

Mariana Rechia Bitencourt

**Investigação de potenciais biomarcadores no diagnóstico da
insuficiência adrenal central**

São Paulo

2023

Mariana Rechia Bitencourt

**Investigação de potenciais biomarcadores no diagnóstico da
insuficiência adrenal central**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof. Dra Luciani Renata de
Carvalho

Coorientador: Dr. Nilson Antônio de Assunção

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bitencourt, Mariana Rechia
Investigação de potenciais biomarcadores no
diagnóstico da insuficiência adrenal central /
Mariana Rechia Bitencourt. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Luciani Renata de Carvalho.
Coorientador: Nilson Antônio de Assunção.

Descritores: 1.Insuficiência adrenal
2.Hipopituitarismo 3.Sulfato de DHEA 4.Metabolômica
5.Biomarcadores 6.Deficiência de ACTH

USP/FM/DBD-493/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Página como os nomes e local para as assinaturas da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais Miriam e Percio, que além do presente da vida sempre priorizaram a educação, garantindo qualidade e amor no nosso lar.

Dedico também esse trabalho a minha filha Sophia, para que continue desbravando o mundo: Que tuas mãos ágeis folheando os livros e teus olhinhos curiosos te levem, guiados pelo coração, a muitas descobertas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida. Agradeço a Ele também, pela família onde cresci e pelas oportunidades e pessoas extraordinárias que conheci nessa jornada.

Aos meus pais pela educação e amor ímpares com que conduziram nosso lar. Aos meus irmãos Angela e Eduardo por compartilharem seu olhar criativo e engenhoso comigo durante a infância. Especialmente ao Eduardo, por ao lado da Bruna me acolher dentro de casa e proporcionar pouso a cada ida a São Paulo durante todo o doutorado.

À minha avó Aristilda (*in memorian*) por ensinar o valor das palavras, a potência do legado e o amor a vida. Espero poder honrar as lutas do dia a dia com tua garra e bom humor.

À minha nonna Lúcia (*in memorian*) por compartilhar suas experiências e sua gentileza no cuidado às pessoas. Obrigada por me proteger e me ensinar a rezar.

Ao nonno Mariano (*in memorian*) por ensinar humildade e simplicidade. Procurarei sempre poder honrar o seu nome.

Ao Rodrigo, meu amor e companheiro da vida. Obrigada por me apoiar nas escolhas e nos desafios, obrigada pela paciência e dedicação a nossa família. Teu apoio foi o que me manteve.

À minha filha Sophia, obrigada por me trazer mais cor e vida. Obrigada por me ensinar o poder da pausa, a graça do erro e o valor da persistência.

À Professora Doutora Luciani Renata Silveira de Carvalho, que abraçou minha dúvida, respondeu meu e-mail e me abriu as portas para a ciência. Obrigada por ser esse exemplo de pesquisadora, de médica e de ser humano. Meu coração será eternamente grato por esse encontro e por ter conhecido esse grupo que pensa “fora da caixa” onde me reconheci. Que continue inspirando a muitos “filhos científicos” e que cada centelha ajude a clarear a vida de muitos pacientes com “Hipopit”.

Ao Professor Nilson Antônio de Assunção, por me introduzir no mundo da química e da metabolômica e dividir seus conhecimentos.

À Professora Doutora Berenice Mendonça, por ser exemplo de mulher, líder e mentora gerindo com dinamismo o LIM 42 e a Endocrinologia da USP. Obrigada também por todas as contribuições, conselhos e ensinamentos.

Ao Professor e Mestre Luiz Alberto Fontoura Pereira, que me acolheu no ambulatório de Endocrinologia da UFSM como aluna e como monitora da disciplina. Obrigada por me inspirar no cuidado ao paciente e na atualização constante. Obrigada por me ensinar que não existe dúvida tola e por fomentar a curiosidade trazendo constantemente novos artigos.

Ao amigo Breno Senna de San Martin, agradeço a amizade e a generosidade em compartilhar seus conhecimentos químicos, analíticos, metabolômicos e culturais. Obrigada por se fazer presente independente do tempo, da distância ou do fuso horário.

À Gislene Gerbassi que contribuiu sobremaneira auxiliando no levantamento de dados no período da pandemia de Covid19.

Aos amigos que encontrei no LIM 42, Rafael Loch Batista, Juliana Moreira, Bianca Ventura, Bruna Azevedo, Patrícia Mara Hugo, Renata Kertsz obrigada pelo convívio, pela partilha de conhecimento, pelos "*brainstorms*", incentivo e apoio constantes.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará a seu tamanho
original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Bitencourt MR. Investigação de potenciais biomarcadores no diagnóstico da insuficiência adrenal central [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: Apesar da descoberta da síntese dos glicocorticoides terem revolucionado a medicina na década de 50, pouco se avançou no reconhecimento e no manejo da insuficiência adrenal central (IAC) desde então. Os métodos diagnósticos na IAC são limitados, dependentes de testes de estímulo trabalhosos, onerosos e muitas vezes passíveis de efeitos colaterais graves. Frente aos atuais desafios na determinação da IAC, o presente estudo objetivou investigar o desempenho de possíveis biomarcadores a serem utilizados no diagnóstico da IAC. **METODOLOGIA:** Foram realizadas duas abordagens metodológicas: 1- Análise retrospectiva de dados de prontuário de pacientes institucionais com suspeita de IAC e comparação dos níveis de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) através da Razão de SDHEA (valor hormonal mensurado/limite inferior da referência para sexo e idade). 2- Estudo transversal com metabolômica exploratória por infusão direta (DIMS) de pacientes com hipopituitarismo congênito e IAC. **RESULTADOS:** A razão de $SDHEA \leq 0,79$ apresentou 94,7% de especificidade e 83,3% de sensibilidade em prever IAC dentre pacientes com IAC e hipopituitarismo congênito (AUC:0,936). Quando analisado cenário com diversas etiologias de IAC em hospital terciário a razão de $SDHEA \leq 0,85$ apresentou especificidade de 76,4% e sensibilidade de 65,8% na predição de IAC (AUC 0,752). Análises de metabolômica exploratória apontou 6 possíveis biomarcadores da deficiência de ACTH (N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, Histidinol-phosphate, Oxoadipic acid, Phosphatidylethanolamine, Farnesyl pyrophosphate, Galactitol) que demonstraram, associados, curva ROC com AUC de 0,97 na diferenciação de pacientes deficientes de ACTH comparados a controles portadores de Hipopituitarismo e AUC de 0,851 na distinção entre controles saudáveis. **CONCLUSÃO:** Este trabalho pôde demonstrar que o uso da razão de SDHEA é uma ferramenta útil para diagnóstico de IAC em população adulta. Também a investigação com metabolômica exploratória apontou potenciais candidatos a biomarcadores de IAC. Trabalhos com metabolômica direcionada e quantitativa (*targeted*) ainda são necessários para corroborar esses achados.

Palavras-chave: Insuficiência adrenal. Hipopituitarismo. Sulfato de DHEA. Metabolômica. Biomarcadores. Deficiência de ACTH

ABSTRACT

Bitencourt MR. Investigation of potential biomarkers in the diagnosis of central adrenal insufficiency [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

INTRODUCTION: Although the discovery of the synthesis of glucocorticoids revolutionized medicine in the 1950s, little progress has been made in the recognition and management of central adrenal insufficiency (CAI). Its treatment is still challenging in clinical practice. Diagnostic methods in CAI are limited, dependent on laborious, costly stimulus tests which are often subject to serious side effects. Faced with the current challenges in determining CAI, the present study aimed to investigate the performance of possible biomarkers to be used in the diagnosis of CAI. **METHODOLOGY:** Two methodological approaches were carried out: 1- retrospective analysis of medical records of institutional patients with suspected CAI and comparison of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) levels using the DHEAS Ratio (measured hormonal value/lower reference limit for sex and age). 2- Cross-sectional study with exploratory direct infusion (DIMS) of patients with congenital hypopituitarism and CAI. **RESULTS:** The DHEAS ratio ≤ 0.79 presented 94.7% specificity and 83.3% sensitivity in predicting CAI among patients with CAI and congenital hypopituitarism (AUC:0.936). When analyzing a scenario with different etiologies of CAI in a tertiary hospital, the DHEAS ratio ≤ 0.85 showed a specificity of 76.4% and sensitivity of 65.8% in predicting CAI (AUC 0.752). Exploratory metabolomics analyzes identified 6 possible biomarkers of ACTH deficiency (N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, Histidinol-phosphate, Oxoadipic acid, Phosphatidylethanolamine, Farnesyl pyrophosphate, Galactitol). That demonstrated an associated ROC curve with AUC of 0.97 in differentiating ACTH-deficient patients compared to controls with Hypopituitarism and AUC of 0.851 in distinguishing between healthy controls. **CONCLUSION:** This work was able to demonstrate that the use of the DHEAS ratio is a useful tool for diagnosing CAI in the adult population. Exploratory metabolomics research also identified potential candidates for CAI biomarkers. Work with targeted and quantitative metabolomics is necessary to corroborate these findings.

Keywords: Adrenal Insufficiency. Hypopituitarism. DHEA Sulfate. Metabolomics. Biomarkers. ACTH deficiency

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SIGLAS.....	15
1 - INTRODUÇÃO.....	17
1.1- Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a deficiência de corticotrofina.....	17
1.2- Dificuldades diagnósticas da Insuficiência adrenal central.....	20
1.3 - Hipopituitarismo congênito e a deficiência de ACTH.....	23
2 - RACIONAL DO TRABALHO E OBJETIVOS.....	25
2.1 - Objetivo primário.....	25
2.2 - Objetivos secundários.....	25
3 - ASPECTOS ÉTICOS.....	26
CAPÍTULO 1	
Sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA): Um possível marcador da ação da corticotrofina.....	27
1 - INTRODUÇÃO: Papel do SDHEA.....	28
2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1 - Delineamento.....	30
2.2 - Das populações estudadas.....	30
2.3 - Análise estatística.....	30
3 - RESULTADOS.....	32
3.1 - Análise da razão de SDHEA entre pacientes com hipopituitarismo congênito.....	32
3.2 - Análise da razão de SDHEA entre pacientes submetidos ao ITT.....	35
4 - DISCUSSÃO.....	38
5 - CONCLUSÃO.....	40
CAPÍTULO 2	
Insuficiência Adrenal Central (IAC) através da Metabolômica <i>Untargeted</i>: Uma Análise Exploratória.....	41
1 - INTRODUÇÃO.....	42
2 - MATERIAL E MÉTODO.....	45
2.1 - Da obtenção de dados.....	45
2.2 - Casuística.....	45

2.3 - Coleta das amostras	46
2.4 - Extração de metabólitos.....	46
2.5 - Controle de qualidade – QC (<i>Quality Control</i>).....	47
2.6 - Aquisição de dados por Infusão Direta em Espectrometria de Massas.....	47
3 - ANÁLISES DE DADOS	48
3.1 - Pré-processamento de dados	48
3.2 - Análises Estatísticas (Quimiometria)	50
3.3 - Anotação putativa e vias bioquímicas.....	50
4 - RESULTADOS.....	52
4.1 - Caracterização da população estudada	52
4.2 - Processamento de dados	53
4.3 - Análises Estatísticas (Quimiometria)	54
5 - DISCUSSÃO	62
6 - CONCLUSÃO	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE I.....	80
ANEXO I.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Eixo Hipotálamo-Pituitária- Adrenal (HPA) e seus principais fatores de estímulo fisiológicos das zonas fasciculada e reticular do córtex da adrenal.....18
- Figura 2-** Fluxo diagnóstico sugerido na Insuficiência Adrenal Central (IAC).....21
- Figura 3-** Boxplot da Razão de SDHEA entre pacientes com deficiência de ACTH (DACTH) e Suficientes em ACTH do ambulatório de Hipopituitarismo Congênito HCFMUSP.....33
- Figura 4-** Gráfico com as curvas de probabilidade de pertencer a um dos grupos (com e sem deficiência de ACTH) em função do valor da razão de SDHEA.....33
- Figura 5-** Curva ROC do modelo com dados do ambulatório de Hipopituitarismo.....34
- Figura 6-** Gráfico boxplot da Razão de SDHEA no grupo deficiente de ACTH (DACTH) e suficiente em ACTH. Análise de pacientes da sala de testes do HCFMUSP.....36
- Figura 7-** Gráfico com curva de probabilidade de doença- deficiência de ACTH (dACTH). Análise de pacientes da sala de testes do HCFMUSP.....36
- Figura 8-** Curva ROC do modelo com dados da sala de testes..... 37
- Figura 9-** Formato da matriz disponibilizado no *metaboanalyst* para correção de erros sistemáticos em lotes das análises comparativas.....49
- Figura10-** PCA a partir das 1.707 *features* selecionadas no processo de tratamento dos dados..... 55

Figura 11- A) Análise PLS-DA entre os grupos DACTH vs. Controle Saudável. B) Validação-cruzada para averiguar o desempenho preditivo do modelo.....	56
Figura 12- A) Análise PLS-DA entre os grupos DACTH vs. Controle Hipopit. B) Validação-cruzada para averiguar o desempenho preditivo do modelo.....	56
Figura 13- A) Análise multivariada baseada em Curva-ROC entre DACTH vs. Controle Saudável. B) Gráfico de probabilidade de predição do modelo contendo 100 <i>features</i> na classificação dos grupos.....	57
Figura 14- A) Análise multivariada baseada em Curva-ROC entre DACTH vs. Controle Hipopit. B) Gráfico de probabilidade de predição do modelo contendo 100 <i>features</i> na classificação dos grupos.....	57
Figura 15- A) Principais classes de metabólitos anotados. B) Vias bioquímicas alteradas de acordo com os metabólitos anotados na análise entre o grupo DACTH vs. Controle Saudável.....	59
Figura 16- A) Principais classes de metabólitos anotados. B) Vias bioquímicas alteradas de acordo com os metabólitos anotados na análise entre o grupo DACTH vs. Controle Hipopit.....	59
Figura 17-Features significativos com potencial biomarcador para DACTH.....	60
Figura 18 A) Curva ROC utilizando 6 <i>features</i> na distinção entre DACTH vs. Controle Hipopit. B) Curva ROC utilizando 6 <i>features</i> na distinção entre DACTH vs. Controle Saudável.....	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Características dos pacientes incluídos na análise da razão de SDHEA. Dados ambulatório Hipopituitarismo congênito.....32
- Tabela 2-** Características dos grupos na análise da razão de SDHEA entre pacientes da sala de testes do HCFMUSP.....35
- Tabela 3-** Característica dos pacientes incluídos na análise metabólica *untargeted*..... 53
- Tabela 4-** Filtragem e mineração de dados a partir de análises metabólicas por DIMS.....54
- Tabela 5-** Anotação putativa dos principais *features* filtrados no processamento de dados e que se mostraram robustos na classificação dos grupos analisados.....58

LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AUC	Área sob a curva (<i>do inglês, Area Under Curve</i>)
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação ética
CAPEPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CBG	Globulina carreadora do cortisol; (<i>do inglês, Cortisol Binding Globulin</i>)
CEP	Comite de ética em Pesquisa
Controle Hipopit	Controles portadores de hipopituitarismo com eixo corticotrófico preservado
CRH	Hormônio liberador de corticotropina; (<i>do inglês Corticotropin Releasing Hormone</i>)
DACTH	Deficiência de Hormônio Corticotrófico
DHEA	Deidroepiandrosterona
DIMS	Espectometria de massas por infusão direta; (<i>do inglês Direct Infusin-Mass Spectrometry</i>)
DP	Desvio Padrão
EDTA	Acido Etilenodiamino Tetra-Acético
FSH	Hormônio Foliculoestimulante
FTMS	Fourier Transform Mass Spectrometry
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectometria de Massas; (<i>do inglês Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>)
GH	Hormônio do Crescimento; (<i>do inglês, Growth Hormone</i>)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade; <i>do inglês High Density lipoprotein</i>
HESI	High Electrospray Ionization
HPA	Hipotálamo-Pituitária- Adrenal
IAC	Insuficiência Adrenal Central
IAP	Insuficiência Adrenal Primária
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IMC	Índice de massa corporal
IM	Intramuscular
IQSC-USP	Instituto de Química de São Carlos

IS	Internal Standard
ITT	Teste de tolerância insulínica; do inglês Insulin Tolerance Test , teste de estímulo com hipoglicemia
IV	Intravenoso
KNN	K-Nearest Neighbors
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDL	Lipoproteína de baixa densidade; (<i>do inglês, Low Density Lipoproteins</i>)
LH	Hormônio Luteinizante
MS	Espectometria de massas; (<i>do inglês, Mass Spectrometry</i>)
MSH	Melanocortin Stimulator Hormone
PCA	Análise de Componentes Principais; (<i>do inglês, Principal Component Analysis</i>)
PLS-DA	Análise discriminante por Mínimos Quadrados parciais; (<i>do inglês, Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>)
QC	Controle de de qualidade; do inglês Quality Control
Q ₂	Coeficiente de Predição
ROC	Receiver Operating Characteristic
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Desvio padrão relativo; (<i>do inglês, Relative Standard Deviation</i>)
SDHEA	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico; (<i>do inglês, tricarboxylic acid cycle</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VIP	Variável importante na projeção; (<i>do inglês Variable Important Projection</i>)
11-DOC	11-Deoxicorticosterona

1 - INTRODUÇÃO

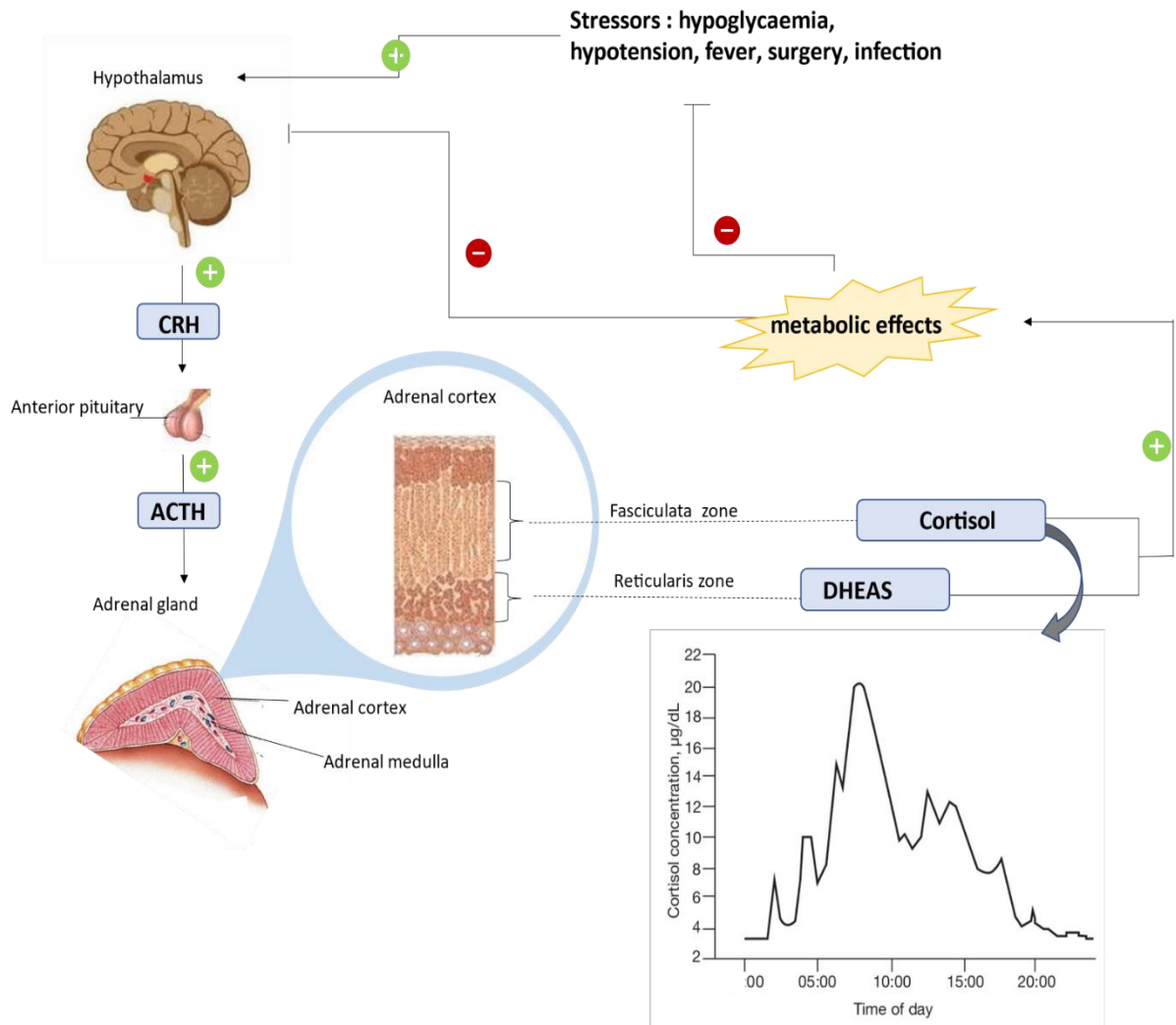
1.1 - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a deficiência de corticotrofina

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) funciona com base no processo de ativação e retroalimentação orquestrado entre os três órgãos endócrinos envolvidos (1,2). Além disso, o eixo HPA ativa os sistemas imune e cardiovascular como resposta essencial em contexto de eventos inflamatórios e imunológicos (3,4). A ativação inadequada dessa resposta a diferentes estressores está por trás da alta mortalidade dos pacientes com insuficiência adrenal. O risco de desfecho fatal entre pacientes com hipopituitarismo é 1,6 vezes maior naqueles com deficiência de corticotrofina (ACTH) (5,6).

A insuficiência adrenal secundária, ou também chamada insuficiência adrenal central (IAC) ocorre devido a falha na sinalização e ou produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de ACTH (1,2). Essa deficiência secretória culmina, principalmente, em geração inadequada de cortisol pela glândula adrenal. A etiologia mais prevalente da IAC é a suspensão abrupta do uso crônico de glicocorticoides exógenos (7), outras causas são relacionadas a tumores hipofisários, traumatismo craniano, uso de opioides etc.(1,8–11).

A glândula adrenal apresenta em seu córtex 3 camadas teciduais que produzem diferentes hormônios (2): As zonas fasciculada e reticular são estimuladas pelo ACTH, enquanto a zona glomerulosa tem como principal estímulo a ação da renina. Na **Figura 1** observam-se os principais mecanismos de estímulo do eixo HPA. Sendo assim a IAC acarreta hipotrofia das zonas fasciculada e reticular, enquanto a zona glomerulosa tem sua atividade preservada (sistema renina-angiotensina-aldosterona intacto) (1,2,12). Já na insuficiência adrenal primária (IAP), há falência da própria suprarrenal e ocorre maior produção hipofisária de corticotrofina. A hiperpigmentação cutânea pelo excesso de ACTH e o acometimento das 3 camadas corticais na IAP diferencia clínica e laboratorialmente os dois tipos de insuficiência adrenal (1,9,13).

Figura 1- Eixo Hipotálamo-Pituitária- Adrenal (HPA) e seus principais fatores de estímulo fisiológicos das zonas fasciculada e reticular do córtex da adrenal. Note o gráfico com a concentração de secreção de cortisol em 24h



Fonte: Ilustração feita com auxílio do programa BioRender

A IAC é uma condição desafiadora na prática médica tanto por sua apresentação clínica pouco sintomática quanto pela complexa investigação laboratorial. Enquanto na IAP o excesso de ACTH pode ocasionar hiperpigmentação cutânea e a falta de mineralocorticoide comumente causa depleção de volume com hipotensão postural e hipercalemia, a IAC pode ocorrer sem achados significativos no exame físico (13,14). Na IAC o quadro clínico dependerá da gravidade da deficiência de ACTH (DACTH), do momento do início do quadro e de outras deficiências hipofisárias associadas. Em neonatos e crianças pequenas, por exemplo, a DACTH pode se manifestar com convulsões, hipoglicemia, icterícia, baixa estatura e retardo do desenvolvimento e crescimento (15). Em população adulta

grande parte das queixas são inespecíficas e vão desde alterações do humor, adinamia, fraqueza e mialgias até náuseas, êmese, hipoglicemia e hipotensão durante uma crise adrenal (16). Em resultados laboratoriais pode-se encontrar hiponatremia (secundária ao aumento de vasopressina), anemia normocítica, eosinofilia, linfocitose e hipoglicemia (12,16). Grande parte desses sintomas são relacionados a falta de glicocorticoide. Porém, vale ressaltar que as ausências de CRH e ACTH podem causar sintomas a despeito da deficiência de cortisol (17). Esses peptídeos já tiveram reconhecidas atividades no sistema nervoso central relacionadas a ansiedade, humor, locomoção, recompensa e alimentação (18,19). CRH e ACTH também estão relacionados com a ativação simpática (1,17).

Outra importante característica da produção de cortisol pela zona fasciculada é o ritmo nictemérico de produção hormonal, com maiores produções de cortisol durante a manhã, reduzindo ao longo dia e quase nula durante a noite (1,2,16). Esse ritmo de produção tem papel importante junto aos genes do relógio biológico (20). Porém, pouco se compreende quais efeitos metabólicos podem advir da perda do ritmo circadiano de produção de cortisol provocada pela reposição prolongada de glicocorticoides de liberação fixa nos pacientes portadores de DACTH (7,16). Alguns estudos com drogas de liberação bifásica demonstraram melhores desfechos ósseos, cardiovasculares e metabólicos nesses pacientes (21,22). Entretanto foram estudos de curta duração e sem análise de desfechos clínicos, como fratura e evento cardiovascular fatal.

A insuficiência adrenal ainda está associada a taxas de mortalidade mais elevadas em comparação com a população em geral (13,14) e uma terapia com ajuste inadequado durante uma doença intercorrente, pode estar relacionado com tal desfecho (5,6,23). Portanto, a dificuldade diagnóstica associada a impossibilidade de reposição fisiológica da deficiência hormonal contribui para a substancial morbimortalidade desses pacientes (24,25). As pesquisas neste campo de estudo permanecem relevantes e necessárias para melhorar tanto o diagnóstico quanto o prognóstico dessa condição.

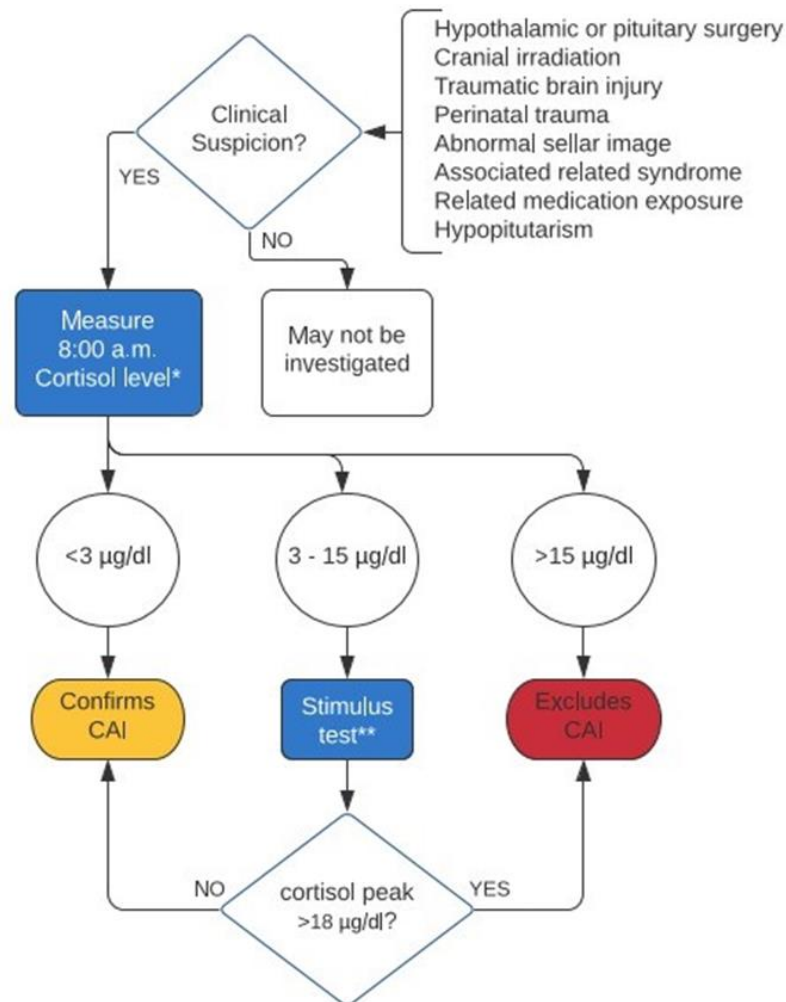
1.2- Dificuldades diagnósticas da Insuficiência adrenal central

O diagnóstico da IAC persiste desafiador para médicos e pacientes. Como a produção de corticoide é episódica e apresenta grande nível de variabilidade, a interpretação de valores considerados normais deve ser feita com cautela. O cortisol basal, mesmo mensurado as 8h da manhã, apresenta algumas particularidades na sua interpretação que devem ser respeitadas para evitar equívocos de raciocínio (26).

Nos pacientes com deficiência parcial na secreção do ACTH, os níveis podem estar dentro do espectro considerado normal, mas podem não conseguir estimular uma produção adequada para períodos de estresse metabólico. A definição de DACTH parcial ainda é um capítulo em aberto na literatura, não há consenso no uso de testes e pontos de corte para definir essa entidade (7,27,28).

Uma metanálise sugere que o melhor ponto de corte para indicar DACTH seria um cortisol basal (mensurado as 8h da manhã) $< 5 \mu\text{g/dl}$ com probabilidade de 92% de detectar doença, enquanto o valor de cortisol $> 13 \mu\text{g/dl}$ indicaria integridade do eixo HPA com chance de erro menor que 9% (AUC 0,79 IC 75-99%)(29). Estudo recente utilizando dosagens de cortisol por espectrometria de massa e testes monoclonais já aponta que, com esses kits laboratoriais mais específicos, o ponto de corte deveria ser $< 2 \mu\text{g/dl}$ para predizer doença e $> 15 \mu\text{g/dl}$ para predizer saúde (26). Todavia, a diretriz vigente da Endocrine Society orienta o critério de cortisol basal $< 3 \mu\text{g/dl}$ para indicar DACTH e valores $> 15 \mu\text{g/dl}$ no basal para excluir DACTH, enquanto valores intermediários a esses devem ser submetidos a investigação adicional (7). O fluxo diagnóstico atual está representado na **Figura 2**.

Figura 2-Fluxo diagnóstico sugerido na Insuficiência Adrenal Central (IAC). *observar tipo de ensaio laboratorial usado . **atenção ao tipo de teste de estímulo e tipo de ensaio para dosagem de cortisol. Métodos monoclonais e por espectrometria de massas na dosagem de cortisol e teste do glucagon apresnetam pontos de corte diferentes .



Fonte: adaptado de Bitencourt et al Arch Endoc (2022)

Sabe-se que o cortisol sérico dosado também reflete os níveis totais de cortisol ligados à sua proteína carreadora (CBG) (30). Existem casos em que a avaliação do cortisol livre ganha importância pois condições que elevam a CBG como gravidez e uso de anticoncepcionais podem superestimar os valores de cortisol (31,32). O oposto também é verdadeiro, em situação em que temos níveis de CBG menores (como durante doenças críticas e em portadores de polimorfismos da SERPINA 6) podemos ter níveis falsamente baixos de cortisol indicando equivocadamente DACTH (33,34).

Como as dosagens basais de cortisol nem sempre conseguem definir a integridade do eixo, a grande maioria dos casos necessitam ser submetidos aos testes de estímulo (1,2,7,35). Os principais testes disponíveis no Brasil são citados abaixo:

a) *Teste de tolerância à insulina*

O teste de tolerância à insulina (ITT) é considerado padrão-ouro para o diagnóstico de IAC, e pode ser utilizado para avaliar quadros agudos, definido como um período < 4 a 6 semanas de injúria, situação em que o teste da cortrosina pode apresentar resposta normal (1). O teste baseia-se no fato de que a hipoglicemia é um potente fator estimulador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e consiste na administração de 0,1 unidade/kg IV de insulina regular e dosagens de cortisol nos tempos basal, 30, 60, 90 e 120 minutos. A glicemia deve atingir o valor de 40 mg/dl ou menos para o teste ser considerado efetivo (1,2,7). Considera-se resposta normal do cortisol, um pico maior ou igual a 18 µg/dl na maioria das referências, porém testes com kits de dosagem de cortisol por ensaio monoclonal ou por dosagem de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) o ponto de corte do cortisol que se usa para garantir bom funcionamento do eixo HPA, é maior ou igual a 15 µg/dl (26).

Mesmo sendo padrão ouro, existem situações em que induzir hipoglicemia é perigoso, e o teste é proscrito em pacientes idosos (>60 anos), cardiopatas, gravidez, portadores de doença cerebrovascular ou histórico de convulsão (1,2,9).

b) *Teste da Cortrosina*

As amostras para dosagens de cortisol sérico são coletadas antes e após administração de 25 µg via intravenosa de ACTH recombinante humano nos tempos 0, 30 e 60 minutos (1,2). O uso do teste curto, com 1 µg de cortrosina, embora apresente maior sensibilidade e especificidade, não é recomendado fora de laboratórios de pesquisa e excelência devido a armadilhas na preparação da medicação diluída e risco de subestímulo com interpretação inadequada do teste. Valores de pico de cortisol maiores ou iguais a 18 µg/dl indicam função adrenal normal, enquanto um pico de cortisol menor do que 18 µg/dl é indicativo de insuficiência adrenal, porém não discriminando se primária ou secundária (7). Vale

ressaltar que ao utilizarmos kits monoclonais ou LC-MS, o indicado é utilizar o ponto de corte de 15 µg/dl (26). Esse teste poderá apresentar falso negativo em casos de IAC aguda, situação em que a falha recente de corticotrofina não ocorreu em tempo suficiente para causar a hipotrofia do córtex adrenal (1,2). Entre os outros limitantes do uso desse teste no Brasil estão: 1- o alto custo do medicamento; 2- dificuldades logísticas advinda da importação do ACTH recombinante que não é produzido e nem comercializado no país (9).

c) *Teste do glucagon:*

O glucagon pode ser utilizado com administração IV ou IM na dose de 1mg, e é uma medicação mais facilmente encontrada que o ACTH recombinante (1,2). O glucagon gera um estímulo mais tardio e não tão potente quantos os outros testes. Além disso, ele requer maior tempo de observação e maior quantidade de amostras (coletas no tempo 0, 30, 60, 90, 120 e 180 min) (36). Apesar de ser um estímulo menos acurado pode ser utilizado dependendo do contexto com a devida interpretação. Estudos sugerem utilizar um pico de cortisol de 16 a 17 µg/dl para garantir integridade do eixo (36–38).

1.3 - Hipopituitarismo congênito e a deficiência de ACTH

A insuficiência adrenal secundária geralmente se desenvolve gradualmente ao longo do tempo, o que pode levar os pacientes a se adaptarem a sintomas mais leves e atrasar a busca por cuidados médicos (2,9,12,16). Fatores de estresse, como doença aguda, cirurgia ou trauma, podem mascarar os sintomas da IAC (39). A necessidade de avaliar os níveis de cortisol em situações de estresse agudo pode tornar o diagnóstico ainda mais desafiador. Outra dificuldade em estudar esse tipo de condição está na possibilidade de haver recuperação do eixo HPA e normalização da secreção de corticotrofina nas causas mais corriqueiras de DACTH como a que ocorre após cirurgias hipofisárias e na IAC induzida por drogas (40,41). Assim, embora raras, as causas congênicas por representarem um status de deficiência

hormonal perene, tornam essa população mais bem caracterizada para estudo dessa condição.

O hipopituitarismo congênito ocorre em 1 a cada 3.500 a 10.000 nascimentos (1,2). As alterações moleculares relacionadas com essa condição estão descritas em genes de fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento hipofisário como *GLI2*, *OTX2*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4* e *PROP1*, embora ainda haja uma boa parcela de casos sem diagnóstico molecular firmado (42). A deficiência de cortisol central isolada congênita, devido a ausência na produção hipofisária de ACTH, tem incidência ainda mais rara e está relacionada com mutações recessivas no gene *TBX19* (anteriormente descrito como *TPIT*) (15,43). Assim o mais frequente é encontrarmos DACTH em pacientes com deficiência hormonal múltipla.

Grande parte dos pacientes com hipopituitarismo congênito apresentam-se inicialmente com baixa estatura por deficiência de GH, podendo evoluir com outras deficiências hormonais hipofisárias incluindo a deficiência de ACTH (7). Descreve-se que dentre os pacientes com hipopituitarismo cerca de $\frac{1}{3}$ evoluem com IAC (44,45).

No presente trabalho constituído de 2 capítulos, optou-se por se estudar essa população para avaliação de biomarcadores que refletissem o estado de deficiência na secreção de ACTH comparada a pacientes com outras deficiências hipofisárias, porém com secreção de ACTH preservada e controles saudáveis. No capítulo 1 abordaremos os resultados acerca do uso do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) como marcador de DACTH e no capítulo 2 os resultados de análise metabólica exploratória nessa população.

2 - RACIONAL DO TRABALHO E OBJETIVOS

Devido a falha no diagnóstico dos pacientes com insuficiência adrenal central baseado apenas no cortisol basal somado à dificuldade em ter um teste de estímulo eficaz, conclusivo e barato, o presente projeto de estudo teve como objetivos primário e secundário:

2.1 - Objetivo primário

Investigação de um candidato a biomarcador ou um conjunto destes (assinatura molecular) que possam representar o estado de deficiência na secreção de ACTH.

2.2 - Objetivos secundários

- Comparar níveis de SDHEA em indivíduos com e sem IAC;
- Processamento e tratamento de dados metabolômicos *untargeted* por infusão direta em espectrometria de massas para anotação e seleção de metabólitos significativos;
- Análise exploratória de vias bioquímicas alteradas em pacientes portadores de hipopituitarismo e IAC em reposição hormonal comparados a controles saudáveis e a controles portadores de hipopituitarismo com eixo corticotrófico intacto.

3 - ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética para análise de projetos de Pesquisa CAPEPesq, da Diretoria do Hospital de Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como foi registrado na Plataforma Brasil e aprovado pelo CEP com número CAAE 42993819.5.0000.0068. Houve dispensa de TCLE devido ao fato de utilizarmos dados gerados em outras pesquisas, porém todos os envolvidos na pesquisa receberam carta de anuência (vide ANEXO I) e concordaram com o uso dos dados gerados anteriormente a esse estudo.

CAPÍTULO 1

**Sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA): Um possível
marcador da ação da corticotrofina**

1 - INTRODUÇÃO: Papel do SDHEA

A dehidroepiandrosterona (DHEA) e a sua forma sulfatada, o sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), são os esteroides mais abundantes na circulação. São produzidos na zona reticular da glândula suprarrenal a partir da 17- α -hidroxipregnenolona e sua secreção é mediada pelo efeito trófico do ACTH (1,2,16).

A zona reticular, embora hipoestimulada tanto na IAC quanto na Doença de Addison, acaba provocando poucos sintomas pois a produção de andrógenos e DHEA ocorre também em tecido gonadal. Assim, essa falta de secreção de andrógenos adrenais não apresenta repercussão clínica bem definida (13). No entanto, como a zona reticular um tecido ACTH dependente, avaliar os níveis de SDHEA em pacientes com IAC pode desempenhar um papel útil na definição diagnóstica, uma vez que a forma sulfatada, SDHEA, é exclusivamente produzida pela adrenal (9).

Alguns estudos sugerem que quando há disfunção adrenal, a deficiência na secreção de andrógenos ocorre mais precocemente do que a supressão de glicocorticoide. Os mecanismos não estão completamente compreendidos. Aparentemente a zona fasciculada por ter maior afeição pelo ACTH consegue manter alguma secreção de cortisol mesmo em cenários de escassez de corticotrofina (46–48). Outras percepções são apresentadas em estudo *in vitro* por Topor et al., onde a concentração intra-adrenal de cortisol parece ser um fator determinante para a inibição da enzima 3beta2desidrogenase, o que por sua vez estimula a produção de SDHEA (49).

Evidências recentes sugerem que o nível sérico de SDHEA é um bom marcador preditivo para defeitos no eixo corticotrófico (50–52). Pacientes diagnosticados com insuficiência adrenal central pelo teste de estímulo com 1 μ g de ACTH, com pico de cortisol após estímulo menor que 18 μ g/dl, apresentaram níveis séricos de SDHEA baixos, enquanto pacientes cujo nível de SDHEA era normal atingiram pico de cortisol adequado. O SDHEA nesse estudo apresentou sensibilidade de 87,1%, especificidade de 86,7%, valor preditivo positivo de 93,1% e valor preditivo negativo de 76,5% (50).

Grande vantagem do uso desse marcador em relação ao uso do cortisol está no fato de ele ter um nível sérico mais estável (meia-vida de cerca de 20h) enquanto o cortisol apresenta variabilidade circadiana característica (2,48). Porém, o desafio dessa dosagem hormonal é padronizar um ponto de corte único, visto que a produção dele é muito variável de acordo com idade e o sexo, sendo maior em jovens e no sexo masculino (48).

Em trabalho publicado em 2008 Fischli et al. sugeriram o uso do SDHEA como marcador de integridade do eixo HPA usando z-score calculado de acordo com idade e sexo (51). Dennedy et al. foram os primeiros a sugerir o uso da razão de SDHEA como marcador ao invés da mensuração hormonal isolada (53). Foi proposto utilizar o valor do SDHEA, mensurado em cada paciente, dividido pelo limite inferior da normalidade do kit laboratorial de acordo com faixa etária e sexo. Utilizando o valor resultante dessa razão para prever a supressão de ACTH por lesões adrenais produtoras de glicocorticoide, os autores conseguiram demonstrar que tal marcador apresentou tanta sensibilidade quanto o teste de supressão de dexametasona e maior especificidade aumentando a acurácia de predição das lesões adrenais causadoras de hipercortisolismo subclínico (53). Posteriormente, Charoensri et al. utilizaram esse racional para estudar a razão do SDHEA e a falta de ACTH em pacientes com IAC. Eles estudaram 46 pacientes adultos com suspeita de DACTH submetidos ao teste curto de cortrosina (1 µg) e identificaram que a razão superior ao ponto de corte de 1,78 foi extremamente sensível para confirmar integridade do eixo HPA e assim evitar uso de testes de estímulo (50).

Embora ainda seja controverso a necessidade de reposição do DHEA ou SDHEA em pacientes com IAC, o uso do SDHEA como um marcador de doença e ou integridade do eixo HPA parece ganhar espaço e relevância. Assim, o presente estudo propôs estudar a utilidade dessa razão para predição de DACTH em diferentes cenários.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Delineamento

Esse é um estudo retrospectivo transversal onde foram revisadas as mensurações de SDHEA prévias (até 12 meses antes) ou concomitantes ao diagnóstico de IAC, precedendo assim qualquer reposição com glicocorticoide.

Conforme proposto por Dennedy et al. e Charoensri et al. foi utilizado para avaliação a RAZÃO: SDHEA mensurado/ valor mínimo de referência para sexo e idade de cada kit (50,53), reduzindo assim os vieses com uso de diferentes kits e pacientes de diferentes sexo e idade.

2.2 - Das populações estudadas

a) Dados do Ambulatório de Hipopituitarismo Congênito do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP): Pacientes com hipopituitarismo congênito e diagnóstico confirmado de Insuficiência adrenal central (IAC) comparados a pacientes com hipopituitarismo e suficiência na secreção do ACTH e controle saudáveis.

b) Dados da sala de testes hormonais do HCFMUSP: Pacientes de 18 a 60 anos submetidos a ITT no HCFMUSP no período de 2008 a 2021.

2.3 - Análise estatística

Para análise comparativa entre os grupos foram utilizados os testes t de student ou de Mann-Whitney. Foram aplicadas análises estatísticas de regressão logística binomial para avaliar a capacidade da razão de SDHEA em classificar paciente como deficiente de ACTH ou suficiente em secreção de ACTH. Em seguida

foi calculada matriz de confusão e determinado acurácia do modelo através de curva ROC.

3 - RESULTADOS

3.1 - Análise da razão de SDHEA entre pacientes com hipopituitarismo congênito

Após revisão de prontuário dos 29 pacientes com IAC acompanhados ativamente no ambulatório de hipopituitarismo, 19 tinham mensurações de SDHEA do momento do diagnóstico resgatáveis. Assim os comparamos com 43 pacientes suficientes em ACTH (25 pacientes com hipopituitarismo e ACTH preservados e 18 controles saudáveis). Características dos grupos seguem na tabela abaixo (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características dos pacientes incluídos na análise da razão de SDHEA. Dados ambulatório Hipopituitarismo congênito

Variáveis	Deficientes de ACTH	Suficientes de ACTH
Tamanho amostral	19	43
Sexo (M/F)	9:10	21:22
Idade no momento da avaliação do SDHEA (DP)	24 ($\pm 6,9$) anos	36 ($\pm 9,2$) anos
IMC (DP)	23.57 (± 5.25) kg/m ²	23.36 (± 2.97) kg/m ²
Razão do SDHEA no diagnóstico (DP)*	0.43 (± 0.62)	1.74 (± 1.28)

* $p < 0,05$

As dosagens bioquímicas se deram ao longo dos anos por diferentes kits no HC-FMUSP. De 1985 até meados da década de 1990 foram utilizados ensaios triciados, a partir do fim dos anos 1990 até 2006 foram utilizado método de radioimunoensaio iodado e desde 2007 até a presente data, o kit de dosagem é eletroquímioimunoensaio da Roche elecys. Os controles saudáveis tiveram análise do SDHEA feito em plasma com kit da Roche. Reforçamos que o uso da RAZÃO de SDHEA por uma equação que leva em consideração o valor de referência para sexo e idade de cada kit, minimiza o viés do uso de diferentes métodos laboratoriais.

Podemos observar na **Figura 3** a distribuição entre os grupos da razão de SDHEA. A média da razão de SDHEA foi de 0,43 no grupo doente enquanto no grupo saudável foi de 1,74, diferença estatisticamente relevante ($p < 0,05$). Após análise

inicial, foram excluídos alguns outliers (3 pacientes deficientes de ACTH cuja relação de SDHEA estava acima 1,5 e cujas idades de diagnósticos eram durante puberdade) com melhor desempenho do modelo. A regressão logística demonstrou modelo eficaz, podemos avaliar as curvas de probabilidade de doença e não doença na **Figura 4**.

Figura 3- Boxplot da Razão de SDHEA entre pacientes com deficiência de ACTH (DACTH) e Suficientes em ACTH do ambulatório de Hipopituitarismo Congênito HCFMUSP

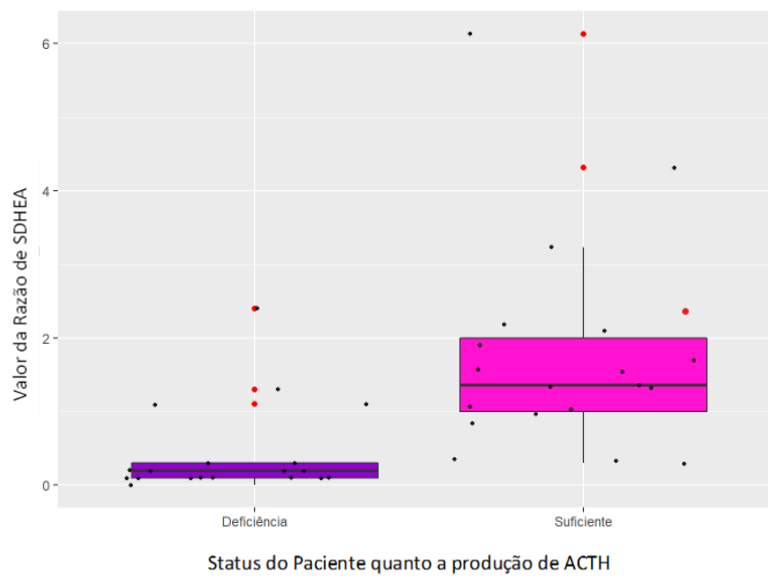
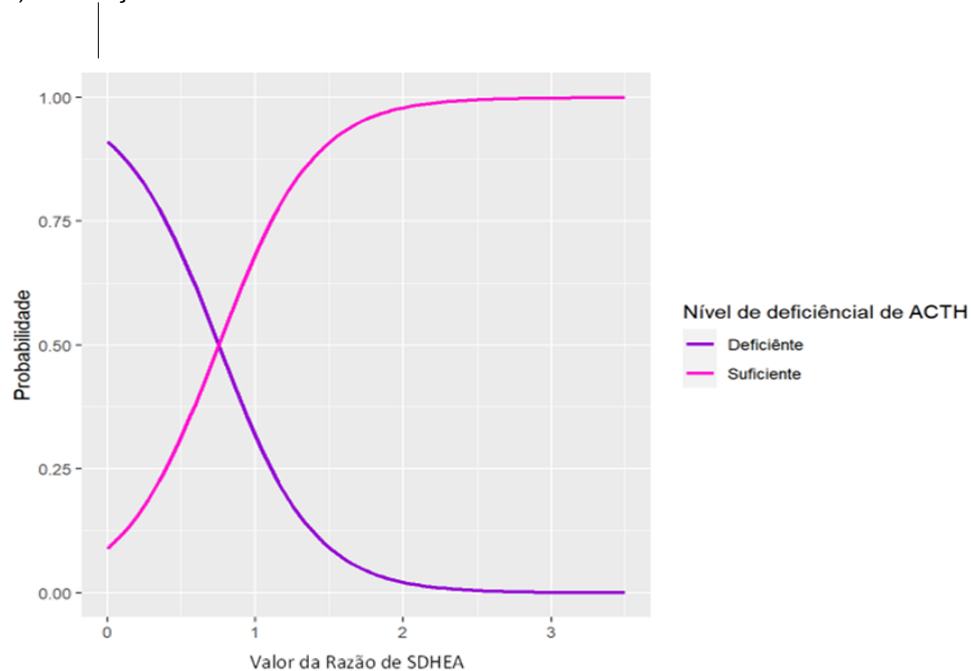
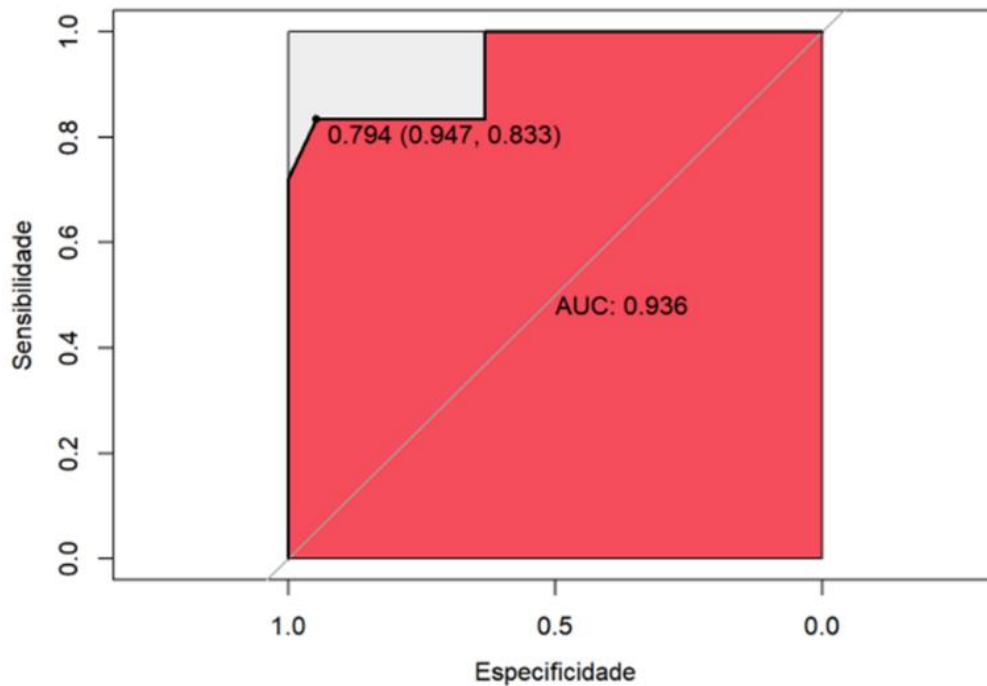


Figura 4-Gráfico com as curvas de probabilidade de pertencer a um dos grupos (com e sem deficiência de ACTH) em função do valor da razão de SDHEA



Análise de curva ROC demonstrou um bom desempenho do modelo, com área sob a curva de 0,936 (**Figura 5**). A acurácia foi de 83,78% (95% IC 67,99-93,81%). Assim conseguimos determinar que uma razão de SDHEA \leq 0,794 tem uma especificidade de 94,7% e sensibilidade de 83,3% em prever a insuficiência de ACTH. Enquanto para assegurar integridade do eixo, o melhor ponto de corte seria uma razão de SDHEA $>$ 0,823 com 100% de sensibilidade e 72,2% de especificidade para suficiência da secreção de ACTH.

Figura 5- Curva ROC do modelo com dados do ambulatório de Hipopituitarismo. Verificamos cálculo de AUC (area under curve) de 0,936



3.2 - Análise da razão de SDHEA entre pacientes submetidos ao ITT

Após revisão de prontuário dos mais de 200 testes de hipoglicemia insulínica realizados no HCFMUSP desde 2008 até 2021 em pacientes adultos (a partir de 18 anos). Foram incluídos 142 testes que tinham dosagem de SDHEA na instituição até 12 meses antes do ITT e excluídos 49 testes (45 que não fizeram hipoglicemia e 5 ITT sem dosagem de cortisol apenas GH). Portanto, ao final da filtragem analisou-se 92 pacientes submetidos ao ITT com avaliação de curva de cortisol e dosagem de SDHEA.

As dosagens de SDHEA foram realizadas com kits de ensaios eletroquímicoiluminométricos e eletroquímicoimunoensaios. Para todos os casos utilizamos a RAZÃO do valor de SDHEA mensurado dividido pelo valor inferior de referência para sexo e idade de cada kit. Para dosagem de cortisol a grande maioria dos kits foram policlonais (adotado ponto de corte para resposta pico > 18µg/dl) apenas no período de 28/01/2019 a 02/10/2020 foi usado ensaio monoclonal na dosagem de cortisol e no período de 01/10/2015 a 13/11/2015 o cortisol foi dosado por LC-MS e nesses intervalos o ponto de corte do pico de cortisol adotado para classificar suficiência de ACTH foi um pico de cortisol > 15 µg/dl. Características dos grupos seguem na tabela abaixo (**Tabela 2**):

Tabela 2: Características dos grupos na análise da razão de SDHEA entre pacientes da sala de testes do HCFMUSP

Variáveis	Deficientes de ACTH	Suficientes de ACTH
Tamanho amostral	41	51
Sexo (M:F)	19:22	21:30
Idade no momento da avaliação do SDHEA (DP)	24 (±6,9) anos	30 (±14,5) anos
Cortisol basal*	7,08 (±3,36) ug/ml	10,3 (±4,6) ug/ml
Razão do SDHEA* (DP)	0,82 (±0,86)	1,67 (±1,30)

* $p < 0,05$

A seguir, observamos a diferença da quantificação da Razão de SDHEA nos grupos. Os casos com DACTH a razão foi de 0,82 (±0,86), enquanto os pacientes com eixo íntegro e produção suficiente de corticotrofina apresentaram RAZÃO de

SDHEA de 1,67 ($\pm 1,30$), com diferença estatística entre os grupos $p < 0,05$. A seguir observa-se o boxplot e a curva de probabilidade de doença com relação a razão de SDHEA (**Figura 6 e Figura 7**).

Figura 6-Gráfico box plot da Razão de SDHEA no grupo deficiente de ACTH (dACTH) e suficiente em ACTH. Análise de pacientes da sala de testes do HCFMUSP

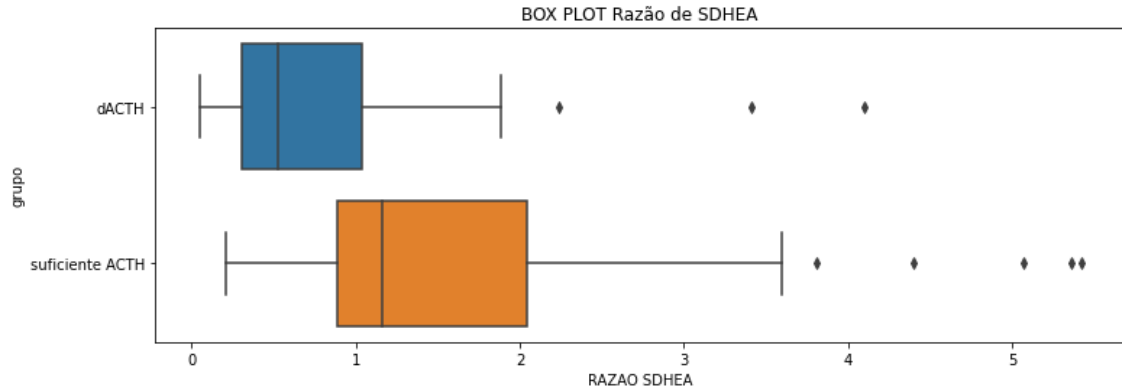
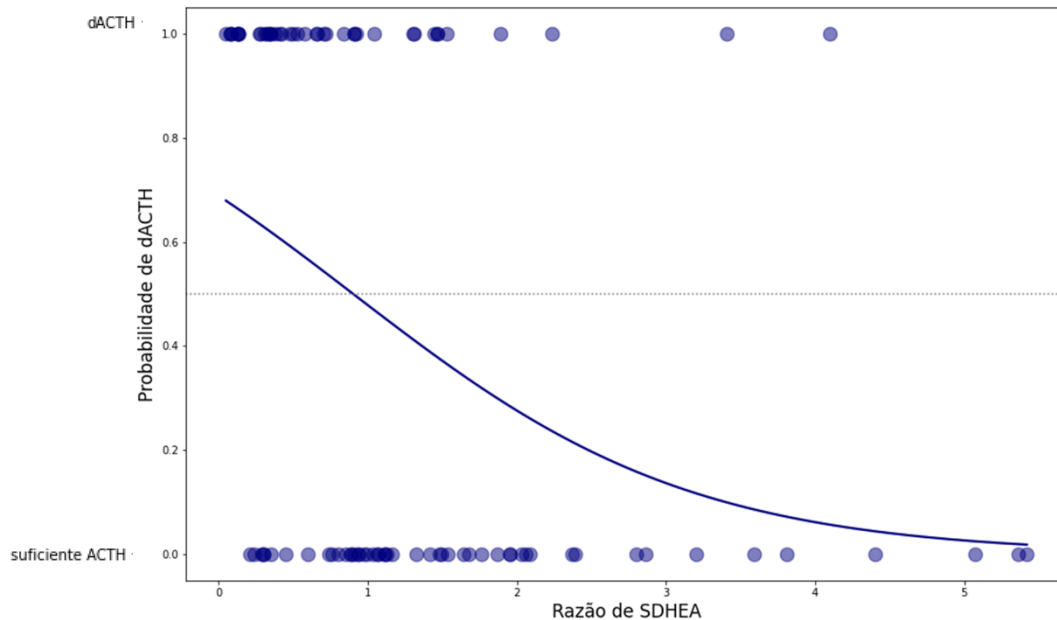


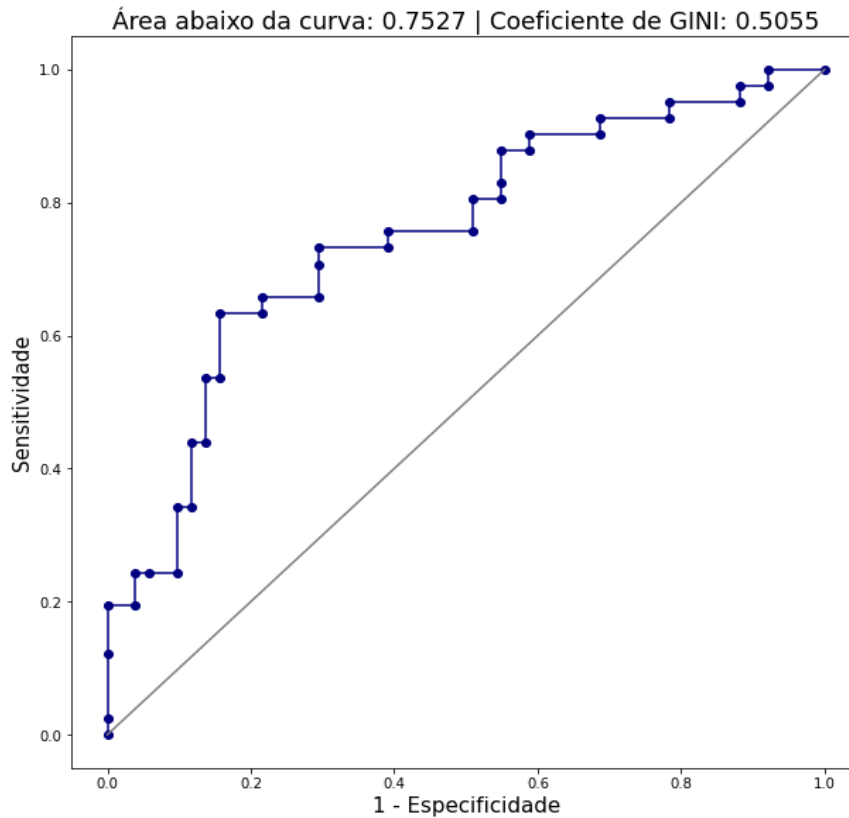
Figura 7-Gráfico com curva de probabilidade de doença- deficiência de ACTH (dACTH). Análise de pacientes da sala de testes do HCFMUSP



Com a regressão logística pôde-se demonstrar que a razão de SDHEA é uma variável explicativa para classificar os pacientes como doentes. A análise da curva ROC demonstrou desempenho razoável do modelo com uma AUC de 0,752 (**Figura 8**). O ponto de corte de razão de SDHEA menor que 0,85 apresentou

especificidade de 76,4%, sensibilidade de 65,8% e acurácia 71,7% para predição de DACTH. O valor da razão com maior sensibilidade e portanto um ponto de corte interessante para confirmar integridade do eixo foi uma razão maior que 3,4 (sensibilidade 97% Especificidade 11% Acurácia 50%).

Figura 8- Curva ROC do modelo com dados da sala de testes. Verificou-se área abaixo da curva de 0,752



4 - DISCUSSÃO

A forma sulfatada do DHEA é um hormônio de produção exclusiva da camada reticular da adrenal e cujo estímulo de secreção está relacionado à ação do ACTH (1,2,16). Vários trabalhos demonstram que em indivíduos com secreção de SDHEA preservada, um quadro de IAC é muito improvável (50–52). Porém, grande limitação para seu uso está na variabilidade de sua secreção de acordo com sexo e faixa etária, o que dificulta a determinação de um ponto de corte. Dennedy et al., em 2017, usou a razão de SDHEA ao invés do seu valor absoluto para estudar supressão de ACTH por hipercortisolismo subclínico em pacientes com incidentalomas adrenais. Em seu trabalho o marcador proposto foi mais específico e tão sensível quanto o teste de supressão com 1mg de dexametasona (53). Na mesma linha racional Charoenski et al. validou em 46 pacientes com suspeita de IAC o uso da razão de SDHEA demonstrando que um ponto de corte 1,78 consegue ter 100% de sensibilidade para prever integridade do eixo corticotrófico (50). No presente trabalho conseguimos validar em uma população com hipopituitarismo congênito o ponto de corte de 0,79 com especificidade e sensibilidade bem satisfatórias (de 94,7% e 83,3% respectivamente) para prever IAC.

Ao ampliar o estudo da Razão de SDHEA para uma população institucional de hospital terciário observamos que também foi um marcador útil, com melhor desempenho para prever doença usando um ponto de corte de 0,85 (\leq) especificidade de 76,4%, sensibilidade de 65,8% e Acurácia 71,7%. Deve-se destacar que ao partir da avaliação de pacientes submetidos a teste de estímulo com hipoglicemia na sala de testes do HCFMUSP, exclui-se parte dos casos em que o cortisol basal ($\leq 15 \mu\text{g/dl}$ ou $\geq 3 \mu\text{g/dl}$) foi informativo para elucidação diagnóstica. Como o cortisol o SDHEA também reflete o efeito trófico do ACTH, portanto não incluir na amostragem pacientes com cortisol e SDHEA nos extremos pode estar relacionado com a menor acurácia do modelo de regressão neste cenário. Estudo prospectivo que avalie cortisol e SDHEA em pacientes com suspeita de IAC de diferentes etiologias, incluindo todos os casos (os que necessitam ou não de teste de estímulo), provavelmente contribuirá para elucidação desse ponto.

Possível limitação para a aplicação da razão do SDHEA é o seu uso em faixa etária puberal. Os mecanismos envolvidos na adrenação são pouco compreendidos e talvez esse despertar de produção androgênica da zona reticular não esteja associado apenas ao ACTH. Vaiani et al., em um estudo transversal com 94 crianças púberes, concluiu que os níveis de DHEA e SDHEA não conseguem prever função adrenal com acurácia suficiente nessa população (48). Nos dados levantados de pacientes acompanhados no ambulatório de hipopituitarismo congênito, observamos que 3 pacientes cujo diagnóstico de DACTH se deu em idade puberal apresentavam razões de SDHEA realmente muito altas. Após exclusão dos dados desses pacientes, o modelo de regressão apresentou um desempenho melhor, corroborando com a ideia de que o uso desse marcador hormonal deva ser considerado apenas em população adulta.

Outro fato interessante é que em pacientes com função adrenal prejudicada, a secreção de SDHEA pela zona reticular preceda e seja mais afetada do que a produção de glicocorticoide (46–48). Essa dissociação andrógeno/glicocorticoide também é observada em doentes críticos e parece ser um mecanismo adaptativo do ACTH em modular respostas na zona fasciculada ou mesmo a um estímulo parácrino que o cortisol induz na reticular propiciando secreção de SDHEA (46,49). Estudar a razão de SDHEA como marcador de disfunção adrenal em cenários de deficiência relativa pode ser interessante levando em conta esse racional.

Estudo metabólico quantitativo de pacientes com asma submetidos a uso de diferentes doses de corticoide inalatório demonstrou que a redução de SDHEA e de metabólitos glucoronídeos de cortisol ocorrem com doses menores de corticoide inalatório do que a supressão de secreção de cortisol. Isso sugere que o SDHEA possa ser um marcador mais sensível de alterações do eixo adrenal (54). Por outro lado, não é sabido quanto tempo pode demorar para ocorrer a recuperação de produção de andrógenos pela adrenal após a exposição a corticosteroides.

5 - CONCLUSÃO

Através desse trabalho, pode-se observar que o uso da razão de SDHEA é uma ferramenta interessante para o diagnóstico de IAC em pacientes adultos. Deve-se levar em conta restrições, como uso em idade puberal e em usuários de glicocorticoides para interpretação dessa mensuração.

Em cenários de probabilidade pré-teste mais elevada, como avaliação de pacientes com doença pituitária, foi observado maior acurácia dos modelos preditivos (maior AUC). Porém, foi possível demonstrar também a validade desse marcador em cenário de suspeita de doença adquirida ao avaliar dados de pacientes investigados em um centro hospitalar de referência.

Tendo em vista o baixo custo e sua ampla disponibilidade é possível acrescentar a interpretação da razão do SDHEA no fluxo diagnóstico antes de submeter paciente a teste de estímulo. Recomenda-se o ponto de corte da razão de SDHEA $<0,79$ para confirmar a suspeita de IAC (especificidade de 94,7%). Assim, a utilização desse marcador pode evitar necessidade de muitos testes invasivos.

Por fim, o SDHEA é um hormônio de mensuração acessível, com meia-vida plasmática estável e quando interpretado a luz do limite inferior de referência para normalidade de acordo com a idade e sexo, tem um potencial bastante interessante para prever resposta suficiente ou não na secreção de ACTH.

CAPÍTULO 2

**Insuficiência Adrenal Central (IAC) através da Metabolômica
Untargeted: Uma Análise Exploratória**

1 - INTRODUÇÃO

O estudo molecular em larga escala de metabólitos surgiu no final do século XX, perante a conclusão de que o sequenciamento do genoma não seria o suficiente para compreender a complexidade da biologia de sistema (55,56). Em conjunto com outras ciências ômicas como, por exemplo, genômica, transcriptômica e proteômica é uma ciência que visa complementar a compreensão e integralização do funcionamento celular dos seres vivos, seus sistemas e suas alterações biológicas (56–58).

O termo metabolômica foi introduzido por Fienh et al e compreende à ciência que estuda moléculas de baixo peso molecular (<1.500 KDa). Pequenas moléculas ou metabólitos são caracterizados como produtos, substratos ou intermediários do metabolismo, portanto, apresentam uma diversidade química gigantesca quando comparada as demais biomacromoléculas.(59,60). O conjunto de metabólitos presente em uma dada matriz biológica é denominado de metaboloma, que apresentam distintas dimensões biológicas e químicas (56,60).

Normalmente os estudos metabolômicos apresentam duas principais abordagens analíticas: 1) Metabolômica *untargeted* (do inglês, não-direcionado) que visa elucidar um panorama metabólico identificando o máximo possível de *features* de determinado contexto. 2) Metabolômica *targeted* (do inglês, direcionado) que objetiva a quantificação exata de um ou mais metabólitos previamente selecionados .(61) A abordagem *untargeted* cria panoramas fenotípicos através de modelos estatísticos selecionando metabólitos que possam estar vinculados significativamente aos estados dos organismos estudados (ex.: doenças, nutrição, tratamento) (62). Comumente a abordagem *targeted* acaba sucedendo a abordagem *untargeted* na validação dos possíveis biomarcadores, pois é focada na quantificação exata de moléculas previamente identificadas em perspectiva semiquantitativa (63,64).

A metabolômica pode oferecer panoramas fenotípicos sem precedentes nas descobertas de assinaturas bioquímicas associadas a condições fisiológicas. Este potencial decorre da sua capacidade de captar mudanças dinâmicas nas vias

metabólicas através do conjunto de metabólitos que as compõem, proporcionando uma visão sistêmica do estado fisiológico de um determinado organismo (65). A metabolômica também usufrui de modernas ferramentas analíticas e técnicas de processamento de dados em análises exploratórias metabolômicas, contribuindo com informações valiosas que catalisam o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas para doenças (57,66–68).

O estudo metabolômico depende de uma série de plataformas analíticas para detectar e quantificar a ampla diversidade química dos metabólitos em matrizes biológicas, contudo, nenhuma técnica garante a cobertura completa das classes de metabólitos. Tanto a espectrometria de massa (MS) quanto a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) destacam-se como técnicas primárias devido à sua alta sensibilidade e à capacidade de discernir misturas complexas de metabólitos, entretanto, a sensibilidade da MS é maior, o que faz desta uma aliada importante no mundo pós-genômica (69–71). Técnicas associadas à espectrometria de massa, como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) são excelentes para a identificação e quantificação de metabólitos (64,65). Com o advento tecnológico de espectrômetros contendo analisadores de massa de alta resolução, o desenvolvimento da técnica de infusão direta em espectrometria de massas, ou seja, sem o auxílio de técnicas de separação acopladas a espectrometria de massas, deu seu início na compreensão da biologia de sistemas (72).

O manuseio dos complexos dados gerados pelas análises metabolômicas requer técnicas sofisticadas de processamento (58). As etapas de pré-processamento envolvem a redução de ruído, o alinhamento de íons e a normalização, a fim de garantir a qualidade dos dados e a comparabilidade entre as amostras (73). A análise de dados subsequente integra abordagens estatísticas multivariadas, como a análise de componentes principais (PCA), o agrupamento hierárquico e a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com o objetivo de descobrir padrões, tendências e agrupamentos nos dados (74–76). Essas técnicas auxiliam na identificação de biomarcadores metabólicos associados a distúrbios específicos.

As análises exploratórias são cruciais para identificação de metabólitos significativos entre o extenso conjunto de dados metabolômicos. A análise das vias metabólicas pode contribuir para a elucidação das vias metabólicas interconectadas e suas perturbações nos estados de doença. As redes de correlação revelam ainda mais associações entre metabólitos e potencialmente esclarecem os mecanismos subjacentes da doença (75). A integração com dados de genômica, transcriptômica e proteômica contribui para uma compreensão abrangente da base molecular dos distúrbios (57).

A metabolômica desempenha um papel fundamental na medicina translacional, oferecendo uma visão abrangente do estado metabólico de um indivíduo. Este campo em rápida evolução fornece informações valiosas sobre os processos bioquímicos subjacentes a várias doenças, ajudando assim no desenvolvimento de estratégias de tratamento personalizadas (77). Ao analisar pequenas moléculas em amostras biológicas, a metabolômica permite aos clínicos e pesquisadores identificar biomarcadores, compreender os mecanismos das doenças e monitorar as respostas ao tratamento (57,66,78). Em última análise, a integração da metabolômica na medicina translacional promete avançar na medicina de precisão, aumentar a precisão diagnóstica e adaptar as intervenções terapêuticas às necessidades individuais dos pacientes.

É importante ressaltar que a discussão sobre estudos e análises metabolômicas requer o uso frequente de termos em língua inglesa, como as siglas das ferramentas analíticas, procedimentos de análise de dados e, por exemplo, os "*features*", que, dependendo do contexto, podem corresponder desde íons selecionados no processamento de dados até variáveis significativas (79).

2 - MATERIAL E MÉTODO

2.1 - Da obtenção de dados

Foram realizadas análises com os dados de ômicas gerados nos estudos CAEE: 98372718.7.0000.0068 e 9126918.0.0000.5505 já aprovados pela CAPPESQ e CEP respectivamente e que tiveram aprovação pela CAPPesq e CEP para o presente estudo CAEE: 42993819.5.0000.0068 de análise de dados gerados. Dados clínicos e laboratoriais complementares foram resgatados através de análise retrospectiva de prontuário.

2.2 - Casuística

Foram selecionadas 46 amostras de plasma de pacientes adultos diagnosticados com hipopituitarismo congênito, destes 23 pacientes com IAC e deficiência de ACTH (DACTH) serão comparados a 23 pacientes com hipopituitarismo, porém sem deficiência de corticotrofina (Controle Hipopit).

Todos os pacientes, para serem incluídos, deveriam estar com comprovada adesão ao tratamento nos últimos 6 meses, os critérios de exclusão foram comorbidade por diabetes e/ou hipertensão, tabagismo e baixa adesão ao tratamento. O grupo controle saudável foi composto por 15 amostras de indivíduos saudáveis e, portanto, sem comorbidades, que não tivessem sido expostos a corticosteroides ou outras medicações nos últimos 6 meses. As amostras foram classificadas para análises comparativas entre os subgrupos DACTH vs Controle Saudável e DACTH vs Controle Hipopit.

2.3 - Coleta das amostras

Durante os procedimentos de coleta das amostras, a assepsia do local da coleta (braço) foi realizada com algodão embebido em álcool a 70%, o sangue foi coletado em tubo contendo EDTA e adicionado o coquetel de proteinase. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (10 min a 12.000 RPM) e o plasma foi aliquoteado em tubos *Eppendorf* de 400 μ L. Em seguida, as amostras foram estocadas em freezer a -80 °C até o uso.

2.4 - Extração de metabólitos

As amostras foram descongeladas enquanto estavam imersas em gelo e, em seguida, homogeneizadas em vórtex durante 2 minutos. Enquanto permaneciam sob o gelo, 100 μ l do plasma foram pipetados para um tubo *Eppendorf*. Para cada tubo, foram adicionados 300 μ l de metanol/etanol (proporção 1:1), resultando em uma relação final de solvente/amostra de 3:1 para garantir a precipitação de proteínas. As amostras foram novamente agitadas pelo emprego de equipamento vórtex durante 1 minuto, seguidas de imersão em gelo durante 5 minutos. Antes da centrifugação por 20 minutos a 13.000 rpm (15,7 rcf) a 4°C, os tubos foram submetidos a uma última homogeneização em vórtex por alguns segundos (80,81).

Preparou-se uma solução contendo o padrão interno (IS, do inglês *Internal Standard*) de triptofano marcado com isótopos de nitrogênio (15N) e carbono (13C), que foi adicionado a cada tubo de amostra com um volume de 20 μ L. Antes da infusão direta no espectrômetro de massa (DIMS), as amostras foram filtradas previamente usando um cartucho de nylon de 0,22 μ m (64).

2.5 - Controle de qualidade – QC (*Quality Control*)

As amostras para controle de qualidade (QC, do inglês *Quality Control*) foram preparadas a partir de uma alíquota de 20 μL retirada de cada amostra e, posteriormente, misturadas. A cada seis injeções das amostras, de forma aleatória, uma injeção de QC era analisada. As análises dos QCs foram processadas da mesma forma que as amostras regulares (69).

2.6 - Aquisição de dados por Infusão Direta em Espectrometria de Massas

A abordagem metabolômica *untargeted* foi realizada em espectrômetro de massas Orbitrap de alta resolução (*Thermo Fisher Scientific*), no laboratório de espectrometria de massas multiusuário do instituto de química de São Carlos (IQSC-USP). As condições para a aquisição dos espectros de massa foram as seguintes: tensão da fonte de íons de 3,5 kV (em ambos os modos de ionização), temperatura da fonte HESI de 60°C, temperatura capilar de 250°C e volume de amostra de 50 μL . O gás de revestimento (N_2) foi mantido em 5 u.a., enquanto os gases auxiliares e de varredura (N_2) foram mantidos em 0 u.a. A resolução FTMS foi fixada em 60.000, com uma máxima taxa de injeção de 500.000 ms e uma tolerância de massa de 5 ppm. Os dados espectrométricos de massa foram adquiridos por infusão direta a uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ em cada faixa de aquisição em m/z. Duas faixas de varreduras foram definidas, entre 50-750 m/z e 150-750 m/z.

3 - ANÁLISES DE DADOS

3.1 - Pré-processamento de dados

Arquivos no formato .RAW foram extraídos do software Xcalibur (versão 3.0.63, *Thermo Fisher Scientific*) e convertidos para o formato .xlsx (Excel, sistema operacional Windows). Após a obtenção dos valores de intensidade relativa de cada íon (*feature*), foram removidos da amostra aqueles com intensidades menores que 1000. Em seguida, as amostras foram agrupadas por classe para serem alinhadas por razão massa-carga (m/z) com tolerância de erro de 5 ppm, usando a plataforma online *MetaboAnalyst* versão 5.0.

Foram usados, em grande parte, recursos disponibilizados pelo *MetaboAnalyst* após a atualização para a versão 5.0, incluindo o alinhamento de matrizes por m/z e o pré-processamento de filtragem. As amostras foram submetidas à subtração do branco, filtração por frequência de >30% nos QC e >40% em cada grupo, substituição dos valores ausentes pelo método de *k-Nearest Neighborhood* (KNN) e pelo coeficiente de variação dos *features* superior a >25% nos QC.

Os dados de cada faixa de varredura, com o respectivo modo de ionização, foram alinhados e pré-processados independentemente. Para a junção das matrizes de dados, foi necessário identificar os *features* de acordo com a faixa de varredura e modo de ionização para verificar o desempenho dos *features* obtidos em cada matriz na caracterização metabólica das análises comparativas.

Após a mesclagem das matrizes em uma única matriz, foi realizada a correção de erros sistemáticos pela ferramenta "*Batch Effects Correction*" do *MetaboAnalyst*, que utiliza as amostras de QC e padrão interno para normalizar os dados, aplicando métodos como *ComBat* e *EigenMS* (82,83). A **Figura 9** representa a configuração da tabela, utilizando informações de classes, ordem de injeção, análises em lotes (*Batches*) e QC na normalização dos dados metabólicos.

A correção de efeitos em lotes (*Batch Effects Correction*) inclui variações diárias no desempenho do instrumento, perda de intensidade do sinal devido a efeitos

dependentes do tempo, acúmulo de contaminantes na fonte de íons do espectrômetro de massas, sensibilidade, entre outros. Portanto, as amostras de QC são utilizadas para normalização pois são as mais similares e de menor variação.

Figura 9: Formato da matriz disponibilizado no *metaboanalyst* para correção de erros sistemáticos em lotes das análises comparativas. Da coluna A até D estão presentes as informações necessárias para correção em lotes, sendo estas o nome da amostra, classe, lote (batch) e ordem de injeção. A partir da coluna E são as variáveis (features) obtidas na mensuração de íons.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Samples	Class	Batch	Order	Neg_B_216.9904	Neg_A_189.01159	Neg_B_216.96988	Neg_B_216.98438	Neg_B_219.02938	Neg_B_216.95538
2	QC4	QC	B1	1	4358.703014	7529.711624	2815.183658	3600.807916	4442.950349	2489.629832
3	sample_10	CONTROLE HIPOPIIT	B1	2	1691.525881	3859.334425	1253.527474	1687.675532	1626.39025	
4	sample_81	CONTROLE SAUДАVEL	B1	3	4471.893364	10160.16653	3115.107603	4506.495703	6109.304486	2829.572771
5	sample_55	DACTH	B1	4	2986.288937	6819.502457		3128.858899	3745.940099	
6	sample_91	CONTROLE SAUДАVEL	B1	5	4999.47041	14182.75223	4174.489441	5121.706482	6546.81539	3194.974287
7	sample_11	CONTROLE HIPOPIIT	B1	6	3130.695468	9938.180091		2665.514866	3882.397566	
8	sample_20	DACTH	B1	7	2348.428582	11122.92093		1000.656008	3051.732793	
9	sample_29	CONTROLE HIPOPIIT	B1	8	4462.582616	4867.058517	2804.248436	4311.21351	4939.053666	2413.223637
10	sample_101	CONTROLE SAUДАVEL	B1	9	3981.041532	4883.369223	3167.492286	3402.452371	5121.142822	2429.228298
11	sample_83	CONTROLE SAUДАVEL	B1	10	3245.678666	5328.149268	1051.726581	3439.348253	4263.421352	
12	sample_38	DACTH	B1	11	2285.614958	7450.776592	1576.216816	2001.667979	2794.302687	1296.028101
13	sample_65	CONTROLE HIPOPIIT	B1	12	5523.239011	7421.636082	3363.725344	5437.817416	5685.398382	3322.00423
14	sample_03	DACTH	B1	13	2285.25273	11465.00563	1580.173768	1840.975961	1991.937466	1217.901142
15	QC7	QC	B1	14	4932.730796	7018.911607	3112.471052	4018.056163	4603.224421	2654.151681
16	QC11	QC	B2	15	4782.49903	6440.503863	3143.390446	4029.590864	4039.479631	2338.054232
17	sample_39	CONTROLE HIPOPIIT	B2	16	3597.062734	5755.29498	2253.849271	3381.093025	2963.892332	1679.852523
18	sample_84	CONTROLE SAUДАVEL	B2	17	3253.754864	3955.071761	2002.608241	2848.375494	2704.831998	1771.618892
19	sample_66	DACTH	B2	18	5721.245217	2762.455329	3832.028994	5244.755729	5075.946964	2594.362993
20	sample_21	DACTH	B2	19	2720.734801		3205.28943	4248.575833	2051.967689	2488.100284
21	sample_30	DACTH	B2	20	6548.413267	12662.16683	4021.867202	5148.736836	4730.202101	3226.002387
22	sample_12	CONTROLE HIPOPIIT	B2	21	6413.716895	3661.418695	2834.510616	2667.528045	2552.494484	1801.84976
23	sample_57	DACTH	B2	22	2661.501743	9618.000148	1747.243389	2774.89962	2559.445356	1605.707263
24	sample_93	CONTROLE SAUДАVEL	B2	23	7984.759427	4846.505033	5206.882015	7409.633764	5878.902929	4720.018388
25	sample_47	DACTH	B2	24	5906.781441	4968.706337	4272.702755	4822.286178	4827.777713	2956.432604
26	QC12	QC	B2	25	4782.49903	6440.503863	3143.390446	4029.590864	4039.479631	2338.054232
27	QC13	QC	B3	26	4424.926504	6708.634572	2775.697266	3512.632288	3947.230145	2161.081694
28	sample_67	DACTH	B3	27	5203.367246	4242.387524	3484.862632	4382.312404	4273.283295	2701.606016
29	sample_13	DACTH	B3	28	2760.256128	9260.203598	1908.368864	2560.476098	2360.045004	1379.000156
30	sample_77	CONTROLE SAUДАVEL	B3	29	5701.152263	7207.094974	2579.601966	4523.443474	5207.189069	2718.004377
31	sample_31	DACTH	B3	30	4394.597444	4239.482712	3043.573542	3707.635609	3868.71819	2653.832077
32	sample_85	CONTROLE SAUДАVEL	B3	31	5159.175711	3063.369635	3072.00114	4366.40021	4059.8906	3040.157566
33	sample_04	CONTROLE HIPOPIIT	B3	32	1890.356007	6352.250505	1146.8689	1398.648841	1643.66627	1001.484341
34	sample_40	DACTH	B3	33	2149.872997	4642.793179	2289.736497	3461.391948	2017.827979	1117.987911

O processamento dos dados teve como objetivo ajustar as amostras em condições mais comparáveis, utilizando a normalização pela média, transformação logarítmica e escalonamento por pareto para transformar a matriz de dados com uma distribuição gaussiana. A plataforma *MetaboAnalyst 5.0* foi utilizada para realizar o processamento de dados, análises quimiométricas, análise de vias e avaliação de biomarcadores. (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

3.2 - Análises Estatísticas (Quimiometria)

Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para verificar o agrupamento, tendências e/ou outliers dos grupos na matriz gerada em cada análise comparativa. Para uma melhor separação dos grupos, foi empregada a Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) nos dados para identificar as principais variáveis de interesse. A capacidade preditiva e a significância estatística dos modelos PLS-DA usados nas análises comparativas foram avaliadas por meio da validação cruzada, onde o coeficiente de predição Q^2 maior ou igual a ($\geq 0,6$) é indicado para estudos metabolômicos.

Para avaliar o potencial dos *features* putativamente anotados em discriminar os grupos analisados, a ferramenta de análises exploratórias multivariadas baseada em curva ROC foi utilizada para projetar as melhores combinações desses *features* como potenciais candidatos a biomarcadores para a DACTH. Cada matriz de dados foi escalonada automaticamente e o PLS-DA foi usado para o método de classificação e seleção de variáveis significantes (*input 2* variáveis latentes). As análises por meio da curva ROC e matriz de confusão também foram realizadas nas matrizes usando a função *Biomarker Discovery* do *MetaboAnalyst*.

3.3 - Anotação putativa e vias bioquímicas

Os bancos de dados metabolômicos METLIN, *Human Metabolome Database* (HMDB), LIPIDMAPS e CEU-Mass Mediator foram usados para a anotação putativa dos *features* a partir de suas bibliotecas contendo os espectros de massas. O erro de massa de 5 ppm (Δ ppm) foi definido como a variação máxima tolerável do *m/z*. Modificações químicas (Adutos) em ambos os modos de ionização foram considerados de acordo com o reagente utilizado ao decorrer do experimento, focando nos adutos mais simples do modo positivo: $[M+H]^+$; $[M+K]^+$; $[M+Na]^+$; $[M+CH_3O+H]^+$; $[M+H-H_2O]^+$; e no modo negativo: $[M-H]^-$; $[M-H_2O-H]^-$; $[M+Cl]^-$; $[M+Na]^-$; $[M+K]^-$.

Os *features* anotados consistiram das variáveis projetadas pela lista com VIP >1,2. As vias bioquímicas analisadas através da ferramenta *Pathway Analysis* do *MetaboAnalyst* tiveram a função de indicar as principais rotas bioquímicas afetadas pelas alterações dos metabólitos anotados.

4-RESULTADOS

4.1 - Caracterização da população estudada

Dentre os 170 pacientes adultos com hipopituitarismo congênito, acompanhados ativamente na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, existem 29 pacientes em seguimento ambulatorial com diagnóstico de deficiência de ACTH. Após os critérios de exclusão, foram selecionados 23 pacientes que correspondiam aos critérios de inclusão para o presente estudo, além de 23 controles portadores de hipopituitarismo com eixo corticotrófico preservado, e 15 pacientes controle saudáveis fizeram parte deste estudo. Dentre os pacientes com IAC e DACTH, 13 estavam em uso de hidrocortisona e 10 prednisona como glicocorticoide de escolha, com uma média de 18,3 mg ($\pm 3,8$) de equivalente a hidrocortisona como dose de reposição. No grupo DACTH a média de idade ao diagnóstico da deficiência do eixo corticotrófico foi de 23,9 ($\pm 8,4$) anos, esses pacientes encontravam-se em corticoterapia há cerca de 17,2 ($\pm 8,8$) anos em média. As características clínicas dos pacientes e controles estão demonstradas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Característica dos pacientes incluídos na análise metabólica *untargeted*

Dados	Hipopituitarismo com DACTH (n=23)	Hipopituitarismo com ACTH preservado (n=23)	Controles saudáveis (n=15)
SEXO (M:F)	11:12	9:14	8:7
IDADE MÉDIA (DP)	41,2 (±7,4)	36,8 (±8,5)	40,5 (±8,7)
IDADE MÉDIA ao diagnóstico de Hipopituitarismo (DP)	11,1 (±5,6)	12,2 (±9,1)	-
IMC Média (DP)	24,2 (±5,1)	23,7 (±3,8)	22,8 (±2,0)
Estatura Média (DP) *	161,0 (±7,7)	153,9 (±16,7)	170,1 (±10,6)
Cintura Abdominal	82,7 (±9,6)	79,8 (±12,1)	80,4 (±8,1)
Deficiência de GH / uso de rhGH	23 (100%)/12 (52,2%)	23 (100%)/9 (39,1%)	
Deficiência de FSH/LH*	21 (91,3%)	16 (69,5%)	
Deficiência de TSH**	22 (95,7%)	12 (52,2%)	
Colesterol Total	191 (±29,3)	185 (±36,7)	185 (±32,9)
LDL	116 (±25,4)	115 (±32,3)	103 (±22,3)
HDL	56 (±16,9)	50 (±17,8)	64 (±20,5)
Triglicerídeos	94 (±46,6)	99 (±42,6)	75 (±37,4)
Glicemia	80 (±11,3)	84 (±7,8)	85 (±6,5)
Hemoglobina Glicada	4,9 (±1,1)	5,3 (±0,3)	5,2 (±0,3)
Diagnóstico Molecular	Prop1- 3 (13%)	Prop1- 4 (17,3%) GH1- 2 (8,7%) GHRHR- 2 (8,7%)	

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$

4.2 - Processamento de dados

O processamento de dados teve como função melhorar a qualidade das matrizes de dados previamente alinhadas, portanto, foram removidos os *features* pouco robustos. Os parâmetros utilizados para esse processamento incluíram a subtração de amostra em branco, a contagem de valores ausentes (*missing values*) e o cálculo do RSD (desvio padrão relativo) do *features* no grupo de controle de qualidade (QC). Foram excluídas as variáveis, ou seja, *features* que apresentaram

um coeficiente de variação acima de 25% no grupo QC. O processo de mineração dos *features* após aplicações de parâmetros pode ser observado na **tabela 04** abaixo.

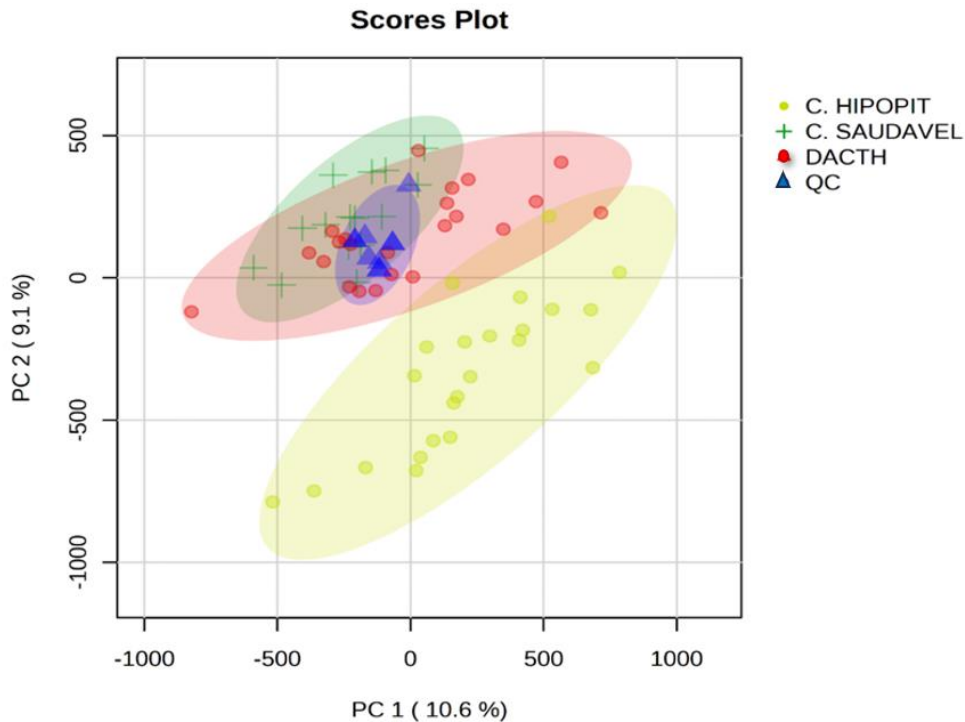
Tabela 4: Filtragem e mineração de dados a partir de análises metabolômicas por DIMS

Processamento de dados	Nº de features
Matriz de dados Alinhada	38.631
Matriz de dados após remoção de ruídos (Branco)	37.018
Matriz de dados após remoção <i>Missing Values</i>	4.354
Matriz de dados após <i>Batch Effects</i> - QC-RSD >40 %	2.318
Matriz de dados após - QC-RSD >25 %	1.707

4.3 - Análises Estatísticas (Quimiometria)

A matriz de dados contendo os 1.707 *features* foi submetida a análise de PCA que constatou agrupamentos e tendências de separações entre os grupos DACTH, C. Hipopit, C. Saudável e QC, contudo, a técnica de decomposição em componentes principais só conseguiu explicar 19.7% (soma do PC1 e PC2) da variabilidade entre as amostras. Por outro lado, a técnica de PCA permitiu afirmar que a aquisição de dados pela técnica de infusão direta em espectrometria de massas fora robusta, pois o agrupamento do grupo controle de qualidade (QC) indica baixa variabilidade analítica durante a aquisição de dados (**Figura 10**). Também foi observado que o grupo C. Hipopit e DACTH apresentaram as maiores variabilidade na PC1 e PC2 do PCA, enquanto o grupo Controle Saudável e QC mostraram menor variabilidade.

Figura 10: PCA a partir das 1.707 *features* selecionadas no processo de tratamento dos dados. A análise revela que íons similares foram medidos em todas as observações (amostras), exibindo variações nas intensidades. O grupo QC confirma a presença dos íons em cada agrupamento, demonstrando um agrupamento satisfatório. As amostras do grupo QC são idênticas e a baixa variabilidade entre elas, ao longo da aquisição de dados, contribui para assegurar a integridade dos resultados.



Diante da ausência de explicações estatísticas entre os grupos obtidas por meio da PCA, o método de análise multivariada discriminante se tornou um aliado na avaliação de múltiplas variáveis. Assim, ao contrário do PCA que é um modelo não supervisionado, o modelo de PLS-DA leva em consideração as classes dos grupos analisados. Dessa forma, ele é capaz de projetar as variáveis ou características que melhor distinguem os grupos por meio de um modelo de predição.

Foram realizadas duas análises comparativas por meio do PLS-DA entre os grupos DACTH vs. Controle Hipopit e DACTH vs. Controle Saudável. Ambas as análises mostraram métricas satisfatórias com coeficiente de predição maior 0.6 (Q2), reafirmando que os dados possuem variáveis significantes que distinguem os grupos pré-definidos (**Figura 11 e 12**).

A partir do modelo de PLS-DA os *features* com VIP score >1.2 foram selecionados de ambos os modelos de PLS-DA para subsequentes análises

estatísticas usando modelo de Curva-ROC multivariada, esse modelo acessou os valores de AUC e testou diferentes conjuntos de *features* na criação de modelos de predição. Para análise entre DACTH vs. Controle Hipopit foram selecionados 167 *features* e DACTH vs. Controle Saudável foram selecionados 162 *features*.

Figura 11: **A)** Análise PLS-DA entre os grupos DACTH vs. Controle Saudável. **B)** Validação-cruzada para averiguar o desempenho preditivo do modelo.

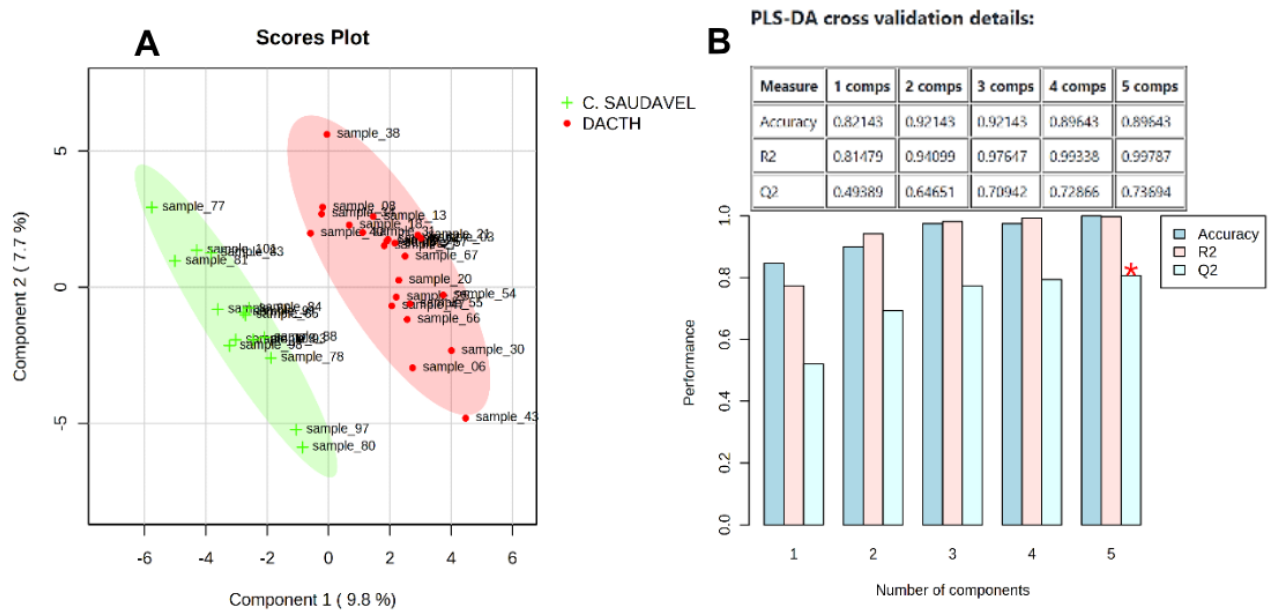
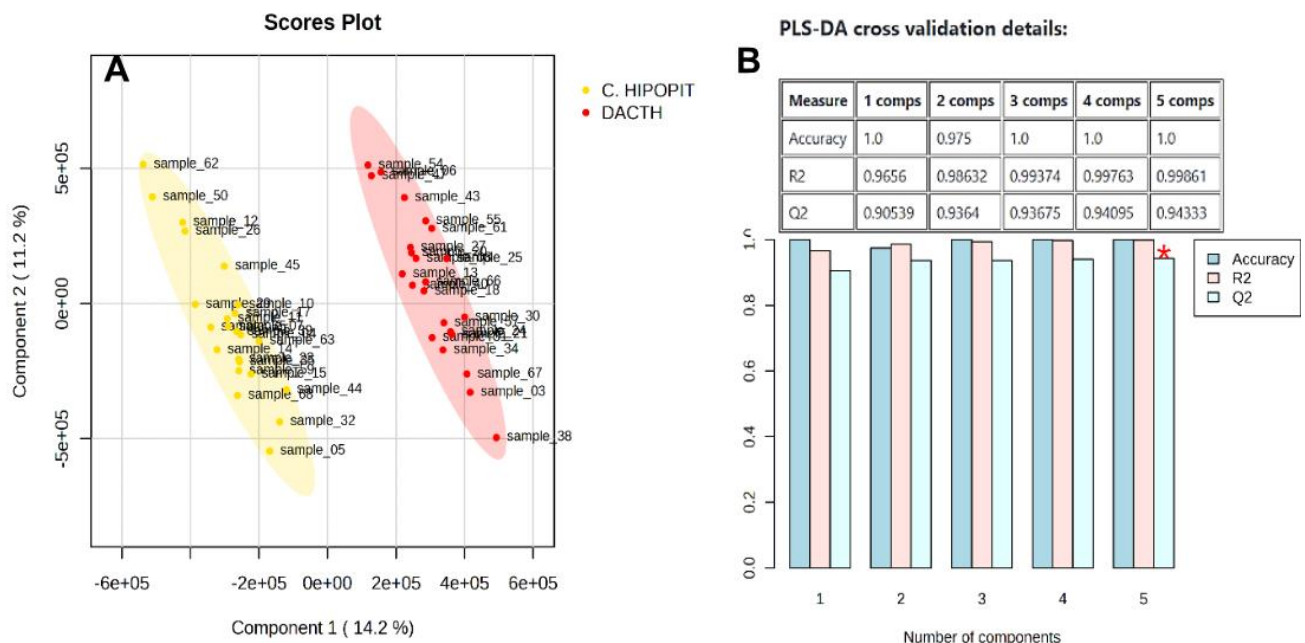


Figura 12: **A)** Análise PLS-DA entre os grupos DACTH vs. Controle Hipopit. **B)** Validação-cruzada para averiguar o desempenho preditivo do modelo.



A análise multivariada baseada em curva ROC mostrou que houve uma boa distinção entre o grupo DACTH vs. Controle Saudável que, quanto mais *features* adicionados ao modelo, melhor era a classificação dos grupos (**Figura 13**). Enquanto na análise entre grupos DACTH vs. Controle Hipopit, houve melhor desempenho dos *features* selecionados pela lista VIP, também, quanto mais *features* adicionados ao modelo havia a melhora da classificação (**Figura 14**).

Figura13:A) Análise multivariada baseada em Curva-ROC entre DACTH vs. Controle Saudável. **B)** Gráfico de probabilidade de predição do modelo contendo 100 *features* na classificação dos grupos.

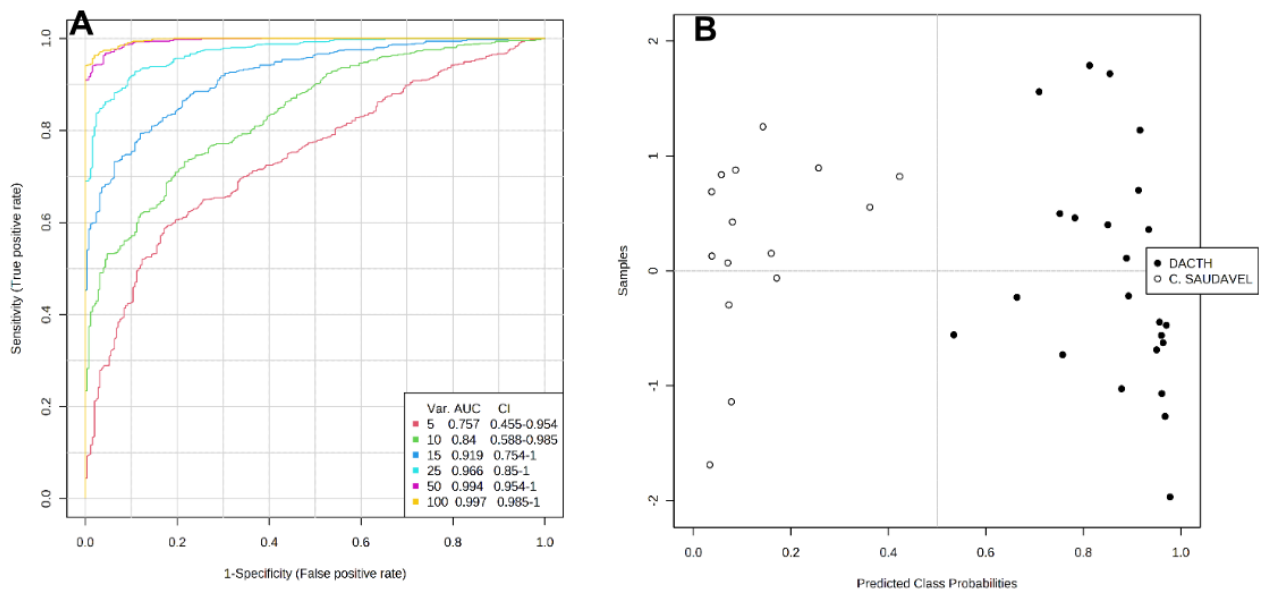
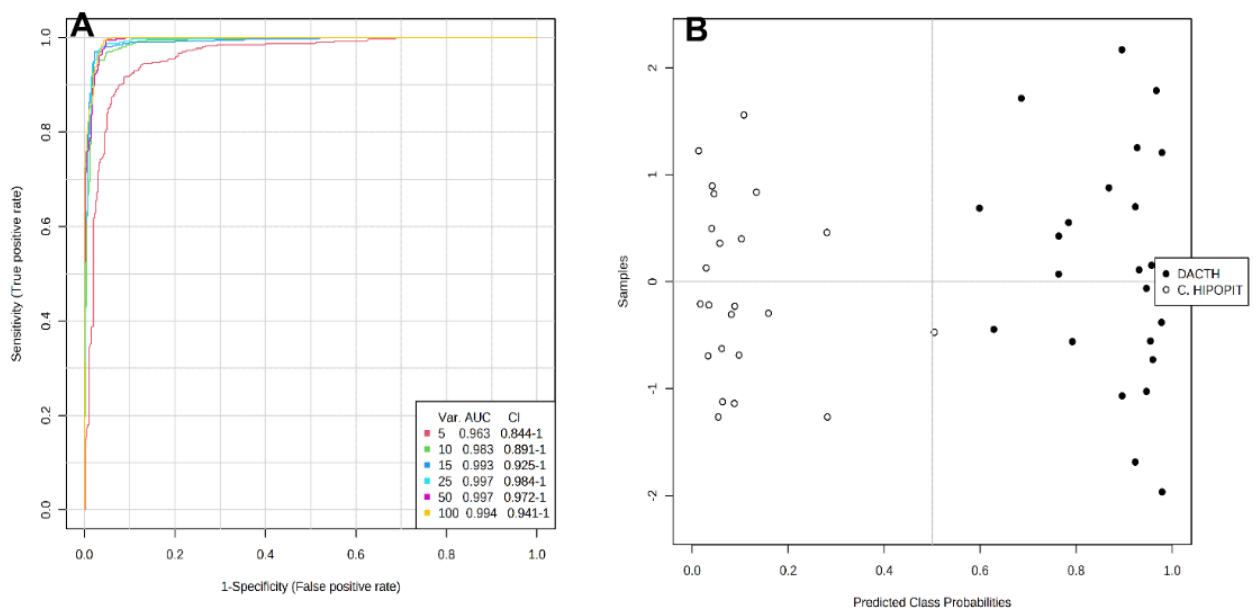


Figura 14:A) Análise multivariada baseada em Curva-ROC entre DACTH vs. Controle Hipopit. **B)** Gráfico de probabilidade de predição do modelo contendo 100 *features* na classificação dos grupos



A anotação putativa foi realizada a partir de *features* que atenderam a critérios específicos, incluindo VIP score superior a 1.2 e valor de *p-value* inferior a 0.05 (*Test-t*). Na análise DACTH vs. Controle Saudável somente 38 *features* foram selecionados, enquanto na análise DACTH vs. Controle Hipopit 79 *features* foram significativos, explicando o fato de os modelos de classificação serem mais eficientes com o conjunto de dados DACTH vs. Controle Hipopit. A **tabela 5** contém *features* significativos achados entre as análises, corroborando que ambos os grupos possuem *features* em comum, porém, contendo assinaturas bioquímicas particulares. É importante mencionar que significativa parcela dos *features* escolhidos para a anotação, podem não corresponder a valores de m/z contidos em bancos de dados metabolômicos, sendo a anotação um processo ainda desafiador na metabolômica. Para a tabela completa da anotação putativa vide **APÊNDICE I**.

Tabela 5: Anotação putativa dos principais *features* filtrados no processamento de dados e que se mostraram robustos na classificação dos grupos analisados.

M/Z	FDR	VIP	ANOTAÇÃO	FÓRMULA	ADUTO	PPM	ID
DACTH vs. Controle Saudável							
219.0459	1.27E-09	6.2	Cystathionine sulfoxide	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	M-H2O-H	6	HMDB0041942
205.0671	2.41E-04	4.6	Galactitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	M+Na	6	HMDB0000107
219.0466	2.16E-02	3.9	N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄ S	M-H	2	HMDB0041942
219.0489	6.48E-03	2.3	Oxoadipic acid	C ₆ H ₈ O ₅	M+Hac-H	2	HMDB0000225
220.0479	4.26E-04	2.2	N-Formyl-L-glutamic acid	C ₈ H ₉ NO ₅	M+HCOOH-H	9	HMDB0003470
217.0629	7.20E-07	2.2	N, N-Dihydroxy-L-tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₄	M-H-H2O	6	C19717
220.0486	1.64E-02	2.2	L-histidinol-phosphate	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₇ P	M-H	3	HMDB0304403
146.0272	3.27E-02	2.1	Methionine sulfoxide	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	M-H2O-H	2	HMDB0002005
DACTH vs. Controle Hipopit							
281.2481	1.78E-05	6.1	2-Hydroxystearate	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	M-H-H2O	3	LMFA01050485
205.0671	4.64E-06	4.6	Galactitol	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₇ S	M-H	2	HMDB0041942
279.2331	1.67E-03	4.5	Malvalic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	M-H	0	LMFA01140002
303.2324	1.18E-02	2.5	Arachidonic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	M-H	2	HMDB0001043
277.2161	1.68E-02	2.5	alpha-Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	M-H	4	HMDB0001388
303.2344	1.45E-02	2.2	Androst-16-Ene	C ₁₉ H ₃₀	M+FA-H	5	HMDB0248399
189.0031	3.05E-03	2.0	Uric acid	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	M+Na-2H	1	HMDB0000289
203.0631	2.68E-02	1.3	Farnesyl pyrophosphate	C ₁₅ H ₂₆ O ₇ P ₂	M+H+Na	3	HMDB0000961

A partir da anotação realizada com os *features* foi possível realizar análises de vias bioquímicas e identificar alterações metabólicas de acordo com as análises comparativas. Entre DACTH vs. Controle Saudável as vias metabólicas que sofreram impactos foram as rotas metabólicas de aminoácidos, enquanto DACTH vs. Controle Hipopit os ácidos graxos e compostos sulfurados foram os principais componentes de alterações metabólicas (**Figuras 15B e 16B**). As análises de enriquecimento forneceram informações das classes de metabólitos anotadas, o que também mostrou diferenças entre os grupos analisados (**Figuras 15A e 16A**).

Figura 15: **A)** Principais classes de metabólitos anotados. **B)** Vias bioquímicas alteradas de acordo com os metabólitos anotados na análise entre o grupo DACTH vs. Controle Saudável.

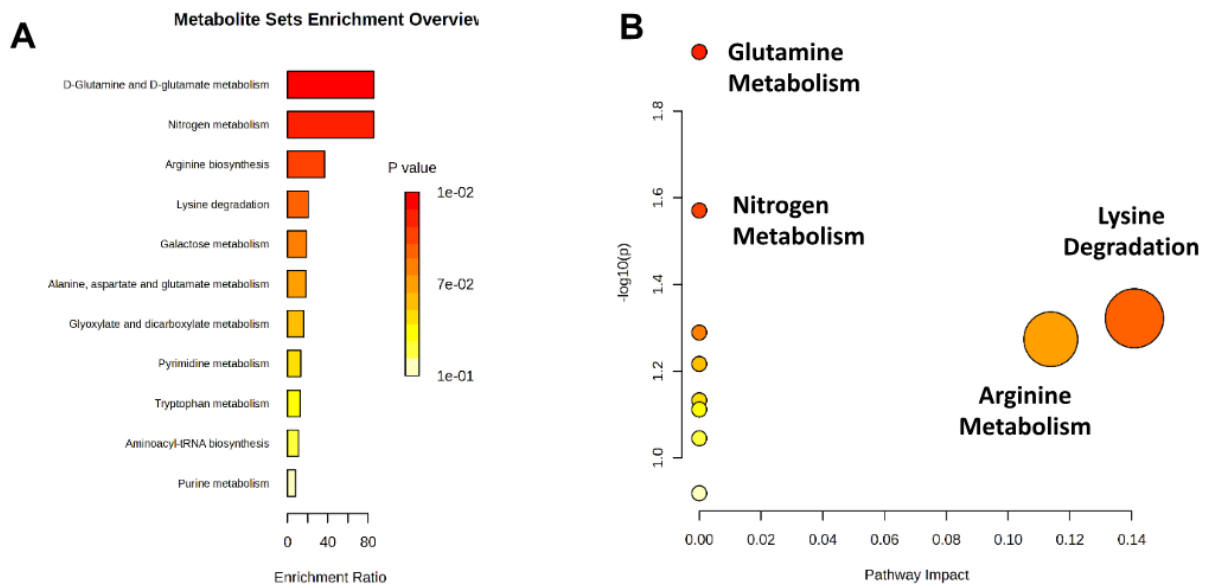
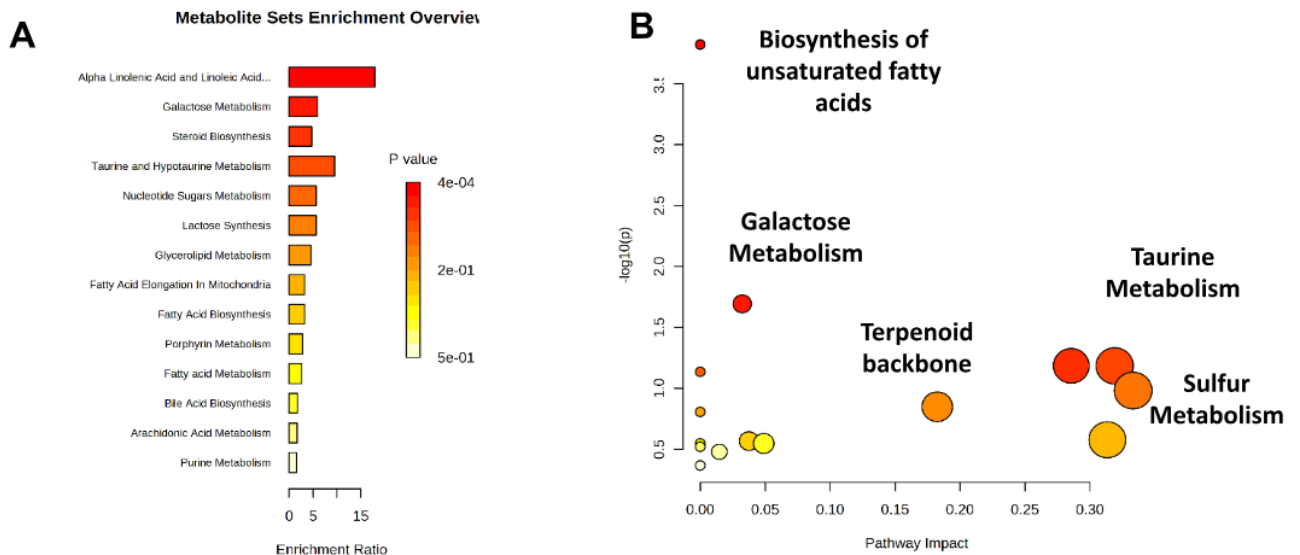


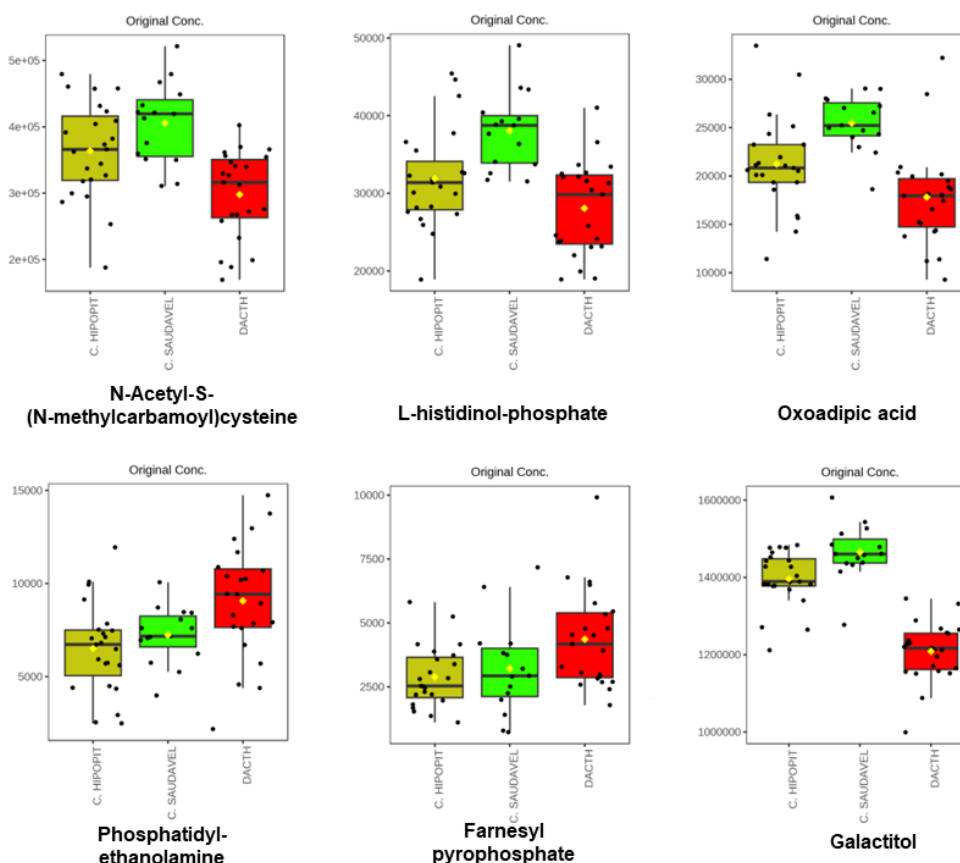
Figura 16: **A)** Principais classes de metabólitos anotados. **B)** Vias bioquímicas alteradas de acordo com os metabólitos anotados na análise entre o grupo DACTH vs. Controle Hipopit.



Além das análises multivariadas, até então descritas, foi realizado também um fluxo de análises univariadas para seleção de *features* de interesse. O teste ANOVA com critério (p -value FDR <0.05) foi aplicado na busca por *features* que apresentassem diferenças estatísticas significantes entre os grupos DACTH vs. Controle Hipopit, e DACTH vs. Controle Saudável, porém, sem diferenças estatísticas entre Controle Hipopit vs. Controle Saudável. Entre as 1.707 variáveis, 156 *features* foram significantes e apenas 6 se incluíam no critério predefinido (**Figura 17**). Portanto, acessar esses *features* permitiu selecionar e visualizar candidatos a biomarcadores que estivessem alterados somente no grupo DACTH para subsequente avaliação da capacidade preditiva, pois a alta variabilidade da fisiopatologia DACTH é um dos grandes gargalos e desafios do diagnóstico.

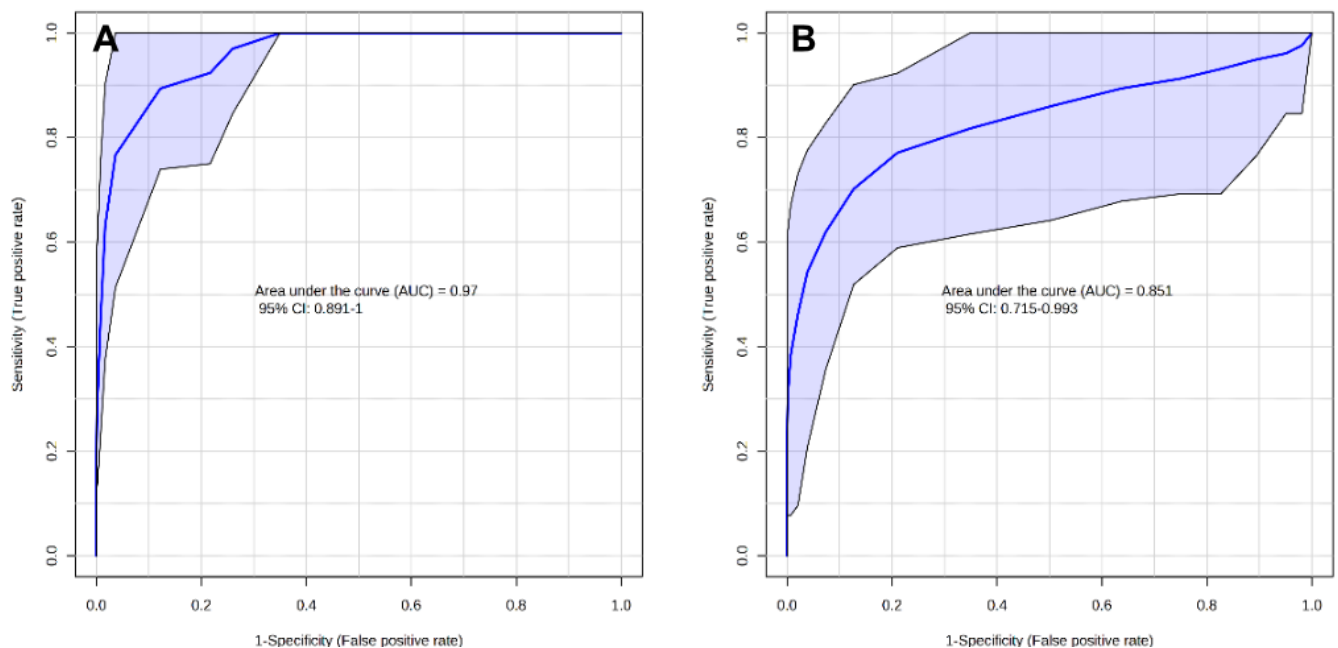
A partir dos 6 *features* selecionados, os mesmos foram anotados putativamente como N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine (mz : 219.0466), Histidinol-phosphate (mz : 220.0486), Oxoadipic acid (mz : 219.0489), Phosphatidylethanolamine (38:6) (mz : 248.8364), Farnesyl pyrophosphate (mz : 203.0631), Galactitol (mz : 205.0671).

Figura 17: *Features* significativos com potencial biomarcador para DACTH



Os 6 *features* foram testados, com auxílio da curva ROC, na mensuração da sua capacidade preditiva entre os grupos DACTH vs. Controle Hipopit e DACTH vs. Controle Saudável (**Figura 18**). Ambas as análises comparativas apresentaram bom desempenho como candidatos a biomarcadores para DACTH. É importante mencionar que os *features* foram selecionados a partir de método de análise univariada, contudo, mais análises com diferentes modelos devem ser aplicadas na busca de corroborar a capacidade preditiva desses *features*.

Figura 18. A) Curva ROC utilizando 6 *features* na distinção entre DACTH vs. Controle Hipopit. **B)** Curva ROC utilizando 6 *features* na distinção entre DACTH vs. Controle Saudável.



5 - DISCUSSÃO

A metabolômica é uma ciência que emergiu na era pós-genômica devido a necessidade de entender a influência na estrutura e função de genomas diante de diferentes estágios e condições do desenvolvimento(84). Todavia, são necessárias diferentes abordagens para que possam abarcar o máximo do metaboloma, sendo estes conjuntos de metabólitos os blocos de construções de importantes biopolímeros, como por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos (84). Os metabólitos são, na maioria das vezes, instáveis e propensos a sucessivas reações (85). Essa correlação com ambiente mostra a forte relação com fenótipo, por outro lado é um desafio capturar panoramas metabólicos semelhantes entre amostras que são influenciadas, constantemente, por fatores de armazenamento, tempo de aquisição de cada amostra entre outros (73,86).

A otimização da aquisição de dados em metabolômica vem sendo trabalhada por alguns grupos de pesquisa que, igual a este trabalho, também aplicaram a técnica de infusão direta em espectrometria de massas (DIMS) em análise metabolômicas (72,87–93). DIMS tem como proposta o uso de espectrômetros de massas de alta resolução sem o uso prévio da cromatografia, ou outro método de separação acoplado ao espectrômetro de massas, viabilizando a inserção das amostras diretamente a fonte de ionização do espectrômetro de massas, o que reduz significativamente não somente o uso de reagentes, mas o tempo de aquisição de dados entre as amostras (91).

Para demonstrar a reprodutibilidade da técnica de DIMS durante a aquisição de dados, neste trabalho foram utilizadas amostras de controle de qualidade analisadas entre as amostras dos pacientes e controles saudáveis. Na **figura 10** a análise não-supervisionada de PCA projetou a variabilidade dos dados adquiridos e, por ser uma técnica quimiométrica robusta, o agrupamento do grupo QC corroborou com a reprodutibilidade analítica da DIMS durante a aquisição de dados para a subsequente análise exploratória do metabolismo DACTH.

Devido o uso de numerosas variáveis presentes em dados metabolômicos, a aplicação de modelos estatísticos na visualização dos dados, se faz necessárias para

seleção de *features* candidatos a biomarcadores (86,94,95). A aplicação da análise univariada por ANOVA garantiu um panorama dos *features* com diferenças estatísticas, contudo, apenas 6 *features* passaram pelo critério de estarem alterados em relação ao grupo DACTH, porém sem diferenças entre os grupos controle saudável e controle hipopit. As análises preditivas usando 6 *features* na classificação de pacientes com DACTH foram satisfatórias (**Figura 18**), principalmente por conseguir distinguir pacientes em relação a outras alterações hipofisárias no qual é composto o grupo controle hipopit, por outro lado, análises univariadas não levam em consideração aleatoriedade das demais variáveis na construção do modelo preditivo, o que torna a análise metabolômica untargeted uma rica fonte de informações a serem exploradas na busca por biomarcadores.

Na busca por mais informações sobre o metabolismo DACTH foi empregado o modelo de análise discriminatória PLS-DA que projetou as principais variáveis (*features*) na distinção entre os grupos pré-definidos, mostrando que a análise multivariada identificou significância estatística levando em consideração o conjunto de dados metabolômico (**Figura 11-A e 12-A**). A validação-cruzada usada para calcular o coeficiente de predição (Q²) da PLS-DA foram satisfatórias no que tange a capacidade preditiva, todavia, é importante ressaltar que muitos *features* contribuíram para estas métricas satisfatórias, o que não é viável quando se deseja transpor biomarcadores para prática clínica, pois se deve considerar a praticidade de mensurar demasiados biomarcadores (76). Dessa maneira foram selecionadas somente as variáveis com escore acima de 1.2 obtidos através da PLS-DA na busca por menores conjuntos de *features* com capacidade classificatória satisfatória.

Análise multivariada baseada em curva ROC tornou-se útil na avaliação de potenciais biomarcadores por combinar diferentes quantidades de *features* a serem usados na classificação dos grupos, e com a auxílio da PSL-DA para concentrar e reduzir a grande quantidade de *features* presentes nos dados, foi possível avaliar o desempenho preditivo em ambas as análises comparativas (**Figura 13-A e 14-A**). Os resultados mostraram que quanto mais *features* adicionados ao modelo, melhor ficavam as métricas, entretanto, conjuntos de 15 a 20 conjuntos puderam mostrar capacidade preditiva satisfatória.

A anotação putativa é um processo vinculado à busca de correspondência dos íons/features significantes, mensurados na aquisição de dados, com os presentes em bancos de dados metabolômicos (96). A razão massa-carga dos features, na maioria das vezes, não apresentam correspondência, sendo a anotação um dos maiores gargalos e desafios da metabolômica *untargeted*, todavia, os features significantes no teste ANOVA também foram ranqueados pelo PLS-DA como variáveis de interesse. Para a anotação putativa utilizou-se apenas dos features com VIP score maior que 1.2, os features que apresentaram correspondência foram analisados para averiguar quais vias bioquímicas estão associadas e a susceptibilidade de alteração dessas vias com o perfil fenotípico dos pacientes.

A anotação do composto farnesil pirofosfato e o impacto na via bioquímica da síntese de terpenos corroboram o desempenho crucial da síntese de hormônios e a sua influência no fenótipo dos grupos (**Tabela 5, Figura 16**). No contexto da síntese hormonal, o farnesil pirofosfato atua como um precursor do isoprenóide que, por sua vez, desempenha um papel central na formação de hormônios (97). A conexão entre o farnesil pirofosfato e a DACTH está relacionada ao fato de que o ACTH estimula as glândulas adrenais a produzir corticosteroides, incluindo o próprio cortisol. Portanto, a interrupção na síntese desses hormônios, acaba afetando a capacidade do corpo de responder ao estresse, regular o metabolismo e manter a função imunológica. O farnesil pirofosfato desempenha um papel indireto, mas essencial, na síntese de corticosteroides e está interligado com a função do ACTH no sistema endócrino. Supõe-se que a falta de estímulo através da cortrosina na IAC pode, hipoteticamente, favorecer o acúmulo dos precursores na via terpenóides (97). Motivo pelo qual foi observado uma tendência de maior concentração de farnesil pirofosfato no grupo de pacientes DACTH e menores concentrações nos grupos Controle saudável e controle Hipopit. Tal impressão proporcionada pelos resultados da análise exploratória necessita ser validada por métodos direcionados, pois, abordagens globais não garantem a exata quantificação de metabólitos. Mesmo o feature farnesil pirofosfato sendo significativo na distinção entre ambas as análises comparativas, apenas a comparação entre DACTH vs. Controle Hipopit evidenciou um impacto significativo na via dos terpenóides.

Weger et al (2016) em seu estudo transcricional e metabólico em modelo de Zebrafish de IAC (rx3strong), destacou o impacto dos glicocorticóides na regulação

diurna da expressão gênica e no metabolismo (98). Os achados metabólicos mostraram que glutamina emergiu como um potencial metabólito-chave na proliferação celular, pois desempenha um papel importante em vias relacionadas à síntese de purinas e ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o que nos permite correlacionar com os nossos achados na análise comparativa entre DACTH vs. Controle saudável, pois houve anotação de metabólitos envolvidos na vias bioquímicas da glutamina e arginina, que também é um aminoácido proteínogênico, além do metabolismo do nitrogênio que é vinculado a síntese de estruturas de ácidos nucleicos (**Figura 15**). No mesmo estudo, comparando os peixes rx3strong com e sem reposição de corticosteroide, evidenciou-se que aminoácidos de cadeia ramificada e aminoácidos aromáticos permaneceram alterados mesmo sob reposição de glicocorticoides, o que coincide com as alterações também notadas na análise de enriquecimento e vias bioquímicas entre DACTH vs. Controle Saudável (**Figura 15**), isso sugere que outros reguladores além dos glicocorticoides podem influenciar esses metabólitos (98). As vias bioquímicas sugeridas pelo grupo de pesquisa podem ser consideradas vias glicocorticoide-independentes na deficiência de CRH e ACTH, ou seja, aparentemente são candidatos a biomarcadores da DACTH mesmo naqueles pacientes cujo uso de corticosteroides foi considerado adequado. Direcionar análises a esses conjuntos de *features* pode ser importante para compreensão da deficiência de DACTH em doentes críticos, tendo em vista que em pacientes sob cuidados intensivos, não é viável retardar o uso de medicações como a hidrocortisona.

Interessante trabalho, comparando modelos animais de zebrafish com insuficiência adrenal primária (fdx1b^{-/-}), com o modelo de IAC (rx3strong) e zebrafish selvagem, observou diferenças claras nas alterações metabólicas e de transcritos gênicos. Em comparação com modelo animal IAC, o zebrafish com IAP apresenta metabólômica com diferenças marcadas e que são relacionadas a vias de transcrição de ACTH (99). Isso indica que as mudanças podem ser específicas para insuficiência adrenal primária em oposição a condições associadas à insuficiência adrenal secundária. O estudo identificou a regulação pós-transcricional de genes envolvidos na via de síntese de purina. Dois genes-chave, paics e atic, foram identificados como regulados por mecanismos pós-transcricionais dependentes de glicocorticoides. Este achado sugere uma interconexão entre a sinalização de GCs, o metabolismo da

glutamina e a regulação por microRNAs, embora os achados tenham ficado mais evidentes no modelo animal com IAP do que no modelo com IAC(99).

Fazendo um comparativo dos dois modelos animais com pacientes humanos IAP com e sem reposição de glicocorticoides, verificou-se que enquanto os pacientes humanos e o modelo animal de IAP compartilhavam alterações de seis aminoácidos em análise quantitativa (*targeted*), apenas dois dos seis aminoácidos eram compartilhados no modelo IAC. Observou-se baixas concentrações de alanina, arginina, leucina, metionina e fenilalanina após o tratamento com corticoide em pacientes e no modelo de zebrafish (*fdx1b^{-/-}*). Os pacientes portadores de hiperplasia adrenal tinham em comum com o modelo zebrafish IAC alterações nas concentrações de metionina e histidina(99). Tal achado sugere que as vias da metionina e histidina estejam mais fortemente relacionadas à deficiência de cortisol em si. No geral, o estudo ofereceu uma compreensão abrangente das consequências metabólicas da deficiência de glicocorticoides e sobre a patogênese da insuficiência adrenal primária e secundária. Podemos correlacionar os achados dos autores com a anotação dos *features* L-histidinol-phosphate e Methionine sulfoxide pertencentes ao metabolismo da histidina e metionina respectivamente. Provavelmente as vias da metionina e histidina não apareceram em destaque nas análises de pathways devido ao fato de no nosso trabalho avaliarmos o plasma de pacientes com reposição de corticosteroides enquanto o trabalho de Weger et al comparou o modelo animal sem e com reposição (99). Todavia, mesmo estando os pacientes do nosso trabalho aderentes e estáveis do ponto de vista de reposição esteroidal, a identificação de diferença nesses dois *features* com significativa diferença entres o grupo DACTH vs. controle saudável, mais as alterações no metabolismo da taurina e do metabolismo do enxofre no grupo DACTH vs. Controle Hipopit, pode ser correlacionado ao fato da reposição hormonal não ser fisiológica na prática médica, seja por não observar o ritmo de produção circadiana, seja pela dificuldade de obtermos um marcador de dose de reposição individualizada de glicocorticoide. Contudo, em ambos as análises comparativas os compostos sulfurados, ou seja, metabólitos contendo molécula de enxofre, mostraram ser importantes fontes da compreensão da DACTH, pois moléculas contendo enxofre desempenham papéis importantíssimos em diversos metabolismos, como no antioxidante e ativação de proteínas (100,101).

Nos resultados apresentados pode-se observar aumento de compostos aromáticos e triptofano principalmente na comparação com o controle saudável (**Figura 15A**). A via de degradação do triptofano à quinoneurina é ativada pela indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO). Estudando a metabolômica de pacientes com Hiperplasia adrenal, Nguyen et al demonstraram forte associação do excesso de cortosina desses pacientes com a atividade da IDO (102). Assim, pode-se sugerir que a falta de ACTH na IAC possa estar relacionada com subatividade da IDO e aumento de triptofano.

Em um recente estudo foram a avaliação da função da glândula suprarrenal e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal foram relacionados a partir do teste de metirapona de curta duração (103). Os autores consideraram resposta normal ao teste quando os níveis de 11-deoxicortisol ficaram ≥ 70 $\mu\text{g/L}$, estando os níveis de cortisol abaixo do limite de referência para garantir adequada ação da metirapona. Os resultados do estudo indicam um aumento significativo nos níveis de ácido biliar GCDC durante o teste de metirapona, com níveis mais elevados em pacientes com resposta fisiológica. Isso sugere uma possível relação entre a função hepática e o eixo HPA, destacando a influência no eixo "hepato-HPA". Nas análises metabolômicas os níveis do Ácido Biliar Glicocondodesoxicólico aumentaram significativamente, sendo ainda mais elevados nos pacientes com resposta fisiológica ao teste. Isso indica possível conexão entre a função hepática e a resposta do eixo HPA, assumindo que há um eixo "hepato-HPA" (103). Também foram notadas alterações nos níveis de outros aminoácidos, incluindo a asparagina, lisina, fenilalanina, alanina, histidina, arginina, leucina e metionina. Alterações de aminoácidos contribui na disfunção metabólica e na síntese de biomoléculas no que tange a insuficiência adrenal, corroborando os dados metabolômicos na construção do perfil metabólico da DACTH. O estudo foi baseado em um registro observacional prospectivo com tamanho de amostra limitado, sem presença de grupo de controle saudável. Não foram realizadas comparações com outros procedimentos de teste, como o teste de estímulo com hipoglicemia ou ACTH. Os resultados focaram na importância da relação entre o eixo HPA e a função hepática, abrindo caminho para pesquisas futuras. Também foram discutidas as alterações em vias metabólicas entre pacientes com resposta alterada versus resposta fisiológica no teste da metirapona, na qual foram concordantes com vias alteradas em achados neste trabalho:

metabolismo de glutamato e glutamina, degradação de lisina, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de galactose, biossíntese de ácidos graxos insaturados, metabolismo da arginina (**Figuras 15B e 16B**).

6 - CONCLUSÃO

O presente estudo tratou de aplicar a metabolômica *untargeted* na busca por candidatos a biomarcadores de IAC. A DIMS apresentou robustez na aquisição de dados mesmo com as limitações dessa técnica inovadora. A análise multivariada baseada em curva ROC sugeriu que conjuntos de 15 a 20 metabólitos puderam prever a DACTH com métricas satisfatórias.

Além disso, a anotação de metabólitos permitiu conexões entre vias bioquímica, função hormonal e o metabolismo, oferecendo insights sobre os mecanismos subjacentes à DACTH. Também, o fluxo de análise de dados desenvolvidos permitiu a anotação de metabólitos com potencial biomarcador para DACTH, a destacar os 6 significativos por comparações univariadas: N-Acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, Histidinol-phosphate, Oxoadipic acid, Phosphatidylethanolamine, Farnesyl pyrophosphate, Galactitol.

A metabolômica é uma abordagem com potencial na busca por biomarcadores, pois consegue criar panoramas individualizados em doenças com alta variabilidade, como a IAC. A complexidade e desafios da metabolômica *untargeted*, principalmente no que tange a identificação dos *features*, são consequências do fato de ser uma técnica emergente. Este trabalho realizou análises exploratórias, porém futuras validações dos *features* encontrados através das análises direcionadas (*targeted*) serão necessárias para a exata quantificação e confirmação desses metabólitos.

Mesmo em um trabalho transversal com pacientes em reposição de glicocorticoides, pôde-se notar tanto ativação de vias relacionadas a reposição de glicocorticoides: vias de aminoácidos glicogênicos (alanina, aspartato glutamato e glutamina) e proteinogênicos (arginina e lisina) e vias de metabolismo de bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas); quanto vias que estão relacionadas a transcrição de ACTH (via dos terpenóides e esteroidogênese). Além disso, foram observadas vias que permanecem alteradas na DACTH mesmo em reposição de glicocorticoides (aminoácidos aromáticos). As correlações dessas alterações de vias metabólicas com os trabalhos citados na discussão fortalecem os achados deste estudo e sua contribuição para o conhecimento da IAC.

Definir um único biomarcador que reflita o estado de DACTH é improvável e dosar 20 metabólitos na prática clínica ainda é inviável. Os resultados demonstraram que a acurácia melhorava de acordo com a adição de *features* aos modelos de predição, contudo, um dos objetivos da análise exploratória é encontrar padrões de alterações a serem estudadas e comprovadas posteriormente, o que foi possível atingir nesta pesquisa. Prospecta-se que com o advento da inteligência artificial na busca por padrões de alterações e uso de modelos não-lineares, será possível identificar e integrar dados de metabolômicas com outras ciências ômicas, ou mesmo dados clínicos favorecendo diagnósticos de doenças complexas como o hipopituitarismo e a IAC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese deteve-se em estudar alternativas diagnósticas frente aos desafios do reconhecimento da IAC na prática clínica. Os dados de metabolômica *untargeted* permitiriam elucidar novos possíveis candidatos a biomarcadores, todavia estudos de metabolômica *targeted* são essenciais para comprovação desses achados. A avaliação da razão de SDEA como marcador de DACTH demonstrou-se acurada para predição de IAC, portanto incorporar o uso dessa razão no fluxo diagnóstico pode evitar investigação invasiva em muitos casos. Assim sugere-se o uso da Razão de SDHEA com ponto de corte de 0,79 para identificação de IAC (especificidade de 94,7% e sensibilidade de 83,3%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Melmed S. The Pituitary. 4th editio. Melmed S, organizador. Elsevier; 2017. 47–83; 330–396 p.
2. Melmed, Shlomo ; Polonsky, Kenneth S.; Larsen, P. Reed ; Kronenberg HM. Williams textbook of endocrinology. 13th editi. Melmed, Shlomo ; Polonsky, Kenneth S.; Larsen, P. Reed ; Kronenberg HM, organizador. Elsevier; 2016. 129-139;178-181;199-204; 214–231 p.
3. Hamrahian AH, Flaseriu M. Evaluation and Management of Adrenal Insufficiency in Critically Ill Patients: Disease State Review. *Endocr Pract.* 2017;23(6):716–25.
4. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* outubro de 2002;53(4):865–71.
5. Burman P, Mattsson AF, Johannsson G, Höybye C, Holmer H, Dahlqvist P, et al. Deaths among adult patients with hypopituitarism: hypocortisolism during acute stress, and de novo malignant brain tumors contribute to an increased mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* abril de 2013;98(4):1466–75.
6. Hahner S, Spinnler C, Fassnacht M, Burger-Stritt S, Lang K, Milovanovic D, et al. High incidence of adrenal crisis in educated patients with chronic adrenal insufficiency: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* fevereiro de 2015;100(2):407–16.
7. Flaseriu M, Hashim IA, Karavitaki N, Melmed S, Murad MH, Salvatori R, et al. Hormonal Replacement in Hypopituitarism in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 1º de novembro de 2016;101(11):3888–921.
8. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, et al. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. *Lancet.* fevereiro de 2001;357(9254):425–31.
9. Bitencourt MR, Batista RL, Biscotto I, Carvalho LR. Central adrenal insufficiency: who, when, and how? From the evidence to the controversies – an exploratory review. Vol. 66, *Archives of Endocrinology and Metabolism.* Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2022. p. 541–50.
10. Gibb FW, Stewart A, Walker BR, Strachan MWJ. Adrenal insufficiency in patients on long-term opioid analgesia. *Clin Endocrinol (Oxf).* dezembro de 2016;85(6):831–5.
11. Gadelha MR, Karavitaki N, Fudin J, Bettinger JJ, Raff H, Ben-Shlomo A. Opioids and pituitary function: expert opinion. *Pituitary.* 23 de fevereiro de 2022;25(1):52–63.
12. Greenspan, FS ;Strewler G. *Endocrinologia Básica e clínica.* 5th ed. Guanabara Koogan; 2000. 235–253 p.
13. Husebye ES, Pearce SH, Krone NP, Kämpe O. Adrenal insufficiency. *Lancet.* fevereiro de 2021;397(10274):613–29.
14. Lousada LM, Mendonca BB, Bachega TASS. Adrenal crisis and mortality rate in adrenal insufficiency and congenital adrenal hyperplasia. *Arch Endocrinol Metab.* julho de 2021;
15. Patti G, Guzzeti C, Di Iorgi N, Maria Allegri AE, Napoli F, Loche S, et al. Central adrenal insufficiency in children and adolescents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab [Internet].* 2018;32(4):425–44. Disponível em:

- <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L2000700455&from=export>
16. Vilar L. *Endocrinologia Clínica*. 6º ed. Vilar L, organizador. Guanabara Koogan; 2016. 650–675 p.
 17. Hasenmajer V, Bonaventura I, Minnetti M, Sada V, Sbardella E, Isidori AM. Non-Canonical Effects of ACTH: Insights Into Adrenal Insufficiency. Vol. 12, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
 18. Claes S. Corticotropin-releasing hormone (CRH) in psychiatry: from stress to psychopathology. *Ann Med* [Internet]. 8 de janeiro de 2004;36(1):50–61. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890310017044>
 19. Keck ME, Holsboer F, Müller MB. Mouse mutants for the study of corticotropin-releasing hormone receptor function: development of novel treatment strategies for mood disorders. *Ann N Y Acad Sci*. junho de 2004;1018:445–57.
 20. Moreira AC, Antonini SR, De Castro M. A sense of time of the glucocorticoid circadian clock: from the ontogeny to the diagnosis of Cushing’s syndrome. Vol. 179, *European Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2018.
 21. Frara S, Chiloiro S, Porcelli T, Giampietro A, Mazziotti G, Marinis L De, et al. Bone safety of dual-release hydrocortisone in patients with hypopituitarism. *Endocrine* [Internet]. 2018;18–21. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-017-1512-1>
 22. Johannsson G, Nilsson AG, Bergthorsdottir R, Burman P, Dahlqvist P, Ekman B, et al. Improved cortisol exposure-time profile and outcome in patients with adrenal insufficiency: a prospective randomized trial of a novel hydrocortisone dual-release formulation. *J Clin Endocrinol Metab*. fevereiro de 2012;97(2):473–81.
 23. Abe SY, Dos Santos KS, Barbosa BFB, Biondo CMP, Takito D, Hayashi SK, et al. Metabolic syndrome and its components in adult hypopituitary patients. *Pituitary*. agosto de 2020;23(4):409–16.
 24. O’Reilly MW, Reulen RC, Gupta S, Thompson CA, Dineen R, Goulden EL, et al. ACTH and gonadotropin deficiencies predict mortality in patients treated for nonfunctioning pituitary adenoma: long-term follow-up of 519 patients in two large European centres. *Clin Endocrinol (Oxf)*. novembro de 2016;85(5):748–56.
 25. Sherlock M, Reulen RC, Alonso AA, Ayuk J, Clayton RN, Sheppard MC, et al. ACTH deficiency, higher doses of hydrocortisone replacement, and radiotherapy are independent predictors of mortality in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. novembro de 2009;94(11):4216–23.
 26. Javorsky BR, Raff H, Carroll TB, Algeciras-Schimmich A, Singh RJ, Colón-Franco JM, et al. New Cutoffs for the Biochemical Diagnosis of Adrenal Insufficiency after ACTH Stimulation using Specific Cortisol Assays. *J Endocr Soc*. abril de 2021;5(4):bvab022.
 27. Lefebvre H. Corticotroph deficiency. *Ann Endocrinol (Paris)*. abril de 2012;73(2):135–7.
 28. Agha A, Liew A, Finucane F, Baker L, O’Kelly P, Tormey W, et al. Conventional glucocorticoid replacement overtreats adult hypopituitary patients with partial ACTH deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. junho de 2004;60(6):688–93.

29. Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona C V., Abdu TAM, Ambrosi B, Atkinson AB, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary-adrenal insufficiency: A metaanalysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008;93(11):4245–53.
30. Perogamvros I, Ray DW, Trainer PJ. Regulation of cortisol bioavailability--effects on hormone measurement and action. *Nat Rev Endocrinol*. dezembro de 2012;8(12):717–27.
31. Verbeeten KC, Ahmet AH. The role of corticosteroid-binding globulin in the evaluation of adrenal insufficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. janeiro de 2018;31(2):107–15.
32. rosa M, Paragliola SM corSello. Secondary adrenal insufficiency : from the physiopathology to the possible role of modified-release hydrocortisone treatment. 2018;43(2):183–97.
33. Meyer EJ, Nenke MA, Rankin W, Lewis JG, Torpy DJ. Corticosteroid-Binding Globulin: A Review of Basic and Clinical Advances. *Horm Metab Res*. junho de 2016;48(6):359–71.
34. Simard M, Hill LA, Lewis JG, Hammond GL. Naturally occurring mutations of human corticosteroid-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab*. janeiro de 2015;100(1):E129–39.
35. Kazlauskaitė R, Maghnie M. Pitfalls in the diagnosis of central adrenal insufficiency in children. *Endocr Dev*. 2010;17:96–107.
36. Ach T, Yosra H, Jihen M, Abdelkarim Asma B, Maha K, Molka C, et al. Cortisol cut-points for the glucagon stimulation test in the evaluation of hypothalamic pituitary adrenal axis. *Endocr J*. setembro de 2018;65(9):935–42.
37. Andler W, Bernasconi S, Giovanelli G, Biro G. [Insulin- and propanol-glucagon stimulation tests. Comparison of both methods]. *Monatsschr Kinderheilkd*. maio de 1975;123(5):338–9.
38. Littlely MD, Gibson S, White A, Shalet SM. Comparison of the ACTH and cortisol responses to provocative testing with glucagon and insulin hypoglycaemia in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. novembro de 1989;31(5):527–33.
39. Garmes HM, Boguszewski CL, Miranda PAC, Martins MRA, da Silva SRC, Abucham JZF, et al. Management of hypopituitarism: a perspective from the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arch Endocrinol Metab*. fevereiro de 2021;
40. Kalaria T, Agarwal M, Kaur S, Hughes L, Sharrod-Cole H, Chaudhari R, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression - The value of salivary cortisol and cortisone in assessing hypothalamic-pituitary-adrenal recovery. *Ann Clin Biochem*. novembro de 2020;57(6):456–60.
41. de Vries F, Lobatto DJ, Bakker LEH, van Furth WR, Biermasz NR, Pereira AM. Early postoperative HPA-axis testing after pituitary tumor surgery: reliability and safety of basal cortisol and CRH test. *Endocrine [Internet]*. 2020;67(1):161–71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-019-02094-6>
42. Nakaguma M, Correa FA, Santana LS, Benedetti AFF, Perez R V, Huayllas MKP, et al. Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: novel pathogenic variants in *GLI2*, *OTX2* and *GHRHR*. *Endocr Connect*. 1º de maio de 2019;8(5):590–5.
43. Vallette-Kasic S, Brue T, Pulichino AM, Gueydan M, Barlier A, David M, et al. Congenital isolated adrenocorticotropin deficiency: an underestimated cause of neonatal death, explained by *TPIT* gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. março de 2005;90(3):1323–31.

44. Crowley RK, Argese N, Tomlinson JW, Stewart PM. Central Hypoadrenalism. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. novembro de 2014;99(11):4027–36. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2014-2476>
45. Mazziotti G, Formenti AM, Frara S, Roca E, Mortini P, Berruti A. Risk of overtreatment in patients with adrenal insufficiency : current and emerging aspects. :231–48.
46. Sayyed Kassem L, El Sibai K, Chaiban J, Abdelmannan D, Arafah BM. Measurements of serum DHEA and DHEA sulphate levels improve the accuracy of the low-dose cosyntropin test in the diagnosis of central adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. outubro de 2012;97(10):3655–62.
47. Al-Aridi R, Abdelmannan D, Arafah BM. Biochemical diagnosis of adrenal insufficiency: the added value of dehydroepiandrosterone sulfate measurements. *Endocr Pract*. 2011;17(2):261–70.
48. Vaiani E, Maceiras M, Chaler E, Lazzati JM, Chiavero M, Novelle C, et al. Central adrenal insufficiency could not be confirmed by measurement of basal serum DHEAS levels in pubertal children. *Horm Res Paediatr* [Internet]. 2014;82(5):332–7. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L600433462&from=export>
49. Topor LS, Asai M, Dunn J, Majzoub JA. Cortisol stimulates secretion of dehydroepiandrosterone in human adrenocortical cells through inhibition of 3betaHSD2. *J Clin Endocrinol Metab*. janeiro de 2011;96(1):E31-9.
50. Charoensri S, Chailurkit L, Muntham D, Bunnag P. Serum dehydroepiandrosterone sulfate in assessing the integrity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Transl Endocrinol*. março de 2017;7:42–6.
51. Fischli S, Jenni S, Allemann S, Zwahlen M, Diem P, Christ ER, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab*. fevereiro de 2008;93(2):539–42.
52. Dušková M, Kolátorová Sosvorová L, Hill M, Šimůnková K, Jandíková H, Pospíšilová H, et al. The Response of C19 Δ 5-steroids to ACTH Stimulation and Hypoglycemia in Insulin Tolerance Test for Adrenal Insufficiency. *Prague Med Rep*. 2016;117(2–3):98–107.
53. Denny MC, Annamalai AK, Prankerd-smith O, Freeman N, Vengopal K, Graggaber J, et al. Low DHEAS: A Sensitive and Specific Test for the Detection of Subclinical Hypercortisolism in Adrenal Incidentalomas. 2017;102(July 2016):786–92.
54. Kachroo P, Stewart ID, Kelly RS, Stav M, Mendez K, Dahlin A, et al. Metabolomic profiling reveals extensive adrenal suppression due to inhaled corticosteroid therapy in asthma. *Nat Med*. abril de 2022;28(4):814–22.
55. Zhang XW, Li QH, Xu Z Di, Dou JJ. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review. *RSC Adv*. 2020;10(6):3092–104.
56. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 22 de abril de 2012;13(4):263–9.

57. Pinu FR, Goldansaz SA, Jaine J. Translational metabolomics: Current challenges and future opportunities. *Metabolites* [Internet]. 2019 [citado 27 de fevereiro de 2023];9(6). Disponível em: www.mdpi.com/journal/metabolites
58. Fiehn O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comp Funct Genomics*. 2001;2(3):155–68.
59. Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*. novembro de 2000;18(11):1157–61.
60. Baker M. Metabolomics: From small molecules to big ideas. *Nat Methods*. fevereiro de 2011;8(2):117–21.
61. Melamud E, Vastag L, Rabinowitz JD. Metabolomic Analysis and Visualization Engine for LC–MS Data. *Anal Chem*. 1º de dezembro de 2010;82(23):9818–26.
62. Rabinowitz JD, Purdy JG, Vastag L, Shenk T, Koyuncu E. Metabolomics in Drug Target Discovery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1º de janeiro de 2011;76(0):235–46.
63. San-Martin BS De, Ferreira VG, Bitencourt MR, Pereira PCG, Carrilho E, Assunção NA de, et al. Metabolomics as a potential tool for the diagnosis of growth hormone deficiency (GHD): a review. *Arch Endocrinol Metab*. 21 de outubro de 2020;
64. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*. 30 de julho de 2011;6(7):1060–83.
65. Canuto GAB, Da Costa JL, Da Cruz PLR, De Souza ARL, Faccio AT, Klassen A, et al. Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. *Quim Nova*. 2018;41(1):75–91.
66. Griffin JL, Atherton H, Shockcor J, Atzori L. Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(11):630–43.
67. Castelli FA, Rosati G, Moguet C, Fuentes C, Marrugo-Ramírez J, Lefebvre T, et al. Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests [Internet]. Vol. 414, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022 [citado 27 de fevereiro de 2023]. p. 759–89. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03586-z>
68. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite Measurement: Pitfalls to Avoid and Practices to Follow. *Annu Rev Biochem*. 20 de junho de 2017;86(1):277–304.
69. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-Mcintyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* [Internet]. 30 de junho de 2011 [citado 16 de março de 2021];6(7):1060–83. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2011.335>
70. Abd Rahman S, Schirra HJ, Lichanska AM, Huynh T, Leong GM, De Leonibus C, et al. XCMS-MRM and METLIN-MRM: a cloud library and public resource for targeted analysis of small molecules. *Med Intensiva* [Internet]. 1º de outubro de 2018 [citado 5 de fevereiro de 2020];42(7):444–53. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150755>

71. Coene KLM, Kluijtmans LAJ, van der Heeft E, Engelke UFH, de Boer S, Hoegen B, et al. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J Inher Metab Dis*. 1º de maio de 2018;41(3):337–53.
72. González-Domínguez R, Sayago A, Fernández-Recamales Á. Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases. <http://dx.doi.org/104155/bio-2016-0202> [Internet]. 6 de dezembro de 2016 [citado 23 de março de 2022];9(1):131–48. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio-2016-0202>
73. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 2016;27(12):1897–905. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
74. Worley B, Powers R. PCA as a predictor of OPLS-DA model reliability. *Curr Metabolomics*. 2016;4(2):97–103.
75. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics [Internet]. Vol. 6, *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society; 2007 [citado 25 de janeiro de 2023]. p. 469–79. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr060594q>
76. Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, Vis DJ, Smilde AK, Velzen EJJ, et al. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*. 2008;4(1):81–9.
77. Nordström A, Want E, Northen T, Lehtiö J, Siuzdak G. Multiple Ionization Mass Spectrometry Strategy Used To Reveal the Complexity of Metabolomics. *Anal Chem*. 1º de janeiro de 2008;80(2):421–9.
78. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial. *Metabolomics*. 2013;9(2):280–99.
79. Fahy E, Subramaniam S. RefMet: a reference nomenclature for metabolomics [Internet]. Vol. 17, *Nature Methods*. Nature Research; 2020 [citado 26 de fevereiro de 2021]. p. 1173–4. Disponível em: www.nature.com/naturemethods
80. Ciborowski M, Javier Rupérez F, Martínez-Alcázar MP, Angulo S, Radziwon P, Olszanski R, et al. Metabolomic Approach with LC–MS Reveals Significant Effect of Pressure on Diver’s Plasma. *J Proteome Res*. 6 de agosto de 2010;9(8):4131–7.
81. Dudzik D, Zorawski M, Skotnicki M, Zarzycki W, Kozłowska G, Bibik-Malinowska K, et al. Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus. *J Proteomics*. maio de 2014;103:57–71.
82. Karpievitch Y V, Nikolic SB, Wilson R, Sharman JE, Edwards LM. Metabolomics data normalization with EigenMS. *PLoS One*. 2014;9(12):e116221.
83. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. janeiro de 2007;8(1):118–27.
84. Bravo-Merodio L, Williams JA, Gkoutos G V., Acharjee A. -Omics biomarker identification pipeline for translational medicine. *J Transl Med* [Internet]. 2019;17(1):1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1912-5>

85. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. NIH Public Access; 2016 [citado 26 de março de 2022]. p. 451–9. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5729912/](http://dx.doi.org/10.1038/nrmc.2016.17)
86. Fuhrer T, Zamboni N. High-throughput discovery metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2015;31:73–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.08.006>
87. Southam AD, Weber RJM, Engel J, Jones MR, Viant MR. A complete workflow for high-resolution spectral-stitching nano-electrospray direct-infusion mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics. *Nat Protoc*. 2017;12(2):255–73.
88. González-Domínguez R. Metabolomic fingerprinting of serum samples by direct infusion mass spectrometry. 2016;C001.
89. de Sain-van der Velden MGM, van der Ham M, Gerrits J, Prinsen HCMT, Willemsen M, Pras-Raves ML, et al. Quantification of metabolites in dried blood spots by direct infusion high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2017;979:45–50. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.038>
90. Haijes HA, Willemsen M, van der Ham M, Gerrits J, Pras-Raves ML, Prinsen HCMT, et al. Direct infusion based metabolomics identifies metabolic disease in patients' dried blood spots and plasma. *Metabolites*. 2019;9(1).
91. Kirwan JA, Weber RJM, Broadhurst DI, Viant MR. Direct infusion mass spectrometry metabolomics dataset: A benchmark for data processing and quality control. *Sci Data* [Internet]. 10 de junho de 2014 [citado 23 de março de 2022];1(1):1–13. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/sdata201412>
92. Lída M, Cífková E, Khalikova M, Ovčačiková M, Holčapek M. Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. *J Chromatogr A*. 2017;1525:96–108.
93. Sarvin B, Lagziel S, Sarvin N, Mukha D, Kumar P, Aizenshtein E, et al. Fast and sensitive flow-injection mass spectrometry metabolomics by analyzing sample-specific ion distributions. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17026-6>
94. Zampieri M, Sekar K, Zamboni N, Sauer U. Frontiers of high-throughput metabolomics. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2017;36:15–23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.006>
95. Malinowska JM, Palosaari T, Sund J, Carpi D, Bouhifd M, Weber RJM, et al. Integrating in vitro metabolomics with a 96-well high-throughput screening platform. *Metabolomics* [Internet]. 1º de janeiro de 2022 [citado 23 de março de 2022];18(1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35000038/>
96. Gil-De-La-Fuente A, Godzien J, Saugar S, Garcia-Carmona R, Badran H, Wishart DS, et al. CEU Mass Mediator 3.0: A Metabolite Annotation Tool. *J Proteome Res*. 2019;18(2):797–802.
97. Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. Vol. 360, *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc.; 2017. p. 55–60.

98. Weger BD, Weger M, Görling B, Schink A, Gobet C, Keime C, et al. Extensive Regulation of Diurnal Transcription and Metabolism by Glucocorticoids. *PLoS Genet.* dezembro de 2016;12(12):e1006512.
99. Weger M, Weger BD, Görling B, Poschet G, Yildiz M, Hell R, et al. Glucocorticoid deficiency causes transcriptional and post-transcriptional reprogramming of glutamine metabolism. *EBioMedicine.* outubro de 2018;36:376–89.
100. Günal S, Hardman R, Kopriva S, Mueller JW. Sulfation pathways from red to green. *Journal of Biological Chemistry.* 2019;294(33):12293–312.
101. Courtney-Martin G, Pencharz PB. Sulfur Amino Acids Metabolism From Protein Synthesis to Glutathione [Internet]. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins.* Elsevier Inc.; 2016. 265–286 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802167-5.00019-0>
102. Nguyen LS, Prifti E, Ichou F, Leban M, Funck-Brentano C, Touraine P, et al. Effect of congenital adrenal hyperplasia treated by glucocorticoids on plasma metabolome: a machine-learning-based analysis. *Sci Rep.* 1º de junho de 2020;10(1):8859.
103. Seoudy AK, Schlicht K, Kulle A, Demetrowitsch T, Beckmann A, Geisler C, et al. A Prospective Analysis of the Metyrapone Short Test Using Targeted and Untargeted Metabolomics. *Neuroendocrinology.* 2023;113(7):770–84.

APÊNDICE I

Anotação putativa de *features* filtrados no processamento de dados .

DACTH vs Controle Hipopit							
M/Z FEATURE	FDR	VI P	NAME	FORMULA	ADUTO	PP M	ID
Neg_A_187.007 61	8,04E -08	6,2	unknown				
Neg_A_281.248 13	1,78E -05	6,1	2-hydroxystearate	C18H36O3	M-H-H2O	3	LMFA0105048 5
Neg_B_187.0064 2	1,14E -05	5,4	UDP-alpha-D-galactose	C15H22N2O17P 2	M-3H	1	HMDB030452 7
Neg_B_281.2484 7	8,04E -08	5,4	Octadec-5-enoic acid	C18H34O2	M-H	0	HMDB024683 3
Neg_B_187.0079 2	3,30E -04	4,8	unknown				
Pos_A_205.0670 9	4,64E -06	4,6	Galactitol	C7H12N2O4S	M-H	2	HMDB004194 2
Neg_A_279.233 07	1,67E -03	4,5	Malvalic acid	C18H32O2	M-H	0	LMFA0114000 2
Neg_A_281.249 07	1,44E -02	4,1	Oleic acid	C18H34O2	M-H	2	LMFA0103000 2
Neg_A_187.006 12	2,15E -02	3,7	unknown				
Neg_B_282.2509	5,19E -03	3,5	unknown				
Neg_A_187.008 6	3,79E -02	3,4	Benzyl sulfate	C7H8O4S	M-H	3	HMDB003478 2
Neg_B_187.0054 2	2,16E -02	3,1	2-Methyl-6-thiopurine	C6H6N4S	M+Na-2H	3	HMDB024522 4
Neg_A_280.236 59	1,86E -03	3,0	unknown				
Neg_B_280.2359 5	1,86E -03	3,0	unknown				
Neg_B_303.2309 5	2,27E -04	2,8	unknown				
Neg_B_282.2494 2	6,92E -04	2,7	unknown				
Neg_A_279.236 6	2,76E -02	2,6	unknown				
Neg_B_303.2323 8	1,18E -02	2,5	Arachidonic acid	C20H32O2	M-H	2	HMDB000104 3
Neg_A_281.252 62	1,21E -03	2,5	unknown				
Neg_B_303.2333 8	9,89E -03	2,5	15(S)- Hydroxyeicosatrienoic acid	C20H34O3	M-H2O-H	3	HMDB000504 5
Neg_A_277.216 1	1,68E -02	2,5	alpha-Linolenic acid	C18H30O2	M-H	4	HMDB000138 8
Neg_B_188.0109 3	9,77E -04	2,4	4-Aminophenyl phosphate	C6H8NO4P	M-H	5	HMDB024996 1
Neg_A_187.000 6	5,08E -07	2,4	2-Deoxypentonic acid	C5H10O5	M+K-2H	4	HMDB005975 3
Neg_A_188.010 6	1,97E -03	2,3	Taurocyamine	C3H9N3O3S	M+Na-2H	3	HMDB000358 4

Neg_B_303.2299 5	7,89E -04	2,3	unknown					
Neg_A_187.012 62	1,85E -07	2,2	unknown					
Neg_B_303.2343 8	1,45E -02	2,2	Androst-16-ene	C19H30	M+FA-H	5	HMDB024839 9	
Neg_B_187.0134 2	3,97E -06	2,2	unknown					
Neg_B_283.2553 9	2,55E -05	2,1	unknown					
Neg_A_187.010 6	1,86E -03	2,0	Dimethyl sulfone	C2H6O2S	2M-H	1	HMDB000498 3	
Neg_A_187.009 61	5,19E -03	2,0	Phenylthiourea	C7H8N2S	M+Cl	3	HMDB025644 8	
Neg_A_279.241 66	1,76E -04	2,0	unknown					
Neg_A_186.998 11	1,62E -06	2,0	S-Phenyl thioacetate	C8H8OS	M+Cl	3	HMDB025742 4	
Neg_B_187.0014 3	2,27E -04	2,0	unknown					
Neg_A_189.003 11	3,05E -03	2,0	Uric acid	C5H4N4O3	M+Na-2H	1	HMDB000028 9	
Neg_B_281.2579 2	1,86E -03	2,0	unknown					
Neg_B_188.0118 5	1,97E -03	2,0	N-Phenylglycine	C8H9NO2	M+K-2H	0	HMDB025522 7	
Neg_B_187.0004 3	1,34E -05	2,0	3,4- Methylenedioxybenzoic acid	C8H6O4	M+Na-2H	5	HMDB003261 3	
Neg_A_107.049 83	3,05E -03	2,0	4-Methyl-3Z,5- hexadienoic acid	C7H10O2	M-H-H2O	1	45796	
Neg_A_189.002 12	3,55E -04	2,0	6-Thioxanthine 5'- monophosphate	C10H13N4O8PS	M-2H	1	HMDB006079 2	
Neg_B_281.2588 9	2,64E -03	2,0	unknown					
Neg_A_186.999 61	1,14E -05	2,0	unknown					
Neg_A_201.034 59	4,67E -02	2,0	Methylthiouracil	C5H6N2OS	M+Hac-H	3	HMDB025466 7	
Neg_B_186.9994 2	8,16E -05	1,9	unknown					
Neg_B_187.0104 2	1,47E -02	1,9	unknown					
Neg_B_186.9984 3	1,39E -04	1,9	unknown					
Neg_B_278.2209 1	1,88E -02	1,9	unknown					
Neg_A_107.050 53	5,79E -03	1,9	2,3-Epoxymenaquinone	C21H24O3	M-3H	3	HMDB006035 9	
Neg_B_187.0119 1	2,63E -03	1,8	unknown					
Neg_A_187.011 6	7,89E -04	1,8	unknown					
Neg_A_187.015 61	1,14E -05	1,8	Mandelic acid	C8H8O3	M+Cl	1	HMDB000070 3	
Neg_A_187.018 12	9,41E -05	1,8	unknown					
Neg_A_186.995 62	1,25E -03	1,8	unknown					

Neg_B_304.2373 6	3,05E -03	1,8	unknown				
Neg_B_189.0019 3	2,91E -02	1,8	unknown				
Neg_B_303.2353 8	4,83E -02	1,8	1-Hexadecanethiol	C16H34S	M+FA-H	4	HMDB024388 8
Neg_B_304.2363 6	6,44E -03	1,8	unknown				
Neg_B_281.2609	9,42E -07	1,7	TG(14:0/20:1(11Z)/O- 18:0)	C55H106O5	M-3H	1	HMDB004242 0
Neg_A_277.215 12	2,67E -02	1,7	Palmitic acid	C16H32O2	M+Na-2H	4	HMDB000022 0
Neg_A_281.257 07	1,86E -03	1,7	unknown				
Neg_A_186.996 62	1,17E -03	1,7	unknown				
Neg_A_187.016 61	3,26E -04	1,6	unknown				
Neg_B_279.2404 5	3,26E -04	1,6	Phytoene 1,2-epoxide	C40H64O	M-2H	0	HMDB003687 5
Neg_A_187.013 61	1,86E -03	1,6	Cystamine	C4H12N2S2	M+Cl	0	HMDB025070 1
Neg_B_304.2353 6	1,88E -02	1,5	unknown				
Neg_B_188.0094 2	3,15E -02	1,5	N- dimethylethanolamine phosphate	C4H10NO4P	M+Na-2H	3	HMDB030442 5
Neg_B_187.0149 1	1,21E -03	1,5	2,6-Diaminopurine	C5H6N6	M+K-2H	5	HMDB024550 9
Neg_B_329.2489	3,51E -02	1,5	7,10,13,16,19- docosapentaenoic acid	C22H34O2	M-H	1	LMFA0103018 4
Neg_B_199.0389 2	3,67E -02	1,5	Piperic acid	C12H10O4	M-H2O-H	3	HMDB003377 9
Neg_A_281.233 66	2,25E -03	1,5	unknown				
Neg_B_187.0158 9	3,32E -03	1,5	3,5-Dimethylbenzoic acid	C9H10O2	M+K-2H	4	HMDB024606 3
Neg_B_189.0034 1	3,81E -02	1,4	Oxalosuccinic acid	C6H6O7	M-H	4	HMDB000397 4
Neg_B_281.2404 5	1,15E -02	1,4	unknown				
Neg_A_187.019 6	6,80E -03	1,4	1-Pentanesulfonic acid	C5H12O3S	M+Cl	3	HMDB024398 6
Neg_A_279.223 16	1,15E -02	1,4	unknown				
Neg_A_79.9573 5	1,44E -02	1,4	Hydrogen sulfite	HO3S	M-H	0	C11481
Pos_A_203.0630 6	2,68E -02	1,3	Farnesyl pyrophosphate	C15H28O7P2	M+H+Na	3	HMDB000096 1
Neg_B_189.0118 9	1,59E -02	1,3	unknown				
Neg_A_187.014 61	3,79E -02	1,3	unknown				

DACTH vs Controle Saudável

M/Z FEATURE	FDR	VI P	NAME	FORMULA	ADUTO	PP M	ID
Neg_A_146.027 24	3,27E -02	2,1	Methionine sulfoxide	C5H11NO3S	M-H2O-H	2	HMDB0002005
Neg_A_146.028 11	1,01E -02	2,9	2-Methylthiazolidine-4- carboxylic acid	C5H9NO2S	M-H	0	HMDB0246657
Neg_A_219.046 59	2,16E -02	3,9	N-Acetyl-S-(N- methylcarbamoyl)cystei ne	C7H12N2O4S	M-H	2	HMDB0041942
Neg_A_220.048 6	1,64E -02	2,2	L-histidinol-phosphate	C6H12N3O4P	M-H	3	HMDB0304403
Neg_A_279.223 16	1,38E -02	1,5	Sitosterol 3-O-(6'-O- oleyl-beta-D-glucoside)	C53H92O7	M-3H	5	HMDB0302625
Neg_A_279.240 7	4,30E -02	2,2	Phytoene 1,2-epoxide	C40H64O	M-2H	0	HMDB0036875
Neg_A_281.232 69	2,75E -02	1,9	Diacylglycerol	C35H64O5		5	HMDB0056156
Neg_A_281.237 15	1,59E -02	2,2	unknown				
Neg_B_181.0784 1	3,86E -02	1,5	Harman	C12H10N2	M-H	7	HMDB0035196
Neg_B_217.0224 1	2,82E -02	1,4	9-bromo-nonanoic acid	C9H17BrO2	M-H-H2O	2	LMFA01090026
Neg_B_217.0308 9	1,76E -02	2,8	8-Dehydro-3-deoxy-D- manno-octulosonate	C8H12O8	M-H-H2O	4	C21332
Neg_B_217.0339	4,43E -03	1,8	3-Dehydroshikimate	C7H8O5	M+HCOO H-H	9	3296
Neg_B_217.0369 1	1,56E -04	2,0	unknown				
Neg_B_217.0399 2	2,16E -02	1,9	unknown				
Neg_B_217.0484 1	1,27E -09	7,6	Mannitol	C6H14O6	M+Cl	0	HMDB0000765
Neg_B_217.0544 2	4,07E -04	2,7	unknown				
Neg_B_217.0568 8	2,41E -04	2,3	unknown				
Neg_B_217.0598 9	3,21E -08	2,4	unknown				
Neg_B_217.0629	7,20E -07	2,2	N,N-Dihydroxy-L- tryptophan	C11H12N2O4	M-H-H2O	6	C19717
Neg_B_217.0659 1	2,30E -04	2,0	Serylmethionine	C8H16N2O4S	M-H-H2O	5	HMDB0029045
Neg_B_217.0689 2	2,41E -04	1,9	unknown				
Neg_B_217.0713 8	2,16E -02	1,3	unknown				
Neg_B_217.0744	3,60E -08	2,0	unknown				
Neg_B_217.0774 1	7,20E -07	2,0	unknown				
Neg_B_217.0804 1	1,05E -03	1,7	unknown				
Neg_B_217.0834 2	1,74E -02	1,5	Glutamylalanine	C8H14N2O5	M-H	2	HMDB0003764
Neg_B_218.0519 2	3,03E -05	3,6	unknown				

Neg_B_218.0543 9	4,35E -09	2,3	unknown				
Neg_B_219.0379 3	2,84E -02	1,4	unknown				
Neg_B_219.0459 1	1,27E -09	6,2	Cystathionine sulfoxide	C7H14N2O5S	M-H2O-H	6	HMDB0041942
Neg_B_219.0489 4	6,48E -03	2,3	Oxoadipic acid	C6H8O5	M+Hac-H	2	HMDB0000225
Neg_B_219.0514 1	1,23E -06	2,4	3-hydroxy-5-methoxy-3-(methoxycarbonyl)-5-oxopentanoic acid	C8H12O7	M-H	2	253213
Neg_B_219.0538 9	2,83E -08	2,3	unknown				
Neg_B_220.0479 2	4,26E -04	2,2	N-Formyl-L-glutamic acid	C6H9NO5	M+HCOO H-H	9	HMDB0003470
Neg_B_220.0508 7	3,39E -03	1,9	Histidinol phosphate	C6H12N3O4P	M-H	7	363
Neg_B_221.0499 5	3,18E -03	1,8	2-(3'-Methylthio)propylmalic acid	C8H14O5S	M-H	5	64493
Neg_B_296.9908 3	1,59E -02	1,7	Bromo-enol lactone	C16H13BrO2	M-H-H2O	2	63068
Pos_A_205.0670 9	2,41E -04	4,6	Galactitol	C6H14O6	M+Na	6	HMDB0000107

ANEXO I

Carta de anuência para uso de dados previamente gerados

CARTA DE CONSENTIMENTO PARA USO DE DADOS.

Prezado participante,

Estamos entrando em contato para agradecer sua participação na pesquisa intitulada “Utilização de ômicas na busca de uma assinatura diagnóstico da deficiência de GH e efetividade da reposição de GH no sistema circulatório de pacientes com deficiência de GH congênita(DGHc).” Registrado sob - CAEE: 98372718.7.0000.0068.”

Em respeito a confidencialidade dos dados gerados por essa pesquisa, viemos por meio desta solicitar seu consentimento para o uso dos dados já gerados em um novo projeto de pesquisa intitulado “Utilização de metabolômica e proteômica na busca de novos marcadores que auxiliem no diagnóstico da insuficiência adrenal central em pacientes com hipopituitarismo congênito e garantam reposição fisiológica de glicocorticóides.”- registrado sob CAEE: 1 42993819.5.0000.0068. Esse projeto tem por objetivo procurar marcadores alternativos para o diagnóstico e tratamento da deficiência de ACTH.

Os pesquisadores envolvidos no projeto se comprometem a manter a confidencialidade sobre os dados coletados nos arquivos bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam a Resolução 466/12, e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde.

Declaramos entender que a integridade das informações e a garantia da confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas estão sob nossa responsabilidade. Também declaramos que não repassaremos os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, a pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Os seus dados serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente sob qualquer circunstância.

Solicitamos sua autorização para que os dados obtidos nesta pesquisa sejam utilizados em uma publicação científica, meio pelo qual os resultados de uma pesquisa são divulgados e compartilhados com a comunidade científica.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Utilização de metabolômica e proteômica na busca de novos marcadores que auxiliem no diagnóstico da insuficiência adrenal central em pacientes com hipopituitarismo congênito e garantam reposição fisiológica de glicocorticóides.” E concordo com o uso dos dados gerados em pesquisa prévia para o atual projeto de pesquisa.

Assinatura do participante/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____