

ANETE REJANE MICHEL

**CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE CORTISOL, DESIDROEPIANDROSTERONA
(DHEA) E VARIÁVEIS PSICOLÓGICAS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO
AFTOSA RECORRENTE**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia Clínica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum

Porto Alegre

2011

Dedico essa tese ao Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da PUC/RS.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, por me dar força e luz, pela oportunidade de mais uma conquista.

Às professoras da PUCRS, Dr^a Liliane Soares Yurgel, Dr^a Karen Cherubini, Dr^a Maria Antônia Zancanaro de Figueiredo e Dr^a Maria Martha Campos e, em especial, à Dr^a Fernanda Gonçalves Salum, minha orientadora, pela paciência e competência.

Aos meus colegas de trabalho da Policlínica da Polícia Civil do Estado do Rio Grande do Sul, onde eu trabalho com tanto afeto, em especial, os médicos Jairo, Rejane, Jussara, Elias, Sílvio, José Roque e também à Rosane, Menezes e Sara, os quais me apoiaram neste estudo.

A minha chefe Rosimery Paixão, pelo carinho, e ao meu chefe Edson Lopes Ayres, que eu tanto admiro, os quais gentilmente autorizaram a realização de parte dessa tese com pacientes da Policlínica da Polícia Civil do Estado do Rio Grande do Sul. E, em especial, ao meu chefe José Carlos Fernandes pelo carinho e tantas palavras de incentivo.

Aos Delegados de Polícia, aos meus colegas Policias Civis, familiares desses e estagiárias que voluntariamente e com tanta presteza participaram desta pesquisa.

Aos pacientes do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC que participaram deste estudo.

À Dra. Clarice Luz e Bruna Luz pela prestatividade na parte laboratorial das análises.

À psicóloga e colega Sílvia Wudarcki pela prestatividade em colaborar, aplicando os testes psicométricos desta pesquisa.

Ao professor Sérgio Kakuta Kato pela competência, didática e prestatividade na análise estatística.

A minha irmã Dirce pelo carinho e prontidão.

Ao meu namorado, André, pelo apoio e compreensão.

Ao colega e amigo José Antônio Barros de Castro (Toco) e família, que me incentivou a trabalhar na Policlínica, e me fez sentir a vontade de “vestir a camiseta” da Polícia Civil/RS.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), pela oportunidade e acolhimento para a realização desta tese.

Ao ex-professor dos meus tempos acadêmicos (ULBRA/Canoas) e meu ex-colega desta Pós-graduação, Luis Alberto Arteché (*in memoriam*), pelos ensinamentos.

À CAPES, pelo auxílio proporcionado, e assim ter possibilitado esta conquista.

*Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.*

Chico Xavier

RESUMO

A ulceração aftosa recorrente (UAR) é uma das doenças mais prevalentes da mucosa bucal, mas o mecanismo que desencadeia seu desenvolvimento permanece desconhecido. Alterações psicológicas como ansiedade e estresse têm sido investigadas e parecem exibir, em alguns pacientes, associação com a doença. O estresse promove desregulação do sistema imune e está relacionado a elevação dos níveis de cortisol e diminuição dos de desidroepiandrosterona (DHEA). No presente estudo, foram investigados níveis de estresse e de ansiedade em pacientes com UAR, bem como as concentrações salivares dos hormônios cortisol e DHEA. A amostra foi constituída por 60 indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 50 anos, distribuídos em dois grupos: 30 pacientes com UAR e 30 pacientes sem histórico da doença, emparelhados por sexo e idade. Para a investigação dos sintomas de estresse foi utilizado o Inventário de Sintomas de Stress de Lipp (ISSL) e para a ansiedade, o Inventário de Ansiedade de Beck (BAI). As amostras de saliva foram coletadas pela manhã, à tarde e à noite, no mesmo dia. No grupo-caso, as coletas foram realizadas em dois momentos, em presença e após a remissão das lesões. As concentrações salivares de cortisol e DHEA foram analisadas em duplicata por radioimunoensaio com *Kit* analítico específico para cada hormônio. Os pacientes-caso exibiram escores de ansiedade ($p=0,001$) mais elevados, além de prevalência superior de estresse ($p=0,004$). No grupo-caso, os níveis de cortisol foram significativamente superiores em presença de lesão, nos turnos da manhã ($p=0,008$) e da tarde ($p=0,001$), quando comparados à fase de remissão da UAR. O ratio cortisol/DHEA também foi superior nos pacientes-caso em presença de lesão quando comparado à fase de remissão, no turno da tarde ($p=0,007$). Não houve diferença significativa quanto aos níveis de DHEA entre os grupos analisados. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que, na amostra investigada, o estresse e a ansiedade são mais elevados em pacientes com UAR. Nestes indivíduos, os níveis de cortisol salivar aumentam em presença de lesão, mas não diferem quando comparados aos de pacientes sem a doença. Os níveis de DHEA não diferem em pacientes com UAR em presença ou em remissão de lesão, nem quando comparados aos de pacientes-controle. Outros estudos são necessários no sentido de elucidar se o estresse e a ansiedade, bem como se a

elevação dos níveis de cortisol exercem influência na etiopatogênese da ulceração aftosa recorrente.

Palavras-chave: Aftas. Cortisol. Desidroepiandrosterona. Estresse. Ansiedade.

ABSTRACT

Recurrent aphthous ulceration (RAU) is one of the most prevalent disease of the oral mucosa, but the mechanism that leads to the development of this lesion remains unknown. Psychological changes such anxiety and stress have been investigated and appear to exhibit, in some patients, an association with the disease. Stress causes dysregulation of the immune system and is related to elevated levels of cortisol and a decrease in dehydroepiandrosterone (DHEA) levels. In the present study, patients with RAU were investigated with regard to stress and anxiety levels, as well as salivary concentrations of the hormones cortisol and DHEA. The sample consisted of 60 individuals of both sexes, aged between 18 and 50 years and distributed into two groups: 30 patients with RAU and 30 patients without history of the disorder, matched by sex and age. Stress symptoms were assessed using the Lipp's Inventory of Stress Symptoms (LISS) and for anxiety the Beck Inventory of Anxiety (BAI). The saliva specimens were collected in the morning, in the afternoon and at night on the same day. In the RAU group, the specimens were collected on two occasions, in the presence and after remission of the lesions. The salivary concentrations of cortisol and DHEA were determined in duplicate by radioimmunoassay with a specific analytical kit for each hormone. The case patients exhibited higher anxiety scores ($p=0.001$), besides a greater prevalence of stress ($p=0.004$). Cortisol levels were significantly higher in the case group in the presence of the lesion in the morning ($p=0.008$) and afternoon ($p=0.001$) when compared to the same RAU patients in remission. The cortisol/DHEA ratio was also higher in the case patients in the presence of lesions when compared to the remission phase in the afternoon ($p=0.007$). There was no significant difference in DHEA levels between the groups. Based on the results obtained, it can be concluded that, in the sample investigated, stress and anxiety are more elevated in patients with RAU. In these individuals, salivary cortisol levels were increased in the presence of lesions, but did not differ when compared to the patients without the disorder. DHEA levels did not differ in patients with RAU in the presence or in remission of the lesion, or between RAU patients and control patients. There is a need for further studies to determine whether stress and anxiety, as well as elevated cortisol levels, have an influence on the etiopathogenesis of recurrent aphthous ulceration.

Key words: Aphthous. Cortisol. Dehydroepiandrosterone. Stress. Anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Molécula de cortisol.....	24
Figura 2 - Molécula de DHEA.....	28
Figura 3 - Recipientes contendo a saliva coletada pela manhã, à tarde e à noite.....	36
Figura 4 - Precipitação da mucina no tubo de polipropileno, após a centrifugação.....	37
Figura 5 - <i>Kit Coat-A-Count</i> cortisol para análise das concentrações de cortisol nas amostras salivares.....	38
Figura 6 - <i>Kit DHEA RIA</i> para análise das concentrações de DHEA nas amostras salivares.....	39
Figura 7 - Tubos de polipropileno acondicionados no contador Gamma C12® (EURO-DPC) e monitor mostrando a contagem da radiação gama remanescente dos ensaios por meio do software específico do equipamento.....	40
Figura 8 - Múltiplas ulcerações aftosas recorrentes do tipo menor.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos casos de UAR segundo a localização das lesões.....	42
Tabela 2 -	Escores de ansiedade dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BAI.....	43
Tabela 3 -	Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de ansiedade.....	43
Tabela 4 -	Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença de estresse.....	44
Tabela 5 -	Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto às fases e tipos de sintomas de estresse.....	44
Tabela 6 -	Concentrações salivares de cortisol e de DHEA no grupo-caso em presença e em remissão de UAR.....	45
Tabela 7 -	Redução percentual das concentrações salivares de cortisol e de DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em presença e em remissão de UAR.....	46
Tabela 8 -	<i>Ratio</i> cortisol/DHEA das amostras salivares do grupo-caso em presença e em remissão de UAR.....	46
Tabela 9 -	Concentrações salivares de cortisol e de DHEA nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.....	47
Tabela 10 -	Redução percentual das concentrações de cortisol e DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em presença de UAR e no grupo-controle.....	47
Tabela 11 -	<i>Ratio</i> cortisol/DHEA nas amostras salivares do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.....	48
Tabela 12 -	Concentrações salivares de cortisol e de DHEA dos pacientes do grupo-caso em remissão de UAR e do grupo-controle.....	48
Tabela 13 -	Redução percentual das concentrações de cortisol e DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em remissão de UAR e no grupo-controle.....	49
Tabela 14 -	<i>Ratio</i> cortisol/DHEA das amostras salivares do grupo-caso em remissão de UAR e do grupo-controle	49
Tabela 15 -	Correlação entre as concentrações salivares de cortisol e de	50

	DHEA com os escores de ansiedade nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.....	
Tabela 16 -	Associação entre as concentrações salivares de cortisol e DHEA com a presença de estresse nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR.....	51
Tabela 17 -	Associação entre as concentrações de cortisol e DHEA com a presença de estresse nos pacientes do grupo-controle.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACTH** - *adrenocorticotropic hormone*, hormônio adrenocorticotrópico
- AIDS** - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ANA** – Antinuclear antibody, Anticorpo antinuclear
- BAI** - *The Beck Anxiety Inventory*, Inventário de Ansiedade de Beck
- CD** - *cluster of differentiation*, grupo de diferenciação
- cm** - centímetros
- CRH** - corticotropina
- DASS** - *Depression, Anxiety and Stress Scale*, Escala de Depressão, Ansiedade e Estresse
- DHEA** - desidroepiandrosterona
- DHEAS** - desidroepiandrosterona sulfatada
- DSL** - *Diagnostics Systems Laboratories*, Laboratório de Sistema de Diagnóstico
- FAN** - fator anti-nuclear
- h** - hora
- HAD** - *Hospital Anxiety and Depression*, Ansiedade e Depressão Hospitalar
- HIV** - *human immunodeficiency virus*, vírus da imunodeficiência humana
- HLA** - *human leucocyte antigen*, antígeno de leucócitos humanos
- HPA** - hipotálamo-hipófise-adrenal
- HSV** - *herpes simplex virus*, vírus do herpes simples
- I¹²⁵** – Iodo 125
- IFN- γ** - *interferon-gamma*
- IL** - *interleukin*, interleucina
- ISSL** - Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp
- LES** – Lupus Eritematoso Sistêmico
- LIA** – *Luminescent Immunoassay*, Imunoensaio Luminescente
- LPO** - líquen plano oral
- M** - manhã
- mL** - mililitro
- n** - frequência

N - noite

nmol/L - nanomol por litro

p - probabilidade

PFAPA - *periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis*, febre periódica, estomatite aftosa, faringite e adenite

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RAS – Recurrent Aphthous Stomatitis, Estomatite aftosa recorrente

RIE - radioimunoensaio

rpm - rotações por minuto

SAB - síndrome da ardência bucal

SAS - *Self-rating Anxiety Scale*, Escala de Ansiedade auto-avaliativa

SNC - sistema nervoso central

SRRS - *Social Readjustment Rating Scale*, Escala de avaliação de reajustamento social

SSPS - *Statistical Package for the Social Sciences*,

STAI - *Spielberger's State-Trait Anxiety Inventory*, Inventário de Ansiedade de Spielberger.

T - tarde

Th - *T – helper*, T – auxiliar

TNF- α - *tumor necrosis factor alpha*, fator de necrose tumoral alfa

UAR - ulceração aftosa recorrente

VAS – *Visual Analogue Scale*, Escala Analógica Visual

VSG - velocidade de sedimentação globular

°C - grau Celsius

$\mu\text{g/dL}$ - micrograma por decilitro

% - porcentagem

® - marca registrada

< - menor

\leq - menor ou igual

\pm DP – desvio-padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE.....	19
2.1.1 Etiologia e patogênese	20
2.2 CORTISOL.....	24
2.3 DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA).....	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	33
4.3 VARIÁVEIS.....	33
4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	33
4.4.1 Critérios de Inclusão	34
4.4.2 Critérios de Exclusão	34
4.5 PROCEDIMENTOS.....	34
4.5.1 Instrumentos para a investigação dos sintomas de estresse e ansiedade	35
4.5.2 Coleta das amostras de saliva	36
4.5.3 Análises das concentrações salivares de cortisol e DHEA	37
4.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	40
5 RESULTADOS	41

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS PACIENTES-CASO E CONTROLES.....	42
5.2.1 Sintomas de ansiedade e de estresse.....	42
5.2.2 Concentrações salivares de cortisol e de DHEA.....	44
5.2.2.1 Grupo-caso em presença e em remissão de UAR.....	45
5.2.2.2 Grupo-caso em presença de UAR e grupo-controle.....	46
5.2.2.3 Grupo-caso em remissão de UAR e grupo-controle.....	48
5.2.3 Correlação e associação entre as concentrações salivares de cortisol e de DHEA com os sintomas de ansiedade e de estresse.....	50
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	73
APÊNDICE B – Ficha de coleta de dados.....	75
ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	77
ANEXO B – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS.....	78
ANEXO C – Inventário de ansiedade de Beck (BAI).....	79
ANEXO D – Inventário de Sintomas de Stress para adultos de LIPP (ISSL)...	80
ANEXO E – Bula do kit de cortisol.....	86
ANEXO F – Bula do kit de DHEA.....	90

1 INTRODUÇÃO

A ulceração aftosa recorrente (UAR), também denominada estomatite aftosa recorrente ou afta, caracteriza-se por ulcerações dolorosas, únicas ou múltiplas, com formato arredondado ou ovalado e halo eritematoso (JURGE et al., 2006; ALTENBURG; ZOUBOULIS, 2008). As lesões localizam-se, preferencialmente, em mucosa não ceratinizada e seu diagnóstico é baseado nos achados clínicos (MESSADI; YOUNAI, 2010). A UAR é uma das doenças mais frequentes da mucosa bucal e sua prevalência na população em geral varia de 5 a 66% (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008; EGUIA-DEL VALLE et al., 2011).

A etiologia da afta é complexa, multifatorial e o mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões permanece desconhecido. Predisposição genética, hipersensibilidade a alimentos, fatores imunológicos, hormonais, microbiológicos, traumáticos, psicológicos, bem como deficiências nutricionais são as principais causas investigadas (AKINTOYE; GREENBERG, 2005; EGUIA-DEL VALLE et al., 2011). Seu desenvolvimento envolve desregulação nos mecanismos de resposta da mucosa bucal frente a antígenos exógenos ou endógenos, ocorrendo uma reação imune que envolve as células T. Há desequilíbrio das células TCD4+, com posterior proliferação de linfócitos TCD8+, mediadores de reação citotóxica que causam danos teciduais (BUÑO et al., 1998; JURGE et al., 2006). Alguns estudos relatam que há desequilíbrio de citocinas T-Helper (Th), com o aumento da atividade Th1 em relação à Th2 em pacientes com aftas (REDWINE et al. 2003; BORRA et al., 2004; MIYAMOTO JUNIOR et al., 2008; BORRA et al., 2009; OZDEMIR et al., 2011).

Há evidências de que a ansiedade e o estresse predisponham à ocorrência da UAR (SOTO-ARAYA; ROJAS-ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008; GALLO; MIMURA; SUGAYA, 2009). O estresse, bem como outras alterações psicológicas, podem modificar funções imunes, promovendo sua desregulação (MARSHALL et al., 1998). Os agentes estressores estimulam o sistema nervoso central (SNC), ativando o eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), com liberação de glicocorticoides e catecolaminas que influenciam na resposta imunológica (TAUSK; ELENKOV; MOYNIHAN, 2008). O cortisol é um hormônio glicocorticoide secretado pelo córtex da adrenal e, dentre suas distintas funções, participa do sistema que modula o estresse e atua sobre as respostas imunológica e

inflamatória (KING; HEGADOREN, 2002). Níveis salivares elevados de cortisol têm sido encontrados em indivíduos com depressão, estresse e ansiedade (MUTSUURA et al., 2009), sendo considerado um biomarcador dessas alterações psicológicas (HELLHAMMER; WÜST; KUDIELKA, 2009). Concentrações séricas e salivares elevadas de cortisol foram previamente encontradas em indivíduos com UAR (MCCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996; ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008).

A desidroepiandrosterona (DHEA) é um esteróide secretado pelo córtex da glândula adrenal, pelas gônadas e pelo sistema nervoso central. Em circunstâncias normais, é secretada sincronicamente com o cortisol e antagoniza vários efeitos deletérios deste hormônio (GRUENEWALD; MATSUMOTO, 2001). A DHEA parece modular a resposta imune, uma vez que a diminuição de suas concentrações séricas está associada à deterioração de várias funções fisiológicas. Baixas concentrações desse esteróide foram encontradas em pacientes com artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES) (STRAUB et al., 2004), síndrome do pânico (HERBERT et al., 1996) e síndrome da ardência bucal (SAB) (DIAS FERNANDES et al., 2009). Em pacientes com queimaduras, anorexia nervosa, síndrome de Cushing, esquizofrenia, depressão, doença de Alzheimer, obesidade, diabetes e LES foram encontrados níveis elevados de cortisol e diminuídos de DHEA (WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BECKER, 2001). Não se encontram na literatura internacional relatos da análise dos níveis deste hormônio, nem da sua relação com os níveis de cortisol em indivíduos com UAR.

A ansiedade e o estresse podem estar associados à UAR pois estas alterações psicológicas promovem alterações dos níveis dos hormônios cortisol e DHEA. O presente estudo teve como objetivos analisar as concentrações salivares destes esteróides, níveis de estresse e de ansiedade em pacientes com UAR, na tentativa de estabelecer a possível associação entre alterações psicológicas e esta doença, bem como com biomarcadores salivares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE

A ulceração aftosa recorrente (UAR), também denominada estomatite aftosa recorrente ou afta, é uma das uma das enfermidades mais frequentes da mucosa bucal. Sua prevalência na população em geral varia de 5 a 66% (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008), sendo mais frequente em indivíduos do sexo feminino, de cor branca, com idades entre 19 e 29 anos. As lesões caracterizam-se por ulcerações dolorosas, bem definidas, com halo eritematoso e centro necrótico recoberto por uma fina camada pseudomembranosa amarelo-acinzentada (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; ALTENBURG; ZOUBOULIS, 2008). Localizam-se, preferencialmente, em mucosa não ceratinizada e têm predileção, em ordem decrescente, pela mucosa labial, jugal, bordas e ventre de língua, assoalho bucal, palato mole e orofaringe (KARACA et al., 2008; MESSADI; YOUNAI, 2010). Há três variações clínicas da UAR: menor, maior e herpetiforme. As ulcerações aftosas menores são as mais prevalentes, medem menos de 1,0 cm de diâmetro e possuem duração de sete a 14 dias. As aftas maiores medem mais de 1,0 cm de diâmetro e sua evolução varia de semanas a meses, podendo deixar cicatrizes. As ulcerações aftosas herpetiformes caracterizam-se por elevado número de pequenas ulcerações e possuem duração de 7 a 14 dias (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; AKINTOYE; GREENBERG, 2005).

O diagnóstico da UAR é baseado nos dados da anamnese e do exame físico; porém, é necessária a exclusão de doenças como síndrome de Behçet, doença celíaca, neutropenia cíclica, síndrome PFAPA (*Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis*) e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SCULLY; PORTER, 2008). O diagnóstico diferencial deve ser estabelecido com doenças que podem se apresentar de forma ulcerada tais como infecção primária ou recorrente pelo HSV, eritema multiforme, líquen plano erosivo, pênfigo vulgar, penfigóide benigno de mucosa, úlceras traumáticas entre outras (MESSADI; YOUNAI, 2010).

2.1.1 Etiologia e patogênese

Chattopadhyay e Shetty (2011) propõem várias hipóteses para o desenvolvimento da afta, dentre elas o estresse, mas ressaltam que ainda não há estudos conclusivos de um agente causal específico. O mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões permanece desconhecido, fatores locais como trauma em indivíduos geneticamente propensos, fatores nutricionais (deficiência de ferro e de vitaminas do complexo B), microbianos, imunológicos e psicológicos têm sido propostos (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; AKINTOYE; GREENBERG, 2005).

As alterações histopatológicas em aftas incluem a infiltração do epitélio por linfócitos, posterior edema e vasculite, que levam à ulceração, infiltração de neutrófilos, de linfócitos e de plasmócitos. O desenvolvimento das lesões está associado com desregulação nos mecanismos de resposta da mucosa bucal frente a antígenos exógenos ou endógenos, ocorrendo uma reação imune que envolve as células T. Há desequilíbrio nas células TCD4+, com posterior proliferação de linfócitos TCD8+, mediadores de reação citotóxica contra o organismo, que causam danos teciduais (BUÑO et al., 1998; JURGE et al., 2006). Segundo Lewkowicz et al. (2008), em pacientes acometidos por aftas há deficiência funcional de células T regulatórias CD4+ e CD25+.

Em pacientes com UAR há desequilíbrio de citocinas *T-helper*, com o aumento da atividade Th1 em relação à Th2 (BORRA et al., 2004; MIYAMOTO JUNIOR et al., 2008; BORRA et al., 2009; OZDEMIR et al., 2011). As células TCD4+ (*T-helper*) são classificadas em três subgrupos: Th1 (que produz interferon-gama, interleucina-2 e fator de necrose tumoral-alfa), Th2 (secretoras de interleucinas 4, 5, 10 e 13) e Th17 (que produz interleucinas 17, 22 e 26) (LIANG et al., 2006; DONNELLY et al., 2010). A ativação de Th1 conduz ao aumento dos linfócitos TCD8+, responsáveis pela ação citotóxica (EVERSOLE, 1997). De acordo com Savage e Seymour (1994) e Borra et al. (2009), ceratinócitos ou células da lâmina própria, em contato com antígenos exógenos ou endógenos, são responsáveis pela secreção de citocinas e quimiocinas Th1 que medeiam a reação citotóxica contra células do epitélio bucal.

Taylor et al. (1992) evidenciaram que há elevação dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em lesões aftosas. Segundo Borra et al. (2009), essa citocina parece ser a chave para o desencadeamento da UAR, pois quando são utilizados fármacos com ação anti-TNF- α como a talidomida e a pentoxifilina, há regressão das lesões (NATAH et al. 2000; BORAS et al., 2006; EGUIA-DEL VALLE et al., 2011). A produção de TNF- α induz à inflamação por seu efeito sobre a adesão das células endoteliais e quimiotaxia de neutrófilos (SCULLY; GORSKY; LOZADA-NUR, 2003; JURGE et al., 2006; SCULLY; PORTER, 2008; MESSADI; YOUNAI, 2010). Os níveis de interleucina-2 (IL-2) e de interferon-gama (IFN- γ) também se encontram elevados nas lesões aftosas e os de interleucina-10 (IL-10) apresentam-se diminuídos. A IL-10 possui ação anti-inflamatória e, usualmente, estimula a proliferação epitelial no processo de cicatrização (BUÑO et al., 1998; JURGE et al., 2006).

Uma predisposição genética parece estar envolvida na etiopatogenia da UAR, pois há aumento da frequência de HLA (*human leucocyte antigen*) e história familiar positiva em pacientes com lesões (JURGE et al., 2006; CHATTOPADHYAY; SHETTY, 2011). De acordo com Kumar et al. (2010), em pacientes com UAR há deficiência na função de neutrófilos salivares e séricos, evidenciada pela redução da sua capacidade fagocítica. Os neutrófilos foram isolados de amostras de saliva e de sangue e cultura de *Candida albicans* foi utilizada para avaliar sua capacidade de ingestão e fagocitose, a qual se encontrou reduzida.

Segundo Altenburg e Zouboulis (2008), alguns alimentos tais como chocolate, frutas cítricas e bebidas alcoólicas podem interferir na ocorrência de aftas, bem como prolongar o seu curso e evolução. Detergentes e dentifrícios contendo lauril sulfato de sódio podem causar irritação e também deveriam ser evitados por indivíduos predispostos ao desenvolvimento das lesões. Wray et al. (2000) verificaram que alguns indivíduos apresentam hipersensibilidade a conservantes e corantes de alimentos. Wardhana (2010) sugere que pacientes predispostos a desenvolver UAR em decorrência de hipersensibilidade a alimentos devem fazer terapia tópica preventiva nos estágios prodrômico ou inicial da doença com o uso de imunossuppressores, particularmente corticosteróides.

A UAR ocorre, preferencialmente, em mucosa não-ceratinizada que é mais facilmente traumatizada e suscetível à permeabilidade de vários antígenos como bactérias, vírus e alérgenos (AKINTOYE; GREENBERG, 2005; SUBRAMANYAM,

2011). Fatores que promovam a redução da espessura da barreira mucosa como danos traumáticos (AMINABADI, 2008), deficiências nutricionais de ferro, ácido fólico e vitamina B₁₂ podem estar associados ao desenvolvimento das lesões (PORTER et al., 1988; PISKIN et al., 2002; BURGAN; SAWAIR; AMARIN, 2006; COMPILATO et al., 2010).

A deficiência de vitamina B₁₂ pode afetar a regeneração das células da mucosa bucal com conseqüente atrofia epitelial, facilitando o desenvolvimento de aftas (DOUGLAS, 2002). Volkov et al. (2009) evidenciaram que a suplementação com essa vitamina em pacientes com UAR, independente do seu nível sérico, contribui significativamente para a redução do número de lesões, da dor e da duração dos episódios. Compilato et al. (2010) constataram, após o tratamento de reposição com vitamina B₁₂, ácido fólico e ferro, que os indivíduos com histórico familiar de UAR apresentaram redução da frequência e severidade das lesões, enquanto os sem histórico familiar exibiram remissão total das mesmas. A vitamina B₁₂ parece ser também moduladora para as células do sistema imune. Foram encontrados índices de TNF- α mais elevados em pacientes com deficiência de vitamina B₁₂ e sua suplementação regularizou os níveis dessa citocina, bem como os de IL-6 (SCALABRINO, 2009).

O tabaco e seus produtos inibem a ocorrência de UAR, havendo uma relação inversa entre o fumo e a doença. É comum o desenvolvimento de aftas em pacientes que param de fumar e a utilização de gomas de nicotina por estes indivíduos reduz o aparecimento das lesões (USSHER et al., 2003, MCROBBIE; HAJEK; GILLISON, 2004). O mecanismo pelo qual o tabaco inibe a ocorrência de UAR é desconhecido, porém, uma das hipóteses é de que a nicotina possa aumentar a queratinização da mucosa bucal (GRANDY et al., 1992). Por outro lado, a abstinência dessa substância comprometeria a resposta imune devido ao estresse (GRIESEL; GERMISHUYS, 1999; WARDLE; MUNAFO; WIT, 2011). A nicotina afeta indiretamente a resposta imunológica em lesões inflamatórias por induzir a produção de glicocorticoides pelo eixo HPA (SOPORI, 2002) e, diretamente, por reduzir a produção de TNF- α (FLOTO; SMITH, 2003).

Alguns estudos têm investigado o papel de agentes microbiológicos na patogênese da UAR. Sun, Chia e Chiang (2002) evidenciaram o envolvimento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mitis* na ocorrência das lesões. Lin et al. (2005)

observaram que infecções pelos vírus do herpes simples, Epstein-Barr, papiloma vírus humano e citomegalovírus predisõem ao desenvolvimento das lesões por ativarem citocinas como a IL-2 e a IL-4. Por outro lado, Fritscher et al. (2004) e Mansour-Ghanaei et al. (2005) não encontraram associação da bactéria *Helicobacter pylori* com a etiologia da UAR.

Há evidências de que a ansiedade e o estresse predisponham à ocorrência da UAR (MCCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996, ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008). Soto-Araya, Rojas-Alcayaga e Esguep (2004) constataram que pacientes com Líquen plano oral (LPO), com a SAB ou com UAR apresentaram níveis de estresse e de ansiedade mais elevados, concluindo que estas alterações psicológicas desempenham um papel importante em relação à saúde dos tecidos bucais. Chiappelli e Cajjulis (2004) sugerem que o desenvolvimento de UAR ou de LPO devido ao estresse, depende da perspectiva psicobiológica em resposta a esse estímulo. Segundo Elenkov (2004), o estresse agudo ou crônico pode afetar a resposta imune do organismo, havendo estimulação do eixo HPA, com aumento dos níveis de cortisol e desequilíbrio das citocinas Th1/Th2. Várias doenças autoimunes caracterizam-se por alterações no equilíbrio entre essas citocinas.

Miller e Ship (1977) realizaram um estudo longitudinal no qual foram avaliados 651 estudantes com UAR. Doze anos após, estes indivíduos foram reavaliados e exibiram menores índices de lesões. Os autores concluíram que estudantes apresentam maior incidência de UAR devido aos elevados níveis de estresse. Buajeeb et al. (1990) investigaram sintomas de ansiedade por meio do questionário *Self-rating Anxiety Scale*, em 3016 pacientes, dos quais 46,7% eram portadores de UAR. Os autores verificaram que indivíduos com afta foram mais ansiosos e que este sintoma psicológico foi mais prevalente em mulheres, em ambos os grupos. Gallo, Mimura e Sugaya (2009) encontraram níveis significativamente mais elevados de estresse em pacientes com UAR em comparação a indivíduos-controle, sem histórico da doença. Entretanto, essa alteração psicológica não se correlacionou à gravidade das lesões, sugerindo que atue como um gatilho que aumenta a suscetibilidade de pacientes predispostos a desenvolvê-las.

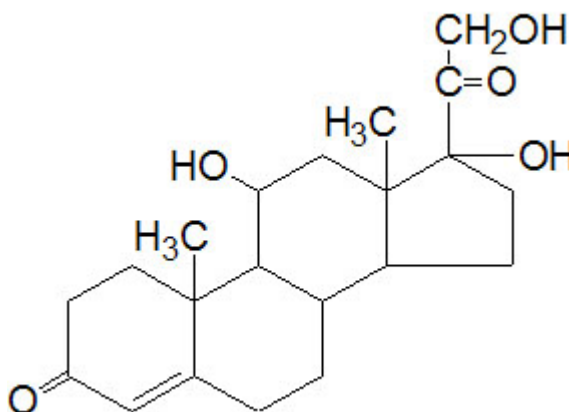
Como o mecanismo de desenvolvimento das lesões permanece desconhecido, os tratamentos disponíveis objetivam a diminuição da dor, redução do número e tamanho das lesões, bem como o aumento do intervalo entre os episódios de aftas (ZAND et al., 2009). Medicamentos de uso tópico como corticosteróides,

antialérgicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos têm sido utilizados. Em episódios mais frequentes e graves, refratários à terapia tópica, fármacos de uso sistêmico como corticosteróides, agentes anti-TNF- α ou drogas imunomoduladoras têm sido indicados (SCULLY; PORTER, 2008). De Souza et al. (2010) evidenciaram a eficácia do laser na redução do tempo de evolução das lesões. Ao utilizarem o laser de baixa intensidade em aftas menores, Zand et al. (2009) constataram que uma aplicação reduziu consideravelmente a sintomatologia dos pacientes.

2.2 CORTISOL

O cortisol (Figura 1), principal hormônio glicocorticoide em humanos, é secretado na camada média (zona fasciculada) do córtex das glândulas supra-renais. Este hormônio exerce diversos efeitos no organismo como estimulação da gliconeogênese, contribuição para a perda muscular, diminuição da utilização de glicose pelas células, inibição da síntese de colágeno, da diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, da absorção de cálcio intestinal, aceleração da reabsorção óssea, modulação da excitabilidade, do comportamento e do humor, aumento da pressão arterial, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e servir de modificador do sistema imune (VANDERHAEGHE, 2001).

Figura 1 - Molécula de cortisol.



Fonte: <http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.htm>. Acesso em agosto de 2010.

O cortisol regula o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, reduz a permeabilidade dos capilares, afeta a sensibilidade do sistema nervoso e a resposta ao estresse (GUYTON, 2006). Em níveis normais, estimula o sistema imune frente a reações alérgicas e inflamatórias, mas pode promover imunossupressão quando em concentrações muito elevadas ou quando prescrito terapêuticamente, em forma de droga sintética (VANDERHAEGHE, 2001).

A secreção de cortisol é controlada pelo eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), que é ativado por fatores metabólicos, físicos ou estresse emocional. Na ativação do eixo HPA, ocorre a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que ativa a liberação de adrenocorticotropina (ACTH) pela hipófise, estimulando as adrenais a secretarem cortisol (BECKER, 2001; KING; HEGADOREN, 2002; GUYTON, 2006). A elevação dos níveis de cortisol exerce um efeito de *feedback* sobre o hipotálamo e sobre a hipófise, reduzindo a formação de CRH e ACTH (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991; BLACK, 1994). Traumatismos, queimaduras, infecções e ansiedade são alguns exemplos em que há aumento de liberação de CRH e de ACTH e, em minutos, o nível de cortisol pode aumentar em até 20 vezes (GUYTON, 2006). A elevação do cortisol devido a estímulos psicológicos ou físicos é transitória, havendo uma adaptação do eixo HPA frente a consecutivas situações estressoras (SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003). Fitzgerald (2011) evidenciou variação na capacidade de reação imune devido à secreção de cortisol, visto que esse glicocorticoide deprime o sistema imunológico.

Sob condições normais, o cortisol é secretado de forma pulsátil. Ocorrem, aproximadamente, 15 pulsos ao longo do dia, com um pico máximo de liberação pela manhã (nível plasmático de aproximadamente 20 µg/dL) e declínio gradativo ao longo do dia. Seu nível mais baixo, cerca de 5 µg/dL, é atingido por volta da meia noite (FERRARI et al., 2001; VREEBURG et al., 2010; WINGENFELD et al., 2010). A meia-vida do cortisol plasmático varia de 70 a 120 minutos (KIRSCHBAUM et al., 1989).

As concentrações de cortisol no organismo humano podem ser medidas no plasma, na urina e na saliva (WEINSTEIN et al., 1999). A determinação dos níveis salivares de cortisol livre tem sido uma ferramenta eficiente e muito utilizada nos estudos que objetivam a investigação da função do eixo HPA (GRÖSCHL et al., 2001). A coleta para determinação do cortisol salivar é um procedimento simples, não invasivo, livre do estresse da venopunção e que permite várias análises em

diferentes momentos do dia, necessárias para avaliação do ritmo circadiano desse esteróide (LUZ et al., 2006). Na saliva, 100% do cortisol está livre e biologicamente ativo. Alterações no fluxo salivar não influenciam os níveis desse hormônio, pois o tamanho reduzido e a alta solubilidade de sua molécula facilitam a difusão através das membranas das células epiteliais glandulares. Os níveis de cortisol salivar também não exibem alterações significativas em relação ao sexo e ao avanço da idade (AHN et al., 2007). Para não haver interferências na dosagem desse hormônio, os pacientes devem evitar o consumo de alimentos, bebidas ou de cigarros 30 minutos antes das coletas (POLL et al., 2007).

Há evidências de que o estresse e a ansiedade estejam relacionados ao aumento dos níveis de cortisol, por isso, esse esteróide é rotineiramente utilizado como biomarcador de estresse (SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003; VEDHARA et al., 2003; WIRTZ et al., 2007; HELLHAMMER; WÜST; KUDIELKA, 2009). O estresse está intimamente relacionado com depressão e ansiedade, podendo modificar funções imunes e predispor ao desenvolvimento de algumas doenças (ANDERSSON; LORENTZEN; ERICSSON-DAHLSTRAND, 2000; WINDLE et al., 2001; BOSCH et al., 2003). Níveis elevados de cortisol no plasma, urina e fluido espinhal foram encontrados em pacientes com depressão maior (OWENS; NEMEROFF, 1993, PARIANTE; MILLER, 2001). Vreeburg et al. (2010) e Franz et al. (2010) encontraram níveis salivares de cortisol mais elevados em pacientes ansiosos do que em pacientes-controle, uma hora após o despertar. Weinrib et al. (2010) evidenciaram, em pacientes com câncer ovariano e com metástases, a presença de depressão, bem como desregulação dos níveis de cortisol.

McCartan, Lamey e Wallace (1996) analisaram os níveis de ansiedade e de cortisol salivar de dois grupos de pacientes com UAR. Um dos grupos apresentava lesões persistentes e níveis séricos normais de ferro, vitamina B₁₂ e de ácido fólico, enquanto o outro grupo exibia deficiência desses elementos. Os níveis de cortisol e de ansiedade do primeiro grupo foram significativamente mais altos em relação ao segundo, no qual as lesões regrediram quando os valores de ferro, de vitamina B₁₂ e de ácido fólico foram corrigidos. Os autores verificaram que, em alguns pacientes, a ansiedade e o estresse têm papel importante no desenvolvimento das lesões, porém o mecanismo de como estas alterações psicológicas predisõem à ocorrência de UAR ainda não é conhecido.

Albanidou-Farmaki et al. (2008) analisaram os níveis de cortisol salivar e sérico, bem como de ansiedade de 38 pacientes com aftas e 38 pacientes-controle. Os pacientes de ambos os grupos não apresentaram outras doenças e os exames hematológicos encontraram-se dentro da normalidade. A ansiedade foi medida por meio do instrumento *Spielberger's State-Trait Anxiety Inventory* (STAI) e o cortisol foi analisado por *Luminenscent Immunoassay* (LIA). Os níveis de cortisol salivar, sérico e de ansiedade foram significativamente mais elevados no grupo com UAR.

Concentrações elevadas de cortisol salivar foram também encontradas em pacientes com outras doenças bucais tais como a SAB (AMENÁBAR et al., 2008) e o líquen plano oral (LPO) (KORAY et al., 2003; SHAH; ASHOK; SUJATHA, 2009). Amenábar et al. (2008) analisaram os níveis de cortisol salivar e de ansiedade de 30 pacientes com SAB e de 30 pacientes-controle, encontrando níveis mais elevados desse hormônio e escores superiores de ansiedade em indivíduos com a doença.

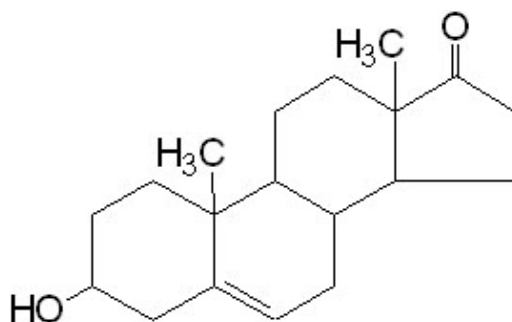
Koray et al. (2003) mediram as concentrações de cortisol salivar de 40 pacientes com LPO e investigaram a sua associação com níveis de ansiedade. Nos pacientes com a doença os níveis de cortisol e os escores de ansiedade foram mais elevados quando comparados aos indivíduos-controle, porém, não foi encontrada correlação entre estas variáveis, presumivelmente pela etiologia complexa do LPO, dependente de fatores genéticos e ambientais, bem como do estilo de vida desses pacientes. Shah, Ashok e Sujatha (2009) analisaram os níveis de cortisol e os escores de depressão, ansiedade e estresse em 30 pacientes com LPO, utilizando a *Depression, Anxiety and Stress Scale* (DASS). Foram encontrados escores de depressão, ansiedade e estresse, bem como níveis de cortisol mais elevados em pacientes com essa enfermidade.

2.3 DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

A DHEA (Figura 2) é um esteróide produzido pelo córtex da glândula adrenal, pelas gônadas e pelo SNC, razão pela qual é também chamada de neuroesteróide (NIESCHLAG et al., 1973). A DHEA e sua forma sulfatada (DHEAS) são os esteróides circulantes mais abundantes em humanos e, apesar de não apresentarem atividade androgênica intrínseca, ambas são precursoras de andrógenos e estrógenos potentes e podem ser convertidas na maioria dos tecidos

periféricos em testosterona, di-idrotestosterona e estrona. Cerca de 98% da DHEA circulante na corrente sanguínea é ligada à albumina e apenas 2% está na forma livre, ou seja, biologicamente ativa (BECKER, 2001).

Figura 2 - Molécula de DHEA



Fonte: <http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.html>
Acesso em agosto de 2010.

A secreção da DHEA também está sob controle do eixo HPA, sendo dessa forma, estimulada pela produção de ACTH (BEISHUIZEN; THIJIS; VERMES, 2002). A DHEA exibe ritmo circadiano, com pico de elevação matinal, declínio durante o dia, secreção mínima à noite e elevação abrupta durante o sono profundo (BECKER et al., 2001). Embora as concentrações de DHEA no sangue oscilem em paralelo com as de cortisol, esse hormônio parece não sofrer controle de *feedback* a nível do eixo HPA (BEISHUIZEN; THIJIS; VERMES, 2002). A DHEA tem meia-vida curta (30 minutos ou menos), enquanto a sua forma sulfatada (DHEAS) tem meia-vida biológica mais longa (7-10 h) (LONGCOPE, 1996).

A secreção da DHEA exibe variação marcante ao longo das diferentes faixas etárias. Inicia-se antes dos oito anos de idade e segue um padrão característico ao longo da vida, alcançando concentrações orgânicas mais elevadas entre os 25 e 35 anos de idade (BELANGER et al., 1994; PALMERT et al., 2001). Ahn et al. (2007) encontraram níveis matinais de DHEA em torno de 0,79 nmol/L, em pacientes com idades entre 20 e 50 anos, havendo redução significativa desse esteróide em indivíduos com mais de 50 anos, com níveis de cerca de 0,62 nmol/L. Segundo

Gruenewald e Matsumoto (2001), nas oitava e nona décadas de vida a produção de DHEA diminui para 10 a 20% em relação às concentrações de adultos jovens. O fato de o cortisol não ter a sua liberação suprimida pela idade faz com que o ambiente neural fique mais exposto a este glicocorticoide, sem a ação moderadora da DHEA, o que poderia causar o surgimento de deficiências cognitivas, depressão, ansiedade e estresse (HERBERT, 1997; FERRARI et al., 2001).

Níveis baixos de DHEA estão relacionados com pior bem-estar psicológico (VAN NIEKERK; HUPPERT; HERBERT, 2001) e com depressão (MICHAEL et al., 2000). Estudos em adultos e adolescentes com diagnóstico de depressão maior sugerem que esta doença pode estar associada a uma variação circadiana desordenada das concentrações de DHEA (TORDJMAN et al., 1995; GOODYER et al., 1996). Goodyer et al. (1996) investigaram os níveis salivares deste esteróide em 82 adolescentes com depressão maior, com idades entre 8 e 16 anos, e evidenciaram elevados níveis salivares noturnos de cortisol e baixos níveis salivares matinais de DHEA. Herbert et al. (1996) associaram alterações psicológicas como pânico e fobia com níveis reduzidos de DHEA salivar matinal em 68 adolescentes. Michael et al. (2000) constataram que os níveis salivares matinais de DHEA de um grupo de pacientes adultos, com idades entre 20 e 64 anos, eram inversamente proporcionais aos índices de depressão.

Elevação na relação entre cortisol/DHEA foi encontrada por Young, Gallagher e Porter (2002) e Markopoulou et al. (2009) em pacientes com depressão. Por outro lado, Shirotaki et al. (2009) encontraram redução na relação cortisol/DHEA em pacientes submetidos a repetidas situações estressoras e de ansiedade. Níveis diminuídos de DHEA foram também encontrados em pacientes com doenças cardiovasculares, doenças degenerativas, tumores malignos, artrite reumatoide e Aids, em indivíduos que sofreram queimaduras, com anorexia nervosa, síndrome de Cushing, diabetes, esquizofrenia e doença de Alzheimer (KROBOTH et al., 1999; WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BECKER, 2001).

A DHEA antagoniza vários efeitos biológicos dos glicocorticoides *in vivo*, protegendo células do hipocampo do estresse oxidativo, o que pode contribuir contra doenças do envelhecimento. Segundo Charalampopoulos et al. (2008), a DHEA tem ação neuroprotetora, exercendo efeitos anti-apoptóticos importantes na prevenção de atrofia cerebral e de doenças degenerativas como mal de Parkinson, esclerose múltipla e doença de Alzheimer, nas quais se evidencia a redução dos níveis desse

esteróide. Tem sido proposto que a diminuição das concentrações de DHEA em idosos contribui para a desregulação do equilíbrio das citocinas Th1 e Th2, reduzindo os níveis de Th1 e aumentando os de Th2 (HAZELDINE; ARLT; LORD, 2010). Porém os mecanismos desse processo ainda são desconhecidos (SVEC; PORTER, 1998; KIMONIDES et al., 1999; BASTIANETTO et al., 1999).

A DHEA também parece atuar como potente imunomodulador, no restabelecimento das funções das células imunes e na diminuição da suscetibilidade a infecções (EBELING; KAIVISTO, 1994; OBERBECK et al., 2001). No estresse crônico pode haver aumento dos níveis de glicocorticoides e diminuição das concentrações plasmáticas de DHEA, com conseqüente redução da imunidade celular (BAUER, 2005). Condições como essas podem ser verificadas na artrite reumatoide, no lúpus eritematoso sistêmico, em pacientes infectados pelo HIV, na AIDS dentre outras doenças (CHEN; PARKER JUNIOR, 2004).

Segundo Becker (2001) e Chen e Parker Junior (2004), os efeitos anti-inflamatórios da DHEA incluem a inibição da secreção de radicais livres e do TNF- α , diminuindo danos teciduais. Solano et al. (2008) verificaram que a DHEA inibe a proliferação de células T. A suplementação com DHEA pode suprimir a resposta Th1 ou Th2, pois esse esteróide suprime a produção de IFN- γ , que por sua vez inibe as células Th2, dependendo da dose administrada (CHOI et al., 2008).

Field et al. (1994) demonstraram que indivíduos fumantes exibem concentrações séricas de DHEA superiores às de não-fumantes. Pierucci-Lagha et al. (2006) demonstraram os efeitos da ingestão de álcool nos níveis de DHEA. Quarenta minutos após ingerirem bebidas alcoólicas, os pacientes apresentaram elevação dos níveis séricos de DHEA. Os níveis desse hormônio não são alterados pelo ciclo menstrual, porém há diminuição de sua concentração na urina em pacientes que fazem uso de contraceptivo oral (BAYLE et al., 2009).

Dias Fernandes et al. (2009) analisaram as concentrações salivares de DHEA em pacientes do sexo feminino com a SAB. Pacientes com a síndrome exibiram níveis salivares de DHEA inferiores aos de indivíduos-controle do mesmo sexo e faixa etária. Permanece controverso se a redução dos níveis desse hormônio representa uma resposta adaptativa à síndrome, ou se é responsável pelo agravamento e perpetuação dos sintomas dessa doença.

Girardi et al. (2011) analisaram os níveis salivares de cortisol, DHEA, a relação entre esses esteróides, bem como os escores de depressão, ansiedade e

estresse em 31 pacientes com LPO. Os pesquisadores não encontraram diferença significativa desses esteróides, da relação cortisol/DHEA, nem das variáveis psicológicas entre pacientes portadores da doença em relação ao grupo-controle.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as concentrações salivares de cortisol e de DHEA, bem como os níveis de estresse e de ansiedade em pacientes com UAR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as concentrações salivares dos hormônios cortisol e DHEA de pacientes com UAR, durante um episódio de lesão e após a sua remissão, e compará-las às de indivíduos-controle.
- Avaliar por meio de escalas psicométricas, os níveis de estresse e de ansiedade de pacientes com UAR e compará-los aos de indivíduos-controle.
- Determinar a relação (*ratio*) entre os hormônios cortisol e DHEA em pacientes com UAR, durante um episódio de lesão e após a sua remissão, e compará-la à de pacientes-controle.
- Verificar se há associação entre a presença de estresse e as concentrações salivares de cortisol e de DHEA em pacientes com UAR e controles.
- Verificar se há correlação entre os escores de ansiedade e as concentrações salivares de cortisol e de DHEA em pacientes com UAR e indivíduos-controle.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (Anexos A e B). Os pacientes que constituíram a amostra foram esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo e após concordarem em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo clínico transversal, controlado e observacional (ESTRELA, 2001; PEREIRA, 2001; JEKEL, 2002).

4.3 VARIÁVEIS

- **Independente:** a presença de UAR.
- **Dependentes:** as concentrações salivares de cortisol e de DHEA e os escores de estresse e de ansiedade.

4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra foi constituída por 60 (sessenta) indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 50 anos que foram distribuídos em:

- Grupo-caso: 30 pacientes com UAR.
- Grupo-controle: 30 pacientes sem histórico conhecido de UAR, emparelhados por sexo e idade com os pacientes do grupo-caso.

Os pacientes do grupo-caso foram selecionados no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUC e na Policlínica da Polícia Civil do Estado do Rio Grande do Sul (RS). Os indivíduos-controle, selecionados na Policlínica da Polícia

Civil (RS), na sua maioria foram servidores do quadro administrativo, bem como seus familiares e estagiários.

4.4.1 Critérios de Inclusão

- **Grupo-caso:** foram incluídos pacientes acometidos por UAR, nas suas diferentes formas clínicas, com evolução de até 72 horas (três dias). Os pacientes deveriam referir no mínimo dois episódios da doença no último ano. Estes pacientes foram também avaliados após a remissão da (s) lesão (ões).
- **Grupo-controle:** foram incluídos pacientes que não apresentaram histórico conhecido de UAR.

4.4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos que:

- Apresentassem lesões erosivas, ulceradas (exceto UAR) ou de natureza infecciosa na mucosa bucal.
- Fossem portadores de doenças sistêmicas como lúpus eritematoso, síndrome de Behçet, doença de Crohn, doença celíaca, síndrome de Sjögren, neutropenia cíclica, AIDS ou soropositivos para o HIV.
- Fossem portadores da SAB.
- Apresentassem neoplasias malignas ou histórico de tratamento quimioterápico ou radioterápico.
- Fossem fumantes.
- Fizessem uso de medicamentos antidepressivos, ansiolíticos, corticosteróides ou repositores hormonais.
- Apresentassem alterações no hemograma, nas concentrações séricas de glicose, de ferro, de ácido fólico, de vitamina B₁₂ ou FAN (fator anti-nuclear) reagente com títulos iguais ou superiores a 1:160.

4.5 PROCEDIMENTOS

Para cada indivíduo da amostra foi preenchida uma ficha (Apêndice B) com

dados de identificação, informações referentes à anamnese e ao exame físico, bem como com os resultados dos exames laboratoriais citados a seguir.

Durante a anamnese foram registrados a história médica e os medicamentos utilizados pelo paciente. Os indivíduos com UAR foram questionados quanto ao tempo de evolução da doença, a duração da(s) lesão(ões), a frequência de ocorrência dos episódios e se os associava com alguma causa.

Posteriormente, foi realizado o exame físico intrabucal. Para os pacientes com UAR, foram registrados o número de lesões, sua localização e tamanho. Para o diagnóstico da UAR foram utilizados os critérios estabelecidos por Jurge et al. (2006). Para todos os pacientes deste estudo foram solicitados hemograma, glicemia, anti-HIV, fator anti-nuclear (FAN), concentrações séricas de ferro, de ácido fólico e de vitamina B₁₂.

4.5.1 Instrumentos para a investigação dos sintomas de estresse e ansiedade

Para a investigação dos sintomas de estresse e de ansiedade foram aplicados, por uma psicóloga, instrumentos psicométricos validados para a população brasileira e reconhecidos pelo Conselho Federal de Psicologia, por meio de parecer favorável datado de 06/11/2003.

Para a avaliação dos sintomas de ansiedade foi utilizada a versão em português do Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) (CUNHA, 2001) (Anexo C). Esta versão foi validada para ser utilizada em pacientes psiquiátricos e não psiquiátricos, assim como na população em geral, com idade mínima de 17 anos. O BAI contém 21 itens, cada qual com escala de quatro pontos que refletem níveis crescentes de cada sintoma de ansiedade.

Para avaliação do estresse foi utilizado o Inventário de Sintomas de *Stress* para adultos de Lipp (ISSL), que inclui um modelo quadrifásico para estudos de estresse (Anexo D). O ISSL é composto por três quadros que referem os sintomas relacionados com o estresse experimentados pelo indivíduo nas últimas 24 horas (quadro 1), última semana (quadro 2) e último mês (quadro 3), resultando na identificação de quatro estágios que correspondem às fases de *alarme*, *resistência*, *quase exaustão* e *exaustão* ao estresse. Cada quadro é ainda subdividido em *a*, que representa sintomas físicos, e *b*, referente a sintomas psicológicos do estresse. Esse inventário inclui 37 itens de natureza fisiológica e 19 de caráter psicológico.

No grupo-caso os instrumentos psicométricos foram aplicados na primeira avaliação, ou seja, na presença de lesões.

4.5.2 Coleta das amostras de saliva

A saliva foi coletada em três momentos, no mesmo dia: entre 7 h e 9 h (antes do café da manhã), entre 11 h e 13 h (antes do almoço) e entre 19 h e 21 h (antes do jantar). Foram utilizados potes descartáveis, transparentes, de polipropileno, com capacidade de 60 mL, devidamente identificados para cada período de coleta (Figura 3).

Figura 3. Recipientes contendo a saliva coletada pela manhã, à tarde e à noite.



Fonte: A autora (2011).

Foram fornecidas, verbalmente e por escrito, as seguintes orientações para os indivíduos de ambos os grupos realizarem a coleta de saliva:

- não ingerir bebida alcoólica nas 24 h anteriores;
- não ingerir alimentos ou bebidas, nem colocar qualquer substância na boca, inclusive não escovar os dentes, por no mínimo uma hora antes da coleta;
- não aplicar fármacos ou produtos cosméticos nos lábios (tais como batom, cremes ou manteiga de cacau);
- enxaguar a boca com água previamente;
- manter-se sentado e com os olhos abertos;
- depositar a saliva no frasco de coleta, conforme o acúmulo na boca, pelo tempo necessário para que fosse atingida a marca de 1,5 mL;

- armazenar os recipientes no congelador até o dia seguinte quando os mesmos seriam recolhidos pela pesquisadora.

Os frascos foram recolhidos pela pesquisadora em caixas de isopor com gelo e armazenados em freezer a -20°C o que permite o rompimento das mucinas salivares, até a data das análises (MANIGA; GOLINSKY, 2001).

Para o grupo-caso as amostras de saliva foram coletadas em dois momentos:

a) Presença de lesões: respeitando o limite de até 72 h de evolução.

b) Remissão das lesões: no mínimo uma semana após a remissão das lesões.

As amostras do grupo-caso e as do grupo-controle foram coletadas entre segunda e sexta-feira.

4.5.3 Análises das concentrações salivares de cortisol e DHEA

As amostras de cada período de coleta (manhã, tarde e noite) foram analisadas separadamente permitindo avaliar a variação circadiana dos esteróides. As análises foram realizadas em duplicata e em baterias seriadas, por meio da técnica de radioimunoensaio (RIE). As amostras foram descongeladas, transferidas para tubos de polipropileno e centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm (rotações por minuto) para separação das mucinas salivares. Para análise foi utilizado o sobrenadante das amostras (Figura 4).

Figura 4 - Precipitação da mucina no tubo de polipropileno, após a centrifugação.



Fonte: A autora (2011).

Para análise do cortisol salivar foi empregado o *Kit Coat-A-Count® Cortisol* (Siemens Medical Solutions Diagnostic, Los Angeles, Califórnia, USA), com anticorpo monoclonal específico para este hormônio (Figura 5). As concentrações de cortisol foram determinadas em um único dia com *kits* do mesmo lote de fabricação, seguindo as especificações do fabricante. O princípio do teste é o da fase sólida, o anticorpo já vem aderido ao tubo-teste e os níveis de cortisol da amostra competem com o cortisol radioativo (cortisol I¹²⁵) pelos sítios do anticorpo contido no tubo. Após o período de incubação de 24 horas, em temperatura ambiente (25°C), o sobrenadante foi aspirado e a radiação remanescente em cada tubo foi mensurada. A sensibilidade analítica do ensaio é de 0,11 µg/dL ou 3,03 nmol/L (Anexo E).

Figura 5 - *Kit Coat-A-Count* cortisol para análise das concentrações de cortisol nas amostras salivares.



Fonte: A autora (2011).

A determinação da DHEA nas amostras salivares foi realizada com *kit* com anticorpo monoclonal e específico para DHEA (DSL®-8900 DHEA RIA - *Diagnostics Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas – USA*) (Granger, 1999) (Figura 6). As análises foram realizadas em único um dia e com *kits* do mesmo lote, seguindo as especificações do fabricante. O ensaio seguiu o princípio competitivo da fase líquida, em que o esteróide contido na amostra compete com a DHEA marcada com I¹²⁵

pelos sítios de ligação ao anticorpo específico. As moléculas ligadas ao anticorpo, após o período de incubação de 24 horas, foram precipitadas por centrifugação e a concentração de DHEA da amostra foi determinada pela contagem da radiação do precipitado. A sensibilidade analítica do ensaio é de 0,025 µg/mL ou 0,09 nmol/L (Anexo F).

Figura 6. *Kit DHEA RIA* para análise das concentrações de DHEA nas amostras salivares.



Fonte: A autora (2011).

Para contagem da radiação dos ensaios foi utilizado o contador *Gamma C12*[®] (EURO-DPC) (Figura 7) durante um minuto para o cortisol e dois minutos para a DHEA. Os resultados foram calculados pelo software específico do equipamento.

Figura 7. Tubos de polipropileno acondicionados no contador Gamma C12® (EURO-DPC) e monitor mostrando a contagem da radiação gama remanescente dos ensaios por meio do software específico do equipamento.



Fonte: A autora (2011)

Para a todas as etapas dos procedimentos, foram adotadas as precauções necessárias inerentes para materiais radioativos.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 11.0. As variáveis foram analisadas, inicialmente, por meio de estatística descritiva. As variáveis qualitativas foram apresentadas por frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de média e desvio-padrão e, quando não satisfizeram a suposição de normalidade, foram representados por mediana e intervalos interquartis (percentil 25 e percentil 75).

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para comparar os escores de ansiedade entre os grupos. O teste Exato de Fischer foi utilizado para as variáveis categóricas: níveis de ansiedade e presença de estresse. O teste t de Student foi utilizado para comparar os grupos quanto à idade. O teste de Mann-Whitney foi também utilizado para comparar os grupos quanto aos níveis salivares de cortisol e DHEA, variação circadiana dos esteróides e relação cortisol/DHEA. Para avaliar a associação entre presença de estresse e níveis de cortisol e DHEA foi aplicado o teste de Mann-whitney. O coeficiente de correlação de Spearmann foi empregado para verificar a correlação entre os escores de ansiedade e os níveis salivares dos hormônios. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Em ambos os grupos, 22 (73,3%) indivíduos eram do sexo feminino e oito (26,7%) do masculino, com idades variando entre 18 e 50 anos. A média de idade do grupo-caso foi de 31,8 ($\pm 11,06$) anos e do grupo-controle de 32,1 ($\pm 11,04$) anos, sem diferença significativa entre ambos quanto a esta variável (teste t de Student, $p=0,917$).

Todos os pacientes do grupo-caso apresentaram UAR do tipo menor (Figura 8), totalizando 51 lesões. Os sítios acometidos estão relacionados na tabela 1.

Figura 8 - Múltiplas ulcerações aftosas recorrentes do tipo menor.



Fonte: Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital São Lucas da PUC/RS (2011).

Tabela 1- Distribuição dos casos de UAR segundo a localização das lesões

Sítios de localização das lesões	n	%
Língua	18	35,3
Bordas laterais	9	17,6
Ápice	5	9,8
Ventre	4	7,8
Mucosa labial	17	33,3
Fundo de sulco	9	17,6
Gengiva	3	5,9
Mucosa jugal	2	3,9
Assoalho	2	3,9
Total	51	100

n= frequência; %= porcentagem

Fonte: A autora (2011).

Quanto ao tempo de evolução, 17 (56,7%) pacientes relataram apresentar a doença desde a infância, sete (23,3%) desde a adolescência, enquanto seis (20%) referiram ser acometidos pela primeira vez na idade adulta. A frequência de aparecimento das lesões variou de três vezes ao mês a duas vezes ao ano.

Ao serem questionados quanto ao agente causal que poderia estar associado ao desencadeamento das úlceras, 30% dos pacientes citaram o estresse, 30% não associaram as lesões a uma causa específica, 20% as relacionaram a alimentos, 10% a agentes traumáticos e 10% à alimentação e ao estresse.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS PACIENTES-CASO E CONTROLES

Os testes psicométricos (BAI e ISSL) foram aplicados uma vez em cada grupo, sendo que no grupo-caso foram empregados em fase de presença de lesões. Neste grupo, as concentrações salivares dos esteróides foram analisadas em dois momentos, na presença de UAR e, no mínimo, uma semana após sua remissão.

5.2.1 Sintomas de ansiedade e de estresse

No grupo-caso, os escores do Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) variaram de 0 a 48 pontos, com mediana de 8 (3,0 -10,3). No grupo-controle, esses

escores variaram de 0 a 7 pontos, com mediana de 2 (1,0-5,3). Foi observada diferença significativa entre os grupos quanto a esta variável (teste de Mann-Whitney, $p < 0,001$) (tabela 2).

Tabela 2 – Escores de ansiedade dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BAI.

Escore do BAI	Grupo-caso		Grupo-controle		p
	Mediana	Percentil 25-75	Mediana	Percentil 25-75	
	8,0	3,0 - 10,3	2,0	1,0 - 5,3	<0,001

Teste de Mann-Whitney; $p < 0,001$
 Fonte: A autora (2011).

Quando os escores de ansiedade foram categorizados em mínimo/leve e moderado/grave, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle (Teste exato de Fischer; $p = 0,492$) (tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de ansiedade

Níveis de ansiedade	Grupo-caso n (%)	Grupo-controle n (%)	Total n (%)
Mínimo/ Leve	28 (93,33)	30 (100)	58 (96,67)
Moderado/ Grave	2 (6,67)	-	2 (3,33)
Total	30 (100)	30 (100)	60 (100)

Teste exato de Fischer; $p = 0,492$
 n= frequência, %= porcentagem
 Fonte: A autora (2011).

Os pacientes com UAR e controles foram categorizados de acordo com a presença de estresse, conforme os escores do inventário ISSL (tabela 4). Enquanto 19 pacientes-caso apresentavam estresse, esta alteração psicológica foi observada em sete pacientes do grupo-controle. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste exato de Fischer, $p = 0,004$).

Tabela 4. Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença de estresse.

Presença de Estresse	Grupo-caso n (%)	Grupo-controle n (%)	Total n (%)
Sem estresse	11 (36,67)	23 (76,67)	34 (56,67)
Com estresse	19 (63,33)	7 (23,33)	26 (43,33)
Total	30 (100)	30 (100)	60 (100)

Teste exato de Fischer; $p=0,004$

n= frequência, %= porcentagem

Fonte: A autora (2011)

A tabela 5 apresenta a distribuição dos 26 pacientes que apresentaram estresse de acordo com as fases desta alteração psicológica (alerta, resistência, quase exaustão e exaustão) e quanto ao tipo de sintomas predominantes (físicos, psicológicos ou ambos).

Tabela 5- Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto às fases e tipos de sintomas de estresse.

	Grupo-caso n (%)	Grupo-controle n (%)	Total n (%)
	0	0	0
	14 (53,8)	6 (23)	20 (76,9)
Fases de estresse	1 (3,8)	0	1 (3,8)
	4 (15,4)	1 (3,8)	5 (19,2)
Total	19 (73)	7 (26,9)	26 (100)
	9 (34,6)	3 (11,5)	12 (46,1)
Tipos de sintomas de estresse	7 (26,9)	4 (15,4)	11 (42,3)
	3 (11,5)	0	3 (11,5)
Total	19 (73)	7 (26,9)	26 (100)

Fonte: A autora (2011)

5.2.2 Concentrações salivares de cortisol e de DHEA

As concentrações salivares de cortisol e de DHEA, bem como as reduções percentuais desses esteróides e o *ratio* entre ambos foram comparadas entre os grupos nos turnos da manhã, da tarde e da noite.

5.2.2.1 Grupo-caso em presença e em remissão de UAR

Quando as concentrações de cortisol foram comparadas entre os pacientes do grupo-caso em presença e em remissão de UAR, foram evidenciados valores significativamente superiores nos pacientes com lesões nas amostras da manhã e da tarde (teste de Mann-Whitney, $p=0,008$, $p=0,001$). Nas amostras salivares da noite não foi constatada diferença significativa ($p=0,065$) (tabela 6). Também não houve diferença significativa quanto às concentrações de DHEA nas amostras da manhã, da tarde ou da noite (tabela 6).

Tabela 6 – Concentrações salivares de cortisol e de DHEA no grupo-caso em presença e em remissão de UAR.

	Grupo-caso Presença de UAR Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Grupo-caso Remissão de UAR Mediana (P25-P75) (nmol/L)	p
Cortisol M	15,80 (11,70-21,83)	12,95 (9,40-16,10)	0,008
Cortisol T	8,05 (6,85-9,18)	6,00 (5,20-7,43)	0,001
Cortisol N	3,20 (2,88-3,98)	2,60 (2,20-3,80)	0,065
DHEA M	0,70 (0,55-1,03)	0,68 (0,57-0,81)	0,365
DHEA T	0,47 (0,38-0,67)	0,43 (0,38-0,54)	0,144
DHEA N	0,22 (0,16-0,33)	0,21 (0,17-0,25)	0,130

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011)

A redução percentual das concentrações salivares de cortisol e de DHEA entre as amostras da manhã e da tarde, bem como da tarde e da noite não diferiu significativamente entre os pacientes-caso em presença e em remissão de UAR (tabela 7).

Tabela 7. Redução percentual das concentrações salivares de cortisol e de DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em presença e em remissão de UAR.

	Grupo-caso Presença de UAR Mediana (P25-P75) (%)	Grupo-caso Remissão de UAR Mediana (P25-P75) (%)	p
Cortisol M-T	-48,12 (59,22-40,04)	-51,37 (56,57-44,04)	0,688
Cortisol T-N	-59,05 (65,61-52,64)	-57,34 (62,20-50,45)	0,159
DHEA M-T	-31,87 (46,15-27,93)	-31,72 (42,05-28,34)	0,797
DHEA T-N	-52,95 (59,13-35,33)	-52,15 (58,33-42,03)	0,992

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

O *ratio* cortisol/DHEA foi significativamente superior no grupo-caso em presença de UAR, nas amostras do turno da tarde (teste de Mann-Whitney, $p=0,007$). Não houve diferença significativa quanto ao *ratio* cortisol/DHEA nas amostras salivares da manhã ou da noite (tabela 8).

Tabela 8. *Ratio* cortisol/DHEA das amostras salivares do grupo-caso em presença e em remissão de UAR.

	Grupo-caso Presença de UAR Mediana (P25-75) (nmol/L)	Grupo-caso Remissão de UAR Mediana (P25- 75) (nmol/L)	p
Cortisol/DHEA M	20,75 (18,78-28,13)	20,24 (14,59-24,20)	0,054
Cortisol/DHEA T	16,95 (15,07-20,87)	14,68 (12,49-16,68)	0,007
Cortisol/DHEA N	14,37 (10,60-17,30)	13,34 (10,00-17,29)	0,586

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

5.2.2.2 Grupo-caso em presença de UAR e grupo-controle

Quando as concentrações salivares de cortisol foram comparadas entre o grupo-caso em presença de UAR e o grupo-controle, não houve diferença estatisticamente significativa nas amostras da manhã, tarde ou noite. Também não foi observada diferença entre estes grupos quanto às concentrações salivares de DHEA nos três turnos de coleta (tabela 9).

Tabela 9 – Concentrações salivares de cortisol e de DHEA nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.

	Grupo-caso	Grupo-controle	p
	Presença de UAR		
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol M	15,80 (11,70-21,83)	14,50 (12,20-17,30)	0,258
Cortisol T	8,05 (6,85-9,18)	7,25 (6,48-8,65)	0,083
Cortisol N	3,20 (2,88-3,98)	2,85 (2,50-4,10)	0,180
DHEA M	0,70 (0,55-1,03)	0,66 (0,55-0,83)	0,420
DHEA T	0,47 (0,38-0,67)	0,45 (0,36-0,53)	0,620
DHEA N	0,22 (0,16-0,33)	0,22 (0,17-0,29)	0,615

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

Não houve diferença entre esses grupos quanto à redução percentual das concentrações salivares de cortisol e de DHEA entre as amostras da manhã e da tarde ou da tarde e da noite (tabela 10).

Tabela 10. Redução percentual das concentrações de cortisol e DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em presença de UAR e no grupo-controle

	Grupo-caso	Grupo-controle	p
	Presença de UAR		
	Mediana (P25-P75) (%)	Mediana (P25-P75) (%)	
Cortisol M-T	-48,12 (59,22-40,04)	-50,88 (59,16-42,66)	0,802
Cortisol T-N	-59,05 (65,61-52,64)	-59,97 (65,64-50,64)	0,923
DHEA M-T	-31,87 (46,15-27,93)	-32,20 (39,32-27,31)	0,595
DHEA T-N	-52,95 (59,13-35,33)	-50,13 (60,50-43,89)	0,600

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

Ao avaliar-se o *ratio* cortisol/DHEA, também não foi observada diferença significativa entre o grupo-caso em presença de UAR e o grupo-controle nas amostras salivares da manhã, da tarde ou da noite (tabela 11).

Tabela 11. *Ratio* cortisol/DHEA das amostras salivares do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.

	Grupo-caso		p
	Presença de UAR		
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol/DHEA M	20,75 (18,78-28,13)	21,55 (18,89-25,47)	0,988
Cortisol/DHEA T	16,95 (15,07-20,87)	16,32 (14,06-18,75)	0,442
Cortisol/DHEA N	14,37 (10,60-17,30)	13,58 (10,89-16,62)	0,706

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

5.2.2.3 Grupo-caso em remissão de UAR e grupo-controle

Ao comparar-se o grupo-caso em fase de remissão de UAR com o grupo-controle, foi observada diferença significativa entre as concentrações de cortisol nas amostras do turno da tarde, que foram superiores nos pacientes-controle (teste de Mann-Whitney, $p=0,025$). Não houve diferença entre estes grupos quanto às concentrações de cortisol nas amostras da manhã e da noite. Também não houve diferença quanto às concentrações salivares de DHEA pela manhã, à tarde ou à noite (tabela 12).

Tabela 12 – Concentrações salivares de cortisol e de DHEA dos pacientes do grupo-caso em remissão de UAR e do grupo-controle.

	Grupo-caso		p
	Remissão de UAR		
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol M	12,95 (9,40-16,10)	14,50 (12,20-17,30)	0,110
Cortisol T	6,00 (5,20-7,43)	7,25 (6,48-8,65)	0,025
Cortisol N	2,60 (2,20-3,80)	2,85 (2,50-4,10)	0,242
DHEA M	0,68 (0,57-0,81)	0,66 (0,55-0,83)	0,712
DHEA T	0,43 (0,38-0,54)	0,45 (0,36-0,53)	0,574
DHEA N	0,21 (0,17-0,25)	0,22 (0,17-0,29)	0,609

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011).

Não houve diferença significativa quanto à redução das concentrações dos hormônios cortisol e DHEA entre as amostras salivares da manhã e da tarde ou da tarde e da noite quando o grupo-caso em remissão de UAR foi comparado com o grupo-controle (tabela 13).

Tabela 13. Redução percentual das concentrações de cortisol e DHEA entre os três turnos de coleta no grupo-caso em remissão de UAR e no grupo-controle.

	Grupo-caso	Grupo-controle	
	Remissão de UAR		p
	Mediana (P25-P75) (%)	Mediana (P25-P75) (%)	
Cortisol M-T	-51,37 (56,57-44,04)	-50,88 (59,16-42,66)	0,658
Cortisol T-N	-57,34 (62,20-50,45)	-59,97 (65,64-50,64)	0,371
DHEA M-T	-31,72 (42,05-28,34)	-32,20 (39,32-27,31)	0,289
DHEA T-N	-52,15 (58,33-42,03)	-50,13 (60,50-43,89)	0,894

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora (2011)

Quanto ao *ratio* cortisol/DHEA, também não foi constatada diferença significativa nas amostras salivares do grupo-caso em remissão de UAR e do grupo-controle (tabela 14).

Tabela 14. *Ratio* cortisol/DHEA das amostras salivares do grupo-caso em remissão de UAR e do grupo-controle.

	Grupo-caso	Grupo-controle	
	Remissão de UAR		p
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol/DHEA M	20,24 (14,59-24,20)	21,55 (18,89-25,47)	0,152
Cortisol/DHEA T	14,68 (12,49-16,68)	16,32 (14,06-18,75)	0,098
Cortisol/DHEA N	13,34 (10,00-17,29)	13,58 (10,89-16,62)	0,802

M=manhã, T=tarde, N=noite

Teste de Mann-Whitney, significativo se $p \leq 0,05$

Fonte: A autora (2011)

5.2.3 Correlação e associação entre as concentrações salivares de cortisol e de DHEA com os sintomas de ansiedade e de estresse

O Coeficiente de Correlação de Spearman foi empregado para verificar a correlação entre as concentrações de cortisol e de DHEA com os escores de ansiedade. Não foi observada correlação significativa entre essas variáveis (tabela 15).

Tabela 15. Correlação entre as concentrações salivares de cortisol e de DHEA com os escores de ansiedade nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR e do grupo-controle.

	Grupo-caso		Grupo-controle	
	Presença de UAR Coeficiente de correlação de Spearman	p	Coeficiente de Correlação de Spearman	p
Cortisol M	-0,090	0,635	0,131	0,490
Cortisol T	-0,068	0,722	0,296	0,113
Cortisol N	-0,096	0,614	0,253	0,178
DHEA M	-0,099	0,603	0,199	0,292
DHEA T	-0,009	0,963	0,309	0,097
DHEA N	-0,308	0,098	0,283	0,130

Legenda: M=manhã; T=tarde; N=noite
Fonte A autora (2011).

As concentrações de cortisol e de DHEA não exibiram associação com o estresse no grupo-caso, em presença de UAR (teste de Mann-Whitney) (tabela 16). No grupo-controle houve associação entre as concentrações de cortisol e a presença de estresse no turno da tarde ($p=0,008$). As concentrações salivares de DHEA não exibiram associação com o estresse (tabela 17).

Tabela 16. Associação entre as concentrações salivares de cortisol e DHEA com a presença de estresse nos pacientes do grupo-caso em presença de UAR.

	Sem estresse	Com estresse	p
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol M	19,60 (14,40-22,50)	14,60 (11,30-20,60)	0,067
Cortisol T	8,10 (7,40-10,50)	8,00 (6,60-8,90)	0,333
Cortisol N	3,20 (3,00-4,20)	3,20 (2,50-3,90)	0,546
DHEA M	0,96 (0,55-1,21)	0,67 (0,54-0,98)	0,366
DHEA T	0,52 (0,39-0,72)	0,45 (0,36-0,67)	0,301
DHEA N	0,32 (0,16-0,40)	0,21 (0,15-0,28)	0,131

Teste de Mann-Whitney

Legenda: M=manhã; T=tarde; N=noite

Fonte: A autora (2011)

Tabela 17. Associação entre as concentrações de cortisol e DHEA com a presença de estresse nos pacientes do grupo-controle.

	Sem estresse	Com estresse	p
	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	Mediana (P25-P75) (nmol/L)	
Cortisol M	13,90 (11,40-17,00)	15,60 (12,70-21,60)	0,211
Cortisol T	6,80 (6,30-7,80)	8,80 (7,40-9,80)	0,008
Cortisol N	2,80 (2,40-4,10)	2,90 (2,60-4,30)	0,376
DHEA M	0,64 (0,53-0,81)	0,76 (0,57-0,98)	0,194
DHEA T	0,45 (0,36-0,52)	0,51 (0,41-0,67)	0,390
DHEA N	0,20 (0,15-0,27)	0,25 (0,20-0,36)	0,065

Teste de Mann-Whitney

Legenda: M=manhã; T=tarde; N=noite

Fonte A autora (2011)

6 DISCUSSÃO

A ulceração aftosa recorrente é uma doença complexa e multifatorial cuja etiologia tem sido associada a fatores psicológicos como estresse e ansiedade (ALBANIDOU-FARMAKI et al., 2008). Estes fatores promovem ativação do eixo HPA, com aumento dos níveis de cortisol, principal hormônio glicocorticoide em humanos (HELLHAMMER; WÜST; KUDIELKA, 2009). Por outro lado, alterações psicológicas estão associadas à redução das concentrações de DHEA, esteróide precursor de estrógenos e andrógenos potentes que parece atuar na patofisiologia da depressão e na modulação da resposta imune (TAUSK; ELENKOV; MOYNIHAN, 2008, SHIROTSUKI et al., 2009). Neste estudo foi investigada a associação da UAR com variáveis psicológicas como estresse e ansiedade, bem como com as concentrações salivares dos esteróides cortisol e DHEA.

A frequência de pacientes com estresse e os escores de ansiedade foram superiores no grupo-caso em comparação ao grupo-controle, emparelhado por sexo e idade. Estes resultados corroboram a literatura, evidenciando uma possível associação das alterações psicológicas investigadas à UAR (BUAJEEB et al., 1990; MCCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996; SOTO-ARAYA; ROJAS-ALCAYAGA; ESGUEP, 2004; ALBANIDOU- FARMAKI et al., 2008). Gallo, Mimura e Sugaya (2009) encontraram níveis mais elevados de estresse em pacientes com aftas. Os autores sugerem que este fator psicológico atue como desencadeante em indivíduos propensos à ocorrência das lesões. O desenvolvimento da UAR depende da perspectiva psicobiológica do indivíduo em resposta ao estímulo estressante, isto é, as consequências do estresse não são uniformes nos pacientes, que podem exibir níveis distintos de manifestações associadas ao mesmo tipo de estresse emocional (CHIAPPELLI; CAJJULIS, 2004).

Além disso, 40% dos pacientes deste estudo, durante a anamnese, associaram o aparecimento das lesões ao estresse, o que reforça a teoria de que este distúrbio psicológico atue como gatilho ao surgimento da UAR. Albanidou-Farmaki et al. (2008) também descrevem que, quando questionados sobre possíveis fatores que predisponham ao desenvolvimento das lesões, muitos pacientes referem um elevado nível de estresse e/ou ansiedade. Situações como exames escolares, tratamentos dentários (KAUFMANN, 1976; MILLER et al., 1995), períodos de grandes mudanças na vida, problemas familiares e profissionais (GALLO; MIMURA;

SUGAYA, 2009) são alguns dos fatores apontados na literatura como desencadeantes de estresse e, conseqüentemente, de UAR.

Por outro lado, Pedersen (1989), utilizando a *Social Readjustment Rating Scale* (SRRS) e a Escala Analógica Visual (VAS), não encontrou diferença significativa entre os níveis de estresse em 22 pacientes com UAR menor, investigados em presença e em fase de remissão das lesões. Nesse estudo, não foram avaliados pacientes-controle, ou seja, sem histórico da doença. Além disso, as escalas utilizadas parecem não ser adequadas para a investigação de estresse e ocorrência de aftas. No presente estudo, para a investigação dos sintomas de estresse foi utilizado o Inventário de Sintomas de *Stress* de Lipp (ISSL) e, para a ansiedade, o Inventário de Ansiedade de Beck (BAI), ambos aplicados por uma psicóloga. Os testes psicométricos foram empregados compreendendo o período máximo de três dias de evolução das lesões para que os resultados fossem fidedignos em relação às alterações psicológicas apresentadas pelos pacientes. O ISSL e o BAI apresentam alta confiabilidade e elevada consistência interna, podendo ser aplicados tanto em pacientes psiquiátricos, quanto na população em geral (CUNHA, 2001; LIPP, 2005). Por serem auto-avaliativos e de rápida aplicação, são amplamente utilizados na investigação da ansiedade e do estresse (LIPP, 2005; BECK et al., 1988).

O estresse, a ansiedade e outras alterações psicológicas podem modificar funções imunes, promovendo sua desregulação, o que predispõe ao desenvolvimento de algumas doenças (MARSHALL et al., 1998; WINDLE et al., 2001; BOSCH et al., 2003). Enfermidades tais como SAB (AMENÁBAR et al., 2008), líquen plano (KORAY et al., 2003), psoríase (ARNETZ et al., 1985, EVERS et al., 2010), dermatite atópica (OH et al., 2010), vitiligo (MANOLACHE; BENEVA, 2007) entre outras, têm sido relacionadas a níveis elevados de estresse e de ansiedade. Segundo Elenkov (2004), o estresse agudo ou crônico pode afetar a resposta imune do organismo, com aumento dos níveis de cortisol e desequilíbrio das citocinas Th1/Th2. No desenvolvimento da afta, há desequilíbrio destas citocinas, com aumento da atividade Th1 (OZDEMIR et al., 2011). Além disso, de acordo com Redwine et al. (2003), o estresse promove aumento da quimiotaxia de células mononucleares e da expressão de moléculas de adesão celular, o que contribui para a elevação da migração e do recrutamento de células do sistema imune.

Uma vez que níveis salivares elevados de cortisol têm sido encontrados em pacientes apresentando estresse e ansiedade, no presente estudo foram investigadas as concentrações desse hormônio em indivíduos com UAR. No grupo-caso, a análise salivar foi realizada em presença de lesões e, no mínimo, uma semana após sua remissão, o que possibilitou pesquisar a variação do hormônio em duas condições fisiológicas distintas. Neste grupo os níveis salivares de cortisol das amostras da manhã e da tarde foram superiores em presença de UAR em comparação à fase de remissão das lesões, e um valor *borderline* ($p=0,065$) foi observado no turno da noite. Entretanto, apesar de superiores, as concentrações de cortisol do grupo-caso em presença de UAR não diferiram significativamente quando comparadas às do grupo-controle. Como as amostras de saliva desses indivíduos foram coletadas em até três dias após o surgimento das úlceras, é possível que os níveis de cortisol já não estivessem tão elevados quanto no momento do surgimento das lesões. Nesse período os pacientes já estariam iniciando a fase de adaptação ao estresse, o que explicaria a ausência de diferença significativa em relação aos pacientes-controle. Por outro lado, há relatos na literatura de que a dor pode elevar os níveis de cortisol salivar (GOODIN et al., 2011; RIVA et al., 2011). Segundo Chapman, Tuckett e Song (2008), danos teciduais ou dores crônicas geram uma resposta estressora a qual pode ativar o eixo HPA e, conseqüentemente, elevar os níveis de cortisol. Portanto, não se pode descartar a hipótese de que no presente estudo, os pacientes-caso tenham apresentado elevação dos níveis desse glicocorticoide em presença de UAR como consequência da dor causada pelas lesões.

Observou-se que os pacientes-caso em presença de lesão apresentaram os níveis mais elevados de cortisol salivar. Os pacientes-controle obtiveram níveis intermediários e as menores concentrações deste esteróide foram encontradas nos pacientes-caso em fase de remissão da UAR. A elevação dos níveis de cortisol após estímulo, promove *feedback* negativo, que se caracteriza pela redução da secreção de ACTH a nível de hipotálamo, com conseqüente diminuição da produção de cortisol (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991). Provavelmente, por essa razão os níveis de cortisol foram menores nos pacientes-caso após a remissão das lesões em comparação aos pacientes-controle. Os níveis de cortisol no grupo-controle foram semelhantes aos encontrados em outros estudos da literatura (WIRTZ et al., 2007; WINGEFELD et al., 2010).

Os níveis salivares de cortisol em pacientes com UAR foram também investigados por outros autores. McCartan, Lamey e Wallace (1996) observaram que pacientes com lesões aftosas persistentes apresentaram níveis mais elevados de ansiedade, de estresse e de cortisol salivar em comparação a pacientes com a doença, mas que exibiam deficiências hematínicas. Nesse estudo, entretanto, não havia pacientes-controle, sem histórico de UAR. Albanidou-Farmaki et al. (2008) encontraram níveis mais elevados de ansiedade, bem como de cortisol salivar e sérico em pacientes com UAR quando comparados a indivíduos-controle. Este resultado difere dos encontrados no presente estudo, no qual não houve diferenças quanto aos níveis salivares de cortisol entre pacientes com aftas e controles. Os níveis de cortisol salivar do presente estudo foram analisados em até três dias após o surgimento das lesões, enquanto esta informação não é descrita na investigação realizada por Albanidou- Farmaki et al. (2008). Além disso, ambos os estudos diferem quanto ao método de análise do cortisol. A técnica de radioimunoensaio foi utilizada nesta pesquisa, enquanto na anterior o cortisol foi analisado por imunoensaio luminescente. A técnica de radioimunoensaio apresenta sensibilidade analítica e baixo custo, sendo o padrão ouro para análises hormonais (GRANGER et al., 1999). Além disso, no presente estudo, o cortisol foi mensurado em três momentos distintos, permitindo avaliar a variação circadiana deste hormônio, enquanto na investigação anterior as amostras foram coletadas no período da manhã.

A DHEA parece desempenhar importante papel na patofisiologia da depressão (WOLKOWITZ et al., 1999; YOUNG; GALLAGHER; PORTER, 2002), na regulação do humor e sensação de bem-estar, protegendo o cérebro contra os efeitos negativos do estresse (BASTIANETTO et al., 1999). Este hormônio também atua como potente imunomodulador (CHEN; PARKER JUNIOR, 2004) e seus efeitos anti-inflamatórios incluem a inibição da secreção de radicais livres e do TNF- α (BECKER, 2001; OBERBECK et al., 2001). A DHEA regula a produção de citocinas, pois aumenta a produção de IL-2 pelas células Th1 e diminui a secreção de IL-6 e IL-10 pelas células Th2. A queda dos níveis de DHEA contribui para a desregulação do equilíbrio das citocinas, o que pode estar envolvido na patogênese de diversas doenças auto-imunes (SUZUKI et al., 1995; HAZELDINE; ARLT; LORD, 2010). Concentrações circulantes diminuídas de DHEA foram encontradas em pacientes

com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (DERKSEN, 1998; HAZELDINE; ARLT; LORD, 2010).

Considerando-se que afta é uma doença de natureza imunológica e que há relatos de sua associação com variáveis psicogênicas, neste estudo, aventou-se a hipótese de que as concentrações salivares de DHEA pudessem estar reduzidas em pacientes com a doença, o que não foi confirmado pelos resultados obtidos. Os níveis de DHEA acompanharam os de cortisol, isto é, foram mais elevados no grupo-caso em presença de UAR, seguido pelo grupo-controle. Níveis salivares inferiores de DHEA foram observados nos pacientes-caso em fase de remissão de UAR, entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto às concentrações deste esteróide. A UAR parece estar associada com alterações psicológicas como ansiedade e estresse, enquanto a diminuição dos níveis de DHEA está mais relacionada com depressão (GOODYER et al., 1996; GOODYER et al., 2000; MICHAEL et al., 2000; YOUNG; GALLAGHER; PORTER, 2002; KAHL et al., 2006). Michael et al. (2000) encontraram níveis salivares matinais e noturnos diminuídos de DHEA em pacientes com depressão, níveis intermediários em pacientes com histórico desta doença e níveis mais elevados em pacientes-controle.

Estudos revelam a importância da avaliação do *ratio* cortisol/DHEA (WOLKOWITZ et al., 1997, YOUNG; GALLAGHER; PORTER, 2002, MARKOPOULOU et al., 2009) em vez de mensurar estes hormônios de forma isolada. Em algumas doenças como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, infecção por HIV ou AIDS há elevação do *ratio* entre estes esteróides, devido ao aumento dos níveis de cortisol e redução dos de DHEA (CHEN; PARKER JUNIOR, 2004; BAUER, 2005). Pacientes ansiosos e estressados também podem apresentar elevação do *ratio* cortisol/DHEA (VAN NIEKERK; HUPPERT; HERBERT, 2001; KIM; LEE; AHN, 2010). No presente estudo o *ratio* entre esses hormônios foi significativamente mais elevado nos pacientes-caso em presença de UAR em comparação à fase de remissão da doença no turno da tarde. Um valor *borderline* ($p=0,054$) foi encontrado no turno da manhã. Entretanto, não foi evidenciada diferença do *ratio* cortisol/DHEA entre os pacientes caso e controles, uma vez que não houve diferença significativa entre os níveis de cortisol e de DHEA entre estes grupos.

No presente estudo não foi encontrada correlação entre os escores de ansiedade com os níveis de cortisol ou de DHEA, além disso, não houve associação entre as concentrações dos hormônios com a presença de estresse no grupo-caso. Albanidou-Farmaki et al. (2008) também não encontraram correlação entre os níveis de cortisol e de ansiedade em pacientes com UAR, apesar de os pacientes com a doença terem exibido escores de ansiedade e níveis de cortisol mais elevados. Koray et al. (2003) mensuraram as concentrações de cortisol salivar em pacientes com LPO e não encontraram correlação dos níveis deste esteróide com os escores de ansiedade.

Segundo Scully, Gorsky e Lozada-Nur (2003), as aftas do tipo menor são as mais frequentes, correspondendo a cerca de 80% dos casos. No presente estudo, de uma população de pacientes com UAR, selecionados aleatoriamente, todos os casos foram de aftas menores. Além disso, 73,3% dos pacientes foram do sexo feminino, corroborando a literatura, que demonstra ser este o sexo mais acometido pela doença (SEDGHIZADEH et al., 2002; MESSADI, YOUNAI 2010). Quanto à localização das lesões, este estudo encontrou, em ordem decrescente, maior prevalência em língua, mucosa labial e fundo de sulco, corroborando outros autores (MESSADI; YOUNAI, 2010; WARDHANA, 2010; KARACA et al., 2008).

A presença de deficiências de ferro, ácido fólico e vitamina B₁₂ foi um fator de exclusão deste estudo, pois estas alterações poderiam representar vieses às variáveis investigadas. Tanto os pacientes-caso, quanto os controle foram submetidos a exames laboratoriais para análise dos níveis séricos desses elementos. Como a DHEA pode exibir elevação em pacientes fumantes (FIELD et al., 1994) e após a ingestão de bebidas alcoólicas (PIERUCCI-LAGHA et al., 2006), foram excluídos também indivíduos tabagistas e os pacientes foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas nas 24 horas anteriores à coleta de saliva. Pacientes com FAN reagente numa titulação igual ou superior a 1:160 foram excluídos da amostra, uma vez que este exame possui excelente sensibilidade e valor preditivo para detectar doenças como síndrome de Sjögren, esclerose sistêmica, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico dentre outras (KEREN, 2002). Pacientes portadores destas enfermidades poderiam exibir alterações nos níveis dos hormônios investigados, além disso, essas patologias podem estar associadas ao desenvolvimento de lesões na mucosa bucal. O uso de medicamentos ou condições sistêmicas com o potencial de alterar os níveis de cortisol e de DHEA ou de causar

imunodepressão como antidepressivos, ansiolíticos, corticosteróides ou repositores hormonais (PARKER; ODELL, 1980; GOODYER et al., 1996; WOLKOWITZ et al., 1997) foi também critério de exclusão do presente estudo.

As concentrações salivares de cortisol e de DHEA refletem as do soro, independem do fluxo salivar (VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983; AHN et al., 2007) e representam com acurácia uma fração dos hormônios livres e biologicamente ativos na circulação sanguínea. A coleta da saliva é realizada com maior facilidade do que a coleta de sangue, além de não causar estresse ao paciente, o que poderia influenciar nos resultados das análises. O cortisol e a DHEA apresentam ritmo circadiano, exibindo valores mais elevados pela manhã, com redução ao longo do dia (AHN et al., 2007). O presente estudo foi baseado em investigações anteriores que estabeleceram horários para as coletas das amostras salivares com vistas a analisar o ritmo circadiano de cortisol e DHEA (LUZ et al., 2006; AMENÁBAR et al., 2008). Quando a variação dos níveis dos esteróides foi comparada entre os diferentes períodos de coleta (manhã, tarde e noite), evidenciou-se que o percentual de redução dos hormônios foi semelhante entre os grupos, ou seja, ambos apresentaram ritmo circadiano semelhante. As coletas das amostras foram realizadas em repouso, visto que a quantidade de 1,5 mL foi suficiente para a dosagem dos dois hormônios em duplicata.

Apesar de a afta não ser uma entidade mórbida, os pacientes acometidos têm a qualidade de vida prejudicada, uma vez que as lesões podem ser extremamente dolorosas e recidivantes, além de sua etiopatogenia permanecer pobremente compreendida. No presente estudo, pacientes com UAR apresentaram níveis mais elevados de ansiedade e frequência superior de estresse do que indivíduos-controle, evidenciando a possível associação destas alterações psicológicas com a doença. Por outro lado, os níveis salivares de cortisol da amostra estudada somente diferiram entre os pacientes com a doença, sendo mais elevados em presença de lesões. Permanece discutível se a elevação dos níveis deste esteróide foi causada por estresse e ansiedade ou se foi consequência da dor provocada pelas lesões. Este foi o primeiro estudo a investigar os níveis salivares de DHEA em pacientes com UAR, uma vez que este esteróide parece estar relacionado com alterações psicológicas e com a modulação da resposta imune. Entretanto, pacientes com afta não exibiram níveis distintos de DHEA quando comparados a indivíduos sem a doença. Outros estudos são necessários no sentido de elucidar se o estresse e a

ansiedade, bem como se a elevação dos níveis de cortisol exercem influência na etiopatogênese da ulceração aftosa recorrente.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Pacientes com aftas exibem escores superiores de ansiedade, bem como prevalência mais elevada de estresse, podendo haver associação entre estas alterações psicológicas e a doença.
2. As concentrações salivares de cortisol elevam-se nos pacientes com UAR na presença de lesões, mas não diferem em relação às de pacientes-controle.
3. As concentrações salivares de DHEA oscilam em paralelo com as de cortisol, mas não exibem distinção entre pacientes com aftas e controles.
4. O *ratio* cortisol/DHEA sofre elevação nos pacientes com UAR na presença de lesões, em função da elevação dos níveis de cortisol, mas não difere em relação a indivíduos-controle.

REFERÊNCIAS

- AHN, R. S. et al. Salivary cortisol and DHEA levels in the Korean population: age-related differences, diurnal rhythm, and correlations with serum levels. **Yonsei Med J**, Seoul, v.48, n.3, p. 379-88, June 2007.
- AKINTOYE, S. O.; GREENBERG, M. S. Recurrent aphthous stomatitis. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v.49, n.1, p.31-47, Jan. 2005.
- ALBANIDOU-FARMAKI, E. et al. Increased anxiety level and high salivary and serum cortisol concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. **Tohoku J Exp Med**, Sendai, v.214, n.4, p.291-6, Apr. 2008.
- ALTENBURG, A.; ZOUBOULIS, C. C. Concepts in the treatment of recurrent aphthous stomatitis. **Skin Therapy Lett**, Vancouver, v.13, n.7, p.1-4, Sep. 2008.
- AMÉNABAR, J. M. et al. Anxiety and salivary cortisol levels in patients with burning mouth syndrome: case-control study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.105, n.4, p.460-5, Apr. 2008.
- AMINABADI, N. A. Recurrent aphthous stomatitis may be initiated by traumatic epithelial implantation and sustained by localized pathergic status. **Med Hypotheses**, Penrith, v.70, n.3, p. 522-4, Sep. 2008.
- ANDERSSON, I. M.; LORENTZEN, J.C.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A. Analysis of adrenocortical secretory responses during acute and prolonged immune stimulation in inflammation-susceptible and -resistant rat strains. **J Neuroendocrinol**, Eynsham, v.12, n.11, p.1096-104, Nov. 2000.
- ARNETZ, B. B. et al. Stress and psoriasis: psychoendocrine and metabolic reactions in psoriatic patients during standardized stressor exposure. **Psychosom Med**, Baltimore, v. 47, n.6, p.528-41, Nov-Dec. 1985.
- BASTIANETTO, S. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. **Brain Res Mol Brain Res**, Amsterdam, v.66, n.1-2, p.35-41, Mar. 1999.
- BAYLE, M. L. et al. Quantitative analysis of DHEA and androsterone in female urine: investigating the effects of menstrual cycle, oral contraception and training on exercise-induced changes in young women. **Anal Bioanal Chem**, Heidelberg, v.393, n.4, p.1315-25, Feb. 2009.
- BAUER, M. E. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. **Stress**, Amsterdam, v.8, n.1, p. 69-83, Mar. 2005.
- BECK, A. T. et al. An inventory for measuring clinical anxiety. **J Consult Clin Psychol**, Washington, v.56, n.6, p.893-7, Dec. 1988.

BECKER, K. L. **Principles and practice of endocrinology and metabolism**. 3rd. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 2001. 2477 p.

BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G.; VERMES, I. Decreased levels or dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? **Crit Care**, London, v.6, n.5, p.434-8, Oct. 2002.

BÉLANGER, A. et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80 year-old men. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.79, n.4, p.1086-90, Oct. 1994.

BLACK, P. H. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.38, n.1, p.1-6, Jan. 1994.

BORAS, V. V. et al. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.35, n.4, p. 241-3, Apr. 2006.

BORRA, R. C. et al. The Th1/Th2 immune-type response of the recurrent aphthous ulceration analyzed by cDNA microarray. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.33, n.3, p.140-6, Mar. 2004.

BORRA, R. C. et al. Toll-like receptor activity in recurrent aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.38, n.3, p.289-98, Mar. 2009.

BOSCH, J. A. et al. Acute stress evokes selective mobilization of T cells that differ in chemokine receptor expression: a potential pathway linking immunologic reactivity to cardiovascular disease. **Brain Behav Immun**, San Diego, v.17, n.4, p.251-9, Aug. 2003.

BUAJEED, W. et al. Anxiety in recurrent aphthous stomatitis patients. **J Dent Assoc Thai**, Bangkok, v.40, n.6, p. 253-8, Nov-Dec. 1990.

BUÑO, I. J. et al. Elevated levels of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, interleukins 2, 4, and 5, but not interleukin 10, are present in recurrent aphthous stomatitis. **Arch Dermatol**, United States, v.134, n.7, p. 827-31, July 1998.

BURGAN, S. Z.; SAWAIR, F.A.; AMARIN, Z. O. Hematologic status in patients with recurrent aphthous stomatitis in Jordan. **Saudi Med J**, Saudi Arabia, v.27, n.3, p. 381-4, Mar. 2006.

CHAPMAN, C. R.; TUCKETT, R. P.; SONG, C. W. Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. **J Pain**, Philadelphia, v.9, n.2, p.122-45, Feb. 2008.

CHARALAMPOPOULOS, I. et al. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v.19, n.8, p.300-7, Oct. 2008.

CHATTOPADHYAY A.; SHETTY, K. V. Recurrent aphthous stomatitis. **Otolaryngol Clin North Am**, Philadelphia, v.44, n.1, p.79-88, Feb. 2011.

CHEN, C. C. G.; PARKER, JR CR. Adrenal androgens and the immune system. **Semin Reprod Med**, New York, v.22, n.4, p.369-77, Nov. 2004.

CHIAPPELLI, F.; CAJULIS, O. S. Psychobiologic views on stress-related oral ulcers. **Quintessence Int**, Berlin, v.35, n.3, p.223-7, Mar. 2004.

CHOI, I. S. et al. Effects of dehydroepiandrosterone on Th2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics. **Korean J Intern Med**, Seoul, v.23, n.4, p.176-81, Dec. 2008.

COMPILATO, D. et al. Haematological deficiencies in patients with recurrent aphthosis. **Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.24, n.6, p.667-73, June 2010.

CUNHA J.A. **Manual das versões em português das escalas de Beck**. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2001.

DE SOUZA, T. O. et al. Clinical evaluation of low-level laser treatment for recurring aphthous stomatitis. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v.28 Suppl 2:S, p.85-8, Oct 2010.

DERKSEN R. H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**, New York, v.27, n.6, p.335-47, June 1998.

DIAS FERNANDES, C. S. et al. Salivary dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in patients with the complaint of burning mouth: a case-control study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.108, n.4, p.537-43, Oct. 2009.

DONNELLY, R. P. et al. Interleukin-26: an IL-10-related cytokine produced by Th17 cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v.21, n.5, p. 393-401, Oct. 2010.

DOUGLAS, C. **Tratado de Fisiologia aplicada à nutrição**. São Paulo: ROBE Editorial, 2002. 1046p.

EBELING, P.; KAIVISTO, V. A. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. **Lancet**, London, v.343, n.8911, p.1479-81, June 1994.

EGUIA-DEL VALLE, A. et al. Salivary levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.16, n.1, p.33-6, Jan. 2011.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.1024, p.138-46, June 2004.

ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 483p.

EVERS, A. W. et al. How stress gets under the skin: cortisol and stress reactivity in psoriasis. **Br J Dermatol**, Oxford, v.163, n.5, p.986-91, Nov. 2010.

EVERSOLE, L. R. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. **Semin Cutan Med Surg**, Philadelphia, v.116, n.4, p.284-94, Dec. 1997.

FERRARI, E. et al. Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging. **Brain Res Brain Res Rev**, Amsterdam, v.37, n.1-3, p.294-300, Nov. 2001.

FIELD, A. E. et al. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.79, n.5, p.1310-6, Nov. 1994.

FITZGERALD, L. Blunted affect is associated with hypothalamic--pituitary--adrenal axis (HPA) hypoactivity and elevated CSF-interleukin-1 Beta (IL-1 β) in response to lumbar puncture. **Biol Res Nurs**, Thousand Oaks, v.13, n.2, p.164-74, Apr. 2011.

FLOTO, R. A.; SMITH, K. G. The vagus nerve, macrophages, and nicotine. **Lancet**, London, v.361, n.9363, p.1069-1070, Mar. 2003.

FRANZ, C. E. et al. Genetic and environmental influences on cortisol regulation across days and contexts in middle-aged men. **Behav Genet**, Westport, v.40, n.4, p.467-79, July 2010.

FRITSCHER, A. M. et al. Association between Helicobacter pylori and recurrent aphthous stomatitis in children and adolescents. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.33, n. 3, p. 129-32, Mar. 2004.

GALLO, C. B.; MIMURA, M. A. M.; SUGAYA, N. N. Psychological stress and recurrent aphthous stomatitis. **Clinics**, São Paulo, v.64, n.6, p.645-8, 2009.

GIRARDI, C. et al. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) levels, psychological factors in patients with oral lichen planus. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.56, n.9, p.864-8, Sep. 2011.

GOODIN, B. R. et al. Enhanced Cortisol Increase Upon Awakening is Associated With Greater Pain Ratings but not Salivary Cortisol or Soluble Tumor Necrosis Factor- α Receptor II Responses to Acute Pain. **Clin J Pain**, New York, v.7, Sep. 2011.

GOODYER, I. M. et al. Adrenal secretion during major depression in 8-to-16 years-olds, I. Altered diurnal rhythms in salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) at presentation. **Psychol Med**, London, v.26, n.2, p.245-56, Mar. 1996.

GOODYER, I. M., et al. Recent life events, cortisol, dehydroepiandrosterone and the onset of major depression in high-risk adolescents. **Br J Psychiatry**, London, v.177, p. 499-504, Dec. 2000.

GRANGER, D. A. et al Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.24, n.5, p.567-79, July 1999.

GRANDY, D. et al. Smokeless tobacco use prevents aphthous stomatitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.74, n.4, p.463-5, Oct. 1992.

GRIESEL, A. G.; GERMISHUYS, P. J. Salivary immunoglobulin A levels of persons who have stopped smoking. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.87, n.2, p.170-3, Feb. 1999.

GRÖSCHL, M. et al. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. **Steroids**, San Francisco, v.66, n.10, p.737-41, Oct. 2001.

GRUENEWALD, D. A; MATSUMOTO, A. M. **Endocrinology and aging**. In:Becker KL. Principles and practice of Endocrinology and Metabolism. 3rd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott; 2001. p.1808-32.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**.11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 1115p.

HAZELDINE, J.; ARLT, W.; LORD, J. M. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v,120, n.2-3, p.127-36, May 2010.

HELLHAMMER, D. H.; WÜST, S.; KUDIELKA, B. M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.34, n.2,p.163-71, Feb. 2009.

HERBERT, J. Stress, the brain, and mental illness. **BMJ**, London, v.315, n.7107, p.330-5, Aug. 1997.

HERBERT, J. et al. Adrenal secretion and major depression in 8-to-16 years-old, II. Influence of co-morbidity at presentation. **Psychol Med**, London, v.26, n.2. p.257-63, Mar. 1996.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr Rev**, Baltimore, v.12, n.2, p.118-34, May 1991.

JEKEL, J. F. et al. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. 1^a ed. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2002. 432p.

JURGE, S. et al. Recurrent aphthous stomatitis. **Oral Dis**, Copenhagen, v.12, n.1, p.1-21, Jan. 2006.

KAHL, K. G. et al. Cortisol, the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio, and pro-inflammatory cytokines in patients with current major depressive disorder comorbid with borderline personality disorder. **Biol Psychiatry**, New York, v.59, n.7, p.667-71, Apr. 2006.

KARACA, S. et al. The effect of gastric *Helicobacter pylori* eradication on recurrent aphthous stomatitis. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v.47, n.6, p.615-7, June 2008.

KAUFMAN, A. Y. Aphthous stomatitis as a featuring syndrome of emotional stress in dental treatment. **Quintessence Int Dent Dig**, Berlin, v.7, n.9, p.75-8, Sep. 1976.

KEREN, D.F. Antinuclear antibody testing. **Clin Lab Med**, Philadelphia, v.22, n.2, p.447-74, June 2002.

KIM, M. S.; LEE, Y. J.; AHN, R. S. Day-to-day differences in cortisol levels and molar cortisol-to-DHEA ratios among working individuals. **Yonsei Med J**, Seoul, v.51, n.2, p.212-8, Mar. 2010.

KIMONIDES, V. G. et al. Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. **Neuroscience**, Oxford, v.89, n.2, p.429-36, Mar.1999.

KING, S. L.; HEGADOREN, K. M. Stress hormones: how do they measure up?. **Biol Res Nurs**, Thousand Oaks, v.4, n.2, p.92-103, Oct. 2002.

KIRSCHBAUM, C. et al. Cortisol and behavior: adaptation of a radioimmunoassay kit for reliable and inexpensive salivary cortisol determination. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v.34, n.4, p.747-51, Dec. 1989.

KORAY, M. et al. The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. **Oral Dis**, Copenhagen, v.9, n.6, p.298-301, Nov. 2003.

KROBOTH, P.D. et al. DHEA and DHEAS: a review. **J Clin Pharmacol**, Thousand Oaks, v.39, n.4, p.327-48, Apr. 1999.

KUMAR, B. P. et al. Evaluating and comparing phagocytic functions of salivary and blood neutrophils in patients with recurrent aphthous ulcers and controls. **Quintessence Int**, Berlin, v.41, n.5, p.411-6, May 2010.

LEWKOWICZ, N. et al. Dysfunction of CD4+ CD25 high T regulatory cells in patients with recurrent aphthous stomatitis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.37, n.8, p.454-461, Sep. 2008.

LIANG, S.C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med**, New York, v.203, n.10, p.2271-9, Oct. 2006.

LIN, S. S. et al. Study of the viral infections and cytokines associated with recurrent aphthous ulceration. **Microbes Infect**, Paris, v.7, n.4, p.635-44, Apr. 2005.

LIPP, M. E. N. **Manual do inventário de sintomas de stress para adultos de Lipp (ISSL)**. 3ª ed. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2005.

LONGCOPE, C. Dehydroepiandrosterone metabolism. **J Endocrinol**, Bristol, v.150 Suppl:S, p.125-7, Sep. 1996.

LUZ, C. et al. Healthy aging is associated with unaltered production of immunoreactive growth hormone but impaired neuroimmunomodulation. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v.13, n.3, p.160-9, Nov. 2006.

MANIGA, L.S.; GOLINSKY, S. Remarkable insights into health and disease are offered through analysis of saliva. **Total Health**, New Delhi, v.23, n.2, p24-5, 2001.

MANOLACHE, L.; BENEVA, V. Stress in patients with alopecia areata and vitiligo. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.21, n.7, p.921-8, Aug. 2007.

MANSOUR-GHANAIE, F. et al. Helicobacter pylori infection in oral lesions of patients with recurrent aphthous stomatitis. **Med Sci Monit**, Warsaw, v.11, n.12, p.576-9, Dec. 2005.

MARKOPOULOU, K. e al. The ratio of cortisol/DHEA in treatment resistant depression. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.34, n.1, p.19-26, Jan. 2009.

MARSHALL, G. D. et al. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. **Brain Behav Immun**, San Diego, v.12, n.4, p.297-307, Dec. 1998.

MCCARTAN, B. E.; LAMEY, P. J.; WALLACE, A. M.; Salivary cortisol and anxiety in recurrent aphthous stomatitis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.25, n.7, p.357-59, Aug. 1996.

MCROBBIE, H.; HAJEK, P.; GILLISON, F. The relationship between smoking cessation and mouth ulcers. **Nicotine Tob Res**, Abingdon, v.6, n.4, p.655-9, Aug. 2004.

MESSADI, D. V.; YOUNAI, F. Aphthous ulcers. **Dermatol Ther**, Copenhagen, v.23, n.3, p.281-90, May-July 2010.

MICHAEL, A. et al. Altered salivary dehydroepiandrosterone levels in major depression in adults. **Biol Psychiatry**, New York, v.48, n.10, p.989-95, Nov. 2000.

MILLER, C. S. et al. Salivary cortisol response to dental treatment of varying stress. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.79, n.4, p.436-41, Apr. 1995.

MILLER, M. F.; SHIP, I. I. A retrospective study of the prevalence and incidence of recurrent aphthous ulcers in a professional population, 1958-1971. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. St. Louis, v.43, n.4, p.532-7, Apr. 1977.

MIYAMOTO, N. T. JR. et al. Immune-expression of HSP27 and IL-10 in recurrent aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 37, n.8, p.462-7, Sep. 2008.

MUTSUURA, H. et al. Depression and anxiety correlate differently with salivary free cortisol in the morning in patients with functional somatic syndrome. **Appl Psychophysiol Biofeedback**, New York, v.34, n.4, p.291-8, Dec. 2009.

NATAH, S. S. et al. Immunolocalization of tumor necrosis factor- α expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions (RAU). **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29, n.1, p.19-25, Jan. 2000.

NIESCHLAG, E. et al. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. **J Endocrinol**, Bristol, v.57, n.1, p.123-134, Apr. 1973.

OBERBECK, R. et al. Dehydroepiandrosterone decreases mortality rate and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, New York, v.29, n.2, p.380-4, Feb. 2001.

OH, S. H. et al. Association of stress with symptoms of atopic dermatitis. **Acta Derm Venereol**, Stockholm, v.90, n.6, p.582-8, Nov. 2010.

OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. **Ciba Found Symp**, Amsterdam, v.172, p.296-308, 1993.

OZDEMIR, I. Y. et al. Thyroid autoimmunity associated with recurrent aphthous stomatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04040.x. 2011.

PALMERT, M. R. et al. The longitudinal study of adrenal maturation during gonadal suppression: evidence that adrenarche is a gradual process. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.86, n.9, p.4536-42, Sep. 2001.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry**, New York, v.49, n.5, p.391-404, Mar. 2001.

PARKER, L. N.; ODELL, W. D. Control of adrenal androgen secretion. **Endocr Rev**, Baltimore, v.1, n.4, p.392-410, Fall 1980.

PEDERSEN, A. Psychologic stress and recurrent aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.18, n.2, p.391-404, Feb. 1989.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

PIERUCCI-LAGHA, A. et al. Subjective effects and changes in steroid hormone concentrations in humans following acute consumption of alcohol. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.186, n.3, p.451-61, June 2006.

PISKIN, S. et al. Serum iron, ferritin, folic acid, and vitamin B12 levels in recurrent aphthous stomatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.16, n.1, p.66-7, Jan. 2002.

PORTER, J. B. et al. Iron mobilization from hepatocyte monolayer cultures by chelators: the importance of membrane permeability and the iron-binding constant. **Blood**, New York, v.72, n.5, p.1497-503, Nov. 1988.

POLL, E. M. et al. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v.382, n.1-2, p.15-9, July 2007.

REDWINE, L. et al. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. **Psychosom Med**, Baltimore, v.65, n.4, p.598-603, July-Aug. 2003.

RIVA, R. et al. Comparison of the cortisol awakening response in women with shoulder and neck pain and women with fibromyalgia. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.14, July 2011.

SAVAGE, N. W.; SEYMOUR, G. J. Specific lymphocytotoxic destruction of autologous epithelial cell targets in recurrent aphthous stomatitis. **Aust Dent J**, Sydney, v.39, n.2, p.98-104, Apr. 1994.

SCALABRINO, G. The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. **Prog Neurobiol**, New York, v.88, n.3, p.203-20, July 2009.

SCHOMMER, N. C.; HELLHAMMER, D. H.; KIRSCHBAUM, C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. **Psychosom Med**, Baltimore, v.65, n.3, p.450-60, May-June 2003.

SCULLY, C.; GORSKY, M.; LOZADA-NUR, F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: A consensus approach. **Am Dent Assoc**, Chicago, v.134, n.2, p.200-7, Feb. 2003.

SCULLY, C.; PORTER S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v.46, n.3, p.198-206, Apr. 2008.

SEDGHIZADEH, P. P. et al. Celiac disease and recurrent aphthous stomatitis: a report and review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.94, n.4, p.474-8, Oct. 2002.

SHAH, B.; ASHOK, L.; SUJATHA, G. P. Evaluation of salivary cortisol and psychological factors in patients with oral lichen planus. **Indian J Dent Res**, Ahmedabad, v.20, n.3, p.288-92, July-Sep 2009.

SHIROTSUKI, K. et al. Salivary cortisol and DHEA reactivity to psychosocial stress in socially anxious males. **Int J Psychophysiol**, Amsterdam, v.72, n.2, p.198-203, May 2009.

SOLANO, M. E. et al. Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v.153, n.2, p.289-296, Aug. 2008.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. **Nat Rev Immunol**, London, v.2, n.5, p.372-7, May 2002.

SOTO-ARAYA, M.; ROJAS-ALCAYAGA, G.; ESGUEP, A. Association between psychological disorders and the presence of oral lichen planus, burning mouth syndrome and recurrent aphthous stomatitis. **Med oral**, Madrid, v.9, n.1, p.1-7, Jan-Fev. 2004.

Steroid Hormones – The medical Biochemistry Page. Disponível em: <http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.htm>. Acesso em: 9 ago. 2010.

STRAUB, R. H. et al. Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, London, v.63, n.8, p.961-8, Aug. 2004.

SUBRAMANYAM, R. V. Occurrence of recurrent aphthous stomatitis only on lining mucosa and its relationship to smoking – A possible hypothesis. **Med Hypotheses**, Penrith, v.77, n.2, p.185-7, Aug. 2011.

SVEC, F.; PORTER, J. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v.218, n.3, p.74-191, July 1998.

SUN, A.; CHIA, J. S.; CHIANG, C. P. Increased proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and T cells to Streptococcus mutans and glucosyltransferase D antigens in the exacerbation stage of recurrent aphthous ulcerations. **J Formos Med Assoc**, Taipei, v.101, n.8, p.560-6, Aug. 2002.

SUZUKI, T. et al. Low serum levels of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clin Exp Immunol**, Oxford, v.99, n.2, p.251-5, Feb, 1995.

TAUSK, F.; ELENKOV, I.; MOYNIHAN, J. Psychoneuroimmunology. **Dermatol Ther**, Copenhagen, v.21, n.1, p. 22-31, Jan-Fev. 2008.

TAYLOR, L. J. et al. Increased production of tumour necrosis factor by peripheral blood leukocytes in patients with recurrent oral aphthous ulceration. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.21, n.1, p. 21-5, Jan. 1992.

TORDJMAN, S. et al. Plasma androgens in autism. **J Autism Dev Disord**, New York, v.25, n.3, p.295-304, June 1995.

USSHER, M. et al. Increase in common cold symptoms and mouth ulcers following smoking cessation. **Tob Control**, London, v.12, n.1, p.86-88, Mar. 2003.

VAN NIEKERK, J. K.; HUPPERT, F. A.; HERBERT, J. Salivary cortisol and DHEA: association with measures of cognition and well-being in normal order men, and effects of three months of DHEA supplementation. **Psychoendocrinology**, Oxford, v.26, n.6, p.591-612, Aug. 2001.

VANDERHAEGHE, L. Stress, aging and cortisol. **Total Health**. v.23, n.1, p.34-5, 2001.

VEDHARA, K. et al. An investigation into the relationship between salivary cortisol, stress, anxiety and depression. **Biol Psychol**, Amsterdam, v.62, n.2, p.89-96, Feb. 2003.

VINING, R. F.; MCGINLEY, R. A.; SYMONS, R. G. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. **Clin Chem**, Washington, v.29, n.19, p.1752-6, Oct. 1983.

VREEBURG, S. A. et al. Salivary cortisol levels in persons with and without different anxiety disorders. **Psychosom Med**, Baltimore, v.72, n.4, p.340-7, May 2010.

VOLKOV, I. et al. Effectiveness of vitamin B12 in treating recurrent aphthous stomatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Am Board Fam Med**, Lexington, v.22, n.1, p.9-16, Jan-Fev. 2009.

WARDHANA, E. A. Recurrent aphthous stomatitis caused by food allergy. **Acta Med Indones**, Jakarta, v.42, n.4, p.236-40, Oct 2010.

WARDLE, M. C.; MUNAFÒ, M. R.; DE WIT, H. Effect of social stress during acute nicotine abstinence. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.15, 2011.

WEINRIB, A. Z. et al. Diurnal cortisol dysregulation, functional disability, and depression in women with ovarian cancer. **Cancer**, New York, v.116, n.18, p.4410-9, Sep. 2010.

WEINSTEIN, D. D. et al. Minor physical anomalies, dermatoglyphic asymmetries, and cortisol levels in adolescents with schizotypal personality disorder. **Am J Psychiatry**, Hanover, v.156, n.4, p.617-23, Apr. 1999.

WINDLE, R. J. et al. Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. **J Neuroendocrinol**, Eynsham, v.13, n.10, p.905-911, Oct. 2001.

WINGENFELD, K. et al. Salivary cortisol release and hypothalamic pituitary adrenal axis feedback sensitivity in fibromyalgia is associated with depression but not with pain. **J Pain**, Philadelphia, v.11, n.11, p.1195-202, Nov. 2010.

WIRTZ, P. H. et al. Perfectionism and the cortisol response to psychosocial stress in men. **Psychosom Med**, Baltimore, v.69, n.3, p.249-55, Apr. 2007.

WOLF, T. O.; KIRSCHBAUM, C. Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. **Brain Res Brain Res Rev**, Amsterdam, v.30, n.3, p.264-88, Nov. 1999.

WOLKOWITZ, O. M. et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment of depression. **Biol Psychiatry**, New York, v.41, n.3, p.311-8, Feb. 1997.

WOLKOWITZ, O. M. et al. Double-blind treatment of major depression with dehydroepiandrosterone. **Am J Psychiatry**, Hanover, v.156, n.4, p.646-9, Apr. 1999.

WRAY, D, et al. The role of allergy in oral mucosal diseases. **QJM**, Oxford, v.93, n.8, p.507-11, Aug. 2000.

YOUNG, A. H.; GALLAGHER, P.; PORTER, R. J. Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. **Am J Psychiatry**, Arlington, v.159, n.7, p.1237-9, July 2002.

ZAND, N. et al. Relieving pain in minor aphthous stomatitis by a single session of non-thermal carbon dioxide laser irradiation. **Lasers Med Sci**, London, v.24, n.4, p.515-20, July 2009.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aos Voluntários da Pesquisa

CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE CORTISOL, DESIDROEPIANDROSTERONA E ALFA-AMILASE E VARIÁVEIS EMOCIONAIS EM PACIENTES COM ULCERAÇÃO AFTOSA RECORRENTE

Com este estudo serão avaliados dois hormônios (cortisol e DHEA) e uma enzima (alfa-amilase) presentes na saliva, bem como os níveis de estresse e ansiedade de pacientes com aftas e de pacientes que não apresentam aftas. O objetivo deste estudo é relacionar aftas com os níveis salivares dos hormônios e da enzima com os resultados obtidos nos questionários de estresse e ansiedade.

O Sr(a). está convidado a participar dessa pesquisa. Se concordar em participar, será solicitado que responda a dois questionários com perguntas sobre estresse e ansiedade. Além dos questionários, será realizado exame da boca e lhe serão fornecidos frascos para coleta de saliva. O Sr(a). será instruído(a) a coletar a saliva na sua residência, três vezes em um único dia, nos seguintes horários: entre 7 h e 9 h, entre 11 h e 13 h e entre 19 e 21 h. Os frascos devem ser armazenados no congelador e serão recolhidos pela pesquisadora. Na saliva coletada serão analisados dois hormônios e uma enzima. Não haverá qualquer tipo de custo aos pacientes que participarem dessa pesquisa.

Os riscos para os indivíduos que participarem do estudo são mínimos, pois se trata de preenchimento de questionários, coleta de saliva e exame da boca.

Se o(a) Sr(a) concordar em participar do estudo:

- tem o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- tem liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do acompanhamento e tratamento;

- tem a segurança que não será identificado, e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a privacidade;
- tem o compromisso de fornecer informação atualizada durante o estudo;

As pesquisadoras responsáveis por esse projeto são a professora Fernanda Salum e a cirurgiã-dentista Anete Rejane Michel, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia e do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em 12 de agosto de 2009.

Para qualquer esclarecimento ou dúvidas, antes e durante a pesquisa, entre em contato com as pesquisadoras Prof^a. Dra. Fernanda Salum pelo fone (51)81829945 (responsável) ou com a pesquisadora Anete Rejane Michel, pelo fone (51) 96527878. Para qualquer pergunta sobre direitos como participante deste estudo, ou se pensa que foi prejudicado pela participação, pode-se entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, através do fone (51)33203345.

Pelo presente termo de consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, dos procedimentos a que serei submetido, eventuais desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, todos acima citados.

Eu, _____,

declaro que, após ler as informações acima, estou plenamente de acordo com a realização do estudo com a minha participação. Assim, garanto minha colaboração e autorizo a minha participação, sendo responsável por ela.

DATA: _____ R.G: _____

ASSINATURA: _____

APÊNDICE B – Ficha de coleta de dados

FICHA DO PACIENTE () Grupo caso () Grupo controle**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____ RG: _____ Data
de nascimento: __ __ / __ __ / __ __ Raça: _____ Sexo: _____
Endereço: _____ CEP: _____
Telefone: _____ Celular: _____ Profissão: _____

ANAMNESE**1. História médica**

2. Consumo de Álcool

3. Usa medicações? () Não () Sim Quais?

4. Com que frequência você tem aftas?

PARA O GRUPO-CASO**5. Há quanto tempo (meses ou anos) apresenta aftas?**

6. Você associa o aparecimento de suas aftas com alguma causa (alimentos, medicamentos, etc)?

() Não () Sim Quais?

7. Você utiliza algum medicamento (pomada, bochecho, etc) para alívio dos sintomas?

() Não () Sim Quais?

EXAME FÍSICO

Úlcera(s) Aftosa(s) Recorrente(s): localização, tamanho (cm), duração, classificação:

EXAMES LABORATORIAIS:

Eritrócitos(mil./µl)		Leucócitos	
Hematócrito (%)		Neutrófilos bastonados	
Hemoglobina(g/dl)		Basófilos	
VCM (fl)		Eosinófilos	
HCM		Monócitos	
CHCM		Linfócitos	
VSG			
Ferro Sérico		Vit B12	
Glicose		Ácido Fólico	
FAN		ANTI-HIV	

CONCENTRAÇÕES SALIVARES

	M	T	N
Cortisol (nmol/L)			
DHEA (nmol/L)			
Alfa-amilase (U/mL)			

SOMENTE PARA O GRUPO-CASO:

() UAR ausentes ao exame físico

	M	T	N
Cortisol (nmol/L)			
DHEA (nmol/L)			
Alfa-amilase (U/mL)			

ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 29 de maio de 2009

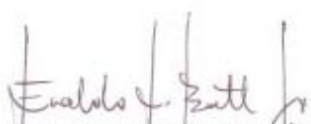
O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0021/09
Intitulado: Concentrações salivares de cortisol, desidroepiandrosterona e alfa-amilase e variáveis emocionais em pacientes com ulceração aftosa recorrente
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum
Pesquisadores Associados: Anete Rejane Michel; Clarice Luz
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 27 de maio de 2009.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS




Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1067/09

Porto Alegre, 12 de agosto de 2009.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04722 intitulado **“Concentrações salivares de cortisol, desidroepiandrosterona e alfa-amilase e variáveis emocionais em pacientes com ulceração aftosa recorrente”**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



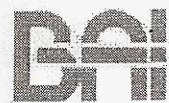
Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Fernanda Gonçalves Salum
Faculdade de Odontologia
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C – Inventário de Ansiedade de Beck (BAI)



Data: _____

Nome: _____ Estado Civil: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

Abaixo está uma lista de sintomas comuns de ansiedade. Por favor, leia cuidadosamente cada item da lista. Identifique o quanto você tem sido incomodado por cada sintoma durante a **última semana, incluindo hoje**, colocando um "x" no espaço correspondente, na mesma linha de cada sintoma.

	Absolutamente não	Levemente Não me incomodou muito	Moderadamente Foi muito desagradável, mas pude suportar	Gravemente Dificilmente pude suportar
1. Dormência ou formigamento.				
2. Sensação de calor.				
3. Trêmulos nas pernas.				
4. Incapaz de relaxar.				
5. Medo que aconteça o pior.				
6. Atordoado ou tonto.				
7. Palpitação ou aceleração do coração.				
8. Sem equilíbrio.				
9. Aterrorizado.				
10. Nervoso.				
11. Sensação de sufocação.				
12. Tremores nas mãos.				
13. Trêmulo.				
14. Medo de perder o controle.				
15. Dificuldade de respirar.				
16. Medo de morrer.				
17. Assustado.				
18. Indigestão ou desconforto no abdômen.				
19. Sensação de desmaio.				
20. Rosto afogueado.				
21. Suor (não devido ao calor).				

"Traduzido e adaptado por permissão de The Psychological Corporation, U.S.A. Direitos reservados ©1991, a Aaron T. Beck. Tradução para a língua portuguesa. Direitos reservados ©1993 a Aaron T. Beck. Todos os direitos reservados."


Tradução e adaptação brasileira, 2001, Casa do Psicólogo® Livraria e Editora Ltda. BAI é um logótipo da Psychological Corporation.

ANEXO D – Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de LIPP (ISSL)

INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE STRESS PARA ADULTOS DE LIPP (ISSL)

Marilda Novaes Lipp

CADERNO DE APLICAÇÃO



Quadro 1 - Assinalar com F1 ou P1, como indicado para sintomas que tenha experimentado nas últimas 24 horas.
Quadro 2 - Assinalar com F2 ou P2, como indicado para sintomas que tenha experimentado na última semana.
Quadro 3 - Assinalar com F3 ou P3, como indicado para sintomas que tenha experimentado no último mês.

Nome:

Sexo:


Data de nascimento:

Local de trabalho:

Função exercida:

Escolaridade:

Local e data:



Casa do Psicólogo®
Livreria e Editora

© 2000 Casa do Psicólogo® Livreria e Editora Ltda. Reservados os direitos de publicação em língua portuguesa à Casa do Psicólogo® Livreria e Editora Ltda. Rua Alves Guimarães, 436 - 05410-000 - São Paulo - SP - Tel./fax: (11) 852-4633, e-mail: casapsi@uol.com.br - http://www.casapsicologo.com.br. É proibida a reprodução total ou parcial desta publicação para qualquer finalidade, sem autorização por escrito dos editores. Impresso no Brasil/Printed in Brazil.



QUADRO 1a

a) Marque com um F1 os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas.

- 1. MÃOS E PÉS FRIOS
- 2. BOCA SECA
- 3. NÓ NO ESTÔMAGO
- 4. AUMENTO DE SUDORESE
- 5. TENSÃO MUSCULAR
- 6. APERTO DA MANDÍBULA/
RANGER OS DENTES
- 7. DIARRÉIA PASSAGEIRA
- 8. INSÔNIA
- 9. TAQUICARDIA
- 10. HIPERVENTILAÇÃO
- 11. HIPERTENSÃO ARTERIAL
SÚBITA E PASSAGEIRA
- 12. MUDANÇA DE APETITE

QUADRO 1b

b) Marque com um P1 os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas.

- 13. AUMENTO SÚBITO DE
MOTIVAÇÃO
- 14. ENTUSIASMO SÚBITO
- 15. VONTADE SÚBITA DE
INICIAR NOVOS
PROJETOS



QUADRO 2a

a) Marque com um F2 os sintomas que tem experimentado na última semana.

- () 1. PROBLEMAS COM A MEMÓRIA
- () 2. MAL-ESTAR GENERALIZADO, SEM CAUSA ESPECÍFICA
- () 3. FORMIGAMENTO DAS EXTREMIDADES
- () 4. SENSAÇÃO DE DESGASTE FÍSICO CONSTANTE
- () 5. MUDANÇA DE APETITE
- () 6. APARECIMENTO DE PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS
- () 7. HIPERTENSÃO ARTERIAL
- () 8. CANSAÇO CONSTANTE
- () 9. APARECIMENTO DE ÚLCERA
- () 10. TONTURA/SENSAÇÃO DE ESTAR FLUTUANDO

QUADRO 2b

b) Marque com um P2 os sintomas que tem experimentado na última semana.

- () 11. SENSIBILIDADE EMOTIVA EXCESSIVA
- () 12. DÚVIDA QUANTO A SI PRÓPRIO
- () 13. PENSAR CONSTANTEMENTE EM UM SÓ ASSUNTO
- () 14. IRRITABILIDADE EXCESSIVA
- () 15. DIMINUIÇÃO DA LIBIDO



QUADRO 3a

a) Marque com um F3 os sintomas que tem experimentado no último mês.

- () 1. DIARRÉIA FREQUENTE
- () 2. DIFICULDADES SEXUAIS
- () 3. INSÔNIA
- () 4. NÁUSEA
- () 5. TIQUES
- () 6. HIPERTENSÃO ARTERIAL CONTINUADA
- () 7. PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS PROLONGADOS
- () 8. MUDANÇA EXTREMA DE APETITE
- () 9. EXCESSO DE GASES
- () 10. TONTURA FREQUENTE
- () 11. ÚLCERA
- () 12. ENFARTE

QUADRO 3b

b) Marque com um P3 os sintomas que tem experimentado no último mês.

- () 13. IMPOSSIBILIDADE DE TRABALHAR
- () 14. PESADELOS
- () 15. SENSÇÃO DE INCOMPETÊNCIA EM TODAS AS ÁREAS
- () 16. VONTADE DE FUGIR DE TUDO
- () 17. APATIA, DEPRESSÃO OU RAIVA PROLONGADA
- () 18. CANSAÇO EXCESSIVO
- () 19. PENSAR/FALAR CONSTANTEMENTE EM UM SÓ ASSUNTO
- () 20. IRRITABILIDADE SEM CAUSA APARENTE
- () 21. ANGÚSTIA/ANSIEDADE DIÁRIA
- () 22. HIPERSENSIBILIDADE EMOTIVA
- () 23. PERDA DO SENSO DE HUMOR

INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE STRESS PARA ADULTOS DE LIPP (ISSL)

Marilda Novaes Lipp

AVALIAÇÃO

Após a soma dos resultados brutos, verifique as tabelas para as porcentagens.

Sinais de stress
P1 + F1 > 6
P2 + F2 > 3
P3 + F3 > 8

Quadros	F		P		Total F + P	%
	Result. Bruto	%	Result. Bruto	%		
Q1						
Q2						
Q3						
Total						

VIDE TABELAS NO VERSO

DIAGNÓSTICO

TEM STRESS	()	NÃO TEM STRESS	()
ALERTA (fase)	()	RESISTÊNCIA (fase)	()
QUASE EXAUSTÃO	()	EXAUSTÃO	()
Predominância de sintomas:			
FÍSICOS	()	PSICOLÓGICOS	()

Nome:

Sexo:

Data de nascimento:

Local de trabalho:

Função exercida:

Escolaridade:

Local e data:



Casa do Psicólogo®
Livraria e Editora

© 2000 Casa do Psicólogo® Livraria e Editora Ltda. Reservados os direitos de publicação em língua portuguesa à Casa do Psicólogo® Livraria e Editora Ltda. Rua Alves Guimarães, 436 - 05410-000 - São Paulo - SP - Tel./fax: (11) 852-4633, e-mail: casapsi@uol.com.br - http://www.casapsicologo.com.br. É proibida a reprodução total ou parcial desta publicação para qualquer finalidade, sem autorização por escrito dos editores. Impresso no Brasil/Printed in Brazil.

Tabela de Correção 1.
Fases do Stress

QUADRO 1		QUADRO 2		QUADRO 3	
Fase 1 Alerta		Parte I Resistência		Fase 4 Exaustão	
Resultado Bruto	Porcentagem	I) Fase 2 Resultado Bruto	Porcentagem	Resultado Bruto	Resultado Bruto
7	11	4	8	9	7
8	22	5	17	10	13
9	33	6	25	11	20
10	44	7	33	12	27
11	56	8	42	13	33
12	67	9	50	14	40
13	78	Parte II		15	47
		II) Fase 3	Quase Exaustão		
14	89	10	58	16	53
	100	11	67	17	60
		12	75	18	67
		13	83	19	73
		14	92	20	80
		15	100	21	87
				22	93
				23	100

Tabela de Correção 2.
Tipo de Sintomatologia
Sintomas Físicos

Fase de Alerta		Fase de Resistência		Fase de Exaustão	
Res. Bruto	Porcent.	Res. Bruto	Porcent.	Res. Bruto	Porcent.
1	8	1	10	1	8
2	16	2	20	2	16
3	25	3	30	3	25
4	33	4	40	4	33
5	41	5	50	5	41
6	50	6	60	6	50
7	58	7	70	7	58
8	66	8	80	8	66
9	75	9	90	9	75
10	83	10	100	10	83
11	91			11	91
12	100			12	100

Tabela de Correção 3.
Tipo de Sintomatologia
Sintomas Psicológicos

Fase de Alerta		Fase de Resistência		Fase de Exaustão	
Res. Bruto	Porcent.	Res. Bruto	Porcent.	Res. Bruto	Porcent.
1	33	1	20	1	9
2	66	2	40	2	18
3	100	3	60	3	27
		4	80	4	36
		5	100	5	45
				6	54
				7	63
				8	72
				9	81
				10	90
				11	100

ANEXO E – Bula do kit de cortisol



Revisão: 04/01/2005

I. FINALIDADE

O Kit Radioimunoensaio para Cortisol DSL-2000 é composto de material e instruções para a determinação quantitativa de cortisol em soro, plasma ou urina. Este ensaio destina-se ao uso diagnóstico *in vitro*.

II. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O cortisol (hidrocortisona, composto F) é o glicocorticóide mais potente produzido pelo córtex adrenal humano. Assim como outros esteróides da adrenal, o cortisol é sintetizado a partir do colesterol através de uma série de etapas mediadas enzimaticamente (1,2). A primeira etapa limitante da taxa na esteroidogênese adrenal, a conversão de colesterol a pregnenolona, é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico da pituitária (ACTH) o qual, por sua vez, é regulado pelo fator de liberação de corticotropina hipotalâmico (CRF). A secreção de ACTH e CRF são inibidas por altos níveis de cortisol. No plasma, a principal porção de cortisol está ligada com alta afinidade à globulina de ligação a corticosteróides (CGB, transcortina), sendo a maior parte remanescente ligada fracamente à albumina. O cortisol atua através de receptores intracelulares específicos e possui efeitos em vários sistemas fisiológicos, incluindo função imunológica, contra regulação de glicose, tônus muscular, utilização de substrato e metabolismo ósseo (1-3). O cortisol é excretado primariamente na urina na forma não ligada (livre).

A produção de cortisol possui um ritmo circadiano dependente de ACTH com níveis de pico cedo pela manhã e com um nadir à noite. Os fatores controladores deste ritmo circadiano não estão completamente definidos. O ritmo circadiano da secreção de ACTH/cortisol amadurece gradualmente durante o início da infância e é interrompido em várias condições físicas e psicológicas (4). Além disso, quantidades elevadas de ACTH e cortisol são secretadas independentemente do ritmo circadiano em resposta a estresse físico e psicológico (4,5).

Níveis elevados de cortisol e ausência de variação diurna foram identificados em pacientes com doença de Cushing (hipersecreção de ACTH) (2,6). Níveis elevados de cortisol circulante também foram identificados em pacientes com tumores adrenais (7). Baixos níveis de cortisol são encontrados na insuficiência adrenal primária (por exemplo, hipoplasia adrenal, hiperplasia adrenal congênita, doença de Addison) e na deficiência de ACTH (1,2,8,9). Devido à variação circadiana normal dos níveis de cortisol, a distinção entre níveis de cortisol normal e anormalmente baixo pode ser difícil. Portanto, vários testes com a finalidade de avaliar o eixo pituitária-adrenal (ACTH-cortisol), incluindo hipoglicemia induzida por insulina, estimulação com ACTH de curta e longa duração, estimulação de CRF e bloqueio artificial de síntese de cortisol com metirapone tem sido realizados (8-13).

O Kit RIA Cortisol DSL-2000 utiliza um anticorpo de coelho anti-cortisol específico e não requer extração prévia da amostra de soro. A reatividade cruzada a outros esteróides que ocorrem naturalmente é baixa.

III. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O procedimento segue o princípio básico de radioimunoensaio, onde existe competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo por um número fixo de sítios de ligação (14). A quantidade de antígeno marcado [I-125] ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância que esta sendo determinada na amostra. A separação do antígeno livre e do ligado é feita de forma rápida e fácil através de um sistema de duplo anticorpo pré-reagido.

IV. REAGENTES

O Kit Cortisol DSL-2000 contém reagentes suficientes para 100 tubos. Cada kit contém os seguintes reagentes:

A. Padrões Cortisol:

Sete frascos, 0,5 mL cada, identificados de A - G, contendo concentrações de, aproximadamente, 0,0, 0,5, 2,0, 4,0, 10,0, 20,0 e 60,0 µg/dL (13,8 - 1654,8 nmol/L) de cortisol em soro humano (isento de cortisol) contendo azida sódica como conservante. Consultar os rótulos das embalagens para obter as concentrações exatas. Armazenar entre 2 - 8 °C por até três semanas. Para períodos mais longos, armazenar a -20 °C, ou à temperatura inferior.

Nota de Padronização: Devido à ausência de materiais universalmente aceitos, a preparação de referência dos Padrões & Controles de Cortisol foi obtida por Sigma, USA, purificada por HPLC, pureza verificada por cromatografia de camada delgada e desempenho verificado por imunoensaio.

B. Reagente Cortisol [I-125]: (Vermelho)

Um frasco com 55 mL cada contendo < 5 µCi (185 kBq) de cortisol marcado [I-125] em tampão contendo polietileno glicol como auxiliar de precipitação e azida sódica como conservante. Armazenar entre 2 - 8 °C até a data de validade.

C. Diluente Cortisol:

Um frasco, 5 mL, contendo um tampão com estabilizante de proteínas e azida sódica como conservante. Armazenar entre 2 - 8 °C até a data de validade.

D. Complexo Anti-Soro Cortisol: (Azul)

Um frasco, 55 mL, contendo soro de coelho anti-cortisol em tampão fosfato contendo azida sódica como conservante. Armazenar entre 2 - 8 °C até a data de validade.

E. Controles Cortisol:

Dois frascos, 0,5 mL cada, Níveis I e II, contendo concentrações baixa e alta de cortisol em soro humano, com azida sódica como conservante. Armazenar entre 2 - 8 °C por até 3 semanas. Para períodos mais longos, armazenar a -20 °C, ou a temperatura inferior.

Observação: Todos os reagentes e amostras devem atingir a temperatura ambiente (-25 °C) e serem bem homogeneizados suavemente por inversão antes do uso.

V. PRECAUÇÕES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Não é destinado ao uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

CUIDADO: MATERIAL RADIOATIVO

Consulte as regulamentações de radiação, padrões, e procedimentos aplicáveis para a sua facilidade em manusear, armazenar, e descartar materiais radioativos.

Este material radioativo deve ser recebido, adquirido, e usado somente por médicos, laboratórios clínicos ou hospitalares e somente deve ser usado para testes de laboratório ou clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou da radiação dele resultante, para seres humanos e animais. O seu recebimento, aquisição, uso e transferência estão sujeitos a regulamentações de cada país.

Para minimizar os riscos de exposição à radiação, manuseie materiais radioativos como recomendado pela regulamentação padrão apropriada e no "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series Nº RS-G-1.1," 1999, publicado pela "International Atomic Energy Agency".

As seguintes Boas Práticas para Laboratório universais a seguir devem ser observadas:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na área onde os materiais radioativos estiverem sendo manipulados.
- Não pipetar com a boca.
- Usar aventais e luvas descartáveis quando manipular materiais imunodiagnósticos.
- Lavar muito bem as mãos após manipular materiais imunodiagnósticos.
- Cobrir a superfície de trabalho com papel absorvente descartável.
- Limpar todos os respingos muito bem e imediatamente e descontaminar a superfície afetada.
- Evite a geração de aerossóis.
- Providencie ventilação adequada.
- Manuseie e descarte os reagentes e materiais de acordo com a regulamentação aplicável.

AVISO: Material Potencialmente Nocivo à Saúde

Este kit contém alguns reagentes fabricados com material de fonte humana (ex. soro ou plasma) ou usados em conjunto com materiais de fonte humana. O material neste kit foi testado por métodos recomendados pela FDA e não se apresentaram reativos para anticorpo HIV-1/2, HCV e HBsAg. Nenhum método pode oferecer completa garantia de eliminação de riscos potenciais à saúde. Estes reagentes devem ser manipulados no Nível de Biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro potencialmente infecciosa no manual do CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 4ª Edição, Abril 1999.

CUIDADO: Perigo Químico:

Alguns dos reagentes neste kit contém azida sódica como conservante em concentrações abaixo do limite permitido de <0.1%. Mesmo significativamente diluída azida sódica concentrada é um irritante para a pele e membranas mucosas e pode reagir com o cobre e chumbo das tubulações e formar azidas metálicas explosivas, especialmente se acumulada. Esta substância está sob a forma diluída, e por isto, pode minimizar os riscos de exposição significativamente, mas não completamente. Evite contato com a pele, olhos, e roupas. Em caso de contato com qualquer um destes reagentes, lave a área completamente com água e procure orientação médica. Descarte todo material não radioativo e reagentes sem risco de contaminação, deixando correr uma grande quantidade de água a fim de prevenir a formação de produtos químicos perigosos no sistema de tubulação.

VI. COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Soro ou Plasma

Soro ou plasma pode ser usado e as precauções normais para punção venosa devem ser observadas. As amostras de soro ou plasma podem ser armazenadas entre 2 - 8 °C por até 24 horas e congeladas a -20 °C, ou temperatura inferior, por períodos mais longos. Devido à variação diurna dos níveis de cortisol, a hora de coleta da amostra deve ser anotada. Não utilizar amostras muito hemolisadas ou lipêmicas.

Urina

O volume total de urina excretado durante um período de 24 horas deve ser coletado e homogeneizado em um único recipiente. Não são necessários conservantes; contudo, 10 g de ácido bórico por litro de urina podem ser adicionados.

As amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente (~ 25 °C) após coleta. As amostras de urina que não forem analisadas imediatamente devem ser armazenadas entre 2 - 8 °C. A urina deve ser armazenada a -20 °C ou à temperatura inferior se armazenada por mais de uma semana. O congelamento e descongelamento repetidos das amostras devem ser evitados.

Procedimento de Extração de Amostras de Urina:

1. Adicionar **250 µL** de urina muito bem homogeneizada a um tubo de vidro 12 x 75 mm apropriadamente identificado.
2. Adicionar **1 mL** de cloreto de metileno.
3. Agitar em vórtex por 30 segundos.
4. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos **ou** deixar em repouso a temperatura ambiente (~ 25 °C) por 30 minutos.
5. Aspirar à camada aquosa superior.
6. Transferir **400 µL** do extrato de cloreto de metileno (camada orgânica inferior), em duplicata, para tubos de plástico 12 x 75 mm apropriadamente identificados.
7. Evaporar o extrato até secagem completa utilizando um jato de ar ou nitrogênio ou deixando o tubo em repouso a temperatura ambiente.
8. Adicionar **100 µL** de Diluente Cortisol a cada tubo de extrato seco de urina.
9. A amostra extraída de urina está agora pronta para ser ensaiada como amostra desconhecida.

VII. OBSERVAÇÕES SOBRE O PROCEDIMENTO

Um bom entendimento destas instruções de uso é necessário para o sucesso do uso deste produto. Resultados confiáveis serão somente obtidos utilizando-se técnicas de laboratório precisas e seguindo-se exatamente as instruções de uso. Uma curva padrão deve ser incluída a cada ensaio.

Não misturar vários lotes de nenhum componente do kit dentro de um ensaio individual. Não usar nenhum componente além da data de validade indicada na embalagem.

Após remoção dos reagentes de ensaio do refrigerador, aguardar até que atinjam a temperatura ambiente (~25 °C) antes de pipetá-los. Reagentes não utilizados podem ser estocados conforme especificado na seção Reagente. Padrões e Controles devem ser misturados antes do uso invertendo-os ou utilizando movimentos rotatórios suaves, ao invés de vórtex. Para garantir uma mistura homogênea dos reagentes em cada tubo de ensaio, agitação suave ou vórtex é essencial.

O fato de não se obter valores apropriados para os controles pode indicar manipulações imprecisas, manipulação inadequada das amostras ou deterioração de reagentes. Se os tubos não forem bem drenados após a decantação pode-se obter replicação baixa e valores errôneos.

VIII. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

A. Material incluído:

Materiais incluídos no kit RIA Cortisol DSL, Código DSL-2000.

Material	Quantidade	Código #
Padrão Cortisol A	Um frasco	2001
Padrão Cortisol B	Um frasco	2002
Padrão Cortisol C	Um frasco	2003
Padrão Cortisol D	Um frasco	2004
Padrão Cortisol E	Um frasco	2005
Padrão Cortisol F	Um frasco	2006
Padrão Cortisol G	Um frasco	2007
Reagente Cortisol [I-125]	Um frasco	2020
Diluente Cortisol	Um frasco	2030
Complexo Anti-soro Cortisol	Um frasco	2010
Controle Cortisol Nível I	Um frasco	2051
Controle Cortisol Nível II	Um frasco	2052

B. Material Necessário Não Incluído:

- Tubos de ensaio de plástico de 12 x 75 mm.
- Tubos de vidro de 12 x 75 mm para extração de urina

- Estante para tubos de ensaio 12 x 75 mm.
- Água deionizada
- Pipeta de precisão para dispensar de 25 µL.
- Pipeta de repetição para dispensar de 500 µL.
- Agitador vórtex
- Centrífuga (1500 x g, preferencialmente refrigerada)
- Banho-maria com controle de temperatura, 37 ± 2 °C.
- Material absorvente para drenagem dos tubos
- Contador gama
- Papel de gráfico log-linear (semi-log) ou programa de análise de dados de RIA
- Cloreto de metileno para procedimento de extração de urina.

C. Procedimento de Ensaio

Aguardar até que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (~25 °C) e homogeneizá-los muito bem por inversão suave antes do uso. Analisar Padrões, Controles e amostras em duplicata.

1. Identificar e preparar tubos de ensaio em duplicata para Contagem Total, Padrões, Controles e amostras de pacientes.
2. Adicionar 25 µL de Padrões, Controles e amostras no fundo dos tubos apropriados.
3. Adicionar imediatamente 500 µL de Reagente Cortisol [I-125] a cada tubo.
4. Adicionar 500 µL de Complexo Anti-soro Cortisol a todos os tubos, exceto aos tubos de contagem Total. Este reagente deve ser misturado muito bem antes do uso.
5. Agitar todos os tubos em vórtex.
6. Incubar todos os tubos por 45 minutos em um banho-maria a 37 ± 2 °C.
7. Centrifugar todos os tubos, exceto os de Contagem Total, de 15 a 20 minutos a 1500 x g em uma centrífuga refrigerada.
8. Decantar todos os tubos por inversão simultânea, exceto os de Contagem Total, com uma estante de espuma, sobre um receptor de resíduos radioativos. Drenar bem os tubos sobre material absorvente por 15 - 30 segundos e remover bem todas as gotículas que estiverem aderidas às bordas antes de retornar os tubos com as bordas para cima. Se os tubos não forem adequadamente drenados, pode-se obter uma baixa replicação e valores errôneos.
9. Contar todos os tubos em um contador gama por um minuto.

IX. RESULTADOS

Os resultados destas Instruções de Uso foram calculados utilizando um ajuste de curva log-linear. Outros métodos de redução de dados podem gerar resultados ligeiramente diferentes.

A. Calcular as contagens médias por minuto (cpm) para cada Padrão, Controle e amostras. Calcular a % B/T ou %B/Bo para cada Padrão, Controle e amostras da seguinte forma:

$$\% B/T = \frac{\text{Contagem Média das Amostras}}{\text{Contagem Total Média}} \times 100$$

$$\%B/Bo = \frac{\text{Contagem Média das Amostras}}{\text{Contagem Média do Padrão 0 mg/dl}} \times 100$$

B. Construir uma curva de % B/T ou %B/Bo para cada Padrão (eixo y) contra a concentração de cortisol (eixo x) em um papel de gráfico log-linear (semi-log). Construir a curva padrão através da média dos pontos em duplicata.

C. Determinar a concentração de cortisol das médias das duplicatas de contagens de cada Controle e amostras a partir da curva padrão.

D. Qualquer amostra que apresente leitura maior que o Padrão mais alto deve ser adequadamente diluída com o Diluente Cortisol e ser analisada novamente.

E. Qualquer amostra que apresente leitura inferior ao padrão mais baixo, deve ser relatada desta forma.

F. Para determinar a concentração de cortisol na urina, calcular conforme mostrado acima e corrigir quanto ao volume total de urina coletado em 24 horas:

$$\frac{\mu\text{g/dL} \times \text{volume de 24 horas (mL)}}{100} = \mu\text{g Cortisol}/24 \text{ horas}$$

X. LIMITAÇÕES

- Este kit não deve ser utilizado para determinar níveis de cortisol em amostras de pacientes tratados com prednisolona ou prednisona (a prednisona é rapidamente convertida in vivo em prednisolona) (15, 16) devido à alta reatividade cruzada do anticorpo a prednisolona.
- Amostras hemolisadas e lipêmicas podem gerar resultados falsos e não devem ser utilizadas.
- Deve-se evitar congelar e descongelar repetidamente os reagentes contidos neste kit, assim como as amostras de pacientes.

XI. CONTROLE DE QUALIDADE

A ligação máxima (%ligada) ou contagens ligadas na ausência de antígeno não marcado, é de aproximadamente 50% quando um traçador recentemente marcado é usado e pode cair para 25% com a aproximação da data de validade. Uma ligação máxima menor que 25% pode indicar deterioração de reagentes, contaminação ou técnica inadequada.

Os Controles DSL ou outros controles comerciais devem cair dentro dos limites de confiança estabelecidos. Os limites de confiança para os Controles DSL são impressos nos rótulos dos frascos dos controles.

CURVA PADRÃO TÍPICA PARA CORTISOL

Tubo nº	Identificação do tubo	Ligado (cpm)	Média (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	Cortisol (µg/dL)
1,2	Contagem Total	79112 79819	79466			
	Padrões					
3, 4	A	45939 45535	45737	57,6	100,0	0
5, 6	B	37942 39732	38837	48,9	84,9	0,5
7, 8	C	30927 30626	30777	38,7	67,3	2,0
9, 10	D	24626 24714	24670	31,0	53,9	4,0
11, 12	E	17689 17682	17786	22,4	38,9	10,0
13, 14	F	12456 12458	12457	15,7	27,2	20,0
15, 16	G	8282 8590	8436	10,6	18,4	60,0
	Controles					
17, 18	Nível I	24311 26049	25180	31,7	55,1	3,77
19, 20	Nível II	12090 12823	12457	15,7	27,2	20,00

ED50 = 5,1 mg/dl

Aviso: Os dados acima não devem ser utilizados no lugar dos dados obtidos pelo usuário no laboratório.

XII. VALORES ESPERADOS

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores para a faixa normal de cortisol. Os resultados de um estudo de faixa normal, conduzido com o RIA Cortisol DSL-2000 foram os seguintes:

Horário	N	Faixa Normal (µg/dL)
Manhã	100	5 - 25
Tarde	100	2 - 12

Devido à variação diurna (4) em indivíduos normais, os níveis séricos ou plasmáticos de cortisol são mais altos pela manhã e mais baixos à noite. Os níveis de cortisol após testes de estimulação com ACTH normalmente aumentam de 2 - 3 vezes o valor basal. Os testes de supressão com dexametasona ou metirapona reduzem o valor basal de cortisol para 75 - 90% do normal (8-12). Os valores de ensaio para amostras de plasma (heparina ou EDTA) podem ser aproximadamente 5 - 10% mais baixos para soro.

Faixa de normalidade para urina: 25 - 120 µg/24 horas (urina não extraída).

XIII. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Todas as características de desempenho foram expressas em µg/dL. Para converter para nmol/L:

µg/dL x 27,6 = nmol/L

A. Sensibilidade:

A sensibilidade teórica, definido como o nível mais baixo detectável de cortisol que pode ser distinguido para o Padrão Cortisol de 0 µg/dL é 0,11 µg/dL a um limite de confiança de 95%.

B. Precisão:

A precisão intra-ensaios foi determinada a partir da média de 12 replicatas para cada amostra.

Amostra	n	Média (µg/dL)	Desvio Padrão (µg/dL)	Coefficiente de Variação (%)
I	12	5,04	0,33	6,5
II	12	18,80	0,66	3,5
III	12	27,32	2,26	8,3

A precisão inter-ensaio foi determinada a partir da média da média de duplicatas de 12 corridas separadas.

Amostra	n	Média (µg/dL)	Desvio Padrão (µg/dL)	Coefficiente de Variação (%)
I	12	5,06	0,40	7,9
II	12	18,46	1,26	6,8
III	12	29,68	2,76	9,3

C. Recuperação:

Três amostras de soro contendo diferentes níveis de cortisol endógeno foram inoculadas com diferentes quantidades de uma amostra de soro com teor elevado e foram analisadas.

Amostra	Endógeno (µg/dL)	Adicionado (µg/dL)	Esperado (µg/dL)	Observado (µg/dL)	Recuperação (%)
I	2,27	1,73	4,00	3,97	99
		3,65	5,92	6,57	111
		7,49	9,76	8,95	92
II	7,94	1,73	9,67	8,46	87
		3,65	11,59	11,80	102
		7,49	15,43	14,26	92
III	13,11	1,73	14,84	14,22	96
		3,65	16,75	14,99	89
		7,49	20,60	17,94	87

D. Linearidade de Diluição

Três amostras de soro foram diluídas com Padrão Cortisol 0 µg/dL e foram analisadas.

Amostra	Fator de Diluição	Esperado (µg/dL)	Observado (µg/dL)	Recuperação (%)
I	-	-	19,81	-
	1:2	9,90	8,68	88
	1:4	4,95	4,23	85
	1:8	2,47	1,86	75
	1:16	1,23	0,95	77
II	-	-	27,84	-
	1:2	13,92	13,85	99
	1:4	6,96	6,54	94
	1:8	3,48	3,71	107
	1:16	1,74	1,87	107
III	-	-	19,74	-
	1:2	9,87	9,64	98
	1:4	4,93	4,49	91
	1:8	2,46	2,08	85
	1:16	1,23	1,04	85

E. Especificidade:

A reatividade cruzada do anti-soro para cortisol foi determinada contra vários compostos. A porcentagem de reatividade cruzada é expressa como a relação entre a concentração de cortisol e a concentração do composto reativo a 50% de ligação com o Padrão 0 µg/dL. Na maioria dos casos a interferência dos compostos endógenos é insignificante quando comparado aos níveis muito mais altos de cortisol circulante. A reatividade cruzada do anticorpo com prednisolona exclui o uso deste kit para pacientes sob terapia com prednisolona ou prednisona (a prednisona é convertida a prednisolona in vivo).

ESTERÓIDE	% Reatividade Cruzada
Cortisol	100,0
Prednisolona	33,33
Corticosterona	9,30
11-Desoxicortisol	3,80
Cortisona	2,22
Prednisona	1,42
17 α-Hidroxiprogesterona	1,00
11-Desoxicorticosterona	0,61
Dexametasona	0,38
Testosterona	0,14
Progesterona	0,12
Epiandrosterona	0,04
Desidroepiandrosterona	0,02
Estradiol	0,02

XIV. REFERÊNCIAS

- Drucker S, MI, New MI: Disorders of adrenal steroidogenesis. *Pediatr Clin North Am* 34: 1055-1066, 1987.
- Migeon CJ, Jansz RI: Adrenal cortex: hypo- and hiperfunction. In Lishitz F (ed): *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide*, second edition, Marcel Dekker, Inc, New York, 1990, pp 333-352.
- Hyams JS, Corey DE: Corticosteroids and growth. *J Pediatr* 113: 249-254, 1988.
- Kreiger DT: Rhythms of ACTH and corticosteroid secretion in health and disease and their experimental modifications. *J Steroid Biochem* 6: 785-791, 1975.

5. Chemow B, Alexander R, Smalldridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardley D, Fink MP, Lake R, Fletcher JR: Hormonal responses to graded surgical rates. *Arch Intern Med* 147: 1273-1276, 1987.
6. Crapo L: Cushing's Syndrome: A review of diagnostic tests. *Metabolism* 28: 955-977, 1979.
7. Lee PDK, Winter RJ, Green OC: Virilization adrenocortical tumors in childhood. Eight cases and a review of the literature. *Pediatrics* 76:437-444, 1985.
8. Leiss S, Ahonen P, Perheentupa J: The diagnosis and staging of hypocortisolism in progressing autoimmune adrenalitis. *Pediatr Res* 17: 861-867, 1983.
9. Alsever RN, Gotlin RW: *Handbook of Endocrine Tests in Adults and Children*, second edition. Year Book Medical Publishers Inc, Chicago, 1978.
10. Stewart PM, Sedd JR, Carrie J, Edwards CRW, Padfield PL: a rational approach for assessing the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Lancet* 5: 1208-1210, 1986.
11. Watts NB, Tindall GT: Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. *JAMA* 259: 708-711, 1988.
12. Lashansky G, Soenger P, Fishman K, Gaulier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E: Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 674-686, 1991.
13. Schlaghecke R, Koinely E, Serfen RT, Ridderskamp P: The effect of long term glucocorticoid on pituitary-adrenal responses to exogenous corticotropin-releasing hormone. *New England J Med* 326: 226-230, 1992.
14. Yalow R, Berson S: introduction and general considerations. IN Odell WD, Daughaday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.

Revisão-Assessoria: 06/10/2006

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828

Registro do Produto M.S.: 10337680041

CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:

Genese Produtos Diagnósticos Ltda.

Autorização de Funcionamento M.S.:103376-8

Rua Diogo Vaz , 291 – CAMBUCI

CNPJ. 68.384.155/0001-02

CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:

Diagnostics Systems Laboratories, Inc.

445 Medical Center Blvd.

Webster, Texas 77598-4217 USA

Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987

ANEXO F – Bula do kit da DHEA



REVISÃO: 04/04/2005

I. FINALIDADE

O Kit para Radioimunoensaio com Tubos Revestidos DHEA ACTIVE™ DSL-9000 fornece materiais e instruções para a determinação quantitativa de dehidroepiandrosterona em soro e plasma. Este ensaio destina-se ao uso diagnóstico *in vitro*.

II. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A dehidroepiandrosterona (DHEA; androstenolona; 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona) é um esteroide C₁₉ produzido no córtex adrenal e, numa menor extensão, nas gônadas (1-3). A DHEA atua como um precursor na síntese de testosterona e estrógeno. Devido à presença de um grupo 17-oxo (ao invés de uma hidroxila), a DHEA possui atividade androgênica relativamente fraca, a qual tem sido estimada como sendo ao redor de 10% da testosterona (1). Porém em recém-nascidos, crianças próximo da puberdade e mulheres adultas, os níveis de DHEA circulante podem estar várias vezes mais altos que as concentrações de testosterona, podendo ocorrer uma conversão rápida no tecido periférico para estrógenos mais potentes (androstenediona e testosterona) e estrógeno. Além disso, a DHEA possui relativamente pouca afinidade para a globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG). Estes fatores podem aumentar a biopotência fisiológica da DHEA. O papel fisiológico da DHEA não foi conclusivamente definido (4,5). Uma variedade de efeitos *in vitro* incluindo efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens de células e efeitos no metabolismo de células mediado por enzimas foram relatados. Estudos *in vivo* sugerem que a DHEA possa afetar o metabolismo de colesterol e lipídeos, sensibilidade à insulina e secreção de insulina e função imunológica. Níveis anormais de DHEA foram relatados na esquizofrenia (6) e obesidade (7). A administração terapêutica de DHEA foi proposta para várias condições, incluindo obesidade e doença cardiovascular (4,5).

Os níveis séricos de DHEA são relativamente altos no feto e no recém-nascido, baixos durante a infância e aumentam durante a puberdade (8,9). Níveis elevados de DHEA durante a adrenarquia podem contribuir para o desenvolvimento de pelos pubianos secundários. Os níveis séricos de DHEA progressivamente declinam após a terceira década de vida (4,10,11). Nenhuma alteração consistente nos níveis séricos de DHEA ocorre durante o ciclo menstrual ou gravidez; contudo, pode ocorrer nível baixo de DHEA na mulher pré-menopausa (12).

A DHEA possui uma taxa de depuração metabólica rápida em comparação com o seu conjugado sulfatado, a DHEA-S. Por esta causa, os níveis séricos de DHEA são de 100 a 1000 vezes mais baixos que os níveis de DHEA-S. Em adição, os níveis séricos de DHEA apresentam variação diurna significativa, a qual é dependente do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (4,10). Os níveis séricos de DHEA aumentam em resposta à administração exógena de ACTH (7).

A determinação de DHEA sérica é um marcador útil da síntese de andrógenos adrenais. Níveis anormalmente baixos podem ocorrer no hipoadrenalismo e níveis elevados ocorrem em várias condições, incluindo adenoma adrenal virilizante e carcinoma (13), deficiências de 21-hidroxilase e 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase e em alguns casos de hirsutismo feminino (3). Como a DHEA é produzida pelas gônadas em quantidades reduzidas, as determinações de níveis de DHEA podem auxiliar na localização de fontes de andrógenos em condições virilizantes.

O Kit RIA DHEA DSL ACTIVE utiliza uma preparação de anticorpo específico e sensível com baixa reatividade cruzada a outros compostos fisiológicos, incluindo DHEA-S. De forma diferente de outros métodos para determinação de DHEA, o RIA DSL para DHEA não requer extração prévia da amostra.

III. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O procedimento segue o princípio básico de radioimunoensaio, onde existe competição entre um antígeno radioativo e um não radioativo por um número fixo de sítios de ligação ao anticorpo (14). A quantidade de DHEA marcada [I-125] ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de DHEA presente na amostra. A separação do antígeno livre e do ligado é feita por decantação ou aspiração dos tubos revestidos com anticorpo.

IV. REAGENTES

Os códigos para o kit RIA DHEA DSL ACTIVE[®] são os seguintes: DSL-9000 (100 tubos) e DSL 9000-5 (500 tubos). Cada kit contém os seguintes reagentes:

A. Padrões DHEA:

Um frasco, 2 mL, identificado como A, contendo 0 ng/mL e cinco frascos, 1 mL cada, identificados de B a F, contendo concentrações de, aproximadamente 0,2, 1,0, 2,5, 10,0 e 30,0 ng/mL (0,7 – 103,8 nmol/L) de DHEA (sintética) em um tampão a base de proteínas (BSA) contendo azida sódica como conservante. Consultar os rótulos das embalagens para obter as concentrações exatas. Armazenar os frascos fechados de 2 – 8 °C até a data de validade. Para períodos mais longos, armazenar a –20 °C, ou à temperatura inferior até a data de validade.

* DSL-9000(500 tubos) contém três conjuntos de calibradores.

NOTA: Devido à ausência de materiais universalmente aceitáveis, a preparação de referência para os Padrões & Controles de DHEA foram obtidas por Steraloids, Inc. USA, purificada por HPLC, pureza verificada por cromatografia de camada delgada e desempenho verificado por imunoensaio.

B. Reagente DHEA [I-125]: (Vermelho)

Um frasco, 55 mL cada, contendo < 5 μ Ci (185 kBq) de DHEA marcada [I-125] em um tampão a base de proteína (BSA) contendo azida sódica como conservante. Armazenar entre 2 – 8 °C até a data de validade.

*DSL-9000(500 tubos) contém 5 frascos de reagentes.

C. Tubos Revestidos com Anti-DHEA: (Borda Creme)

100 tubos plásticos (DSL-9000) com imunoglobulina policlonal de coelho anti-DHEA imobilizada na parede interna de cada tubo. Armazenar entre 2 – 30 °C até a data de validade.

* DSL-9000 (500 tubos) contém quinhentas (500) tubos plásticos.

D. Controles DHEA:

Dois frascos, 1 mL cada, Níveis I e II, contendo concentrações baixa e alta de DHEA em um tampão a base de proteína (BSA), com azida sódica como conservante. Consultar os rótulos dos frascos para as faixas de referência. Armazenar os frascos fechados de 2 – 8 °C até a data de validade. Para períodos mais longos, armazenar a –20 °C, ou à temperatura inferior até a data de validade.

*DSL-9000 (500 testes) contém três conjuntos de controles.

Nota: Todos os reagentes e amostras devem atingir a temperatura ambiente (~25 °C) e serem bem homogeneizados suavemente por inversão antes do uso.

V. PRECAUÇÕES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Não é destinado ao uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

CUIDADO: MATERIAL RADIOATIVO

Consulte as regulamentações de radiação, padrões, e procedimentos aplicáveis para a sua facilidade em manusear, armazenar, e descartar materiais radioativos. Este material radioativo deve ser recebido, adquirido, e usado somente por médicos, laboratórios clínicos ou hospitalares e somente deve ser usado para testes de laboratório ou clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou da radiação dele resultante, para seres humanos e animais. O seu recebimento, aquisição, uso e transferência estão sujeitos a regulamentações de cada país.

Para minimizar os riscos de exposição a radiação, manuseie materiais radioativos como recomendado pela regulamentação padrão apropriada e no "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series N° RS-G-1.1, 1999, publicado pela "International Atomic Energy Agency".

As seguintes Boas Práticas para Laboratório universais devem ser observadas:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na área onde os materiais radioativos estiverem sendo manipulados.
- Não pipetar com a boca.
- Usar aventais e luvas descartáveis quando manipular materiais imunodiagnósticos.
- Lavar muito bem as mãos após manipular materiais imunodiagnósticos.
- Cobrir a superfície de trabalho com papel absorvente descartável.
- Limpar todos os respingos muito bem e imediatamente e descontaminar a superfície afetada.
- Evite a geração de aerossóis.
- Providencie ventilação adequada.
- Manuseie e descarte os reagentes e materiais de acordo com a regulamentação aplicável.

AVISO: Material Potencialmente Nocivo à Saúde

Este kit contém alguns reagentes fabricados com material de fonte humana (ex. soro ou plasma) ou usados em conjunto com materiais de fonte humana. O material neste kit foi testado por métodos recomendados pela FDA e não se apresentaram reativos para anticorpo HIV-1/2, HCV e HBsAg. Nenhum método pode oferecer completa garantia de eliminação de riscos potenciais à saúde. Estes reagentes devem ser manipulados no Nível de Biossegurança 2, conforme recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro potencialmente infecciosa no manual do CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 4ª Edição, Abril 1999.

CUIDADO: Perigo Químico:

Alguns dos reagentes neste kit contêm azida sódica como conservante em concentrações abaixo do limite permitido de <0.1%. Mesmo significativamente diluída azida sódica concentrada é um irritante para a pele e membranas mucosas e pode reagir com o cobre e chumbo das tubulações e formar azidas metálicas explosivas, especialmente se acumulada. Esta substância está sob a forma diluída, e por isto, pode minimizar os riscos de exposição significativamente, mas não completamente. Evite contato com a pele, olhos, e roupas. Em caso de contato com qualquer um destes reagentes, lave a área completamente com água e procure orientação médica. Descarte todo material não radioativo e os reagentes sem risco de contaminação deixando correr uma grande quantidade de água a fim de prevenir a formação de produtos químicos perigosos no sistema de tubulação. Para maiores informações a respeito de substâncias de riscos pertencentes a este kit, por favor, consulte os componentes específicos no MSDS, ou consulte o site www.DSLabs.com ou solicite a informação.

VI. COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

O soro ou plasma (EDTA) pode ser usado e as precauções normais para punção venosa devem ser observadas. As amostras podem ser armazenadas entre 2 – 8 °C por até 24 horas e devem ser congeladas a –20 °C, ou temperatura inferior por até dois anos em recipientes hermeticamente fechados (15). Não utilizar amostras hemolisadas ou lipêmicas. Em um estudo realizado pelo fabricante, os valores obtidos para 10 amostras de soro ou plasma coletado com EDTA foram comparados utilizando o Kit RIA DSL-9000. Os resultados foram os seguintes:

$$[\text{soro}] = 1,04 [\text{plasma}] + 0,05$$

$$r^2 = 0,99, p < 0,001$$

VII. OBSERVAÇÕES SOBRE O PROCEDIMENTO

Um bom entendimento destas instruções de uso é necessário para o sucesso do uso deste produto. Resultados confiáveis serão somente obtidos utilizando-se técnicas de laboratório precisas e seguindo-se exatamente as instruções de uso. Uma curva padrão deve ser incluída em cada ensaio.

Não misturar vários lote de nenhum componente do kit dentro de um ensaio individual. Não usar nenhum componente além da data de validade indicada na embalagem.

Após remoção dos reagentes de ensaio do refrigerador, aguardar até que atinjam a temperatura ambiente (~25 °C) antes de pipetá-los. Reagentes não utilizados podem ser estocados conforme especificado na seção Reagente. Padrões e Controles devem ser misturados antes do uso invertendo-os ou utilizando movimentos rotatórios suaves, ao invés de vórtex. Para garantir uma mistura homogênea dos reagentes em cada tubo de ensaio, agitação suave ou vórtex é essencial.

O fato de não se obter valores apropriados para os controles pode indicar manipulações imprecisas, manipulação inadequada das amostras ou deterioração de reagentes. Se os tubos não forem bem drenados após a decantação pode-se obter replicação baixa e valores errôneos.

VIII. PROCEDIMENTO DO ENSAIO**A. Materiais fornecidos:**

Materiais fornecidos no kit RIA DHEA ACTIVE™ DSL, Código DSL-9000

Material	DSL-9000 (100 tubos)		DSL-9000-5 (500 tubos)	
	Quantidade	Código #	Quantidade	Código #
Padrão DHEA A	Um frasco	8901	Três frascos	8901
Padrão DHEA B	Um frasco	8902	Três frascos	8902
Padrão DHEA C	Um frasco	8903	Três frascos	8903
Padrão DHEA D	Um frasco	8904	Três frascos	8904
Padrão DHEA E	Um frasco	8905	Três frascos	8905
Padrão DHEA F	Um frasco	8906	Três frascos	8906
Tubos Revestidos com Anti-DHEA	100 Tubos	9010	500 Tubos	9010
Reagente Anti-DHEA [I-125]	Um frasco	8920	Cinco frascos	8920
Controle DHEA Nível I	Um Frasco	8951	Três frascos	8951
Controle DHEA Nível II	Um Frasco	8952	Três frascos	8952

B. Materiais Necessários Não Fornecidos:

- Tubos de ensaio de plástico de 12 x 75 mm.
- Estante para tubos de ensaio 12 x 75 mm.
- Pipeta de precisão para dispensação de 100 µL.
- Pipeta de repetição para dispensação de 500 µL.
- Agitador de vórtex
- Banho-maria com temperatura controlada, 37 ± 2 °C.
- Material absorvente para drenagem dos tubos
- Contador gama

- Papel gráfico semi-log ou programa de análise de dados de RIA

C. Procedimento de Ensaio

Aguardar até que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (~25 °C) e homogeneizá-los muito bem por inversão suave antes do uso. Analisar Padrões, Controles e amostras em duplicata.

1. Identificar dois tubos normais (não revestidos) para Contagem Total. Identificar e preparar Tubos Revestidos com Anti-DHEA em duplicata, para Padrões, Controles e amostras.
2. Pipetar 100 µL dos Padrões, Controles e amostras nos tubos apropriados. Pipetar nos fundos dos tubos.
3. Adicionar 500 µL de Reagente DHEA [I-125] a cada tubo.
4. Agitar todos os tubos em vórtex de 1 a 3 segundos.
5. Incubar todos os tubos a 37 °C por 2 horas.
6. Decantar todos os tubos, exceto os de Contagem Total, por inversão simultânea com uma estante de espuma sobre um receptáculo de resíduos radioativos. Inverter firmemente os tubos sobre um material absorvente, para facilitar a drenagem, e deixá-los secar sobre o material absorvente por pelo menos 2 minutos. Drenar bem os tubos a fim de remover todas as gotículas que estejam aderidas às bordas antes de retornar os tubos com as bordas para cima. Se os tubos não forem adequadamente drenados, pode-se obter uma baixa replicação e valores errôneos.
7. Contar todos os tubos em um contador gama por 1 minuto.

IX. RESULTADOS

Os resultados destas Instruções de Uso foram calculados utilizando um ajuste de curva log-linear. Outros métodos de redução de dados podem gerar resultados ligeiramente diferentes.

A. Calcular as médias das contagens por minuto (cpm) para cada Padrão, Controle e amostra. Calcular a %B/T ou %B/Bo para cada Padrão, Controle e amostra da seguinte forma:

$$\%B/T = \frac{\text{Contagem Média das Amostras}}{\text{Contagem Total Média}} \times 100$$

$$\%B/Bo = \frac{\text{Contagem Média das Amostras}}{\text{Contagem Média do Padrão 0 ng/ml}} \times 100$$

B. Construir uma curva com %B/Bo para cada Padrão de DHEA (eixo y) contra a concentração de DHEA (eixo x) em um papel gráfico log-linear (semi-log). Construir a curva padrão através da média dos pontos em duplicata.

C. Determinar a concentração de DHEA das médias de contagens das duplicatas de cada Controle e amostras a partir da curva padrão.

D. Qualquer amostra que apresentar leitura maior que o padrão mais alto, deve ser adequadamente diluída com o Padrão DHEA 0 ng/mL e ser analisada novamente.

E. Qualquer amostra que apresentar leitura inferior ao padrão mais baixo, deve ser relatada desta maneira.

X. LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos neste kit são otimizados para a determinação de níveis de DHEA em soro ou plasma coletado com EDTA.
- Evitar congelar e descongelar repetidamente os reagentes contidos neste kit, assim como as amostras de pacientes.
- Amostras hemolisadas e lipêmicas podem gerar resultados falsos e não devem ser utilizadas.

XI. CONTROLE DE QUALIDADE

- A ligação máxima (%B/T) ou contagens ligadas na ausência de antígeno não marcado, é de aproximadamente 40% quando um traçador recentemente marcado é usado e pode cair para 20% com a aproximação da data de validade. Uma ligação máxima menor que 20% pode indicar deterioração de reagentes, contaminação ou técnica inadequada.
- Os Controles DSL ou outros controles comerciais devem cair dentro dos limites de confiança estabelecidos. Os limites de confiança para os Controles DSL são impressos nos rótulos dos frascos dos controles. Os controles de níveis alto e baixo devem ser incluídos em cada ensaio.

CURVA PADRÃO TÍPICA DO ACTIVE™ DHEA

Tubo nº	Identificação do tubo	Ligado (cpm)	Média (cpm)	L/T (%)	L/Lo (%)	DHEA (ng/mL)
1,2	Contagem Total	76937	77601			
	Padrões	78265				

3, 4	A	39920 36033	37977	48,9	100,0	0
5,6	B	31067 31388	31228	40,2	82,2	0,2
7,8	C	19536 20250	19893	25,6	52,4	1,0
9,10	D	13533 13733	13633	17,6	35,9	2,5
11,12	E	6126 6126	6126	7,9	16,1	10,0
13,14	F	3548 3534	3541	4,6	9,3	30,0
15, 16	Controles Nível I	24328 25343	24836	32,0	65,4	0,49
17,18	Nível II	14516 14068	14292	18,4	37,6	2,27

ED₅₀ = 1,14 ng/mL

Aviso: Os dados acima não devem ser utilizados no lugar dos dados obtidos pelo usuário no laboratório.

XII. VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deverá estabelecer os seus próprios valores para a faixa normal e patológica para DHEA. Os dados a seguir foram coletados utilizando o Kit DHEA DSL-8900 para indivíduos adultos normais:

Sexo	N	Idade (em anos) média ± DP	DHEA (ng/mL)	
			Mediana	Faixa Absoluta
Masculino	33	47 ± 31, faixa 16 - 79	4,6	1,4 - 12,5
Feminino	61	51 ± 29, faixa 22 - 80	3,0	0,8 - 10,5

Para a população como um todo, os níveis de DHEA foram inversamente relacionados com a idade ($r^2 = 0,28$, $p = 0,007$).

Ver a seção Comparação de Métodos entre o Kit RIA DHEA DSL-8900 e o Kit RIA com Tubos Revestidos DHEA ACTIVE DSL-9000.

XIII. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Todas as características de desempenho foram expressas em ng/mL. Para converter para nmol/L:

ng/mL x 3,46 = nmol/L

A. Sensibilidade

A sensibilidade teórica, ou limite de detecção mínimo, calculado através da interpolação da média menos dois desvios padrões de 14 replicatas do Padrão DHEA 0 ng/mL é de 0,02 ng/mL.

B. Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada a partir da média de 12 replicatas para cada amostra.

Amostra	n	Média (ng/mL)	Desvio Padrão (ng/mL)	Coefficiente de Variação (%)
I	12	1,24	0,07	5,6
II	12	2,63	0,28	10,6
III	12	8,51	0,69	7,3

A precisão inter-ensaio foi determinada a partir da média da média de duplicatas de 10 corridas separadas.

Amostra	n	Média (ng/mL)	Desvio Padrão (ng/mL)	Coefficiente de Variação (%)
I	10	0,98	0,10	10,2
II	10	2,55	0,20	7,8
III	10	10,34	0,72	7,0

C. Recuperação

Três amostras de soro contendo diferentes níveis de DHEA endógena foram inoculadas com quantidades conhecidas de DHEA e foram analisadas.

Amostra	Endógeno (ng/mL)	Adicionado (ng/mL)	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperação (%)
I	0,32	0,45	0,77	0,86	112
		1,20	1,52	1,56	103
		4,85	5,17	5,06	98

II	1,36	0,45	1,81	1,92	106
		1,20	2,56	2,73	107
		4,85	6,21	6,72	108
III	11,51	0,45	11,96	10,01	84
		1,20	12,71	10,93	86
		4,85	16,33	16,29	100

D. Linearidade de Diluição

Três amostras séricas foram diluídas com Padrão DHEA 0 ng/ml e analisadas.

Amostra	Fator de Diluição	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperação (%)
I	-	-	4,35	-
	1:2	2,17	2,25	104
	1:4	1,08	1,05	97
	1:8	0,54	0,54	100
	1:16	0,27	0,28	104
II	-	-	9,14	-
	1:2	4,57	4,38	96
	1:4	2,28	2,29	100
	1:8	1,14	1,09	96
	1:16	0,57	0,55	96
III	-	-	15,99	-
	1:2	7,99	7,48	94
	1:4	3,99	4,16	104
	1:8	1,99	2,09	105
	1:16	0,99	1,07	108
IV	-	-	0,16	-
	1:32	0,13	0,16	123
	1:64	0,14	0,15	107
	1:128	0,14	0,15	107
	1:256	0,14	0,15	107

E. Especificidade

A reatividade cruzada do anti-soro para DHEA foi determinada contra vários compostos com o ensaio DSL-9000. A porcentagem de reatividade cruzada é expressa como a relação entre a concentração de DHEA e a concentração do composto reativo a 50% de ligação com o Padrão DHEA 0 ng/mL.

Composto	% Reatividade Cruzada
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	100
Isoandrosterona	0,45
Androstenediona	0,19
5 α -Androstane-3,17-diona	0,04
5-Androstene-3 β , 17 β -diol	0,03
Androsterona	0,03
11-Desoxicortisol	ND
Progesterona	ND
Dexametasona	ND
Sulfato de DHEA	ND
Testosterona	ND
19-Hidroxiandrostenediona	ND
Androstanolona (5 α -Dehidrotestosterona)	ND
5 β -Androstano-3 α -ol-17-ona	ND
5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol	ND
5 β -Androstane-3,17-diona	ND
4-Androsten-11 β -ol-3,17-diona	ND
5(10)Estren-17 α -Etilnil-17 β -ol-3-ona	ND
4-Androsten-17 β -ol-3, 11-diona	ND
4-Androsten 17 α -Etilnil-17 β -ol-3-ona	ND
5 β -Androstane-3 α , 17 β -diol	ND
5 β -Androstane-3 β , 17 β -diol	ND
Aldosterona	ND
Corticosterona	ND
Cortisol	ND
Danazol	ND
Estrilol	ND
Estrona	ND
Noretindrona	ND
Prednisona	ND
Espironolactona	ND
Triamcinolona	ND

ND = Não Detectável (< 0,001%)

F. Comparação de Métodos

O Kit RIA de Tubos Revestidos DHEA ACTIVE DSL-9000 foi comparado ao Kit RIA DHEA DSL-8900 utilizando amostras com limites entre 0,94 - 8,81 ng/mL. Os resultados foram os seguintes:

N = 56 amostras de soro

Valores Médios: DSL-9000: $2,56 \pm 1,55$ ng/mL

DSL-8900: $2,64 \pm 1,45$ ng/mL

Regressão: [DSL-9000] = 1,03 [DSL-8900] - 0,16
 $r^2 = 0,94$, $p < 0,001$

XIV. REFERÊNCIAS

1. Dorfman, RI, Shiple RA: Androgens. John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Meikle AW, Daynes RA, Araneo BA: Adrenal androgen secretion and biological effects. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20: 381-400, 1991.
3. Pong S, Riddick L: Hirsutism. IN Lilshitz F (ed): *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide*, second edition, Marcel Dekker, Inc, New York, 1990, pp. 259-291.
4. Natziger AN, Herrington DM, Bush TL: Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: their relation to cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* 13: 267-293, 1991.
5. Berdazier CD, Parente JA Jr, McIntosh MK: Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB J* 7: 414-419, 1993.
6. Erb JL, Kadone JB, Tournay G, Mickelsen R, Trader D, Szabo R, Davis V: Discrimination between schizophrenic and control subjects by means of plasma dehydroepiandrosterone measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 181-196, 1981.
7. De Pergola G, Giorgioli VA, Cospite MR, Giorgino F, Cignarelli M, Giorgino R: Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index. *Metabolism* 40: 187-190, 1991.
8. de Pirelli E, Forest MG: Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: the use of a sensitive radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 43: 982-991, 1976.
9. Lachinsky G, Soenger P, Fishman K, Gaudier T, Mayes D, Berg G, Di Martino-Nardi J, Reiter E: Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 674-686, 1991.
10. Zimmoff B, Rosenfeld RS, Slain GW, Levin J, Fukushima DK: Sex differences in twenty-four hour mean plasma concentration of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in adults. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 330-333, 1980.
11. Carlström K, Brady S, Lunell N-O, Lagrelus A, Möllerström G, Poussette A, Ronnevik G, Stege R, von Scholitz B: Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. *Maturitas* 10: 297-306, 1988.
12. Key TJA, Pike MC, Wong DY, Moore JW: Long term effects of a first pregnancy on serum concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate and dehydroepiandrosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1651-1653, 1990.
13. Lee PDK, Winter RJ, Green OC: Virilization adrenocortical tumors in childhood. Eight cases and a review of the literature. *Pediatrics* 76:437-444, 1985.
14. Yalow R, Benson S: Introduction and general considerations. IN Odell WD, Daughaday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
15. *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3rd ed. Tietz NW, ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1987: 560.

Revisão-Assessoria: 21/07/2005

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828

Registro do Produto M.S.: 10337680042

CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:

Genese Produtos Diagnósticos Ltda.
 Autorização de Funcionamento M.S.:103376-8
 Rua Diogo Vaz, 291 – CAMBUCCI
 CNPJ. 68.384.155/0001-02
 CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:

Diagnostics Systems Laboratories, Inc.
 445 Medical Center Blvd.
 Webster, Texas 77598-4217 USA

Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987