

Análise Crítica do Cortisol Salivar na Avaliação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

**Margaret Castro
Ayrton C. Moreira**

Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP.

*Recebido em 13/06/03
Aceito em 18/06/03*

RESUMO

A dosagem do cortisol salivar, que avalia a fração livre do hormônio, tem se tornado cada vez mais popular, com vários ensaios comerciais disponíveis. Neste artigo avaliamos criticamente os diferentes ensaios disponíveis para dosagem de cortisol salivar e suas aplicações em situações fisiológicas e patológicas. Esta técnica tem se mostrado útil para o estudo do ritmo circadiano do cortisol e para a avaliação de insuficiência adrenal, nos primeiros dias de vida de recém-nascidos a termo e pré-termo. Adicionalmente, tem sido utilizada para avaliar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em alterações da função cognitiva, em situações de estresse, ansiedade, depressão, síndrome do pânico, na avaliação da privação de sono em pacientes trabalhadores noturnos e naqueles com fadiga crônica. Recentemente, a dosagem de cortisol salivar têm sido empregada no diagnóstico da síndrome de Cushing (SC), inclusive em crianças: sua dosagem às 24:00h apresenta sensibilidade diagnóstica superior a todos os outros parâmetros para detectar pacientes com a condição, mesmo naqueles com hipercortisolismo intermitente ou leve. Utilizando a dosagem do cortisol salivar, avaliamos a acurácia diagnóstica do teste de supressão com dexametasona (DEX, 8mg e 24mg) no diagnóstico diferencial da SC. Nossos dados sugerem que a medida do cortisol salivar, quando comparada ao cortisol plasmático, melhora a acurácia diagnóstica do teste de supressão com altas doses de DEX, mesmo utilizando critérios mais rigorosos. É importante que o pesquisador e o clínico estejam cientes das possíveis diferenças geradas pelos diferentes ensaios, para interpretar adequadamente os intervalos de referências. Os ensaios para cortisol salivar devem ser padronizados e interpretados com base em valores de corte, obtidos em cada laboratório, utilizando amostras de controles normais da população, de obesos e de pacientes com pseudo-Cushing e SC comprovada. Os laboratórios de pesquisa ou laboratórios comerciais devem, desta forma, realizar a validação de seus ensaios para dosagem de cortisol salivar, tornando-os mais disponíveis à prática clínica. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/4:358-367**)

Descritores: Cortisol salivar; Hipercortisolismo; Teste de supressão com dexametasona; Síndrome de Cushing; Pseudo-Cushing

ABSTRACT

Salivary Cortisol on the Evaluation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis.

Measurement of salivary cortisol, which evaluates the free form of the hormone, has become popular following the development of commercial assays. This article evaluates the different assays available for measurement of salivary cortisol, and its clinical application in some physiological and pathological conditions. Measurement of salivary cortisol has been extensively used to evaluate cortisol circadian rhythm and adrenal insufficiency, in the first days of life of full-term and pre-term infants, and to evaluate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) activity in adults and children with cognitive impairment, major depression, stress,

anxiety, panic syndrome, chronic fatigue syndrome, and sleep deprivation in shift workers. Measurement of salivary cortisol is also used in the diagnosis of Cushing syndrome, in adults and children. These studies demonstrate that midnight salivary cortisol measurement has higher diagnostic sensitivity compared to all other previously analyzed parameters, in detecting Cushing syndrome (CS), even in patients with intermittent or mild hypercortisolism. Using salivary cortisol measurement, we evaluated the diagnostic accuracy of the high dose dexamethasone (DEX, 8mg and 24 mg) suppression test in the differential diagnosis of CS. Our data suggest that salivary cortisol compared to plasma cortisol improved the diagnostic accuracy of high dose DEX suppression tests, even using more rigorous criteria of suppression. It is critical that researchers and clinicians must be aware of the differences generated in different salivary cortisol assays, in order to interpret the intervals of references adequately. Thus, salivary cortisol assays should be chosen and interpreted based on assay-specific normative data in combination with results from patients suspected but proven not to have CS. We also suggest that commercial laboratories consider large-scale validation of these assays to make them widely available to practicing clinicians. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/4:358-367)

Keywords: Salivary cortisol; Hypercortisolism; Dexamethasone suppression tests; Cushing's syndrome; Pseudo-Cushing

Aspectos Críticos nas Dosagens de Esteróides

Os ESTERÓIDES ADRENAIS SÃO moléculas de pequeno peso molecular (250-350Da) com estruturas químicas muito semelhantes, não são espécie-específicas, são resistentes ao calor e, portanto, estáveis à temperatura ambiente. As concentrações plasmáticas, da ordem de nanomoles ou micromoles por litro, não exigem ensaios muito sensíveis. Por outro lado, a semelhança estrutural dos esteróides exige anticorpos altamente específicos ou a necessidade de extração e de cromatografia prévias.

O cortisol circula no sangue ligado às proteínas transportadoras, a transcortina, a principal proteína transportadora de corticóides (CBG), e a albumina. Apenas uma pequena fração (5-10%) encontra-se na forma livre, isto é, na fração biologicamente ativa do hormônio. Situações que elevam as globulinas transportadoras dos esteróides, tais como gravidez e uso de estrógenos, apresentam maiores aumentos dos valores do esteróide total do que do esteróide livre. Similarmente, em condições de baixos níveis de CBG, como ocorre na síndrome nefrótica, insuficiência hepática e hipotireoidismo, as concentrações de cortisol livre são mantidas normais apesar da redução dos

níveis do cortisol plasmático. A maioria dos métodos de imunoenaios utilizados na determinação do cortisol no plasma detecta o cortisol total (ligado e livre), ao passo que a dosagem do cortisol na urina e na saliva quantifica o cortisol livre. Os níveis de cortisol livre, tanto urinário como salivar, aumentam rapidamente quando as concentrações séricas do cortisol total atingem 25µg/dl (700nmol/L), excedendo a capacidade de ligação da CBG.

A medida precisa da concentração do cortisol total foi, inicialmente, realizada por técnicas de competição à ligação a proteínas usando anticorpos específicos (1). Este método foi substituído pelo radioimunoensaio (RIA) e, mais recentemente, por ensaios de imunofluorescência e quimioluminescência, ensaios estes de maior sensibilidade e especificidade. A determinação do cortisol livre urinário (UFC, *urinary free cortisol*) pode também ser realizada por imunoenaios ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, *high performance liquid chromatography*). Estes mesmos métodos também permitem a quantificação do cortisol salivar, um índice excelente da concentração livre do cortisol do plasma.

A medida do cortisol salivar independe da taxa de fluxo de saliva e das flutuações da transcortina (2,3). As amostras de saliva são obtidas por procedimento simples, não invasivo, livre de estresse, podendo ser realizadas por pessoas não treinadas em ambulatório ou na própria residência do paciente (4-9). Estas amostras podem ser coletadas muitas vezes ao dia, permitindo a avaliação dinâmica da secreção de cortisol livre. Além disso, as amostras do cortisol salivar são estáveis em temperatura ambiente por 1 semana e podem ser transportadas ao laboratório pelo correio ou pelo portador, sem nenhuma perda da atividade do cortisol (10).

Aplicação Clínica da Dosagem de Cortisol Livre

Com a finalidade de avaliar criticamente a aplicação clínica da dosagem de cortisol salivar, discutiremos algumas situações fisiológicas e patológicas onde esta dosagem tem sido utilizada. Em relação ao estudo do ritmo circadiano da secreção de cortisol em crianças e em recém-nascidos, o cortisol salivar tem se mostrado uma técnica extremamente útil (4,8,11). Crianças a termo foram avaliadas em um estudo longitudinal, com o intuito de determinar o tempo de aparecimento do ritmo circadiano do cortisol, por meio da dosagem do cortisol salivar. As amostras de saliva foram coletadas entre 08:00 e 09:00h e entre 21:00 e 22:00h no berçário ou na casa do paciente, após a alta hospitalar e foram obtidas nas semanas 2, 4, 8, 12, 16,

20 e 24 da vida pós-natal. A idade média do aparecimento do ritmo circadiano do cortisol ocorreu entre o segundo e o terceiro mês nos recém-nascidos a termo (4,12). Resultados similares foram descritos usando o cortisol plasmático e um protocolo de seção transversal (13), sugerindo que a maturação do ritmo circadiano do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ocorre em torno de 8 a 12 semanas de vida pós-natal, em recém-nascidos a termo.

Um estudo prévio havia relatado uma relação inversa entre a idade gestacional e os valores do cortisol plasmático em crianças prematuras (14). Utilizando a dosagem do cortisol salivar, também avaliamos os efeitos da prematuridade na ontogenia da variação circadiana do eixo HHA. O ritmo circadiano emergiu e persistiu entre a segunda e a décima sexta semana pós-natal. Neste estudo longitudinal, a média e a mediana de aparecimento do ritmo do cortisol foram 8 e 9,3 semanas pós-natal, respectivamente. Estes achados foram, portanto, similares aos observados para o ritmo do cortisol salivar em crianças a termo, usando o mesmo protocolo longitudinal (4,8), sugerindo que o desenvolvimento do ritmo circadiano do cortisol em crianças prematuras, em idade gestacional entre 31 e 34 semanas, diferentemente de prematuros de 28 semanas de idade gestacional (15), não está necessariamente retardado. Provavelmente, a partir da trigésima semana de vida gestacional, o sistema controlador do ritmo circadiano endógeno esteja desenvolvido e apto a responder aos estímulos sono/vigília, ciclo claro/escuro, alimentação e estresse ambiental (8).

Uma condição crítica em crianças é a avaliação de insuficiência adrenal nos primeiros dias de vida. Geralmente, estas crianças são prematuras e apresentam baixo peso, o que torna difícil a retirada de grande quantidade de sangue para dosagem do cortisol plasmático. Analisamos as concentrações de cortisol salivar em condições basais e após o teste de estímulo com ACTH em 48 crianças prematuras, na primeira semana de vida pós-natal. Observamos um aumento do cortisol plasmático e do cortisol salivar após o teste com ACTH quando comparado com o estímulo com salina ($p < 0,0001$). Portanto, o cortisol salivar pode ser utilizado para avaliar a resposta adrenal ao ACTH, nos primeiros dias de vida de crianças a termo e de prematuros (11).

Adicionalmente, a dosagem de cortisol salivar tem sido utilizada para a avaliação do eixo HHA em alterações da função cognitiva, tanto em crianças (16), como em pacientes adultos, além de estudos com estresse, ansiedade, depressão e síndrome do pânico (17-19). Esta dosagem tem também sido avaliada em

relação à privação de sono em pacientes trabalhadores noturnos (20), em pacientes com fadiga crônica (21), e para avaliação de estresse em crianças durante tratamento dentário (22). Centenas de trabalhos nestas áreas do conhecimento, utilizando a dosagem do cortisol salivar, podem ser encontradas nos últimos 3 anos na Internet. Entretanto, estes aspectos não são do escopo deste artigo, que avaliará criticamente o papel da dosagem de cortisol salivar no diagnóstico da síndrome de Cushing.

Nos últimos anos, vários estudos utilizando dosagem de cortisol salivar no diagnóstico da síndrome de Cushing têm sido descritos, inclusive em crianças (5-7,23). A primeira etapa na avaliação da síndrome de Cushing consiste em afastar o uso exógeno de glicocorticóides, a causa mais freqüente de hipercortisolismo, situação esta onde os pacientes geralmente apresentam sinais e sintomas de hipercortisolismo, porém com valores indetectáveis de cortisol. O diagnóstico do hipercortisolismo e a definição etiológica da síndrome de Cushing (causas independentes e causas dependentes de ACTH) dependem de exames laboratoriais e de imagem. Cabe salientar que ainda não há consenso de qual a melhor forma de confirmar o hipercortisolismo e de definir as causas da síndrome de Cushing (24). Entretanto, a maioria dos protocolos de investigação utiliza, no mínimo, dois testes funcionais que enfocam diferentes aspectos da fisiopatologia do eixo HHA.

O UFC tem sido considerado o indicador mais sensível de hipercortisolismo. Entretanto, apresenta o inconveniente da coleta de urina de 24h e a necessidade da avaliação simultânea da taxa de filtração glomerular do paciente (24). Mesmo com estas inconveniências, a determinação do UFC (valor normal $< 220-330 \text{ nmol}$ ou $80 \text{ a } 120 \mu\text{g}/24\text{h}$), em duas ou três medidas repetidas e consecutivas, tem sido considerada como método padrão-ouro para este fim, sobretudo quando os valores de UFC excederem quatro vezes o limite superior do método (24,25). Embora o UFC seja um teste útil para rastreamento de hipercortisolismo, pode ser normal em 8 a 15% dos pacientes com síndrome de Cushing (26).

Na tentativa de uma abordagem mais simples para o diagnóstico do hipercortisolismo, alguns estudos, baseados na perda do ritmo circadiano observada na maioria dos pacientes com síndrome de Cushing, utilizaram a dosagem de UFC em amostras de urina de 1h, obtidas entre 07:00-08:00 e entre 22:00-23:00h, em indivíduos normais e em pacientes com síndrome de Cushing (27,28). Os valores do UFC, em média, foram maiores nos pacientes com síndrome de Cushing,

porém houve sobreposição com os controles no período da manhã. Entretanto, não houve sobreposição nas concentrações de UFC determinadas à noite entre indivíduos normais e pacientes com síndrome de Cushing. Cabe salientar, ainda, que ocorreu sobreposição - em ambos os períodos estudados - nos valores de UFC entre pacientes com hipercortisolismo e um grupo de indivíduos obesos ou com outras formas de pseudo-Cushing, situações estas em que ocorre maior dificuldade diagnóstica, limitando o uso deste teste.

Outro teste utilizado para o diagnóstico da síndrome de Cushing, também baseado na perda do ritmo circadiano, foi sugerido por Newell-Price e cols. (29), que dosaram o cortisol plasmático às 24:00h em 150 pacientes com síndrome de Cushing comprovada, e demonstraram que o cortisol total do plasma menor que 50nmol/L (1,8µg/dL) rendeu uma sensibilidade diagnóstica de 100% para síndrome de Cushing. Um outro trabalho (30) sugeriu que valores de cortisol plasmático às 24:00h maiores do que 7,5µg/dL (207nmol/L) permitem a discriminação entre a síndrome de Cushing e estados de pseudo-Cushing, com uma sensibilidade de 96%. Avaliando, também, as concentrações de cortisol plasmático, o teste de supressão com 1mg de dexametasona administrada às 23:00h tem sido utilizado como rastreamento de hipercortisolismo. A supressão do cortisol plasmático para valores menores que 5µg/dl era considerada uma resposta normal a este teste (31). Entretanto, em alguns indivíduos obesos, as concentrações de cortisol plasmático variavam de 3,0-7,2µg/dL (80-195nmol/L). Adicionalmente, alguns pacientes com síndrome de Cushing demonstraram uma sensibilidade incomum à supressão com dexametasona, fazendo com que este teste resultasse em um número significativo de respostas falso-negativas. Para aumentar a sensibilidade do teste de supressão com 1mg de dexametasona, alguns autores (24,30) têm sugerido que a supressão do cortisol plasmático deve ser menor que 1,8µg/dL (50nmol/L). Entretanto, quando se utiliza um valor de corte tão baixo, ocorre um aumento indubitável da taxa de falso-positivo. Neste caso, o teste apresenta alta sensibilidade (95%) e baixa especificidade, o que o torna freqüentemente necessário à continuidade da investigação para hipercortisolismo.

Embora estudos prévios tenham demonstrado claramente a utilidade da dosagem do cortisol salivar para avaliar o ritmo (4,8,12) e a atividade do eixo HHA (9,11,32,33) e, também, para diagnosticar hipercortisolismo (5-7,23,27), é surpreendente que esta técnica não tivesse sido usada mais extensamente, o que vem ocorrendo mais recentemente. Laudat e

cols. (34) estabeleceram valores de normalidade em 101 adultos normais, 18 pacientes com síndrome de Cushing e 21 pacientes com insuficiência adrenal, e concluíram que a dosagem de cortisol salivar poderia ser utilizada para avaliar alterações do eixo HHA, independente das alterações da CBG. Raff e cols. (5), utilizando a dosagem de cortisol salivar às 09:00 e às 23:00h no diagnóstico de hipercortisolismo, observaram que as concentrações de cortisol salivar coletado às 23:00h estavam significativamente elevadas quando comparadas com controles normais. Adicionalmente, estes autores demonstraram que, apesar da maioria dos pacientes com síndrome de Cushing exibirem uma perda do ritmo circadiano, 3 de 39 pacientes apresentaram cortisol salivar às 23:00h dentro dos valores de referência normal e, destes, 2 mantiveram ritmo circadiano. Neste trabalho foi demonstrado não haver diferença significativa entre os valores de cortisol salivar entre homens e mulheres normais, como havia sido previamente sugerido (34). Além disto, a concentração do cortisol na saliva foi estimulada pela administração de ACTH exógeno, consistente com um estudo precedente (32). Uma correlação positiva e significativa entre o cortisol livre na saliva e o cortisol total no plasma (5,6,35) tem sido observada em vários trabalhos (figura 1).

Estudando 30 pacientes com síndrome de Cushing, demonstramos que os níveis de cortisol salivar coletado às 23:00h são tão acurados (100% sensibilidade com 91,4% de especificidade) quanto os testes convencionais para a confirmação do hipercortisolismo endógeno (6). O padrão circadiano do cortisol salivar persistiu em 43% dos pacientes com síndrome de

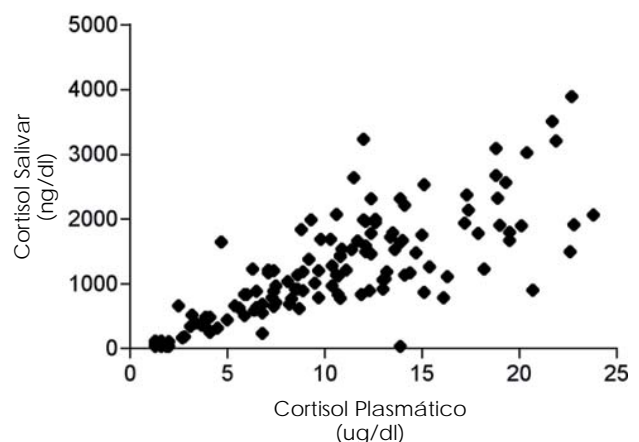


Figura 1. Correlação ($r= 0,89$ e $p<0,0001$) obtida entre os valores de cortisol salivar (ng/dl) e plasmático (µg/dl) em condições basais e após o teste de supressão com diferentes doses de dexametasona.

Cushing de nossa casuística, porém as concentrações absolutas de cortisol estavam elevadas (figura 2). Avaliamos, também, a acurácia diagnóstica de uma amostra de saliva coletada às 09:00h da manhã seguinte, após a ingestão de dexametasona (1mg no adulto e 20µg/kg/peso em crianças) às 23:00h. As concentrações médias do cortisol salivar após o teste de supressão com 1mg de dexametasona foram mais elevadas nos pacientes com síndrome de Cushing do que nos indivíduos normais (6) e nos pacientes com pseudo-Cushing (5-7). A sobreposição das concentrações de cortisol salivar entre indivíduos normais e pacientes com síndrome de Cushing e a persistência de ritmo circadiano (5,6) podem ser justificadas pelo grau de hipercortisolismo mais leve observado em alguns pacientes, ou pela intermitência do hipercortisolismo observada em outros.

Mais recentemente, um estudo do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos também avaliou o cortisol salivar às 24:00h como um teste de rastreamento para síndrome de Cushing (23). Os autores avaliaram 139 pacientes de ambulatório e 4 internados com possível síndrome de Cushing, 16 pacientes de ambulatório e 7 internados com doença não adrenal, e 34 indivíduos saudáveis. A concentração de cortisol salivar às 24:00h identificou 93% dos pacientes com síndrome de Cushing (intervalo da confiança, 89-98%). Os autores concluíram, mais uma vez, que a dosagem do cortisol salivar às 24:00h é um teste prático e exato para o diagnóstico da síndrome de Cushing. Com especificidade de 100%, a sensibilidade diagnóstica do cortisol salivar às 24:00h foi equivalente a de uma medida do cortisol plasmático às 24:00h e superior a todos os parâmetros restantes, incluindo o UFC na urina de 24 horas.

Resumindo, vários trabalhos demonstram que a dosagem do cortisol salivar em amostra coletada às 24:00h pode excluir o diagnóstico da síndrome de Cushing ao identificar mais de 90% dos pacientes com esta doença. Mesmo assim, em torno de 7% dos pacientes com síndrome de Cushing apresentaram cortisol salivar às 24:00h dentro da variação observada nos estados pseudo-Cushing. De toda forma, nos diferentes trabalhos analisados, a sensibilidade diagnóstica da dosagem do cortisol salivar foi superior a todos os outros parâmetros em detectar pacientes com síndrome de Cushing, mesmo em pacientes com hipercortisolismo leve. Neste caso, ou quando os testes laboratoriais forem duvidosos, o diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing dos casos de pseudo-Cushing pode trazer dificuldades. O fato de que todos os testes laboratoriais apresentam falso-negativos e falso-positivos torna essencial a associação e, às vezes, a repetição dos testes para confirmar o hipercortisolismo endógeno. Cabe salientar que, se as dúvidas diagnósticas persistirem, sugere-se a reavaliação do paciente após um a três meses. Nestas situações, o teste de supressão com baixas doses (2mg) de dexametasona (36), combinado ou não com o do oCRH, podem ser também utilizados (37).

Diagnóstico Etiológico da Síndrome de Cushing

Na presença de um paciente com quadro clínico sugestivo de síndrome de Cushing e após a confirmação laboratorial do hipercortisolismo endógeno, os níveis plasmáticos basais de ACTH devem ser determinados para diferenciar as causas ACTH-dependentes das ACTH-independentes. Os testes com altas (8mg/d) e muito altas (16 ou 24mg/dia) doses de dexametaxona, administradas durante 2 dias, foram muito utilizados

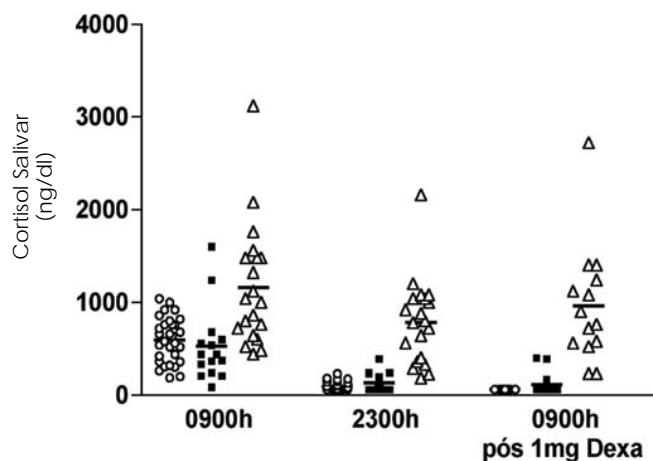


Figura 2. Valores individuais de cortisol salivar obtidos às 09:00h, 23:00h e às 09:00h após ingestão de 1mg de dexametasona (Dexa) às 23:00h da noite anterior, em indivíduos controles (O), pacientes obesos (■) ou com síndrome de Cushing (Δ). Figura modificada de Castro e cols., 1999 (6).

no diagnóstico diferencial das causas de síndrome de Cushing (36) e hoje foram substituídos pelo teste *overnight* simplificado. A supressão de 50% dos valores de cortisol plasmático, entretanto, não é observada em todos os pacientes com doença de Cushing, podendo ocorrer até 12% de falso-negativos. Por outro lado, esta supressão pode ocorrer em cerca de 20% de pacientes com produção ectópica de ACTH e em até um terço das hiperplasias macronodulares (38,39). O teste de oCRH (1µg/kg/peso corporal) tem sido extensivamente utilizado no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing, tanto como teste periférico (40) como durante o cateterismo de seio petroso inferior (41). Adenomas corticotróficos liberam ACTH (incremento de 35 a 50%) e cortisol (incremento de 20%) pós-CRH, enquanto os tumores ectópicos produtores de ACTH e os tumores adrenais produtores de cortisol não respondem ao oCRH (24,40). Cerca de 8-10% dos pacientes com doença de Cushing podem não responder, e em torno de 20% de pacientes com síndrome de secreção ectópica de ACTH podem apresentar resposta ao oCRH. O teste de estímulo com DDAVP (10µg EV em bolo) constitui uma alternativa ao teste de estímulo com oCRH no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing (24,42,43). A associação do teste com DDAVP e CRH faz com que todos os pacientes respondam ao teste, devido ao efeito sinérgico das drogas, porém esta alta sensibilidade ocorre com uma baixa especificidade (23,44,45). O cateterismo bilateral do seio petroso inferior (CBSPI) é mais um instrumento na investigação das causas de síndrome de Cushing dependentes de ACTH, tanto em adultos (41) com em crianças (46-48).

Recentemente (49,50) avaliamos a resistência dos corticotrofos na doença de Cushing a diferentes doses de dexametasona, utilizando a dosagem do cortisol salivar. Comparamos, ainda, a resposta do cortisol salivar com a do cortisol plasmático após o teste com altas (8mg) e muito altas (24mg) doses de dexametasona e após o teste com oCRH no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing. Estudamos 46 pacientes com síndrome de Cushing, incluindo 28 com doença de Cushing, 16 com doença adrenal e 2 com tumor ectópico oculto produtor de ACTH. Observamos uma supressão dose dependente do cortisol salivar, do cortisol plasmático e do ACTH nos pacientes com doença de Cushing. Entretanto, o cortisol salivar apresentou uma maior supressão que o cortisol plasmático ou o ACTH, após diferentes doses de dexametasona. O paralelismo das três linhas identificou o critério de 65% de supressão para o cortisol salivar correspondente a 50% da supressão do cortisol

no plasma após 8mg/dia durante 2 dias como consistente com doença de Cushing (49,50). É importante salientar que Flack e cols. (51) mostraram que um maior grau de supressão (80%) do UFC deveria ser utilizado para o diagnóstico de síndrome de Cushing. Na nossa opinião, quando se utilizam as formas livres do cortisol (UFC ou saliva) como indicadores do teste, o grau de supressão deve ser maior do que quando se utiliza o cortisol plasmático. Estas observações em conjunto recomendam a adoção de critérios mais rigorosos de supressão para interpretar a resposta do cortisol livre aos testes com dexametasona. A razão para a maior supressibilidade do cortisol livre pela dexametasona não são claras. Previamente, Cope e Black (52) atribuíram a ligação do cortisol no plasma à CBG, limitando, desta forma, a quantidade de cortisol livre difundível. Portanto, o cortisol na saliva cai muito mais intensamente que o cortisol total no plasma e pode refletir muito melhor a supressão do eixo HHA.

Avaliamos, também, a aplicabilidade do cortisol salivar no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing. A sensibilidade e a especificidade diagnósticas foram de 81%/83% usando 50% de supressão para o cortisol plasmático e de 86%/100% usando o critério de 65% de supressão para o cortisol salivar, no teste com 8mg de dexametasona. Analisando a acurácia diagnóstica, nossos dados sugerem que a medida do cortisol salivar, mesmo utilizando critérios mais rigorosos, melhora o teste de supressão com altas doses de dexametasona comparado ao cortisol plasmático no diagnóstico diferencial da síndrome de Cushing.

Comparamos, também, o valor diagnóstico da dosagem do cortisol salivar em relação às dosagens do cortisol e ACTH plasmáticos em resposta ao teste oCRH. O teste oCRH apresentou sensibilidade e especificidade de 86%/91% para a ACTH, 100%/64% para o cortisol plasmático e 93%/91% (20% de incremento) ou 86%/100% (35% de incremento) para o cortisol salivar. Nossos dados indicam que a dosagem do cortisol salivar após o teste oCRH parece ser tão boa como a do cortisol ou ACTH plasmáticos na diferenciação das causas de Cushing ACTH-dependentes. Cabe, entretanto, salientar que o teste do oCRH é também realizado durante o CBSPI (41,48) e, nesta condição, a dosagem de cortisol salivar não apresenta nenhuma utilidade. Este é o primeiro trabalho que avaliou a dosagem de cortisol salivar no diagnóstico das etiologias da síndrome de Cushing, portanto, estudos posteriores, ampliando o número de pacientes, serão necessários para a definição de critérios de resposta frente ao teste com altas doses de dexametasona.

Comparação dos Métodos para Dosagem do Cortisol Salivar

A medida do cortisol na saliva pode facilmente ser executada com as modificações simples de um RIA disponível para o cortisol plasmático. Este tem sido o método empregado até recentemente (5,6,23,27,32-35), mas estes ensaios diferem entre si. Independente do método, os estudos demonstraram sensibilidade com especificidade elevadas e destacaram a importância do uso do cortisol salivar como um teste de rastreamento para a síndrome de Cushing. Entretanto, apesar da similaridade no desempenho diagnóstico da síndrome de Cushing, os dados do estudo do NIH (23) diferem dos obtidos nos estudos precedentes (5,6), principalmente em termos dos valores de corte observados nos indivíduos normais ou com pseudo-Cushing. As possíveis razões para esta diferença são variadas, a primeira delas é que os indivíduos sem síndrome de Cushing eram diferentes nos vários estudos. Esta assertiva é totalmente verdadeira. Outra possibilidade é que o método da coleta da saliva possa ter influenciado os resultados. Finalmente, é também possível que os diferentes ensaios ou o ponto de corte da dosagem de cortisol salivar resultem em diferenças na interpretação dos dados.

No ensaio utilizado em laboratório (4,6), amostras de saliva são coletadas em tubos plásticos por salivagem direta durante 15 minutos. A cavidade oral é previamente limpa com água filtrada. As amostras de saliva são centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos e o sobrenadante separado e estocado a -20°C para posterior dosagem de cortisol livre por RIA. No trabalho de Raff e cols. (5), foi usado um dispositivo para a coleta (Salivette). É possível que o algodão do Salivette possa reter alguma quantidade de cortisol, levando a um resultado mais baixo daquele que seria encontrado se a saliva fosse coletada diretamente. Entretanto, a similaridade dos pontos de corte do cortisol salivar, propostos para a interpretação do teste de supressão com dexametasona, usando Salivette (103ng/dl) (5) e coleção direta (62-112ng/dl) (6), sugere que a técnica da coleta não é um fator importante.

Utilizamos, para a dosagem de cortisol salivar, o mesmo RIA utilizado para dosagem do cortisol plasmático, porém sem extração (53). Após centrifugação da saliva, 25µl são pipetados diretamente no tubo de ensaio e [1,2, ³H(N)] Hydrocortisone (N.E.N. Dupont - NET-185) e um anticorpo contra cortisol produzido em coelho contra o conjugado cortisol 3-carboxi metil oxima (CMO) – albumina bovina (BSA) produzido pelo Prof. Dr. José Gilberto Vieira (Laboratório Fleury) são adicionados. Utilizamos como

curva padrão a Hydrocortisone - Δ^4 - pregnene-11 β , 17 α , 21triol - 3,20-dione (catálogo n° H-4001, Sigma) e uma incubação de 15 horas. A dose mínima detectável pelo nosso método foi de 62ng/dl (1,7nmol/L). No trabalho de Raff e cols. (5), o cortisol salivar foi medido por RIA comercial (*Coat-a-Count, Diagnostic Products*, Los Angeles, CA), também após modificação do ensaio para o cortisol plasmático (35). Neste método, os autores aumentam o volume do analisado (de 25 para 200µL), aumentam o tempo de incubação de 45 para 180min, diminuem a temperatura de incubação de 37°C para temperatura ambiente, e diluem a curva padrão em água destilada 1:10. A dose mínima detectável do cortisol salivar obtida pelo método de Raff e cols. (5) foi de 14ng/dl (0,4mmol/L). O ensaio utilizado por Papanicolaou e cols. (23) utiliza 50µl de saliva, após centrifugação, pipetados diretamente em tubos de ensaios contendo [1,2,6,7 ³H] cortisol e um anticorpo anti-coelho contra acetato de cortisona - 3 CMO- BSA, seguindo 3h de incubação à temperatura ambiente. A dose mínima detectável do cortisol salivar obtida por este método foi de 80ng/dl. Todos estes três métodos utilizam, para separação da fração livre da ligada, o carvão ativado. É interessante salientar que os RIAs usados no nosso estudo (6) e no estudo de Papanicolaou e cols. (23) são menos sensíveis que o de Raff e cols. (5).

Outro aspecto discutível nos resultados dos diferentes autores é o ponto de corte do cortisol salivar entre os indivíduos normais, obesos ou pacientes com hipercortisolismo. Em nosso estudo, utilizamos como ponto de corte o percentil 90 dos indivíduos normais e de indivíduos obesos, e observamos valores de cortisol salivar de 168 e 282ng/dl, respectivamente, às 23:00h (6). Outros autores utilizaram como ponto de corte o percentil 97 ou a média mais dois desvios padrões dos indivíduos normais, com valores de cortisol salivar variando nestes casos de 130-282ng/dl (5,7). O estudo do NIH adotou valor de corte para o cortisol salivar mais elevado (550ng/dl) e este valor foi obtido pelo resultado mais alto do cortisol salivar, observado às 23:00h em um paciente com pseudo-Cushing. Portanto, a concentração de 550ng/dl (15,2nmol/L) foi o nível de corte para que se obtivesse uma especificidade de 100%. O uso de percentil 97 ou média mais dois desvios padrões no estudo do NIH renderia valores de corte de 415-457ng/dl, ainda assim mais elevados do que os observados nos outros estudos.

Mais recentemente, laboratórios têm procurado comparar novos métodos (54,55) como enzimaímunoensaio (EIA) com RIAs (*Coat-a-Count, Diagnostic*

Products Corporation, Los Angeles, CA) previamente descritos (5). Para o EIA comercial (*Diagnostic System Laboratories*, produto nº 10-67100) foram utilizados 25µl de saliva, um tempo de incubação de 45 minutos e calibradores que variaram de 2,8 a 273nmol/L (100-10000ng/dl). A dose mínima detectável foi de 0,4nmol/L (14ng/dl). Utilizando os 2 métodos, foram construídas curvas de regressão dos dados obtidos nos três grupos de pacientes estudados: normais, obesos e pacientes com síndrome de Cushing. As concentrações de cortisol salivar nas amostras estudadas obtidas pelo EIA mostraram-se consistentemente mais elevadas que as obtidas pelo RIA (54,55). Para se determinar qual dos métodos apresentava valores mais acurados, um padrão de cortisol (Hydrocortisone H4001, Sigma) foi adequadamente pesado e soluções padrões contendo diferentes concentrações de cortisol foram preparadas. Estas soluções padrões foram dosadas por ambos os métodos. As concentrações observadas pelo RIA foram mais próximas dos resultados previstos do que as dosadas pelo EIA, que superestimavam as concentrações de cortisol na saliva. Similarmente ao observado por Raff e cols. (54,55), Papanicolaou e cols. (23) compararam dois métodos de RIA e demonstraram que o método (5) utilizado por Raff e cols., (*Coat-a-Count, Diagnostic Products*, Los Angeles, CA) apresentavam valores de cortisol salivar em torno da metade dos observados pela dosagem utilizando um RIA disponível comercialmente nos EUA (*Covance Laboratories, Inc.* Vienna, VA) e modificado pelos autores (23). Esta alteração metodológica pode justificar o valor mais elevado de corte do cortisol salivar encontrado no trabalho do NIH (550ng/dl) quando comparado aos trabalhos previamente publicados (5,6).

Mais recentemente, outro grupo independente de investigadores (56) avaliou o ritmo circadiano em indivíduos normais utilizando a dosagem do cortisol salivar por um método de eletro-quimioluminescência (Elecsys 1010/1020 analyzers, Roche Diagnostic, Laval, Quebec). Este ensaio é realizado em 18 minutos, utiliza 20µl de saliva e a curva de calibração varia de 1 a 1750nmol/L (40 a 63000ng/dl). Os coeficientes de variação intra e interensaios foram metodologicamente adequados e não houve diferença estatística entre valores observados em homens e mulheres. Os autores concluem que o cortisol salivar pode ser quantificado adequadamente utilizando métodos automatizados. Entretanto, este trabalho é um estudo piloto e algumas limitações ocorreram, como, por exemplo, um número pequeno de lotes de kits comerciais que foram testados e a ausência de estudo de

replicabilidade do método. Neste estudo, os autores também compararam as dosagens de cortisol salivar utilizando o método automatizado Elecsys com o método RIA comercial da DPC utilizado previamente por Raff e cols., (5) e um outro ensaio comercial, utilizando dois sítios de um anticorpo monoclonal, também disponível nos EUA (Salimetrics LLC, State College, Pennsylvania). Os autores demonstraram que, enquanto as correlações dos calibradores foram de 0.986 (Elecsys vs. DPC) e de 0.926 (Elecsys vs. Salimetrics), as correlações entre os métodos, utilizando saliva de 18 crianças, foram de 0.6446 e de 0.594, respectivamente. As amostras quantificadas foram, portanto, em torno de 40% mais elevadas quando analisadas pelo Elecsys.

Portanto, todos os trabalhos da literatura que descrevem o uso do cortisol salivar às 23:00-24:00h, com ou sem associação com o teste de supressão com dexametasona, confirmam a eficácia deste como um teste simples e acurado no rastreamento de pacientes com hipercortisolismo endógeno. Pela facilidade de coleta, a dosagem do cortisol salivar pode, ainda, auxiliar na avaliação de alguns pacientes com hipercortisolismo intermitente (5) e principalmente no diagnóstico de hipercortisolismo na criança (7,23). Vale ressaltar que o teste de cortisol salivar às 24:00h pode também ser útil em facilitar o rastreamento de hipercortisolismo em populações de alto risco (por exemplo, pacientes com diabetes mellitus, hipertensão arterial ou síndrome metabólica).

A dosagem do cortisol salivar tem se tornado cada vez mais popular nos EUA e mesmo no Brasil. É importante que o pesquisador ou o clínico estejam cientes das possíveis diferenças geradas pelos diferentes ensaios para interpretar adequadamente os intervalos de referências. Os ensaios para o cortisol salivar devem ser padronizados e interpretados com base em valores de corte obtidos em cada laboratório utilizando amostras de controles normais da população, de obesos, e outros pacientes com pseudo-Cushing e de pacientes com síndrome de Cushing comprovada. Os laboratórios de pesquisa ou laboratórios comerciais devem, desta forma, realizar a validação de seus ensaios para dosagem de cortisol salivar, tornando-os disponíveis à prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Murphy BEP. Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1968;28:343-8.

2. Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF. Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. **Clin Chem** 1978;24:1460-3.
3. Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, Shimada T, Miura F, Sato T. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. **Clin Chim Acta** 1981;110:245-53.
4. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. **Clin Endocrinol** 1996;44:157-61.
5. Raff H, Raff JL, Findling JW. Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:2681-6.
6. Castro M, Elias PCL, Quidute AR, Halah FPB, Moreira AC. Outpatient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:878-82.
7. Martinelli CE, Sader SL, Oliveira EB, Daneluzzi JC, Moreira AC. Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children. **Clin Endocrinol** 1999;51:67-71.
8. Antonini SR, Jorge SM, Moreira AC. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. **Clin Endocrinol** 2000;52:423-6.
9. Raff H. Salivary cortisol: a useful measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome and the evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **The Endocrinologist** 2000;10:9-17.
10. Chen Y-M, Cintron NM, Whitson PA. Long-term storage of salivary cortisol samples at room temperature. **Clin Chem** 1992;38:304-5.
11. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE Jr. Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. **J Pediatr** 2002;140:116-8.
12. Price DA, Close GC, Fielding BA. Age of appearance of circadian rhythm in salivary cortisol values in infancy. **Arch Dis Child** 1983;58:454-6.
13. Mirmiran M, Kok JH. Circadian rhythms in early human development. **Early Hum Dev** 1991;26:121-8.
14. McMillen IC, Kok JS, Adamson TM, Deayton JM, Nowak R. Development of circadian sleep-wake rhythms in preterm and full-term infants. **Pediatr Res** 1991;29:381-4.
15. Scott SM, Watterberg KL. Effect of gestational age, post-natal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants. **Pediatr Res** 1995;37:112-6.
16. Terstegen C, Koot HM, Koudijs SM, de Boer JB, Weijers EM, de Jong FH, et al. Salivary cortisol in children with cognitive impairment. **Dev Med Child Neurol** 2003;45:139-40.
17. den Hartog HM, Nicolson NA, Derix MM, van Bommel AL, Kremer B, Jolles J. Salivary cortisol patterns and cognitive speed in major depression: a comparison with allergic rhinitis and healthy control subjects. **Biol Psychol** 2003;63:1-14.
18. Vedhara K, Miles J, Bennett P, Plummer S, Tallon D, Brooks E, et al. An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. **Biol Psychol** 2003;62:89-96.
19. Leal CG, Parente ACVB, Del-Ben CM, Guimarães FS, Moreira AC, Elias LLK, et al. Effects of simulated public speaking on activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in panic patients (2003; submitted).
20. Lac G, Chamoux A. Elevated salivary cortisol levels as a result of sleep deprivation in a shift worker. **Occup Med (Lond)** 2003;53:143-5.
21. Gaab J, Huster D, Peisen R, Engert V, Heitz V, Schad T, et al. Assessment of cortisol response with low-dose and high-dose ACTH in patients with chronic fatigue syndrome and healthy comparison subjects. **Psychosomatics** 2003;44:113-9.
22. Hill CM, Walker RV. Salivary cortisol determinations and self-rating scales in the assessment of stress in patients undergoing the extraction of wisdom teeth. **Br Dent J** 2001;191:513-5.
23. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I, Nieman LK. Night-time salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:4515-21.
24. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. **Endocr Rev** 1998;19:647-72.
25. Orth DN. Differential diagnosis of Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1995;325:957-95.
26. Orth DN. The adrenal. In: **Williams textbook of endocrinology**. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. p.551-91.
27. Luthold WW, Marcondes JAM, Wajchenberg BL. Salivary cortisol for the evaluation of Cushing's syndrome. **Clin Chim Acta** 1985;151:33-9.
28. Contreras LN, Hane S, Tyrrell JB. Urinary cortisol in the assessment of pituitary-adrenal function: utility of 24-hour and spot determinations. **J Clin Endocrinol Metab** 1986;62:965-9.
29. Newell-Price J, Trainer P, Perry L, Wass J, Grossman A, Besser M. A single sleeping midnight cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. **Clin Endocrinol** 1995;43:545-50.
30. Papanicolaou DA, Yanovski JA, Cutler GB, Chrousos GP, Nieman LK. A single midnight cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:1163-7.
31. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. **Metabolism** 1979;28:955-77.
32. Bolufer P, Gandia A, Rodríguez A, Antonio P. Salivary corticosteroids in the study of adrenal function. **Clin Chim Acta** 1989;183:217-26.
33. Read GF, Walker RF, Wilson DW, Griffiths K. Steroid analysis in saliva for the assessment of endocrine function. **Ann NY Acad Sci** 1990;595:260-74.
34. Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP. Salivary cortisol measurements: a practical approach to assess pituitary-adrenal function. **J Clin Endocrinol Metab** 1988;66:343-8.
35. Kahn J-P, Rubinow DR, Davis CL, Kling M, Post RM. Salivary cortisol: a practical method for evaluation of adrenal function. **Biol Psychol** 1988;23:335-49.

36. Liddle GW. Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1960;20:1539-60.
37. Yanovsky JA, Cutler GB, Chrousos GP, Niewman LK. Corticotropin-releasing hormone stimulation test following a low dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. **JAMA** 1993;269:2232-8.
38. Orth DN. Differential diagnosis of Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1995; 325:957-95.
39. Aron DC, Findling JW, Fitzgerald PA, et al. Pituitary ACTH dependency of nodular adrenal hyperplasia in Cushing's syndrome: report of two cases and review of the literature. **Am J Med** 1981;71:302-6.
40. Nieman LK, Oldfield EH, Wesley R, Chrousos GP, Loriaux DL, Cutler GB Jr. A simplified morning ovine corticotropin-releasing hormone stimulation test for the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77:1308-12.
41. Oldfield EH, Doppman JL, Nieman LK, Chrousos GP, Miller DL, Katz DA, et al. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. **N Engl J Med** 1991;325:897-905.
42. Webb-Peploe MM, Spathis GS, Reed PI. Cushing's syndrome: use of lysine vasopressin to distinguish overproduction of corticotrophin by pituitary from others causes of adrenal cortical hyperfunction. **Lancet** 1967;1:195-7.
43. Malerbi DA, Mendonça BB, Liberman B, et al. The desmopressin stimulation test in the diagnosis of Cushing's syndrome. **Clin Endocrinol** 1993;38:463-72.
44. Tabarin A, San Galli F, Dezous S, et al. The corticotropin-releasing factor test in the differential diagnosis of Cushing's syndrome: a comparison with the lysine-vasopressin test. **Acta Endocrinol** 1990;123:331-8.
45. Dickstein G, DeBold CR, Gaitan D, et al. Plasma corticotropin and cortisol responses to ovine corticotropin-releasing hormone (CRH), arginine vasopressin (AVP) and CRH plus metyrapone in patients with Cushing disease. **Clin Endocrinol** 1996;81:2934-41.
46. Lienhardt A, Grossman AB, Dacie JE, Evanson J, Huebner A, Afshar F, et al. Relative contributions of inferior petrosal sinus sampling and pituitary imaging in the investigation of children and adolescents with ACTH-dependent Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:5711-4.
47. Oldfield EH, Chrousos, Schulte HM, et al. Pre-operative lateralization of ACTH-secreting pituitary microadenoma by simultaneous inferior petrosal sinus sampling. **N Engl J Med** 1985;312:100-3.
48. Lefournier V, Martinie M, Vasdev A, Bessou P, Passagia JG, Labat-Moleur F, et al. Accuracy of bilateral inferior petrosal or cavernous sinuses sampling in predicting the lateralization of Cushing's disease pituitary microadenoma: influence of catheter position and anatomy of venous drainage. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:196-203.
49. Castro M, Elias PC, Martinelli CE Jr, Antonini SR, Santiago L, Moreira AC. Related articles, links salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. **Braz J Med Biol Res** 2000;33:1171-5.
50. Castro M, Elias LLK, Elias PCL, Moreira AC. A dose response study of salivary cortisol after dexamethasone suppression test in Cushing disease and its potential use in the differential diagnosis of Cushing syndrome **Clin Endocrinol** 2003 (in press).
51. Flack MR, Oldfield EH, Cutler Jr GB, et al. Urine free cortisol in the high-dose dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of the Cushing's syndrome. **Ann Intern Med** 1992;116:211-7.
52. Cope CL, Black EG. The reliability of some adrenal function tests. **Br Med J** 1959;28:1117-22.
53. Vieira JGH, Noguti KO, Hidal JT, Russo EMK, Maciel RMB. Measurement of saliva cortisol as a method for the evaluation of free serum fraction. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1984;28:8-10.
54. Raff H, Homar PJ, Burns EA. Comparison of two methods for measuring salivary cortisol. **Clin Chem** 2002;48:207-8.
55. Raff H, Homar PJ, Skoner DP. New enzyme immunoassay for salivary cortisol. **Clin Chem** 2003;49:203-4.
56. Chiu SK, Collier CP, Clark AF, Wynn-Edwards KE. Salivary cortisol on ROCHE Elecsys immunoassay system: pilot biological variation studies. **Clin Biochem** 2003;36:211-4.

Endereço para correspondência:

Margaret Castro
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
14049-900 Ribeirão Preto, SP
Fax: (016) 633-1144
e.mail: castrom@fmrp.usp.br / acmoreir@fmrp.usp.br