

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE**  
**RIBEIRÃO PRETO**

**MARIANA PEDUTI HALAH**

**Avaliação dos Testes de Estímulo de Cortisol no**  
**Diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central em**  
**Crianças e Adolescentes**

**Ribeirão Preto**  
**2023**

MARIANA PEDUTI HALAH

# **Avaliação dos Testes de Estímulo de Cortisol no Diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central em Crianças e Adolescentes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo programa de Mestrado Profissional em Medicina.

Área de concentração: Medicina

**Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini**

**Ribeirão Preto**

**Versão Corrigida – dezembro de 2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Halal, Mariana Peduti

Avaliação dos Testes de Estímulo de Cortisol no Diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central em Crianças e Adolescentes

82 p

Dissertação de Mestrado profissional em Medicina apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini

1. Cortisol; 2. Insuficiência adrenal central; 3. Teste de estímulo de cortisol;

Nome: HALAH, Mariana Peduti

Título: Avaliação dos Testes de Estímulo de Cortisol no Diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central em Crianças e Adolescentes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP-USP – para defesa de projeto desenvolvido no programa de Mestrado Profissional em Medicina e obtenção do título de Mestre em Medicina.

Aprovada em: 31 de outubro de 2023.

Banca examinadora:

Prof.Dr.: Sonir Roberto Rauber Antonini

Instituição:FMRP-USP

Julgamento: Aprovada

Prof.Dr.: Mauro Antonio Czepielewski

Instituição: UFRGS

Julgamento: Aprovada

Prof.Dr.: Paulo Ferrez Collett Solberg

Instituição: UERJ

Julgamento: Aprovada

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente minha família. Aos meus pais, Fernanda e Ricardo, que sempre foram meus maiores incentivadores a fazer o que mais gosto, estudar. Sempre me deram apoio, abriram portas e nunca mediram esforços para que eu pudesse ter acesso a todas as oportunidades acadêmicas possíveis.

Ao meu marido Luís, que sempre me estimulou a ir um passo além, que sempre acreditou em mim e que divide diariamente comigo o amor pela ciência, a Medicina e a Pediatria.

Ao meu irmão Alexandre, que me inspira a sempre ter criatividade.

Aos meus avós, Therezinha e Said, e Sandra e Emílio, que sempre colocaram o estudo como prioridade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Sonir R. R. Antonini, que desde o segundo ano da faculdade esteve presente na minha formação, sempre com maestria e de forma brilhante, e foi o maior impulsionador para minha escolha da carreira em Endocrinologia Pediátrica.

À Professora Lucila L. K. Elias, que foi responsável pela minha iniciação na ciência, por quem tenho grande respeito e admiração.

À minha amiga e colega de mestrado, Ana Carolina Maia Teodózio, por me convidar para trabalhar com ela, fazer esse projeto possível, me ensinar muito e confiar em mim.

Aos médicos assistentes e docentes que contribuíram e contribuem para minha formação, Dra Patricia Volpon, Dra Monica Stecchini, Dra Mariana Sarti, Dr Rodrigo Custódio, Dra Nathália Bordeira e Professor Raphael Liberatore.

Ao estatístico do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP, Davi C. Aragon, pela paciência e comprometimento em elaborar o trabalho conosco e no ensino de estatística em cada reunião.

Ao analista de sistemas do Departamento De Puericultura e Pediatria da FMRP USP, Carlos Alberto S. L. Junior, pela ajuda com o formulário eletrônico que desenvolvemos para o REDcap.

Aos funcionários do Laboratório de Endocrinologia do HC FMRP USP, José Roberto e Fernanda, pelo auxílio no acesso aos registros para coleta de dados e aos docentes e médicos assistentes responsáveis pelo Laboratório, Prof. Dr. Ayrton C. Moreira, Profª. Dra. Margaret de Castro e Dra Paula Lamparelli Elias pelo rigor

científico e pela organização em manter todos estes dados por todo o período deste estudo.

Aos pacientes que contribuíram com a participação nesta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

HALAH, M.P. **Avaliação dos Testes de Estímulo de Cortisol no Diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central em Crianças e Adolescentes.** 2023. Dissertação de Mestrado Profissional em Medicina – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2023.

**Introdução:** A mensuração do pico de cortisol plasmático após estímulo farmacológico induzido pelo teste de tolerância à insulina (ITT) e pelo glucagon é frequentemente necessária para confirmar ou afastar o diagnóstico de Insuficiência Adrenal Central (IAC). Entretanto, os pontos de corte do cortisol ainda são controversos e os testes não são isentos de complicações.

**Objetivos:** Em pacientes que realizaram ITT e teste do glucagon avaliar: a correlação entre os testes diagnósticos avaliados (cortisol basal, ITT e glucagon), a concordância entre o teste de ITT e o glucagon, sensibilidade diagnóstica destes testes e a frequência de complicações e intercorrências.

**Materiais e métodos:** Estudo observacional longitudinal retrospectivo que incluiu pacientes entre 6 meses e 18 anos de idade submetidos a testes de estímulo de cortisol no HCFMRP-USP entre janeiro de 2001 e dezembro de 2016. O cortisol foi dosado por radioimunoensaio (RIE) pelo mesmo método durante todo o estudo. Os testes de estímulo foram realizados na sala de provas de endocrinologia sob supervisão médica e seguindo o mesmo protocolo durante todo o estudo. De acordo com as concentrações de cortisol (F; mcg/dL), basal (F<sub>basal</sub>) e pico pós-estímulo (F<sub>pico</sub>) os pacientes foram classificados em três grupos: IAC (F<sub>basal</sub> < 5 ou F<sub>pico</sub> < 15), Indeterminado (F<sub>basal</sub>= 5 a 13 mcg/dL ou F<sub>pico</sub>=15-18) e Normal (F<sub>basal</sub> > 13 mcg/dL ou F<sub>pico</sub> > 18). Para avaliar os melhores pontos de corte, construímos curvas ROC utilizando ITT ou necessidade de tratamento medicamentoso como padrão-ouro e avaliamos a sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança (LR) para F<sub>basal</sub> e F<sub>pico</sub>. Avaliamos a existência de correlação entre F<sub>basal</sub> e F<sub>pico</sub> por meio do teste de Kappa. A concordância entre os testes ITT e Glucagon foi avaliada pelo método de Bland-Altman. Avaliamos a frequência de eventos adversos nos testes. Avaliamos a correlação entre cortisol basal dosado pré teste vs basal colhido nos horários -15 e 0 minutos dos teste de ITT e glucagon pelo coeficiente de correlação de

Spearman. Comparamos Fbasal e Fpico em pacientes com ou sem DGH, neurohipófise ectópica e síndrome da haste interrompida pelo método t de Student e pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Comparamos Fbasal e Fpico de pacientes que utilizaram medicações ou foram expostos a radioterapia com aqueles que não utilizaram medicações nem foram submetidos a radioterapia pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Comparamos Fbasal e Fpico de pacientes que tinham antecedentes neonatais sugestivos de hipopituitarismo através do teste de Kruskal-Wallis. Comparamos Fbasal e Fpico de pacientes com 6 meses a 2 anos com pacientes com idade superior a 2 anos pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Para avaliação de quais possíveis variáveis categóricas ou numéricas poderiam indicar um determinado resultado no Fpico em uma relação de regressão, construímos uma *Conditional Inference Tree*.

**Resultados:** Foram avaliados 904 pacientes (60,1% masculino; 10,1 anos [0,1 - 17,7]), a maioria com baixa estatura (escore Z estatura= -2,6; [-10 a 3,8]) e 17,2% apresentaram sinais de hipopituitarismo no período neonatal. A importância dos testes estímulo foi confirmada pelos dados do Fbasal: Fbasal de 3,5 mcg/dL teve especificidade de 99% porém baixa sensibilidade (5,3%) e LR+ (7,6), enquanto que o valor de 13 mcg/dL apresenta especificidade (45%) e sensibilidade baixas (82%). No teste do glucagon, Fpico = 11 mcg/dL teve maior acurácia diagnóstica, com LR+ de 2,8 e alta especificidade de 94% às custas de sensibilidade baixa (17%). A correlação entre cortisol basal anterior a realização do teste de estímulo e a medida do cortisol basal no ITT e no teste de estímulo de glucagon foi forte-moderada (coeficiente de Spearman = 0,74 ITT e 0,58 Glucagon). Observamos que Fbasal de pacientes com neurohipófise ectópica e pacientes com síndrome da haste hipofisária interrompida é menor do que pacientes se esses achados na RNM ( $p < 0,01$ ). Destes, apenas pacientes com neurohipófise ectópica tinham Fpico menor do que pacientes controle ( $p < 0,01$ ). Dentre aqueles que fizeram uso de medicações, uso de corticoide oral, anticonvulsivantes e radioterapia demonstraram apresentar Fbasal menor ( $p < 0,01$ ), mas sem alterações em Fpico. Houve concordância fraca entre o Fpico e Fbasal (Kappa= 0,25; 0,2 - 0,3). A concordância entre o ITT e glucagon foi boa na maioria dos pontos observados, com mediana das diferenças entre Fpico nos dois testes próxima de zero, principalmente nos valores abaixo de 18 mcg/dL. Durante o ITT, 59,1% dos pacientes apresentaram sinais de hipoglicemia e a suplementação de



glicose foi necessária em 18,6%, sendo 10,1% por via EV. Destes, 1,4% (n= 8) necessitaram de observação clínica após o teste e 1 paciente necessitou permanecer internado. No teste do glucagon, 13,1% dos pacientes apresentaram intercorrência, sendo a maioria náuseas e/ou vômitos. Destes, 2% (n= 2), necessitaram de internação hospitalar. Não houve mortes ou sequelas permanentes.

**Conclusões:** Fbasal não apresenta boa acurácia diagnóstica e testes de estímulo de cortisol são necessários na maioria dos pacientes com suspeita ou possibilidade de IAC, descartando o diagnóstico na maioria dos pacientes. Os testes de ITT e glucagon são seguros e possuem excelente acurácia para diagnóstico de IAC.

**Palavras-chave:** Cortisol, insuficiência adrenal central, teste de estímulo, ITT, glucagon.

## ABSTRACT

HALAH, M.P. **Evaluation of Cortisol Stimulation Tests in the Diagnosis of Central Adrenal Insufficiency in Children and Adolescents.** 2023. Dissertation for the Professional Master's Program in Medicine – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2023.

**Introduction:** Measuring peak plasma cortisol after pharmacological stimulation induced by insulin tolerance test (ITT) and glucagon is often necessary to confirm or rule out the diagnosis of Central Adrenal Insufficiency (CAI). However, cortisol concentration's cutoffs are still controversial, and these tests may result in adverse effects.

**Objectives:** In patients who underwent ITT and glucagon test, to evaluate: the correlation between the diagnostic tests evaluated (baseline cortisol, ITT, and glucagon), the agreement between the ITT test and glucagon, the diagnostic sensitivity of these tests, and the frequency and severity of the adverse effects.

**Materials and Methods:** Retrospective longitudinal observational study including patients between 6 months and 18 years of age who underwent cortisol stimulation tests at the HCFMRP-USP between January 2001 and December 2016. Cortisol was measured by radioimmunoassay using the same method throughout the whole study. Cortisol stimulation tests were performed by a physician and followed the same protocol throughout the study. According to cortisol concentrations (F; mcg/dL), baseline (F<sub>basal</sub>) and post-stimulus peak (F<sub>peak</sub>) patients were classified into three groups: IAC (F<sub>basal</sub> < 5 or F<sub>peak</sub> < 15), Indeterminate (F<sub>basal</sub>= 5 to 13 mcg/dL or F<sub>peak</sub>=15-18 ) and Normal (F<sub>basal</sub> > 13 mcg/dL or F<sub>peak</sub> > 18). To assess the best cutoff points, we constructed ROC curves and evaluated the sensitivity, specificity and likelihood ratios (LR) for F<sub>basal</sub> and F<sub>peak</sub>. We evaluated the correlation between F<sub>basal</sub> and F<sub>peak</sub> using the Kappa test. The agreement between the ITT and Glucagon tests was evaluated by the Bland-Altman method. We evaluated the frequency of adverse events in these tests. We evaluated the correlation between F<sub>basal</sub> and cortisol at times -15 min and 0 min in the stimulation tests by Spearman correlation coefficient. We compared F<sub>basal</sub> and F<sub>peak</sub> between patients with and without GH deficit, with or without ectopic neurohypophysis and with or without

interrupted stalk syndrome by Student's t test and non-parametric Wilcoxon test. We compared Fbasal and Fpeak of patients that were exposed to medication or radiation with those that were not exposed by using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test. We compared Fbasal and Fpeak of patients that referred neonatal symptoms that were compatible with hypopituitarism by using the Kruskal-Wallis test. We compared patients who underwent cortisol stimulation tests between the ages of 6 months and 2 years and compared Fbasal and Fpeak with patients older than 2 years at the time of the test by using the Wilcoxon non-parametric test. In order to evaluate which categorical or numerical variables could indicate certain results in Fpeak, we constructed a Conditional Inference Tree.

**Results:** A total of 904 patients were evaluated (60.1% male; median age 10.1 years [0.1 - 17.7]), most with short stature (height Z score= -2.6; [-10 to 3.8]) and 17.2% presented with signs of hypopituitarism in the neonatal period. The Fbasal data confirmed the importance of the stimulation tests: Fbasal (mcg/dL) of 3.5 had a specificity of 99% but low sensitivity (5.3%) and LR+ (7.6), while a value of 13 showed low specificity (54%) and sensitivity (82%). In glucagon stimulation test, Fpeak of 11 mcg/dL showed highest diagnostic accuracy (LR+ of 2.8) and high specificity (94%), with a low sensitivity (17%). Correlation between basal cortisol performed before the test and cortisol at -15 and 0 min at the stimulation tests was strong-moderate (Spearman coefficient = 0.74 for ITT and 0.58 for Glucagon). We observed that Fbasal was lower in patients with ectopic neurohypophysis and interrupted stalk syndrome ( $p < 0.01$ ) and Fpeak was lower in patients with ectopic neurohypophysis ( $p < 0.01$ ). Patients that used oral corticosteroids, anticonvulsants and those that underwent radiotherapy had a lower Fbasal ( $p < 0.01$ ), but showed no difference in Fpeak. There was a weak agreement between Fpeak and Fbasal (Kappa= 0.25; 0.2 - 0.3). The agreement between ITT and glucagon was adequate in most observed points, the median was close to zero, especially in concentrations lower than 18 mcg/dL. During the ITT, 46% of the patients showed signs of hypoglycemia, and glucose supplementation was required in 16.7%, being 5.7% by IV. Of these, 1.4% ( $n = 3$ ) required clinical observation after the tests but did not require hospitalization. 17.5% of the patients had complications in the glucagon test, mostly nausea and vomiting. Of these, 1.9% ( $n = 3$ ) required hospitalization. There were no deaths or permanent sequelae.

**Conclusions:** In children and adolescents, Fbasal does not present good diagnostic accuracy, and cortisol stimulation tests are necessary for most patients with suspected or possible IAC. The ITT and glucagon tests are safe and ITT has excellent accuracy for diagnosing IAC.

**Keywords:** Cortisol, central adrenal insufficiency, stimulation test, ITT, glucagon.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Amostra referente aos testes de estímulo de cortisol de 2001 a 2016.....	34
<b>Figura 2</b> – Proporção dos eixos hipofisários mais acometidos nos pacientes com hipopituitarismo anterior parcial.....	46
<b>Figura 3</b> – Proporção de pacientes em cada categoria (IAC, normal ou indeterminado) de acordo com os resultados em cada um dos três testes de cortisol avaliados: cortisol basal, ITT e teste de estímulo com glucagon.....	47
<b>Figura 4</b> – Valores obtidos no ITT e teste de estímulo de glucagon durante avaliação do teste.....	48
<b>Figura 5</b> – Sensibilidade e especificidade da dosagem de cortisol basal no diagnóstico de insuficiência adrenal central.....	49
<b>Figura 6</b> – Sensibilidade e especificidade do teste de glucagon no diagnóstico de insuficiência adrenal central .....	50
<b>Figura 7</b> – Concordância entre os testes ITT e Glucagon avaliada pelo método de Bland-Altman.....	52
<b>Figura 8</b> - Correlação entre cortisol basal anterior a realização do teste de estímulo e a medida de cortisol no basal do ITT e teste de estímulo com glucagon.....	53
<b>Figura 9</b> - Comparação de F <sub>basal</sub> de pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.....	55
<b>Figura 10</b> - Comparação de F <sub>pico</sub> entre pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.....	56

<b>Figura 11</b> – Comparação entre médias de Fbasal em pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.....	57
<b>Figura 12</b> – Comparação entre médias de Fpico em pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.....	58
<b>Figura 13</b> – Comparação entre Fbasal em pacientes lactentes e maiores de 2 anos de idade pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.....	60
<b>Figura 14</b> – Comparação entre medias de Fpico em pacientes lactentes e maiores de 2 anos de idade pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. ....	60
<b>Figura 15</b> – Comparação entre Fbasal de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia. ....	61
<b>Figura 16</b> – Comparação entre Fpico de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia.....	62
<b>Figura 17</b> – Comparação entre Fbasal de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo.....	63
<b>Figura 18</b> – Comparação entre Fpico de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo.....	63
<b>Figura 19</b> – <i>Conditional inference tree</i> para os pacientes submetidos a ITT, sendo a classificação dos pacientes baseado no Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação.....	65
<b>Figura 20</b> – <i>Conditional inference tree</i> para os pacientes submetidos a ITT, sendo o Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação por boxplots para cada ponto de corte de Fbasal. Significância estatística demonstrada pelo p valor em cada nodo de bifurcação.....	66

**Figura 21** – *Conditional inference tree* para os pacientes submetidos a glucagon, sendo o Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação por boxplots para cada ponto de corte de Fbasal ou T4 livre e para presença ou ausência de suspeita clínica prévia de hipopituitarismo. Significância estatística demonstrada pelo p valor em cada nodo de bifurcação.....67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Proporção de sinais neonatais sugestivos de hipopituitarismo.....	36
<b>Tabela 2</b> – Proporção das medicações de uso prévio/crônico mais encontradas e da exposição prévia a radioterapia.....	36
<b>Tabela 3</b> – Frequência de achados sindrômicos encontrados nos pacientes que apresentavam traços de doenças sindrômicas.....	37
<b>Tabela 4</b> – Dados bioquímicos dos pacientes submetidos a testes de estímulo para cortisol.....	39
<b>Tabela 5</b> – Achados radiológicos na RNM de encéfalo ou sela túrcica.....	40
<b>Tabela 6</b> – Frequência de hipoglicemia efetiva, efeitos colaterais observados e manejo clínico dos pacientes submetidos ao ITT.....	42
<b>Tabela 7</b> – Frequência de hipoglicemia efetiva, efeitos colaterais observados e manejo clinic dos pacientes submetidos ao ITT.....	42
<b>Tabela 8</b> – Concentração de glicemia basal e nadir dos ITT, com tempo de recuperação da glicemia.....	43
<b>Tabela 9</b> – Frequência de complicações durante a realização dos testes de estímulo com glucagon.....	44
<b>Tabela 10</b> – Proporção de diagnósticos finais estabelecidos após realização dos testes de estímulo.....	45
<b>Tabela 11</b> – Concentração de cortisol (pico, em mcg/dL) nos diferentes testes em cada grupo de pacientes.....	48



**Tabela 12** – Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste t de Student.....55

**Tabela 13** – Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste t de Student.....57

**Tabela 14** – Comparação entre médias de Fbasal e de Fpico em pacientes com ou sem DGH isolado pelo teste t de Student.....59

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina

DGH – Déficit de hormônio de crescimento

DP – Desvio padrão

GH – Hormônio de crescimento

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IA – Insuficiência adrenal

IAC – Insuficiência Adrenal Central

IAP – Insuficiência Adrenal Primária

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

ITT - Teste de tolerância a insulina

LR - *Likelihood ratio* (Razão de verossimilhança)

POMC - Pró-opiomelanocortina

RNM – Ressonância nuclear magnética

SDS - *Standard deviation score*

T4L – T4 livre

TSH- hormônio tireotrófico

VC - Velocidade de Crescimento

VPP - Valor preditivo positivo

VPN - Valor preditivo negativo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1: Objetivos primários .....	27
2.2: Objetivos secundários.....	27
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
3.1: Delineamento do estudo.....	28
3.2: Amostragem.....	29
3.3: Coleta de dados.....	28
3.4: Parâmetros coletados.....	28
3.4.1:Clínicos.....	28
3.4.2:Laboratoriais.....	29
3.4.3: Imagem.....	30
3.5: Critérios de inclusão e exclusão.....	30
3.6: Parâmetros Laboratoriais e Análise Estatística.....	31
3.7: Aspectos éticos.....	32
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. Caracterização geral dos testes de estímulo realizados entre 2001-2016: faixa etária e estímulo realizado.....	34
4.2. Caracterização da população pediátrica submetida a teste de estímulo entre 2001-2016.....	35
4.3. Caracterização dos testes de estímulo realizados em crianças e adolescentes entre 2001-2016.....	41
4.4. Levantamento dos resultados dos testes de estímulo e diagnósticos finais obtidos.....	44
4.5. Avaliação da concordância dos testes de estímulo.....	50
4.6. Comparação entre cortisol basal anterior a realização do teste de estímulo e a medida de cortisol no basal do teste de estímulo.....	52
4.7. Comparação entre Fbasal e Fpico em diferentes grupos de pacientes.....	54
4.7.1. Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com neurohipófise ectópica e pacientes sem o diagnóstico.....	54
4.7.2. Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com síndrome da haste interrompida e pacientes sem o diagnóstico.....	56

4.7.3. Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com deficit de GH isolado e pacientes sem DGH.....	58
4.7.4. Comparação entre Fbasal e Fpico de pacientes lactentes (entre 6 meses e 2 anos de idade) e pacientes acima de 2 anos de idade.....	59
4.7.5. Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia.....	61
4.7.6. Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo.....	62
4.8. Avaliação de possíveis preditores de resultado no teste de estímulo baseado em regressão múltipla com análise de diversas variáveis por meio de <i>Conditional Inference Tree</i> .....	64
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência adrenal (IA) é um quadro clínico grave e que pode ter repercussões importantes para o paciente e inclusive ser ameaçadora da vida. Por esta razão, é imprescindível seu diagnóstico precoce e o manejo adequado.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) age controlando a liberação de cortisol (glicocorticóide) e androgênios adrenais pelo córtex suprarrenal (Charmandari et al, 2005). O ACTH é produzido nas células corticotrófica da hipófise após estímulo pelo CRH liberado pelo hipotálamo (Charmandari et al, 2005). O ACTH é derivado da clivagem da POMC pela PC-1 (Charmandari et al, 2005). Por outro lado, o controle da liberação de aldosterona (mineralocorticóide) é exercido principalmente pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (Charmandari et al, 2005).

O eixo HHA é regulado pelo ritmo circadiano e os genes do relógio (Moreira et al, 2018). Os sincronizadores ambientais agem a nível central, culminando em propagação de sinais através do núcleo supraquiasmático no hipotálamo para outros núcleos hipotalâmicos, adenohipófise, glândula pineal e adrenal, controlando de forma hierárquica os genes do relógio e a liberação plasmática de cortisol (Moreira et al, 2018). A formação dos núcleos hipotalâmicos associados aos genes do relógio e ritmo circadiano se desenvolvem no período pré natal e a regulação eixo HHA em termos de maturidade ocorre de forma gradual, geralmente se estabelece entre 8 e 12 semanas de vida pós natal, mas pode ser diferente para cada indivíduo (Moreira, et al 2018). O conhecimento do ritmo circadiano e seu desenvolvimento e maturação em humanos é importante para considerações acerca do diagnóstico e tempo de coleta de exames e para o tratamento dos pacientes com insuficiência adrenal.

A IA primária (IAP) resulta de alterações primárias da estrutura e/ou função da adrenal, com redução tanto da produção de glicocorticoides como de mineralocorticoides (Charmandari et al, 2014). O termo doença de Addison é mais frequentemente empregado para IAP causada por doença autoimune, sendo esta a causa mais frequente em pacientes adultos (Erichsen et al, 2009). Neste grupo, principalmente, a IAP pode ser causada também por algumas doenças infecciosas incluindo paracoccidiodomicose, tuberculose, citomegalovírus, vírus da imunodeficiência humana e sífilis, ou doenças neoplásicas. Em pacientes pediátricos e adolescentes, as causas genéticas como hipoplasia adrenal, resistência ao ACTH,

defeitos de síntese de esteróides adrenais (como exemplo a hiperplasia adrenal congênita) e a adrenoleucodistrofia são as principais causas de IAC (Bornstein et al, 2016; Charmandari et al, 2014; Guran T et al, 2017).

O diagnóstico da IAP envolve suspeita clínica relacionada aos sintomas mais comuns: fadiga generalizada, fraqueza, desidratação inexplicada por outras causas, hipotensão, perda de peso, crescimento deficiente, febre, dor abdominal e hiperpigmentação cutânea (Bornstein et al, 2016; Charmandari et al, 2014). O diagnóstico laboratorial envolve a demonstração de concentrações muito baixas de cortisol basal, na presença de concentrações plasmáticas de ACTH muito elevadas (Bornstein et al, 2016; Charmandari et al, 2014). Pode ocorrer também hipoglicemia. Em função da deficiência concomitante de aldosterona, a maioria dos pacientes apresenta também hiponatremia, hipercalemia, elevação da renina plasmática e redução da aldosterona (Bornstein et al, 2016; Charmandari et al, 2014).

Em pacientes com suspeita de IAP que apresentam resultados laboratoriais duvidosos, isto é, com concentrações de cortisol basal em faixa indeterminada e ACTH leve ou moderadamente elevado, pode-se utilizar o teste de estímulo agudo com ACTH. Para este teste, que avalia a reserva adrenal de cortisol utiliza-se um análogo sintético do ACTH que é infundido por via endovenosa. Concentração de cortisol após 60 minutos do estímulo menor que 18 mcg/dL confirma o diagnóstico (Bornstein et al, 2016; Charmandari et al, 2014).

Já os pacientes com insuficiência adrenal secundária ou central (IAC) têm redução de glicocorticóides devido a secreção insuficiente de ACTH ou CRH/ACTH causada por doença ou lesão na hipófise ou no hipotálamo, respectivamente (Charmandari et al, 2014). A prevalência de IAC varia de 150 a 280 para cada milhão e pessoas, sendo que a principal causa é a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) causado por uso prolongado de corticosteróides para tratamento de outras doenças (Charmandari et al, 2014). No entanto, também são importantes causas de IAC, devendo ser destacadas, as causas genéticas com alterações em genes específicos, associadas a síndromes, causas adquiridas e alterações anatômicas do sistema nervoso central (Charmandari et al, 2014; Bornstein 2009; Patti et al, 2018). A IAC pode ser causada por doenças hipotalâmicas ou hipofisárias. Pode ocorrer isoladamente (Andrioli et al, 2006) ou no contexto de hipopituitarismo, quando é acompanhada de outras deficiências hipofisárias (Higham et al, 2016; Webb e Dattani, 2015; Charmandari et al, 2014; Patti et al, 2018).

Dentre as causas genéticas de IAC isolada, podemos destacar alterações no gene *TBX19*, gene importante para diferenciação de células que produzem POMC (Couture et al, 2012). Mutações do *TBX19* são as principais causas de deficiência isolada de ACTH congênita (Couture et al, 2012). A deficiência de POMC também é uma causa conhecida de IAC por causa genética e envolve uma síndrome com fenótipo de cabelos ruivos, pele clara, obesidade grave associada a hiperfagia e deficiência isolada de ACTH (Krude et al, 1998). Outro gene conhecido, cuja deficiência pode culminar com deficiência de ACTH e IAC é o *PC1*, que codifica a enzima pró-convertase 1 (Jackson et al, 1997).

As alterações anatômicas craniofaciais e de sistema nervoso central são causas importantes de IAC. Dentre elas, destacam-se os defeitos de linha média, a displasia septo-óptica, holoprosencefalia, a síndrome da interrupção da haste hipofisária e cistos da bolsa de Rathke (Higham et al, 2016; Webb e Dattani, 2015).

Algumas síndromes genéticas que estão associadas a risco aumentado de IAC são: síndrome de Prader Willi (Corrias et al, 2012), síndrome de Pallister Hall (Demurger et al, 2015), síndrome de Webb Dattani (Webb et al, 2013), síndrome de Williams Beuren (Dayal et al, 2017) e síndrome CHARGE (Wong et al, 2016).

As manifestações clínicas da IAC estão relacionadas aos efeitos do hipocortisolismo e, secundariamente, à redução de androgênios adrenais nos pacientes durante a puberdade e na vida adulta (Charmandari et al, 2014). A deficiência de cortisol em neonatos pode causar hipoglicemia, convulsões e icterícia prolongada (Charmandari et al, 2014; Webb e Dattani, 2015; Patti et al, 2018). Em crianças e adolescentes com IAC pode também ocorrer infecções frequentes, fraqueza, fadiga, náuseas, cefaléia, mialgia e artralgia. Adolescentes do sexo feminino e mulheres adultas podem ter redução da quantidade de pelos corporais (Charmandari et al, 2014; Webb e Dattani, 2015; Patti et al, 2018). Deve-se destacar que esses pacientes não apresentarão as alterações eletrolíticas típicas da IAP, hiponatremia e hipercalemia. No entanto, pacientes com IAC podem apresentar hiponatremia dilucional, com potássio sérico dentro da normalidade (Charmandari et al, 2014). Em pacientes com IAC, diferente daqueles com IAP, não se observa hiperpigmentação cutâneo-mucosa (Charmandari et al, 2014). Outras alterações clínicas associadas podem resultar de outros defeitos hormonais que acompanham o déficit de ACTH, como baixa estatura por déficit de GH, alterações genitais e puberais pelo hipogonadismo ou sinais clínicos decorrentes do hipotireoidismo (Webb e Dattani, 2015). Além disso, podem

ocorrer alterações clínicas decorrentes da doença de base, como exemplos tumores de sistema nervoso central causando sintomas neurológicos associados ao efeito de massa.

O diagnóstico da IAC é feito por meio da análise do eixo HHA e pode ser iniciado com a dosagem de cortisol plasmático basal em amostra de sangue coletada entre 7 e 9 horas da manhã (Chrousos et al, 2009; Grossman, 2010). Este é um exame simples, mas que deve ser interpretado com cautela. A secreção de cortisol varia de acordo com o ritmo circadiano, como descrito anteriormente, tendo seu pico entre 6 e 9 horas da manhã (Chrousos et al, 2009; Grossman, 2010), período em que está indicada a coleta da amostra para a investigação da IA. Caso o paciente apresente concentrações plasmáticas de cortisol basal abaixo de 3,0 mcg/dL nesse horário, a probabilidade de IA é bastante alta. Por outro lado, caso o paciente apresente cortisol plasmático em concentração acima de 13 mcg/dL nesse horário, a possibilidade deste diagnóstico se reduz muito (Grossman, 2010). Um estudo mais recente (Gasco et al 2021), demonstrou que concentrações abaixo de 4 mcg/dL têm sensibilidade de 13,8% e especificidade de 98,7% para diagnóstico de IA, enquanto que o valor de 11 mcg/dl teve o melhor valor de sensibilidade (87,7%) e especificidade (46,1%) para diagnóstico de IA. Considerando variações de cortisol basal de acordo com diversos fatores, principalmente o ritmo circadiano, e também por que em muitos pacientes com IAC, a concentração matinal de cortisol plasmático se situa entre estes dois limites, surge a necessidade de testar o eixo HHA utilizando testes de estímulo farmacológicos.

O teste de estímulo para avaliar a secreção de cortisol considerado o padrão-ouro para diagnóstico de IAC é o Teste de Tolerância à Insulina ou ITT (do inglês, *Insulin Tolerance Test*). Este teste de estímulo coloca o organismo em situação de estresse por meio de indução de hipoglicemia, gerando ativação rápida do eixo HHA. Neste teste, é aferida a concentração de cortisol basal (tempo zero) e após 30, 60 e 90 minutos da injeção intravenosa de 0,1 UI/kg de insulina. O estímulo hipoglicêmico é considerado totalmente efetivo quando há queda de pelo menos 50% da glicemia basal ou para concentrações menores do que 45 mg/dL. Resposta normal, isto é, insuficiência adrenal é descartada se a resposta máxima (pico) de cortisol atinge concentrações maiores que 18 a 20 mcg/dL (Chrousos et al, 2009; Grossman, 2010). Esse teste é considerado de risco para pacientes com doenças cardíacas, histórico de hipoglicemias severas ou convulsões. Além disso, por princípio de segurança,



habitualmente ele não é realizado em crianças menores de 2 a 3 anos. Quando o ITT é contraindicado, podemos indicar realização de outros testes de estímulo, como o teste do ACTH, teste da metirapona e o teste do glucagon (Chrousos et al, 2009; Grossman, 2010).

O teste de estímulo com ACTH, utiliza análogo do ACTH para estímulo de liberação de cortisol pelo córtex adrenal. É um teste útil para avaliar insuficiência adrenal de curso crônico, visto que nos casos de insuficiência adrenal moderada ou recente não há atrofia cortical adrenal e o teste não é tão sensível, podendo o resultado ser falso negativo (Kazlauskaitė et al, 2008; Grossman, 2010). Uma metanálise demonstrou sensibilidade de 36 a 69% e especificidade de 91 a 99% do teste de estímulo com ACTH (Ospina NS et al, 2016). Portanto, é um teste adequado para afastar, mas não para confirmação do diagnóstico de IA.

O teste do glucagon é bastante útil para identificação de IAC e indicado em pacientes que não podem realizar o ITT. Neste teste, é aplicada injeção intramuscular de glucagon na dose de 1 mg ou 30 mcg/kg em crianças com menos de 6 anos de idade. O mecanismo proposto é de ativação alfa adrenérgica e estímulo a liberação de cortisol. Pico de cortisol abaixo de 14 mcg/dL indica fortemente IAC (Di Iorgi et al, 2010; Grossman, 2010). Um estudo realizado na Itália avaliou a acurácia do teste de glucagon em comparação com o ITT em pacientes com deficiência de GH no diagnóstico de IA (Di Iorgi et al, 2010). A maior proporção de pacientes corretamente diagnosticados no estudo (91,6%), com IAC confirmada ou com diagnóstico descartado, foi obtida com o ponto de corte da concentração de cortisol de 14,6 mcg/dl, com uma sensibilidade de 66,6% e especificidade de 100%. Além disso, os picos observados no teste de glucagon foram concordantes com aqueles obtidos no ITT. Um estudo realizado na Alemanha observou uma especificidade de 100% e sensibilidade de 32% para descartar o diagnóstico de IA considerando valores acima do cut-off de 21,7 mcg/dl (Berg et al, 2010). Em valores abaixo do cut-off de 10 mcg/dl, o teste apresentou sensibilidade de 72% e especificidade de mais de 95% no diagnóstico de insuficiência adrenal.

O teste da metirapona envolve administração de 30 mg/kg desta droga à meia-noite, visando a inibição da enzima 11-alfa hidroxilase, que é o último passo na síntese de cortisol. A inibição desta enzima resulta na redução da retroalimentação negativa do cortisol sobre o ACTH (Raff H, et al 1989). Considera-se o diagnóstico de insuficiência adrenal se o pico de 11-desoxicortisol permanecer abaixo de 7

mcg/dL. Um grupo da Universidade de Turim investigou o teste da metirapona para avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos pacientes com suspeita de insuficiência adrenal. No estudo, um ponto de corte de 5 mcg/dl de 11-desoxicortisol apresentou o par com as maiores sensibilidade e especificidade, sendo elas 64,3% e 82,4%, respectivamente (Giordano R et al, 2008). No entanto, devido ao risco de precipitar crise adrenal e dificuldade de conseguir a metirapona, este teste é raramente utilizado (Korpi-Steiner e Nerenz, 2020).

Portanto, considerando que nenhum dos testes é 100% sensível ou 100% específico, devemos considerar diversos aspectos para indicar os testes, na interpretação dos resultados após avaliação fina da metodologia de realização das coletas de amostra e análise de dosagem de cortisol (espectrometria de massa, imunofluorométrico ou radioimunoensaio) e correlacionar com apresentação clínica. É importante considerar a necessidade de avaliar os pacientes com alta probabilidade pré-teste de IAC, avaliar como e em qual faixa o cortisol basal pode prever o diagnóstico de IAC, considerar a possibilidade de deficiência de ACTH e realizar testes de estímulo a partir de uma indicação correta para garantir reconhecimento precoce de tal patologia e instituição de tratamento adequado para estes pacientes. Para tal, é necessário avaliar a acurácia dos testes de estímulo de cortisol para o diagnóstico de IAC, correlação dos resultados dos testes diagnósticos, incluindo cortisol basal, com os resultados obtidos nos testes de estímulo, e os desfechos, como desenvolvimento de crise adrenal ou necessidade de tratamento com corticosteroides.

É importante avaliar os resultados dos testes de estímulo para cortisol realizados em um hospital terciário do porte do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, considerando a gravidade da insuficiência adrenal subdiagnosticada e não tratada adequadamente. Necessita-se da avaliação da segurança desses testes e da análise dos pontos de corte vigentes utilizados para o diagnóstico e a indicação de tratamento. Além disso, muitos pacientes são testados mais de uma vez ao longo da vida, visto que a insuficiência adrenal pode evoluir após exames iniciais dentro dos parâmetros normais ou duvidosos. Adicionalmente, mostra-se necessário caracterizar o padrão de resposta a estes testes dos pacientes na faixa etária pediátrica que apresentam suspeita clínica de IAC e também aqueles com alterações hipofisárias anatômicas ou até déficit de GH, os quais podem evoluir com IAC (Cerbone e Dattani, 2017).

A hipótese principal deste projeto é de que os testes de estímulo de cortisol são eficazes e seguros para realização do diagnóstico de IAC.

Avaliamos neste estudo se os testes são solicitados de acordo com os protocolos atuais vigentes e se os valores obtidos no nosso serviço são concordantes com os valores da literatura. Avaliamos quantas e quais foram as complicações e intercorrências durante a realização dos testes de estímulo de cortisol. Observamos os resultados dos diferentes testes de estímulo e analisamos se existe associação entre o pico de cortisol observado nos testes de estímulo com a concentração de cortisol basal, além de avaliar pontos de corte de cada teste com melhor sensibilidade e especificidade para diagnóstico de IAC.

Analisamos as características dos pacientes com IAC: sexo, idade, quantos possuem alteração anatômica do sistema nervoso central, quantos tem síndrome genética associada, quantos desenvolveram esta deficiência após tratamento com radioterapia ou uso crônico de corticosteroide e quantos possuem outras alterações hormonais associadas.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo primário:**

- Avaliar necessidade dos testes de estímulo de cortisol para o diagnóstico de insuficiência adrenal secundária em crianças e adolescentes.

### **Objetivos secundários:**

- Identificar o número de testes realizados, divididos por tipo de estímulo e caracterizar a população pediátrica submetida ao teste;

- Comparar os resultados entre diferentes testes realizados num mesmo paciente pediátrico: comparar o teste de glucagon com o teste de ITT e comparar os resultados dos testes de estímulo com os resultados de cortisol basal.

- Avaliar a segurança dos testes e os eventos adversos que ocorreram durante a realização dos testes.

- Avaliar a associação entre IAC e deficiência de outros hormônios hipofisários, alterações do sistema nervoso central e/ou síndromes genéticas.

### 3. METODOLOGIA

#### **Delineamento do estudo:**

Este é um estudo observacional, de coorte, retrospectivo.

#### **Amostragem:**

Foram incluídos todos os pacientes submetidos a testes de estímulo de cortisol no HC FMRP-USP entre janeiro de 2001 e dezembro de 2016, dentro da faixa etária pediátrica (de zero até 18 anos incompletos).

#### **Coleta de dados:**

Os resultados foram coletados através da análise de prontuários, exames laboratoriais e exames de imagem dos pacientes submetidos a testes de estímulo de cortisol no período referido. Os dados clínicos, antropométricos, laboratoriais e de imagem foram obtidos pela análise de prontuários médicos e gerenciados usando a ferramenta de captura de dados eletrônicos REDCap.

#### **Parâmetros coletados:**

##### **Clínicos:**

Foram coletados dados relativos à idade, sexo, IMC (kg/m<sup>2</sup>), estatura (SDS), estatura alvo (SDS), velocidade de crescimento (cm/ano), estadiamento puberal (pela classificação de Tanner), diagnóstico inicial e indicação para realização do teste.

O ajuste da estatura ao escore de desvio padrão (SDS) foi feito de acordo com os dados das curvas da OMS para menores de 2 anos, e da tabela CDC *Growth Charts for the United States* (2000) para maiores de 2 anos, cujas curvas de crescimento derivadas destas tabelas são as mesmas utilizadas nos ambulatórios de endocrinologia pediátrica deste serviço.

A fórmula utilizada para este ajuste é a seguinte:

$$\text{SDS} = (\text{estatura observada} - \text{estatura média (idade, sexo)}) \div \text{DP (idade, sexo)}$$

O cálculo da velocidade de crescimento antes e depois do teste de estímulo foi feito em cm/ano, através da variação de estatura observada num período mínimo de 4 meses e máximo de 12 meses.

A avaliação puberal se divide em impúberes ou púberes, em função da classificação pelo estadiamento de Tanner. Foram considerados púberes os meninos com estadiamento igual ou superior a G2 e as meninas com estadiamento igual ou superior a M2.

### **Laboratoriais:**

Foram contemplados exames laboratoriais prévios ao teste de estímulo importantes para avaliação de IAC e hipopituitarismo, assim como problemas de crescimento, a saber: IGF-1, glicemia de jejum, cortisol, TSH e T4L. Também foram coletados o(s) resultado(s) obtido(s) no(s) teste(s) de estímulo (pico máximo obtido). Consideramos o ITT como adequado quando paciente atingiu nadir de glicemia abaixo de 45 mg/dL ou com redução de pelo menos 50% em relação à glicemia basal.

O cortisol foi dosado por radioimunoensaio, sendo utilizado o mesmo método durante todo o período de estudo. A determinação do cortisol sérico ocorreu por método direto sem extração prévia do plasma. O plasma foi apenas previamente submetido a diluição com tampão do ensaio com 11% de metanol e colocado em banho maria a 60°C, sendo a seguir dosado em duplicatas. O radioimunoensaio utilizou um anticorpo anti-cortisol (produzido em coelhos contra o conjugado cortisol-3oxima-albumina bovina), apresentando reatividade cruzada de 26% com a cortisona, 14% com o 11-desoxicortisol, 3% com a corticosterona e menos que 1% com os demais esteroides adrenais e gonadais. Utilizou-se como hormônio marcado a hydrocortisone 1,2 3H (New England Nuclear) com atividade específica de 50,7 Ci/nmol, previamente purificada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals). Na separação das frações livres das ligadas utilizou-se solução de carvão-Dextran 0,5/0,05%. A dose mínima detectável foi de 1,2µg/dL, a variação intra ensaio de cerca de 5% e a variação interensaio de cerca de 10,5% ao nível do ponto médio ( $B/B_0 = 0,5$ ) da curva padrão.

O ITT e o teste de glucagon foram realizados seguindo os protocolos do HC FMRP-USP, detalhados a seguir. Os testes foram realizados por médicos residentes treinados e sempre seguindo o protocolo do serviço para realização do teste e manejo de efeitos adversos.

Para realização do ITT, os pacientes foram orientados a chegar ao hospital pela manhã às 8 horas em jejum, quando o acesso venoso periférico é puncionado. Foi realizada a administração endovenosa de insulina humana regular na dose de

0,1UI/Kg. No caso de teste repetido, em paciente que não havia tido hipoglicemia satisfatória com esta dose, um novo teste com a dose de 0,15 UI/Kg foi realizado. Foram coletadas amostras de glicemia e cortisol no basal (-15 minutos e zero) e depois nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos.

Para realização do teste de estímulo com glucagon, os pacientes também foram orientados a chegar ao hospital pela manhã às 8 horas em jejum. Foi realizada a administração intramuscular de glucagon na dose de 30 mcg/kg ou doses fixas de 500 mcg ou 1 mg a depender do peso. Foram coletadas amostras de glicemia e cortisol no basal (-15 minutos e zero) e depois nos tempos 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

### **Imagem:**

Foram avaliados os dados observados no exame de ressonância nuclear magnética (RNM) da sela túrcica e do encéfalo. Foram avaliadas a idade óssea dos pacientes obtida na admissão, sendo as mesmas relidas pelo mesmo observador.

### **Crítérios de inclusão e exclusão:**

Inicialmente, avaliamos todos os prontuários de pacientes submetidos ao teste de estímulo de cortisol e de GH no período referido (ITT ou Teste do Glucagon), sem restrição de idade. Essa lista de pacientes foi obtida nos arquivos do Laboratório de Endocrinologia – Setor de Imunoensaios do HCFMRP-USP. Neste laboratório foram dosadas todas as amostras de cortisol realizadas no HCFMRP-USP no período analisado.

Num segundo momento, para caracterização da população pediátrica, foram incluídos apenas aqueles que foram submetidos a teste de estímulo e que apresentem idade entre 6 meses de idade e 17 anos e 11 meses e 29 dias (18 anos incompletos), ou seja, crianças e adolescentes.

Para caracterização dos testes de estímulo com insulina, excluimos todos os pacientes que foram submetidos a ITT e não apresentaram hipoglicemia significativa, além daqueles que faziam uso de qualquer tipo de glicocorticoide.

Para análise de acurácia do teste, sensibilidade e especificidade, excluimos, além dos pacientes que não apresentaram hipoglicemia no ITT, pacientes que fizeram uso prévio de corticoides, pacientes menores de 6 meses que fizeram hipoglicemia espontânea e coletaram amostra crítica para investigação etiológica, pacientes com doença crônica e pacientes com síndrome de Turner que foram submetidas ao teste de

estímulo por baixa estatura e para iniciar tratamento com somatropina pelo Sistema Único de Saúde (demanda do protocolo do SUS existente no início deste programa).

### **Parâmetros Laboratoriais e Análise Estatística:**

De acordo com as concentrações de cortisol (F; mcg/dL), basal ( $F_{\text{basal}}$ ) e pico pós-estímulo ( $F_{\text{pico}}$ ) dividimos os pacientes em 3 grupos (Grossman et al, 2010; Maguire A M et al, 2008; Patti G et al, 2018).

Concentração de cortisol basal:

- 1) Alta probabilidade de insuficiência adrenal: aqueles com resultado abaixo de 5 mcg/mL;
- 2) Baixa probabilidade de diagnóstico de insuficiência adrenal: aqueles com resultado acima de 13 mcg/mL;
- 3) Resultado indeterminado: aqueles com resultado entre 5 e 13 mcg/mL, com necessidade de realização de teste de estímulo

Concentração do pico de cortisol após estímulo:

Para avaliação do teste de estímulo, os pacientes que foram submetidos à realização de teste de estímulo de cortisol foram divididos e classificados como descrito a seguir:

- a) Diagnóstico de IAC excluída: pico de cortisol acima de 18 mcg/mL.
- b) Indeterminado: pico de cortisol entre 15 e 18 mcg/mL. Considerando os dados recentes da literatura, este intervalo pode representar resposta normal de cortisol ao estresse do teste de estímulo em crianças, portanto consideramos como um grupo à parte a ser avaliado (Drummond JB et al, 2020).
- c) Diagnóstico de IAC confirmada: pico de cortisol abaixo de 15 mcg/dL.

Combinação de Cortisol basal e Cortisol pós-estímulo

De acordo com as concentrações de cortisol basal ( $F_{\text{basal}}$ ) e pico pós-estímulo ( $F_{\text{pico}}$ ) os pacientes foram classificados em três grupos:

- a) IAC confirmada:  $F_{\text{basal}} < 5$  mcg/dL ou  $F_{\text{pico}} < 15$  mcg/dL;
- b) Indeterminado:  $F_{\text{basal}} = 5$  a 13 mcg/dL ou  $F_{\text{pico}} = 15-18$  mcg/dL;



c) IAC excluída (Normal):  $F_{\text{basal}} > 13 \text{ mcg/dL}$  ou  $F_{\text{pico}} > 18 \text{ mcg/dL}$ .

Os pontos de cortes para o  $F_{\text{basal}}$  e  $F_{\text{pico}}$  foram avaliados por meio de curvas ROC, avaliamos a existência de correlação entre  $F_{\text{basal}}$  e  $F_{\text{pico}}$  por meio do teste de Kappa e a concordância entre os testes ITT e Glucagon foi avaliada pelo método de Bland-Altman.

Neste momento, padronizamos como doente aqueles pacientes com diagnóstico final confirmado de IAC pelo teste do ITT (padrão-ouro). Considerando o paciente como portador ou não da doença, estabelecemos sensibilidade e especificidade, para os pontos de corte avaliados no teste de cortisol basal e no teste de estímulo com glucagon.

Avaliamos também a frequência de eventos adversos que ocorreram em cada teste de estímulo em pacientes que realizaram tanto o ITT quanto o teste de estímulo com glucagon para evitar viés de seleção. Não conseguimos realizar análise estatística devido ao número reduzido de pacientes que realizaram tanto o ITT quanto o teste de estímulo com o glucagon.

Comparamos o cortisol basal dosado pré teste e o basal colhido nos horários -15 e 0 minutos dos teste de ITT e glucagon e comparamos pela correlação de Spearman.

Comparamos  $F_{\text{basal}}$  e  $F_{\text{pico}}$  em pacientes com ou sem DGH, neurohipófise ectópica, síndrome da haste interrompida e pacientes com 6 meses a 2 anos com aqueles acima de 2 anos de idade. A diferença estatística foi avaliada pelo teste t de Student e teste não paramétrico de Wilcoxon. Comparamos  $F_{\text{basal}}$  e  $F_{\text{pico}}$  em pacientes que tiveram ou não exposição prévia a medicações e/ou radiação e pacientes com presença ou não de antecedentes neonatais de hipopituitarismo através do teste de Kruskal-Wallis. No caso de se encontrarem diferenças significativas, foi realizado subsequentemente o pós-teste de Dunn.

Para avaliação de quais possíveis variáveis categóricas ou numéricas poderiam indicar um determinado resultado no  $F_{\text{pico}}$  em uma relação de regressão, construímos uma *Conditional Inference Tree*.

O software utilizado para análise estatística foi o R, versão 4.0.3.

#### **Aspectos éticos:**

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e aprovado (45517621.1.0000.5440).

Por se tratar de um estudo retrospectivo, baseado em revisão de dados de prontuários físicos e eletrônicos, sem contato direto com o paciente ou intenção de intervenção na conduta médica do mesmo, foi solicitada dispensa da necessidade de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo aprovada pelo comitê de ética em pesquisa.

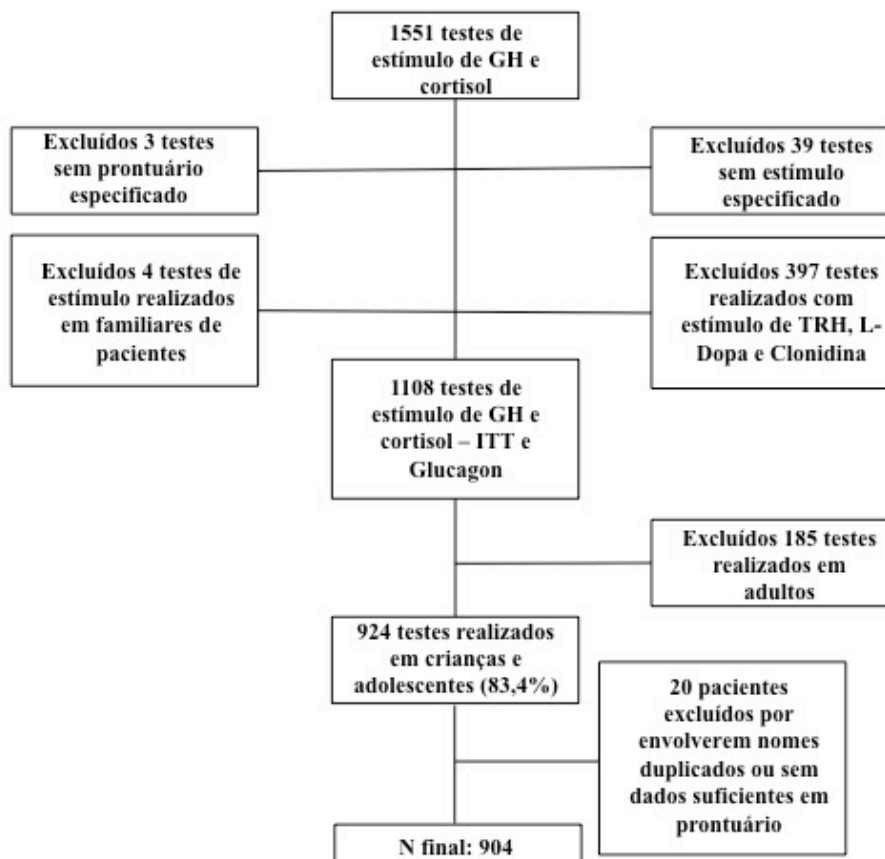
Por sua natureza, este estudo não envolveu custos significativos e não recebeu financiamento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização geral dos testes de estímulo realizados entre 2001-2016: faixa etária e estímulo realizado

Após um primeiro levantamento, demonstrado na figura 1 e feito exclusivamente a partir dos registros físicos armazenados no laboratório de endocrinologia do HC FMRP USP, foi constatado que 1112 testes de estímulo foram realizados no período referido. Observamos que a maioria dos testes foram realizados na faixa etária pediátrica (927 ou 83,4% dos testes).

Quanto ao tipo de teste de estímulo de cortisol realizado, observou-se que, em números absolutos, o ITT foi o mais frequente (67,0% dos testes).



**Figura 1** - Amostra referente aos testes de estímulo de cortisol de 2001 a 2016.

#### **4.2. Caracterização da população pediátrica submetida a teste de estímulo entre 2001-2016**

No total, foram analisados 904 pacientes após exclusão de pacientes duplicados ou com dados insuficientes em prontuário físico e eletrônico.

Quanto às características dos indivíduos submetidos aos testes de estímulo de cortisol, observamos a proporção de 39,9% de indivíduos do sexo feminino e 60,1% do sexo masculino. A maioria desses pacientes era impúbere à admissão (70,4%), com mediana de idade de 10,1 anos (mínima de 0,1 e máxima de 17,7 anos). A média de IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) dos pacientes foi de 17,1, com mediana de 16,2. O IMC mínimo foi 10,3 e o máximo foi 48,3. A média do escore Z do desvio padrão da estatura foi de -2,5 e a mediana de -2,6, com mínimo de -10,0 e máximo de 3,8. A média de velocidade de crescimento foi de 5,5 cm/ano com mediana de 4,6 cm/ano.

Ao avaliarmos os antecedentes pessoais dos pacientes do estudo, a maioria nasceu com peso adequado para idade gestacional (76,2%), enquanto que 22,7% tinham antecedentes de terem nascido pequenos para idade gestacional e apenas 8% grandes para idade gestacional. A média de idade gestacional (semanas) dos indivíduos avaliados foi de 37,5, sendo a mediana de 38, a idade gestacional mínima de 24 e a máxima de 42. Antecedente pessoal de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor ou dificuldades de aprendizado foram observados em 17,5% e 24,2%, respectivamente.

A grande maioria (708 ou 82,8%) não apresentava antecedentes conhecidos sugestivos de hipopituitarismo no período neonatal. Dentre aqueles com história prévia positiva para hipopituitarismo (147 pacientes ou 17,2%), observamos que 27 pacientes apresentaram crise convulsiva, 47 pacientes apresentaram hipoglicemia, 47 pacientes apresentaram criptorquidia, 28 pacientes apresentaram micropênis, 67 pacientes apresentaram icterícia neonatal tardia, apenas 1 paciente apresentou atraso da queda do coto umbilical e 3 pacientes apresentaram poliúria. A proporção dos sinais sugestivos de hipopituitarismo na população avaliada é descrita na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Proporção de sinais neonatais sugestivos de hipopituitarismo (n = 904).

<b>Sinais sugestivos de hipopituitarismo no período neonatal</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
Crise convulsiva	27 (3%)
Hipoglicemia	47 (5,2%)
Criptorquidia	47 (5,2%)
Micropênis	28 (3,1%)
Icterícia neonatal tardia	67 (7,4%)

Quanto ao uso de medicações, uma proporção considerável fazia uso de medicações (21,6%), correspondendo a 195 pacientes na amostra observada. Dentre as medicações utilizadas, observamos que 50 destes pacientes fizeram uso de algum tipo de corticoide oral previamente à realização do teste, 26 pacientes faziam uso de corticoide inalatório, 16 pacientes faziam uso de corticoide tópico, 76 pacientes faziam uso de anticonvulsivantes, 21 pacientes fizeram uso de algum tipo de quimioterápico e 32 pacientes fizeram uso de outras medicações sem possíveis implicações com as condições clínicas avaliadas. Apenas 26 pacientes (2,9%) avaliados foram previamente expostos a radiação. A frequência de uso de medicações e exposição a radiação é demonstrada na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Proporção das medicações de uso prévio/crônico mais encontradas e da exposição prévia a radioterapia (n = 904)

<b>Medicações de uso crônico/uso prévio</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
Corticoide oral	50 (5,5%)
Corticoide inalatório	26 (2,9%)
Corticoide tópico	16 (1,8%)
Anticonvulsivantes	76 (8,4%)
Quimioterapia	21 (2,3%)
<b>Radioterapia</b>	26 (2,9%)

Após o exame físico da admissão, 282 pacientes (31,4%) tinham algum achado dismórfico e a frequência de cada um dos achados mais comuns está descrita na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Frequência de achados sindrômicos encontrados nos pacientes que apresentavam traços de doenças sindrômicas (n = 904)

<b>Dismorfias observadas</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
Microcefalia	19 (2,1%)
Macrocefalia	15 (1,7%)
Face triangular	58 (6,4%)
Micrognatia	16 (1,8%)
Hipertelorismo ocular	16 (1,8%)
Ptose palpebral	4 (0,4%)
Implantação auricular baixa	36 (4%)
Pescoço curto e alado	38 (4,2%)
Braquidactilia	14 (1,5%)
Clinodactilia	60 (6,6%)
4º metacarpo curto	48 (5,3%)
Valgismo cubital	97 (10,7%)
Frouxidão ligamentar	19 (2,1%)
<i>Pectus excavatum</i>	28 (3,1%)
<i>Pectus carinatum</i>	7 (0,8%)
Outros	223 (24,7%)

Dentre as outras alterações menos frequentes, foram observadas: fronte ampla, implantação dos cabelos em tridente, retrognatia, telecanto, lábios finos, sulco nasolabial curto e apagado, base nasal alargada, raiz nasal baixa, palato em ogiva, braquicefalia, dolicocefalia, sinofre e incisivo central único.

Proporcionalmente, 293 pacientes (32,4%) dos pacientes colheram amostra para realização de cariótipo. Quanto aos resultados, 200 pacientes (68,3%) destes tinham um cariótipo normal (sendo 129 pacientes 46,XX e 71 pacientes 46,XY). 14%

dos pacientes (41 pacientes) tinham cariótipo compatível com síndrome de Turner e 6,8% dos pacientes (20 pacientes) tinham cariótipo de Turner mosaico. O restante dos pacientes apresentaram outras alterações em cariótipo que consistiram de polimorfismos associados com infertilidade ou sem significado clínico para o paciente. Não foram observadas alterações cromossômicas associadas com outras síndromes conhecidas.

Apenas 6,4% dos pacientes realizaram análise molecular. Dentre as análises realizadas, 14 pacientes foram submetidos à realização de MLPA, 6 foram submetidos a CGH array, 22 pacientes foram submetidos a sequenciamento de genes específicos de acordo com a suspeita clínica, 2 foram submetidos a painéis genéticos e 2 colheram exoma. Os 12 pacientes restantes não tiveram especificação de exame colhido na descrição do prontuário físico. Observamos que em apenas 1 paciente foi feita análise molecular do gene PIT1, com mutação presente, e 1 paciente com mutação em gene SHH, ambos associados com hipopituitarismo. Em três pacientes o gene do GH foi sequenciado, sendo evidenciado microdeleções em dois desses pacientes e 1 deles com exame normal. Em 1 paciente foi evidenciada alteração genética no receptor de GH. Em 1 paciente foi realizada análise molecular do cromossomo 15, sendo evidenciado herança biparental para polimorfismos e metilações na região 15q11-13, mas Síndrome de Angelman foi descartada clinicamente. Em 7 pacientes foi realizada análise molecular para diagnóstico de síndrome de Silver-Russel, sendo um resultado negativo e os outros não relatados no sistema de prontuário eletrônico pela equipe da genética. Em 2 pacientes com síndrome de Turner, foi realizada pesquisa de sequências do cromossomo Y (TSPY / DAZ / SRY), sendo negativas. Um paciente apresentava mutação em heterozigose para raquitismo hipofosfatêmico. Dois pacientes realizaram análise de microdeleções para diagnóstico de Prader Willi, sendo um teste positivo e outro paciente com resultado normal. Dois pacientes tinham alteração molecular para hiperplasia adrenal congênita. Dois pacientes tinham alteração genética compatível com a síndrome de *Cat eye*. Um paciente apresentou alteração genética compatível com Síndrome de Allan Herdon Dudley. Observamos também um paciente com doença de Gaucher e outro com Niemann Pick diagnosticados por análise genética. Além destes, os outros exames alterados foram caracterizados por deleções em cromossomo 11, 3, 8 e 22, e 1 ganho cromossômico na região 18p11.32.

Quanto aos dados laboratoriais, observa-se que o IGF-1, a função tireoidiana, o cortisol basal e a glicemia de jejum foram os exames mais frequentemente pedidos na avaliação laboratorial inicial. Dentre os pacientes avaliados, apenas 3% tinham suspeita de diabetes insípido e realizaram teste de jejum hídrico, mas nenhum destes pacientes teve este diagnóstico confirmado pelo exame. A descrição das variáveis laboratoriais: média, desvio-padrão, mediana, valor máximo e mínimo referentes aos exames estão demonstrados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Dados bioquímicos dos pacientes submetidos a testes de estímulo para cortisol

<b>Variável</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mediana (intervalo)</b>
IGF1 ( ng/ml)	176,2	161,2	132,0(indetectável a 1055,0)
Glicemia de jejum (mg/dl)	84,7	25,0	83,0 (22,0 a 409,0)
TSH (μIU/ml)	3,7	21,9	2,0 (0,01 a 533,0)
T4 livre (ng/dl)	1,2	0,4	1,2 (indetectável a 7,5)
LH (μIU/ml)	2,8	6,5	1,0 (indetectável a 60,8)
FSH (μIU/ml)	11,2	35,7	2,3 (indetectável a 452,2)
Testosterona total (ng/dl)	120,6	141,1	56,0 (indetectável a 814,0)
Estradiol (pg/ml)	43,3	54,3	34,5 (indetectável a 422,0)
Prolactina (ng/ml)	22,8	126,7	9,0 (indetectável a 2024,0)
Sódio (mmol/l)	139,6	4,5	139,0 (129,5 a 174,0)
Potássio (mmol/l)	4,3	0,5	4,4 (3,0 a 7,1)
Osm plasmática (mOsm/kg)	289,6	21,1	289,0 (163,0 a 391,0)
Osm urinária (mOsm/kg)	506,5	329,8	526,5 (214,0 a 1261,0)

Dos 904 pacientes avaliados, 92% foram submetidos a realização de radiografia simples de idade óssea, sendo a maioria deles (56,7%) com a idade óssea atrasada com relação a idade cronológica. Foi realizada previsão de estatura final pelo cálculo de Bayley-Pinneau, sendo a média e mediana de desvio padrão de estatura final de -1,7 DP.

Ao avaliar a realização de ressonância nuclear magnética, 55% dos pacientes avaliados realizaram o exame de imagem (total de 497 pacientes dentre os avaliados).



A maioria destes, 56,7% (282 pacientes) apresentava alterações. As alterações mais comuns estão descritas na **Tabela 5**. Observamos que a maioria também apresentou alterações na RNM, sendo que os achados classicamente associados com hipopituitarismo foram os mais frequentemente encontrados (neurohipófise ectópica, hipoplasia ou ausência de haste hipofisária, hipoplasia de hipófise anterior).

**Tabela 5** – Achados radiológicos na RNM de encéfalo ou sela túrcica (n = 497)

<b>Achados na RNM de encéfalo ou sela</b>	
Normal	215 (43,3%)
Neurohipófise ectópica	67 (13,5%)
Hipoplasia ou ausência de haste hipofisária	33 (6,6%)
Hipoplasia de hipófise anterior	71 (14,3%)
Agenesia de septo pelúcido	14 (2,8%)
Agenesia ou hipoplasia do corpo caloso	24 (4,8%)
Alteração de nervo óptico	18 (3,6%)
Holoprosencefalia ou holoprosencefalia <i>like</i>	2 (0,4%)
Outros	186 (37,4%)

Outras alterações foram identificadas na RNM que não são classicamente associadas com hipopituitarismo, como as descritas individualmente na **Tabela 5**. Estas incluíram tumores malignos e benignos (meduloblastoma, craniofaringeoma, pineoblastoma,ependimoma, lipoma, astrocitoma, adenomas hipofisários, hamartomas), histiocitose, cisto da bolsa de Rathke, cisto de aracnoide, sequelas de infecção congênita, lesões pós traumatismo crânio encefálico, leucomalácia e hidrocefalia.

Por fim, em relação à indicação que motivou a solicitação do teste de estímulo, observou-se que dentre as 904 crianças avaliadas, 694 (76,8 %) dos pacientes teve o teste de estímulo indicado por baixa estatura, enquanto que 294 (32,5%) com indicação de realização de teste de estímulo por deficiência de crescimento e 198 pacientes (21,9%) com suspeita de hipopituitarismo com acometimento do eixo HHA. Entre as outras indicações que motivaram solicitação de

testes de estímulo para 29 pacientes (3,2%), incluíram estatura abaixo do canal familiar, estatura final prevista abaixo do percentil 3 ou abaixo do canal familiar.

#### **4.3. Caracterização dos testes de estímulo realizados em crianças e adolescentes entre 2001-2016**

Observou-se que 965 testes de estímulo foram realizados em 904 pacientes, o que resulta em uma média de 1,07 testes por paciente. O mais frequentemente realizado foi o ITT, que corresponde a um total de 621 testes (64,4%), enquanto que o teste de estímulo com glucagon foi realizado 344 vezes (35,6%).

A dose de insulina mais utilizada foi de 0,1 UI/Kg, sendo realizada em 80,8% dos ITT e a dose de 0,15 UI/Kg foi utilizada em 8,1%. Em 10,5% dos testes de ITT a dose de insulina não foi especificada em prontuário. Em apenas 3 testes não foi administrada insulina, pois os pacientes apresentaram hipoglicemia espontânea no tempo -15 min do teste.

Na **Tabela 6** encontram-se os dados relativamente à frequência de hipoglicemia e de complicações durante a realização destes testes, e na **Tabela 7** encontram-se informações relativas ao tempo necessário para recuperação da hipoglicemia. Por fim, na **Tabela 8** apresentam-se valores de média, mediana, mínima e máximo de glicemia basal e nadir destes testes de estímulo.

**Tabela 6** – Frequência de hipoglicemia efetiva, efeitos colaterais observados e manejo clínico dos pacientes submetidos ao ITT (n = 621)

	<b>Nº de testes (%)</b>
<b>Nadir de hipoglicemia foi &lt; 45 mg/dl</b>	367 (59,1%)
<b>Nadir de hipoglicemia foi &lt; 50% da glicemia basal</b>	313 (50,4%)
<b>Ocorreram sintomas de hipoglicemia leves</b>	251 (40,5%)
<b>Ocorreram sintomas de hipoglicemia graves</b>	3 (0,6%)
<b>Corrigiu hipoglicemia por via oral</b>	43 (8,5%)
<b>Corrigiu hipoglicemia por via endovenosa</b>	53 (10,1%)
<b>Precisou ficar em observação clínica</b>	8 (1,4%)
<b>Precisou de internação hospitalar</b>	1 (0,2%)
<b>Total de ITT</b>	621 (100%)

**Tabela 7** – Tempo para recuperação da hipoglicemia nos ITT (n = 621)

<b>Tempo para recuperação da hipoglicemia (minutos a partir da detecção do evento)</b>	<b>Nº de testes (%)</b>
<b>30</b>	300 (48,3%)
<b>60</b>	116 (18,7%)
<b>90</b>	55 (8,9%)
<b>120</b>	53 (8,5%)
<b>150</b>	1 (0,01%)
<b>180</b>	2 (0,03%)
<b>Total</b>	621 (100%)

**Tabela 8** – Concentração de glicemia basal e nadir dos ITT, com tempo de recuperação da glicemia (n = 621)

	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mediana (intervalo)</b>
<b>Glicemia basal (mg/dl)</b>	83,8	13,4	84,0 (38,0 – 270,0)
<b>Glicemia nadir (mg/dl)</b>	43,5	15,6	41,0 (10,0 – 102,0)
<b>Tempo de recuperação da glicemia (min)</b>	45,7	33,1	30,0 (0,0 – 180,0)

Por outro lado, em relação ao teste de estímulo com glucagon, concluiu-se que a dose mais frequentemente administrada foi de 1 mg de glucagon por via intramuscular (14,1% dos testes). Em 13,4% dos testes foi administrado metade da dose anterior, de 0,5 mg também por via intramuscular e em 14,8% dos testes foi utilizada uma dose ajustada para o peso do paciente, de 30 mcg/kg. No restante dos testes este dado não foi relatado em prontuário médico, o que corresponde a 57,7% dos testes de glucagon realizados. Foram relatadas intercorrências em 47 testes de glucagon (13,1%), as quais estão descritas na **Tabela 9**. Quatro pacientes necessitaram de observação clínica. Em 7 testes de estímulo com glucagon foi necessária internação hospitalar em enfermaria para realização do teste por comorbidades do paciente ou dificuldade de acesso venoso. Nenhum paciente apresentou intercorrências graves ou necessitou de internação em Unidade de Terapia Intensiva.

**Tabela 9** – Frequência de complicações durante a realização dos testes de estímulo com glucagon (n = 344)

	<b>Nº de testes (%)</b>
<b>Náuseas</b>	14 (4,2%)
<b>Vômitos</b>	14 (4,2%)
<b>Tontura</b>	2 (0,7%)
<b>Sonolência</b>	5 (1,4%)
<b>Sudorese</b>	1 (0,3%)
<b>Epigastralgia</b>	1 (0,3%)
<b>Irritabilidade</b>	1 (0,3%)
<b>Precisou ficar em observação clínica</b>	4 (1,6%)
<b>Precisou de internação hospitalar</b>	7 (2%)
<b>Total de testes de glucagon</b>	344 (100%)

#### **4.4. Levantamento dos resultados dos testes de estímulo e diagnósticos finais obtidos**

Para esta análise, foram excluídos os pacientes que não apresentaram hipoglicemia significativa durante o ITT (nadir de glicemia maior que 45 mg/dl ou maior que 50% da glicemia basal), já que isso invalida o resultado do exame. Foram também excluídos pacientes com menos de 6 meses, os pacientes que faziam uso de qualquer tipo de glicocorticoide, pacientes com doença crônica e pacientes com síndrome de Turner.

A proporção dos diagnósticos finais estabelecidos após a realização do(s) teste(s) de estímulo encontra-se detalhada na **Tabela 10**.

**Tabela 10** – Proporção de diagnósticos finais estabelecidos após realização dos testes de estímulo (n = 904)

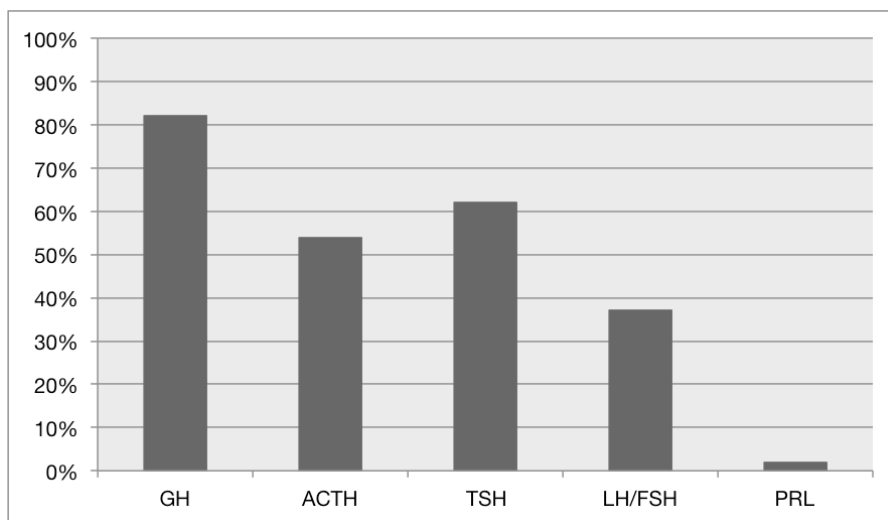
<b>Diagnóstico final</b>	<b>Nº de pacientes (%)</b>
BE Familiar	39 (4,3%)
BE Constitucional	72 (8,0%)
BE Constitucional com componente familiar	62 (6,9%)
BE Idiopática	234 (25,9%)
DGH isolado	122 (13,5%)
Insuficiência adrenal isolada	11 (1,2%)
Hipopituitarismo anterior parcial	103 (11,4%)
Hipopituitarismo anterior completo	24 (2,7%)
Pan-hipopituitarismo	17 (1,9%)
PIG sem catch up	33 (3,7%)
Hipotireoidismo primário	10 (2,9%)
BE secundária a doença crônica	96 (10,6%)
Desnutrição	1 (0,1%)
Displasia esquelética	3 (1,3%)
Síndrome de Turner	69 (7,6%)
Outras síndromes genéticas	107 (11,8%)
Outros diagnósticos	259 (28,7%)
<b>Total de pacientes da amostra</b>	<b>904 (100%)</b>

Dentre os outros diagnósticos não especificados na **Tabela 10**, observamos que alguns pacientes que foram investigados acabaram com diagnóstico de eutrofia. Foi evidenciado também pacientes com doenças crônicas: hemocromatose (talassemia e anemia falciforme), broncodisplasia, bronquiolite obliterante, doença renal crônica fibrose cística, síndromes epiléticas, doença celíaca, hepatite autoimune, proteinúria nefrótica sindrômica; observamos pacientes com doenças endócrinas: puberdade precoce central, hiperplasia adrenal congênita, diabete insípido isolado, Diabete Melito tipo 1, diabete melito tipo MODY, hiperinsulinismo congênito, raquitismo hipofosfatêmico, hipertireotrofinemia, hipotireoidismo subclínico,

hipoglicemia cetótica da infância e hipogonadismo (hipergonadotrófico pós quimioterapia e hipogonadotrófico).

Dentre as síndromes genéticas, além da síndrome de Turner descrita acima, houve pacientes com suspeita de síndrome de Silver Russel, 1 paciente confirmado para síndrome de Prader Willi, 2 com síndrome de *Cat eye*, diagnóstico de cromossomopatia complexa (1 paciente), pacientes com síndromes envolvendo deleções/microdeleções, 1 paciente com síndrome de Alport e 1 paciente com síndrome unha-patela.

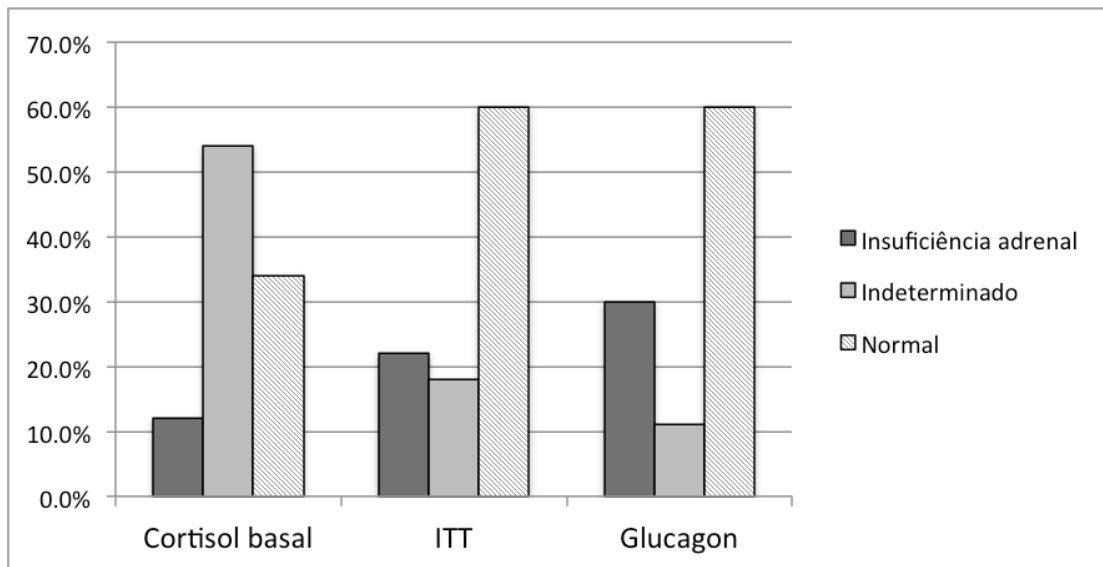
Analisando especificamente a parcela de pacientes com hipopituitarismo anterior parcial, podemos evidenciar as seguintes proporções de acometimento de eixos hormonais de acordo com a **Figura 2**.



**Figura 2** – Proporção dos eixos hipofisários mais acometidos nos pacientes com hipopituitarismo anterior parcial (n = 103).

Em função do resultado ( $F$ ; mcg/dL) do teste de cortisol basal ( $F_{\text{basal}}$ ) e do pico de Cortisol ( $F_{\text{pico}}$ ) nos testes de estímulo, os pacientes foram incluídos em uma das seguintes categorias: IAC ( $F_{\text{basal}} < 5$  ou  $F_{\text{pico}} < 15$ ), Indeterminado ( $F_{\text{basal}} = 5$  a 13 mcg/dL ou  $F_{\text{pico}} = 15-18$ ) e Normal ( $F_{\text{basal}} > 13$  mcg/dL ou  $F_{\text{pico}} > 18$ ). Para isso, naqueles pacientes que foram submetidos a mais de um teste de estímulo, foi escolhido o maior pico para classificação em uma das três categorias.

A proporção de pacientes em cada uma das categorias para cada teste realizado é descrita na **Figura 3**. As medidas relativas à média, DP, mediana, valor máximo e mínimo dos picos de cortisol para cada teste, em cada grupo de diagnóstico final, encontram-se descritas na **Tabela 11**.

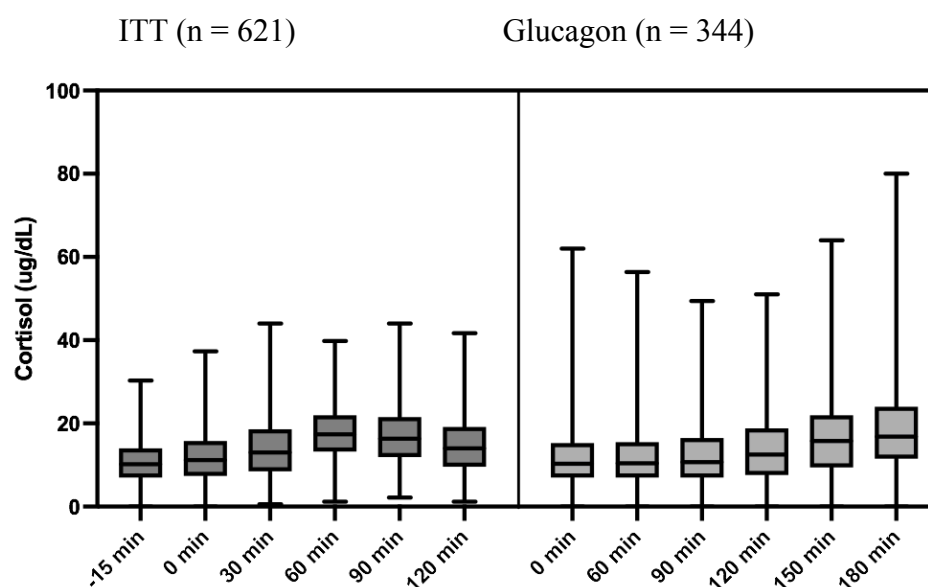


**Figura 3** – Proporção de pacientes em cada categoria (IAC, normal ou indeterminado) de acordo com os resultados em cada um dos três testes de cortisol avaliados: cortisol basal, ITT e teste de estímulo com glucagon.



**Tabela 11** – Concentração de cortisol (mcg/dL) basal ( $F_{\text{basal}}$ ) e pico ( $F_{\text{pico}}$ ) nos diferentes testes em cada grupo de pacientes

	N	Média	DP	Mediana (intervalo)
<b>IAC (<math>F_{\text{basal}} &lt; 5</math> ou <math>F_{\text{pico}} &lt; 15</math>)</b>				
Cortisol basal	96	3,0	1,6	3,6 (indetectável – 4,9)
ITT	108	10,9	2,7	11,4 (3,0 – 14,9)
Glucagon	85	10,0	2,7	11,0 (indetectável - 14,8)
<b>Indeterminado (<math>F_{\text{basal}} = 5</math> a <math>13</math> mcg/dL ou <math>F_{\text{pico}} = 15 - 18</math>)</b>				
Cortisol basal	437	9,2	2,3	9,3 (5,00 – 12,9)
ITT	87	16,2	0,9	16,1 (15,0 – 17,9)
Glucagon	30	16,2	0,8	16,0 (15 – 17,6)
<b>Normal (<math>F_{\text{basal}} &gt; 13</math> mcg/dL e <math>F_{\text{pico}} &gt; 18</math>)</b>				
Cortisol basal	272	18,4	6,4	16,8 (13,0 - 82,7)
ITT	294	24,6	5,4	23,6 (18,0 – 44,0)
Glucagon	168	27,2	9,1	24,80 (18,0 – 80,0)

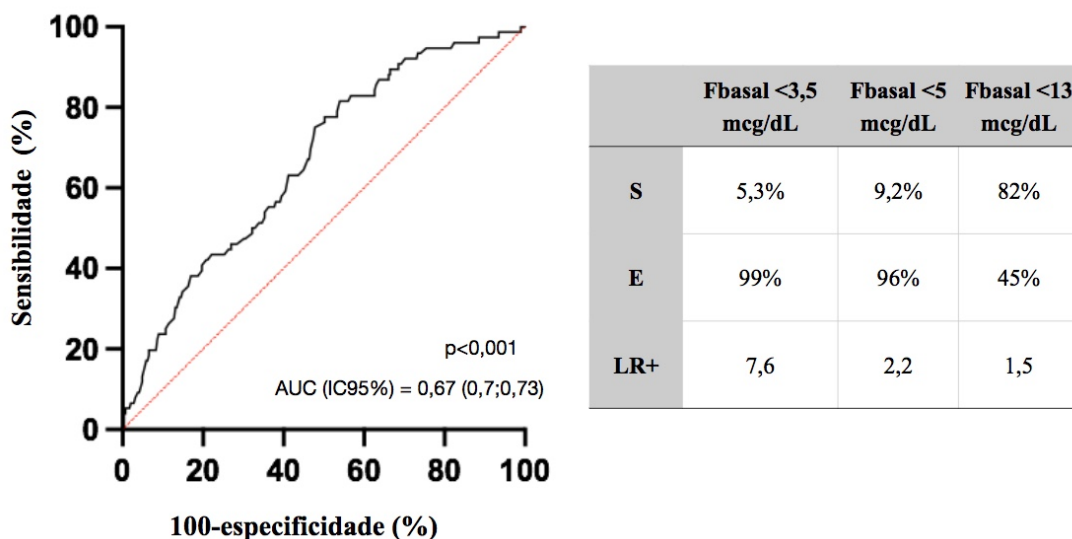


**Figura 4** – Concentrações de cortisol (mcg/dl) obtidos no ITT e teste de estímulo de glucagon nos diferentes pontos dos testes.

Para avaliar a correlação entre a concentração de cortisol no basal e no pico obtido nos testes de estímulo de cortisol, baseando-se na classificação dos pacientes em cada uma das categorias analisadas, utilizamos a análise do coeficiente de Kappa e os resultados demonstram um coeficiente de Kappa ponderado: 0,25 (CI 95%: 0,2 - 0,3).

Para avaliar tempo de obtenção de Fpico no teste, construímos a **Figura 4**, que demonstra Fpico próximo de 30 a 60 minutos no ITT e mais tardio no teste de estímulo com Glucagon.

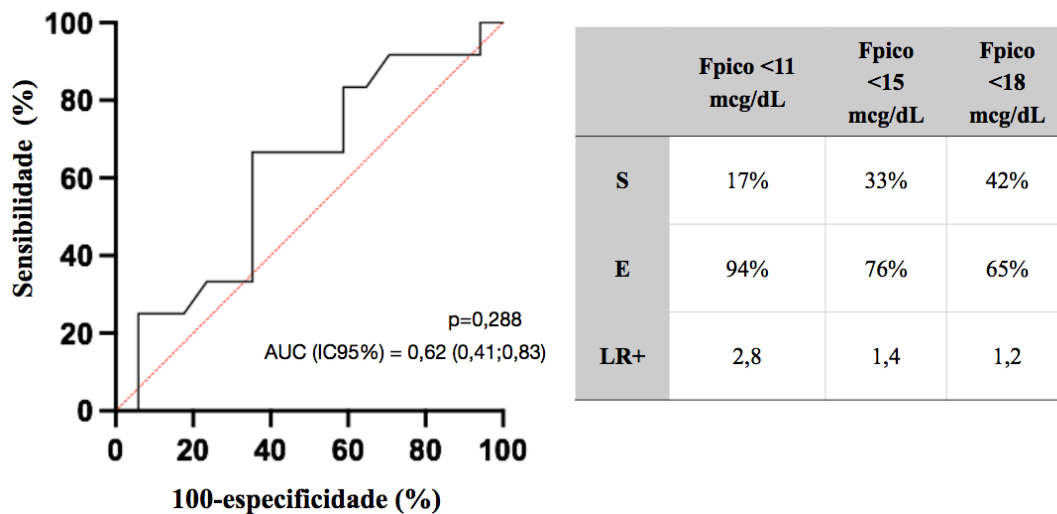
Utilizamos ITT como padrão-ouro com ponto de corte de 18 mcg/dL no teste para definir sensibilidade e especificidade dos testes de cortisol basal e teste de estímulo de glucagon. Estas informações estão demonstradas nas **Figuras 5 e 6**, respectivamente.



**Figura 5** – Sensibilidade e especificidade da dosagem de cortisol basal no diagnóstico de insuficiência adrenal central (n=365).

Para o diagnóstico de IAC utilizando a dosagem de cortisol basal pela manhã, podemos observar que o ponto de corte de 3,5 mcg/dL teve maior acurácia diagnóstica (razão de verossimilhança de 7,6), apresentando especificidade de 99%, às custas de baixa sensibilidade (5,3%). Já o ponto de corte de 5 mcg/dL, previamente utilizado no nosso serviço, ainda demonstra alta especificidade (96%), com pequeno aumento de sensibilidade, que se manteve muito baixa (9,2%), e redução importante

da acurácia diagnóstica, com queda da razão de verossimilhança para 2,2. Já no ponto de corte de 13 mcg/dL, há um aumento considerável da sensibilidade (82%).



**Figura 6** – Sensibilidade e especificidade do teste de glucagon no diagnóstico de insuficiência adrenal central (n=29).

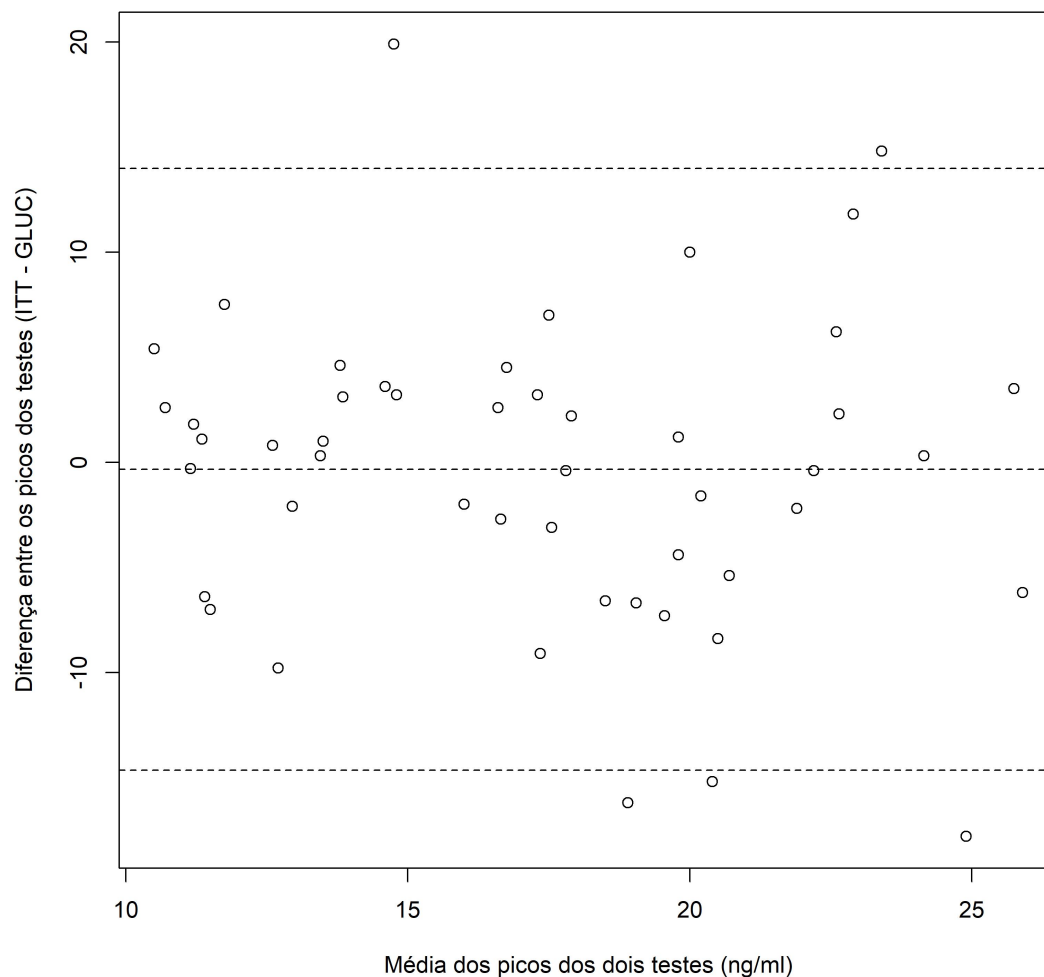
Para o diagnóstico de IAC utilizando o teste de estímulo com glucagon, podemos observar que o ponto de corte de 11 mcg/dL teve maior acurácia diagnóstica (razão de verossimilhança de 2,8), apresentando especificidade de 94%, às custas de baixa sensibilidade (17%). Já o ponto de corte de 18 mcg/dL, previamente utilizado no nosso serviço, demonstrou baixa sensibilidade (42%) e baixa especificidade (65%).

#### 4.5. Avaliação da concordância dos testes de estímulo

Para a análise deste objetivo, os pacientes excluídos no tópico anterior (pacientes com ITT sem hipoglicemia significativa ou com uso de corticoides) continuaram fora desta análise. Foram incluídos apenas aqueles pacientes que haviam realizado, no total, os dois testes de estímulo para evitar viés de seleção (total de 29 pacientes após excluir os pacientes que não apresentaram hipoglicemia no ITT). Os pacientes que realizaram 3 testes de estímulo foram excluídos por representarem uma amostra pequena e, além disso, por apresentarem uma grande variabilidade de cenários (realização de 3 testes de estímulos diferentes, 3 testes de estímulos iguais ou

2 testes de estímulos iguais + 1 de estímulo diferente), não sendo possível obter um  $n$  significativo para cada análise necessária.

Para avaliar a concordância entre os picos obtidos nos testes de glucagon em comparação com o ITT utilizamos a análise de Bland-Altman, demonstrada na **Figura 7**. A figura consiste de um gráfico de dispersão para a diferença entre os picos de ITT e do teste de estímulo com glucagon para aqueles 29 pacientes que realizaram ambos os testes. A linha do meio representa a média da diferença, o qual se encontra próximo de zero, portanto demonstrando uma boa concordância entre as variáveis. As linhas pontilhadas nas extremidades consistem dos limites superior e inferior de concordância e elas delimitam 95% de concordância entre os testes. Como estão distantes do zero, com vários pontos de observação também distantes do zero, indicam que há uma dispersão considerável dos pontos observados. Apenas um ponto (outlier) ficou fora do limite de 95% de concordância entre os testes. A grande dispersão entre os pontos observados pode se dar pelo número pequeno de pacientes incluídos na amostra.



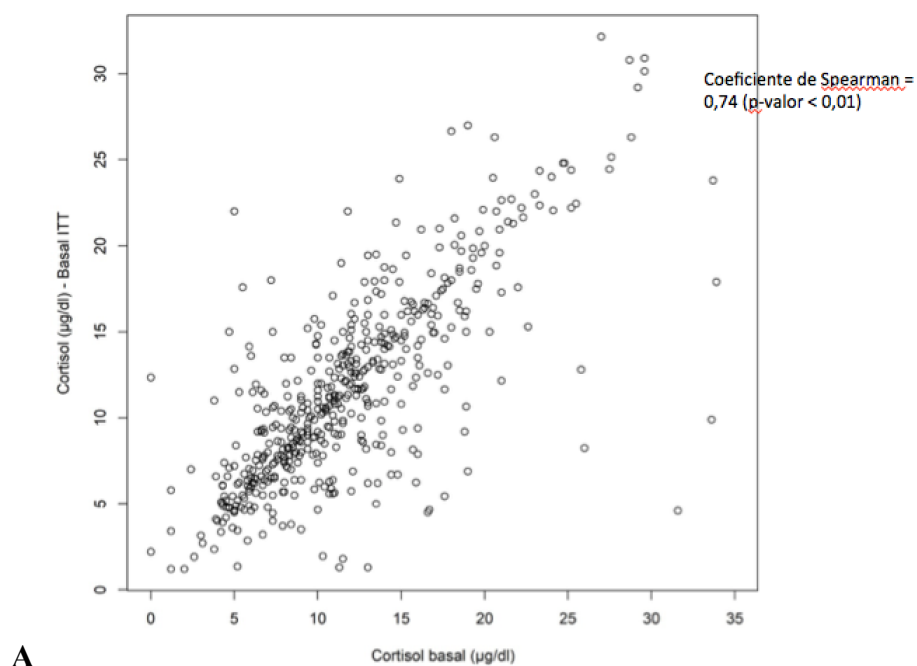
**Figura 7** - Concordância entre os testes ITT e Glucagon avaliada pelo método de Bland-Altman (n=29 pacientes).

#### 4.6. Comparação entre cortisol basal anterior a realização do teste de estímulo e a medida de cortisol no basal do teste de estímulo

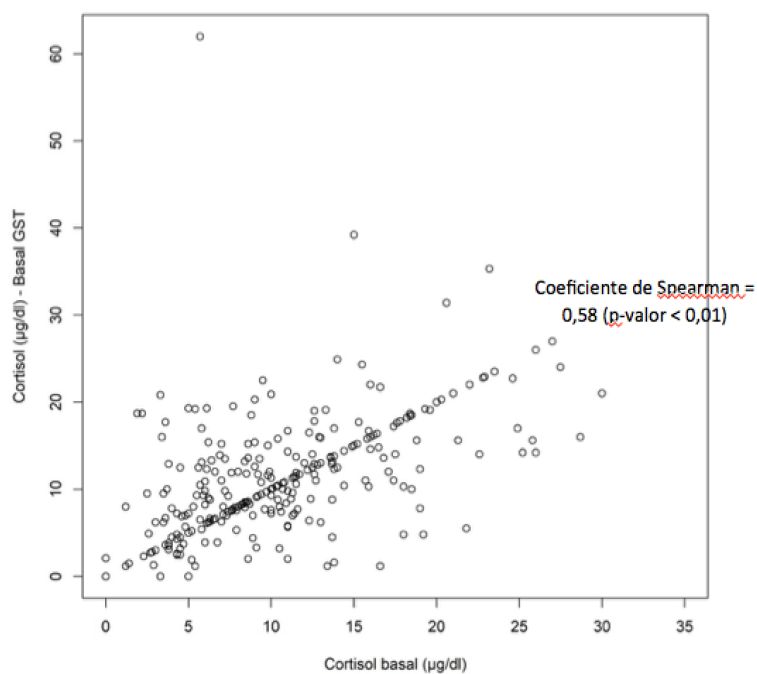
Os pacientes do estudo foram submetidos tanto a dosagem de cortisol basal prévia a realização do teste, quanto à medida de cortisol no momento da realização do estímulo. Para este objetivo, utilizamos a correlação de Spearman. A partir daí foi calculado o coeficiente de Spearman, que descreve a relação entre as variáveis acima.

Observamos um coeficiente de correlação de 0,74 entre cortisol basal pré ITT e cortisol basal realizado durante ITT (**Figura 8A**). Já na análise de correlação entre cortisol basal pré teste e cortisol basal realizado durante tempo 0 min do teste de

estímulo de glucagon, observamos um coeficiente de 0,58 (**Figura 8B**). Ambos considerados com correlação moderada ( $p$ -valor  $<0,01$ ).



**A**



**B**

**Figura 8** - Correlação entre cortisol basal anterior a realização do teste de estímulo e a medida de cortisol no basal do ITT (A) e teste de estímulo com glucagon (B)

#### **4.7. Comparação entre Fbasal e Fpico em diferentes grupos de pacientes.**

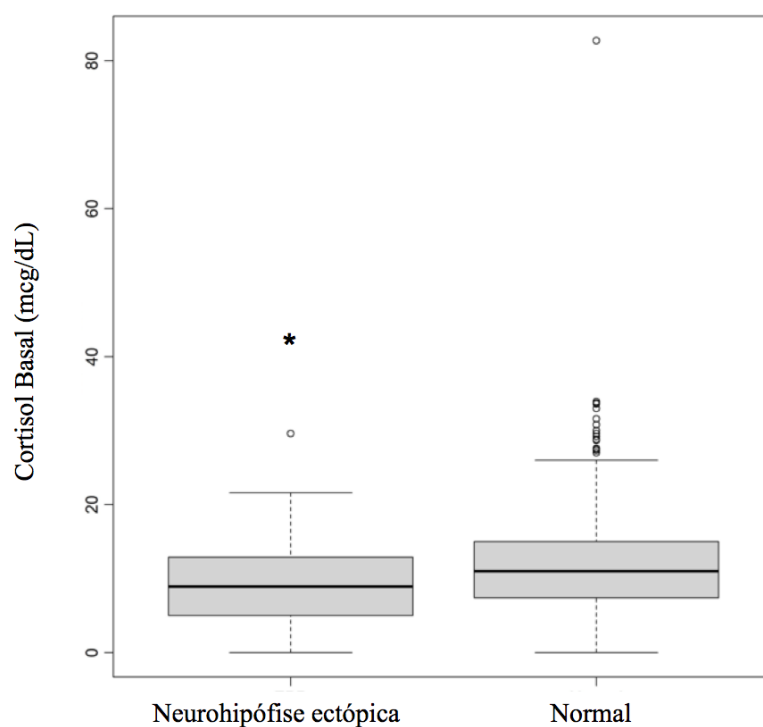
Para este objetivo, comparamos os valores de Fbasal e Fpico no ITT e no teste de estímulo de glucagon em pacientes que apresentavam, neurohipófise ectópica (Tabela 18), síndrome da haste interrompida (Tabela 19) e DGH (Tabela 20) com aqueles que não apresentavam tais diagnósticos. Comparamos Fbasal e Fpico de pacientes com 6 meses a 2 anos com pacientes com idade acima de 2 anos. Comparamos Fbasal e Fpico de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com aqueles sem exposição. Por fim, comparamos Fbasal e Fpico de pacientes com antecedentes neonatais de hipopituitarismo.

##### **4.7.1 Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com neurohipófise ectópica e pacientes sem o diagnóstico.**

Para comparação de Fbasal e Fpico, utilizamos o teste t de Student e o teste de Wilcoxon. Observamos que pacientes com neurohipófise ectópica apresentam cortisol basal significativamente mais baixo do que aqueles que não apresentam, como demonstrado na **Figura 9** e na **Tabela 12**. Dentre os pacientes que foram submetidos ao teste de glucagon, os pacientes com neurohipófise ectópica apresentaram Fpico menor do que os pacientes sem este diagnóstico pelo teste t de Student, como demonstrado na **Tabela 12**. Quando avaliados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, os pacientes com neurohipófise ectópica demonstraram menor pico de cortisol no teste de estímulo do que os pacientes sem esta alteração, como demonstrado na **Figura 10**.

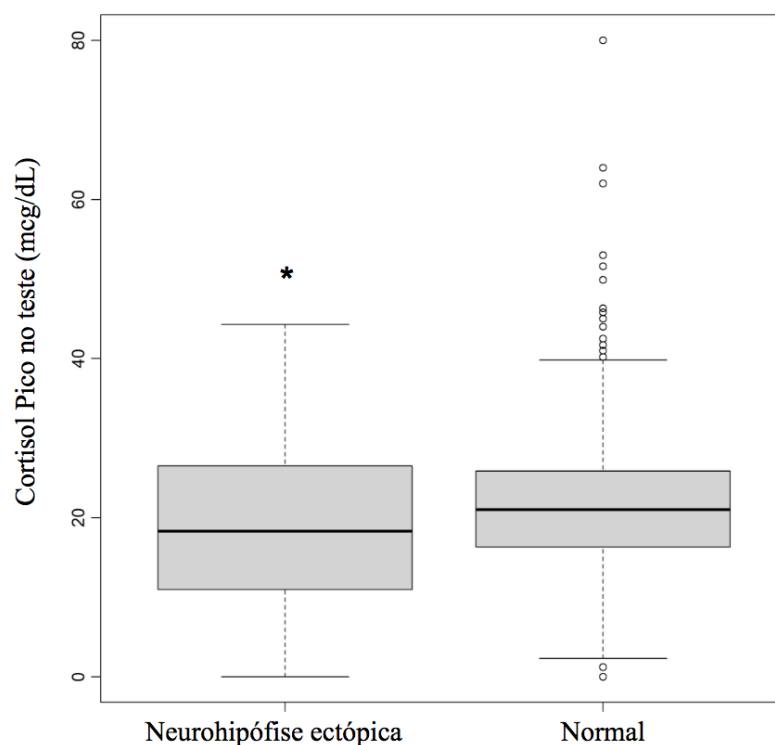
**Tabela 12** – Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste t de Student.

	Fbasal (mcg/dL)	Fpico ITT (mcg/dL)	Fpico Glucagon (mcg/dL)
Neurohipófise ectópica (n=66)	9,2	21,08	16,1
Ausência de neurohipófise ectópica (n=746)	11,8	21,02	21,5
Diferença entre médias	2,6	-0,06	5,4
IC95%	(0,9; 4,2)	(-2,4; 2,3)	(21,5; 16,1)
p-valor	<0,01	0,95	<0,01



**Figura 9** – Comparação de Fbasal de pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. \*p<0,01 neurohipófise ectópica vs normal.





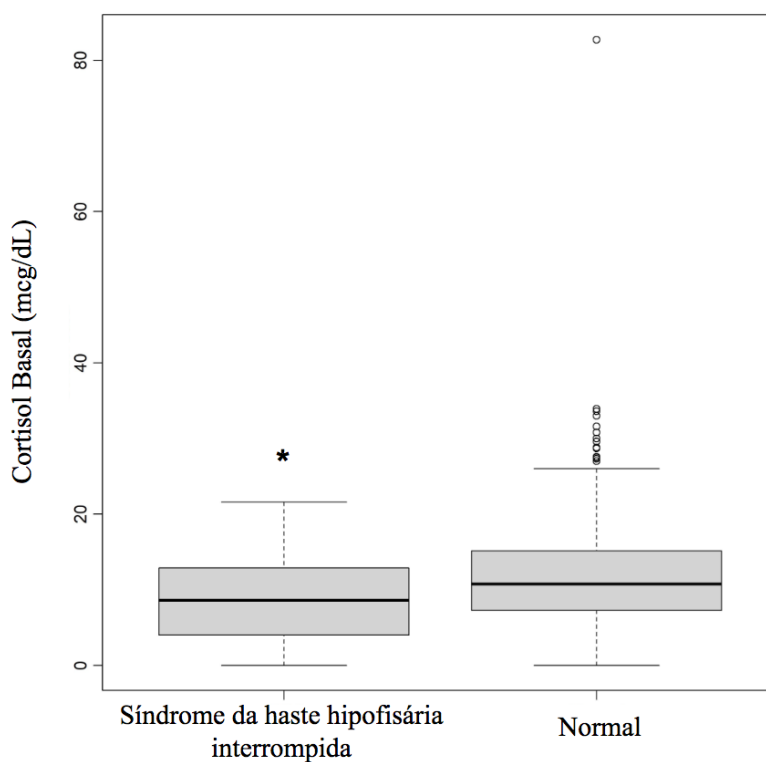
**Figura 10** – Comparação de Fpico entre pacientes com ou sem neurohipófise ectópica pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. \* $p < 0,01$  neurohipófise ectópica vs normal.

#### 4.7.2 Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com síndrome da haste interrompida e pacientes sem o diagnóstico.

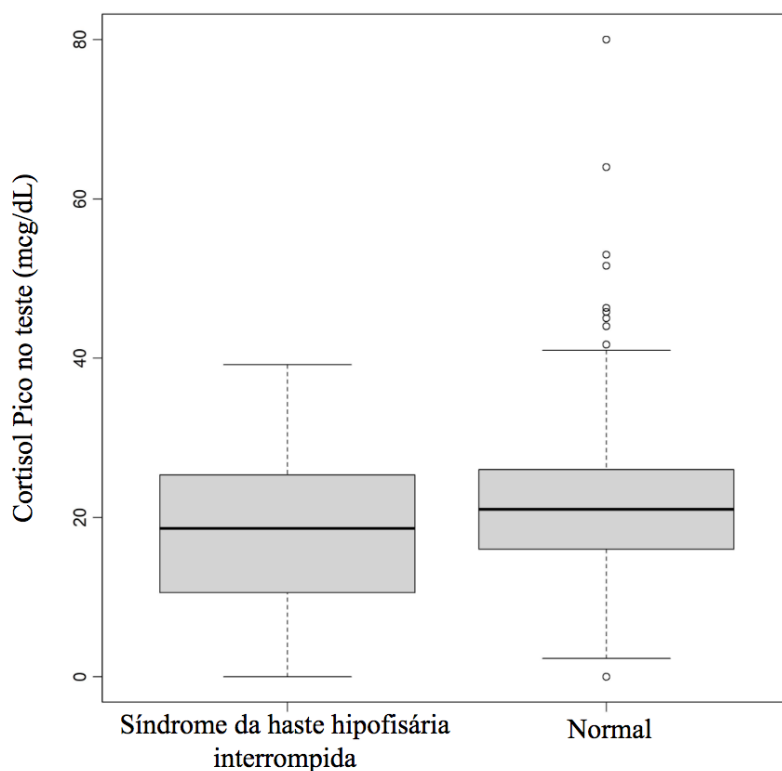
Para comparação entre as medianas, utilizamos o teste t de Student e o teste não paramétrico de Wilcoxon. Observamos que pacientes com síndrome da haste interrompida (presença de dois ou três das seguintes alterações: neurohipófise ectópica, ausência de haste hipofisária e adenohipófise hipoplásica) apresentam cortisol basal significativamente mais baixo do que aqueles que não a apresentam, como demonstrado na **Tabela 13** e na **Figura 11**. Não foi observada diferença estatística entre Fpico de pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste t de Student ou pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, como demonstrado na **Tabela 13** e na **Figura 12**.

**Tabela 13** – Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste t de Student.

	<b>Fbasal (mcg/dL)</b>	<b>Fpico ITT (mcg/dL)</b>	<b>Fpico Glucagon (mcg/dL)</b>
<b>Síndrome da haste interrompida (n=50)</b>	8,9	21,0	17,5
<b>Ausência de síndrome da haste interrompida (n=762)</b>	11,7	20,4	21,2
<b>Diferença entre médias</b>	2,8	0,6	3,6
<b>IC95%</b>	(0,9; 4,9)	(-2,1; 3,4)	(-0,7; 8)
<b>p-valor</b>	<0,01	0,63	0,10



**Figura 11** – Comparação entre medianas de Fbasal em pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. \*p<0,01 síndrome da haste hipofisária interrompida vs normal.



**Figura 12** – Comparação entre medianas de Fpico em pacientes com ou sem síndrome da haste interrompida pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

#### **4.7.3 Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes com deficit de GH isolado e pacientes sem DGH isolado.**

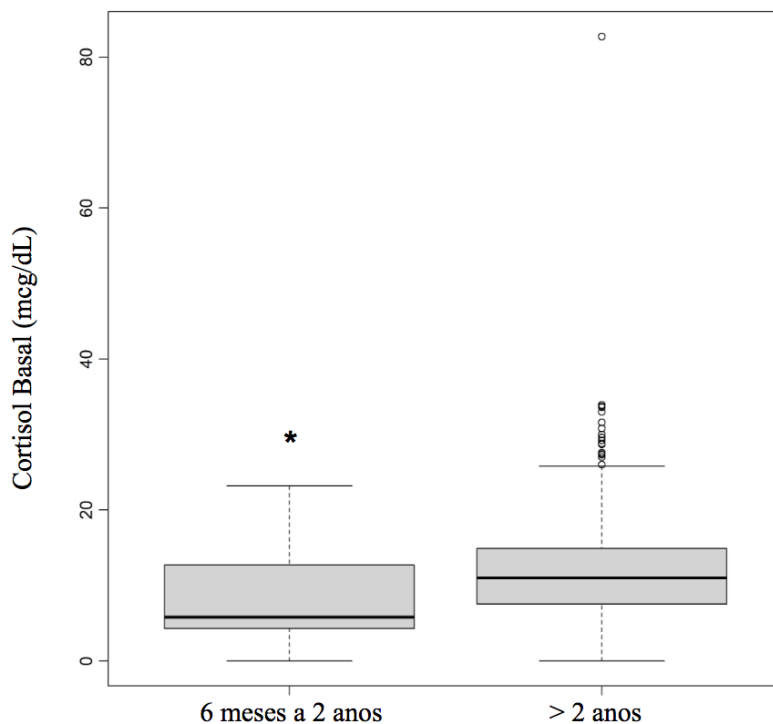
Observamos que pacientes que foram submetidos a teste de estímulo de cortisol com glucagon e apresentavam DGH isolado, tinham Fpico menor do que aqueles sem o diagnóstico de DGH isolado, como demonstrado na **Tabela 14**, mas com ambas as médias acima do valor de 20 mcg/dl, a partir do qual descarta-se IAC. Não foram observadas diferenças entre Fbasal e Fpico no ITT entre os grupos.

**Tabela 14** – Comparação entre médias de Fbasal e de Fpico em pacientes com ou sem DGH isolado pelo teste t de Student.

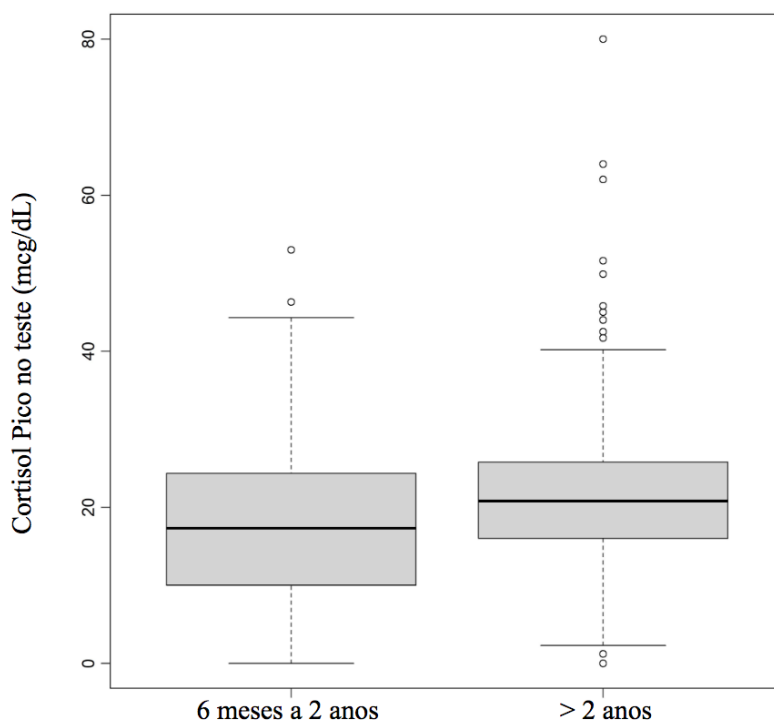
	Fbasal (mcg/dL)	Fpico ITT (mcg/dL)	Fpico Glucagon (mcg/dL)
DGH (n=41)	11,62	18,9	20,5
Sem DGH (n=771)	11,66	21,1	26,2
Diferença entre médias	-0,05	2,2	-5,7
IC95%	(-2,1; 2,0)	(-0,2; 4,8)	(-10,8; -0,6)
p-valor	0,96	0,08	0,03

#### 4.7.4 Comparação entre Fbasal e Fpico de pacientes lactentes (entre 6 meses e 2 anos de idade) e pacientes acima de 2 anos de idade.

Observamos que pacientes com idade entre 6 meses a 2 anos de idade tinham Fbasal significativamente menor do que aqueles acima de 2 anos de idade, como demonstrado na **Figura 13**. Não foram observadas diferenças de Fpico entre os grupos.



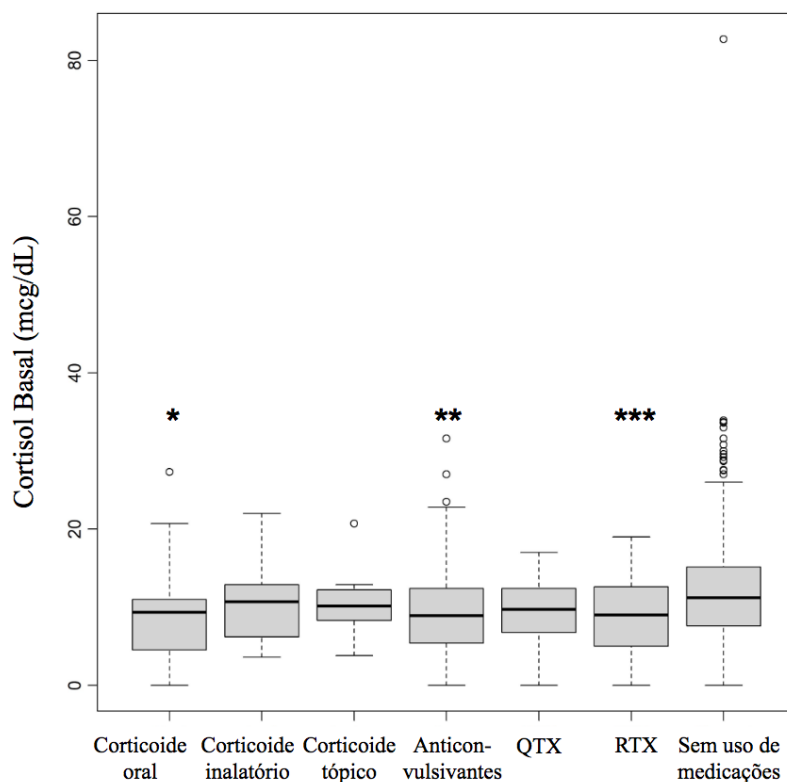
**Figura 13** – Comparação entre Fbasal em pacientes lactentes e maiores de 2 anos de idade pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. \* $p < 0,01$  6 meses a 2 anos vs >2 anos.



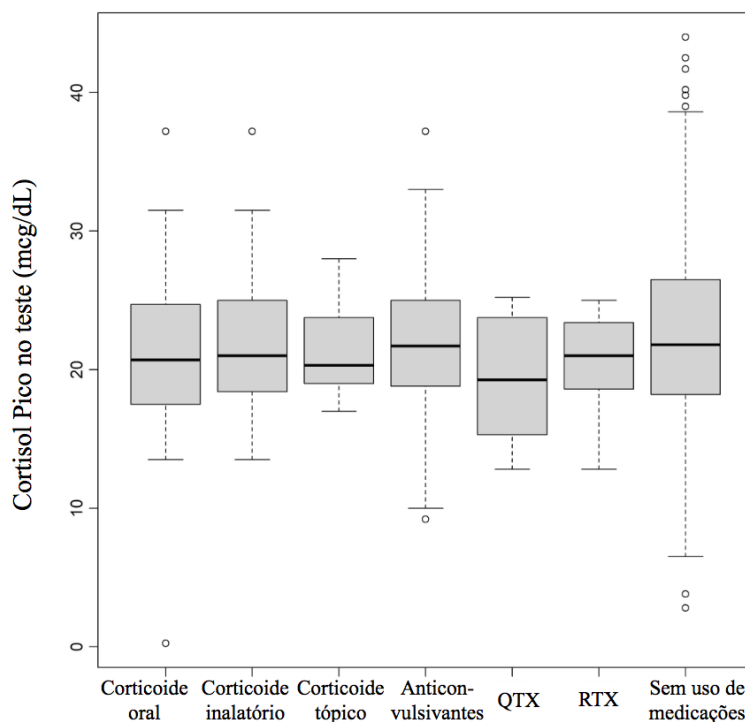
**Figura 14** – Comparação entre medianas de Fpico em pacientes lactentes e maiores de 2 anos de idade pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

#### 4.7.5 Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia.

Observamos que pacientes que fizeram uso de corticoides orais, anticonvulsivantes e aqueles expostos previamente a radioterapia apresentaram cortisol basal significativamente menor, como demonstrado na **Figura 15**. Não foram observadas diferenças de Fpico entre os grupos, como demonstrado na **Figura 16**.



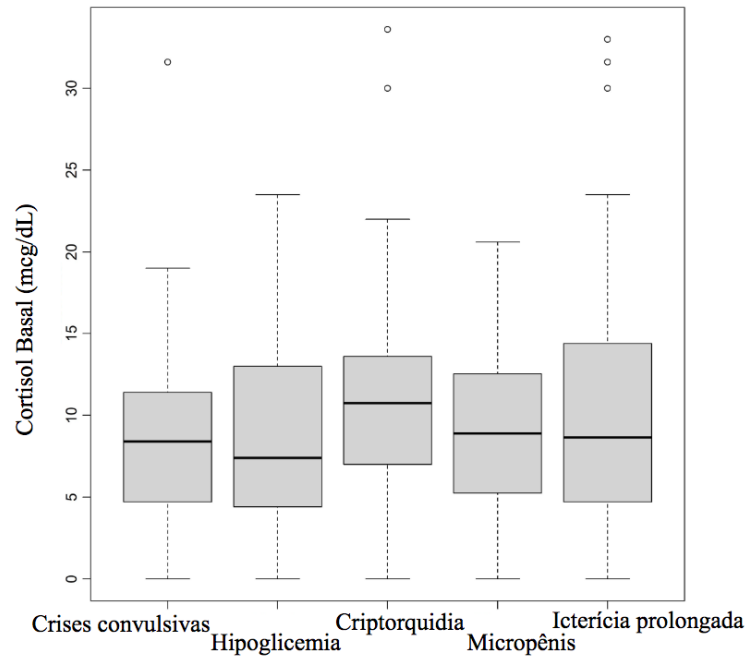
**Figura 15** – Comparação entre Fbasal de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia. \* $p < 0,01$  corticoide oral vs sem uso de medicações. \*\* $p < 0,01$  anticonvulsivantes vs sem uso de medicações. \*\*\* $p < 0,01$  RTX vs sem uso de medicações.



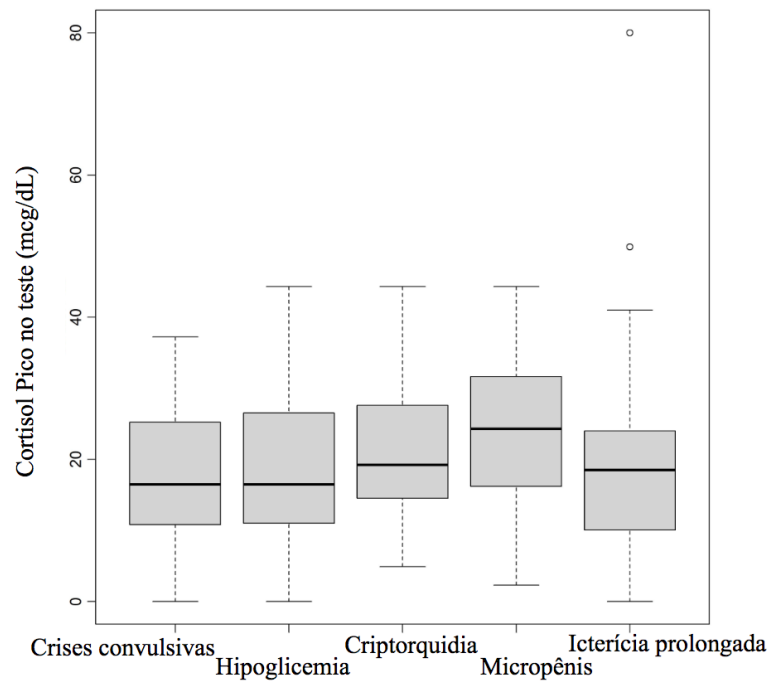
**Figura 16** – Comparação entre Fpico de pacientes que fizeram uso de medicações e/ou foram expostos a radiação com pacientes que não fizeram uso de medicações ou foram submetidos a radioterapia.

**4.7.6 Comparação de Fbasal e Fpico de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo com pacientes que não apresentavam antecedentes pessoais de sintomas sugestivos de hipopituitarismo.**

Não foram observadas diferenças de Fbasal e Fpico entre os grupos, como demonstrado nas **Figuras 17 e 18**.



**Figura 17** – Comparação entre Fbasal de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo.



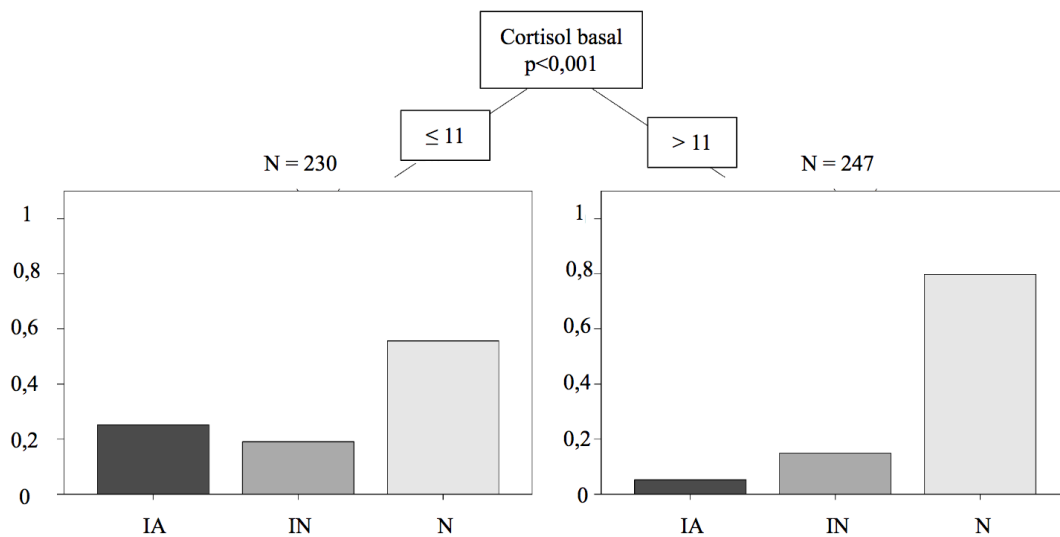
**Figura 18** – Comparação entre Fpico de pacientes que apresentaram antecedentes neonatais de hipopituitarismo.



#### **4.8. Avaliação de possíveis preditores de resultado no teste de estímulo baseado em regressão múltipla com análise de diversas variáveis por meio de *Conditional Inference Tree***

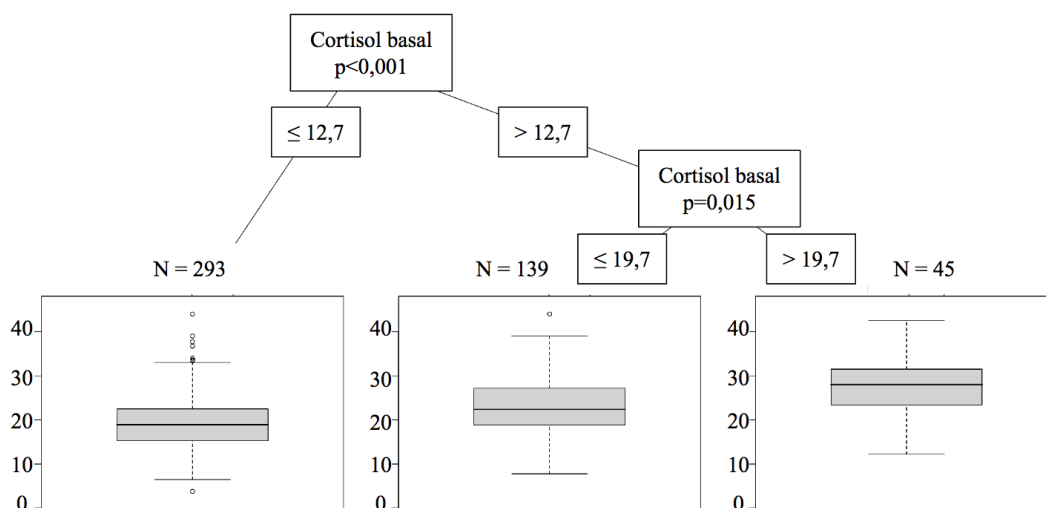
A partir do banco de dados obtido na avaliação dos 904 pacientes do estudo, optamos por avaliar as variáveis numéricas e categóricas mais importantes para predição de resultado no teste de estímulo de um paciente com suspeita de hipopituitarismo. Para garantir este objetivo, avaliamos esses dados por regressão múltipla por meio da *Conditional Inference Tree*.

Por meio desta, podemos observar que, no ITT, nas variáveis numéricas, apenas o cortisol basal conseguiu diferenciar significativamente os grupos ( $p < 0,001$ ). Ao utilizar o ponto de corte de 11 mcg/dL no F<sub>basal</sub>, conseguimos classificar a maioria dos pacientes dentro da categoria normal (pico no teste de estímulo acima de 18 mcg/dL). No entanto, ainda apresentamos 5% de pacientes com insuficiência adrenal (F<sub>pico</sub> no ITT  $< 15$  mcg/dL). Já para concentrações menores ou iguais a 11 mcg/dL no cortisol basal, ainda há mais de 50% dos pacientes configurando como normais. No entanto, há aumento significativo da probabilidade de insuficiência adrenal central quando comparado aos pacientes com valor de F<sub>basal</sub> acima de 11 mcg/dL.



**Figura 19** – *Conditional inference tree* para os pacientes submetidos a ITT, sendo a classificação dos pacientes baseado no Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação

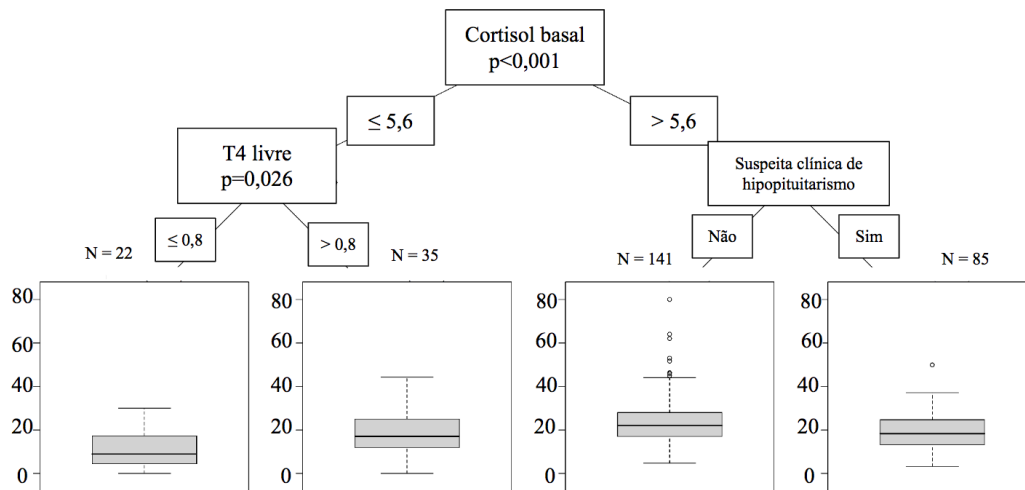
Ainda utilizando pontos de corte de cortisol basal para predizer o valor do Fpico no ITT, observamos que concentrações de Fbasal menores ou iguais a 12,7 mcg/dL diferem significativamente de concentrações de Fbasal entre 12,6 e 19,7 mcg/dl, que por sua vez diferem significativamente de concentrações de Fbasal maiores que 19,7 mcg/dL com relação a valores de Fpico nestes pacientes. No entanto, clinicamente, não há diferença entre os grupos, visto que a mediana fica entre 18 e 30 mcg/dL, configurando a maior parte dos indivíduos como normais nos três pontos de corte de cortisol basal.



**Figura 20** – *Conditional inference tree* para os pacientes submetidos a ITT, sendo o Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação por boxplots para cada ponto de corte de Fbasal. Significância estatística demonstrada pelo p valor em cada nodo de bifurcação.

Por fim, podemos observar que, no glucagon, nas variáveis numéricas, tanto o cortisol basal quanto o T4 livre conseguiu diferenciar significativamente os grupos ( $p < 0,001$  e  $p = 0,026$ , respectivamente). Além disso, a suspeita prévia de hipopituitarismo também conseguiu caracterizar os pacientes em valores diferentes de Fpico. Ao utilizar o ponto de corte de 5,6 mcg/dL no Fbasal e valores iguais ou menores do que 0,8 ng/dL de T4 livre, podemos distinguir os pacientes com valores mais baixos de Fpico, com mediana próxima de 15 mcg/dL ( $p = 0,026$ ). Se obtivermos valores de cortisol basal menores ou iguais a 5,6 mcg/dL no Fbasal, mas T4 livre maior do que 0,8 ng/dL, obtivemos valores mais altos na mediana de Fpico, em torno de 19 mcg/dL.

Para concentrações de Fbasal acima de 5,6 mcg/dL, podemos distinguir o Fpico dos pacientes que têm ou não suspeita de hipopituitarismo prévia ao teste de estímulo. Apesar de significativamente diferente ( $p = 0,028$ ), as medianas de Fpico em ambos os grupos ficaram entre 18 e 20 mcg/dL, não configurando diferença clínica relevante.



**Figura 21** – *Conditional inference tree* para os pacientes submetidos a glucagon, sendo o Fpico demonstrado em cada grupo da bifurcação por boxplots para cada ponto de corte de Fbasal ou T4 livre e para presença ou ausência de suspeita clínica prévia de hipopituitarismo. Significância estatística demonstrada pelo p valor em cada nodo de bifurcação

## 5. DISCUSSÃO

Fazer o diagnóstico de IAC corretamente é de extrema importância, visto que pode ser uma doença ameaçadora da vida. Apesar de o diagnóstico de crise adrenal ser bem estabelecido, a identificação dos pacientes com sintomas sutis de disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ainda se mantém desafiadora. Além disso, diagnosticar erroneamente um paciente com IAC pode levar a tratamento desnecessário e a efeitos iatrogênicos decorrentes do uso crônico de corticosteróides. Portanto, a caracterização de pacientes que apresentam indicação de realização de testes de estímulo de cortisol e aqueles com diagnóstico de IAC é útil para melhorar a abordagem desses pacientes durante o atendimento de endocrinologia pediátrica e pediatria.

Este estudo é o primeiro realizado na FMRP-USP e um dos poucos disponíveis na literatura científica a fazer um levantamento de dados com grande número de pacientes que realizaram testes de estímulo de cortisol para diagnóstico de IAC na população pediátrica.

Observamos que dentre a totalidade de testes de estímulo de cortisol avaliados, a maioria deles foi realizada na faixa etária pediátrica, o que motivou o estudo específico da população com idade inferior a 18 anos.

O teste mais realizado foi o ITT, que ainda é considerado como teste de referência para diagnóstico de IAC (Charmandari et al, 2014). O teste de estímulo com ACTH para diagnóstico de IAC não é utilizado no HCFMRP-USP em função de apresentar menor desempenho diagnóstico, pela dificuldade de se obter o ACTH sintético e por boa experiência com o ITT e teste de glucagon para diagnóstico eficaz e seguro, assim como descrito neste estudo.

A maioria dos pacientes avaliados apresentou indicação de realização dos testes de estímulo por baixa estatura ou deficiência de crescimento. 21,9% dos pacientes apresentavam suspeita de hipopituitarismo ao início da avaliação. Ao solicitar os testes de ITT e glucagon, conseguimos avaliar tanto o eixo HHA quanto a secreção hipotalâmica de GH. Como os déficits de hormônios hipofisários isolados são menos frequentes, é justificado que seja investigada a existência de déficit de cortisol em pacientes com baixa estatura ou crescimento deficiente, visto que podemos ter alteração de mais de um eixo hipofisário e que os sintomas de IAC na maioria das vezes não são claros para o paciente e os familiares e podem não estar

presentes fora de uma circunstância de estresse. Dois estudos realizados na Itália demonstraram a importância da utilização dos testes de estímulo para avaliação do diagnóstico de IAC em pacientes com déficit de GH e risco de insuficiência adrenal (Iorgi et al, 2010; Maghnie et al, 2005).

Os pacientes avaliados tiveram análises de outros exames laboratoriais, principalmente para avaliação de outros eixos hipofisários. Como esses pacientes tinham indicação de realização dos testes de estímulo para avaliação de déficit de hormônio hipofisário (GH e/ou cortisol), é correto que sejam avaliados outros déficits hormonais associados, visto que a incidência na população é bem maior do que déficits isolados e a clínica pode ser bastante frustra, necessitando portanto da análise laboratorial.

Observamos uma proporção maior de pacientes masculinos submetidos aos testes de estímulo, provavelmente pela maior procura dessa população pelo pediatra ou endocrinologista pediátrico com queixa de baixa estatura. A maioria deles era impúbere no momento do teste.

Há variações entre indivíduos para maturação do ritmo circadiano e resposta do eixo HHA ao estresse. Por isso, optamos por comparar F<sub>basal</sub> e F<sub>pico</sub> de pacientes lactentes (de 6 meses de idade a 2 anos) e pacientes acima de 2 anos de idade. Pudemos observar menor F<sub>basal</sub> em lactentes, mas nenhuma diferença estatística no F<sub>pico</sub>. Este achado sugere que a partir dos 6 meses de idade, a maioria dos pacientes já apresenta maturidade da resposta do eixo HHA ao estresse mimetizado pelo glucagon no teste, visto que nos menores de 2 anos o ITT é contraindicado em nossa instituição.

Ao avaliar os achados clínicos neonatais sugestivos de hipopituitarismo, observamos que o achado mais comum foi de icterícia neonatal tardia, que não é patognomônica de IAC e pode causada por outros fatores, como icterícia secundária ao aleitamento materno. Outros achados mais comuns incluíram crise convulsiva, hipoglicemia e criptorquidia. Estes achados estão de acordo com dados prévios descritos na literatura (Chabre et al, 2017). Não observamos diferença estatística entre F<sub>basal</sub> e F<sub>pico</sub> em pacientes que apresentaram diversos antecedentes neonatais de hipopituitarismo.

Entre os 59 pacientes diagnosticados com IAC, 16 (27%) faziam uso de medicações, principalmente glicocorticóide ou anticonvulsivantes. Poucos utilizaram quimioterápicos ou foram expostos a radiação. Dentre aqueles expostos a

radioterapia, observamos Fbasal menor quando comparados com pacientes controle (sem uso de medicação). Essa diferença não foi observada em pacientes com uso de quimioterápicos. Os efeitos iatrogênicos do uso terapêutico crônico de corticosteróides são bem descritos e conhecidos (Krasner AS, 1999). Esses pacientes têm risco aumentado de inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e de apresentarem IAC (Chabre et al, 2017). Observamos menor Fbasal em pacientes em uso de corticoides orais quando comparados com aqueles que não faziam uso da medicação. Considerando que este estudo foi realizado em um hospital terciário universitário, é justificável o aumento do número de pacientes fazendo uso de corticosteróides, visto que muitos acompanham em outras especialidades pediátricas por comorbidades complexas, como doenças autoimunes/inflamatórias, neoplásicas e alérgicas graves.

Os anticonvulsivantes são drogas que têm efeito de aumentar a depuração do cortisol, portanto esses pacientes podem apresentar alterações nos resultados dos exames por interação das medicações com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Putignano et al, 1998). Observamos menor Fbasal em pacientes em uso de anticonvulsivantes quando comparados com aqueles que não faziam uso da medicação. Não observamos essa diferença no teste de estímulo, o que pode ser justificado pelo fato de que a maioria desses pacientes possui um eixo HHA que responde bem ao estresse.

À admissão, parte considerável dos pacientes do estudo apresentava algum achado dismórfico, podendo ou não ser significativo para apontar suspeita diagnóstica de síndrome genética. A maioria dos achados foi relacionado com a Síndrome de Turner (pescoço curto e alado, clinodactilia, quarto metacarpo curto, valgismo cubital). Tal achado é confirmado quando analisamos os cariótipos realizados na população do estudo. A maioria destes pacientes que realizaram exame de cariótipo apresentava resultado normal no teste de estímulo de cortisol. Entre aqueles com resultado anormal de cariótipo, a maioria tinha confirmação para síndrome de Turner e Turner mosaico. Usualmente, a avaliação de rotina do eixo HHA não está indicada nestas pacientes. Os dados do presente estudo são explicados pois, no passado, o protocolo de fornecimento do SUS para estas pacientes exigia a realização de testes de GH. Nestes casos, a dosagem simultânea de cortisol era também realizada. Nenhuma paciente com síndrome de Turner teve IAC confirmada.

Foram poucos os pacientes que realizaram análise molecular para diagnóstico. Provavelmente isto decorre do fato de a maior parte da análise de dados ser composta de pacientes avaliados na primeira década dos anos 2000, em que estes exames não tinham a mesma facilidade de serem realizados num sistema público de assistência e ensino, sendo realizados na maioria das vezes com fins de pesquisa. Apenas um paciente apresentou alteração molecular compatível com hipopituitarismo (Birla et al, 2016). O restante dos pacientes com alterações moleculares tinham clínica de baixa estatura e alterações em genes relacionados, de modo geral, à deficiência isolada de GH.

A avaliação da presença de anormalidades anatômicas da região hipotálamo-hipofisária, bem como de todo o SNC foi realizada por meio de RNM na maioria dos pacientes avaliados. Habitualmente, este tipo de exame é solicitado apenas em pacientes com alterações clínicas com confirmação bioquímica de deficiência de um ou mais hormônios hipofisários. Dentre as alterações observadas, destacam-se aquelas classicamente associadas com hipopituitarismo: neurohipófise ectópica, hipoplasia ou ausência da haste hipofisária, hipoplasia da hipófise anterior, agenesia do septo pelúcido, agenesia ou hipoplasia do septo caloso, alteração do nervo óptico e holoprosencefalia ou holoprosencefalia-like. Além disso, observamos outras alterações, que apesar de não serem diretamente ligadas ao hipopituitarismo, podem causá-lo indiretamente, tanto por efeito de massa, exposição a radioterapia por tratamento de lesão neoplásica ou lesões causadoras de epilepsia. Neste último caso, há necessidade de uso de anticonvulsivantes, que, como descrito previamente, podem alterar e aumentar a metabolização de cortisol, levando ou contribuindo para o desenvolvimento de IAC ou, eventualmente, dificultando seu diagnóstico com precisão.

Entre os pacientes diagnosticados com IAC, a maioria apresentava hipopituitarismo anterior parcial, hipopituitarismo anterior total, panhipopituitarismo, uso crônico de corticosteróides ou síndromes genéticas reconhecidamente associadas com deficiência do eixo HHA .

Em relação a segurança do ITT, apenas uma pequena parcela apresentou necessidade de correção oral ou endovenosa da glicemia por sintomas leves. Entretanto, uma porção considerável dos pacientes apresentou sintomas de hipoglicemia como sonolência, fraqueza e/ou tremores, sendo na maioria leves. Em poucos pacientes foi necessária suplementação de glicose por via oral e via



endovenosa. Poucos pacientes necessitaram observação clínica ambulatorial após o final do teste. A escolha da via de correção da glicemia na maioria das vezes não foi descrita em prontuário, mas aparentemente foi arbitrária e relacionada a facilidade de acesso endovenoso ou de alimentos para oferecer via oral. Poucos pacientes apresentaram sintomas graves (redução do nível de consciência), oito pacientes ficaram em observação e apenas um necessitou de internação em enfermaria. Nenhum paciente foi internado em UTI pediátrica. A maioria teve sua glicemia normalizada no período de 30 a 60 minutos após o início dos sintomas, independente da correção da glicemia. Nenhum paciente teve crise convulsiva ou apresentou sequelas permanentes ou morreu durante o teste.

Fizemos comparação entre o tempo necessário para recuperação da hipoglicemia no ITT e o Fpico obtido no teste, mas não observamos diferença estatística entre os grupos (IAC, normal ou indeterminado; dados não apresentados). Aventamos a hipótese de que a correção precoce da hipoglicemia pode ter alterado os resultados observados.

Durante a realização da dose do teste de glucagon, poucos pacientes apresentaram efeitos colaterais muito significativos. A maioria dos sintomas foi gastrointestinal: náuseas e vômitos. Poucos necessitaram de internação hospitalar em enfermaria em decorrência dos sintomas mencionados, nenhum em UTI pediátrica. Nenhum paciente teve sequela permanente ou óbito. Estes dados nos permitem afirmar que tanto os ITT como os testes com glucagon são seguros na faixa etária pediátrica.

Observamos que a maioria dos pacientes no estudo tiveram como diagnóstico final afecções relacionadas com baixa estatura. No entanto, uma proporção considerável de pacientes foi diagnosticada com IAC em suas diversas formas (79 pacientes, 8,7% da amostra), principalmente quando comparada a incidência de IAC no presente estudo com aquela relatada na literatura (Chabre et al, 2017), destacando o viés de seleção de pacientes em hospital de complexidade terciária/quaternária.

Dentre os pacientes com hipopituitarismo anterior parcial, observamos que a maioria dos pacientes apresentava déficit de GH, enquanto que a mesma proporção tinha déficit de ACTH e TSH. Em menor proporção, observamos déficit de LH/FSH. Isso pode se dar por viés de seleção para realização do exame, visto que a maioria dos pacientes realizou teste na pré-adolescência/adolescência, sendo impúberes e por suspeita de baixa estatura e/ou hipopituitarismo e IAC. A maioria dos pacientes com

IAC tem déficit de outros hormônios concomitantemente, e, no presente estudo, mais frequentemente relacionado ao déficit de GH. Portanto, a realização do ITT e/ou do teste com glucagon é importante, visto que ambos analisam tanto o eixo somatotrófico quanto o adrenocorticotrófico e eles são realizados em sua maioria em pacientes com baixa estatura, queixa tão comum em consultório do pediatra e do endocrinologista.

Ao avaliar os resultados dos testes de estímulo de cortisol, observamos que a maioria dos pacientes foi caracterizada como normal. Já ao analisar as dosagens de cortisol basal, observamos que a maioria se encontra no grupo de pacientes com diagnóstico indeterminado.

Avaliamos a concordância do pico de cortisol obtido nos testes de estímulo com o resultado obtido no cortisol basal e o grupo em que os pacientes foram classificados. Para isso utilizamos o teste de concordância de Kappa. Obtivemos um nível de concordância muito pequeno entre o cortisol basal e os testes de estímulo, como já inferido pelos dados discutidos acima, para classificar os pacientes entre normal ou portador da doença.

Ao avaliar as concentrações de cortisol basal, a concordância entre o exame coletado antes do teste de estímulo e no basal do teste de estímulo tem correlação forte-moderada tanto para o ITT quanto para o teste de estímulo de glucagon.

Observamos que a resposta (pico) do cortisol obtida no ITT e no teste de glucagon têm boa concordância em todos os grupos de diagnóstico: normal, indeterminado e IAC (mediana próxima de zero na análise de Bland-Altman), mas principalmente nos grupos IAC e indeterminado. No entanto, ainda necessitamos de um número maior de pacientes que realizaram os dois testes para avaliar se assim há redução da dispersão da dispersão dos valores e melhor concordância.

No cenário de vida real, ao avaliarmos cada paciente, para garantir um diagnóstico correto, utilizamos um raciocínio clínico, avaliamos a probabilidade clínica da doença e podemos fazer uso de testes diagnósticos para reduzir ao máximo o grau de incerteza do diagnóstico. Dentre as propriedades dos testes diagnósticos, avaliamos neste estudo a sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança.

A sensibilidade de um teste avalia a probabilidade de o teste ser positivo quando o paciente apresenta realmente a doença. Já a especificidade consiste na probabilidade de o teste ser negativo e o paciente não apresentar a doença. Um teste sensível é um bom teste para triagem, enquanto que um teste específico é adequado

para confirmação diagnóstica. O teste ideal é sensível e específico, classificando corretamente a maior parte dos pacientes (Threvetan R. et al, 2017).

Existem indivíduos normais com exame alterado e indivíduos doentes com exame normal. Para avaliação dos pontos de corte de um teste, podemos deixá-lo mais sensível ou específico. Na prática, escolhemos o ponto em que a maioria dos pacientes é corretamente classificado, evitando erros de classificação. Para isso podemos construir a curva ROC. Avaliamos a curva pela proximidade do canto superior esquerdo do gráfico e pela área sob a curva (AUC). Quanto mais próximo e quanto maior a AUC (mais próximo de 1), melhor o poder discriminatório do teste e assim podemos escolher o ponto de corte adequado (Hand DJ, 2010). Além disso, podemos comparar diferentes testes diagnósticos, assim como fizemos neste estudo.

Para avaliar especificamente os dados dos pacientes classificados como indeterminados quanto ao diagnóstico de IAC, construímos curvas ROC para avaliar sensibilidade e especificidade de diferentes pontos de corte para diagnosticar pacientes com IAC ou descartar a doença.

Assim como proposto na literatura (Grossman AB, et al, 2010), observamos que o ponto de corte de cortisol basal de 3,5 mcg/dl é o limite inferior que garante a maior acurácia diagnóstica e maior especificidade para diagnóstico de IAC, mas com grande comprometimento da sensibilidade do teste.

Por outro lado, aqueles pacientes com cortisol basal acima de 13 mcg/dl, têm seu diagnóstico descartado com taxas consideráveis de falsos negativos. Por essa razão, é necessário avaliar os pontos de corte dentre aqueles considerados como resultados indeterminados do teste, a fim de identificar um ponto que consiga classificar corretamente a maioria dos pacientes. Ao avaliar os pontos de corte considerados como resultados indeterminados de cortisol basal, não conseguimos determinar um valor de ponto de corte que configure em valores adequados de sensibilidade ou especificidade, com risco alto de classificar erroneamente o paciente.

Com relação ao teste de estímulo de glucagon, observamos que o ponto de corte de 11 mcg/dL de Fpico é o que apresenta maior acurácia diagnóstica, apresentando alta especificidade.

Por fim, optamos por avaliar variáveis categóricas e numéricas para tentar aumentar probabilidade pré teste de atingir um determinado Fpico. No entanto, apesar de diferenças estatísticas significativas, as diferenças de valores de Fpico obtidos na *Conditional Inference Tree* não impactam significativamente as decisões da prática

clínica, exceto em pacientes com T4 livre abaixo de 0,8 ng/dl, em que o Fpico foi significativamente menor, o que corrobora a constatação de que a probabilidade de existir IAC em paciente com pelo menos mais um eixo hipofisário acometido é maior do que num paciente com acometimento isolado do eixo HHA

Obtivemos diferença significativa na concentração de cortisol basal de pacientes com neurohipófise ectópica e naqueles com síndrome da haste interrompida quando comparados com os pacientes sem estes achados em exames de imagem. Portanto, isso corrobora com os dados conhecidos de relação entre estes achados e o diagnóstico de hipopituitarismo. No entanto, estes pacientes apresentaram, em sua maioria resposta normal no teste de estímulo, demonstrando que, mesmo com alterações em exame de imagem e Fbasal mais baixo, não podemos excluir a realização de teste de estímulo de cortisol para diagnóstico correto destes pacientes.

Este estudo apresenta limitações por consistir de um estudo retrospectivo com análise de prontuários. Apesar de retrospectivo, foi utilizado o mesmo método de dosagem de cortisol durante todo o período de estudo e todos os testes seguiram o mesmo protocolo e foi realizada por equipe médica treinada. Este estudo é importante para caracterização da população que realizou testes de estímulo de cortisol na nossa instituição, para avaliação longitudinal dos pacientes, diagnóstico final e análise de sensibilidade e especificidade dos testes aplicados. Apresenta potencial para otimizar interpretação dos testes, além de garantir um banco de dados para análise contínua dos testes realizados neste serviço, assim como comparação com novos métodos de dosagem de cortisol.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo caracterizou a população pediátrica submetida a teste de estímulo de cortisol e os testes realizados entre 2001 e 2016 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Observamos que os testes de ITT e glucagon são concordantes entre si, são seguros e necessários para diagnóstico de IAC.

O exame de cortisol basal classifica grande parte dos pacientes como indeterminados e apresenta sensibilidade e especificidade menor do que os testes de estímulo, sendo útil para descartar a doença utilizando pontos de corte altos, ou para confirmar diagnóstico com valores muito baixos.

Concluimos que os teste de estímulo são necessários para classificar corretamente os pacientes previamente indeterminados pelo cortisol basal.

Observamos que a maioria dos pacientes classificados como portadores de IAC apresentaram algum tipo de hipopituitarismo, com déficit associado de outros hormônios, em sua maioria de GH e TSH.

As alterações do sistema nervoso central consistiram em sua maioria de achados classicamente ligados a hipopituitarismo.

Reconhecemos as limitações do trabalho por ser retrospectivo, mas consideramos imprescindível para compreender a implicação dos testes de estímulo no diagnóstico de IAC.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Andrioli M, Pecori Giraldi F, Cavagnini F. Isolated corticotrophin deficiency. *Pituitary*. 2006;9(4):289-95.
2. Antonini SR, Jorge SM, Moreira AC. The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(4):423-426.
3. Berg C, Meinel T, Lahner H, Yucece A, Mann K, Petersenn S. Diagnostic utility of the glucagon stimulation test in comparison to the insulin tolerance test in patients following pituitary surgery. *European Journal of Endocrinology*. 2010; 162(3):477.
4. Birla S, Khadgawat R, Jyotsna VP, Jain V, Garg MK, Bhalla AS, Sharma A. Identification of Novel PROP1 and POU1F1 Mutations in Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Horm Metab Res*. 2016;48(12):822-827.
5. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, Torpy DJ. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):364-89.
6. Bornstein SR. Predisposing factors for adrenal insufficiency. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2328-39.
7. Cerbone M, Dattani MT. Progression from isolated growth hormone deficiency to combined pituitary hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2017;37:19-25.
8. Chabre O, Goichot B, Zenaty D, Bertherat J. Group 1. Epidemiology of primary and secondary adrenal insufficiency: Prevalence and incidence, acute adrenal insufficiency, long-term morbidity and mortality. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2017;78(6):490-494.
9. Charmandari E, Nicolaidis NC, Chrousos GP. Adrenal insufficiency. *Lancet*. 2014;383(9935):2152-67.
10. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84.

11. Chrousos G, P, Kino T, Charmandari E: Evaluation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Childhood and Adolescence. *Neuroimmunomodulation* 2009;16:272-283.
12. Corrias A, Grugni G, Crinò A, Di Candia S, Chiabotto P, Cogliardi A et al. Assessment of central adrenal insufficiency in children and adolescents with Prader-Willi syndrome. *Clinical Endocrinology*. 2012;76(6):843-850.
13. Couture C, Saveanu A, Barlier A, Carel JC, Fassnacht M, Flück CE, Houang M, Maes M, Phan-Hug F, Enjalbert A, Drouin J, Brue T, Vallette S. Phenotypic homogeneity and genotypic variability in a large series of congenital isolated ACTH-deficiency patients with TPIT gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):E486-95.
14. Dayal D, Giri D, Senniappan S. A rare association of central hypothyroidism and adrenal insufficiency in a boy with Williams-Beuren syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;22(1):65-67.
15. Démurger F, Ichkou A, Mougou-Zerelli S, Le Merrer M, Goudefroye G, Delezoide AL, Quélin C, Manouvrier S, Baujat G, Fradin M, Pasquier L, Megarbané A, Faivre L, Baumann C, Nampoothiri S, Roume J, Isidor B, Lacombe D, Delrue MA, Mercier S, Philip N, Schaefer E, Holder M, Krause A, Laffargue F, Sinico M, Amram D, André G, Liquier A, Rossi M, Amiel J, Giuliano F, Boute O, Dieux-Coeslier A, Jacquemont ML, Afenjar A, Van Maldergem L, Lackmy-Port-Lis M, Vincent-Delorme C, Chauvet ML, Cormier-Daire V, Devisme L, Geneviève D, Munnich A, Viot G, Raoul O, Romana S, Gonzales M, Encha-Razavi F, Odent S, Vekemans M, Attie-Bitach T. New insights into genotype-phenotype correlation for GLI3 mutations. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(1):92-102.
16. De Sanctis V, Soliman AT, Yassin M, Di Maio S. Is priming with sex steroids useful for defining patients who will benefit from GH treatment? *Pediatr Endocrinol Rev* 2014;11:284-7.
17. Di Iorgi N, Napoli F, Allegri A, Secco A, Calandra E, Calcagno A, Frassinetti C, Ghezzi M, Ambrosini L, Parodi S, Gastaldi R. The accuracy of the glucagon test compared to the insulin tolerance test in the diagnosis of adrenal insufficiency in young children with growth hormone deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(5):2132-9.

18. Di Iorgi N, Secco A, Napoli F, Tinelli C, Calcagno A, Fratangeli N, Ambrosini L, Rossi A, Lorini R, Maghnie M. Deterioration of growth hormone (GH) response and anterior pituitary function in young adults with childhood-onset GH deficiency and ectopic posterior pituitary: a two-year prospective follow-up study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(10):3875-84.
19. Drummond JB, Soares BS, Pedrosa W, Ribeiro-Oliveira A Jr. Revisiting peak serum cortisol response to insulin-induced hypoglycemia in children. *J Endocrinol Invest*. 2020 Sep 21.
20. Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, Wolff AB, Undlien DE, Svartberg J, Fougner KJ, Berg TJ, Bollerslev J, Mella B, Carlson JA, Erlich H, Husebye ES. Clinical, immunological, and genetic features of autoimmune primary adrenal insufficiency: observations from a Norwegian registry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4882-90.
21. Gasco V, Bima C, Geranzani A, Giannelli J, Marinelli L, Bona C, Cambria V, Berton AM, Prencipe N, Ghigo E, Maccario M, Grottoli S. Morning Serum Cortisol Level Predicts Central Adrenal Insufficiency Diagnosed by Insulin Tolerance Test. *Neuroendocrinology*. 2021;111(12):1238-1248.
22. Giordano, R., Picu, A., Bonelli, L., Balbo, M., Berardelli, R., Marinazzo, E., Corneli, G., Ghigo, E. and Arvat, E. Hypothalamus–pituitary–adrenal axis evaluation in patients with hypothalamo–pituitary disorders: comparison of different provocative tests. *Clinical Endocrinology*. 2008 (68):935-941.
23. Gonc EN, Ozon A, Alikasifoglu A, Kandemir N. Pros of priming in the diagnosis of growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011;24:9-11.
24. Grossman AB. Clinical Review#: The diagnosis and management of central hypoadrenalism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):4855-63.
25. Güran T. Latest Insights on the Etiology and Management of Primary Adrenal Insufficiency in Children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017 Dec 30;9(Suppl 2):9-22.
26. Hand DJ. Evaluating diagnostic tests: The area under the ROC curve and the balance of errors. *Stat Med*. 2010;29(14):1502-1510.
27. Higham CE, Johannsson G, Shalet SM. Hypopituitarism. *Lancet*. 2016;388(10058):2403-2415



28. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997;16(3):303-6.
29. Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, Abdu TA, Ambrosi B, Atkinson AB, Choi CH, Clayton RN, Courtney CH, Gonc EN, Maghnie M. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: a metaanalysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2008;93(11):4245-53.
30. Korpi-Steiner, N., & Nerenz, R. D. Disorders of the anterior and posterior pituitary. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry.* Academic Press. 2020 pp. 681-700.
31. Krasner AS. Glucocorticoid-induced adrenal insufficiency. *JAMA.* 1999;282(7):671-6.
32. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19(2):155-7.
33. Maguire AM, Biesheuvel CJ, Ambler GR, Moore B, McLean M, Cowell CT. Evaluation of adrenal function using the human corticotrophin-releasing hormone test, low dose Synacthen test and 9am cortisol level in children and adolescents with central adrenal insufficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(5):683-91.
34. Moreira AC, Antonini SR, de Castro M. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(1):R1-R18
35. Ospina NS, Al Nofal A, Bancos I, Javed A, Benkhadra K, Kapoor E, Lteif AN, Natt N, Murad MH. ACTH Stimulation Tests for the Diagnosis of Adrenal Insufficiency: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):427-34.
36. Patti G, Guzzeti C, Di Iorgi N, Maria Allegri AE, Napoli F, Loche S, Maghnie M. Central adrenal insufficiency in children and adolescents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(4):425-444.
37. Putignano P, Kaltsas GA, Satta MA, Grossman AB. The effects of anti-convulsant drugs on adrenal function. *Horm Metab Res.* 1998;30(6-7):389-97.

38. Raff H, Findling JW, Wong J. Short loop adrenocorticotropin (ACTH) feedback after ACTH-(1-24) injection in man is an artifact of the immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69(3):678-80.
39. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy. *Clin Endocrinol(Oxf).* 1996;44(2):157-161.
40. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Front Public Health.* 2017;5:307.
41. Webb EA, AlMutair A, Kelberman D, Bacchelli C, Chanudet E, Lescai F, Andoniadou CL, Banyan A, Alsawaid A, Alrifai MT, Alahmesh MA, Balwi M, Mousavy-Gharavy SN, Lukovic B, Burke D, McCabe MJ, Kasia T, Kleta R, Stupka E, Beales PL, Thompson DA, Chong WK, Alkuraya FS, Martinez-Barbera JP, Sowden JC, Dattani MT. ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies. *Brain.* 2013;136(Pt 10):3096-105.
42. Webb EA, Dattani MT. Understanding hypopituitarism. *Paediatrics and Child Health.* 2015;25(7):295-301.
43. Weintrob N, Sprecher E, Josefsberg Z, Vardi P, Weininger C, Aurbach-Klipper Y, Pertzalan A, Phillip M. Combined clonidine-short-ACTH test for the simultaneous assessment of growth hormone reserve and hypothalamic-pituitary-adrenal axis integrity in children. *Eur J Endocrinol.* 2000;143(1):105-10.
44. Wong MT, van Ravenswaaij-Arts CM, Munns CF, Hsu P, Mehr S, Bocca G. Central Adrenal Insufficiency Is Not a Common Feature in CHARGE Syndrome: A Cross-Sectional Study in 2 Cohorts. *J Pediatr.* 2016;176:150-5.