



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSIANE FESTTI

**ACTH, LIPOPROTEÍNAS E CORTISOL SALIVAR COMO
MARCADORES DA INSUFICIÊNCIA SUPRARRENAL EM
PACIENTES COM CHOQUE SÉPTICO**

JOSIANE FESTTI

**ACTH, LIPOPROTEÍNAS E CORTISOL SALIVAR COMO
MARCADORES DA INSUFICIÊNCIA SUPRARRENAL EM
PACIENTES COM CHOQUE SÉPTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Alexandre José Faria Carrilho.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F418a Festti, Josiane.

ACTH, lipoproteínas e cortisol salivar como arcadores da insuficiência suprarrenal em pacientes com choque séptico / Josiane Festti. – Londrina, 2012. 62 f. : il.

Orientador: Alexandre José Faria Carrilho.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Glândulas supra-renais – Teses. 2. Choque séptico – Teses. 3. Septicemia – Teses. 4. Lipoproteínas – Teses. 5. Hormônios adrenocórticos – Teses. I. Carrilho, Alexandre José Faria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.45

JOSIANE FESTTI

**ACTH, LIPOPROTEÍNAS E CORTISOL SALIVAR COMO
MARCADORES DA INSUFICIÊNCIA SUPRARRENAL EM PACIENTES
COM CHOQUE SÉPTICO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Dr. Alexandre José Faria
Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares
Fragoso
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 21 de agosto de 2012.

DEDICO

Dedico este trabalho à Deus por me
dar vida, força e sabedoria.

Aos meus pais que fizeram dos seus sonhos
as minhas oportunidades de crescimento
e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os familiares dos pacientes incluídos no estudo que, mesmo em um momento de sofrimento e angústia, permitiram a doação do material biológico que viabilizou esta pesquisa.

Ao professor Dr. Alexandre José Faria Carrilho pela dedicação e orientação desta dissertação.

À professora Dra. Cintia Magalhães Carvalho Grion pela especial atenção e contribuição para este estudo.

Aos professores Dra. Tânia Longo Mazzuco e Dr Décio Sabbatini Barbosa, ao Dr. Vinicius Nahime Brito, Valéria Samuel Lando e às funcionárias do laboratório de pós-graduação Denise Duarte Santiago e Deborah Vittori pela contribuição na realização dos exames laboratoriais. À professora Dra Timei Matsuo pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos plantonistas do time de resposta rápida e aos residentes do pronto-socorro pela ajuda na busca de pacientes. À Fabiane Urizzi, à Mariana Festti e aos amigos do Hospital Universitário de Londrina pela força e incentivo.

À minha irmã Luciana Festti pelo apoio fundamental na conclusão do estudo.

Ao meu noivo Wellington Cardin pelo carinho, companheirismo e compreensão.

FESTTI, Josiane. **ACTH, lipoproteínas e cortisol salivar como marcadores da insuficiência suprarrenal em pacientes com choque séptico**. 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

RESUMO

A sepse e o choque séptico são as principais causas de mortalidade em UTI. Muitos pacientes em choque séptico evoluem com insuficiência suprarrenal, um diagnóstico difícil de ser determinado. A realização do teste com ACTH sintético não é indicada rotineiramente, devido aos custos elevados e pouca praticidade. O HDL colesterol é precursor na biossíntese do cortisol e estudos têm mostrado que baixos níveis de HDL colesterol estão associados a aumento de mortalidade na sepse. Este estudo teve como objetivo avaliar se o HDL colesterol, o ACTH e o cortisol salivar são preditores de insuficiência suprarrenal no choque séptico. O teste com ACTH sintético foi realizado em 34 pacientes nas primeiras 24 horas do choque séptico para determinar os pacientes respondedores e não respondedores. Os valores de cortisol total, livre e salivar, HDL colesterol e ACTH foram comparados entre os grupos. Não houve diferença significativa nos valores de HDL colesterol entre os pacientes respondedores e não respondedores ($p=0,418$). O HDL colesterol não se mostrou preditor de insuficiência suprarrenal no choque séptico.

Palavras-chave: Insuficiência suprarrenal. HDL colesterol. Sepse. Choque séptico. ACTH. Cortisol. Cortisol livre. Cortisol salivar.

FESTTI, Josiane. **ACTH, lipoproteins and salivary cortisol as markers of adrenal insufficiency in patients with septic shock**. 2012. 62p. Dissertation (Master in Health Sciences) - University of Londrina, Londrina. 2012.

ABSTRACT

Severe sepsis and septic shock are major causes of mortality in ICU. Many patients develop septic shock with adrenal insufficiency, a difficult diagnosis to be determined. The testing with synthetic ACTH is not indicated routinely, due to high costs and poor practicality. HDL cholesterol is a precursor in the biosynthesis of cortisol and studies have shown that low levels of HDL cholesterol are associated with increased mortality in sepsis. This study aims to assess whether HDL cholesterol, ACTH and salivary cortisol are predictors of adrenal insufficiency in septic shock. The synthetic ACTH test was performed on 34 patients within 24 hours from septic shock to determine the responders and non-responders patients. The values of total, free and salivary cortisol, HDL cholesterol and ACTH were compared between groups. There was no significant difference in HDL cholesterol in patients responders and non-responders ($p = 0.418$). HDL cholesterol was not a predictor of adrenal insufficiency in septic shock.

Key Words: Adrenal insufficiency. HDL cholesterol. Sepsis. Septic shock. ACTH. Cortisol. Free cortisol. Salivary cortisol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	ANATOMIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA SUPRARRENAL	13
2.2	FISIOLOGIA DA GLÂNDULA SUPRARRENAL	14
2.2.1	Regulação da Secreção de Cortisol	16
2.2.2	Resposta da Glândula Suprarrenal ao Estresse	17
2.3	INSUFICIÊNCIA SUPRARRENAL NA SEPSE	18
2.3.1	Mecanismos da Insuficiência Suprarrenal Induzida pela Sepse	22
2.3.2	Diagnóstico	23
2.3.2.1	Teste de estímulo com ACTH sintético	23
2.3.2.2	Cortisol livre	25
2.3.2.3	Cortisol salivar	28
2.4	HDL COLESTEROL NA SEPSE	29
3	OBJETIVO	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	DELINEAMENTO	35
4.2	POPULAÇÃO	35
4.3	AMOSTRA	35
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	35
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
4.6	COLETA DE DADOS	36
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
	ARTIGO	41
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICES	61
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência suprarrenal em pacientes graves com disfunção de múltiplos órgãos tem sido exaustivamente estudada nas últimas décadas (1), entretanto, o diagnóstico preciso e a intervenção terapêutica permanecem controversos. Outrora considerada relativamente rara, atualmente esta condição tem sido reconhecida com mais frequência em pacientes graves com sepse, infecção por HIV, trauma de crânio e em pós-operatório de cirurgia cardíaca. Particularmente em pacientes sépticos, o tratamento com corticosteróide deve ser instituído nas primeiras 24 horas, a fim de otimizar a perfusão tecidual e restaurar a fisiologia celular (2). O retardo no diagnóstico e, conseqüentemente, no tratamento, pode contribuir decisivamente para um desfecho desfavorável.

Considerados hormônios fundamentais na manutenção da homeostase circulatória, sobretudo na resposta aguda ao estresse, a produção de glicocorticóide e mineralocorticóide encontra-se muito elevada na sepse grave e no choque séptico, caracterizando uma sobrecarga funcional da suprarrenal. Paradoxalmente, essa mesma condição acarreta menor perfusão tecidual e diminuição da disponibilidade de lipoproteínas transportadoras de colesterol, matéria prima para a síntese dos hormônios esteróides. Configura-se, pois, uma situação na qual a glândula suprarrenal é solicitada a aumentar a produção de cortisol e aldosterona em condições adversas, como má perfusão tecidual e menor oferta de colesterol. Nesse contexto, é esperado que ocorra insuficiência parcial ou mesmo total da glândula suprarrenal e o diagnóstico precoce torna-se fundamental para justificar a reposição hormonal.

A ativação do eixo hipotálamo–hipófise–suprarrenal com a liberação do cortisol é um componente essencial de adaptação geral à doença e ao estresse. Este mecanismo de proteção é claramente demonstrado em trabalhos experimentais com animais adrenalectomizados que sucumbem rapidamente ao choque séptico ou hemorrágico e que são protegidos da morte quando recebem reposição com esteróides (3). Em humanos, existe debate no que diz respeito à definição de insuficiência suprarrenal. Alguns pesquisadores utilizam a concentração de cortisol basal, enquanto outros usam uma resposta reduzida ao ACTH sintético e outros ainda usam um valor aleatório de cortisol (4). Já foi demonstrado que os pacientes

com choque séptico que apresentam resposta adequada ao ACTH sintético têm melhor prognóstico do que aqueles que não respondem adequadamente a este teste (2).

Uma das razões bem estabelecidas para a falência suprarrenal é a necrose hemorrágica da glândula encontrada na meningococcemia. Entretanto, esse achado não está presente na grande maioria das outras causas de septicemia. Especula-se se a produção de citocinas possa levar à falência da glândula, à semelhança de outros órgãos que apresentam disfunção durante a sepse grave. Outra hipótese aponta para disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, na qual a disfunção, determinada por mediadores inflamatórios sistêmicos ou pela má perfusão tecidual, acometeria o hipotálamo e/ou a hipófise, repercutindo sobre a glândula suprarrenal. Esta disfunção poderia ainda ser de caráter definitivo ou mesmo temporário. Do ponto de vista bioquímico, o aumento da concentração de cortisol em resposta a um estímulo é o resultado do aumento da sua síntese e liberação pelo córtex suprarrenal, uma vez que o cortisol não é armazenado na glândula. Esse aumento é proporcionado pelo pequeno pool de colesterol livre intracelular (5), advindo da síntese endógena ou da captação de lipoproteínas transportadoras de colesterol, a saber: lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Estudos experimentais sugerem que a HDL é a principal fonte de lipoproteína como substrato esteroidogênico na glândula suprarrenal (6). Valores reduzidos de HDL e de apolipoproteína A (apo A) em pacientes graves podem estar ligados à alta incidência de insuficiência suprarrenal nestes pacientes. Corroborando com esta hipótese, van der Voort e col. (7) demonstraram que em pacientes gravemente doentes, baixos níveis de HDL-colesterol estão associados a uma resposta suprarrenal atenuada ao estímulo com ACTH sintético. Além disso, Marik e col. (8) demonstraram a associação entre baixos níveis de HDL à admissão e insuficiência de suprarrenal em pacientes com falência hepática internados em UTI.

Grion e col. (9) estudando a associação entre a concentração de lipoproteínas na admissão hospitalar e a susceptibilidade à sepse grave, encontraram associação inversa entre a concentração de HDL-colesterol e o risco de sepse grave intra-hospitalar, observando que para cada aumento em 1 mg/dL do HDL colesterol, esse risco diminuía em 3%.

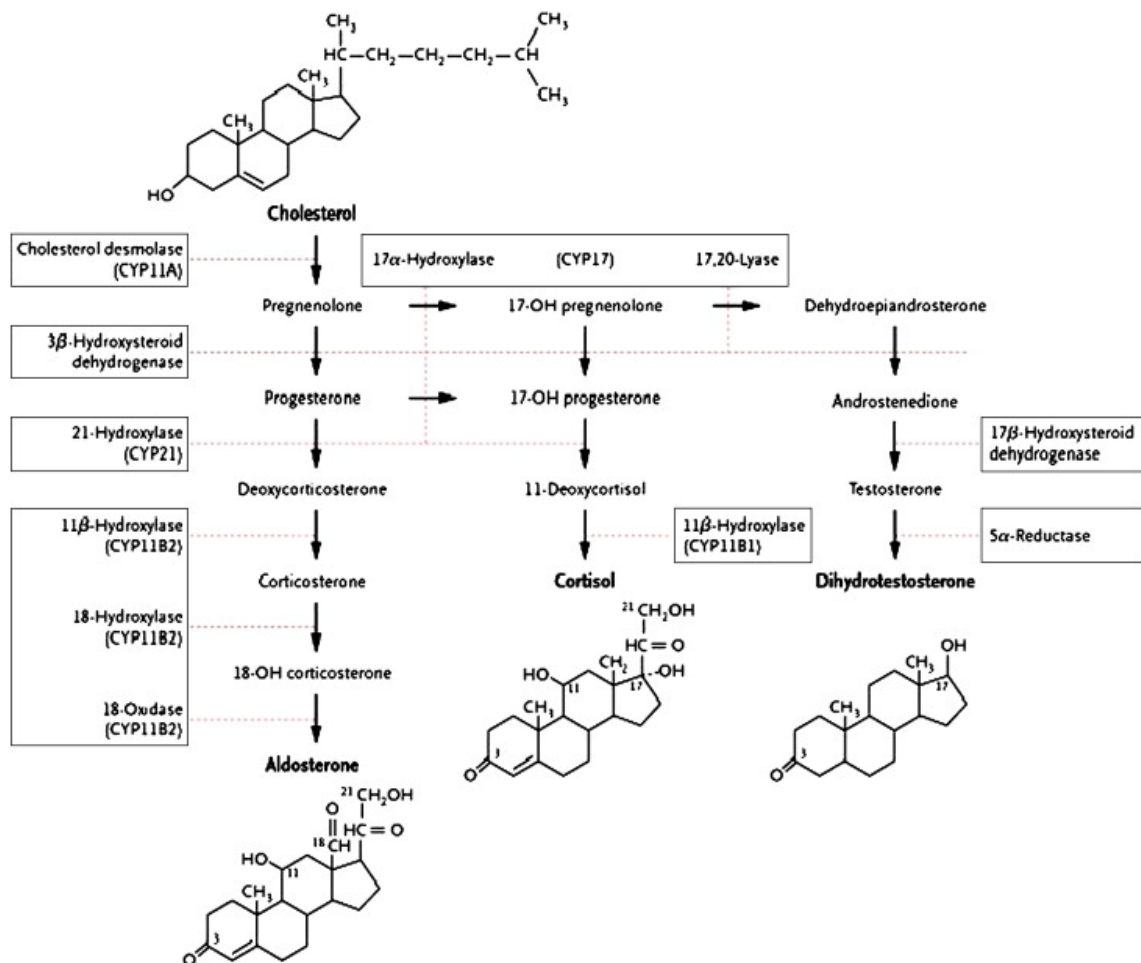
O fato da insuficiência suprarrenal ser comum em pacientes graves e o tratamento com reposição de baixas doses de corticóide ser benéfico em alguns grupos de pacientes é aceito na literatura. O que permanece controverso é o diagnóstico desta doença. O cortisol circulante se encontra ligado à globulina ligadora de corticosteróide (CBG) ou transcortina, com menos de 10% na forma livre. Durante a resposta de fase aguda, há uma redução abrupta na concentração da CBG que transporta o cortisol, assim como ocorre redução da afinidade deste pela CBG, resultando no aumento de sua fração livre no plasma. Simultaneamente, ocorre redução de receptores celulares para o cortisol, levando à resistência tecidual durante a doença aguda (10). Estes dados sugerem que a dosagem de cortisol plasmático não seja uma avaliação adequada de sua atividade tecidual, entretanto, como não se dispõe de uma metodologia que avalie a ação do hormônio nos diversos tecidos, utiliza-se a medida do cortisol plasmático após estímulo com ACTH sintético como o “padrão ouro” para o diagnóstico de insuficiência suprarrenal na sepse grave, e espera-se como resposta adequada uma elevação do cortisol após o teste de estímulo de 9 mcg/dL em relação ao cortisol basal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA GLÂNDULA SUPRARRENAL

As glândulas suprarrenais estão situadas nos polos superiores de ambos os rins e pesam cerca de quatro gramas cada. São constituídas por duas partes distintas, a medula e o córtex. A medula está localizada na parte central e corresponde a 20% da glândula. Funcionalmente, está relacionada ao sistema nervoso simpático e secreta os hormônios epinefrina e norepinefrina, em resposta à estimulação simpática. O córtex suprarrenal secreta os hormônios denominados corticosteróides, que compreendem os mineralocorticóides, glicocorticóides e pequenas quantidades de androgênios. Todos esses hormônios são sintetizados a partir do colesterol, e mantêm como estrutura básica o anel ciclopentanoperidrofenantreno (11). (Figura 1)

Figura 1 – Síntese hormonal a partir do colesterol.



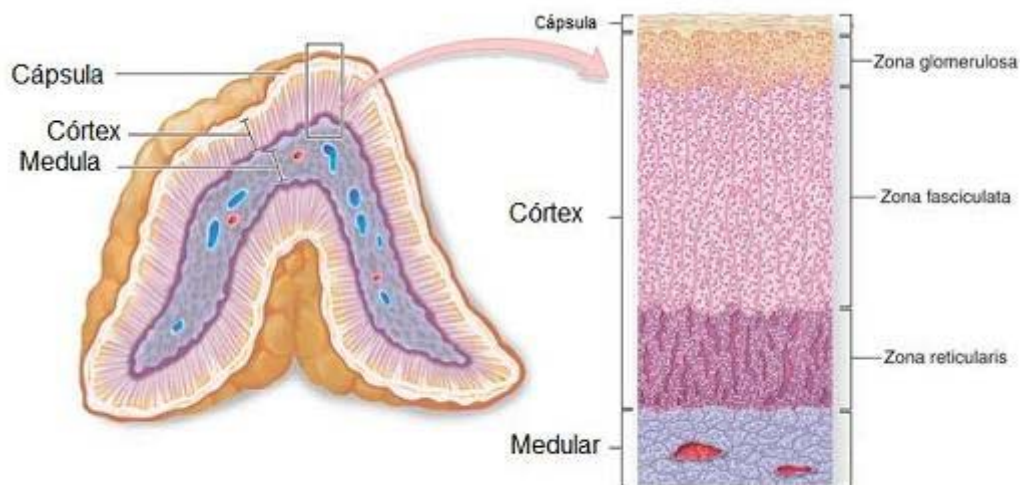
O córtex é constituído por três zonas histológicas, denominadas de acordo com a disposição das células secretoras: glomerulosa, fasciculada e reticular (11). (Figura 2)

A zona glomerulosa, mais externa, é muito fina, contém pequenas células com grande quantidade de mitocôndrias alongadas e produz quase exclusivamente aldosterona (11).

A zona fasciculada é a intermédia, de maior dimensão, com células cúbicas em forma de cordões, com citoplasma repleto de inclusões lipídicas e mitocôndrias de grandes dimensões e cristas vesiculares. Esta zona tem predomínio da produção de glicocorticóides, sobretudo o cortisol (11).

A zona reticular, mais interna, tem células interligadas, semelhantes às da zona fasciculada, mas com menor número de inclusões lipídicas e produz principalmente androgênios (11).

Figura 2 - Glândula suprarrenal: anatomia e histologia.



2.2 FISILOGIA DA GLÂNDULA SUPRARRENAL

Conforme previamente explicado, o colesterol é a matéria prima para a síntese de todos os hormônios do córtex suprarrenal, podendo ser sintetizado pela própria célula a partir de acetilcoenzima A, ou obtido do plasma por endocitose de lipoproteínas, sobretudo a HDL e LDL, mediados por receptores específicos,

principalmente o SR-B1 (*Scavenger related receptor B1*) e o receptor B-E, respectivamente (11).

Os glicocorticóides regulam a transcrição de genes em cada célula do organismo, aumentam os níveis de glicose sanguínea e facilitam a sua oferta para as células, garantindo o estresse agudo e crônico. O aumento da glicose plasmática ocorre pelo aumento da taxa de gliconeogênese hepática e pela inibição da captação de glicose pelos tecidos adiposos (12). Os glicocorticóides também estimulam a liberação de ácidos graxos livres dos tecidos adiposos e a de aminoácidos dos músculos esqueléticos. Estes processos fornecem energia e substrato para as células na resposta ao estresse e no reparo de injúrias (1).

Os glicocorticóides também são requeridos para a resposta cardiovascular normal à angiotensina II, adrenalina e noradrenalina, contribuindo para a manutenção da contratilidade cardíaca e tônus muscular. Seus efeitos na síntese de catecolaminas e seus receptores são parcialmente responsáveis pelo efeito inotrópico positivo destes hormônios (13).

Além disso, os glicocorticóides influenciam várias células que participam das reações imunológicas e inflamatórias, incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e basófilos, reduzindo o acúmulo e funcionamento da maioria destas células nos locais de inflamação.

Os efeitos da supressão da resposta imunológica parecem ser consequência da modulação da produção ou atividade de citocinas (interleucinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, interferon-gama, fator de necrose tumoral (TNF- α), ativação do complemento e outros mediadores inflamatórios (1).

O cortisol é o maior glicocorticóide endógeno secretado pelo córtex da adrenal. Cerca de 90% do cortisol circulante é ligado à globulina de ligação do cortisol e à albumina, e 10% está na forma livre, biologicamente ativa (14,15). A proteína de ligação predominante é a transcortina, enquanto que a ligação com albumina ocorre em menor quantidade.

Durante um quadro crítico, particularmente na sepse, os níveis de transcortina reduzem, resultando em um aumento significativo da porcentagem de cortisol livre (16,17). O tempo de meia vida do cortisol circulante varia de 70 a 120 minutos. Este hormônio não é armazenado pela glândula suprarrenal, portanto a

secreção elevada ocorre devido ao aumento da síntese controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (18).

O colesterol é o principal precursor para a síntese dos esteróides. Numa sequência de reações enzimáticas, o colesterol é convertido em pregnenolona e posteriormente nos produtos finais da biossíntese suprarrenal: aldosterona, cortisol, deidroepiandrosterona e androstenediona (18). Durante o estresse, aproximadamente 80% do cortisol circulante é derivado do colesterol plasmático, e os 20% restantes são sintetizados *in situ* a partir de acetato e outros precursores (19).

Yaguchi e col. (6) sugeriram que a lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) é o colesterol preferido pela glândula suprarrenal como substrato da esteroidogênese.

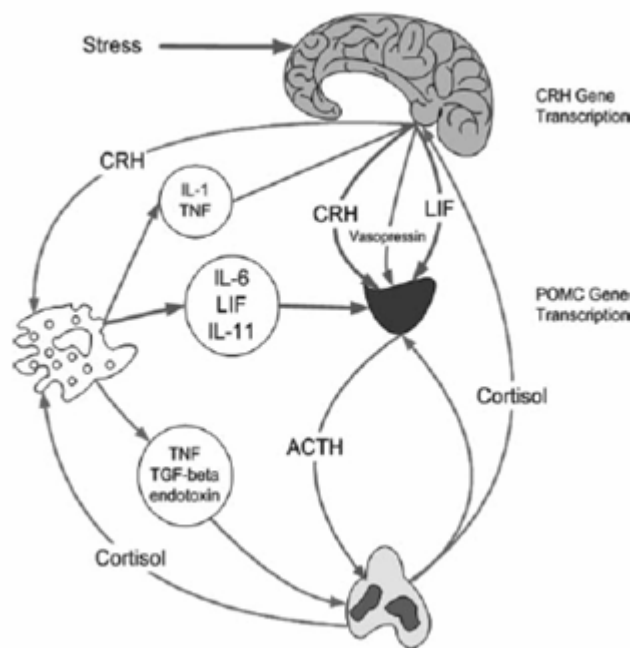
Receptores SR-B1 em ratos e seu homólogo humano CLA-1 têm sido identificados como os receptores de alta afinidade pelo HDL, mediando a captação seletiva de colesterol (20,21,22). Estes receptores são expressos em níveis elevados nas células parenquimatosas do fígado e em células esteroidogênicas das glândulas suprarrenais, ovários e testículos (23). Ratos nocauteados para o receptor SR-B1 são incapazes de aumentar a produção de glicocorticóides em resposta ao estresse ou ACTH (24).

2.2.1 Regulação da Secreção de Cortisol

A secreção de cortisol pelo córtex suprarrenal é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. Sinais clínicos como liberação de citocinas, injúria tissular, dor, hipotensão, hipoglicemia e hipóxia são percebidos pelo sistema nervoso central e a informação é transmitida ao hipotálamo. O hipotálamo integra estes sinais e responde com aumento ou redução da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH, por sua vez, estimula a hipófise anterior para a produção de ACTH, o qual circula até o córtex da suprarrenal onde estimula a liberação de cortisol. O cortisol faz um feed-back negativo no eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. Assim o organismo pode controlar a secreção de cortisol conforme a variação de estresse ou outros sinais (1). O eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e a resposta imune são interligados, uma vez que as citocinas,

produzidas pelas células imunológicas ativadas, atuam como sinalizadoras cerebrais de injúria tissular, estimulando o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e elevando a liberação de cortisol, que por sua vez exerce feed-back negativo e suprime a resposta imunológica (25). (Figura 3)

Figura 3 - Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e a interação com a resposta inflamatória.



Fonte: Paul Marik (63).

2.2.2 Resposta da Glândula Suprarrenal ao Estresse

Várias fontes de estresse como: febre, frio, infecções, traumas, emoções, queimaduras, hemorragia, agentes inflamatórios e outros desafios para a homeostase estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal aumentando a secreção de cortisol. Existe muita controvérsia sobre que concentração de cortisol circulante é considerado adequado à resposta ao estresse (26). A maioria dos autores atribui valores de cortisol plasmático acima de 18 mcg/dL como resposta satisfatória (1), contudo, este valor é baseado na resposta ao teste de estímulo com ACTH exógeno em alta dose (250mcg) (27) e à hipoglicemia induzida por insulina em pacientes não críticos sem estresse (28). Neste último, a integridade de todo o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal é avaliada, uma vez que a hipoglicemia,

provocada pela administração intravenosa de insulina, desencadeia a ativação do eixo a partir da liberação hipotalâmica de CRH. Por outro lado, a administração de doses supra fisiológicas de ACTH sintético avalia diretamente a capacidade de resposta suprarrenal, ignorando a integridade do eixo hipotálamo-hipófise. Em caso de resposta satisfatória da suprarrenal, infere-se a integridade previa do eixo, mantendo o trofismo da glândula, necessário à sua resposta ao estímulo agudo com ACTH. Entretanto, não se pode descartar lesão aguda hipotalâmica ou hipofisária.

Uma concentração aleatória de cortisol sérico de 25 mcg/dL para o diagnóstico de uma resposta adequada do cortisol à doença crítica é apoiado na literatura (5,29) e deve ser interpretado em conjunto com a resposta clínica à terapia de reposição de esteróides (1).

Estudos em humanos e experimentos em animais demonstraram elevação dos níveis séricos de adrenalina e cortisol concomitantes ao aumento da severidade do estresse, sendo hipotensão e sepse os dois principais estressores (30,31).

Na sepse os glicocorticóides atuam na modulação da inflamação, estimulação da síntese e ação das catecolaminas, além disto, também tem ação no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos (32).

Uma disfunção reversível do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal tem sido reconhecida em pacientes críticos com inflamação sistêmica associada à sepse, disfunção hepática, injúria pulmonar e circulação extracorpórea. TNF- α e IL-1 têm sido implicados na disfunção reversível do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal durante a doença crítica. O TNF- α prejudica a liberação de ACTH estimulada pelo CRH e vários estudos clínicos têm relatado níveis inapropriadamente baixos de ACTH em pacientes com sepse grave (33,34). O TNF- α também mostrou reduzir a síntese de cortisol pela inibição da ação estimulatória do ACTH e angiotensina II nas células suprarrenais (35,36). A redução na produção do cortisol durante a doença grave pode ocorrer devido à deficiência de substrato (37).

2.3 INSUFICIÊNCIA SUPRARRENAL NA SEPSE

Sepse e choque séptico são as maiores causas de mortalidade em unidade de terapia intensiva. A sepse tem sido reconhecida como o principal

problema de saúde pública em estudos epidemiológicos (38). Martin e col. (39) estimaram uma incidência de sepse nos EUA de 240 casos por 100.000 pessoas e Angus e col. (40) encontraram 300 casos de sepse grave por 100.000 pessoas. A incidência foi projetada para aumentar 1,5% ao ano. A taxa de mortalidade nestes estudos foi de 17,9% (39) para a sepse e 28,6% para a sepse grave (40). O estudo europeu SOAP relatou que 35% dos pacientes apresentavam critérios de sepse durante internação em UTI, com taxa de mortalidade de 27% (41).

Conforme a definição da *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee* de 1992 (42), a sepse é uma resposta sistêmica manifestada por duas ou mais das condições seguintes, na vigência de uma infecção:

- ✓ temperatura acima de 38° C ou abaixo de 36° C;
- ✓ frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto;
- ✓ frequência respiratória acima de 20 incursões por minuto ou PaCO₂ menor que 32 mmHg;
- ✓ contagem de leucócitos maior que 12000 cel/mm³ ou menor que 4000 cel/mm³ ou presença de 10% de formas imaturas.

O choque séptico é definido como hipotensão induzida pela sepse, reconhecido quando ocorre pressão sistólica menor que 90 mmHg ou redução maior ou igual a 40 mmHg da pressão de base na ausência de outras causas de hipotensão, não responsiva a ressuscitação volêmica adequada e na presença de alterações de perfusão que podem incluir acidose metabólica, oligúria e alteração do estado mental. Pacientes que recebem agentes inotrópicos ou vasopressores podem não estar hipotensos no momento em que as alterações perfusionais são observadas (42).

A insuficiência suprarrenal relativa é definida em pacientes sem disfunção suprarrenal prévia, que durante uma doença crítica, apresentam uma concentração inadequada de cortisol para a gravidade da doença (32). A prevalência da insuficiência suprarrenal em pacientes críticos é variável e dependente da doença de base e de sua gravidade. Essa prevalência varia de 0 a 70% dependendo da população estudada e do critério de definição utilizado (34,43). A prevalência global em pacientes críticos é de aproximadamente 30%, aumentado para 50 a 60% em pacientes com choque séptico (4). Marik e Zaloga (1) diagnosticaram insuficiência

suprarrenal em 36 de 59 pacientes (61%) com choque séptico. Sendo que, apenas 5 destes pacientes (9%) apresentavam os critérios clássicos para a insuficiência suprarrenal (cortisol menor que 18 mcg/dL aos 60 min após 250 mcg de corticotropina) e 27 dos 36 pacientes mostraram melhora hemodinâmica após terapia de reposição com esteróides. Rydvall e col. (44) relataram prevalência de 47% de insuficiência suprarrenal na população geral de UTI. Briegel e col. (45) relataram que 65% dos pacientes com choque séptico tiveram cortisol de estresse menor que 25 mcg/dL, enquanto Sibbald e col. (46) relataram 77% e Moran e col. (47) mencionaram 49% de insuficiência suprarrenal em pacientes com choque séptico.

As diretrizes da campanha de sobrevivência a sepse de 2008 (SSC-2008) para o tratamento da sepse grave e choque séptico, sugerem que a reposição de corticóide com hidrocortisona seja realizada apenas quando for confirmado que a hipotensão arterial tem uma resposta pobre à reposição volêmica e ao uso de vasopressor. A justificativa da recomendação baseia-se na controvérsia dos resultados dos estudos (48).

Anname e col. (2) em estudo aleatório e duplo-cego, estudaram pacientes com choque séptico, que após teste de estímulo com ACTH sintético, receberam hidrocortisona mais fludrocortisona ou placebo por 7 dias. A prevalência de insuficiência suprarrenal foi de 76,5%. Para os pacientes não respondedores a mortalidade foi maior nos pacientes do grupo placebo. Não houve diferença significativa entre os respondedores e os efeitos adversos foram similares nos dois grupos. O uso de drogas vasoativas foi suspenso mais rapidamente no grupo com reposição hormonal.

Briegel e col. (49) e Bollaert e col. (50) também descreveram resultados significativos no tratamento do choque séptico com corticóides. Briegel e col. (49) estudaram 40 pacientes com 24 a 28 horas de choque séptico para receberem tratamento com hidrocortisona ou placebo. O uso de hidrocortisona reduziu significativamente o tempo de terapia com vasopressores no choque séptico. A mediana de tempo de uso de vasopressor no grupo hidrocortisona foi de 2 dias e no grupo placebo de 7 dias ($p=0,005$). Bollaert e col. (50) estudaram 41 pacientes com choque séptico, com mais de 48 horas de evolução do choque. Os pacientes foram aleatorizados para receberem hidrocortisona ou placebo durante 5 dias. O

grupo que recebeu hidrocortisona apresentou maior reversão do choque e houve uma tendência para a mortalidade reduzida no 28º dia.

O Corticosteroid Therapy of Septic Shock (CORTICUS) (51) foi um estudo multicêntrico, duplo-cego e aleatório que incluiu pacientes com choque séptico: 251 pacientes foram aleatorizados para receber 50 mg de hidrocortisona e 248 pacientes para receber placebo a cada 6 horas durante 5 dias. O teste com 250 mcg de ACTH sintético foi realizado para determinar os pacientes respondedores e não respondedores. A prevalência de insuficiência suprarrenal foi de 46,7% dos pacientes (125 no grupo da hidrocortisona e 108 no grupo placebo). Os autores concluíram que não houve diferença significativa na mortalidade no 28º dia entre os pacientes que não responderam ao teste com ACTH sintético nos dois grupos (39,2% no grupo que recebeu hidrocortisona e 36,1% no grupo placebo, $p=0,69$) e também entre os pacientes que responderam ao teste (28,8 % no grupo da hidrocortisona e 28,7% no grupo placebo, $p=1,0$). No 28º dia 34,3% dos pacientes do grupo hidrocortisona e 31,5% do grupo placebo tinham evoluído a óbito ($p=0,51$). No grupo de pacientes que recebeu reposição com hidrocortisona o choque reverteu mais rapidamente, porém neste grupo houve mais episódios de infecção, incluindo nova sepse e choque séptico comparando-se com o grupo placebo (51).

O estudo CORTICUS (51) não mostrou redução da mortalidade no choque séptico com terapia com corticóides. O estudo de Annane e col. (2) incluiu pacientes com choque não responsivo a vasopressores enquanto que o estudo CORTICUS (51) inclui pacientes com choque séptico independentemente de como a pressão arterial responde aos vasopressores. Embora o uso de corticóides pareça reverter o choque, existe o risco de efeitos adversos, como aumento do risco de infecção e miopatia que reduzem o entusiasmo ao seu uso.

Portanto, baseado nos estudos acima, a SSC-2008 (48) recomenda o uso de corticóides nos pacientes em que o choque não responde ao uso de fluidos e vasopressores e desencoraja o uso em pacientes em que o choque responde bem a essas medidas. A SSC-2008 (48) também recomenda que o teste de estímulo com ACTH sintético não seja utilizado de rotina para identificar os pacientes que necessitam receber corticóide, pois os estudos CORTICUS (51) e Ananne e col. (2) não demonstraram associação significativa entre a realização do teste com ACTH sintético e benefício do uso de corticóides (48). Esse posicionamento leva-nos a

concluir que a insuficiência suprarrenal na sepse grave é uma condição freqüente, plausível, e que a reposição com corticosteróides traz benefícios apenas quando indicado corretamente e que a administração descriteriosa dessa medicação pode acarretar malefícios. A principal dificuldade reside em diagnosticar corretamente essa condição.

2.3.1 Mecanismos da Insuficiência Suprarrenal Induzida pela Sepse

A liberação de citocinas nos tecidos, induzida pela sepse, ativa o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal através das fibras aferentes do sistema nervoso noradrenérgico e do nervo vago, resultando em uma ativação subsequente de neurônios do *locus coeruleus* que fazem sinapse nos neurônios colinérgicos no núcleo parvocelular. A acetilcolina estimula a liberação de fator de liberação de corticotrofina através de receptores muscarínicos, um efeito que é mediado por óxido nítrico e monóxido de carbono (52).

Em modelos de sepse a inibição da atividade do nervo vago promove uma resposta inflamatória sistêmica (53). Além disso, endotoxinas ou sepse podem desencadear liberação neuronal de citosinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α) particularmente no núcleo hipotalâmico (54,55). A síntese de óxido nítrico induzida pela sepse pode prolongar a síntese de hormônios hipotalâmicos (56). Citocinas também podem agir diretamente na hipófise e na suprarrenal estimulando a liberação de ACTH e cortisol (57). Vários fatores podem influenciar o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal incluindo danos anatômicos, inflamação e drogas (52).

As alterações hemodinâmicas encontradas nessa condição tornam a hipófise, assim como a suprarrenal, suscetíveis à isquemia, necrose e hemorragia (58). São fatores de risco para dano vascular: a falência cardiovascular ou renal, hemoculturas positivas, distúrbios de coagulação e uso de anticoagulantes (59). Além desses fatores, o acúmulo de óxido nítrico no hipotálamo e na hipófise desencadeia apoptose neuronal (56), que associado ao aumento de substância P, radicais superóxido, monóxido de carbono e prostaglandinas alteram a síntese dos hormônios hipofisários (60).

Drogas utilizadas no tratamento da sepse podem inibir a síntese do cortisol, particularmente antifúngicos e etomidato, através da inibição da enzima 21 α -hidroxilase, afetando a esteroidogênese.

2.3.2 Diagnóstico

Tradicionalmente o diagnóstico da insuficiência suprarrenal em pacientes críticos tem sido baseado nas dosagens de cortisol sérico total ou na sua elevação após administração intravenosa de 250 mcg de ACTH sintético (1,61). Apesar de várias limitações em pacientes críticos, Annane e col. (2006) (62) determinaram que um delta de cortisol menor que 9 mcg/dL foi o melhor preditor de insuficiência suprarrenal. Valores de cortisol abaixo de 10mcg/dL também foram indicativos de insuficiência suprarrenal, porém a sensibilidade do teste foi pobre. Como não existe um teste que quantifique a atividade tissular do hormônio, o diagnóstico da insuficiência suprarrenal relativa permanece incerto (37).

As recomendações pelo consenso do *American College of Critical Care Medicine* incluem um delta cortisol (após 250 mcg de ACTH sintético) menor que 9 mcg/dL ou um valor de cortisol total menor que 10 mcg/dL (grau de recomendação 2 B) para o diagnóstico de insuficiência suprarrenal. O cortisol livre não pode ser recomendado como rotina neste momento, pois além de ser uma medida difícil de ser realizada, seu valor normal em pacientes críticos permanece indeterminado (grau de recomendação 2 B). Apesar de ser considerado padrão ouro, o teste de estímulo com ACTH sintético não é recomendado para uso na rotina devido a pouca praticidade e demora dos resultados (grau de recomendação 2 B) (63). O grau de recomendação 2 B inclui estudos que recomendam a ação, pois são encontradas evidências importantes no desfecho e conclui-se que há benefício na escolha da ação em relação aos riscos do dano.

2.3.2.1 Teste de estímulo com ACTH sintético

Uma das primeiras referências ao teste de alta dose de cortrosina em pacientes críticos é de 1991 (64). Apesar do pequeno número de pacientes, o autor observou que entre pacientes com variação de cortisol após o teste de

cortrosina menor ou igual a 9 mcg/dL, a taxa de mortalidade foi 100% (13 pacientes). Apenas 30% dos pacientes com variação de cortisol maior que 9 mcg/dL foram a óbito. Este foi o primeiro estudo a apontar que este teste foi capaz de identificar pacientes críticos com disfunção suprarrenal (64).

Nove anos depois, esta hipótese foi analisada em outro estudo (65), que foi concebido para identificar fatores associados com a mortalidade em pacientes críticos, em especial atenção para os níveis de cortisol e sua variação. Neste estudo, a variação do cortisol após a administração de ACTH sintético foi a variável que melhor se correlacionou com a mortalidade, apresentando área sob a curva ROC de 0,6, delta de cortisol igual a 9 µg/dL como ponto de corte, com sensibilidade e especificidade de 0,68 e 0,65 respectivamente (65). Desde então, este teste foi adotado como padrão ouro na identificação da disfunção suprarrenal em pacientes críticos.

Após a pesquisa de Annane e col. (2) muitas unidades de terapia intensiva ao redor do mundo começaram a usar a resposta do teste de alta dose de cortrosina para decidir quais pacientes com choque séptico receberiam ou não a terapia com esteróide. Esta abordagem foi sugerida pelas diretrizes da Sociedade Européia de Medicina Intensiva publicada em 2004, mas esta recomendação foi removida das diretrizes atualizadas de 2008 (48).

Muitas questões surgiram acerca do uso do teste com 250 mcg de ACTH sintético, pois expõe a suprarrenal a níveis suprafisiológicos de corticotropina. Assim, pacientes que respondem à dose, podem não ser capazes de aumentar adequadamente os níveis de cortisol quando enfrentam outro estímulo, como choque ou hipoglicemia, diminuindo a sensibilidade do teste. Alguns pesquisadores concordam com esta hipótese, mostrando que o teste tem alta especificidade e baixa sensibilidade (66,67).

Apesar da crítica, o teste com 250 mcg é o teste de diagnóstico mais estudado para insuficiência suprarrenal relativa em pacientes críticos, e é o teste que mostrou a maior acurácia entre morbidade e mortalidade, embora o consenso atual seja que a decisão sobre suplementação ou não de glicocorticóide em choque séptico independa de seu resultado (32).

2.3.2.2 Cortisol livre

O cortisol é transportado ligado à transcortina (80%) e, em menor grau, à albumina (10%) e cerca de 10% circula na forma livre. Tanto na forma combinada quanto na forma livre, os hormônios são transportados por todo o compartimento do líquido extracelular. Em geral, os hormônios fixam-se aos tecidos-alvo dentro de 1 ou 2 horas, no caso do cortisol.

Em 1987 Coolens e col. (73) descreveram um método para calcular o cortisol livre a partir do cortisol total e da transcortina, baseado no equilíbrio das ligações. O resultado calculado teve boa correlação com o resultado obtido por ultrafiltração centrífuga a 37°C.

Somente o cortisol livre é capaz de penetrar no espaço intracelular e ter atividade hormonal. Dosagens de cortisol total não são um reflexo adequado da função suprarrenal na presença de alterações nos níveis de transcortina (73).

O cortisol livre é calculado através da equação de Coolens (73):

$$U^2 \cdot K (1+N) + U [1 + N + K (G - T)] - T=0$$

na qual U, T e G correspondem respectivamente à concentração molar de cortisol livre, cortisol total e transcortina. A constante K é a afinidade da transcortina ao cortisol a 37°C e tem o valor de $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Para N foi atribuído valor constante de 1,74 e é proporcional à concentração de albumina.

Segundo Ho e col. (16), ajustes na constante N da equação de Coolens em pacientes com variação do valor de albumina tem pequeno efeito no valor do cortisol livre estimado. Por isso o método de Coolens, sem ajuste para o valor de N pode ser usado no cálculo do cortisol livre no choque séptico e também pode ser amplamente aplicado já que o cortisol livre mostrou ser superior ao cortisol total em auxiliar a decisão de tratamento com corticosteróides. E, portanto, o aumento atenuado do cortisol após estímulo com ACTH sintético nos pacientes com insuficiência suprarrenal não tem correlação com as proteínas de ligação. Ho e col. (16), em pacientes séptico, compararam o valor de cortisol livre mensurado com valor de cortisol livre calculado pela fórmula de Coolens e encontraram correlação ($r=0,9$ e $p<0,001$).

Molenaar e col. (74) incluíram pacientes sépticos e não sépticos em tratamento para hipotensão nos quais o teste com ACTH foi realizado. Embora uma

concentração baixa de transcortina resultou em um cortisol livre elevado em relação ao cortisol total, cortisol total e livre e suas elevações foram bem correlacionados ($r=0,77$; $r=-0,79$ e $p<0,001$). Molenaar e col. (74) também relataram que em pacientes sépticos a hipoalbuminemia não altera os valores de cortisol total e livre, e o aumento no cortisol total após teste com ACTH sintético prediz aumentos no cortisol livre independente de baixos valores de proteínas de ligação. Os autores também encontraram que o ACTH endógeno foi inversamente proporcional ao aumento do cortisol basal e livre após ACTH sintético, sugerindo que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal ocorra conforme a severidade da doença, independente da condição subjacente. O estudo conclui que embora a fração livre biologicamente ativa dependa das proteínas de ligação o cortisol total correlacionou-se com o cortisol livre em pacientes com hipotensão durante a doença crítica. Na sepse a albumina não é uma proteína de ligação importante e seus níveis não podem ser usados para prever a fração livre do cortisol. Aumentos anormais no cortisol total após ACTH bastam na avaliação da insuficiência adrenal relativa, particularmente na sepse.

Hamrahian e col. (75) investigaram o efeito da redução das proteínas de ligação na fração total e livre do cortisol durante a doença crítica, quando a secreção de glicocorticóides é estimulada ao máximo. O cortisol total e após o estímulo com ACTH sintético foram menores em pacientes com hipoproteinemia que naqueles com concentrações de albumina normais ($p<0,001$). A concentração de cortisol livre foi similar nos dois grupos e apresentou valores muito mais elevados que os controles ($p<0,001$). Em todos os pacientes, incluindo os que apresentavam hipoproteinemia, o cortisol livre basal e após estímulo com ACTH apresentaram valores elevados (aumento de 7 a 10 vezes). A concentração plasmática de ACTH também foi elevada e a concentração de cortisol total foi 2 a 3 vezes o valor normal. O estudo conclui que durante a doença crítica a secreção de glicocorticóides aumenta, mais este aumento não é observado quando apenas o cortisol total é mensurado. Neste estudo aproximadamente 40% dos pacientes críticos com hipoproteinemia tinham concentração de cortisol total subnormal, apesar de sua função suprarrenal estar preservada. Mensurar o cortisol livre em pacientes com hipoproteinemia pode prevenir o uso desnecessário de terapia com glicocorticóides.

Ho e col. (16) compararam pacientes em choque séptico, sepse e indivíduos saudáveis. O cortisol livre refletiu a severidade da doença melhor que o cortisol total ($p < 0,001$). O aumento do cortisol livre após estímulo variou muito conforme a gravidade ($p = 0,004$) enquanto que o cortisol total não apresentou este aumento ($p = 0,013$). Considerando para os pacientes com diagnóstico de insuficiência suprarrenal relativa um delta menor que 248 nmol/L (9 mcg/dL), estes pacientes apresentavam elevação do cortisol total ($p = 0,028$) e cortisol livre ($p = 0,017$) em comparação aos pacientes com função suprarrenal preservada. A elevação do cortisol na insuficiência suprarrenal relativa, tanto total quanto livre, foi menor. Essas diferenças são devido às alterações nos níveis de transcortina e albumina. Os níveis de cortisol livre normalizaram mais prontamente que o cortisol total nos pacientes doentes. O estudo, portanto, concluiu que o cortisol livre parece ser o melhor marcador de cortisolemia e infecção sistêmica porque corresponde melhor com a severidade da doença.

Como o cortisol livre foi calculado pelo método de Coolens e apresentou-se correlacionado com o cortisol livre mensurado, é possível concluir que o cortisol livre pode ser determinado com segurança utilizando-se o cálculo com cortisol total e os níveis de transcortina. Considerando o teste de estímulo com ACTH sintético, para os pacientes com insuficiência suprarrenal relativa, 87% dos pacientes com delta de cortisol total menor que 248 nmol/L (9 mcg/dL) tiveram um delta de cortisol livre menor que 110 nmol/L (4 mcg/dL). E também 87% dos pacientes com delta de cortisol total maior que 248 nmol/L excederam este limiar de 110 nmol/L de delta de cortisol livre. Por isso um aumento de cortisol livre de 110 nmol/L categorizou insuficiência suprarrenal relativa e função suprarrenal normal similarmente à resposta do cortisol total de 248 nmol/L (16).

No grupo de pacientes críticos os níveis de transcortina foram reduzidos a 48% no choque séptico e a 35% na sepse. Correspondentemente a fração de cortisol livre foi 23% no choque séptico, 7% na sepse e 3,6% nos pacientes saudáveis (16).

Beishuizen e col. (10) compararam pacientes com choque séptico, politrauma e indivíduos controle. Os níveis de transcortina estavam reduzidos na fase inicial do choque séptico e no trauma em comparação aos controles. Os níveis de transcortina aumentaram progressivamente nos dias seguintes até atingir níveis

normais no sétimo dia. Mas na análise de regressão logística não houve correlação da transcortina com a severidade da doença, duração do choque ou mortalidade. Os valores extremamente baixos de transcortina no início da doença indicaram níveis elevados de cortisol livre. Na fase seguinte ocorreu aumento e normalização da transcortina, independente de parâmetros clínicos.

Bendel e col. (76) estudaram pacientes sépticos e em choque séptico, e avaliaram o cortisol total e livre calculado. O cortisol livre apresentou boa correlação com o cortisol total. Os pacientes que evoluíram a óbito apresentavam níveis mais elevados de cortisol total e livre que os sobreviventes. Porém o cortisol livre calculado não provou ser essencial na identificação de pacientes que se beneficiaram de tratamento com corticóide.

2.3.2.3 Cortisol salivar

A mensuração do cortisol na saliva dispensa punção venosa. Diferentemente do cortisol sérico, o cortisol salivar é predominantemente, cerca de 85%, na forma livre e está estritamente relacionado ao cortisol sérico. O aumento do cortisol sérico geralmente eleva o cortisol salivar em apenas 2 a 3 minutos (32).

O amplo acesso à mensuração do cortisol salivar torna este uma alternativa interessante na estimativa do cortisol plasmático livre (67). Contudo, deve ser enfatizado que a coleta de saliva em pacientes críticos não é amplamente padronizada e as amostras são mais difíceis de serem coletadas que em pacientes ambulatoriais. Muitas situações em um cenário de cuidados intensivos, como coma ou ventilação mecânica, tornam impossível obter a colaboração do paciente para coletar a saliva. Isto torna mais difícil obter o cortisol salivar que o cortisol sérico e é mais propenso a vieses. Além disto, anemia, sangramento oral, candidíase oral, uso de clorexidina interferem com a dosagem do cortisol na saliva, limitando seu uso em pacientes críticos (32).

Níveis de cortisol salivar e sérico têm uma forte correlação, mesmo em pacientes críticos (67,68), porém mais estudos são necessários para validar os níveis de cortisol salivar no diagnóstico de insuficiência suprarrenal relativa.

Teruhisa e col. em 1981 (69) estudaram voluntários saudáveis e encontraram um coeficiente de correlação entre os níveis de cortisol salivar e cortisol sérico de 0,893 ($p < 0,001$).

Arafah e col. (67) avaliaram o valor do cortisol salivar como marcador substituto do cortisol livre em pacientes críticos e saudáveis, e os classificaram conforme o valor de albumina sérica. Os valores encontrados de cortisol salivar apresentavam boa correlação com os níveis de cortisol sérico livre em pacientes saudáveis e em pacientes críticos com valores de albumina próximo do normal. Nos pacientes críticos com albumina menor que 2,5 g/dL a relação entre o cortisol salivar e sérico livre foi logarítmica.

Raff e col. (70) estudaram o teste de cortisol salivar na avaliação da função suprarrenal em pacientes hospitalizados, com suspeita clínica de insuficiência suprarrenal, com baixas concentrações de proteínas plasmáticas. Este estudo concluiu que o cortisol salivar pode identificar pacientes hospitalizados com função suprarrenal aparentemente preservada e, em baixas concentrações de proteínas séricas, confunde a interpretação das medidas de cortisol total.

Mello e col. (71) compararam pacientes em sepse grave com pacientes em pós-operatório e pacientes saudáveis. Os pacientes com sepse grave apresentaram cortisol salivar 14 vezes mais elevado que os indivíduos saudáveis e 2,6 vezes maior que pacientes em pós-operatório. Os pacientes com cortisol salivar superior a 7,2 mg/dL apresentaram mortalidade de 80% quando comparados com os pacientes com níveis mais baixos de cortisol salivar. Esses dados sugerem que a elevação do cortisol salivar foi proporcional à severidade do estresse.

Estrada-Y-Martin e col. (72) encontraram correlação entre o cortisol salivar e sérico livre de 0,79 ($p < 0,0001$) quando estudaram pacientes com choque séptico.

2.4 HDL COLESTEROL NA SEPSE

As lipoproteínas são partículas esféricas de alto peso molecular que transportam lipídeos no plasma, suas definições são baseadas na sua densidade. Assim são divididas em 5 classes: quilomicrons, lipoproteína de muito baixa

densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (77).

As partículas de HDL tem uma densidade de 1,063 a 1,21 g/mL e seu número é 10 a 20 vezes maior que o número total de todas as outras partículas de lipoproteínas em conjunto. Uma das principais funções do HDL é o transporte de colesterol das células periféricas para a excreção hepática (77). A apolipoproteína A-1 (Apo-A1) é a principal proteína estrutural da HDL, que em associação com fosfolípidos e colesterol envolvem um núcleo de ésteres de colesterol (78).

Em sepse por microorganismos Gram negativo a resposta inflamatória é iniciada por lipopolissacarídeos (LPS, endotoxina) constituintes da membrana de bactérias. LPS também é encontrada na circulação sistêmica em sepse causada por bactérias Gram positiva e fungos. *In vitro* verificou-se que as lipoproteínas se ligam ao LPS e neutralizam seus efeitos tóxicos. Nos pacientes sépticos as concentrações de lipoproteínas são reduzidas, especialmente o HDL colesterol, e essas alterações observadas são relacionadas à severidade da infecção. A modulação do metabolismo das lipoproteínas na sepse pode influenciar a cascata de mediadores inflamatórios (77).

O receptor SR-B1 tem sido identificado como um receptor de HDL (24). A super expressão deste receptor em ratos resulta no desaparecimento potencial do HDL e LDL plasmáticos e ocorre um aumento concomitante do colesterol biliar. A deleção do gene codificador do receptor SR-B1 em ratos resulta no aumento plasmático de HDL e redução do teor de colesterol da glândula suprarrenal enquanto que a concentração plasmática de Apo-A1 mantém-se inalterada.

O receptor SR-AI/II parece ser importante na degradação da endotoxina e pode ter um papel vital na resposta imune.

Em 1926, Thannhauser e Schaber (79) relataram uma associação entre colesterol baixo e doença. Estudos subsequentes descrevem redução de lipoproteínas associada a infecções, queimaduras e câncer (80).

Em pacientes com sepse grave e choque séptico, os níveis de colesterol total e HDL reduzem rapidamente e alcançam 50% dos níveis de recuperação no terceiro dia, seguido por um aumento progressivo nos próximos 28 dias (77).

As lipoproteínas podem competir com a proteína ligante de LPS (LPSBP) pela ligação ao LPS. O LPS ligado a LPSBP ativa o CD14 em células mononucleares, que ativa a cascata inflamatória. Estudos experimentais parecem corroborar esta interação. Ratos transgênicos com elevadas concentrações de HDL ou LDL são protegidos contra endotoxemia e infecções graves por Gram negativos (81,82).

A infusão de lipoproteínas reconstituídas que contem Apo-A1 e fosfatidilcolina bloqueiam a produção de citocinas induzidas por LPS com significativa atenuação de hipotensão, acidose e leucopenia em um modelo de choque endotoxêmico em ratos (83). Uma formulação de HDL reconstituído protege ratos contra doses letais de LPS. Níveis baixos de colesterol podem predispor os doentes críticos a endotoxemia, sepse e disfunção de múltiplos órgãos (80).

A hipocolesterolemia também pode atuar em outros mecanismos. Baixos níveis de HDL podem levar à insuficiência suprarrenal em pacientes graves. Os mecanismos da insuficiência suprarrenal relativa em pacientes críticos não são bem compreendidos, mas níveis baixos de HDL podem ter um papel importante (84). Estudos experimentais sugerem que a HDL é a principal fonte de colesterol para a esteroidogênese na glândula (6).

Fernandez e col. (85) avaliaram pacientes com cirrose e choque séptico e obtiveram incidência de 68% de insuficiência suprarrenal.

Marik (84) observou que pacientes com doença hepática terminal e pacientes pós transplante hepático apresentavam uma alta incidência de insuficiência suprarrenal. Em uma revisão retrospectiva notou uma incidência de insuficiência suprarrenal em 15% dos pacientes com insuficiência hepática fulminante, 40 a 50% dos pacientes com doença hepática terminal e em aproximadamente 90% dos pacientes submetidos a transplante hepático. Como o HDL colesterol é sintetizado primariamente no fígado e tem um papel fundamental no transporte de colesterol para a glândula suprarrenal postulou-se que pacientes com insuficiência hepática e suprarrenal teriam níveis de HDL baixos. Em pacientes com insuficiência hepática os pacientes com insuficiência suprarrenal apresentavam HDL de 8 mg/dL enquanto que os pacientes com função suprarrenal preservada apresentavam HDL de 34 mg/dL ($p=0,01$).

Chien e col. (86) estudaram pacientes com sepse grave e encontraram que níveis baixos de HDL no primeiro dia da sepse grave é significativamente associada ao aumento da mortalidade. Em cultura de macrófagos o HDL pode atenuar a produção de TNF- α induzida por LPS apenas se adicionada concomitantemente, e não depois, da exposição ao LPS.

Grion e col. (9) avaliaram se a concentração de lipoproteínas na admissão hospitalar é fator de risco para desenvolvimento de sepse grave durante a internação. Comparando-se os pacientes que desenvolveram sepse grave durante a internação com os pacientes que não desenvolveram, os resultados encontrados demonstraram que o HDL colesterol foi significativamente menor nos pacientes que desenvolveram sepse grave. Colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos não apresentaram diferença significativa entre os grupos. O estudo também descreveu que para cada aumento em 1 mg/dL do HDL-colesterol ocorreu uma redução de 3% no risco de desenvolver sepse grave durante a internação. Nos pacientes que desenvolveram sepse grave os níveis de HDL colesterol eram baixos no primeiro dia de sepse, tanto nos sobreviventes como não sobreviventes, e apenas os sobreviventes mostraram uma tendência de aumento das concentrações de HDL.

No estudo de van der Voort e col. (7) foram analisados pacientes graves internados na unidade de terapia intensiva com disfunção de múltiplos órgãos e quadro clínico sugestivo de insuficiência suprarrenal. Realizou-se teste com ACTH sintético para definir os pacientes respondedores e não respondedores. Comparando-se esses grupos observou-se que os níveis de HDL colesterol eram significativamente maiores no pacientes respondedores que nos não respondedores. Isso não foi observado com o colesterol total, LDL colesterol e triglicerídeos. Em condições normais o LDL tem importante papel na síntese do cortisol pela glândula suprarrenal, mas em situações em que os níveis de LDL colesterol estão baixos a produção de cortisol não é alterada. Provavelmente nestas condições o HDL colesterol é utilizado na síntese do cortisol. Nos pacientes críticos os níveis de HDL colesterol pareciam ser mais importantes que os níveis de LDL colesterol na regulação da síntese de cortisol. E conclui-se ainda que níveis baixos de HDL colesterol podem ser determinantes da insuficiência suprarrenal em pacientes críticos.

Considerando que no estudo de van der Voort e col. (7) foram incluídos pacientes críticos com quadro sugestivo de insuficiência suprarrenal, que a grande parte dos pacientes apresentavam quadro infeccioso, que o HDL colesterol pode ser determinante de insuficiência suprarrenal e os achados de Grion e col. em que os baixos níveis de HDL colesterol aumentaram a mortalidade, postulou-se que o HDL-colesterol pode ser um fator preditor de insuficiência suprarrenal em pacientes com choque séptico.

3 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar o ACTH, o cortisol salivar, o cortisol plasmático livre estimado e as lipoproteínas, sobretudo o HDL colesterol, como preditores de insuficiência suprarrenal em pacientes com choque séptico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo observacional prospectivo, que incluiu pacientes com diagnóstico de choque séptico.

4.2 POPULAÇÃO

A população do presente estudo foi constituída de todos os pacientes hospitalizados com o diagnóstico de choque séptico.

4.3 AMOSTRA

A amostra foi não probabilística, de conveniência, constituída de todos os pacientes internados no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina (HURNP-UEL), no período de agosto de 2010 a março de 2011, com diagnóstico de choque séptico.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

O estudo incluiu pacientes internados no HURNP-UEL no período de agosto de 2010 a março de 2011, maiores de 18 anos, com diagnóstico de choque séptico e tempo decorrido após a introdução de drogas vasoativas menor que 24 horas. Fez-se necessário a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os pacientes com diagnóstico de choque séptico que apresentassem:

- 1 - uso de drogas vasoativas há mais de 24 horas;
- 2 - uso de corticosteróides nos últimos 30 dias que precederam o choque séptico;

- 3 - uso de propofol durante a internação hospitalar;
- 4 - uso de etomidato nas 24 horas que precederam o choque séptico;
- 5 - pacientes em nutrição parenteral contendo lipídeos;
- 6 - pacientes com antecedente de doença de suprarrenal;
- 7 - gravidez;
- 8 - portadores do vírus HIV;
- 9 - pacientes em eminente risco de morte;
- 10 - ausência do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6 COLETA DE DADOS

O diagnóstico de choque séptico foi realizado de acordo com a definição da *Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* de 1992, que estabelece a necessidade da presença de foco infeccioso com dois ou mais sinais de resposta inflamatória sistêmica e associado à hipotensão arterial com necessidade de uso de vasopressores (42).

Ao diagnóstico de choque séptico foram coletados dados de identificação, internação hospitalar, data e horário do choque séptico, dados do foco e fonte de infecção, antibioticoterapia utilizada, vasopressores em uso e sua dosagem no horário da coleta das amostras laboratoriais. História pregressa, sinais clínicos e resultados de exames laboratoriais foram anotados para o cálculo do escore de gravidade APACHE II (87) e do escore de disfunção orgânico SOFA (88).

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa, em tubos contendo gel separador, durante as primeiras 24 horas do choque séptico e com o paciente em jejum de 12 horas. Após centrifugação, o soro foi condicionado a -80° C para posterior dosagem de cortisol basal total, transcortina, albumina, colesterol total, HDL colesterol e triglicérides. Para a dosagem do ACTH foi coletada amostra em tubo contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA 0,1%), mantido no gelo, e procedido à obtenção do plasma em centrífuga refrigerada. Este foi então condicionado a -80° C até a realização do ensaio.

Amostras de saliva foram obtidas através do dispositivo de coleta Salivette® (Sarstedt®, Austrália) com imersão do algodão na cavidade oral durante

dez minutos, após limpeza da mesma com água. Os salivetes foram centrifugados e posteriormente condicionados a -80°C até a dosagem do cortisol salivar.

Após a coleta basal, foi realizado o teste de estímulo com a administração intravenosa de 250 mcg de tetracosactídeo - Synacthène® (Novartis Pharma, França). O horário da administração foi rigorosamente anotado e cronometrado. Após 60 minutos foi realizada nova coleta de sangue venoso e saliva, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, para as dosagens de cortisol sérico e cortisol salivar.

As dosagens de cortisol sérico, ACTH e cortisol salivar foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos métodos de quimioluminescência (IMMULITE® 2000 Immunoassay System - Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, EUA) e imunoenzimático competitivo colorimétrico (ELISA - DiaMetra®, Milão, Itália) respectivamente. Neste último, o antígeno cortisol na amostra de saliva compete com peroxidase-cortisol (enzima-antígeno) para ligar-se em um número limitado de anti-cortisol (anticorpos) na microplaca (fase sólida). Após a incubação, uma separação entre a fração ligada e livre foi realizada por uma simples lavagem da fase sólida. O substrato enzimático (H_2O_2) e o substrato tetrametil-benzidina (TMB) são adicionados. No tempo adequado ocorre o desenvolvimento de cor máxima, a reação enzimática é interrompida e as absorbâncias são determinadas. A concentração de cortisol na amostra é calculada baseada em um conjunto de padrões e a intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de cortisol na amostra. As dosagens de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos foram determinadas por método enzimático em analisador automático Dimension® RxLMax® (Dade Behring, Newark, NJ, USA).

A albumina foi dosada pelo método colorimétrico do Verde de Bromocresol no analisador automático Dimension® RxLMax® (Dade Behring, Newark, NJ, USA). A albumina da amostra é detectada devido ao fenômeno denominado “erro protéico dos indicadores” que ocasiona uma mudança na cor de determinados indicadores, na presença de albumina, em meio tamponado. O Verde de Bromocresol reage com a albumina, formando um complexo corado de cor verde,

que é medido, fotometricamente. A concentração de albumina na amostra é diretamente proporcional à formação de cor na reação.

Para a dosagem de transcortina, as amostras de plasma foram analisadas em microplacas pré-revestidas com anticorpo monoclonal específico para transcortina humana, a partir do Kit de ELISA (Uscn Life Science Inc., Wuhan, P.R. China) no leitor de microplaca Expert plus (Asys).

Para as amostras que tiveram resultado de triglicérides menor que 400 mg/dL o LDL-colesterol foi estimado pela fórmula de Friedewald (89):

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterol Total} - \text{HDL-C} - (\text{Triglicérides}/5)$$

O cortisol livre basal e após estímulo com ACTH sintético foi calculado através da equação de Coolens (73):

$$U^2 \cdot K (1+N) + U [1 + N + K (G - T)] - T=0$$

na qual U, T e G correspondem respectivamente à concentração molar de cortisol livre, cortisol total e transcortina. A constante K é a afinidade da transcortina com o cortisol a 37°C e tem o valor de $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Para N foi atribuído valor constante de 1,74 e é proporcional à concentração de albumina. Para o cortisol total e livre 1mg/ml corresponde a 2,76 nmol/L e para a transcortina 1µg/ml corresponde a 19,23 nmol/L.

Para o cálculo do cortisol livre basal foi atribuído na fórmula o valor do cortisol total basal. Para o cálculo do cortisol livre após estímulo com ACTH (cortisol livre 60 min) foi atribuído na fórmula o valor do cortisol total após estímulo com ACTH.

O valor do delta de cortisol total, livre e salivar foi calculado pela diferença entre o valor do cortisol obtido após estímulo com ACTH sintético e o cortisol basal.

Para as análises dos dados, os pacientes foram divididos em dois grupos:

- 1 – respondedores: aqueles que apresentaram o valor do delta de cortisol total maior ou igual a 9 mcg/dL após o teste de estímulo com 250 mcg de ACTH sintético.
- 2 – não respondedores, aqueles no qual o delta foi menor do que 9 mcg/dL após o teste de estímulo com 250 mcg de ACTH sintético. Este último grupo recebeu o diagnóstico de insuficiência suprarrenal.

Os pacientes foram acompanhados até seu desfecho: óbito ou alta hospitalar.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HURNP, sob o número 0012.0.268.000-09.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo do tamanho da amostra do estudo considerou-se os valores encontrados de colesterol em HDL (média e desvio-padrão), por van der Voort e col. (8) e Grion e col. (10). Utilizou-se comparação de duas médias, com diferença a ser detectada de redução de 50% nos valores de colesterol em HDL entre os pacientes respondedores e não respondedores. Com desvio padrão de 14.59, nível de significância de 5% e poder do teste de 90%, o tamanho da amostra estimado foi de 28 pacientes, 14 pacientes para cada grupo (respondedores e não respondedores).

As análises foram realizadas no programa SPSS 15.0 statistics. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

Para verificar a normalidade de distribuição das variáveis foram realizados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. E como teste de homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste de Levene. A análise de resíduos foi realizada para identificar a existência de valores discrepantes.

Para as variáveis contínuas com distribuição gaussiana, os valores foram expressos em médias com desvio-padrão. A comparação dos grupos de amostras independentes foi realizada pelo teste t de Student.

Para as variáveis contínuas que não apresentavam distribuição gaussiana, os valores foram expressos em mediana e intervalos interquartis; e a comparação dos grupos pelos testes não-paramétrico de Mann-Whitney e Wilcoxon, para amostras independentes.

As correlações de variáveis não gaussianas foram analisadas pelo teste de Spearman. Os valores extremos do coeficiente de correlação ($r = -1$ e $r = 1$) indicaram uma associação perfeita.

Para o cálculo do ponto de corte de ACTH entre os pacientes respondedores e não respondedores construímos uma curva de *Receiver Operating*

Characteristic (ROC). Foram também construídas curvas ROC para o cortisol total e livre, e seus respectivos pontos de corte para os pacientes respondedores e não respondedores.

ARTIGO

ACTH, LIPOPROTEINS AND SALIVARY CORTISOL AS MARKERS OF ADRENAL INSUFFICIENCY IN PATIENTS WITH SEPTIC SHOCK

Josiane Festti, Alexandre José Faria Carrilho.

ABSTRACT

Severe sepsis and septic shock are major causes of mortality in ICU. Many patients develop septic shock with adrenal insufficiency, a difficult diagnosis to be determined. The testing with synthetic ACTH is not indicated routinely, due to high costs and poor practicality. HDL cholesterol is a precursor in the biosynthesis of cortisol and studies have shown that low levels of HDL cholesterol are associated with increased mortality in sepsis. This study aims to assess whether HDL cholesterol, ACTH and salivary cortisol are predictors of adrenal insufficiency in septic shock. The synthetic ACTH test was performed on 34 patients within 24 hours from septic shock to determine the responders and non-responders patients. The values of total, free and salivary cortisol, HDL cholesterol and ACTH were compared between groups. There was no significant difference in HDL cholesterol in patients responders and non-responders ($p = 0.418$). HDL cholesterol was not a predictor of adrenal insufficiency in septic shock.

The relative adrenal insufficiency is suggested to describe those patients without previous adrenal dysfunction who, during critical illness, had inadequate cortisol level for the severity of the disease (1). The prevalence of adrenal insufficiency in critically ill patients is variable and dependent on the primary disease and its severity. This prevalence ranges from 0 to 70% depending on the population studied and the definition criteria used (2,3,4,5). The prevalence in critically ill patients is approximately 30%, increasing to 50-60% in patients with septic shock (6).

Adrenal insufficiency in critically ill patients has been greatly studied in recent decades (2), however, accurate diagnosis and therapeutic intervention remain controversial. In septic patients, the treatment of adrenal insufficiency with corticosteroids should be instituted in the first 24 hours, so a delay in diagnosis and treatment may contribute to an unfavorable outcome.

Around 90% of cortisol is bound to the corticosteroid-binding globulin (CBG). During the acute phase response occurs an abrupt decrease in the concentration of CBG and a reduced affinity for cortisol CBG, resulting in increasing free fraction in plasma. Simultaneously, there is a reduction of cellular receptors for cortisol, resulting in tissue resistance (7). These data suggest that plasma cortisol is not an adequate assessment of its tissue activity, however, there is not a methodology to assess the hormone action in various tissues. For this reason, the measurement of plasma cortisol after stimulation test with synthetic ACTH remains the "gold standard" for diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis. This diagnostic test is the most studied and showed the highest accuracy for morbidity and mortality. Nevertheless, the stimulation test with synthetic ACTH is not recommended for routine use because of practicability and delay in results (8) and the decision on whether or not to replace glucocorticoids in septic shock should be independent of the result (1).

Several studies have described other markers for adrenal insufficiency in sepsis. The salivary cortisol is 85% in its free form and is closely related to plasma free cortisol. Some authors have reported the salivary cortisol as an alternative to diagnose adrenal insufficiency in critically ill patients (9,10,11,12).

Van der Voort et al. (13) analyzed critically ill patients in intensive care unit and observed that the levels of HDL cholesterol were significantly higher in patients responders to synthetic ACTH test. This was not observed with total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides. In normal conditions LDL plays an important role in the synthesis of cortisol by the adrenal gland, but in situations in which the levels of LDL cholesterol are lower cortisol production is not changed. Probably in these conditions HDL cholesterol is used in the synthesis of cortisol. Marik et al. (14) demonstrated the association between low HDL levels on admission and adrenal insufficiency in patients with liver failure in the ICU.

Adrenal insufficiency is common in critically ill patients and the replacement therapy with low corticosteroids doses is beneficial in some patients, however the diagnosis of this condition remains controversial. The objective of this study was to evaluate the ACTH, salivary cortisol, estimated free plasma cortisol and lipoproteins,

especially HDL cholesterol, as predictors of adrenal insufficiency in patients with septic shock.

Materials and Methods:

Prospective observational study that included all patients admitted to the University Hospital of Northern Paraná, Universidade Estadual de Londrina (UEL-HURNP), from August 2010 to March 2011, with septic shock, over 18 years and with the signing of the free and informed consent. Exclusion criteria were patients with septic shock who used: vasoactive drugs for more than 24 hours, corticosteroids in the last 30 days preceding the septic shock, propofol during hospitalization, etomidate in 24 hours preceding the septic shock, patients on parenteral nutrition containing lipids, patients with a history of adrenal disease, pregnancy, carriers of the HIV virus, patients in imminent risk of death and absence of the term of free and informed consent.

Data Collection

The diagnosis of septic shock was defined according the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine criteria (1992) (15). When septic shock was identified, data were collected for identification, hospitalization, date and time of septic shock, given the focus of infection, antibiotic used, vasopressors in use and the dosage at the time of sampling laboratory. Data were recorded for the calculation of APACHE II (16) and SOFA score (17).

Blood samples were collected during the first 24 hours from septic shock and the patient fasted for 12 hours, for the measurements of ACTH, total cortisol, transcortin, albumin, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides. Saliva samples were obtained from Salivette® collection device (Sarstedt®, Australia) for salivary cortisol measurement.

After collecting baseline blood samples and saliva, the test for stimulation with intravenous administration of 250 mcg tetracosactídio - Synacthène® (Novartis Pharma, France) was performed. The timing of administration was carefully noted

and timed. After 60 minutes we have made new collection of blood and saliva for assay of serum cortisol and salivary cortisol after ACTH synthetic stimulation test.

The measurement of serum cortisol and ACTH were measured by chemiluminescence methods (IMMULITE® 2000 Immunoassay System - Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA). The salivary cortisol was performed by competitive enzyme immunoassay colorimetric method (ELISA - DiaMetra®, Milan, Italy). The total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic colorimetric method and albumin by the Bromocresol Green, performed on an automated analyzer Dimension RxLMax® (Dade Behring, Newark, NJ, USA). For the determination of transcortin, we used the ELISA kit (Uscn Life Science Inc., Wuhan, PRChina) by reading the microplate reader Expert Plus (ASYS).

Samples of triglycerides showed results less than 400 mg/dL, and LDL-cholesterol was calculated by the Friedewald formula (89), in which:

$$\text{LDL-C} = \text{Total cholesterol} - \text{HDL-C} - (\text{Triglycerides} / 5).$$

The free cortisol baseline and after stimulation with synthetic ACTH was calculated using the Coolens equation(73):

$$U^2 \cdot K (1 + N) + U [1 + N + K (G - T)] - T = 0$$

in which U, T and G correspond to the molar concentration of free cortisol, total cortisol and transcortin. The constant K is the affinity of transcortin with cortisol to 37°C and has a value of $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. N is assigned to the constant value of 1.74 and is proportional to the concentration of albumin. For total and free cortisol 1mg/ml corresponding to 2.76 nmol/L and for transcortin 1µg/ml corresponds to 19.23 nmol/L. For the calculation of baseline free cortisol was given the formula the value of baseline total cortisol. For the calculation of free cortisol after ACTH stimulation was given in the formula the value of total cortisol after ACTH stimulation.

The values of delta of total, free and salivary cortisol was calculated by the difference between the value of cortisol obtained after stimulation with synthetic ACTH and cortisol baseline, for each.

For data analysis, patients were divided into two groups. The responding patients were those showing the value of total cortisol delta greater than or equal to 9 mcg/dL after stimulation test with 250 mcg of synthetic ACTH. The non-responders were those patients in which the delta was less than 9 mcg/dL after stimulation test with 250 mcg of synthetic ACTH. The latter group received the diagnosis of adrenal insufficiency.

It was noted use of corticosteroids, prescribed by the doctor treating the patient, within 24 hours from the shock for treating adrenal insufficiency. Patients were followed until outcome: death or hospital discharge. The study protocol was approved by the ethics committee.

Statistical Analysis

To calculate the sample size of the study we considered the values found in HDL cholesterol (mean and standard deviation), by van der Voort et al. (14) and Grion et al. (18). Used to compare two means, with a difference being detected reduction of 50% in HDL cholesterol levels between patients responders and nonresponders. Standard deviation of 14.59, significance level of 5% and a power of 90%, the estimated sample size was 28 patients, 14 patients for each group (responders and nonresponders).

Analyses were performed using SPSS 15.0 statistics. A p value <0.05 was considered significant. To check the normality of variables distribution were performed Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. And as a test of homogeneity of variance was used Levene's test. For continuous variables with Gaussian distribution, values were expressed as means with standard deviation. The comparison of groups of independent samples was performed by Student's t test. For continuous variables that did not have a Gaussian distribution, values were expressed as median and interquartile range, and the comparison of groups by non-parametric Mann-Whitney and Wilcoxon tests for independent samples.

The correlations of non-Gaussian variables were analyzed by Spearman test. The extreme values of the correlation coefficient ($r=-1$, $r=1$) showed a perfect association. To calculate the cutoff of ACTH, total cortisol and free cortisol in patients

responders and nonresponders were constructed Receiver Operating Characteristic curves (ROC).

Results

From August 2010 to March 2011, 7324 patients were admitted to the HURNP-UEL. The sample of patients diagnosed with septic shock was 93 patients, of whom 35 were included in the study. One patient was subsequently excluded because values had suppressed ACTH and cortisol, consistent with previous administration of glucocorticoids. Thus, 34 patients were enrolled. The 58 patients with septic shock who did not enter on the study were excluded because: 23 had used corticosteroids within 30 days prior to diagnosis, 11 were admitted to hospital in septic shock for more than 24 hours, 8 did not show the signature of term of informed consent (six refused and two whose relatives were not located), 4 have made use of propofol, 3 patients received etomidate, two were using parenteral nutrition, 5 have HIV positive, one patient was pregnant and two have imminent risk of death.(Figure1)

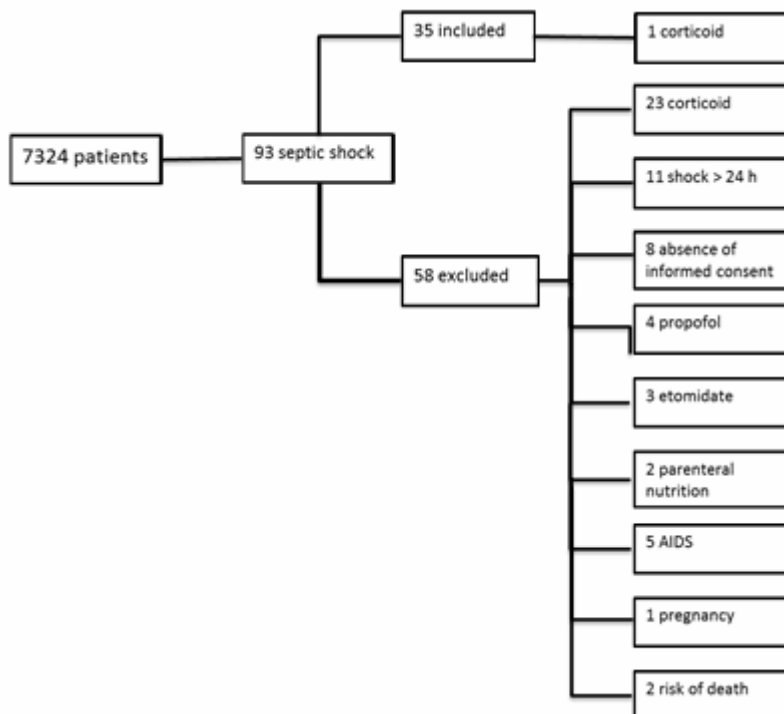


Figure 1 - Fluxogram of patients.

Of the 34 patients studied, 20 were male (58.8%) and 14 females (41.2%). Mean age, APACHE II and SOFA score were 68.12 ± 16.28 years, 27.53 ± 8.71 and 12.5 ± 2.91 , respectively.

Regarding the focus of infection, 20 patients had pneumonia, 3 had urinary tract infection, 4 had association of the pulmonary and urinary, 3 had skin and tissue infection, 2 had endocarditis, and two had abdominal focus (Figure 2).

The hospitalization was on average 35.76 ± 36.68 days, ranging from 1 to 140 days. Considering the outcome, seven patients were discharged (20.6%) and 27 died (79.4%).

The 34 patients were divided into two groups: seven (20.6%) had a diagnosis of adrenal insufficiency (nonresponders) and 27 (79.4%) had preserved adrenal function. In these groups were compared the following variables: age, ACTH, HDL cholesterol, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, total cortisol, free cortisol, salivary cortisol, total cortisol after ACTH, free cortisol after ACTH, salivary cortisol after ACTH, delta total cortisol, delta free cortisol, delta salivary cortisol, CBG, albumin, APACHE II, SOFA and vasoactive drug dosage.

When analyzing the correlations, HDL cholesterol, the main object of this study, did not correlate with any other variables. ACTH was negatively correlated with the delta of free cortisol and lower correlation coefficients for the other variables. As expected, there was strong correlation between total cortisol and free cortisol ($r=0.952$, $p<0.001$), and between delta free cortisol and delta total cortisol ($r=0.942$, $p<0.001$). The salivary cortisol showed moderate correlation with total cortisol ($r=0.607$, $p<0.001$) and with free cortisol ($r=0.653$, $p<0.001$). The rate of SOFA score correlated with the APACHE II ($r=0.753$, $p<0.001$).

Mortality was 85% for patients with adrenal insufficiency and 77% for patients with preserved adrenal function. At the discretion of the attending physician, 8 of 34 patients received corticosteroids in low doses for the treatment of septic shock. Of the eight patients, three were non-responders to the test with synthetic ACTH. All patients who received corticosteroid replacement in the initial hours of shock died.

Due to technical difficulty to collect the saliva in patients in shock, with a small amount of saliva and sometimes blood in the oral cavity, some laboratory tests were not performed by insufficient material (three analyzes of salivary cortisol baseline and six analyzes of salivary cortisol after stimulation ACTH).

Discussion

Severe sepsis and septic shock are among the leading causes of mortality in ICU and also generate high costs. Many patients with septic shock develop adrenal insufficiency, which must be treated in the initial hours of shock (19). However, the adrenal insufficiency in septic shock is still a difficult diagnosis to be determined. The test with synthetic ACTH is considered the gold standard, but its realization is not indicated in routine due to its technical difficulty, high cost and time spent waiting for the result. Therefore, we hypothesized if HDL cholesterol levels were predictor of adrenal insufficiency in septic shock. Considering the low cost of determination, easy implementation and immediate result, it could be a great tool to help physicians in the decision to indicate or not glucocorticoid replacement in septic shock.

Many recent studies suggest that HDL cholesterol may be a predictor of adrenal insufficiency in this condition (13,20). This hypothesis has been tested due to the fact that cortisol is not a hormone stored in the gland to be readily released during stress. Under this condition, the adrenal is requested to increase their synthesis, however, obtaining cholesterol, raw material for the synthesis of steroids, can only result from the intracellular synthesis from acetylcoenzima A or by uptake of lipoproteins, especially HDL. Studies in mice suggest that HDL is the major source of cholesterol to the adrenal (21).

Van der Voort et al. (13) to analyze critically ill patients in ICU with a clinical diagnosis suggestive of adrenal insufficiency, found that patients do not respond to the synthetic ACTH test showed levels of HDL cholesterol lower than the responders ($p = 0.02$) and most patients in the study had a focus of infection or sepsis. In another study, Marik et al. (20) evaluating individuals with liver failure, found values of HDL cholesterol significantly lower in patients who developed adrenal insufficiency (8mg/dL) than in those with preserved adrenal function (34 mg/dL), $p = 0,01$.

In our study, however, when analyzing patients responders and nonresponders to the synthetic ACTH test, we found no significant difference between the levels of HDL cholesterol. Based on these results we conclude that HDL cholesterol was not a predictor of adrenal insufficiency in septic shock.

Different from the plasma cortisol, approximately 85% of salivary cortisol is in free form and is closely related to plasma cortisol. Easy access to the determination of salivary cortisol makes it a great tool in estimating the free fraction of plasma, configured as an alternative to the methodological difficulty in direct measurement of free cortisol (9). Levels of salivary and plasma cortisol have a strong correlation, even in hospitalized and critically ill patients (9,10,12). In our study, salivary cortisol showed moderate correlation with total cortisol ($r=0.607$, $p<0.001$) and free cortisol ($r=0.653$, $p<0.001$). However, it should be emphasized that the collection of saliva in critically ill patients is not widely standardized, and the samples are more difficult to collect than in ambulatory patients. Many situations in intensive care setting, such as coma or mechanical ventilation, makes it impossible to obtain the cooperation of the patient to collect saliva. Other conditions such as anemia, oral bleeding and use of chlorhexidine interfere with the measurement of cortisol in saliva, limiting this use in critically ill patients (1). In our study, the principal technical difficulty encountered was the small amount of saliva present in the oral cavity, as the patients with septic shock present frequently with depletion and have dry mucous. Another difficulty was the presence of blood in the oral cavity due to the fragility of blood capillaries in sepsis. Therefore, in some patients it was not possible to determine the values of salivary cortisol. Based on our results, although we found a correlation between salivary cortisol and basal cortisol levels and between salivary cortisol and free cortisol levels, due to technical difficulties in collection of saliva, it is possible to conclude that measurement of salivary cortisol is not the appropriate method for diagnosing adrenal insufficiency in septic shock.

In the analyzes performed in our study we found correlations between the levels of free cortisol and total cortisol ($r=0.952$, $p<0.001$), and between delta free cortisol and delta total cortisol ($r=0.942$, $p<0.001$). These correlations were also found by other authors. Molenaar et al. (22) reported that total and free cortisol and

their elevations were well correlated ($r=0.77$, $r=-0.79$, $p < 0.001$). In Bendel et al. (23) free cortisol showed a good correlation with total cortisol ($r = 0.90$, $p < 0.001$).

The prevalence of adrenal insufficiency found in our results was 20.6%. This value was lower than those observed in other studies. In the study Corticosteroid Therapy of Septic Shock (CORTICUS) (24) the prevalence was 46.7% and at Annane et al. (25) was 76.5%. This analysis of our study may have a very different result from other authors because of the small number of patients in the sample.

With regard to mortality, levels of HDL cholesterol were lower among patients who died, but this difference was not significant. Other authors found that low levels of HDL cholesterol are correlated with mortality (18,26). Probably our results showed no significant difference due to sample size.

The mortality in our study was 79.4%. Kauss et al. (27) reported a mortality of 72.7% in patients with septic shock. The values of APACHE II and SOFA score showed to be quite high, mean of 27.53 and 12.5 respectively. And the mortality was significantly associated with the dose of vasoactive drugs (alive= 0.14 mcg/dL; death= 0.33 mcg/dL, $p = 0.013$). As the mean age was high, 68 years, the shock may have a cardiogenic component, which explains the correlation of vasoactive drugs with mortality no correlation of vasoactive drugs with HDL or with adrenal insufficiency.

Thus, the search for a marker to adrenal insufficiency in septic shock HDL was shown to be not a predictor.

References:

- 1 MORAES, R. B.; CZEPIELEWSKI, M. A.; FRIEDMAN, G.; BORBA, E. L. de Diagnosis of adrenal failure in critically ill patients. **Arq. Bras. Endocrinol Metab**, v. 55, n. 5, p. 295-302, 2011.
- 2 MARIK, P. E.; ZALOGA, G. P. Adrenal insufficiency in the critically ill. A new look at an old problem. **Chest**, v. 22, p. 1784-1796, 2002.
- 3 RIVERS, E. P.; GASPARI, M.; ABI SAAD, G.; et al. Adrenal insufficiency in high-risk surgical ICU patients. **Chest**, v. 119, p. 889-896, 2001.
- 4 RYDVALL, A.; BRANDSTROM, A. K.; BANGA, R.; et al. Plasma cortisol is often decreased in patients in an intensive care unit. **Intensive Care Med**, v. 26, p. 545-551, 2000.

- 5 BRIEGEL, J.; SCHEELLING, G.; HALLER, M.; et al. A comparison of the adrenocortical response during septic shock and after complete recovery. **Intensive Care Med**, v. 22, p. 894-899, 1996.
- 6 ZALOGA G. P.; MARIK, P. E. Hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency. **Crit Care Clin**, v. 17, p. 25-42, 2001.
- 7 BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G.; VERMES, I. Patterns of corticosteroid-binding globulin and free cortisol index during septic shock and multi-trauma. **Intensive Care Med**, v. 27, p. 1584-1591, 2001.
- 8 MARIK, P.; PASTORES, S. M.; ANNANE, D.; MEDURI, G. U.; et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroidinsufficiency in critically ill adult patients: Consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. **Crit Care Med**, v. 36, n. 6, p. 1937-1949, 2008.
- 9 ARAFAH, B. M.; NISHIYAMA, F. J.; TLAYGEH, H.; HEJAL, R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. **JCEM**, v. 92, n. 8, p. 2965-71, 2007.
- 10 RAFF, H.; BROCK, S.; FINDILING, J. W. Cosyntropin-stimulated salivary cortisol in hospitalized patients with hypoproteinemia. **Endocrine**, v. 34, n. 1-3, p. 68-74, 2008.
- 11 MELLO, R. C. V. DE; SAD, E. F.; ANDRADE, B. C.; et al. Serum and salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency and as a predictor of the outcome in patients with severe sepsis. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 7, p. 455-459, 2011.
- 12 ESTRADA-Y-MARTIN, R. M.; ORLANDER, P. R. Salivary Cortisol Can Replace Free Serum Cortisol Measurements in Patients With Septic Shock. **CHEST**, v. 140, n. 5, p. 1216-1222, 2011.
- 13 Van Der VOORT, P. H. J.; GERRITSEN, R. T.; BAKKER, A. J.; et al. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen ill patients. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 2199-2203, 2003.
- 14 MARIK, P. E.; GAYOWSKI, T.; STARZI, T. E.; et al. The hepatoadrenal syndrome: A common yet unrecognized clinical condition. **Crit Care Med**, v. 33, p. 1254-1259, 2005.
- 15 Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, v. 20, p. 864-74, 1992.
- 16 KNAUS, W. A.; DRAPER, E. A.; WAGNER, D. P.; ZIMMERMAN, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med**, v. 13, p. 818-29, 1985.
- 17 VINCENT, J. L.; MENDONÇA, A.; CANTRAINED, F.; MORENO, R.; TAKALA, J.; SUTER, P. M.; et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med**, v. 26, p. 1793-800, 1998.

- 18 GRION, C. M. C.; CARDOSO, L. T. Q.; PERAZOLO, T. F.; GARCIA, A. S.; BARBOSA, D. S.; MORIMOTO, H. K.; MATSUO, T.; CARRILHO, A. J. F. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. **Eur J Clin Invest**, v. 40, n. 4, p. 330-338, 2010.
- 19 PARK, H.Y.; SUH, G.Y.; SONG, J.U. Early initiation of low-dose corticosteroid therapy in the management of septic shock: a retrospective observational study. **Crit Care**, vol 16, p.2-12, 2012.
- 20 MARIK, P. E. Adrenal insufficiency: the link between low Apolipoprotein A-1 levels and poor outcome in the critically ill? **Crit Care Med**, v. 32, p. 1977-8, 2004.
- 21 CAI, L.; JI, A.; DE BEER, F. C.; et al. SR-B1 protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. **J Clin Invest**, v. 118, p. 364-375, 2008.
- 22 MOLENAAR, N.; GROENEVELD, A. B. J.; DIJSTELBLOEM, H. M.; et al. Assessing adrenal insufficiency of corticosteroid secretion using free versus total cortisol levels in critical illness. **Intensive Care Med**, 2011. doi:10.1007/s00134-011-2342-x
- 23 BENDEL, S.; KARLSSON, S.; PETTILA, V.; et al. Free Cortisol in Sepsis and Septic Shock. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1813-9, 2008.
- 24 SPRUNG, C. L.; ANNANE, D.; KEH, D.; et al. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock. **N Engl J Med**, v. 358, n. 2, p. 111-24, 2008.
- 25 ANNANE, D.; SEBILLE, V.; CHARPENTIER, C.; et al. Effect of treatment with low doses of hidrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. **JAMA**, v. 288, n.7, p. 862-871, 2002.
- 26 CHIEN, J. Y.; JERNG, J. S.; YU, C. J.; YANG, P. C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 33, n. 8, p. 1688-1693, 2005.
- 27 KAUSS, I.A.M.; GRION, C.M.C.; CARDOSO, L.T.Q.; et al. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **Braz J Infect Dis**, vol 14, p.264-270, 2010.

5 CONCLUSÃO

Concluimos que os valores das lipoproteínas, em especial o HDL colesterol, não se correlacionaram com a disfunção suprarrenal e ainda que o cortisol salivar, bem como, o cortisol livre plasmático estimado não se mostraram superiores ao cortisol plasmático total na avaliação da reserva funcional suprarrenal no choque séptico.

REFERÊNCIAS

- 1 MARIK, P. E.; ZALOGA, G. P. Adrenal insufficiency in the critically ill. A new look at an old problem. **Chest**, v. 22, p. 1784-1796, 2002.
- 2 ANNANE, D.; SEBILLE, V.; CHARPENTIER, C.; et al. Effect of treatment with low doses of hidro cortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. **JAMA**, v. 288, n.7, p. 862-871, 2002.
- 3 DARLINGTON, D. N.; CHEW, G., HA, T., et al. Corticosterone, but not glucose, treatment enables fasted adrenalectomized rats to survive moderate hemorrhage. **Endocrinology**, v. 127, p. 766-772, 1990.
- 4 ZALOGA G. P.; MARIK, P. E. Hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency. **Crit Care Clin**, v. 17, p. 25-42, 2001.
- 5 LAMBERTS, S. W. J.; BRUINING, H. A.; DE JONG, F. H. Corticosteroid therapy in severe illness. **N Engl J Med**, v. 337, p. 1285-1292, 1997.
- 6 YAGUCHI, H.; TSUTSUMI, K.; SHIMONO, K.; et al. Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. **Life Sci**, v. 62, p. 1387-1395, 1998.
- 7 Van Der VOORT, P. H. J.; GERRITSEN, R. T.; BAKKER, A. J.; et al. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen ill patients. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 2199-2203, 2003.
- 8 MARIK, P. E.; GAYOWSKI, T.; STARZI, T. E.; et al. The hepatoadrenal syndrome: A common yet unrecognized clinical condition. **Crit Care Med**, v. 33, p. 1254-1259, 2005.
- 9 GRION, C. M. C.; CARDOSO, L. T. Q.; PERAZOLO, T. F.; GARCIA, A. S.; BARBOSA, D. S.; MORIMOTO, H. K.; MATSUO, T.; CARRILHO, A. J. F. Lipoproteins and CETP levels as risk factors for severe sepsis in hospitalized patients. **Eur J Clin Invest**, v. 40, n. 4, p. 330-338, 2010.
- 10 BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G.; VERMES, I. Patterns of corticosteroid-binding globulin and free cortisol index during septic shock and multi-trauma. **Intensive Care Med**, v. 27, p. 1584-1591, 2001.
- 11 GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Edição. Guanabara Koogan, 2006.
- 12 PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K.; Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 885-909, 1992.
- 13 ORLOWSKI, J.; LINGREL, J. B. Thyroid and glucocorticoid hormones regulate the expression of multiple Na, K-ATPase genes in cultured neonatal rat cardiac myocytes. **J. Biol Chem**, v. 265, p. 3462-3470, 1990.
- 14 DUNN, J. F.; NISULA, B. C.; RODBARD, D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and

- corticosteroid-binding globulin in human plasma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 53, p. 58-68, 1981.
- 15 MUELLER, U. W.; POTTER, J. M. Binding of cortisol to human albumin and serum: the effect of protein concentration. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, p. 727-733, 1981.
- 16 HO, J. T.; AL-MUSALHI, H.; CHAPMAN, M. J.; et al. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 1, p. 105-114, 2006.
- 17 DIMOPOULOU, I.; ALEVIZOPOULOU, P.; DAFNI, U.; et al. Pituitary-adrenal response to human corticotropin-releasing hormone in critically ill patients. **Intensive Care Med**, v. 33, p. 454-459, 2007.
- 18 ARLT, W.; STEWART, P.M. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 34, p. 293-313, 2005.
- 19 BORKOWSKI, A. J.; LEVIN, S.; DELCROIX, C.; et al. Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. **J Clin Invest**, v. 46, p. 797-811, 1967.
- 20 ACTON, S.; RIGOTTI, A.; LANDSCHULTZ, K. T.; et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science**, v. 271, p. 518-520, 1996.
- 21 CALCO, D.; GOMEZ-CORONADO, D.; LASUNCION, M. A.; et al. CLA-I is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, p. 2341-2349, 1997.
- 22 De La LLERA-MOYA, M.; CONNELLY, M. A.; DRAZUL, D.; et al. Scavenger receptor class B type 1 affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. **J Lipid Res**, v. 42, p. 1969-1978, 2001.
- 23 LIU, J.; HEIKKILA, P.; MENG, Q. H.; et al. Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. **Eur J Endocrinol**, v. 142, p. 677-682, 2000.
- 24 CAI, L.; JI, A.; DE BEER, F. C.; et al. SR-B1 protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. **J Clin Invest**, v. 118, p. 364-375, 2008.
- 25 ZALOGA, G. P.; BHATT, B.; MARIK, P. E. Critical illness and systemic inflammation. In: BECKER, K.; NYLEN, E. (eds). **Practice and principles of endocrinology and metabolism**. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001. p. 2068-2076.
- 26 STREETEN, D. H. P. What test for hypothalamic-pituitary adrenocortical insufficiency? **Lancet**, v. 354, p. 179-180, 1999.

- 27 CLARK, P. M.; NEYLON, I.; RAGGATT, P. R.; et al. Defining the normal cortisol response to the short Synacthen test: implications for the investigation of hypothalamic-pituitary disorders. **Clin Endocrinol**, v. 49, p. 287-292, 1998.
- 28 STREETEN, D. H. P.; ANDERSON, G. H.; DALAKOS, T. G.; et al. Normal and abnormal function of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in man. **Endocr Rev**, v. 5, p. 371-394, 1984.
- 29 SCHEIN, R. M. H.; SPRUNG, C. L.; MARCIAL, E. Plasma cortisol levels in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v. 18, p. 259-263, 1990.
- 30 CHERNOW, B.; RAINEY, T. R.; LAKE, C. R. Endogenous and exogenous catecholamines in critical care medicine. **Crit Care Med**, v. 10, p. 409-416, 1982.
- 31 HART, B. B.; STANFORD, G. G.; ZIEGLER, M. G.; et al. Catecholamines: study of interspecies variation. **Crit Care Med**, v. 17, p. 1203-1218, 1989.
- 32 MORAES, R. B.; CZEPIELEWSKI, M. A.; FRIEDMAN, G.; BORBA, E. L. de Diagnosis of adrenal failure in critically ill patients. **Arq. Bras. Endocrinol Metab**, v. 55, n. 5, p. 295-302, 2011.
- 33 BATEMAN, A.; SINGH, A.; KRAL, T.; et al. The immune-hypothalamicpituitary-adrenal axis. **Endocrine Rev**, v. 10, p. 92-112, 1989.
- 34 SONI, A.; PEPPER, G. M.; WYRWINSKI, P. M.; et al. Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels. **Am J. Med**, v. 98, p. 266-271, 1995.
- 35 JAATTELA, M.; ILVESMAKI, V.; VOUTILAINEN, R.; et al. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. **Endocrinology**, v. 128, p. 623-629, 1991.
- 36 JAATTELA, M.; CARPEN, O.; STENMAN, U. H.; et al. Regulation of ACTH-induced steroidogenesis in human fetal adrenals by rTNF- α . **Mol Cell Endocrinol**, v. 68, p. R31-36, 1990.
- 37 MARIK, P. E. Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency. **CHEST**, v. 135, p. 181-193, 2009.
- 38 SILVA, E.; PASSOS, R. Da H.; FERRI, M. B.; FIGUEIREDO, L. F. P. De. Sepsis: from bench to bedside. **Clinics** [online], v. 63, n. 1, p. 110-120, 2008.
- 39 MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, p. 1546, 2003.
- 40 ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. **Crit Care Med**, v. 29, p. 1303-10, 2001.

- 41 VINCENT, J. L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L.; RANIERI, V. M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; et al. Sepsis in european intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med** (in press).
- 42 Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, v. 20, p. 864-74, 1992.
- 43 RIVERS, E. P.; GASPARI, M.; ABI SAAD, G.; et al. Adrenal insufficiency in high-risk surgical ICU patients. **Chest**, v. 119, p. 889-896, 2001.
- 44 RYDVALL, A.; BRANDSTROM, A. K.; BANGA, R.; et al. Plasma cortisol is often decreased in patients in an intensive care unit. **Intensive Care Med**, v. 26, p. 545-551, 2000.
- 45 BRIEGEL, J.; SCHEELLING, G.; HALLER, M.; et al. A comparison of the adrenocortical response during septic shock and after complete recovery. **Intensive Care Med**, v. 22, p. 894-899, 1996.
- 46 SIBBALD, W. J.; SHORT, A.; COHEN, M. P.; et al. Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections: unrecognized adrenocortical insufficiency is severe bacterial infections. **Ann Surg**, v. 186, p. 29-33, 1977.
- 47 MORAN, J. L.; CHAPMAN, M. J.; O'FATHARTAIGH, M. S.; et al. Hypocortisolaemia and adrenocortical responsiveness at onset of septic shock. **Intensive Care Med**, v. 20, p. 489-495, 1994.
- 48 DELLINGER, R. P.; MITCHELL, M. L.; CARLET, J. M.; et al Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Crit Care Med**, v. 36, n. 1, p. 296-327, 2008.
- 49 BRIEGEL, J.; FORST, H.; HALLER, M.; et al. Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: A prospective, randomized, double-blind, single-center study. **Crit Care Med**, v. 27, p. 723-732, 1999.
- 50 BOLLAERT, P. E.; CHARPENTIER, C.; LEVY, B.; et al. Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. **Crit Care Med**, v. 26, p. 645-650, 1998.
- 51 SPRUNG, C. L.; ANNANE, D.; KEH, D.; et al. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock. **N Engl J Med**, v. 358, n. 2, p. 111-24, 2008.
- 52 ANNANE, D. Adrenal Insufficiency in Sepsis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 19, p. 1882-1886, 2008.
- 53 BOROVIKOVA, L. V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458-62, 2000.
- 54 KOENIG, J. I. Presence of cytokines in the hypothalamic-pituitary axis. **Prog Neuroendocrino Immunol**, v. 4, p. 143-7, 1991.

- 55 SHARSHAR, T.; ANNANE, D.; LORIN De La GRANDMAISON, G.; BROULAND, J. P.; HOPKINSON, N. S.; GRAY, F. The neuropathology of septic shock. **Brain Pathol**, v. 14, p. 21-33, 2004.
- 56 SHARSHAR, T.; GRAY, F.; LORIN De La GRANDMAISON, G.; HOPKINSON, N. S.; ROSS, E.; DORANDEU, A.; et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centers triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, v. 362, p. 1799-805, 2003.
- 57 GLODDEK, J.; LOHRER, P.; STALLA, J.; ARZT, E.; STALLA, G. K.; RENNER, U. The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 109, p. 410-5, 2001.
- 58 ANNANE, D.; VIGNON, P.; RENAULT, A.; BOLLAERT, P. E.; CHARPENTIER, C.; MARTIN, C.; et al. Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. **Lancet**, v. 370, p. 676-84, 2007.
- 59 PRIGENT, H.; MAXIME, V.; ANNANE, D. Science review: mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular actions of glucocorticoids. **Crit Care**, v. 8, p. 243-52, 2004.
- 60 MAXIME, V.; SHIDASP, S.; ANNANE, D. Metabolism modulators in sepsis: The abnormal pituitary response. **Crit Care Med**, v. 35, n. 9, p. S596-601, 2007.
- 61 ANNANE, D.; SEBILLE, V.; TROCHE, G.; et al. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. **JAMA**, v. 283, p.1038-1045, 2000.
- 62 ANNANE, D.; MAXIME, V.; IBRAHIM, F.; et al. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, p. 1319-1326, 2006.
- 63 MARIK, P.; PASTORES, S. M.; ANNANE, D.; MEDURI, G. U.; et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroidinsufficiency in critically ill adult patients: Consensus statements from aninternational task force by the American College of Critical Care Medicine. **Crit Care Med**, v. 36, n. 6, p. 1937-1949, 2008.
- 64 SIRAUX, V.; DE BACKER, D.; YALAVATTI, G.; MELOT, C.; GERVY, C.; MOCKEL, J.; et al. Relative adrenal insufficiency in patients with septic shock: comparison of low-dose and conventional corticotropin tests. **Crit Care Med**, v. 33, n. 11, p. 2479-86, 2005.
- 65 VENKATESH, B.; COHEN, J.; HICKMAN, I.; NISBET, J.; THOMAS, P.; WARD, G.; et al. Evidence of altered cortisol metabolism in critically ill patient: a prospective study. **Intensive Care Med**, v. 33, p. 1746-53, 2007.
- 66 ROTHWELL, P. M.; UDWADIA, Z. F.; LAWLER, P. G.; Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock. **Lancet**, v. 337, p. 582-3, 1991.

- 67 ARAFAH, B. M.; NISHIYAMA, F. J.; TLAYGEH, H.; HEJAL, R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. **JCEM**, v. 92, n. 8, p. 2965-71, 2007.
- 68 CASTRO, M.; MOREIRA, A. C. Analise critica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotalamo-hipofise-adrenal. **Arq Bras Endocrinol. Metab**, v. 47, n. 4, p. 358-67, 2003.
- 69 TERUHISA, U.; RYOJI, H.; TAISUKE, I.; TATSUYA, S.; FUMIHIRO, M.; TATSUO, S. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. **Clinica Chimica Acta**, v. 110, n. 2-3, p. 245-253, 1981.
- 70 RAFF, H.; BROCK, S.; FINDILING, J. W. Cosyntropin-stimulated salivary cortisol in hospitalized patients with hypoproteinemia. **Endocrine**, v. 34, n. 1-3, p. 68-74, 2008.
- 71 MELLO, R. C. V. DE; SAD, E. F.; ANDRADE, B. C.; et al. Serum and salivary cortisol in the diagnosis of adrenal insufficiency and as a predictor of the outcome in patients with severe sepsis. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 7, p. 455-459, 2011.
- 72 ESTRADA-Y-MARTIN, R. M.; ORLANDER, P. R. Salivary Cortisol Can Replace Free Serum Cortisol Measurements in Patients With Septic Shock. **CHEST**, v. 140, n. 5, p. 1216–1222, 2011.
- 73 COOLENS, J. L.; VAN BAELEN, H.; HEYNS, W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. **J Steroid Biochem** v. 26, p. 197-202, 1987.
- 74 MOLENAAR, N.; GROENEVELD, A. B. J.; DIJSTELBLOEM, H. M.; et al. Assessing adrenal insufficiency of corticosteroid secretion using free versus total cortisol levels in critical illness. **Intensive Care Med**, 2011. doi:10.1007/s00134-011-2342-x
- 75 HAMRAHIAN, A. H.; OSENI, T. S.; ARAFAH, B. M.; Measurements of Serum Free Cortisol in Critically Ill Patients. **The new england journal of medicine**, v. 350, n. 16, p. 1629-1638, 2004.
- 76 BENDEL, S.; KARLSSON, S.; PETTILA, V.; et al. Free Cortisol in Sepsis and Septic Shock. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1813-9, 2008.
- 77 Van LEEUWEN, H. J.; HEEZIUS, E. C. J. M.; DALLINGA, G. M.; et al. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 31, p. 1359-1366, 2003
- 78 WU, A.; HINDS, C. J.; THIEMERMANN, C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. **SHOCK**, v. 21, n. 3, p. 210–221, 2004.

- 79 THANNHAUSER, S. J.; SCHABER, H. Uber bezie-hungen des gleichgewichtes cholesterin und cholesterinester im blut und serum zur leberfunkt. **Klin Wochenschr**, v. 7, p. 252-3, 1926.
- 80 MARIK, P. E. Dyslipidemia in the Critically Ill. **Crit Care Clin**, v. 22, p. 151-159, 2006.
- 81 LEVINE, D. M.; PARKER, T. S.; DONNELLY, T. M.; et al. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 12040– 4, 1993.
- 82 NETEA, M. G.; DEMACKER, P. N.; KULLBERG, B. J.; et al. Low-density lipoprotein receptor-deficient mice are protected against lethal endotoxemia and severe gram-negative infections. **J Clin Invest**, v. 97, p. 1366-72, 1996.
- 83 HUBSCH, A. P.; POWELL, F. S.; LERCH, P. G.; et al. A reconstituted, apolipoprotein A-I containing lipoprotein reduces tumor necrosis factor release and attenuates shock in endotoxemic rabbits. **Circ Shock**, v. 40, p. 14-23, 1993.
- 84 MARIK, P. E. Adrenal insufficiency: the link between low Apolipoprotein A-1 levels and poor outcome in the critically ill? **Crit Care Med**, v. 32, p. 1977-8, 2004.
- 85 FERNÁNDEZ, J.; ESCORSELL, A.; ZABALZA, M.; et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: effect of treatment with hidrocortisone on survival. **Hepatology**, v.44, p. 1288-1295, 2006.
- 86 CHIEN, J. Y.; JERNG, J. S.; YU, C. J.; YANG, P. C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 33, n. 8, p. 1688-1693, 2005.
- 87 KNAUS, W. A.; DRAPER, E. A.; WAGNER, D. P.; ZIMMERMAN, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med**, v. 13, p. 818-29, 1985.
- 88 VINCENT, J. L.; MENDONÇA, A.; CANTRAINED, F.; MORENO, R.; TAKALA, J.; SUTER, P. M.; et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. **Crit Care Med**, v. 26, p. 1793-800, 1998.
- 89 FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499–502, 1972.

APÊNCICE

