambulatório de Assistência Pré-Natal da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Síndrome de Cushing	2
1.1.1 Definições e epidemiologia	2
1.1.2 Classificação.....	2
1.1.3 Manifestações clínicas	3
1.1.4 Diagnóstico	4
1.1.4.1 Cortisol salivar noturno	7
1.2 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e gestação	11
1.3 Síndrome de Cushing e gestação	16
1.3.1 Complicações maternas e fetais	16
1.3.2 Etiologia	17
1.3.3 Diagnóstico	18
1.3.4 Tratamento.....	25
2 OBJETIVO	28
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 Casuística	30
3.1.1 Grupo gestante	30
3.1.2 Grupo controle	31
3.1.3 Grupo doença de Cushing (DC).....	32
3.1.4 Critérios de exclusão para os grupos.....	32
3.1.5 Variáveis dos grupos	32
3.2 Metodologia	34
3.2.1 Coleta e preparação das amostras	34
3.2.2 Ensaio Hormonal	36
3.2.3 Análise estatística	37

4 RESULTADOS	40
4.1 Caracterização geral dos grupos	40
4.1.1 Grupo controle	40
4.1.2 Grupo gestante	40
4.1.3 Grupo DC.....	41
4.2 Cortisol salivar noturno	43
4.2.1 Coletas.....	43
4.2.2 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante (Trimestre).....	44
4.2.2.1 Gestante 1º trimestre X Controle X DC.....	46
4.2.2.2 Gestante 2º trimestre X Controle X DC.....	46
4.2.2.3 Gestante 3º trimestre X Controle X DC.....	46
4.2.3 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante (Trimestre/Subgrupos: Gestante de alto e de baixo risco)	46
4.2.4 Valores de cortisol salivar noturno do indivíduo #26 do grupo gestante	48
4.2.5 Valores de cortisol salivar noturno do grupo gestante com coletas no três trimestres gestacionais	49
4.2.6 Comparação dos valores de cortisol salivar noturno do grupo gestante no primeiro trimestre de gestação.....	50
4.2.7 Associação do cortisol salivar noturno em relação às variáveis: Grupos controle e gestante.....	51
4.2.7.1 Variáveis quantitativas (Idade e IMC) (Tabela 12)	51
4.2.7.2 Variáveis qualitativas (Tabela 13)	52
4.2.7.2.1 Raça.....	52
4.2.7.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....	52
4.2.7.2.3 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	53
4.2.7.2.4 Consumo de bebidas alcoólicas	53
4.2.7.2.5 Uso de anticoncepcional oral.....	53
4.2.7.2.6 Tabagismo e uso de polivitamínicos	53
4.2.7.2.7 Uso de insulina e metformina.....	54
4.2.8 Valores de referência para o cortisol salivar noturno	55
4.2.9 Determinação de valores de corte do cortisol salivar noturno nos grupos DC e gestante em cada um dos trimestres de gestação.....	56
5 DISCUSSÃO	60
5.1 Caracterização geral dos grupos	61

5.2 Cortisol salivar noturno.....	62
5.2.1 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante	62
5.2.2 Associação do cortisol salivar noturno em relação às variáveis: Grupos controle e gestante.....	64
5.2.3 Valores de referência para o cortisol salivar noturno	65
5.2.4 Determinação de valores de corte do cortisol nos grupos DC e gestante em cada um dos trimestres de gestação.....	66
6 CONCLUSÕES.....	68
7 ANEXOS.....	70
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	73
Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
Anexo D - Dados gerais dos indivíduos do grupo gestante de baixo risco	79
Anexo E - Dados gerais dos indivíduos do grupo gestante de alto risco	83
Anexo F - Dados gerais dos indivíduos do grupo controle.....	84
Anexo G - Idade, IMC e cortisol salivar cortisol salivar noturno (µg/dL) dos indivíduos do grupo Cushing.....	86
Anexo H - Folha de instrução com orientações fornecidas pelo Laboratório de Hormônios do HC-FMUSP.....	87
8 REFERÊNCIAS	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
>	maior que
<	menor que
=	igual a
±	mais ou menos
µg/dL	Micrograma por decilitro
µL	Microlitro
11 β HSD 2	11β-hidroxiesteroide desidrogenase 2
17 OH	17-hidroxiesteróide
17 OHP	17-hidroxiprogesterona
ACO	Anticoncepcional Oral
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
ADA	Associação Americana de Diabetes
CBG	Globulina ligadora de cortisol
CIUR	Crescimento intrauterino restritivo
Cm	centímetro
CRH	Hormônio de liberação da corticotropina
CRHBP	Proteína ligadora do hormônio de liberação da corticotropina
CSN	Cortisol salivar noturno
DC	Doença de Cushing
dL	decilitro
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMS	Dexametasona
DP	Desvio-Padrão
ECLIA	Eletroquimioluminescência
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	grama

HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HDDST	Teste de supressão com Dose Alta de Dexametasona
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IMC	Índice de massa corporal
IQR	Intervalo interquartil
Kg	quilograma
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência
LDDST	Teste de supressão com dose baixa de dexametasona
LH	Hormônio luteinizante
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
NSB	Ligante não específico
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P</i>	significância estatística
POMC	Pró-ópio-melanocortina
RIA	Radioimunoensaio
RM	Ressonância Magnética
RPM	rotações por minuto
SC	Síndrome de Cushing
SEA	Secreção ectópica do ACTH
TC	Tomografia computadorizada
TMB	Tetrametilbenzidina
UFC	Cortisol livre em urina de 24 h
US	Ultrassonografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aumento no cortisol sérico (O) e ACTH (●) em controles normais durante gestação 13
Figura 2	Concentrações do CRH plasmático em sete mulheres ao longo da gestação 14
Figura 3	Eixo HHA durante gestação 15
Figura 4	Foto de paciente com SC com múltiplas estrias largas e violáceas em membros inferiores 19
Figura 5	Avaliação do cortisol sérico antes e após a administração de 1 mg de DMS na mulher grávida (●). Uma dose única de DMS foi administrada por via oral as 23h00 e sangue foi colhido as 08h00 da manhã seguinte..... 21
Figura 6	Figura esquemática do material Salivette (SARSTEDT) utilizado para a coleta de cortisol salivar 35
Figura 7	<i>Box-plots</i> do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, Cushing e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres 45
Figura 8	<i>Box-plots</i> do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, Cushing e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo e alto risco 47
Figura 9	Medianas do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) no grupo gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo ou alto risco 48
Figura 10	Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g}/\text{dL}$) do indivíduo controle deste estudo: pré-gravidez, 1 ^o trimestre gestacional, 2 ^o trimestre e 3 ^o trimestre 49
Figura 11	Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g}/\text{dL}$) das pacientes com coletas nos três trimestres gestacionais (1 ^o trimestre, 2 ^o trimestre e 3 ^o trimestre). 50
Figura 12	Valores individuais do cortisol salivar noturno nas gestantes com até 10 semanas e 11 a 13 semanas de gestação 51

Figura 13	Valores individuais e limites de referência utilizando os percentis 2,5-97,5 para o cortisol salivar noturno no grupo controle	55
Figura 14	Valores individuais e limites de referência utilizando os percentil 2,5-97,5 para o cortisol salivar noturno no grupo gestante, nos três trimestres de gestação	56
Figura 15	<i>Dot-plots</i> do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no primeiro trimestre	57
Figura 16	<i>Dot-plots</i> do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no segundo trimestre	57
Figura 17	<i>Dot-plots</i> do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no terceiro trimestre	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Manifestações clínicas da síndrome de Cushing com respectivas frequências	4
Tabela 2	Condições associadas com hipercortisolismo na ausência de síndrome de Cushing.....	10
Tabela 3	Frequência de complicações maternas e fetais decorrentes da SC durante a gestação.	17
Tabela 4	Etiologia da SC na gestação.....	18
Tabela 5	Classificação do IMC – OMS	33
Tabela 6	Distribuições de frequências e porcentagens do IMC categorizado, nos grupos controle, gestante e DC	41
Tabela 7	Distribuições de frequências e porcentagens nos grupos controle e gestante das variáveis: raça, diabetes, hipertensão, consumo de álcool, tabagismo, uso de polivitamínicos, uso de ACO, uso de insulina e uso de metformina	43
Tabela 8	Frequência de amostras de cortisol salivar coletadas por trimestre gestacional do grupo gestante.	44
Tabela 9	Análise do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, DC e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres	45
Tabela 10	Análise do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, DC e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo e alto risco	47
Tabela 11	Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) em gestantes com até 10 semanas e com 11 a 13 semanas de gestação	51
Tabela 12	Valores observados do coeficiente de correlação de Spearman do cortisol salivar noturno com a idade e com o IMC, nos grupos controle e gestante nos três trimestres.....	52

Tabela 13	Frequência e mediana (mínimo e máximo) do cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) nos grupos controle e gestante (1 ^o , 2 ^o e 3 ^o trimestre) em cada variável qualitativa: raça, diabetes, hipertensão, consumo de álcool, uso de ACO, uso de insulina e uso de metformina	54
------------------	---	----

RESUMO

Lopes LML. *Padronização dos valores de referência de cortisol salivar noturno em gestantes: comparação com os valores de mulheres não grávidas e pacientes com doença de Cushing* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014

A ocorrência de síndrome de Cushing (SC) durante a gestação é rara, e está associada com significativa morbidade e mortalidade materna. O diagnóstico da SC durante a gestação é, por vezes, problemático pela superposição de achados clínicos e laboratoriais com a gestação normal. Em relação aos aspectos laboratoriais, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) materno na gestação altera parâmetros e testes utilizados para o rastreamento da SC. Desta forma, a confirmação do hipercortisolismo é mais difícil na gestação, particularmente no segundo e terceiro trimestres. Dentre os exames de rastreamento, o cortisol salivar noturno (CSN), por indicar alteração no ritmo circadiano de secreção de cortisol, que é característico da SC, tem sido considerado método importante para diferenciar grávidas com SC daquelas com gravidez normal, que apresentam ritmo circadiano preservado. No entanto, os valores de referência do CSN na gravidez não estão estabelecidos. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo determinar os valores de referência de CSN em gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres tendo como grupo controle mulheres não grávidas e pacientes portadoras de doença de Cushing (DC), com a finalidade de contribuir para o diagnóstico diferencial entre o hipercortisolismo fisiológico e o patológico durante a gestação. Para tanto, o CSN foi mensurado por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) em três grupos de indivíduos: 85 gestantes (grupo gestante), 33 mulheres não grávidas (grupo controle) e 25 mulheres não grávidas com DC (grupo DC). Observou-se menor concentração do CSN no grupo controle (mediana de 0,07 µg/dL) e as maiores no grupo DC (mediana de 0,51 µg/dL). Notou-se tendência de aumento das medianas do CSN no decorrer dos trimestres da gestação (primeiro trimestre: 0,08 µg/dL; segundo trimestre: 0,10 µg/dL; terceiro trimestre: 0,15 µg/dL). Em relação ao grupo controle, o CSN mostrou aumento de 1,1 vezes no primeiro trimestre, 1,4 vezes no segundo trimestre e de 2,1 vezes no terceiro trimestre da gestação. No grupo DC, o CSN foi significativamente superior ao do grupo controle e ao terceiro trimestre gestacional. Observou-se, ainda, que os valores de CSN foram significativamente superiores no terceiro trimestre da gestação em relação ao grupo controle. No presente estudo, determinamos valores de referência para o CSN na gestação, sendo o limite superior para o CSN nos respectivos trimestres gestacionais: 1º trimestre (0,25 µg/dL), 2º trimestre (0,26 µg/dL) e 3º trimestre (0,33 µg/dL). Os valores de corte do CSN que separaram da melhor forma possível o grupo DC do grupo gestante nos três

trimestres foram, respectivamente, 0,255 µg/dL; 0,260 µg/dL e 0,285 µg/dL. A comparação dos valores de corte de CSN de gestantes sem DC com os de pacientes portadoras de DC mostrou alto grau de sensibilidade e especificidade, decrescendo no avançar da gestação. Mesmo no terceiro trimestre, foram de 80% e 93%, respectivamente. Em conclusão, foi observado um aumento progressivo do CSN no decorrer da gestação normal, sendo que concentrações máximas foram encontradas no terceiro trimestre. Um aumento estatisticamente significativo do CSN foi encontrado entre o terceiro trimestre de gestação e o grupo controle. Foram estabelecidos valores de referência para o método CSN nos três trimestres gestacionais e foi encontrada uma boa acurácia diagnóstica do CSN na diferenciação entre gestantes normais e pacientes portadores de DC, mesmo no terceiro trimestre gestacional.

Descritores: Saliva/química; Gravidez; Síndrome de Cushing; Hipersecreção hipofisária de ACTH.

ABSTRACT

Lopes LML. *Standardization of reference values for nighttime salivary cortisol in pregnant women: comparison with values in non-pregnant women and patients with Cushing's disease* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014

Cushing's syndrome (CS) occurs rarely during pregnancy and is associated with significant maternal morbidity and mortality. Diagnosing CS during pregnancy is sometimes challenging, due to overlapping of clinical and laboratorial findings of the disease with characteristics of normal pregnancy. In addition, activation of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy interferes with parameters and tests for screening of CS. Therefore, confirmation of hypercortisolism is more difficult during pregnancy, particularly in the second and third trimesters. Among the screening tests, nighttime salivary cortisol (NSC), which can detect changes in the circadian rhythm of cortisol secretion characteristic of CS, has been considered an important method to distinguish pregnant women with CS from normal pregnant women, in whom the cortisol circadian rhythm is preserved. However, NSC reference values in pregnancy have not yet been established. Thus, this study aims to determine the reference values for NSC in pregnant women in the first, second and third trimesters, using non-pregnant women and patients with Cushing's disease (CD) as controls, in order to establish values to distinguish between physiological and pathological hypercortisolism during pregnancy. To achieve that, we measured NSC by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in three groups of individuals: 85 pregnant women (pregnancy group), 33 non-pregnant women (control group) and 25 non-pregnant women with CD (CD group). Concentration of NSC was lowest in the control group (median 0.07 µg/dL) and highest in the CD group (median 0.51 µg/dL). Median NSC showed a trending increase at each consecutive gestation trimester (first trimester: 0.08 µg/dL; second trimester: 0.10 µg/dL; third trimester: 0.15 µg/dL). Compared with the control group, NSC showed increases of 1.1 times in the first trimester, 1.4 times in the second trimester and 2.1 times in the third trimester of pregnancy. Levels of NSC were significantly higher in the CD group compared with the control group and with the third gestational trimester. Values of NSC were also significantly higher in the third gestational trimester compared with the control group. The upper limit values for NSC during pregnancy determined in this study were 0.25 µg/dL in the first trimester, 0.26 µg/dL in the second trimester and 0.33 µg/dL in the third trimester. The cutoff NSC values that best separated the CD group from the pregnancy group in all three trimesters were, respectively, 0.255 µg/dL, 0.260 µg/dL and 0.285 µg/dL. The comparison between cutoff values of NSC in pregnant women without CD with those in patients with CD showed a high degree of sensitivity and

specificity, which declined with the advancement of pregnancy. In the third trimester, sensitivity and specificity were still high at 80% and 93%, respectively. In conclusion, a progressive increase in NSC levels was observed during normal pregnancy, with maximum concentrations found in the third trimester. A statistically significant increase in NSC was found in the third gestational trimester when compared with the control group. Reference values were established for the NSC method in the three gestational trimesters with a good diagnostic accuracy of NSC in distinguishing between normal pregnant women, including those in the third gestational trimester, from patients with CD.

Descriptors: Saliva/química; Pregnancy; Cushing syndrome; Pituitary ACTH hipersecretion.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Cushing

1.1.1 Definições e epidemiologia

A síndrome de Cushing (SC) é um estado clínico resultante de prolongada e inapropriada exposição a concentrações séricas elevadas de cortisol, com perda da contrarregulação normal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e alteração no ritmo circadiano de secreção de cortisol (Trainer & Grossman, 1991; Newell-Price *et al.*, 1998).

A SC exógena, causa mais comum de SC, deve-se à exposição crônica aos glicocorticoides exógenos (Newell-Price *et al.*, 2006; Pivonello *et al.*, 2008), sejam eles orais, tópicos, injetáveis e/ou inalatórios (Newell-Price *et al.*, 2006; Guaraldi & Salvatori, 2012). Por sua vez, a SC endógena é uma condição rara, com incidência de 2 a 3 casos por 1.000.000/habitantes/ano (Nieman *et al.*, 2008). Estudos recentes, entretanto, sugerem que a SC é mais comum do que anteriormente se acreditava ocorrendo em 0,5-1% dos pacientes hipertensos, 6-9% dos indivíduos com incidentalomas adrenais, 2-3% dos pacientes com diabetes mellitus (DM) mal controlado, e 11% dos indivíduos com osteoporose inexplicada e fraturas vertebrais (Carrol & Findling, 2010). A SC endógena acomete indivíduos em várias faixas etárias, mas com maior prevalência entre 20-30 anos, sendo mais frequente no sexo feminino (Beauregard *et al.*, 2002).

1.1.2 Classificação

A SC endógena pode ser classificada, quanto ao mecanismo fisiopatológico, em dois grupos: (1) causas ACTH-dependentes em que

concentrações de ACTH são elevadas ou inapropriadamente normais para os níveis de cortisol; e (2) causas ACTH independentes em que as concentrações plasmáticas de ACTH estão indetectáveis ou baixas.

As causas dependentes de ACTH representam 80-85% dos casos de SC e, dentre elas, a doença de Cushing (DC), decorrente de adenoma hipofisário produtor de ACTH, é responsável por 80% dos casos. Os 20% restantes são representados pela secreção ectópica de ACTH (SEA), principalmente por carcinoides brônquicos ou carcinoma de pequenas células de pulmão (Arnaldi *et al.*, 2003; Newell-Price *et al.*, 2006). O grupo ACTH-independente é representado por doenças adrenais primárias, principalmente por adenomas em 60% e carcinomas em 40% dos casos (Newell-Price *et al.*, 1998; Newell-Price *et al.*, 2006). Outras raras causas são a hiperplasia adrenal macronodular, doença adrenal nodular pigmentada primária (isolada ou como parte do complexo de Carney) e síndrome de McCune-Albright (Newell-Price *et al.*, 1998; Newell-Price *et al.*, 2006; Carrol & Findling, 2009).

1.1.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da SC acometem vários órgãos e tecidos, não existindo total especificidade dos sinais e sintomas (tabela 1). As características clínicas podem variar entre diferentes pacientes e ainda conforme o estado de ciclicidade, o que leva à dificuldade diagnóstica. Existe, ainda, uma superposição destas manifestações com outras situações clínicas, tais como síndrome metabólica e obesidade. E, para diferenciar destas situações algumas morbididades, são consideradas mais específicas da SC: osteoporose, miopatia proximal, equimoses surgidas espontaneamente ou aos mínimos traumatismos, atrofia cutânea, estrias purpúricas e maiores que 1 cm, pletora facial, doenças psiquiátricas, nefrolitíase e, em crianças, diminuição da velocidade do crescimento

(Findling & Raff, 2001; Newell-Price *et al.*, 2006; Newell-Price, 2008; Nieman *et al.*, 2008; Carrol & Findling, 2010).

Tabela 1 - Manifestações clínicas da síndrome de Cushing com respectivas frequências

Manifestação clínica	Proporção
Obesidade ou ganho de peso	95%
Pletora facial	90%
Fácies arredondada (“de lua cheia”)	90%
Diminuição de libido	90%
Adelgaçamento da pele	85%
Diminuição do crescimento linear em crianças	70-80%
Irregularidade menstrual	80%
Hipertensão arterial	75%
Hirsutismo	75%
Depressão/labilidade emocional	70%
Fragilidade capilar	65%
Intolerância à glicose	60%
Miopatia proximal	60%
Osteopenia ou fratura	50%
Nefrolitíase	50%

FONTE: Adaptado de Newell-Price (2006).

1.1.4 Diagnóstico

Após a suspeita clínica de SC, excluindo-se fonte exógena de glicocorticoide e diante de algum sinal ou sintoma de maior especificidade, o diagnóstico deve ser baseado em duas etapas sequenciais. A primeira etapa consiste na confirmação do hipercortisolismo. Diante da confirmação, prossegue-se, então, a investigação quanto a sua possível etiologia.

Três exames diagnósticos de primeira linha são, atualmente, empregados para confirmação da SC: a medida do cortisol livre em urina de 24h (UFC), supressão do cortisol sérico por doses baixas de dexametasona (DMS) (LDDST) e a avaliação do ritmo circadiano do cortisol por meio da

dosagem do cortisol salivar entre 23h e 24h (Arnaldi *et al.*, 2003; Castro & Moreira, 2007; Nieman *et al.*, 2008; Carrol & Findling., 2010). Nenhum dos exames de primeira linha tem 100% de acurácia diagnóstica (Pivonello *et al.*, 2008). Desta forma, dois exames inequívocos confirmam o hipercortisolismo (Guaraldi & Salvatori, 2012).

Outros exames usados para confirmação do hipercortisolismo são a dosagem do cortisol sérico à meia-noite e o teste combinado de dexametasona-CRH (hormônio de liberação da corticotropina), sendo que, atualmente, devem ser reservados para situações específicas em que os testes de primeira linha de rastreamento não forem conclusivos (Arnaldi *et al.*, 2003; Nieman *et al.*, 2008).

Dentre os exames de primeira linha, o UFC reflete um índice integrado do cortisol livre que circulou no sangue durante esse período. Em contraste com as concentrações do cortisol sérico, que refletem o cortisol total, o UFC não é afetado por fatores que influenciam a proteína ligadora de globulina. Em virtude da possibilidade de hipercortisolismo intermitente, indica-se a coleta de três amostras de UFC. E, se estes valores forem normais, o diagnóstico de SC é altamente improvável na ausência de insuficiência renal. Por outro lado, valores de UFC maiores que 4 vezes o limite superior da normalidade sugerem fortemente o diagnóstico de SC (Newell-Price *et al.*, 2006; Castro & Moreira, 2007; Alexandraki & Grossman, 2011). Estudos mais antigos realizados do UFC mostram sensibilidade e especificidade diagnóstica de 95-100% e 98%, respectivamente, na diferenciação de SC e obesidade (Newell-Price *et al.*, 1998). No entanto, estudos atuais do UFC para o diagnóstico da SC reportam uma sensibilidade que varia de 45-71% e especificidade de 100%. Uma provável explicação para esta baixa sensibilidade são os pacientes que apresentam quadros leves de SC (Carrol & Findling, 2010; Alexandraki & Grossman, 2011). Valores pouco acima da referência do método podem estar presentes nestes pacientes com quadros leves de SC e também em outras situações, como depressão, ansiedade crônica, alcoolismo, gestação, anorexia nervosa e indivíduos cronicamente doentes. Situações estas consideradas estados de pseudo-Cushing. O uso

de medicamentos como carbamazepina, digoxina e fenofibrato também pode levar a resultados falso-positivos (Arnaldi *et al.*, 2003; Castro & Moreira, 2007; Nieman *et al.*, 2008). Em relação a resultados falso-negativos, estes são observados nos erros de coleta da amostra urinária de 24h e na presença de insuficiência renal crônica (Nieman *et al.*, 2008). Desta forma, apesar do UFC ser útil na confirmação da SC, como sua sensibilidade e especificidade não são ideais, ele deve ser realizado em combinação com outros testes de rastreamento para confirmação do hipercortisolismo (Arnaldi *et al.*, 2003; Castro & Moreira, 2007).

O LDDST tem como racional o fato de que doses suprafisiológicas de glicocorticoide suprimem o ACTH e, portanto, a secreção de cortisol em indivíduos normais. Na SC, há uma perda da retroalimentação normal do eixo HHA e não ocorre esta supressão (Nieman *et al.*, 2008; Carrol & Findling, 2010). O teste mais utilizado consiste na determinação do cortisol sérico às 8h após ingestão de 1mg de DMS entre 23h e 24h (*overnight*). O valor de corte recomendado pela *Endocrine Society* para este teste é $< 1,8$ $\mu\text{g/dl}$, o que aumenta a sensibilidade para 95%, com especificidade próxima de 80% para o diagnóstico da SC (Wood *et al.*, 1997; Nieman *et al.*, 2008). Falso-positivos podem ocorrer em estados de pseudo-Cushing, aumento da CBG (globulina ligadora de cortisol), como ocorre no uso de estrógeno ou durante a gestação, e metabolização aumentada ou absorção diminuída da DMS (Arnaldi *et al.*, 2003). Diversos fármacos podem acelerar o metabolismo hepático da DMS, como, por exemplo, carbamazepina, fenitoína, fonobarbital, rifampicina e pioglitazona (Nieman *et al.*, 2008). Na insuficiência renal crônica, tanto a absorção da DMS como sua depuração renal podem estar diminuídas (Newell-Price *et al.*, 1998). Na avaliação de respostas falso-positivas e falso-negativas, alguns especialistas preconizam a dosagem simultânea de cortisol e DMS para se certificarem das concentrações plasmáticas adequadas de DMS (Meikle, 1982; Nieman *et al.*, 2008). Dentre os exames utilizados para rastreamento da SC, o LDDST é o que melhor avalia hipercortisolismo subclínico em pacientes com incidentaloma adrenal (Deutschbein *et al.*, 2009; Raff, 2013).

1.1.4.1 Cortisol salivar noturno

A secreção do cortisol é regulada pelo eixo HHA e caracterizada por uma ritmicidade circadiana. As concentrações plasmáticas de ACTH começam a se elevar entre 3 e 4h da manhã, alcançando pico entre 7 e 9h e reduzem durante o dia com suas menores concentrações em torno da meia-noite (Krieger *et al.*, 1971; Nieman *et al.*, 2008; Mert *et al.*, 2013). Os valores do cortisol sérico e salivar espelham tal fato, sendo as concentrações mais elevadas observadas entre 8 e 9h da manhã, e seu nadir em torno da meia-noite, na ausência de estresse. Esse ritmo circadiano está alterado em pacientes com SC, sendo que a elevação do cortisol ao final da noite é considerada marcador sensível e precoce para SC (Carrol *et al.*; Nieman *et al.*, 2008; Carrol & Findling, 2010).

O cortisol circula na corrente sanguínea ligado cerca de 90% à CBG, 7% à albumina e em menor quantidade circula na forma livre metabolicamente ativa (Brien, 1981; Alexandraki & Grossman, 2010). O cortisol salivar reflete esta forma livre biologicamente ativa, não sendo influenciado por proteínas de ligação. Um aumento no cortisol sérico é refletido por alteração na concentração do cortisol salivar em poucos minutos, mostrando que estão em equilíbrio. A concentração do cortisol salivar não parece ser influenciada pela taxa de fluxo salivar (Viardot *et al.*, 2005; Nieman *et al.*, 2008; Zerikly *et al.*, 2010) e estudos realizados mostram fluxos salivares semelhantes em gestantes e não gestantes (Laine *et al.*, 1988; Abrao *et al.*, 2014).

A utilidade do cortisol salivar no diagnóstico da SC foi, inicialmente, mostrada em estudos realizados a partir da década de 80 (Hiramatsu, 1981; Luthold *et al.*, 1985). Nos dias atuais, o cortisol salivar tem sido considerado um dos exames mais importantes para rastreamento e diagnóstico da SC, o que é corroborado por duas recentes metanálises (Carrol *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Outro recente estudo realizado mostra, ainda, que o cortisol salivar tem desempenho diagnóstico superior ao UFC e deve ser usado como principal teste diagnóstico para SC (Elias *et al.*, 2014).

A dosagem do cortisol salivar noturno (CSN), assim como do cortisol sérico à meia-noite, tem como racional avaliar as concentrações de cortisol no momento de nadir do ritmo circadiano normal, visto que, como referido anteriormente, os pacientes com SC apresentam ritmo circadiano alterado. Concentração anormalmente elevada de cortisol sérico à meia-noite é indicador sensível para SC. No entanto, sua coleta carece de praticidade e seu valor pode ser influenciado pelo estresse da punção venosa. Desta forma, o CSN é um exame mais prático para avaliação da perda do ritmo circadiano na SC (Alexandraki & Grossman, 2010).

Destacam-se como métodos disponíveis para medida do cortisol salivar: o imunoensaio e a espectrometria de massas (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em sequência-LC-MS/MS). Imunoensaio inclui o radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoenzimático (ELISA), eletroquimioluminescência (ECLIA) e detecção fluorométrica. No imunoensaio, embora haja variação no método de detecção e na sua automatização, são todas dosagens competitivas de ligação utilizando anticorpos primários contra cortisol conjugado (Raff, 2012).

O primeiro ensaio utilizado para o cortisol salivar na SC foi o RIA, mas os ensaios validados mais recentemente são ELISA e LC-MS/MS (Nieman *et al.*, 2008; Alexandraki & Grossman, 2010). Os métodos de imunoensaio tem vantagens como baixo custo, facilidade de execução e necessidade de pequenos volumes de saliva, como, por exemplo, o método ELISA que necessita de 20-40 µl de saliva para sua realização. E como desvantagem podem apresentar reação cruzada com esteroides sintéticos (Raff, 2012; 2013). Já o LC/MS-MS requer equipamentos caros e sofisticados, profissional experiente e necessita de quantidade maior de saliva (≥ 100 µl), mas é extremamente útil para avaliar o uso de esteroides sintéticos, sendo para estes casos o melhor método (Raff, 2009; 2013).

Estes métodos resultam em diferentes valores de referência e apresentam diferenças na sensibilidade e especificidade (Raff, 2012). Investigadores de diversos países reportaram uma sensibilidade de 92-100% e uma especificidade de 93-100% para o CSN no diagnóstico da SC (Castro

et al., 1999; Papanicolaou *et al.*, 2002; Yaneva *et al.*, 2004; Carrol *et al.*, 2009). Uma recente metanálise, já comentada anteriormente, foi realizada com estudos publicados de janeiro de 1998 a dezembro de 2012 e também mostrou sensibilidade e especificidade maiores que 90% (Zhang *et al.*, 2013). Embora a LC/MS-MS tenha surgido como método promissor para mensuração do cortisol salivar, alguns recentes estudos mostram baixa sensibilidade e especificidade deste método para SC em comparação com os métodos de imunoensaio (Zerikly *et al.*, 2010; Erickson *et al.*, 2012; Raff, 2013). Um destes estudos mostra sensibilidade de 74,5% e especificidade de 90,1% da LC/MS-MS para o diagnóstico da SC (Erickson *et al.*, 2012).

A medida do cortisol na saliva é simples, reprodutível, não invasiva, pode ser realizada ambulatorialmente e reflete o estado do ritmo circadiano de secreção de cortisol, como referido anteriormente (Castro *et al.*, 2000; Alexandraki & Grossman, 2010). A amostra é estável à temperatura ambiente por 7 dias ou por várias semanas quando refrigerada, e pode ser enviada para um laboratório de referência (Nieman *et al.*, 2008; Alexandraki & Grossman, 2010; Inder *et al.*, 2012).

Os erros pré-analíticos mais comuns para o cortisol salivar são a coleta da amostra em horário incorreto e a contaminação da amostra de saliva, principalmente por meio da contaminação das mãos, lábios e mucosa oral por cremes com hidrocortisona, por exemplo. Ainda podemos destacar como erros pré-analíticos o uso de cigarro antes da coleta do cortisol salivar, algum evento estressante vivido antes de ser colhida a amostra e a contaminação da saliva com sangue (Raff, 2012).

A maioria dos valores de referência de ensaios comerciais é desenvolvida usando amostra de voluntários saudáveis e, geralmente, não levam em consideração idade, gênero e outras condições médicas (Baid *et al.*, 2007). Condições como distúrbios psiquiátricos (depressão, transtorno obsessivo compulsivo), DM mal controlado, gestação e alcoolismo estão associadas com concentrações mais elevadas de CSN. O uso de cigarros antes da coleta também está associado a um aumento dos valores do CSN, em virtude da inibição da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 2 (11 β

HSD 2), enzima que pode estar expressa na glândula salivar e que catalisa a conversão dos glicocorticoides ativos em seus metabólitos inativos (Carroll & Findling, 2008). Em estudo realizado em homens com mais de 60 anos, foram encontrados resultados falso-positivos de CSN em hipertensos e diabéticos (Liu *et al.*, 2005). Outro estudo mostra ainda elevada porcentagem de falso-positivo em obesos (Baid *et al.*, 2007). Desta forma, o desenvolvimento de valores de referência em populações específicas selecionadas é extremamente importante, sendo ideal para cada centro de referência a normatização dos seus próprios valores para o método empregado (Viardot *et al.*, 2005; Alexandraki & Grossman, 2010; Deutschbein & Petersenn; Mert *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o CSN se destaca, dentre os três testes diagnósticos de primeira linha utilizados para o diagnóstico de SC, tanto pela sua praticidade como também pela alta acurácia no diagnóstico da SC. Como estes três testes podem apresentar falso-positivos em estados de pseudo-Cushing, a avaliação do cortisol salivar depende da normatização de valores de referência para populações específicas já citadas.

Condições associadas com hipercortisolismo são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições associadas com hipercortisolismo na ausência de síndrome de Cushing

Condições
Algumas características clínicas da síndrome de Cushing podem estar presentes
Gestação
Depressão e outros transtornos psiquiátricos
Alcoolismo
Resistência glicocorticoide
Obesidade mórbida
Diabetes mal controlado
Sem características clínicas da síndrome de Cushing
Estresse físico (hospitalização, cirurgia, dor)
Anorexia nervosa
Amenorreia hipotalâmica
Excesso CBG (aumenta cortisol sérico e não o urinário)

FONTE: Adaptado de Nieman *et al.* (2008)

1.2 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e gestação

A gestação em mulheres normais está associada a um aumento da ativação do eixo HHA materno. Desta forma, UFC, 17-hidroxisteroides (17 OH) plasmáticos, cortisol plasmático total e livre, e CBG estão elevados na gestação (Nolten *et al.*, 1980; Carr *et al.*, 1981; Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010).

Como resultado do aumento das concentrações do estrogênio placentário, a produção hepática de CBG é aumentada, levando à redução do clearance do cortisol e, assim, ao aumento nas concentrações do cortisol plasmático total (Lindsay & Nieman, 2005; Bronstein *et al.*, 2011). Em virtude do aumento da CBG, as concentrações de cortisol livre diminuem transitoriamente, o que leva à redução do *feedback* negativo e ativação do ACTH, que, então, estimula a secreção de cortisol com o objetivo de manter as concentrações do cortisol livre. Estudos realizados mostram valores elevados de cortisol livre no segundo e terceiro trimestres de gestação (Nolten *et al.*, 1980; Nolten & Rueckert, 1981).

As concentrações plasmáticas de cortisol total e livre se elevam em paralelo durante a gestação (Demey-Ponsart *et al.*, 1982; Lindsay & Nieman, 2005), sendo reportado um aumento das concentrações do cortisol plasmático em até duas a três vezes em relação às mulheres não grávidas (Nolten *et al.*, 1980; Lindsay & Nieman, 2005). Demey-Ponsart *et al.* mostraram que o aumento do cortisol plasmático pode ser observado a partir da 11^o semana de gestação.

Diferentes estudos mostram aumento do cortisol livre de duas a quatro vezes no decorrer da gestação (Nolten & Rueckert, 1981; Cousins *et al.*, 1983; Allolio *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2011). O cortisol salivar, que reflete o hormônio livre, está aumentado até três vezes no terceiro trimestre da gestação em relação às mulheres não grávidas (Allolio *et al.*; Scott *et al.*, 1990). Nierop *et al.*, 2006, também mostraram aumento significativo do cortisol salivar no terceiro trimestre em comparação com os valores encontrados no segundo trimestre e mulheres não grávidas. Outro estudo

demonstrou que o cortisol salivar apresenta redução das suas concentrações no decorrer do dia também na gestação, estando preservado o ritmo circadiano de secreção do cortisol. Também corrobora o achado de outros autores mostrando aumento dos valores do cortisol salivar em gestantes quando comparadas a mulheres não grávidas (Kivlighan *et al.*, 2008). Especificamente em relação ao CSN, seu aumento é observado no final da gestação (Scott *et al.*, 1990; Viardot *et al.*, 2005; Manetti *et al.*, 2012). O UFC e seus metabólitos também se elevam em paralelo ao cortisol durante a gestação. Cousins *et al.* mostraram aumento médio de 180% do UFC durante a gestação em comparação com mulheres não grávidas. Em estudo recente, Jung *et al.* também encontraram aumento de até três vezes do UFC no segundo e terceiro trimestres da gestação.

Existem diferentes explicações para o aumento do cortisol livre: resistência à ação do cortisol, efeitos antiglicocorticoides em virtude de elevadas concentrações de progesterona, alteração do *set point* para ACTH, e secreção autônoma de ACTH e CRH pela placenta (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010).

Apesar da ativação do eixo HHA materno, no feto, as concentrações de glicocorticoides são muito mais baixas que as concentrações maternas devido à intensa atividade da enzima 11 β HSD 2 na placenta que catalisa a conversão dos glicocorticoides ativos, cortisol e corticosterona, em seus metabólitos inativos, e protege o feto do hipercortisolismo materno (Seckl *et al.*, 2000; Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010; Bronstein *et al.*, 2011; Duthie *et al.*, 2013). No entanto, no final da gestação, a atividade da enzima favorece a produção do hormônio ativo que é importante para maturação pulmonar do feto (Murphy, 1977; Karaca *et al.*, 2010).

A concentração do ACTH está aumentada na gestação e alcança níveis máximos durante o parto. Um estudo demonstrou a presença de ACTH e β -endorfina no tecido trofoblástico, sugerindo um precursor comum, a pró-ópio-melanocortina (POMC) (Demura *et al.*, 1982). Valores elevados de ACTH são observados no final da gestação e sugerem fonte de ACTH que não é sujeita ao controle de *feedback*. Em um estudo, foi observado

aumento de, aproximadamente, três vezes nas concentrações do ACTH entre o final do primeiro trimestre da gestação e o terceiro trimestre (Carr *et al.*, 1981). O ACTH placentário parece contribuir de forma significativa para o hipercortisolismo na gestação e também é regulado pela liberação do CRH placentário (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Na gestação, destaca-se, ainda, uma maior responsividade adrenal à estimulação pelo ACTH (Nolten *et al.*, 1981; Bronstein *et al.*, 2011). O aumento das concentrações do cortisol e ACTH pode ser observado na Figura 1.

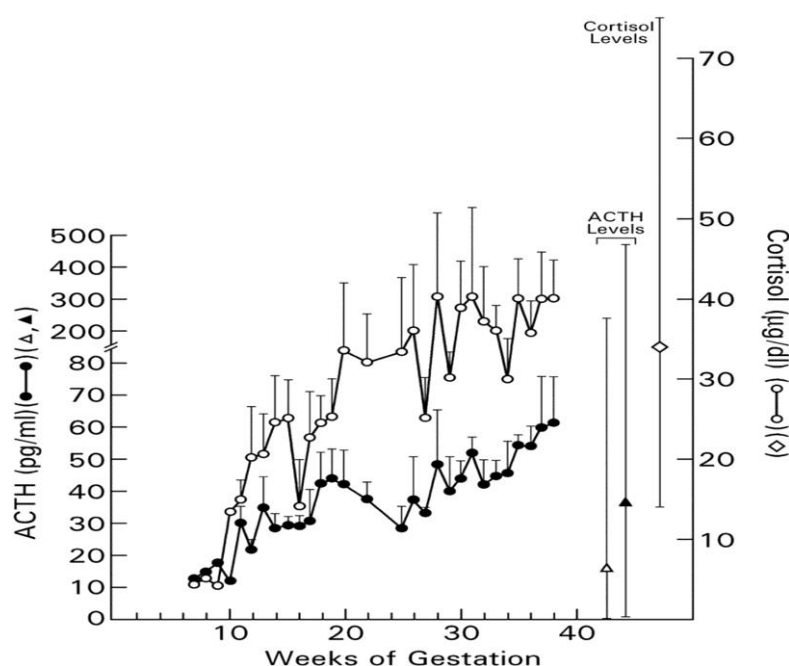


Figura 1 - Aumento no cortisol sérico (O) e ACTH (●) em controles normais durante gestação. Adaptado de Lindsay & Nieman (2005)

A placenta também é responsável pela elevação do CRH durante a gestação (Fadalti *et al.*, 2000), que é semelhante ao CRH hipotalâmico em sua estrutura, imunorreatividade e bioatividade (Magiakou *et al.*, 1997; Lindsay & Nieman, 2005). Embora o ritmo circadiano do ACTH e cortisol estejam preservados, o ritmo do CRH ainda não foi bem demonstrado. Supõe-se que exista uma estimulação não circadiana e não pulsátil do eixo HHA materno pelo CRH placentário (Magiakou *et al.*, 1996; Karaca *et al.*, 2010). As concentrações do CRH plasmático aumentam no decorrer da gestação e começam a se elevar por volta de 8 semanas (Sorem *et al.*,

1996). Estas concentrações apresentam acentuado aumento em torno de 35 semanas e valores máximos são observados por volta de 40 semanas de gestação (Nolten *et al.*, 1980; Goland *et al.*, 1988), conforme demonstrado na Figura 2.

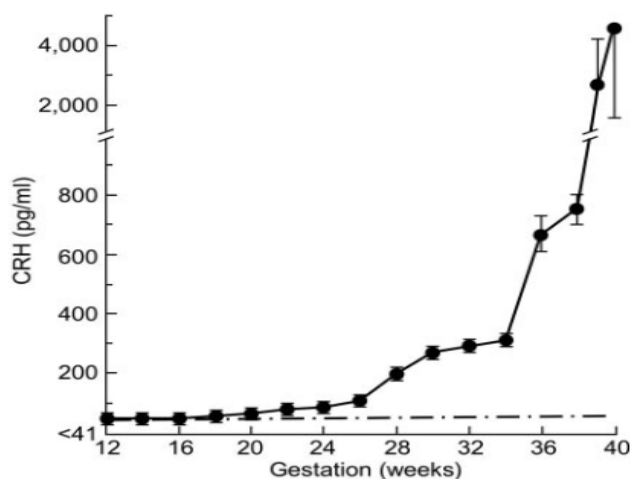


Figura 2 - Concentrações do CRH plasmático em sete mulheres ao longo da gestação. Adaptado de Lindsay & Nieman (2005)

Para evitar a hiperestimulação desnecessária do eixo HHA, a proteína ligadora do CRH (CRHBP) produzida pelo fígado controla os efeitos do CRH placentário. A CRHBP apresenta concentrações semelhantes em mulheres grávidas e não grávidas, sugerindo que, ao contrário da CBG, a CRHBP não é influenciada pelas elevadas concentrações de estrogênio (Linton *et al.*, 1993). Durante as últimas semanas de gestação, uma progressiva redução nas concentrações desta proteína de ligação permite maiores quantidades de CRH livre para estimular o eixo HHA em preparação para o parto (Linton *et al.*, 1993; Bronstein *et al.*, 2011). Estudos mostram que não existe correlação entre o CRH plasmático e o ACTH ou cortisol total e livre, sugerindo que o CRH placentário não é o único regulador do eixo HHA materno, ou até mesmo que esta regulação ocorre de forma parácrina na placenta (Campbell *et al.*, 1987; Allolio *et al.*, 1990). Estes achados parecem ser consistentes com o fato de que a função do eixo HHA permanece preservada na gestação normal, apesar dos corticotrofos maternos estarem dessensibilizados. O CRH placentário parece ser o maior estímulo para o eixo HHA no terceiro trimestre da gestação (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010).

O CRH tem função relevante na reprodução feminina, sendo importante para decidualização, implantação e função ovariana. O CRH placentário também é fundamental para estereoidogênese adrenal do feto, manutenção da circulação fetoplacentária e determinação do início do parto (Kalantaridou *et al.*, 2003; Karaca *et al.*, 2010).

No início do trabalho de parto, as concentrações plasmáticas de CRH, ACTH e cortisol aumentam significativamente (Carr *et al.*, 1981; Sasaki *et al.*, 1987). As concentrações de CRH são máximas 48h antes do trabalho de parto. Durante o trabalho de parto, enquanto o CRH apresenta redução das suas concentrações, a secreção do ACTH é máxima (Ochedalski *et al.*, 2001). E, no pós-parto imediato, as concentrações de CRH, ACTH e cortisol apresentam redução dos seus valores atingindo os valores das mulheres não grávidas (Carr *et al.*, 1981; Lindsay & Nieman, 2005).

A ativação do eixo HHA materno está descrita na Figura 3.

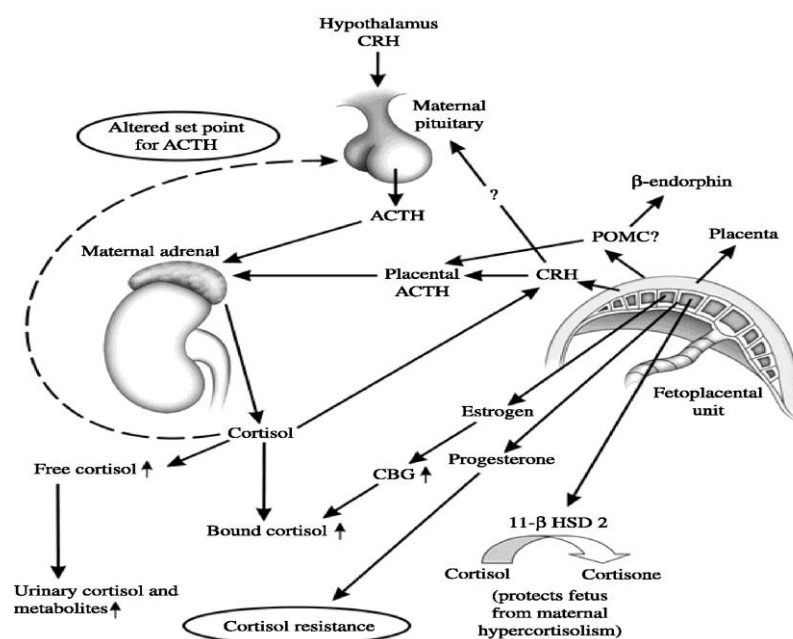


Figura 3 - Eixo HHA durante gestação:

O CRH hipotalâmico estimula a secreção do ACTH, que, por sua vez, estimula a secreção adrenal de cortisol. O CRH placentário é um importante estimulador do ACTH placentário que contribui para aumento da secreção adrenal de cortisol. O efeito do CRH placentário na hipófise materna é desconhecido. Existe um efeito estimulatório entre CRH e cortisol. Estrogênio aumenta a CBG, com aumento do cortisol total, mas a secreção do cortisol livre também é aumentada durante a gestação. Progesterona tem efeito antiglicocorticoide na mãe e a enzima 11 β-HSD 2 protege o feto do hiper-cortisolismo materno (→ , estimulação; --- , inibição; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; ACTH; POMC, proopiomelanocortina; CBG, globulina de ligação do cortisol; 11 β HSD 2, 11 β hidroxisteroidesdesidrogenase 2). Adaptado de Karaca *et al.* (2010).

1.3 Síndrome de Cushing e gestação

A ocorrência de gestação em mulheres com SC é rara, com, aproximadamente, 150 casos reportados na literatura, visto que hiperandrogenismo e hipercortisolismo suprimem a secreção hipofisária de gonadotrofinas (Kita *et al.*; Vilar *et al.*, 2007; Karaca *et al.*, 2010). Oligomenorreia e amenorreia, diretamente associadas com infertilidade, são relatadas em, aproximadamente, 75% das mulheres em idade reprodutiva diagnosticadas com SC (Kita *et al.*, 2007).

1.3.1 Complicações maternas e fetais

A SC está associada com significativa morbidade e mortalidade materna em 70% dos casos. As complicações mais comuns são hipertensão arterial sistêmica (HAS) e DM, sendo menos comuns osteoporose, fraturas, complicações psiquiátricas graves, cardiopatia e morte (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007). Também é descrito edema agudo pulmonar e síndrome HELLP, síndrome esta definida por hemólise, aumento de enzimas hepáticas e plaquetopenia (Sammour *et al.*, 2012). Dentre as complicações para o feto, destacam-se: parto prematuro, crescimento intrauterino restritivo (CIUR), aborto espontâneo e óbito fetal (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Parto prematuro pode ocorrer em mais de 50% das mulheres com SC, independente da etiologia (Molich, 2003). As complicações maternas e fetais com suas respectivas frequências são descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência de complicações maternas e fetais decorrentes da SC durante a gestação.

Morbidade materna	Morbidade fetal
Hipertensão arterial (68%)	Prematuridade (43%)
Diabetes ou Intolerância à glicose (25%)	Natimorto (6%)
Preeclâmpsia (14%)	Aborto espontâneo/ morte intrauterina (5%)
Osteoporose e fratura (5%)	Morte infantil em 2 casos (hepatite aguda; sepse e gastroenterite)
Doença cardíaca (3%)	Crescimento intrauterino restritivo (21%)
Doenças psiquiátricas (4%)	Hipoadrenalismo (2%)
Infecção de ferida operatória (2%)	Relato isolado de lábio leporino, ducto patente e coarctação
Morte materna (2%)	Hemorragia intraventricular em dois casos pós-parto

FONTE: Adaptado de Lindsay & Nieman (2005).

1.3.2 Etiologia

A etiologia da SC difere entre mulheres grávidas e não grávidas. Adenomas adrenais são responsáveis por 40 a 50% dos casos em gestantes com SC em comparação com 15% em mulheres não grávidas (Lindsay & Nieman; Lindsay *et al.*, 2005; Sammour *et al.*, 2012). A incidência aumentada de SC adrenal na gestação não é bem compreendida. Alguns autores acreditam dever-se à presença de receptores adrenais ilícitos para o hormônio luteinizante (LH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Karaca *et al.*, 2010). Outros autores levantam a possibilidade de que mulheres com DC tenham maior comprometimento da ovulação do que mulheres com doença adrenal, sendo que adenomas adrenais, por produzirem essencialmente cortisol, interferem menos com a função ovulatória. Já a DC está, geralmente, associada a um estado de hiperandrogenismo e hipercortisolismo que poderia levar à maior supressão das gonadotrofinas hipofisárias (Lado-Abeal *et al.*, 1998; Vilar *et al.*, 2007; Sammour *et al.*, 2012, Lim *et al.*, 2013). Desta forma, esta pode ser a razão da DC não ser a etiologia mais prevalente na gestação (33%), contrastando com 58-70% dos casos fora da gravidez (Lindsay *et al.*, 2005). A maioria dos pacientes com

SEA tem grave hipercortisolismo e amenorreia, o que também pode levar à redução da prevalência desta condição na gravidez (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007). As diversas causas de SC na gestação são descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Etiologia da SC na gestação

Etiologia	Casos [n(%)]
Doença de Cushing	40 (33)
Adenoma adrenal	56 (46)
Carcinoma	12 (10)
Complexo Carney's	1 (0,8)
Feocromocitoma	1 (0,8)
Hiperplasia ACTH-independente	4 (3)
Síndrome ACTH ectópico	4 (3)
Não especificado	4 (3)

FONTE: Adaptado de Lindsay & Nieman (2005).

1.3.3 Diagnóstico

Em se tratando de SC e gestação, existem três situações possíveis. A SC com diagnóstico estabelecido previamente à gestação, gestantes normais que apresentam quadro clínico e laboratorial semelhantes a SC e aquelas gestantes que desenvolvem a SC durante a gestação.

Em casos de diagnóstico prévio da SC, deve haver acompanhamento rigoroso da paciente durante a gestação voltado para quadro clínico, exames laboratoriais e comorbidades.

No entanto, se a SC desenvolve-se durante a gestação, torna-se, muitas vezes, difícil o diagnóstico diferencial com gestação normal devido à superposição de sinais e a sintomas como ganho de peso, estrias, HAS, fadiga, hiperglicemia e alterações do humor, que também ocorrem na mulher normal grávida e podem retardar o diagnóstico (Lindsay & Nieman; Tejura *et al.*, 2005; Karaca *et al.*, 2010). A SC, frequentemente, não é detectada até 12-26 semanas de gestação (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007).

Elevado grau de suspeição clínica é requerido para identificação precoce e manejo adequado da SC com o objetivo de evitar complicações maternas e fetais (Holgado-Galicia *et al.*, 2011; Borna *et al.*, 2012). A presença de hipocalcemia, fraqueza muscular, fraturas patológicas, e estrias largas e violáceas abdominais e fora do abdome são importantes por serem mais específicas, aumentando a suspeição diagnóstica para SC (Karaca *et al.*, 2010). Em geral, estas alterações não são encontradas na gestação normal, o que contribui na diferenciação com gestantes que desenvolvem a SC durante a gestação. A presença de estrias largas e violáceas em paciente com SC pode ser observada na Figura 4.



Figura 4 - Foto de paciente com SC com múltiplas estrias largas e violáceas em membros inferiores

Desta forma, nos casos relatados na literatura, o diagnóstico da SC na gestação ocorreu a partir da suspeição clínica por meio da presença de HAS, DM, plethora facial, presença de estrias largas e violáceas, hirsutismo, equimoses surgidas aos mínimos traumatismos, fácies arredondada e ganho de peso, embora nem todas estas manifestações ocorram numa mesma gestante (Lindsay *et al.*, 2005; Gopal *et al.*; Ragonese *et al.*; Sammour *et al.*, 2012).

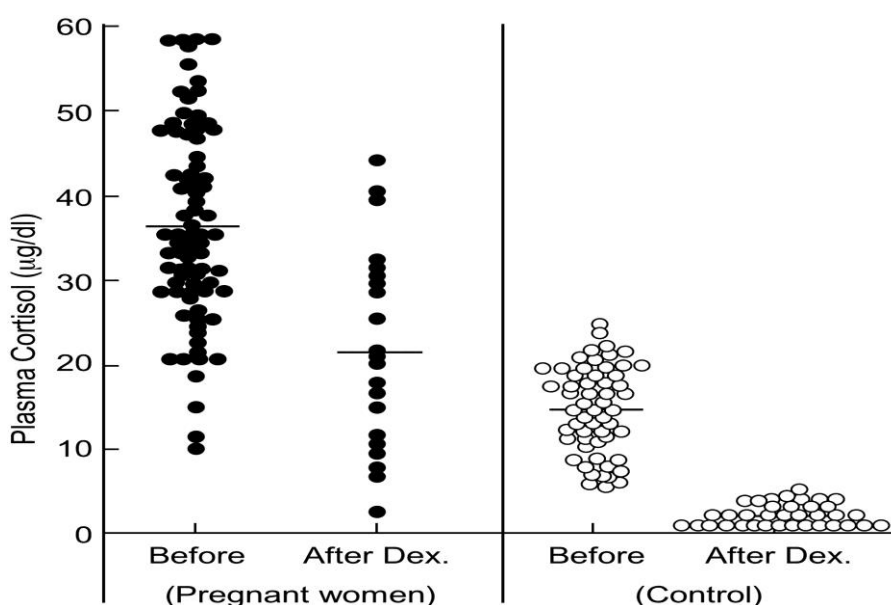
A gestação normal ao modificar o eixo HHA altera parâmetros e exames utilizados para o rastreamento da SC (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007). Como referido anteriormente, UFC, cortisol plasmático total e livre, ACTH e CBG estão elevados na gestação (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Deste modo, a confirmação do hipercortisolismo torna-se mais difícil na gestação, particularmente no segundo e terceiro trimestres (Nieman *et al.*, 2008). No entanto, como o ritmo circadiano de secreção do cortisol é preservado na gestação normal e alterado em casos de SC (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007), exames laboratoriais que avaliem o ritmo circadiano podem contribuir nesta diferenciação, embora sejam observados valores mais elevados do cortisol noturno em mulheres grávidas quando comparadas com mulheres não grávidas, como relatado anteriormente (Scott *et al.*, 1990; Viardot *et al.*, 2005; Karaca *et al.*, 2010).

A concentração do cortisol sérico das 08h é semelhante em mulheres gestantes com e sem SC. Desta forma, assim como em mulheres não grávidas, o cortisol sérico, geralmente, não estabelece o diagnóstico da SC durante a gestação. (Vilar *et al.*, 2007; Holgado-Galicia *et al.*, 2011).

Dentre os exames utilizados para rastreamento da SC destacam-se, como já referido, a medida do cortisol livre em urina de 24h (UFC), o LDDST e a avaliação do ritmo circadiano do cortisol, usando a dosagem do cortisol salivar entre 23h e 24h (Newel-Price, 2008).

O UFC tem sido recomendado como método de rastreamento da SC. Na gestação, seus níveis estão inalterados durante o primeiro trimestre, mas podem estar aumentados em até três vezes no segundo e terceiro trimestres (Lindsay *et al.*, 2005; Nieman *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011). Um recente estudo, já referido previamente, confirma estes dados, mostrando aumento do UFC durante a gestação, alcançando valores máximos no terceiro trimestre (Jung *et al.*, 2011). Deste modo, apenas valores de UFC maiores que três vezes o limite superior da normalidade podem ser considerados indicativos de SC na gestação (Lindsay *et al.*, 2005; Nieman *et al.*, 2008). Numa revisão de casos, foi observado um aumento médio de oito vezes no UFC em gestantes com SC (Lindsay *et al.*, 2005).

De acordo com guideline do diagnóstico da SC, o LDDST não deve ser primeira opção em virtude dos resultados falso-positivos durante a gestação devido à resposta alterada à DMS (Nieman *et al.*, 2008). Enquanto a maioria das mulheres não grávidas mostra uma consistente supressão do cortisol plasmático, existe uma ampla variação da resposta na mulher grávida, como observado na Figura 5. Segundo alguns autores esta resposta alterada à DMS tem sido atribuída aos efeitos da CBG sobre o cortisol, refratariedade tecidual aos glicocorticoides ou alteração do set point do eixo HHA (Lindsay & Nieman, 2005).



FONTE: Adaptado Lindsay & Nieman (2005)

Figura 5 - Avaliação do cortisol sérico antes e após a administração de 1 mg de DMS na mulher grávida (●). Uma dose única de DMS foi administrada por via oral as 23h00 e sangue foi colhido as 08h00 da manhã seguinte

Dentre os exames de rastreamento, o CSN, por indicar alteração no ritmo circadiano de secreção de cortisol que é característico da SC, tem sido considerado método importante para diferenciar grávidas com SC daquelas com gravidez normal, que apresentam ritmo circadiano preservado (Lindsay & Nieman, 2005). Como referido anteriormente, estudos realizados mostram aumento do CSN no final da gestação (Scott *et al.*, 1990; Viardot *et al.*, 2005). No entanto, os valores de referência do CSN na gravidez não estão

estabelecidos (Lindsay & Nieman, 2005; Kita *et al.*, 2007; Nieman *et al.*, 2008; Karaca *et al.*, 2010; Bronstein *et al.*, 2011; Hampson *et al.*, 2013).

A dosagem do cortisol sérico à meia-noite tem sido útil na confirmação do hipercortisolismo em alguns casos na gestação. No entanto, faltam estudos para avaliar um valor de corte e a interpretação deste teste na gestação (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007).

Na avaliação do diagnóstico diferencial da SC na gestação, são recomendados, inicialmente, o teste de supressão com dose alta de dexametasona (HDDST), avaliação das concentrações de ACTH e exames de imagem adrenal (ultrassonografia) (Lindsay *et al.*, 2005).

A avaliação das concentrações de ACTH plasmático que são utilizados para diferenciar causas ACTH-dependentes de causas ACTH independentes deve levar em conta o aumento das concentrações do ACTH e a predominância de patologias adrenais na gestação. Os valores do ACTH podem não estar supressos em gestantes com SC adrenal, achado que difere do encontrado em mulheres não grávidas com SC adrenal em que os valores do ACTH estão comumente reduzidos. Isto pode ser atribuído ao aumento da produção do ACTH pela placenta ou estimulação do ACTH pelo CRH placentário, como referido anteriormente. Desta forma, valores elevados de ACTH ou inapropriadamente normais para as concentrações de cortisol podem não excluir etiologia adrenal na gestação (Karaca *et al.*, 2010).

O HDDST, em sua forma clássica, é realizado com a administração de 2 mg de DMS a cada 6 horas, por 48h, com uma dosagem de cortisol sérico basal e outra 48h após o início do teste. Uma supressão do cortisol sérico > 50% com relação ao valor basal indica DC, enquanto supressão < 50% sugere SAE ou tumor adrenal (Tyrrell *et al.*, 1986; Newell-Price *et al.*, 1998). Este teste pode ser usado para distinguir DC de SEA em mulheres não grávidas. No entanto, na gravidez, sua eficácia é desconhecida em virtude do pequeno número de casos de SEA reportados. Tem sido útil para discriminar causas adrenais de SC da DC, o que pode ser de grande utilidade tendo em vista as dificuldades na interpretação das concentrações

do ACTH plasmático na gestação (Lindsay *et al.*; Lindsay & Nieman, 2005). Numa revisão sistemática, Lindsay *et al.* mostraram que nenhum paciente com SC por patologia adrenal apresentou supressão, enquanto quatro de sete pacientes com DC apresentaram.

O teste do CRH baseia-se no fato de que a maioria dos corticotropinomas responde à administração do CRH com uma elevação significativa do ACTH e do cortisol plasmáticos, enquanto tumores adrenais e a maioria dos tumores ectópicos produtores de ACTH não respondem (Newell-Price *et al.*, 1998; Newell-Price *et al.*, 2006). Este teste não tem sido sistematicamente estudado na gestação. Em relatos de literatura, pacientes submetidos ao teste mostraram aumento do cortisol sérico e tiveram confirmação cirúrgica da DC. Seu uso tem sido indicado quando patologias adrenais são improváveis após uma avaliação inicial (Lindsay & Nieman; Lindsay *et al.*, 2005; Vilar *et al.*, 2007).

Para gestantes com testes do CRH e HDDST com resposta consistente com DC e lesão hipofisária maior que 6 mm pela RM, geralmente, nenhum teste adicional é necessário, assim como ocorre em pacientes não gestantes (Lindsay & Nieman, 2005).

Em casos isolados, o cateterismo bilateral dos seios petrosos inferiores pode ser indicado havendo poucos relatos na literatura do seu uso na gestação. É considerado o método mais importante na diferenciação entre fontes hipofisárias e não hipofisárias de ACTH na população não gestante. Um gradiente entre o valor do ACTH plasmático obtido neste local e o de uma amostra plasmática periférica simultânea indica uma fonte central de ACTH. No entanto, seu uso na gestação é limitado pelo risco de radiação ionizante. Deve ser considerado apenas após avaliação completa com exames não invasivos e em centros considerados de referência para realizar tal procedimento (Lindsay *et al.*; Lindsay & Nieman, 2005).

Em resumo, embora não exista um algoritmo para o diagnóstico da SC na gestação, alguns autores recomendam a combinação do UFC e CSN como testes de rastreamento iniciais. Em pacientes com SC confirmada, concentrações baixas de ACTH indicam a realização de imagem adrenal.

Entretanto, em casos em que o ACTH está elevado ou inapropriadamente normal, a combinação do HDDST e do teste do CRH podem contribuir no diagnóstico diferencial entre o tumor corticotrófico (DC) e a SEA (Lindsay & Nieman, 2005).

Na avaliação do diagnóstico diferencial, também é recomendado exame de imagem adrenal, sendo a ultrassonografia (US) um método seguro e efetivo (Lindsay & Nieman, 2005). Deve-se evitar a realização de tomografia computadorizada (TC) na gestação (Doshi *et al.*, 2003; Vilar *et al.*, 2007) e a ressonância magnética (RM) só deve ser indicada em casos específicos. A RM hipofisária deve ser considerada em pacientes com suspeita de SC ACTH-dependente. Em virtude do potencial efeito teratogênico, a RM é contraindicada no primeiro trimestre e considerada segura após 32 semanas de gestação. Entre 12 e 32 semanas, deve ser avaliado o risco e benefício em cada caso. O uso do contraste gadolínio deve ser evitado na gestação, sendo considerado categoria C pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Lindsay *et al.*; Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007).

Diante do exposto, os casos relatados na literatura de gestação em mulheres com SC tiveram seu diagnóstico por meio da combinação do resultado de exames e testes realizados. Numa série de quatro casos de gestação e DC já referida anteriormente, em todos os casos, após suspeita clínica, a confirmação bioquímica da SC foi realizada por meio da elevação do UFC e cortisol sérico à meia-noite com valores $> 7,5 \mu\text{g/dl}$, sendo que este corte para o cortisol sérico à meia-noite apresenta elevada sensibilidade para o diagnóstico da SC. Dentre os exames existentes para o diagnóstico diferencial, no primeiro caso, foram realizados teste do CRH com resposta sugestiva de DC, HDDST sem supressão do cortisol, RM hipófise sem gadolínio normal e cateterismo que mostrou gradiente central. Num segundo caso, foi utilizado para diagnóstico a RM de hipófise e o cateterismo. Um terceiro caso desta série teve o diagnóstico da DC baseado na RM de hipófise que mostrava um microadenoma e nos valores elevados de ACTH plasmático. E, no último caso, a paciente apresentava HDDST

com supressão do cortisol que era sugestivo de DC, cateterismo com gradiente central e RM hipófise normal. Nestes quatro casos, as pacientes foram submetidas à cirurgia com confirmação da DC (Lindsay *et al.*, 2005). Em casos relatados por outros autores, também foi usada a combinação do HDDST e RM para o diagnóstico da DC (Triay *et al.*, 2010). Outros relatos de caso da literatura mostraram pacientes com aumento do UFC, não supressão do cortisol com dose baixa de DMS, como já esperado pela própria gestação, e valores baixos de ACTH, que levaram à realização de imagem adrenal, sendo confirmado SC de causa adrenal (Shaw *et al.*, 2002; Doshi *et al.*, 2003; Kita *et al.*, 2007; Holgado-Galicia *et al.*, 2011; Borna *et al.*, 2012; Chang *et al.*; Lim *et al.*, 2013). Sammour *et al.* reportaram um caso em que a paciente após suspeita clínica apresentava aumento do UFC, não supressão do cortisol por dose baixa de DMS e aumento do cortisol salivar. Neste caso, valores baixos de ACTH sugeriram se tratar de SC ACTH-independente que foi confirmado por imagem adrenal. Desta forma, pode-se observar que os testes e exames na gestação são interpretados numa combinação de resultados, levando-se em conta a resposta esperada ao teste para sugerir a etiologia da SC e alterações do eixo HHA próprias da gestação.

1.3.4 Tratamento

A gravidade do hipercortisolismo e a idade gestacional são importantes fatores que devem ser considerados na decisão do tratamento mais adequado (Karaca *et al.*, 2010).

O tratamento cirúrgico para SC na gravidez é o mais indicado para todas as causas de SC, exceto em casos de gestação no final do terceiro trimestre em que o tratamento medicamentoso deve ser considerado (Lindsay *et al.*, 2005; Lindsay & Nieman, 2005). A cirurgia deve ser indicada entre a décima segunda e a vigésima nona semana de gestação (Bronstein *et al.*, 2011). O tratamento medicamentoso deve ser recomendado como

segunda escolha conforme Lindsay *et al.* Dentre as opções medicamentosas, a metirapona, inibidor da esteroidogênese adrenal (Lim *et al.*, 2013), é a droga mais utilizada e apresenta boa tolerância (Lindsay *et al.*; Lindsay & Nieman, 2005). Ainda pode ser usado o cetoconazol, agente antifúngico com propriedades antiesteroidogênicas (Lim *et al.*, 2013), que tem surgido como opção em potencial por alguns autores, embora, segundo Lindsay *et al.*, deve ser reservado para casos de emergência e casos em que a metirapona não pode ser tolerada. Mais estudos com cetoconazol são necessários para se estabelecer a segurança desta droga na gravidez (Lindsay *et al.*; Lindsay & Nieman, 2005; Lim *et al.*, 2013). O mitotane tem sido contraindicado na gestação por ter efeitos teratogênicos (Lindsay & Nieman, 2005), como apresentado em caso relatado na literatura por Leiba *et al.*, 1989.

Diante de tudo que foi exposto, dos métodos existentes para rastreamento do hipercortisolismo, o CSN tem sido proposto como método importante para diagnóstico da SC em gestantes. Como referido anteriormente, o LDDST não deve ser primeira opção em virtude dos resultados falso-positivos durante gestação e o UFC pode estar aumentado no segundo e terceiro trimestres da gestação. Embora o UFC seja recomendado como método de rastreamento da SC na gestação, o CSN se destaca pela sua praticidade e, principalmente, por indicar alteração no ritmo circadiano de secreção de cortisol característico da SC e que é preservado na gestação normal. Diante das alterações do eixo HHA próprias da gestação, a gestante passa a fazer parte de uma população específica em que os valores de CSN não estão determinados. Não conhecemos estudos avaliando o CSN nos três trimestres de gestação. Desta forma, este estudo tem como objetivo contribuir para este tópico, determinando os valores de CSN na gestação em nosso centro de referência (Hospital das Clínicas – FMUSP). Uma vez estabelecidos tais valores, a aplicabilidade clínica do CSN poderá ser utilizada de forma mais confiável na diferenciação da gestação normal de gestantes que desenvolvem SC.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo determinar os valores de referência de cortisol salivar noturno em gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres tendo como grupo controle mulheres não grávidas e pacientes portadoras de DC, com a finalidade de contribuir para o diagnóstico diferencial entre o hipercortisolismo fisiológico e o patológico durante a gestação.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Entre agosto de 2013 e setembro de 2014, foram avaliados 142 indivíduos do sexo feminino, com idade compreendida entre 18 e 45 anos, divididos em três grupos: (1) grupo gestante, (2) grupo controle e (3) grupo de pacientes com DC.

O presente estudo é prospectivo em relação aos grupos gestante e controle. Já em relação ao grupo DC, ele é parcialmente retrospectivo, utilizando-se os valores de CSN das pacientes que tiveram diagnóstico da DC a partir de 06/2010 (data em que foi iniciada a dosagem do CSN pelo método ELISA no Hospital das Clínicas – FMUSP); e, em parte prospectivo, sendo avaliadas amostras de casos novos diagnosticados no mesmo período de coleta do grupo gestante e controle.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Processo nº8980/13. Os indivíduos assinaram os respectivos Termos de Consentimento Informado (Anexos A, B e C).

3.1 Casuística

3.1.1 Grupo gestante

O grupo gestante foi formado por 85 mulheres grávidas que foram recrutadas do Ambulatório de Assistência Pré-Natal da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP. Este grupo foi subdividido em gestantes de baixo e de alto risco. Das 85 gestantes, 69 eram de baixo risco que eram acompanhadas na Liga Multiprofissional de Assistência Pré-Natal, dos alunos da FMUSP e 16 eram gestantes de alto risco que eram acompanhadas no Setor de

Endocrinopatias da Clínica Obstétrica do HC-FMUSP. Os dados gerais de cada indivíduo incluso no grupo gestante encontram-se disponíveis nos Anexos D e E.

A gravidez de alto risco constitui-se “na gestação na qual a vida ou a saúde da mãe e/ou do feto e/ou do recém-nascido têm maiores chances de serem atingidas que as da média da população considerada” (Caldeyro-Barcia, 1973). No presente estudo, o que definiu gestação de alto risco foi a presença de DM2 e/ou HAS. As grávidas acompanhadas na Liga Multiprofissional de Assistência Pré-Natal não apresentaram nenhum critério para serem classificadas como gestantes de alto risco durante o seguimento.

Em relação à idade gestacional, a gravidez pode ser dividida em trimestres, conforme sugerido por Johnson *et al.*, 1986 (primeiro trimestre: até 13 semanas de gestação; segundo trimestre: de 14 a 27 semanas, e terceiro trimestre: de 28 semanas até o parto). As grávidas do presente estudo foram seguidas longitudinalmente do primeiro ao terceiro trimestre de gestação quando iniciavam o pré-natal antes de 13 semanas (primeiro trimestre). E acompanhadas a partir do segundo ou terceiro trimestres se já iniciavam o pré-natal nesta idade gestacional ou se eram incluídas no estudo nos trimestres referidos.

3.1.2 Grupo controle

O grupo controle é composto por 33 mulheres não grávidas, pareadas em idade com grupo gestante e grupo DC. Foi formado por mulheres voluntárias e por funcionárias do HC-FMUSP. Das 33 mulheres do grupo controle, 28 não apresentavam comorbidades clínicas e 5 mulheres apresentavam comorbidades como HAS e/ou DM2. Uma das mulheres do grupo controle (indivíduo #4) engravidou durante o estudo, sendo, também, incluída no grupo gestante (indivíduo #26). Os dados gerais de cada indivíduo do grupo controle estão demonstrados no Anexo F.

3.1.3 Grupo doença de Cushing (DC)

No grupo de pacientes com DC, foram incluídas 25 pacientes que tiveram este diagnóstico confirmado no período de junho de 2010 a fevereiro de 2014 e que são acompanhadas no Ambulatório da Unidade de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP. Todas as pacientes foram submetidas à cirurgia e tiveram diagnóstico confirmado de DC por histopatologia e/ou remissão clínica e laboratorial. E nenhuma das pacientes deste grupo estava grávida.

Neste grupo, não foram incluídos indivíduos com SC por patologias adrenais do Ambulatório de Suprarrenal da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP, visto que não havia, dentre os casos acompanhados neste ambulatório, pacientes na faixa etária de 18 a 45 anos e sexo feminino, com diagnóstico a partir de junho de 2010.

3.1.4 Critérios de exclusão para os grupos

Para definição da casuística dos grupos, foram utilizados os seguintes critérios de exclusão: doenças psiquiátricas (exceto para DC), alcoolismo, uso recente de glicocorticoides e insuficiência adrenal. Para os grupos gestante e controle, foi, ainda, adotado como critério de exclusão a preexistência da SC.

3.1.5 Variáveis dos grupos

Para os grupos gestante e controle, foram analisadas as seguintes variáveis: índice de massa corporal (IMC), raça, presença de DM2 e/ou HAS, consumo de álcool, tabagismo, uso de medicamentos como polivitamínicos, anticoncepcional oral (ACO), metformina e anti-hipertensivos. No grupo DC, foi analisado o IMC.

O IMC, um dos indicadores usados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para verificação do estado nutricional, é definido como o peso do indivíduo (kg) dividido pela sua altura (m) elevada ao quadrado, como mostrado na Tabela 5. No grupo gestante, foi considerado, para cálculo do IMC, o peso exatamente anterior à gestação segundo informações fornecidas pela paciente, sendo a altura confirmada por meio de medida na primeira consulta pré-natal.

Tabela 5 - Classificação do IMC – OMS (WHO, 1995)

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

As pacientes com DM2 do grupo controle tiveram confirmação diagnóstica anterior ao estudo que foi baseada nos critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA) (*American Diabetes Association, 2012*). No grupo gestação de alto risco, foram incluídas pacientes diabéticas tipo 2, sendo estas tanto pacientes com diabetes diagnosticado antes da gestação, como pacientes que realizaram exames na primeira consulta pré-natal que indicaram diabetes preexistente, não diagnosticado anteriormente. Nestas duas situações, o diagnóstico também foi baseado nos critérios da ADA. Não foram incluídas gestantes com diabetes tipo 1, diabetes gestacional e pacientes com diabetes descompensado neste estudo. Da mesma forma, as gestantes de alto risco deste estudo apresentavam HAS prévia à gestação.

Quando questionados em relação ao uso de bebidas alcoólicas, todos os indivíduos do grupo controle faziam uso de até 04 doses/semana, quantidade considerada aceitável pela OMS (WHO, 1998)

3.2 Metodologia

3.2.1 Coleta e preparação das amostras

No grupo gestante, foram colhidas amostras de CSN nos três trimestres de gestação. Pacientes seguidas do primeiro ao terceiro trimestre tiveram uma amostra colhida por trimestre. Outras fizeram coleta em apenas um ou dois trimestres. E as pacientes que já iniciaram pré-natal ou foram incluídas no estudo no segundo ou terceiro trimestres tiveram amostras colhidas neste período, como pode ser observado nos Anexos D e E.

Cada indivíduo do grupo controle teve uma amostra de cortisol salivar coletada, estando os valores de CSN demonstrados no Anexo F.

Nos indivíduos do grupo DC, foi considerada a coleta da amostra de cortisol salivar realizada na investigação inicial do hipercortisolismo e, na ocasião, nenhum indivíduo fazia uso de medicamentos que interferissem com a avaliação do cortisol salivar. No acompanhamento destes pacientes, houve confirmação do diagnóstico de DC, como referido anteriormente. Os valores do CSN dos indivíduos deste grupo seguem no Anexo G.

Os participantes receberam folha de instrução com todas as orientações fornecidas pelo Laboratório de Hormônios do HC-FMUSP, conforme Anexo H.

Os indivíduos foram orientados a coletar o CSN entre 23h e 24h, utilizando-se, para isso, o coletor de saliva salivette do fornecedor SARSTEDT (Figura 6).

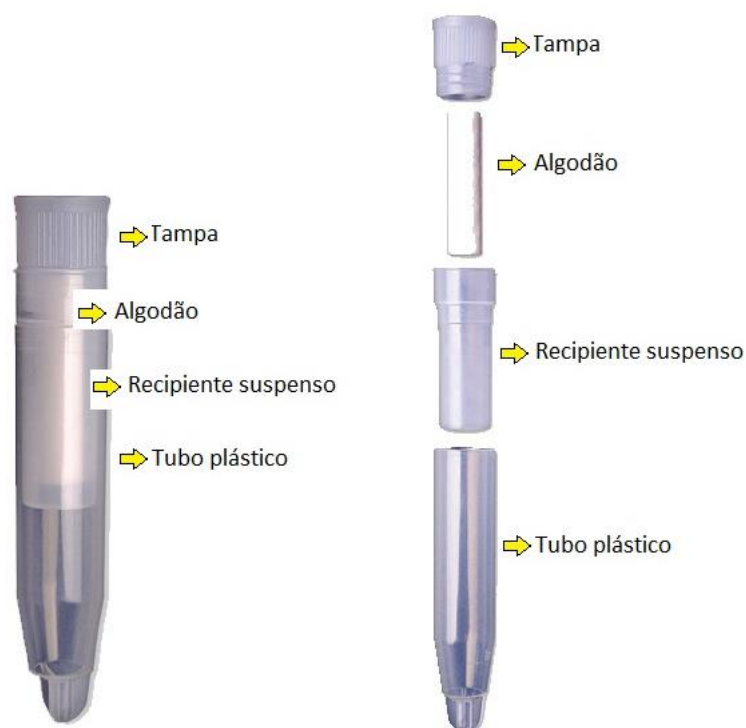


Figura 6 - Figura esquemática do material Salivette (SARSTEDT) utilizado para a coleta de cortisol salivar

Em relação ao dia da coleta, os participantes receberam as seguintes instruções:

- Não colher se estiver em uso de corticosteroides tópicos ou sistêmicos;
- Colher em dia de atividade normal;
- Não comer 60 minutos antes da coleta;
- Não consumir bebida alcoólica 24h antes da coleta;
- Evitar alimentos ácidos ou muito doces 4h antes da coleta;
- Não escovar os dentes 2h antes da coleta;
- Lavar a boca apenas com água 10 minutos antes da coleta.

Em relação ao momento da coleta, cada indivíduo foi orientado a abrir o coletor de saliva, retirar o rolo de algodão e mastigá-lo por 2 a 3 minutos (até que estivesse molhado). O rolo mastigado deveria ser colocado de volta no coletor e entregue no laboratório na manhã seguinte.

A dosagem do cortisol salivar foi realizada no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas- FMUSP.

A amostra recebida no laboratório foi armazenada em freezer a - 20°C, conforme recomendações do fornecedor. No dia do ensaio, a amostra foi incubada à temperatura ambiente até seu total descongelamento. Em seguida, vortexada e centrifugada a 1500 x g (aproximadamente, 3000 RPM) por 15 minutos a 24°C.

3.2.2 Ensaio Hormonal

O cortisol salivar foi mensurado pelo método ELISA – cortisol (Expanded Range) EIA Kit - 1x96 wells, sendo o fabricante o Salimetrics. Dados reportados pelo fabricante são sensibilidade analítica < 0,007 µg/dl e coeficientes de variação intra e interensaio < 7% e < 11%, respectivamente. O ensaio não apresenta reatividade cruzada com vários esteroides testados como, por exemplo, a prednisona e a 17-hidroxiprogesterona (17OHP), mas apresenta 0,56% de reatividade com prednisolona e 19,2% com DMS. O valor de referência do método às 23h para adultos, segundo o fornecedor, é até 0,12 µg/dL. A preparação da amostra para medida do cortisol por ELISA envolve os passos descritos a seguir. As placas são revestidas com anticorpos monoclonais anticortisol (anticorpo fase sólida). É adicionado 25 µL de amostras padrão e controles, 25 µL de diluente no poço zero e no poço com NSB (ligante não específico). Em seguida, é adicionado 200 µL de conjugado diluído 1:1600 (15 µL de conjugado para 24 ml de diluente). As placas são, então, homogeneizadas por 5 minutos a 500 rpm e incubadas por mais 55 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, são realizadas 4 lavagens com tampão 1X. É adicionado 200 µL de solução TMB (tetrametilbenzidina) homogeneizada por 5 minutos e incubada no escuro por mais 25 minutos. E, a seguir, adicionada à solução *stop* 50 µL. As leituras das absorbâncias são realizadas após 10 minutos da adição de

solução *stop* em leitora de ELISA em 450 nm. Toda a reação é realizada em temperatura ambiente.

3.2.3 Análise estatística

A média da idade nos grupos controle, DC e gestante foram comparadas por meio da técnica de Análise de variância (Fisher & van Belle, 1993). Para comparar as distribuições do IMC nos grupos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Quando necessário, as diferenças entre os grupos foram localizadas por meio do procedimento proposto por Dunn, 1964, e os *p*-valores foram corrigidos pelo procedimento de Bonferroni. Para comparar as distribuições das demais variáveis de caracterização nos grupos controle e gestante, foi aplicado o teste Qui-Quadrado e, quando este se mostrou inapropriado, foi utilizado o teste da Razão de verossimilhanças ou o teste exato de Fisher (Fisher & van Belle, 1993).

O coeficiente de correlação de Spearman foi considerado como medida de correlação do CSN com a idade e com o IMC. A associação do CSN com as demais variáveis da caracterização (qualitativas) foi avaliada por meio da comparação das distribuições do CSN nas categorias das variáveis em cada grupo, adotando-se, para isto, o teste de Mann-Whitney (Fisher & vanBelle, 1993).

A análise de variância não paramétrica com medidas repetidas (Brunner & Puri, 2001) foi aplicada para comparar os subgrupos de gestante de alto e de baixo risco nos três trimestres.

Os grupos controle e DC foram comparados com o grupo gestante nos três trimestres, utilizando-se, para isto, o teste de Kruskal-Wallis. Quando necessário, as diferenças entre os grupos foram localizadas por meio do procedimento proposto por Dunn, 1964 e os *p*-valores foram corrigidos pelo procedimento de Bonferroni.

As distribuições do CSN nas gestantes com até 10 e de 11 a 13 semanas de gestação foram comparadas por meio do teste de Mann-Whitney.

Foram obtidos valores de referência utilizando os percentis 2,5 e 97,5 para o CSN no grupo controle e para o CSN nos três trimestres de gestação no grupo gestante (Boyd & Harris, 1995).

A determinação de valores de corte do CSN que separem da melhor forma possível o grupo DC do grupo de gestante nos três trimestres foi feita a partir da construção de curvas ROC (Altman, 1999).

Significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização geral dos grupos

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram do sexo feminino, com média \pm DP da idade de $30,7 \pm 6,8$ anos (18 a 45 anos). Os três grupos foram homogêneos em relação à idade ($p=0,323$).

4.1.1 Grupo controle

Foi composto por 33 mulheres não gestantes. Média de idade de $31,9 \pm 6,6$ anos e média do IMC de $24,0 \pm 5,0$ kg/m². A maioria das mulheres (78,8%) apresentava IMC normal, 6,1% sobrepeso, 12,1% obesidade grau I e 3% obesidade grau III (Tabela 6).

Das 33 mulheres do grupo controle, 12,1% eram diabéticas e 9,1% eram hipertensas. Adicionalmente, 48,5% não usavam ACO e 51,5% faziam uso (Tabela 7).

4.1.2 Grupo gestante

Foram incluídos 85 indivíduos, sendo 81,2% gestantes de baixo risco e 18,8% gestantes de alto risco, com média de idade de $30,1 \pm 6,2$ anos. Média do IMC de $25,3 \pm 5,5$ kg/m², sendo que 57,7% das gestantes apresentavam IMC normal, 23,5% sobrepeso, 8,2% obesidade grau I, 9,4% obesidade grau II e 1,2% obesidade grau III (Tabela 6).

Das 85 gestantes, 18,8% apresentavam diabetes e 5,9% eram hipertensas (Tabela 7).

4.1.3 Grupo DC

Neste grupo, foram incluídas 25 pacientes, com média de idade $31,8 \pm 8,5$ anos e média do IMC de $30,3 \pm 7,3$ kg/m². A maioria (84%) apresentava sobrepeso ou obesidade, sendo 36% sobrepeso, 28% obesidade grau I, 16% obesidade grau II e 4% obesidade grau III. Somente 16,0% apresentavam IMC normal (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuições de frequências e porcentagens do IMC categorizado, nos grupos controle, gestante e DC

Grupo	IMC (kg/m ²)		IMC categorizado					Total
	Média±DP	Mediana (mín-máx)	normal	sobrepeso	obeso I	obeso II	obeso III	
Controle	24,0 ± 5,0	22,6 18,7-41,4	26 78,8%	2 6,1%	4 12,1%	0 0,0%	1 3,0%	33 100,0%
Gestante	25,3 ± 5,5	23,4 18,5-43	49 57,7%	20 23,5%	7 8,2%	8 9,4%	1 1,2%	85 100,0%
DC	30,3 ± 7,3	27 23,1-57	4 16,0%	9 36,0%	7 28,0%	4 16,0%	1 4,0%	25 100,0%
Total			79 55,2%	31 21,7%	18 12,6%	12 8,4%	3 2,1%	143 100,0%

IMC- Índice de Massa Corporal, DP-Desvio Padrão

A distribuição do IMC foi heterogênea entre os grupos. A maior porcentagem de indivíduos com IMC normal foi observada no grupo controle e a menor no grupo DC. Mais de 80% dos indivíduos dos grupos controle e gestante possuíam IMC normal ou sobrepeso e as maiores porcentagens de obesidade graus I, II e III foram observadas no grupo DC (Tabela 6).

Observou-se que o IMC do grupo DC foi significativamente maior do que o do grupo controle ($p < 0,001$) e do que o do grupo gestante ($p < 0,001$). Não se observou diferença significativa entre as distribuições do IMC nos grupos controle e gestante ($p = 0,684$).

Os grupos gestante e controle foram homogêneos quanto à frequência de DM, HAS, tabagismo e uso de insulina (indivíduos diabéticos). E apresentaram heterogeneidade em relação: à raça (quase a totalidade das mulheres do grupo controle são brancas); ao consumo de álcool (nenhuma gestante consumia bebida alcoólica, enquanto que a maioria das mulheres do grupo controle o fazia); ao uso de polivitamínicos (todas as gestantes fazem uso de polivitamínicos, e nenhum indivíduo do grupo controle faz uso); ao uso de anticoncepcionais (nenhuma gestante fez uso); ao uso de metformina (por todas as diabéticas do controle em contraste com a maioria das gestantes diabéticas que não usava) (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuições de frequências e porcentagens nos grupos controle e gestante das variáveis: raça, diabetes, hipertensão, consumo de álcool, tabagismo, uso de polivitamínicos, uso de ACO, uso de insulina e uso de metformina

Características	variáveis	Controle (n = 33)	Gestante (n = 85)	P Teste
Raça [n (%)]	Branca	31 (93,9%)	65 (76,5%)	0,022*
	Negra	2 (6,1%)	12 (14,1%)	Teste VS
	Parda	0 (0%)	8 (9,4%)	
Diabetes [n (%)]	Não	29 (87,9%)	69 (81,2%)	0,384
	Sim	4 (12,1%)	16 (18,8%)	Teste χ^2
Hipertensão [n (%)]	Não	30 (90,9%)	80 (94,1%)	0,545
	Sim	3 (9,1%)	5 (5,9%)	Teste VS
Álcool [n (%)]	Não	12 (36,4%)	85 (100%)	<0,001 *
	Sim	21 (63,6%)	0 (0%)	Teste χ^2
Tabagismo [n (%)]	Não	33 (100%)	84 (98,8%)	0,417
	Sim	0 (0%)	1 (1,2%)	Teste VS
Polivitamínicos [n (%)]	Não	33 (100%)	0 (0%)	<0,001 *
	Sim	0 (0%)	85 (100%)	Teste χ^2
ACO [n (%)]	Não	16 (48,5%)	85 (100%)	<0,001 *
	Sim	17 (51,5%)	0 (0%)	Teste VS
^D Insulina [n (%)]	Não	1/4 (25%)	3/16 (18,8%)	>0,999
	Sim	3/4 (75%)	13/16 (81,3%)	Teste F
^D Metformina [n (%)]	Não	0 (0%)	14/16 (87,5%)	0,003*
	Sim	4 (100%)	2/16 (12,5%)	Teste F

*Diferença estatística significante; ^D Em relação aos diabéticos (grupo gestantes: 16, grupo controle:4)

Teste VS: teste da razão de verossimilhanças; Teste χ^2 : Teste Qui-Quadrado; Teste F: Teste exato de Fisher

4.2 Cortisol salivar noturno

4.2.1 Coletas

Foram realizadas as três coletas, ou seja, uma coleta por trimestre de gestação, de oito gestantes, sendo sete de baixo risco e uma de alto risco. Outras quatro gestantes fizeram coletas no primeiro e segundo trimestre, sendo todas de baixo risco. Foram coletadas amostras no segundo e terceiro

trimestre de cinco gestantes, três de baixo risco e duas de alto risco, sendo que apenas uma gestante de baixo risco realizou coleta no primeiro e terceiro trimestre. Das 85 gestantes, 67 fizeram apenas uma coleta, sendo 15 no primeiro trimestre, 26 no segundo trimestre e 26 no terceiro trimestre. Das 15 que coletaram no primeiro trimestre, 13 eram gestantes de baixo risco e duas de alto risco. Em relação às coletas do segundo trimestre, 21 eram de baixo risco e cinco de alto risco. E das 26 coletas do terceiro trimestre, 20 gestantes eram de baixo risco e seis de alto risco. Foram, então, realizadas um total de 28 coletas no primeiro trimestre, 43 coletas no segundo e 40 no terceiro trimestre, reunindo gestantes de baixo e alto risco. (Tabela 8)

Tabela 8 - Frequência de amostras de cortisol salivar coletadas por trimestre gestacional do grupo gestante.

	n (%) de gestantes	Risco	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre
Três coletas	8 (9,41%)	Alto	1	1	1
		Baixo	7	7	7
	4 (4,71%)	Alto	0	0	0
		Baixo	4	4	0
Duas coletas	5 (5,88%)	Alto	0	2	2
		Baixo	0	3	3
	1 (1,18%)	Alto	0	0	0
		Baixo	1	0	1
Uma coleta	67 (78,82%)	Alto	2	5	6
		Baixo	13	21	20
TOTAL	85 (100%)	-	28	43	40

4.2.2 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante (Trimestre)

Após a mensuração do CSN, observou-se que os menores valores foram observados no grupo controle (mediana de 0,07 µg/dL) e as maiores concentrações no grupo DC (mediana de 0,51 µg/dL). No grupo gestante, as maiores médias (0,17 µg/dL) e medianas (0,15 µg/dL) foram observadas no terceiro trimestre de gestação. Nota-se, neste grupo, uma tendência de

aumento das medianas do CSN no decorrer dos trimestres (primeiro trimestre: mediana de 0,08 µg/dL; segundo trimestre: mediana de 0,10 µg/dL; terceiro trimestre: mediana de 0,15 µg/dL) (Tabela 9, Figura 7). Desta forma, em relação ao grupo controle, os valores do CSN mostram aumento de 1,1 vezes no primeiro trimestre, 1,4 vezes no segundo trimestre e de 2,1 vezes no terceiro trimestre da gestação.

Tabela 9 - Análise do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, DC e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres

Grupo	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	IQR
Controle	33	0,072	0,027	0,03	0,07	0,15	0,04
Cushing	25	0,558	0,325	0,21	0,51	1,50	0,38
Gestante 1º trimestre	28	0,110	0,075	0,02	0,08	0,25	0,09
Gestante 2º trimestre	43	0,106	0,061	0,02	0,10	0,28	0,11
Gestante 3º trimestre	40	0,177	0,077	0,07	0,15	0,34	0,14

DP: Desvio Padrão; IQR: Intervalo interquartil

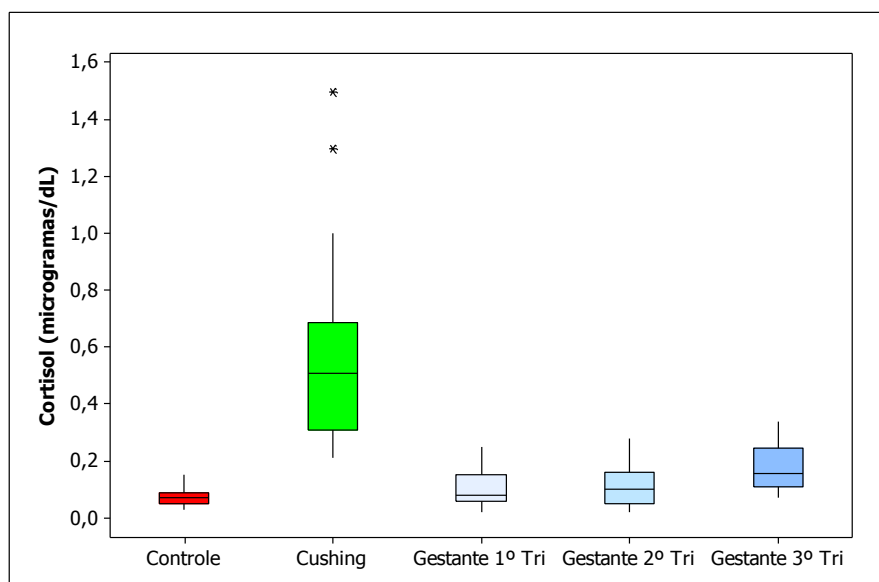


Figura 7 - Box-plots do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, Cushing e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres

4.2.2.1 Gestante 1º trimestre X Controle X DC

Quando comparados os valores de CSN entre os grupos, observou-se que, no grupo DC, os valores foram significativamente superiores aos do grupo controle ($p < 0,001$) e aos do grupo gestante-1º trimestre ($p < 0,001$). Não foi identificada diferença significativa entre as distribuições do cortisol nos grupos controle e gestante 1º trimestre ($p = 0,766$).

4.2.2.2 Gestante 2º trimestre X Controle X DC

Quando comparados os valores de CSN entre os grupos, observou-se que, no grupo DC, os valores foram significativamente superiores aos do grupo controle ($p < 0,001$) e aos do grupo gestante-2º trimestre ($p < 0,001$). Não foi identificada diferença significativa entre as distribuições do cortisol nos grupos controle e gestante 2º trimestre ($p = 0,192$).

4.2.2.3 Gestante 3º trimestre X Controle X DC

Quando comparados os valores de CSN entre os grupos, observou-se que, no grupo DC, estes foram significativamente superiores aos do grupo controle ($p < 0,001$) e aos do grupo gestante-3º trimestre ($p < 0,001$). Além disso, foi observado que o grupo gestante 3º trimestre também apresentou valores superiores aos do grupo controle ($p < 0,001$).

4.2.3 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante (Trimestre/Subgrupos: Gestante de alto e de baixo risco)

Quando analisados os subgrupos de baixo e de alto risco do grupo gestante, observaram-se valores de CSN semelhantes entre estes

subgrupos ($p=0,295$) (Tabela 10, Figura 8). Adicionalmente, observou-se tendência de aumento do CSN no decorrer dos trimestres em ambos os subgrupos (Figura 9). Não foi observado uma diferença significativa entre os dois primeiros trimestres do grupo gestante ($p=0,115$), porém os valores do CSN no terceiro trimestre foram também estatisticamente superiores aos encontrados no primeiro ($p<0,001$) e no segundo ($p<0,001$) trimestres.

Tabela 10 - Análise do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, DC e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo e alto risco

Grupo		N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	IQR
Controle		33	0,072	0,027	0,03	0,07	0,15	0,04
Cushing		25	0,558	0,325	0,21	0,51	1,5	0,38
Gestante 1º trimestre	Baixo	25	0,116	0,076	0,03	0,09	0,25	0,13
	Alto	3	0,053	0,029	0,02	0,07	0,07	0,05
Gestante 2º trimestre	Baixo	35	0,105	0,065	0,02	0,10	0,28	0,11
	Alto	8	0,111	0,044	0,05	0,11	0,17	0,09
Gestante 3º trimestre	Baixo	31	0,175	0,073	0,08	0,16	0,33	0,13
	Alto	9	0,180	0,095	0,07	0,15	0,34	0,17

DP: desvio padrão; IQR: Intervalo interquartil

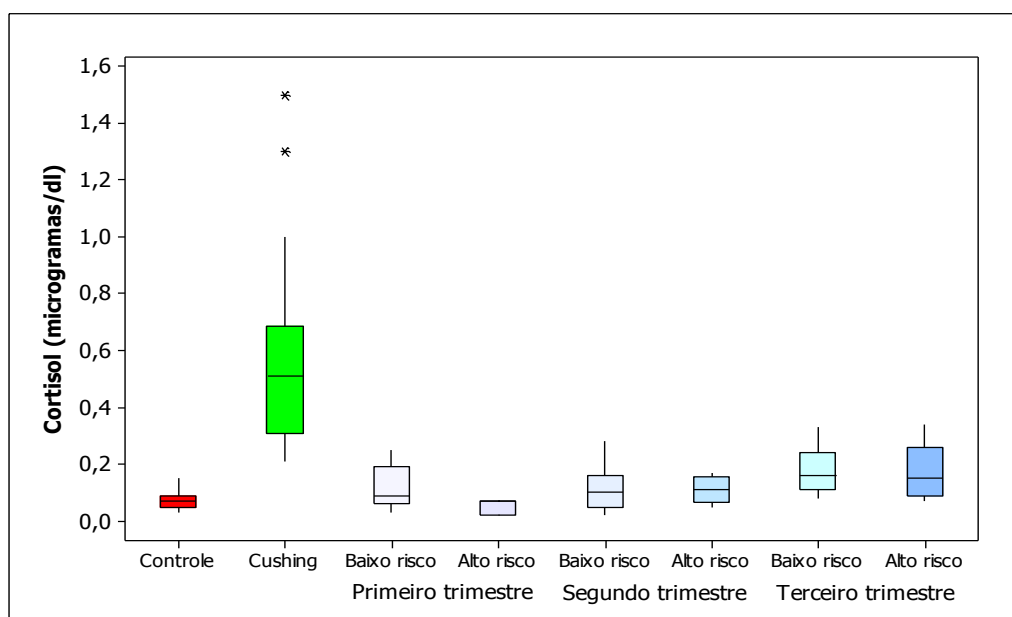


Figura 8 - Box-plots do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) nos grupos controle, Cushing e gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo e alto risco

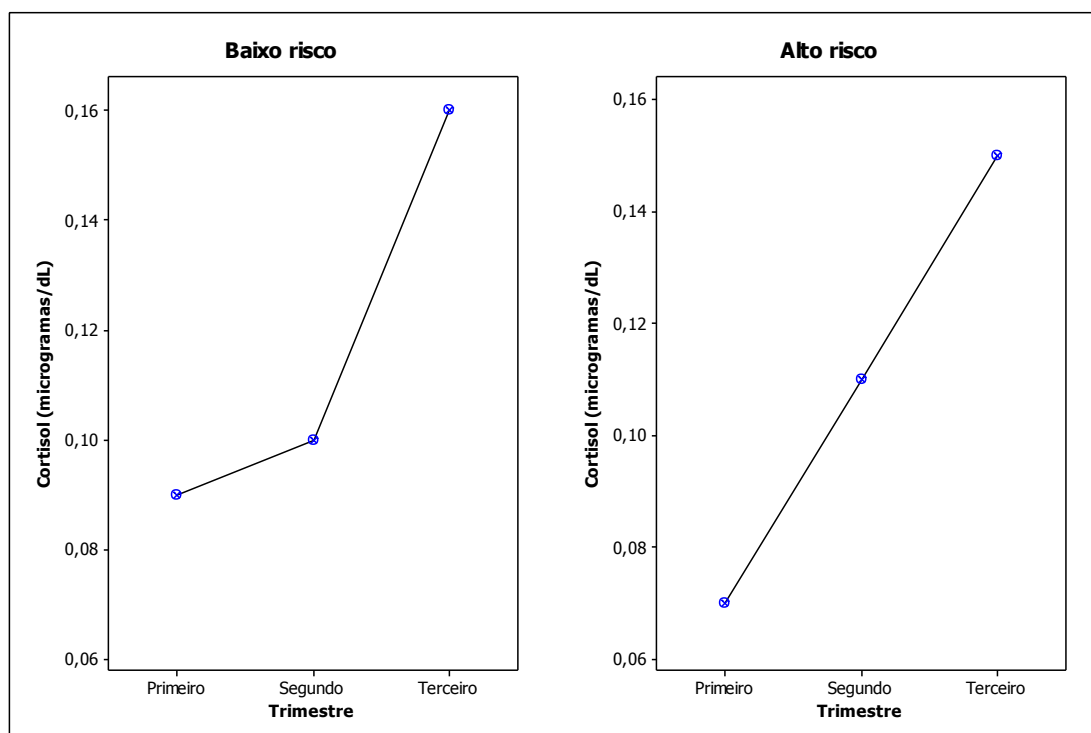


Figura 9 - Medianas do cortisol salivar noturno (micrograma/ dL) no grupo gestante no primeiro, segundo e terceiro trimestres, considerando-se os subgrupos gestante de baixo ou alto risco

4.2.4 Valores de cortisol salivar noturno do indivíduo #26 do grupo gestante

Tivemos a oportunidade de observar a evolução longitudinal pré e durante a gestação em uma participante do grupo controle (#4) que engravidou durante o presente estudo, sendo também incluída no grupo gestante (#26). Sua gravidez foi considerada de baixo risco. Os dados gerais estão demonstrados no Anexo D e F.

O CSN foi mensurado pré-gravidez (0,06 $\mu\text{g/dL}$) e nos três trimestres gestacionais: 1º trimestre (0,06 $\mu\text{g/dL}$), 2º trimestre (0,1 $\mu\text{g/dL}$) e 3º trimestre (0,24 $\mu\text{g/dL}$). Neste indivíduo, foi possível observar valor de CSN pré-gravidez (grupo controle) semelhante ao coletado no primeiro trimestre gestacional e seu aumento gradativo no decorrer dos três trimestres gestacionais (Controle = 1º trimestre < 2º trimestre < 3º trimestre) (Figura 10).

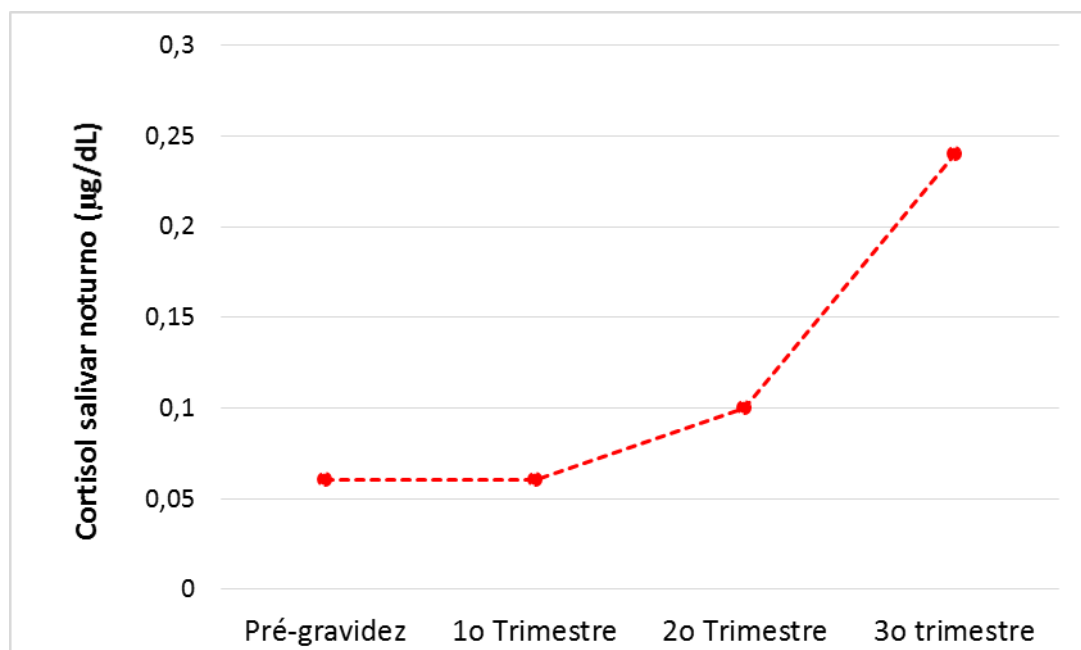


Figura 10 - Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) do indivíduo controle deste estudo: pré-gravidez, 1º trimestre gestacional, 2º trimestre e 3º trimestre

4.2.5 Valores de cortisol salivar noturno do grupo gestante com coletas no três trimestres gestacionais

Analisaram-se os valores de CSN das oito gestantes que fizeram as três coletas (1º, 2º e 3º trimestre gestacional), sendo uma gestante de alto risco e sete de baixo risco. Também se observou a tendência de aumento do CSN no decorrer dos trimestres, sendo que um aumento do primeiro para o segundo trimestre foi identificado em seis de oito indivíduos; e aumento do primeiro para terceiro trimestre em sete de oito gestantes (Figura 11).

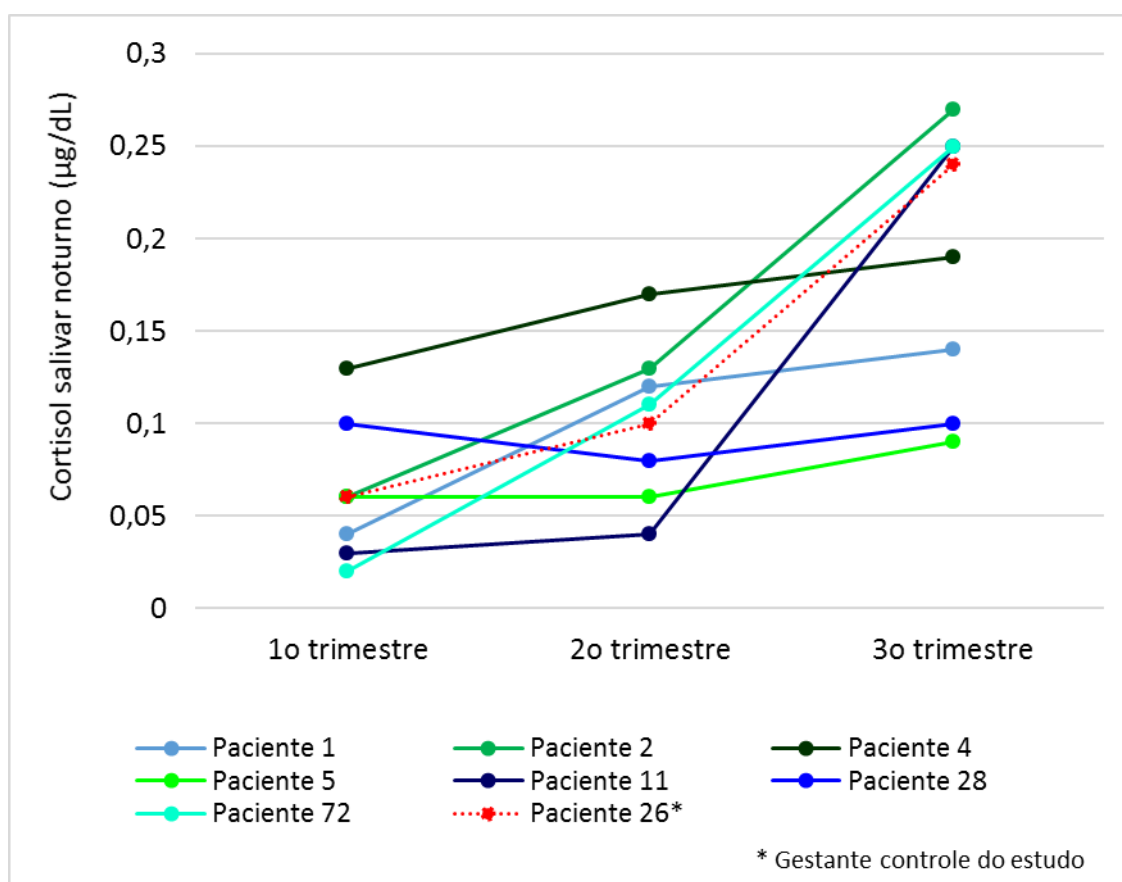


Figura 11 - Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) das pacientes com coletas nos três trimestres gestacionais (1º trimestre, 2º trimestre e 3º trimestre)

4.2.6 Comparação dos valores de cortisol salivar noturno do grupo gestante no primeiro trimestre de gestação

Uma vez verificado nas nossas gestantes elevação do CSN já no primeiro trimestre, comparamos suas concentrações nas gestantes que colheram as amostras até 10 semanas com aquelas que o fizeram entre 11 e 13 semanas de gravidez. No entanto, não foi observado diferença significativa entre os valores mensurados de CSN nestes dois subgrupos de gestantes ($p=0,885$) (Tabela 11 e Figura 12).

Tabela 11 - Valores de cortisol salivar noturno ($\mu\text{g}/\text{dL}$) em gestantes com até 10 semanas e com 11 a 13 semanas de gestação

Semanas	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	IQR
até 10	10	0,108	0,079	0,020	0,085	0,250	0,085
11 a 13	18	0,111	0,076	0,030	0,075	0,250	0,120

DP: Desvio Padrão; IQR: intervalo interquartil

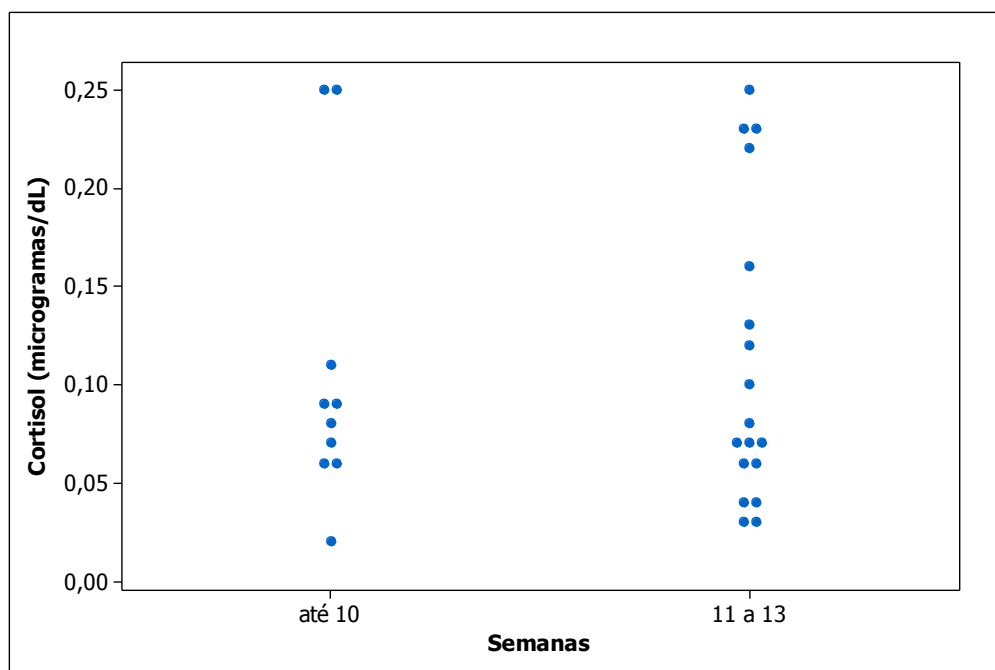


Figura 12 - Valores individuais do cortisol salivar noturno nas gestantes com até 10 semanas e 11 a 13 semanas de gestação

4.2.7 Associação do cortisol salivar noturno em relação às variáveis: Grupos controle e gestante

4.2.7.1 Variáveis quantitativas (Idade e IMC) (Tabela 12)

Por meio das análises de associação, não foi possível identificar, em nenhum dos grupos (controle, gestante 1º, 2º e 3º trimestre), correlação significativa entre os valores de CSN e a idade ($p > 0,14$) das pacientes ou o IMC ($p > 0,35$).

Tabela 12 - Valores observados do coeficiente de correlação de Spearman do cortisol salivar noturno com a idade e com o IMC, nos grupos controle e gestante nos três trimestres

Grupo	Variável					
	Idade			IMC		
	N	r	p	N	r	p
Controle	33	0,07	0,705	33	0,30	0,095
Gestante 1º trimestre	28	-0,28	0,143	28	-0,01	0,980
Gestante 2º trimestre	43	-0,13	0,405	43	0,04	0,784
Gestante 3º trimestre	40	-0,06	0,721	40	0,15	0,352

4.2.7.2 Variáveis qualitativas (Tabela 13)

4.2.7.2.1 Raça

No grupo controle, observou-se que os valores de CSN nas pacientes da raça branca foram menores estatisticamente do que os valores apresentados pelas pacientes da raça negra ($p=0,033$). Entretanto, deve-se ter cautela diante desta conclusão devido ao número reduzido de representantes da raça negra neste grupo ($n=2$). Já no grupo gestante, não foi identificada diferença significativa entre as distribuições do cortisol nas diferentes raças, independente do trimestre gestacional (1º trimestre: $p=0,292$; 2º trimestre: $p=0,285$; e 3º trimestre: $p=0,151$).

4.2.7.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

Não se observou diferença significativa entre as distribuições do CSN em indivíduos diabéticos e não diabéticos, no grupo controle ($p=0,210$) e no grupo gestante (1º, 2º e 3º trimestre: $p=0,146$; $p=0,481$; $p=0,974$; respectivamente).

4.2.7.2.3 Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Não foi verificada diferença significativa entre as distribuições do CSN em hipertensos e não hipertensos, no grupo controle ($p=0,635$) e no grupo gestante (1º, 2º e 3º trimestre: $p=0,709$; $p=0,839$; $p=0,901$; respectivamente). No entanto, esse resultado não pode ser assumido como conclusivo devido ao número reduzido de mulheres hipertensas nessa casuística (controle- $n=3$; gestante- $n=5$).

4.2.7.2.4 Consumo de bebidas alcoólicas

Não houve diferença significativa entre as distribuições do CSN em mulheres que consumiam bebidas alcoólicas e as que não consumiam no grupo controle ($p=0,678$). Nenhuma gestante referiu consumir bebidas alcoólicas.

4.2.7.2.5 Uso de anticoncepcional oral

Também não foi observado diferença significativa entre as distribuições do CSN em mulheres que faziam uso de anticoncepcional e as que não faziam uso no grupo controle ($p=0,985$).

4.2.7.2.6 Tabagismo e uso de polivitamínicos

Não foi possível realizar o estudo de associação das distribuições do CSN com as variáveis tabagismo, pois só havia um único indivíduo tabagista nessa casuística, e uso de polivitamínicos, uma vez que todas as mulheres do grupo gestante faziam uso, ao passo que nenhuma mulher do grupo controle utilizou este medicamento.

4.2.7.2.7 Uso de insulina e metformina

Considerando-se somente as mulheres diabéticas dos grupos controle e gestante, observaram-se distribuições semelhantes do CSN entre as que usam e as que não usam insulina no grupo controle ($p=0,655$) e no grupo gestante ($p>0,999$ e $p=0,697$; 2º e 3º trimestre, respectivamente). Resultado semelhante foi observado entre as mulheres diabéticas que usam metformina e as que não usam no grupo gestante 2º trimestre ($p>0,999$). Estes resultados devem ser olhados com cautela devido ao número reduzido de mulheres diabéticas em uso de insulina e metformina nesta casuística.

Tabela 13 - Frequência e mediana (mínimo e máximo) do cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) nos grupos controle e gestante (1º, 2º e 3º trimestre) em cada variável qualitativa: raça, diabetes, hipertensão, consumo de álcool, uso de ACO, uso de insulina e uso de metformina

Grupo/ variáveis	Controle		Gestante							
	1º Trimestre		2º Trimestre		3º Trimestre					
Raça	branca (n=31)	negra (n=2)	branca (n=20)	parda (n=2)	branca (n=33)	negra (n=6)	parda (n=4)	branca (n=33)	negra (n=3)	parda (n=4)
Mediana	0,07	0,11	0,08	0,12	0,1	0,11	0,06	0,15	0,22	0,23
Min-Máx	0,03-0,15	0,1-0,12	0,02-0,25	0,07-0,25	0,02-0,28	0,05-0,19	0,04-0,11	0,07-0,33	0,15-0,27	0,14-0,34
Diabetes	não (n=29)	sim (n=4)	não (n=25)	sim (n=3)	não (n=35)	sim (n=8)	não (n=31)	sim (n=9)	não (n=31)	sim (n=9)
Mediana	0,07	0,09	0,09	0,07	0,1	0,11	0,16	0,15	0,16	0,15
Min-Máx	0,03-0,15	0,05-0,12	0,03-0,25	0,02-0,07	0,02-0,28	0,05-0,17	0,08-0,33	0,07-0,34	0,08-0,33	0,07-0,34
Hipertensão	não (n=30)	sim (n=3)	não (n=27)	sim (n=1)	não (n=41)	sim (n=2)	não (n=38)	sim (n=2)	não (n=38)	sim (n=2)
Mediana	0,07	0,08	0,08	0,07	0,1	0,09	0,16	0,17	0,16	0,17
Min-Máx	0,03-0,15	0,05-0,1	0,02-0,25	0,07-0,07	0,02-0,28	0,06-0,11	0,07-0,34	0,11-0,22	0,07-0,34	0,11-0,22
Álcool	não (n=12)	sim (n=21)								
Mediana	0,08	0,07								
Min-Máx	0,03-0,12	0,03-0,15								
ACO	não (n=16)	sim (n=17)								
Mediana	0,08	0,07								
Min-Máx	0,03-0,12	0,03-0,15								
Insulina	Não (n=1)	sim (n=3)	não (n=0)	sim (n=3)	não (n=2)	sim (n=6)	não (n=1)	sim (n=6)	não (n=1)	sim (n=6)
Mediana	0,08	0,1	-	0,07	0,11	0,11	0,14	0,19	0,14	0,19
Min-Máx	0,08-0,08	0,05-0,12	-	0,02-0,07	0,06-0,16	0,05-0,17	0,14-0,14	0,07-0,34	0,14-0,14	0,07-0,34
Metformina	não (n=0)	sim (n=4)	não (n=3)	sim (n=0)	não (n=6)	sim (n=2)	não (n=9)	sim (n=0)	não (n=9)	sim (n=0)
Mediana	-	0,09	0,07	-	0,11	0,11	0,15	-	0,15	-
Min-Máx	-	0,05-0,12	0,02-0,07	-	0,05-0,17	0,06-0,16	0,07-0,34	-	0,07-0,34	-

4.2.8 Valores de referência para o cortisol salivar noturno

Foram determinados os valores de referência baseados nos percentis 2,5-97,5 para o CSN no grupo controle (0,03- 0,13 $\mu\text{g/dL}$), como pode ser observado na Figura 13; e no grupo gestante 1º trimestre (0,03-0,25 $\mu\text{g/dL}$), 2º trimestre (0,04-0,26 $\mu\text{g/dL}$) e 3º trimestre (0,07-0,33 $\mu\text{g/dL}$), como pode ser visto na Figura 14.

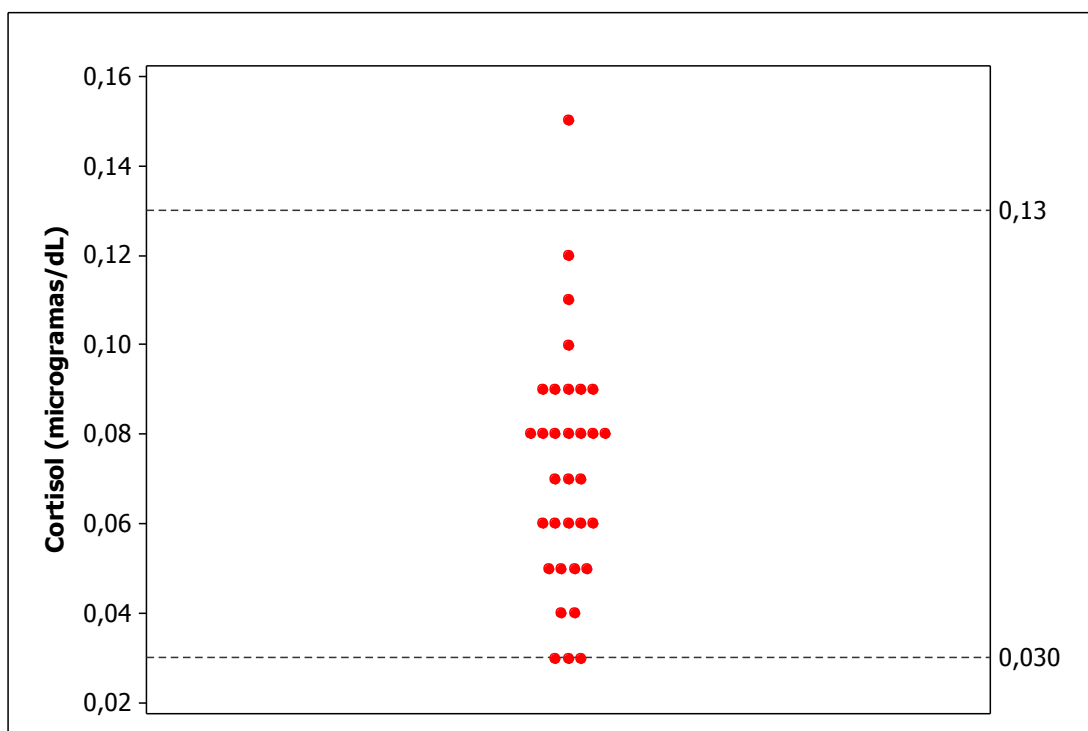


Figura 13 - Valores individuais e limites de referência utilizando os percentis 2,5-97,5 para o cortisol salivar noturno no grupo controle

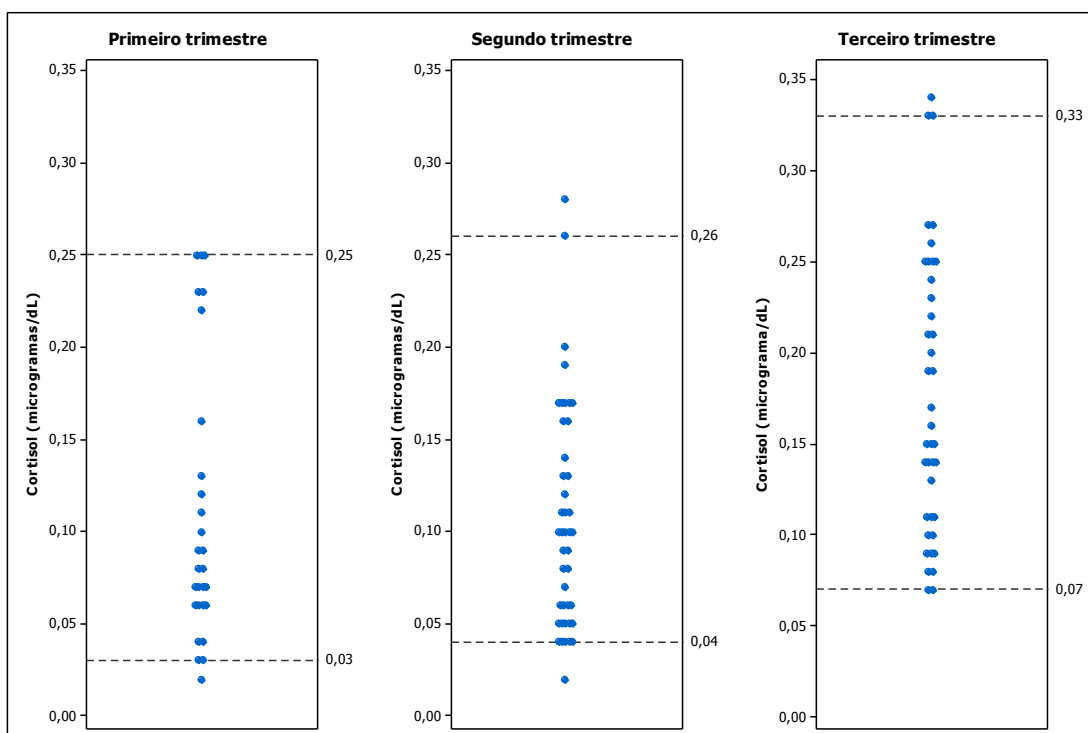


Figura 14 - Valores individuais e limites de referência utilizando os percentil 2,5-97,5 para o cortisol salivar noturno no grupo gestante, nos três trimestres de gestação

4.2.9 Determinação de valores de corte do cortisol salivar noturno nos grupos DC e gestante em cada um dos trimestres de gestação

Observando o resumo descritivo do CSN apresentado na Tabela 9, verifica-se uma sobreposição dos valores nos grupos DC e gestante nos três trimestres (Figuras 15, 16, 17).

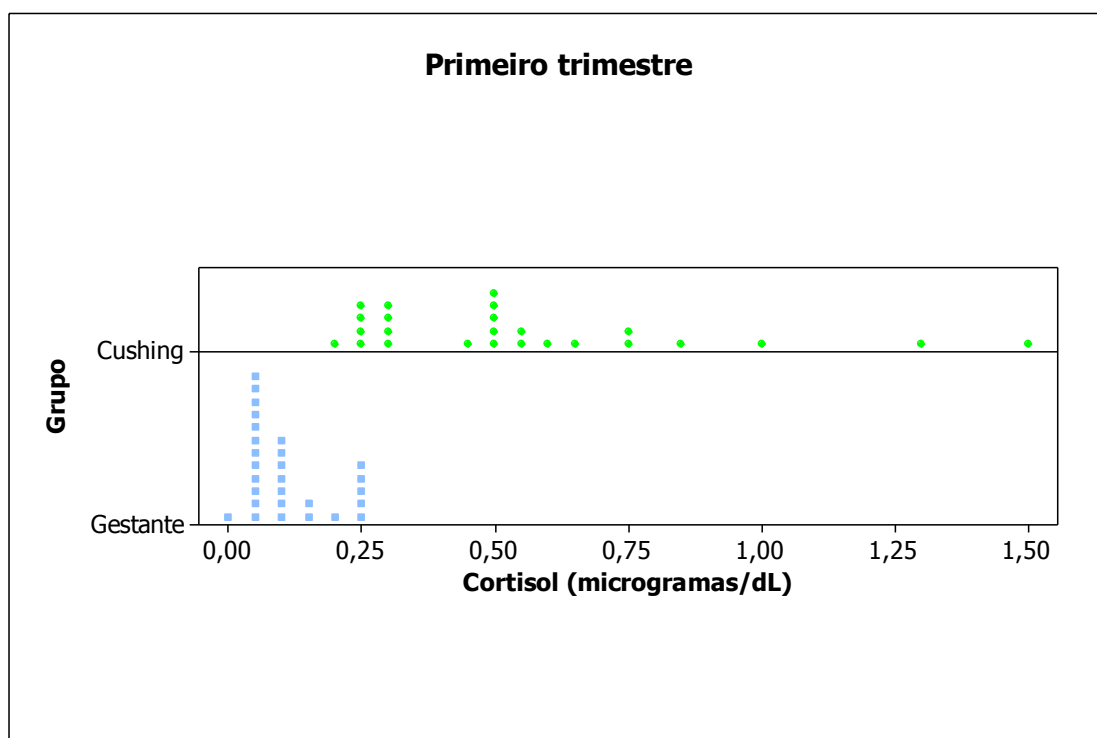


Figura 15 - *Dot-plots* do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no primeiro trimestre

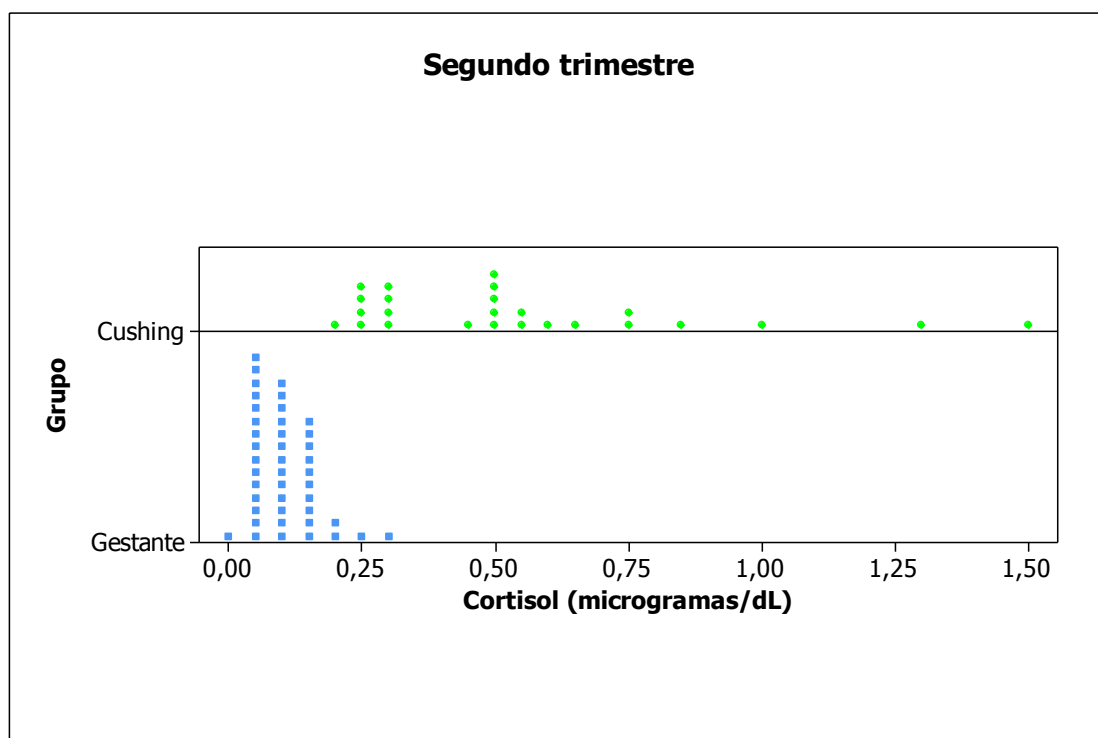


Figura 16 - *Dot-plots* do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no segundo trimestre

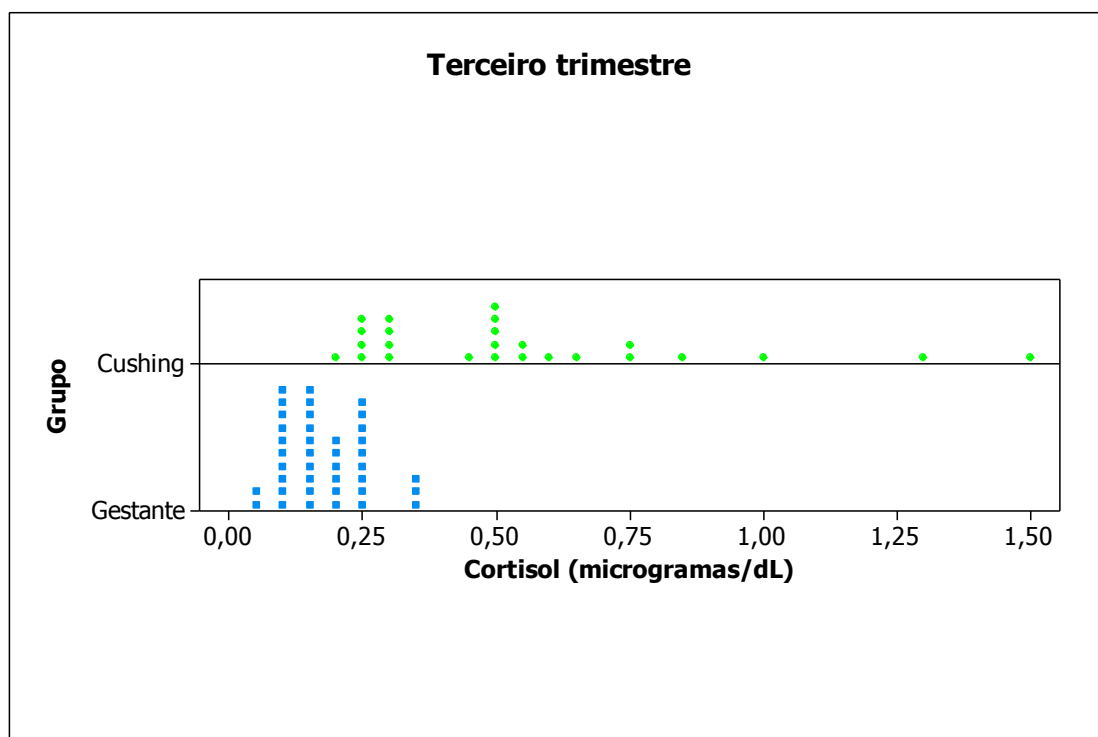


Figura 17 - *Dot-plots* do cortisol salivar noturno nos grupos Cushing e gestante no terceiro trimestre

Os valores de corte do CSN e área sobre a curva, que separaram da melhor forma possível o grupo DC do grupo gestante nos três trimestres, realizados a partir da construção de curvas ROC, foram, respectivamente: primeiro trimestre: 0,255 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e 0,987 (erro padrão 0,011); segundo trimestre: 0,260 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e 0,990 (erro padrão 0,007); terceiro trimestre: 0,285 $\mu\text{g}/\text{dL}$ e 0,949 (erro padrão 0,024). As sensibilidades e especificidades correspondentes nos três trimestres foram: 92% e 100%; 84% e 98%; 80% e 93%, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico da SC durante a gestação é, por vezes, problemático pela superposição de achados clínicos e laboratoriais com a gestação normal. Quanto aos aspectos clínicos, existe uma superposição de sinais e sintomas, como ganho de peso, estrias, HAS, fadiga, hiperglicemia e alterações do humor, que podem ocorrer tanto na mulher normal grávida como em pacientes com SC (Lindsay & Nieman; Tejura *et al.*, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Já a presença de fraqueza muscular, fraturas patológicas e estrias largas e violáceas abdominais e fora do abdome são mais específicas, aumentando a suspeição diagnóstica para SC (Karaca *et al.*, 2010).

Em relação aos aspectos laboratoriais, a ativação do eixo HHA materno altera parâmetros e testes utilizados para o rastreamento da SC (Lindsay & Nieman, 2005; Vilar *et al.*, 2007). Desta forma, UFC, cortisol plasmático total e livre e CBG podem estar elevados pela própria gestação (Lindsay & Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Em relação aos exames utilizados para confirmação do hipercortisolismo, o LDDST não deve ser primeira opção em virtude dos resultados falso-positivos durante a gestação devido à resposta alterada à DMS (Nieman *et al.*, 2008) e apenas valores de UFC maiores que três vezes o limite superior da normalidade podem ser considerados indicativos de SC na gestação (Lindsay *et al.*, 2005; Nieman *et al.*, 2008). Dentre estes exames de rastreamento, o CSN tem sido proposto como método importante para o diagnóstico da SC em gestantes, destacando-se pela sua praticidade e, principalmente, por indicar alteração no ritmo circadiano de secreção de cortisol característico da SC e que é preservado na gestação normal (Lindsay & Nieman, 2005). No entanto, diante das alterações do eixo HHA próprias da gravidez, a gestante passa a fazer parte de uma população específica em que os valores de referência do CSN não estão determinados (Lindsay & Nieman, 2005; Kita *et al.*, 2007;

Nieman *et al.*, 2008; Karaca *et al.*, 2010; Bronstein *et al.*, 2011; Hampson *et al.*, 2013).

Existem poucos estudos publicados na literatura sobre o CSN na gravidez, sendo que nestes o CSN foi estudado no início e final da gestação (Scott *et al.*, 1990), no terceiro trimestre da gestação, como o realizado por Viardot *et al.* e, no segundo e terceiro trimestres da gestação, sem avaliação dos trimestres separadamente (Manetti *et al.*, 2012). No entanto, desconhecemos estudos comparando o CSN nos três trimestres da gestação.

Neste estudo, procuramos contribuir para este tópico, estabelecendo valores de referência do CSN no primeiro, segundo e terceiro trimestres gestacionais, utilizando o método ELISA, que é o método adotado no Hospital das Clínicas - FMUSP, nosso centro de referência. Foi estudado o CSN na gestação tendo como grupo controle mulheres não grávidas e pacientes com SC.

5.1 Caracterização geral dos grupos

Trata-se de um estudo com indivíduos do sexo feminino e com mesma faixa etária nos três grupos. A distribuição do IMC foi heterogênea entre os grupos. Observou-se que o IMC do grupo DC foi significativamente maior do que o do grupo controle e do que o do grupo gestante. Estes dados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, apontando para prevalência aumentada da obesidade na SC (Newell-Price *et al.*, 1998; Newell-Price *et al.*, 2006; Bertagna *et al.*, 2009; Carrol & Findling, 2010).

5.2 Cortisol salivar noturno

5.2.1 Valores de cortisol salivar noturno: Grupos controle, DC e gestante

No presente estudo, foi observada tendência de aumento das medianas do CSN no decorrer dos trimestres no grupo gestante (primeiro trimestre: mediana de 0,08 µg/dL; segundo trimestre: mediana de 0,10 µg/dL; terceiro trimestre: mediana de 0,15 µg/dL). As maiores medianas foram observadas no terceiro trimestre de gestação, mostrando um aumento de 2,1 vezes nos valores do CSN em relação ao grupo controle. Esta elevação do hormônio no terceiro trimestre está de acordo com dados reportados por Viardot *et al.* que mostraram aumento de mais de duas vezes do CSN no terceiro trimestre da gestação em relação às mulheres não grávidas. Em relação ao primeiro e segundo trimestre, nosso estudo demonstrou aumento do CSN de 1,1 vezes e 1,4 vezes, respectivamente, em relação ao grupo controle. Como até o presente foram realizados poucos estudos com CSN na gestação, podemos comparar nossos dados com os encontrados em outros estudos baseados na dosagem do cortisol livre durante a gravidez. Sua elevação na gestação é bem documentada na literatura, com diferentes estudos mostrando um aumento do cortisol livre de duas a quatro vezes (Nolten & Rueckert, 1981; Cousins *et al.*, 1983; Allolio *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2011). Jung *et al.*, em estudo longitudinal realizado no decorrer dos três trimestres da gestação, mostraram aumento da concentração média do cortisol livre plasmático em relação ao grupo controle de 1,2, 1,4 e 1,6 vezes nos respectivos trimestres gestacionais, sendo alcançadas concentrações máximas no terceiro trimestre. Outro estudo demonstrou um progressivo aumento do cortisol livre da 16-36 semana de gestação em mulheres grávidas saudáveis (Ho *et al.*, 2007). Existem diferentes explicações para este aumento do cortisol livre na gestação: resistência à ação do cortisol, efeitos antiglicocorticoides em virtude de elevadas concentrações de progesterona, alteração do *set point* para ACTH, e secreção autônoma de ACTH e CRH pela placenta (Lindsay &

Nieman, 2005; Karaca *et al.*, 2010). Destaca-se, ainda, uma maior responsividade adrenal à estimulação pelo ACTH (Nolten *et al.*, 1981; Bronstein *et al.*, 2011). O aumento do cortisol livre, principalmente no final da gestação, é implicado na preparação materna para o parto (Trainer, 2002) e na maturação pulmonar do feto (Murphy, 1977; Karaca *et al.*, 2010).

No presente estudo, os menores valores de CSN foram observados no grupo controle (mediana de 0,07 µg/dL) e as maiores concentrações no grupo DC (mediana de 0,51mg/dL). Foi também observado um aumento estatisticamente significativo nos valores do CSN entre o terceiro trimestre de gestação (mediana de 0,15 µg/dL) e o grupo controle (mediana de 0,07 µg/dL), sendo que este dado está de acordo com os encontrados na literatura (Scott *et al.*, 1990; Viardot *et al.*, 2005; Manetti *et al.*, 2012). Em relação ao grupo DC, foram encontrados valores de CSN significativamente superiores aos observados no grupo controle e aos observados no grupo gestante nos três trimestres. Mesmo em relação ao terceiro trimestre gestacional (mediana de 0,15 µg/dL), que apresenta aumento significativo em relação aos demais trimestres, o CSN dos indivíduos com DC (mediana de 0,51 µg/dL) foi significativamente superior, achado já observado por Manetti *et al.* Mostramos também que não houve diferença significativa entre os valores de CSN nos grupos controle e gestante primeiro e segundo trimestres, sendo que esta diferença também não foi observada por Scott *et al.* em relação a gestantes no início da gestação (12 a 16 semanas) e mulheres não grávidas.

As concentrações de CSN foram avaliadas separadamente em gestantes de baixo e de alto risco (portadoras de HAS e/ou DM2), não sendo verificada diferença significativa entre estes subgrupos nos três trimestres. Não localizamos estudos avaliando CSN em gestantes de baixo e de alto risco, não sendo, portanto, possível comparar com nossos dados.

Como em todo estudo longitudinal, tivemos dificuldade na obtenção de amostras das gestantes em todos os trimestres. Desta forma, somente oito delas realizaram coleta nos três trimestres, sendo também observada tendência de elevação do hormônio no decorrer desses.

Demey-Ponsart *et al.* mostraram aumento do cortisol plasmático total e livre a partir da 11^o semana de gestação. Observamos que não houve diferença significativa nas concentrações de CSN entre as gestantes que colheram amostras até 10 semanas e de 11 a 13 semanas de gravidez, mas não existem estudos comparativos.

5.2.2 Associação do cortisol salivar noturno em relação às variáveis: Grupos controle e gestante

A influência da idade e de condições médicas coexistentes sobre as concentrações de CSN ainda não estão amplamente caracterizadas (Nieman *et al.*, 2008).

Observamos, assim como Manetti *et al.*, que as concentrações de CSN não foram influenciadas pela idade e pelo IMC. Em estudo realizado em homens com mais de 60 anos, Liu *et al.*, encontraram resultados falso-positivos para o CSN em hipertensos e diabéticos. No entanto, nosso estudo compreende mulheres de 18 a 45 anos. Diferentemente dos nossos dados, Baid *et al.* mostraram concentrações elevadas de CSN em uma porcentagem de obesos. Neste estudo, também não encontramos diferença entre os valores de CSN de indivíduos diabéticos e não diabéticos, hipertensos e não hipertensos, e de mulheres que consumiam ou não bebida alcoólica. Na literatura, concentrações mais elevadas de CSN são descritas em condições como alcoolismo (Carroll & Findling, 2008), sendo que as mulheres do grupo controle, que faziam uso de bebida alcoólica, o faziam numa quantidade considerada aceitável pela OMS. Adicionalmente, concentrações mais elevadas de CSN podem ser vistas em indivíduos diabéticos mal controlados (Carroll & Findling, 2008), coorte excluído no nosso estudo. Ainda em relação às mulheres diabéticas dos grupos controle e gestante, observou-se CSN semelhante entre as que usavam e não usavam insulina e metformina.

No grupo controle, observou-se diferença nos valores de CSN entre mulheres negras e brancas, sendo que os valores nas pacientes da raça

branca foram mais baixos do que as da raça negra. Entretanto, deve-se ter cautela diante desta conclusão devido ao número reduzido de representantes da raça negra neste grupo. Já em relação ao grupo gestante, não foi identificada diferença entre os valores do CSN nas diferentes raças, assim como observado por Manetti *et al.*

No presente estudo, verificamos que os valores do CSN em mulheres do grupo controle que faziam uso de ACO não foram diferentes das que não usavam, assim como demonstrado por outros pesquisadores (Scott *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2011; Manetti *et al.*, 2013). Confirmando que o cortisol salivar, que reflete a forma livre biologicamente ativa, não é influenciado por modificações nas proteínas de ligação (CBG) como ocorre em uso de estrógenos. É bem documentado que o uso de estrógenos exógenos isolados ou em combinação com progesterona aumentam os níveis de CBG (Aden *et al.*, 1998; Wiegratz *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2011).

5.2.3 Valores de referência para o cortisol salivar noturno

É bem fundamentado na literatura que a determinação de valores de referência em populações específicas selecionadas é extremamente importante, sendo ideal para cada centro de referência a normatização dos seus próprios valores para o método empregado (Viardot *et al.*, 2005; Alexandraki & Grossman, 2010; Deutschbein & Petersenn, 2013; Mert *et al.*, 2013).

Neste estudo, estabelecemos valores de referência para o CSN na gestação, sendo o limite superior para o CSN nos respectivos trimestres gestacionais: 1º trimestre (0,25 µg/dL), 2º trimestre (0,26 µg/dL) e 3º trimestre (0,33 µg/dL). Para as mulheres do grupo controle, o limite superior para o CSN neste estudo foi 0,13 µg/dL. Nosso laboratório segue os valores de referência sugerido pelo fabricante Salimetrics (até 0,12 µg/dL), sendo que, neste caso, foram estabelecidos valores de referência para o CSN em adultos usando o percentil 95, diferentemente do percentil 97,5 utilizado

neste estudo. Adicionalmente, existe discrepância entre a amostragem utilizada pelo fabricante (197 indivíduos saudáveis) (Aardal & Holm, 1995) e a deste estudo (33 controles normais).

5.2.4 Determinação de valores de corte do cortisol nos grupos DC e gestante em cada um dos trimestres de gestação

A comparação dos valores de corte de CSN de gestantes sem DC com os de pacientes portadoras de DC mostrou alto grau de sensibilidade e especificidade, decrescendo no avançar da gestação. Mesmo no terceiro trimestre, foram de 80% e 93%, respectivamente, mostrando alto poder discriminatório entre os dois grupos de indivíduos. Estes achados podem contribuir para o diagnóstico diferencial, vistas as limitações na gestação normal de outros métodos para SC, tais como o LDDST e UFC.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foi observado um aumento progressivo do CSN no decorrer da gestação, sendo que concentrações máximas foram encontradas no terceiro trimestre;
- Um aumento estatisticamente significativo do CSN foi encontrado entre o terceiro trimestre de gestação e o grupo controle;
- Foram estabelecidos valores de referência para o método CSN nos três trimestres gestacionais;
- Foi encontrada uma boa acurácia diagnóstica do CSN na diferenciação entre gestantes e pacientes portadores de DC, mesmo no terceiro trimestre gestacional.

7 ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO:..... CIDADE _.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : AVALIAÇÃO DO CORTISOL SALIVAR

NOTURNO EM GESTANTES: COMPARAÇÃO COM MULHERES NÃO GRÁVIDAS E PACIENTES COM
SÍNDROME DE CUSHING

.....
PESQUISADOR : Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN

CARGO/FUNÇÃO: Médico..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .15798.....

UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E
METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA MÉDICA I

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : vinte e quatro

meses.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP
SOMENTE PARA GESTANTES**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que **visa verificar os valores normais de cortisol na saliva em gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação. O cortisol, que é um hormônio conhecido popularmente como cortisona, vai ser dosado na saliva de gestantes e seu valor será comparado com o de mulheres não grávidas e pacientes com síndrome Cushing (doença associada com aumento da produção de cortisol). Desta forma, a dosagem do cortisol salivar vai ajudar no diagnóstico de síndrome de Cushing em gestantes**”.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: **será coletada uma amostra de saliva em tubo Salivete, fornecida pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do Hospital das Clínicas de São Paulo. A amostra deverá ser colhida em ambiente não hospitalar entre 2300h e 2400 h. O paciente deverá abrir o tubo e retirar o rolo inteiro e mastigá-lo até que esteja molhado (2 a 3 min). O rolo deverá, então, ser colocado de volta no frasco plástico que deverá ser mantido em refrigerador por no máximo 12 horas e entregue no próprio laboratório.**

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – **coleta de saliva em tubo Salivete para o exame acima descrito.**

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: **a medida do cortisol salivar é simples, não invasiva e, desta forma, não traz riscos e desconfortos ao paciente.**

5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de um estudo que determina valores de referência do cortisol salivar em gestantes. A determinação destes valores serão importantes na avaliação de gestantes normais e gestantes com síndrome de Cushing.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **não há.**

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal, Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN, pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –

Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o Dr. Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. **Eu ou o indivíduo ao qual sou o responsável legal concordamos voluntariamente em participar deste estudo e poderemos retirar o nosso consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.**

..... Data ____ / ____ / ____
Assinatura do paciente/representante legal

..... Data ____ / ____ / ____
Assinatura da testemunha

para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

..... Data ____ / ____ / ____
Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : AVALIAÇÃO DO CORTISOL SALIVAR
 NOTURNO EM GESTANTES: COMPARAÇÃO COM MULHERES NÃO GRÁVIDAS E PACIENTES COM
 SÍNDROME DE CUSHING

.....
 PESQUISADOR : Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN

CARGO/FUNÇÃO: Médico..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .15798.....

UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E
 METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA MÉDICA I

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : vinte e quatro

meses.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

SOMENTE PARA MULHERES NÃO GRÁVIDAS (GRUPO CONTROLE)

- 1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa **verificar os valores normais de cortisol na saliva em gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação. O cortisol, que é um hormônio conhecido popularmente como cortisona, vai ser dosado na saliva de gestantes e seu valor será comparado com o de mulheres não grávidas e pacientes com síndrome Cushing (doença associada com aumento da produção de cortisol). Desta forma, a dosagem do cortisol salivar vai ajudar no diagnóstico de síndrome de Cushing em gestantes**”.
- 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: **será coletada uma amostra de saliva em tubo Salivete, fornecida pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do Hospital das Clínicas de São Paulo. A amostra deverá ser colhida em ambiente não hospitalar entre 2300h e 2400 h. O paciente deverá abrir o tubo e retirar o rolo inteiro e mastigá-lo até que esteja molhado (2 a 3 min). O rolo deverá, então, ser colocado de volta no frasco plástico que deverá ser mantido em refrigerador por no máximo 12 horas e entregue no próprio laboratório.**
- 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – **coleta de saliva em tubo Salivete para o exame acima descrito.**
- 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: **a medida do cortisol salivar é simples, não invasiva e, desta forma, não traz riscos e desconfortos ao paciente.**
- 5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de um estudo que determina valores de referência do cortisol salivar em gestantes. A determinação destes valores serão importantes na avaliação de gestantes normais e gestantes com síndrome de Cushing.**
- 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **não há.**
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal, Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN, pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcfmusp.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dr. Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. **Eu ou o indivíduo ao qual sou o responsável legal concordamos voluntariamente em participar deste estudo e poderemos retirar o nosso consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.**

-----Assinatura Data ____/____/____
do paciente/representante legal

Assinatura da testemunha Data ____/____/____
para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : AVALIAÇÃO DO CORTISOL SALIVAR
 NOTURNO EM GESTANTES: COMPARAÇÃO COM MULHERES NÃO GRÁVIDAS E PACIENTES COM
 SÍNDROME DE CUSHING

.....

PESQUISADOR : Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN

CARGO/FUNÇÃO: Médico..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
 .15798.....

UNIDADE DO HCFMUSP: UNIDADE DE NEUROENDOCRINOLOGIA DO SERVIÇO DE ENDOCRINOLOGIA E
 METABOLOGIA – DIVISÃO DE CLÍNICA MÉDICA I

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : vinte e quatro

meses.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

SOMENTE PARA PACIENTES COM SÍNDROME DE CUSHING (GRUPO CONTROLE)

- 1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa **verificar os valores normais de cortisol na saliva em gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação. O cortisol, que é um hormônio conhecido popularmente como cortisona, vai ser dosado na saliva de gestantes e seu valor será comparado com o de mulheres não grávidas e pacientes com síndrome Cushing (doença associada com aumento da produção de cortisol). Desta forma, a dosagem do cortisol salivar vai ajudar no diagnóstico de síndrome de Cushing em gestantes**”.
- 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: **será coletada uma amostra de saliva em tubo Salivete, fornecida pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do Hospital das Clínicas de São Paulo. A amostra deverá ser colhida em ambiente não hospitalar entre 2300h e 2400 h. O paciente deverá abrir o tubo e retirar o rolo inteiro e mastigá-lo até que esteja molhado (2 a 3 min). O rolo deverá, então, ser colocado de volta no frasco plástico que deverá ser mantido em refrigerador por no máximo 12 horas e entregue no próprio laboratório.**
- 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – **coleta de saliva em tubo Salivete para o exame acima descrito.**
- 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: **a medida do cortisol salivar é simples, não invasiva e, desta forma, não traz riscos e desconfortos ao paciente.**
- 5 – Benefícios para o participante: **Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de um estudo que determina valores de referência do cortisol salivar em gestantes. A determinação destes valores serão importantes na avaliação de gestantes normais e gestantes com síndrome de Cushing.**
- 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: **não há.**
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal, Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN, pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 5º andar, bloco 4B ambulatório de Endocrinologia, telefones: 3069-6745 3069-6293 / 3069-6624. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 E-mail: cappesq@hcnnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dr. Prof. Dr. MARCELLO DELANO BRONSTEIN sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. **Eu ou o indivíduo ao qual sou o responsável legal concordamos voluntariamente em participar deste estudo e poderemos retirar o nosso consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que possamos ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.**

-----Assinatura Data ____/____/____
do paciente/representante legal

Assinatura da testemunha Data ____/____/____
para casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo D - Dados gerais dos indivíduos do grupo gestante de baixo risco

N°	Idade (anos)	Raça	IMC	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti-hipert.			Cortisol Salivar (µg/dL)		
												1° T	2° T	3° T	1° T	2° T	3° T
1	33	branca	21	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,04	0,12	0,14
2	34	branca	25,6	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06	0,13	0,27
3	32	branca	19,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,1	0,09	
4	31	branca	20,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,13	0,17	0,19
5	33	branca	18,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06	0,06	0,09
6	33	branca	21,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,02		
7	30	negra	19,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,25		
8	19	branca	21,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,1		
9	27	branca	28,7	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,25		
10	26	branca	23,4	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,03		
11	32	parda	36,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,03	0,04	0,25
12	18	branca	23,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,17		
13	38	branca	28,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,04		
14	34	branca	24,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,13		
15	43	parda	30	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,11		
16	30	branca	35,4	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,1		
17	34	branca	19,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,16		
18	35	branca	20,1	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06		
19	20	branca	20,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,04		
20	28	branca	30,3	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06		
21	23	branca	25,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,23		0,11

continua

N°	Idade (anos)	Raça	IMC	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti- hipert.	continuação Cortisol Salivar (µg/dL)			
													1° T	2° T	3° T	
22	16	branca	31,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	0,25	0,28	0,25	
23	21	branca	19	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,17	0,25	0,17
24	32	branca	35,2	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,08	0,26	0,08
25	24	branca	39,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,05	0,05	0,05
26	31	branca	22,6	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,06	0,1	0,24
27	26	branca	21	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,15	0,15	0,15
28	36	branca	27,9	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	0,1	0,08	0,1
29	37	branca	23	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,17	0,17	0,17
30	30	branca	18,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,14	0,14	0,14
31	31	branca	21,4	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,05	0,17	0,05
32	20	parda	18,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,14	0,14	0,14
33	27	negra	29,7	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,12	0,19	0,12
34	30	branca	23,2	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,16	0,16	0,16
35	34	parda	19,6	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,21	0,21	0,21
36	26	parda	29	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,07	0,07	0,07
37	17	parda	29,1	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,04	0,04	0,04
38	27	negra	20,1	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,22	0,06	0,06
39	33	branca	21,7	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,08	0,08	0,08
40	27	negra	28	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,07	0,07	0,07
41	22	branca	24	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,09	0,09	0,09
42	29	parda	20,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,09	0,09	0,09
43	43	branca	26	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,25	0,25	0,25

continua

N°	Idade (anos)	Raça	IMC	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti-hipert.	continuação Cortisol Salivar (µg/dL)		
													1° T	2° T	3° T
44	35	branca	20,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,08	
45	29	branca	23	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,07	
46	36	branca	25,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,26	
47	32	branca	26	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,23	
48	36	branca	24,3	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,08	
49	23	branca	23,2	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,2	
50	26	branca	18,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,33	
51	26	branca	33	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,21	
52	23	branca	29,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,04	
53	32	branca	19	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,16	
54	29	branca	21,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,2	
55	31	branca	21	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,19	
56	32	branca	20,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,09	
57	28	branca	21	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,1	
58	32	branca	25,4	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,08	
59	32	branca	20,8	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,05	
60	30	branca	20,7	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,11	
61	21	branca	25,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,33	
62	34	negra	24,9	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,11	
63	25	negra	22,5	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,05	
64	38	branca	21	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,04	
65	31	branca	28,2	não	não	não	não	sim	não	não	não	não	não	0,1	

continua

Anexo E - Dados gerais dos indivíduos do grupo gestante de alto risco

Nº	Idade (anos)	Raça	IMC (kg/m ²)	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti-hipert.	Cortisol Salivar (µg/dL)		
													1º T	2º T	3º T
70	26	Branca	26,2	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,07		
71	37	negra	28,1	sim	sim	não	não	sim	não	sim	não	sim	0,07		
72	37	branca	27,4	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,02	0,11	0,25
73	31	negra	21,9	sim	não	não	não	sim	não	não	sim	não	0,16		
74	40	branca	35,3	sim	sim	não	não	sim	não	sim	não	sim	0,11		
75	34	branca	36	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,14		
76	32	negra	30,1	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,17	0,27	
77	22	branca	43	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,15		
78	42	branca	36	sim	sim	não	não	sim	não	sim	não	sim	0,11		
79	29	branca	21,8	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,09	0,07	
80	39	branca	31	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,05		
81	34	negra	35,4	sim	sim	não	não	sim	não	sim	não	sim	0,22		
82	27	parda	24,6	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,34		
83	41	branca	28,2	sim	não	não	não	sim	não	sim	não	não	0,07		
84	38	negra	34	sim	sim	não	não	sim	não	não	sim	sim	0,06		
85	36	branca	23	sim	não	não	não	sim	não	não	não	não	0,14		

IMC: índice de massa corporal; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HAS: hipertensão arterial sistêmica; Alcool: uso de álcool; TAB: tabagismo; Polivit.: uso de polivitamínicos; ACO: uso de anticoncepcionais orais; Insulina: uso de insulina; MTF: uso de metformina; Anti-hipert.: uso de anti-hipertensivos.

Anexo F - Dados gerais dos indivíduos do grupo controle

N°	Idade (anos)	Raça	IMC (kg/m ²)	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti- hipert.	Cortisol Salivar (µg/dL)
1	34	branca	21,9	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,15
2	33	branca	20,5	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,07
3	30	branca	20,3	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,09
4	31	branca	22,6	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,06
5	31	branca	18,8	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,05
6	33	branca	25,1	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,11
7	39	branca	20,7	não	não	não	não	não	não	não	não	não	0,04
8	32	branca	20,8	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,07
9	31	branca	23,4	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,09
10	22	branca	21,8	não	não	não	não	não	não	não	não	não	0,09
11	24	branca	23,2	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,08
12	40	branca	24,6	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06
13	28	branca	22,6	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,08
14	25	branca	20,7	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,06
15	32	branca	23	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,08
16	44	branca	24,3	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,07
17	30	branca	21,8	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,09
18	27	branca	23,4	não	não	não	não	não	sim	não	não	não	0,03
19	39	branca	32	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,06
20	25	branca	21,1	não	não	não	não	não	não	não	não	não	0,05
21	19	branca	20,9	não	não	não	não	não	não	não	não	não	0,03

continua

N°	Idade (anos)	Raça	IMC (kg/m ²)	DM2	HAS	Alcool	TAB	Polivit.	ACO	Insulina	MTF	Anti-hipert.	conclusão	
													Cortisol	Salivar (µg/dL)
22	27	branca	24,4	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,08	
23	38	branca	24,5	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,03	
24	45	branca	22,5	sim	não	sim	não	não	não	não	sim	não	0,08	
25	25	branca	30,4	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,08	
26	42	branca	27,7	não	sim	sim	não	não	não	não	não	sim	0,08	
27	27	branca	18,7	não	não	sim	não	não	sim	não	não	não	0,05	
28	31	branca	19,5	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,04	
29	30	branca	21,5	não	não	não	não	não	não	não	não	não	0,09	
30	25	branca	21,8	não	não	sim	não	não	não	não	não	não	0,06	
31	43	branca	34,5	sim	sim	sim	não	não	sim	sim	sim	sim	0,05	
32	35	negra	41,4	sim	não	não	não	não	não	sim	sim	não	0,12	
33	35	negra	32,8	sim	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	0,10	

IMC: índice de massa corporal; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HAS: hipertensão arterial sistêmica; Alcool: uso de álcool; TAB: tabagismo; Polivit.: uso de polivitamínicos; ACO: uso de anticoncepcionais orais; Insulina: uso de insulina; MTF: uso de metformina; Anti-hipert.: uso de anti-hipertensivos.

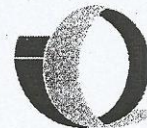
Anexo G - Idade, IMC e cortisol salivar cortisol salivar noturno ($\mu\text{g/dL}$) dos indivíduos do grupo Cushing

Nº do paciente	Idade (anos)	IMC (kg/m^2)	Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)
1	43	32,3	0,74
2	37	27,0	0,56
3	38	32,6	0,59
4	28	30,5	0,32
5	18	26,1	0,32
6	37	38,4	0,52
7	29	25,7	0,21
8	31	25,8	0,26
9	20	26,8	0,30
10	32	25,6	0,83
11	32	35,8	0,63
12	45	30,4	0,75
13	35	27	0,51
14	30	30,5	0,43
15	19	26,6	0,56
16	34	32,8	0,27
17	33	25,3	1,00
18	24	57	0,24
19	26	38,4	0,52
20	40	30	1,30
21	45	24,1	1,50
22	33	38,2	0,26
23	45	24,4	0,51
24	20	24,1	0,49
25	20	23,1	0,32

Anexo H - Folha de instrução com orientações fornecidas pelo Laboratório de Hormônios do HC-FMUSP



DIVISÃO DE LABORATÓRIO CENTAL



CORTISOL SALIVAR

ORIENTAÇÕES AO PACIENTE

1. Não colher se estiver em uso de **corticosteróides** tópicos ou sistêmicos.
2. Colher em dia de atividade **normal**.
3. **Não** comer 60 minutos antes da coleta.
4. **Não** consumir bebida alcoólica 24 horas antes da coleta.
5. Evitar alimentos ácidos ou muito doces 4 horas antes da coleta.
6. **Não escovar** os dentes 2 horas antes da coleta.
7. Lavar a boca apenas com **água** 10 minutos antes da coleta.
8. Mastigar ou mover pela boca o rolo de algodão até que este esteja totalmente molhado (2 a 3 minutos).
9. Colocar o rolo de algodão de volta ao frasco plástico.
10. Colher a amostra no horário indicado pelo médico.
11. Se for colhido em casa, anotar o horário e entregar no dia seguinte pela manhã no laboratório.
12. Entregar o **mais rápido** possível ao laboratório.

Paciente Ambulatorial do ICHC

Local de entrega: Av. Dr. Enéas de Carvalho de Aguiar, 155
Segunda a sexta-feira 07:00 h às 13:00h

Versão 08 (03-09-2013)

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Aardal E, Holm AC. Cortisol in saliva-reference ranges and relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995;33(12):927-32.

Abrao AL, Leal SC, Falcao DP. Salivary and serum cortisol levels, salivary alpha-amylase and unstimulated whole saliva flow rate in pregnant and non-pregnant. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014;36(2):72-78.

Aden U, Jung-Hoffmann C, Kuhl H. A randomized cross-over study on various hormonal parameters of two triphasic oral contraceptives. *Contraception*. 1998;58(2):75-81.

Alexandraki KI, Grossman AB. Is urinary free cortisol of value in the diagnosis of Cushing syndrome? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(4):259-63.

Alexandraki KI, Grossman AB. Novel insights in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010;92(1):35-43.

Allolio B, Hoffmann J, Linton EA, Winkelmann W, Kusche M, Schulte HM. Diurnal salivary cortisol patterns during pregnancy and after delivery: relationship to plasma corticotrophin-releasing-hormone. *Clin Endocrinol*. 1990;33(2):279-89.

Altman DG (1999). *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall, New York.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35(Suppl)1:S64-71.

Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A, Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(12):5593-02.

Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3102-07.

Beauregard C, Dickstein G, Lacroix A. Classic and recent etiologies of Cushing's syndrome: diagnosis and therapy. *Treat Endocrinol*. 2002;1(2):79-94.

Bertagna X, Guignat L, Groussin L, Bertherat J. Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(5):607-23.

Borna S, Akbari S, Eftekhar T, Mostaan F. Cushing's syndrome during pregnancy secondary to adrenal adenoma. *Acta Med Iran*. 2012;50(1):76-8.

Boyd JC, Harris EK. *Statistical bases of reference values in laboratory medicine*. New York: Marcel Dekker, 1995.

Brien TG. Human corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol*. 1981;14(2):193-12.

Bronstein MD, Paraiba DB, Jallad RS. Management of pituitary tumors in pregnancy. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):301-10.

Brunner E, Puri ML. Nonparametric methods in factorial designs. *Statist Papers*. 2001;42:1-52.

Caldeyro-Barcia R, Pose SV, Poseiro JJ, Mendez-Bauer C. Frecuencia cardíaca y equilibrio ácido base del feto. Centro Latinoamericano de Perinatología y Desarrollo Humano; 1973. (Publicación científica del CLAP, n. 519).

Caldeyro-Barcia R, *et al*. Frecuencia cardíaca y equilibrio ácido base del feto. Montevideo: Centro Latinoamericano de Perinatología y Desarrollo Humano; 1973. (Publicación científica del CLAP, n. 519).

Campbell EA, Linton EA, Wolfe CD, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ. Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(5):1054-59.

Carr BR, Parker CR Jr, Madden JD, MacDonald PC, Porter JC. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;139(4):416-22.

Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing syndrome: a meta-analysis. *Endocr Pract*. 2009;15(4):335-42.

Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(6):344-50.

Carroll TB, Findling JW. Cushing's syndrome of nonpituitary causes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16(4):308-15.

Carroll TB, Findling JW. The diagnosis of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(2):147-53.

Castro M, Elias PC, Martinelli CE Jr, Antonini SR, Santiago L, Moreira AC. Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33(10):1171-75.

Castro M, Elias PC, Quidute AR, Halah FP, Moreira AC. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):878-82.

Castro M, Moreira AC. Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(8):1191-98.

Chang I, Cha H-H, Kim J-H, Choi S-J, Oh S-Y, Roh C-R. Cushing syndrome in pregnancy secondary to adrenal adenoma. *Obstet Gynecol Sci.* 2013;56(6):400-03.

Cousins L, Rigg L, Hollingsworth D, Meis P, Halberg F, Brink G, Yen SS. Qualitative and quantitative assessment of the circadian rhythm of cortisol in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1983;145(4):411-16.

Demey-Ponsart E, Foidart JM, Sulon J, Sodoyez JC. Serum CBG, free and total cortisol and circadian patterns of adrenal function in normal pregnancy. *J Steroid Biochem.* 1982;16(2):165-69.

Demura R, Odagiri E, Yoshimura M, Jibiki K, Adachi T, Shiota M, Demura H, Shizume K, Oouchi H. Placental secretion of prolactin, ACTH and immunoreactive beta-endorphin during pregnancy. *Acta Endocrinol.* 1982;100(1):114-19.

Deutschbein T, Petersenn S. Screening for Cushing's syndrome: new immunoassays require adequate normative data. *Horm Metab Res.* 2013;45(2):118-23.

Deutschbein T, Unger N, Hinrichs J, Walzi MK, Mann K, Petersenn S. Late-night and low-dose dexamethasone-suppressed cortisol in saliva and serum for the diagnosis of cortisol-secreting adrenal adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(5):747-53.

Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. Jan 2012;35(Suppl 1):S64–S71.

Doshi S, Bhat A, Lim KB. Cushing's syndrome in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 2003;23(5):568-69.

Dunn OJ. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 1964;6:241-52.

Duthie L, Reynolds RM. Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes. *Neuroendocrinology*. 2013;98:106-15.

Elias PC, Martinez EZ, Barone BF, Mermejo LM, Castro M, Moreira AC. Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):2045-51

Erickson D, Singh RJ, Sathananthan A, Vella A, Byrant SC. Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol*. 2012;76(4):467-72.

Fadalti M, Pezzani I, Cobellis L, Springolo F, Petrovec MM, Ambrosini G, Reis FM, Petraglia F. Placental corticotropin-releasing factor. An update. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;900:89-94.

Findling JW, Raff H. Diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001;30(3):729-47.

Fisher LD, van Belle G. *Biostatistics*. John Wiley & Sons, New York, 1993.

Goland RS, Wardlaw SL, Blum M, Tropper PJ, Stark RI. Biologically active corticotropin-releasing hormone in maternal and fetal plasma during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;159(4):884-90.

Gopal RA, Acharya SV, Bandgar TR, Menon PS, Shah NS. Cushing disease with pregnancy. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(7):533-35.

Guaraldi F, Salvatori R. Cushing Syndrome: Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. *J Am Board Fam Med*. 2012;25(2):199-08.

Hampson E, Phillips SD, Soares CN, Steiner M. Steroid concentrations in antepartum and postpartum saliva: normative values in women and correlations with serum. *Biol Sex Differ*. 2013;4(1):7.

Hiramatsu R. Direct assay of cortisol in human saliva by solid phase radioimmunoassay and its clinical applications. *Clin Chim Acta*. 1981;117(2):239-49.

Ho JT, Lewis JG, O'Loughlin P, Bagley CJ, Romero R, Dekker GA, Torpy DJ. Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin Endocrinol*. 2007;66(6):869-77.

Holgado-Galicia MVB, Magno JD, Acelajado-Valdenor C, Isis-Tan IT, Lim-Abraham MA. Cushing's syndrome in pregnancy. *BMJ Case Reports*. 2011; 4/25/2011, p3.

Inder WJ, Dimeski G, Russel A. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clin Endocrinol*. 2012;77(5):645-51.

Johnson TRB, Walker MA, Niebyl JR. Prenatal care. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL (Ed.). *Obstetrics: normal and problem pregnancies*. New York: Churchill Livingstone; 1986. Chapter 6: p.159-182.

Jung C, Ho JT, Torpy DJ, Rogers A, Doogue M, Lewis JG, Czajko RJ, Inder WJ. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(5):1533-40.

Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Mastorakos G, Chrousos GP. Roles of reproductive corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;997:129-35.

Karaca Z, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Kelestimur F. Pregnancy and pituitary disorders. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(3):453-75.

Kita M, Sakalidou M, Saratzis A, Ioannis S, Aramides A. Cushing's syndrome in pregnancy: report of a case and review of the literature. *Hormones*. 2007;6(3):242-46.

Kivlighan KT, DiPietro JA, Costigan KA, Laudenslager ML. Diurnal rhythm of cortisol during late pregnancy: associations with maternal psychological well-being and fetal growth. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(9):1225-35.

Krieger DT, Allen W, Rizzo F, Krieger HP. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971;32(2):266-84.

Lado-Abeal J, Rodriguez-Arnan J, Newell-Price JD, Perry LA, Grossman AB, Besser GM, Trainer PJ. Menstrual abnormalities in women with Cushing's disease are correlated with hypercortisolemia rather than raised circulating androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3083-88.

Laine M, Tenovuo J, Lehtonen OP, Ojanotko-Harri A, Vilja P, Tuohimaa P. Pregnancy-related changes in human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 1988;33(12):913-17.

Leiba S, Weinstein R, Shindel B, Lapidot M, Stern E, Levavi H, Rusecki Y, Abramovici A. The protracted effect of o,p'-DDD in Cushing's disease and its impact on adrenal morphogenesis of young human embryo. *Ann Endocrinol.* 1989;50(1):49-53.

Lim WH, Torpy DJ, Jeffries WS. The medical management of Cushing's syndrome during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(1):1-6.

Lindsay JR, Jonklaas J, Oldfield EH, Nieman LK. Cushing's syndrome during pregnancy: personal experience and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3077-83.

Lindsay JR, Nieman LK. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment. *Endocr Rev.* 2005;26(6):775-99.

Linton EA, Perkins AV, Woods RJ, Eben F, Wolfe CD, Behan DP, Potter E, Vale WW, Lowry PJ. Corticotropin releasing hormone-binding protein (CRH-BP): plasma levels decrease during the third trimester of normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(1):260-62.

Liu H, Bravata DM, Cabacchan J, Raff H, Ryzen E. Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. *Clin Endocrinol.* 2005;63(6):642-49.

Liu H, Crapo L. Update on the diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinologist.* 2005;15(3):165-79

Luthold W W, Marcondes JA, Wajchenberg BL. Salivary cortisol for the evaluation of Cushing's syndrome. *Clin Chim Acta.* 1985;151(1):33-39.

Magiakou MA, Mastorakos G, Rabin D, Margioris AN, Dubbert B, Calogero AE, Tsigos C, Munson PJ, Chrousos GP. The maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the third trimester of human pregnancy. *Clin Endocrinol*. 1996;44(4):419-28.

Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;816:42-56.

Manetti L, Rossi G, Grasso L, Raffaelli V, Scattina I, Del Sarto S, Cosottini M, Iannelli A, Gasperi M, Bogazzi F, Martino E. Usefulness of salivary cortisol in the diagnosis of hypercortisolism: comparison with serum and urinary cortisol. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(3):315-21.

Meikle AW. Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. *Clin Endocrinol*. 1982;16(4):401-8.

Mert M, Tanakol R, Karpuzoglu H, Abbasoglu S, Yarman S, Boztepe H, Alagol F. Spectral effect: each population must have its own normal midnight salivary cortisol reference values determined. *Arch Med Sci*. 2013;9(5):872-76.

Molich ME. Pituitary tumors and pregnancy. *Growth Horm IGF Res*. 2003;13:38-44.

Murphy BE. Conversion of cortisol to cortisone by the human uterus and its reversal in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1977;44(6):1214-17.

Nagesser SK, van Seters AP, Kievit J, van Dulken H, Krans HM, van de Velde CJ. Treatment of pituitary-dependent Cushing's syndrome: long-term results of unilateral adrenalectomy followed by external pituitary irradiation compared to transsphenoidal pituitary surgery. *Clin Endocrinol*. 2000;52(4):427-35.

Newell-Price J, Bertagna X, Grossman A, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006;367:1605-17

Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev*. 1998;19:647-72.

Newell-Price J. Cushing's Syndrome. *Clin Med*. 2008;8:204-8.

Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newwell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1526-40.

Nierop A, Bratsikas A, Klinkenberg A, Nater UM, Zimmermann R, Ehlert U. Prolonged salivary cortisol recovery in second-trimester pregnant women and attenuated salivary alpha-amylase responses to psychosocial stress in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(4):1329-35.

Nolten WE, Lindheimer MD, Rueckert PA, Oparil S, Ehrlich EN. Diurnal patterns and regulation of cortisol secretion in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51(3):466-72.

Nolten WE, Rueckert PA. Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;139(4):492-98.

Ochedalski T, Zylińska K, Laudański T, Lachowicz A. Corticotrophin-releasing hormone and ACTH levels in maternal and fetal blood during spontaneous and oxytocin-induced labour. *Eur J Endocrinol.* 2001;144(2):117-21.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO, 1995. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_854.pdf.

Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I, Nieman LK. Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4515-21.

Pivonello R, De Martino M C, De Leo M, Lombardi G, Colao A. Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37 (1):135-49.

Raff H. Cushing's syndrome: diagnosis and surveillance using salivary cortisol. *Pituitary.* 2012;15(1):64-70.

Raff H. Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: methodological considerations. *Endocrine.* 2013;44(2):346-49.

Raff H. Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3647-55.

Ragonese M, Cotta OR, Ferrà F, Trimarchi F, Cannavò S. How to diagnose and manage Cushing's disease during pregnancy, when hypercortisolism is mild? *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(8):637-39.

Sammour RN, Saiegh L, Matter I, Gonen R, Shechner C, Cohen M, Ohel G, Dickstein G. Adrenalectomy for adrenocortical adenoma causing Cushing's syndrome in pregnancy: a case report and review of literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;165(1):1-7.

Sasaki A, Shinkawa O, Margioris AN, Liotta AS, Sato S, Murakami O, Go M, Shimizu Y, Hanew K, Yoshinaga K. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human plasma during pregnancy, labor, and delivery. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(2):224-29.

Scott EM, McGarrigle HH, Lachelin GC. The increase in plasma and saliva cortisol levels in pregnancy is not due to the increase in corticosteroid-binding globulin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(3):639-44.

Seckl JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. Glucocorticoids, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int.* 2000;57(4):1412-17.

Shaw JA, Pearson DW, Krukowski ZH, Fisher PM, Bevan JS. Cushing's syndrome during pregnancy: curative adrenalectomy at 31 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;105(2):189-91.

Sorem KA, Smikle CB, Spencer DK, Yoder BA, Graveson MA, Siler-Khodr TM. Circulating maternal corticotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone in normal and abnormal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:912-16.

Tejura H, Weiner J, Gibby O, O'Leary AJ, Avasarala S. Cushing's syndrome in pregnancy. *J Obstet Gynaecol.* 2005;25(7):713-14.

Trainer PJ, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol.* 1991;34:317-30.

Trainer PJ. Corticosteroids and pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2002;20(4):375-80.

Triay J, Lambert AP. Cushing's disease occurring in pregnancy. *Diabet Med.* 2010;27(1):123-25.

Tyrrell JB, Findling JW, Aron DC, Fitzgerald PA, Forsham PH. An overnight high-dose dexamethasone suppression test for rapid differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Ann Intern Med.* 1986;104(2):180-86.

Viardot A, Huber P, Puder JJ, Zulewsky H, Keller U, Müller B. Reproducibility of nighttime salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5730-36.

Vilar L, Freitas MC, Lima LH, Lyra R, Kater CE. Cushing's syndrome in pregnancy: an overview. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(8):1293-02.

WHO, 1998 - Organização Mundial de Saúde – OMS. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_MSA_MNHIEAC_98.1.pdf

Wiegatz I, Kutschera E, Lee JH, Moore C, Mellinger U, Winkler UH, Kuhl H. Effect of four different oral contraceptives on various sex hormones and serum-binding globulins. *Contraception.* 2003;67(1):25-32.

Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome- recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem.* 1997;34:229-29.

Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugué MA, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3345-51.

Zerikly RK, Amiri L, Faiman C, Gupta M, Singh RJ, Nutter B, Kennedy L, Hatipoglu B, Weil RJ, Hamrahian H. Diagnostic characteristics of late-night salivary cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(10):4555-59.

Zhang Q, Dou J, Gu W, Yang G, Lu J. Reassessing the reliability of the salivary cortisol assay for the diagnosis of Cushing syndrome. *J Int Med Res.* 2013;41(5):1387-94.