

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CARLA GIRARDI

**ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE
DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E DE CORTISOL,
ESCORES DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE E ESTRESSE
EM PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL**

Porto Alegre
2010

CARLA GIRARDI

**ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE
DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E DE CORTISOL,
ESCORES DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE E ESTRESSE
EM PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum

Porto Alegre

2010

CARLA GIRARDI

**ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE
DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E DE CORTISOL,
ESCORES DE DEPRESSÃO, ANSIEDADE E ESTRESSE
EM PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL**

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

Aprovada em 13 de Agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes – UFPR

Profa. Dra. Sílvia Ataíde Pithan – UFSM

Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati – UFRGS

Profa. Dra. Maria Martha Campos – PUCRS

Porto Alegre
2010

Dedico essa tese aos meus pais.

Deus me deu a graça de ser filha de **Antônio e Nelci Girardi**.

Pai e mãe, vocês foram os meus primeiros professores, do certo e do errado, do andar, do falar e da disciplina.

Tantas foram às vezes que, o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês em uma união que me incentivou a prosseguir. Se hoje estou aqui é porque vocês me mostraram o caminho, alimentaram meus sonhos, me aconselharam, tiveram paciência e compartilharam minhas alegrias, tristezas e dúvidas.

Obrigada pelos valores e princípios que vocês dois me ensinaram e que jamais serão esquecidos.

Pai e mãe, eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que é minha força e minha paz. Obrigada por segurar minhas mãos, iluminar meus caminhos e guardar minha vida.

À minha irmã, **Patrícia Girardi**, com quem posso sorrir chorar e ser eu mesma, sem disfarces. Saber que posso contar com sua ajuda, facilita o enfrentamento das adversidades. Não importa as circunstâncias e o tempo, raízes nos unem e um amor indestrutível.

À minha sobrinha, **Sara Girardi Andriolo**, que há 04 anos vem colocando em meu mundo príncipes, princesas, fadas e bruxas. Em suas mãos, os brinquedos ganham vida e a vida fantasia. Ah! Obrigada pelas sessões de cinema da Barbie, Cinderela, Bela Adormecida, Branca de Neve, Pequena Sereia, Bela e a Fera, Aristogatas, Pinóquio... Te amo muito!

Aos **Pacientes** por me aceitarem e por confiarem suas angústias, seus segredos e seus sofrimentos. Obrigada pelos ensinamentos de paciência, respeito e humildade. Sem vocês, essa tese não seria possível.

À minha amiga **Lee Yi Ching** por todas as palavras de coragem que me incentivaram a seguir em frente. Mesmo ocupadas com nossos próprios interesses, lutando para alcançar nossas metas e vivendo nossas próprias vidas, quero que saibas que te considero minha verdadeira amiga.

Ao meu amigo **Eduardo Girard Siqueira** por todas as palavras de coragem que antecederam a conclusão dessa tese e que me deram força para enfrentar essa fase. Obrigada por me escutar.

Ao meu chefe **Mauri Marcos Sens** por me permitir fazer parte da história da PerfilRX. Minha eterna gratidão pelo apoio e incentivo durante o doutorado e por compreender os momentos de ausência.

Às minhas colegas de trabalho e minhas amigas **Greicy Kelly Neckel, Janes Francio Pissaia, Márcia da Silva, Maria Helenice de Souza, Pamela Salles e Rita Ionete Viana** por compartilharem as horas fáceis e as difíceis. Obrigada pela compreensão e pela ajuda de todas vocês.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)** pela acolhida como aluna e por permitir a realização dessa tese.

À minha orientadora, professora **Fernanda Gonçalves Salum**, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e companheirismo. Obrigada pela brilhante orientação no planejamento, execução e conclusão dessa tese.

Às professoras, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **Fernanda Gonçalves Salum, Liliane Soares Yurgel, Karen Cherubini e Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo**, obrigada por abrirem meus caminhos e por transmitirem os segredos da caminhada. Vocês são exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e de amor à Estomatologia.

Aos professores, da Universidade Federal de Santa Catarina, **Cleo Nunes de Sousa, Inês Vilain, Liliane Janete Grandó, Maria Inês Meurer e Sônia Maria Lückmann Fabro**, meu agradecimento e gratidão a vocês que fizeram da docência um ideal, mesclando a arte de ensinar com o dom da convivência, tornando-se minhas amigas e transmitindo suas experiências que grandemente ajudaram na minha formação.

À professora **Daniela Nascimento Silva** pela acolhida no momento de mudança para Porto Alegre. Obrigada pelo apoio, amizade, força e carinho.

À professora **Maria Lúcia Tiellet Nunes** pelos ensinamentos, apoio e todo o auxílio prestado na interpretação dos instrumentos de depressão, ansiedade e estresse.

Ao professor **Sérgio Kakuta Kato** pela competência na análise estatística.

À **Clarice Luz e Bruna Luz** pela ajuda na análise das amostras de saliva. Obrigada pelo apoio, incentivo, carinho e por todas as portas abertas que encontrei no Laboratório Vitrus.

Aos meus colegas de doutorado, especialmente, **Aline Rose Morosolli Cantarelli, André Takahashi, Carolina Sommer Dias Fernandes, Frederico Saueressig, José Miguel Amenábar, Juliana Romanini, Márcia Fava, Nicole de Mello Rahde e Tatiana Andrea Soares Pinto** por termos compartilhado, durante o curso, esforços, renúncias, perseverança e garra. Obrigada pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos secretários do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **Denise Bernardes Pereira e Fernando Souza**, pela ajuda com as questões burocráticas. Obrigada pela prontidão e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **Ana Lúcia Silveira Prestes, Carlos Eduardo dos Santos Minossi, Davenir Menger Bruschi e Marcos Caetano Correa**, pela competência na resolução das questões burocráticas. Obrigada pela simpatia ao me receberem.

Enfim, o meu agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa tese.

RESUMO

O líquen plano é uma doença mucocutânea, imunologicamente mediada por linfócitos T, que se manifesta com frequência na mucosa bucal. O mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões permanece desconhecido, mas evidências sugerem a participação de transtornos psicológicos na sua etiopatogenia. Com o objetivo de identificar fatores de risco e biomarcadores salivares para o líquen plano oral (LPO), nesse estudo foram analisados os níveis de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, bem como os escores de depressão, ansiedade e estresse em pacientes com essa doença. Foram selecionados 31 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO, de ambos os sexos, com idades entre 32 e 71 anos e 31 pacientes-controle, sem lesões bucais, emparelhados por sexo e faixa etária. Os sintomas de depressão, ansiedade e estresse foram investigados pelos instrumentos *The Beck Depression Inventory*, *The Beck Anxiety Inventory* e Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp, respectivamente. Amostras de saliva foram coletadas pela manhã e à noite para análise das concentrações de DHEA e de cortisol, que foi realizada pela técnica de radioimunoensaio. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos escores de depressão ($p=0,832$), ansiedade ($p=0,061$) ou estresse ($p=0,611$), nem quanto às concentrações salivares matinais e noturnas de DHEA ($p=0,888$, $p=0,297$) ou de cortisol ($p=0,443$, $p=0,983$). Também não houve diferença entre os grupos para o *ratio* cortisol/DHEA nas amostras salivares matinais ($p=0,526$) e noturnas ($p=0,678$). Não foi observada correlação entre as concentrações salivares de DHEA e de cortisol com os escores de depressão, ansiedade e estresse nos pacientes com LPO. Na amostra investigada pode-se concluir que não há associação entre as variáveis psicológicas depressão, ansiedade e estresse com o LPO. As concentrações de cortisol e de DHEA ou o *ratio* entre esses dois esteróides, não diferem entre indivíduos com a doença e controles, não podendo ser utilizados como biomarcadores salivares para o LPO.

Palavras-chave: Líquen plano oral. Depressão. Ansiedade. Estresse. Desidroepiandrosterona. Cortisol.

ABSTRACT

SALIVARY ANALYSIS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) AND CORTISOL, DEPRESSION, ANXIETY AND STRESS IN PATIENTS WITH ORAL LICHEN PLANUS

Lichen planus is a mucocutaneous disease, immunologically mediated by T lymphocytes, which manifests often in the oral mucosa. The mechanism that leads to the development of lesions remains unknown, but there is evidence suggesting the participation of psychological disturbances in the etiopathogenicity of this disease. The aim of this study was to identify the risk factors and salivary biomarkers for oral lichen planus (OLP). An analysis was made of the levels of dehydroepiandrosterone (DHEA) and cortisol, as well as the scores of depression, anxiety and stress in patients with this disease. Thirty-one patients with a histopathologic diagnosis of OLP were selected; they were of both sexes, with ages between 32 and 71 years. These patients were matched by sex and age with 31 control patients who did not present oral lesions. Symptoms of depression, anxiety and stress were investigated by the instruments *The Beck Depression Inventory*, *The Beck Anxiety Inventory* and Lipp's *Inventory of Symptoms of Stress for Adults*, respectively. Saliva was collected in the morning and at night for determination of the DHEA and cortisol levels by radioimmunoassay. There was no significant difference between the groups with respect to scores of depression ($P=0.832$), anxiety ($P=0.061$) or stress ($P=0.611$), or with respect to morning and night salivary levels of DHEA ($P=0.888$, $P=0.297$) and cortisol ($P=0.443$, $P=0.983$). Also, there was no difference between the groups with regard to the cortisol/DHEA ratio in the morning ($P=0.526$) and night ($P=0.678$) salivary samples. No correlation was observed between the salivary DHEA or cortisol levels and the scores of depression, anxiety and stress in the patients with OLP. In the sample investigated, it can be concluded that there is no association between the psychological variables depression, anxiety and stress with OLP. The levels of cortisol and DHEA or the ratio of these two steroids does not differ between individuals with the disease and controls, and therefore, these parameters cannot be used as salivary biomarkers for OLP.

Key-words: Oral lichen planus. Depression. Anxiety. Stress.
Dehydroepiandrosterone. Cortisol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Molécula de cortisol. Disponível em: < http://www.fnquimica.com/bioquimica-f15/molecula-de-cortisol-t156.htm > Acesso em: 26 maio. 2010.....	29
Figura 2 – Molécula de DHEA. Disponível em: < http://www.centerpointe.com/images/phdhea_dhea.jpg > Acesso em: 26 maio. 2010.....	34
Figura 3 – Diagnóstico do estresse. Fonte: LIPP, M. E. N. Manual do Inventário de Sintomas de <i>Stress</i> para Adultos de Lipp (ISSL). São Paulo: Casa do Psicólogo, 2005.....	44
Figura 4 – Recipientes contendo saliva coletada pela manhã e à noite. Fonte: a autora (2010).....	46
Figura 5 – Transferência da saliva do recipiente para o tubo de polietileno. Fonte: a autora (2010).....	46
Figura 6 – Centrifugação das amostras de saliva para precipitação de mucinas. Fonte: a autora (2010).....	47
Figura 7 – Kit para mensuração das concentrações de DHEA na saliva. Fonte: a autora (2010).....	47
Figura 8 – Kit para mensuração das concentrações de cortisol na saliva. Fonte: a autora (2010).....	48
Figura 9 – Tubos de ensaio acondicionados no contador <i>Gamma C12®</i> (<i>EURO-DPC</i>). Fonte: a autora (2010).....	49
Figura 10 – Contagem da radiação gama remanescente dos ensaios por meio do <i>software</i> específico do equipamento <i>Gamma C12®</i> (<i>EURO-DPC</i>). Fonte: a autora (2010).....	49
Figura 11 – Líquen plano oral erosivo. Fonte: a autora (2010).....	52
Figura 12 – Líquen plano oral reticular e papular. Fonte: a autora (2010).....	52
Figura 13 – Concentrações de DHEA nos grupos caso e controle. Fonte: a autora (2010).....	60
Figura 14 – Concentrações de cortisol nos grupos caso e controle. Fonte: a autora (2010).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos níveis de depressão.....	43
Tabela 2 – Classificação dos níveis de ansiedade.....	43
Tabela 3 – Distribuição dos casos de líquen plano oral segundo a localização das lesões.....	53
Tabela 4 – Distribuição dos casos de líquen plano oral segundo o tempo de evolução das lesões.....	53
Tabela 5 – Alterações sistêmicas dos pacientes dos grupos caso e controle.	54
Tabela 6 – Medicamentos utilizados pelos pacientes dos grupos caso e controle.....	55
Tabela 7 – Escores de depressão dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BDI.....	55
Tabela 8 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de depressão.....	56
Tabela 9 – Escores de ansiedade dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BAI.....	56
Tabela 10 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de ansiedade.....	57
Tabela 11 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença de estresse (inventário ISSL).....	57
Tabela 12 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença e fases do estresse.....	58
Tabela 13 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto ao tipo predominante de sintomas de estresse.....	58
Tabela 14 – Concentrações salivares matinais e noturnas de DHEA e de cortisol (nmol/L) dos pacientes dos grupos caso e controle.....	59
Tabela 15 – Variação percentual dos níveis de DHEA e de cortisol entre as amostras coletadas pela manhã e à noite nos pacientes dos grupos caso e controle.....	61
Tabela 16 – <i>Ratio</i> cortisol/DHEA (nmol/L) das amostras salivares matinais e noturnas dos pacientes dos grupos caso e controle.....	61

Tabela 17 – Correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e ansiedade nos pacientes com líquen plano oral..	62
Tabela 18 – Correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e ansiedade nos pacientes-controle.....	62
Tabela 19 – Associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com a presença de estresse nos pacientes com líquen plano oral.....	63
Tabela 20 – Associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com a presença de estresse nos pacientes-controle.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACTH** - Hormônio adrenocorticotrópico
- AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- BAI** - *The Beck Anxiety Inventory*
- BDI** - *The Beck Depression Inventory*
- BHS** - *The Beck Hopelessness Scale*
- CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa
- CMI** - *Cornell Medical Index*
- cpm** - Conta por minuto
- CRH** - Hormônio liberador de corticotropina
- DASS** - *Depression, Anxiety and Stress Scale*
- DHEA** - Desidroepiandrosterona
- DHEAS** - Sulfato de desidroepiandrosterona
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- ELISA** - *Enzyme linked immuno sorbent assay*
- FAN** - Fator antinuclear
- GHQ** - *General Health Questionnaire*
- h** - Hora
- HADS** - *Hospital Anxiety and Depression Scale*
- HAS** - *Hamilton Anxiety Scale*
- HCV** - Vírus da hepatite C
- HPA** – Hipotálamo-pituitária-adrenal
- I¹²⁵** - Iodo 125
- ICAM-1** - *Intercellular adhesion molecule-1*
- ICWP** - *Interactive colour word procedure*
- IFN- γ** - Interferon-gama
- IL** - Interleucina
- ISSL** - Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp
- LES** - Lupus eritematoso sistêmico
- LFA-1** - *Leucocyte function-associated antigen-1*
- LP** - Líquen plano
- LPO** - Líquen plano oral
- M** - Manhã

MACL - *Mood Adjective Check List*
MADRS – *Montgomery Asberg Depression Rating Scale*
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MMPI - *Minnesota Multiphasic Personality Inventory*
N - Noite
n - Frequência
ng/mL - Nanograma por mililitro
nmol/L - Nanomol por litro
p - Probabilidade
PSQ - *Perceived Stress Questionnaire*
PSS - *Perceived Stress Scale*
PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
® - Marca registrada
RLC - Reação liquenóide por contato
rpm - Rotações por minuto
SAB - Síndrome da ardência bucal
SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*
SRRS - *Social Readjustment Rating Scale*
STAI - *State Trait Anxiety Inventory*
TNF - Fator de necrose tumoral
TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa
VAS - *Visual Analogue Scale*
VCAM-1 - *Vascular adhesion molecule-1*
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
VSG - Velocidade de sedimentação globular
 χ^2 - Teste Qui-quadrado
 $\mu\text{g/dL}$ - Micrograma por decilitro
16PF - *Cattell 16PF Questionnaire*
% - Porcentagem
°C - Grau Celsius
 \pm - Desvio padrão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 LÍQUEN PLANO ORAL.....	20
2.1.1 Etiologia e patogênese do líquen plano oral	23
2.2 CORTISOL.....	29
2.3 DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA).....	34
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	40
4.2 DELINEAMENTO.....	40
4.3 VARIÁVEIS.....	40
4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	40
4.4.1 Critérios de inclusão	41
4.4.2 Critérios de exclusão	41
4.5 PROCEDIMENTOS.....	42
4.5.1 Anamnese e exame físico	42
4.5.2 Inventários para investigação dos sintomas de depressão, ansiedade e estresse	42
4.5.3 Coleta de saliva para análise das concentrações de DHEA e cortisol	44
4.5.4 Análise das concentrações de DHEA e cortisol na saliva	45
4.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	50

5 RESULTADOS	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
5.1.1 Caracterização da amostra segundo sexo e idade	51
5.1.2 Caracterização dos casos de líquen plano oral	51
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL E CONTROLES.....	54
5.2.1 História médica e uso de medicamentos	54
5.2.2 Sintomas de depressão, ansiedade e estresse	55
5.2.3. Concentrações salivares de DHEA e cortisol	59
5.2.4 Correlação e associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os sintomas de depressão, ansiedade e estresse	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - grupo de pacientes portadores de líquen plano oral.....	87
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - grupo-controle.....	89
APÊNDICE C - Ficha de coleta de dados.....	91
ANEXO A - Aprovação do projeto pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	93
ANEXO B - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS.....	94
ANEXO C - Inventário de depressão de Beck (BDI).....	95
ANEXO D - Inventário de ansiedade de Beck (BAI).....	97
ANEXO E - Inventário de Sintomas de <i>Stress</i> para Adultos de LIPP (ISSL).....	98
ANEXO F - Bula do kit da DHEA.....	104
ANEXO G - Bula do kit do cortisol.....	111

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea, imunopatológica que se manifesta com frequência na mucosa bucal (SOUSA; ROSA, 2005; GONSALVES; CHI; NEVILLE, 2007; PAKFETRAT, 2009; VAN DER WAAL, 2009). As lesões bucais podem apresentar-se de diferentes formas clínicas, sendo a reticular, caracterizada pelas estrias de Wickham, a mais comum. A doença pode ainda manifestar-se na forma de placas brancas ceratóticas, semelhantes à leucoplasia ou como áreas atróficas, ulceradas e bolhosas que provocam sintomas de ardência e dor (MOLLAOGLU, 2000).

O líquen plano oral (LPO) é uma doença imunologicamente mediada por linfócitos T, entretanto, o mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões permanece desconhecido (DORREGO et al., 2002; SCARDINA et al., 2009; LIU et al., 2009). Infecção pelo vírus da hepatite C ou transtornos psicológicos tais como depressão, ansiedade e estresse têm sido investigados nos pacientes com LPO, mas os resultados são controversos (VALLEJO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2002; CHAUDHARY, 2004; IVANOVSKI et al., 2005; MONTI et al., 2006; LUNDQVIST et al., 2006; MANOLACHE; SECELEANU-PETRESCU; BENEÀ, 2008).

Pelos relatos dos pacientes portadores de LPO quanto ao aparecimento ou exacerbação dos sintomas frente a situações estressantes, a associação entre essa doença, o estresse e concentrações elevadas de cortisol tem sido investigada (IVANOVSKI et al., 2005; SHAH; ASHOK; SUJATHA, 2009). O cortisol é um hormônio corticosteróide que atua praticamente em todas as células do organismo e apresenta ação complexa sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, além de participar do sistema que modula o estresse e atuar sobre as respostas inflamatória e imunológica (JONES; ROLLMAN; BROOKE, 1997; RÖDSTRÖM et al., 2001). Concentrações elevadas desse hormônio têm sido encontradas em indivíduos com depressão (HOLSBOER; BARDEN, 1996; VILAR, 2006), submetidos a situações estressantes (LERESCHE; DWORKIN, 2002), de dor e ansiedade (KORAY et al., 2003).

A desidroepiandrosterona (DHEA) é um esteróide precursor de andrógenos e estrógenos potentes que parece modular a resposta imune, uma vez que a diminuição de sua concentração sérica está associada à deterioração de várias

funções fisiológicas. Embora os mecanismos de ação da DHEA no organismo humano não sejam completamente compreendidos, baixas concentrações desse hormônio são encontradas em pacientes com determinadas doenças imunológicas como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (LES) (DORIA et al., 2002; STRAUB et al., 2004), em indivíduos com depressão (TORDJMAN et al., 1995; GOODYER et al., 1996; MICHAEL et al., 2000), síndrome do pânico, fobias (HERBERT et al., 1996) e síndrome da ardência bucal (SAB) (FERNANDES et al., 2009). O aumento dos níveis de cortisol acompanhado pela redução nos níveis de DHEA foi observado em pacientes com queimaduras, anorexia nervosa, síndrome de Cushing, esquizofrenia, depressão, doença de Alzheimer, obesidade, diabetes e LES (KROBOTH et al., 1999; WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BECKER, 2001). Na literatura internacional, até o momento, não há relatos quanto à análise dos níveis de DHEA, nem do *ratio* cortisol/DHEA em pacientes com LPO.

A literatura sugere que transtornos psicológicos podem estar associados à etiopatogenia do LPO. Uma vez que esses transtornos elevam as concentrações de cortisol e promovem diminuição das de DHEA, no presente estudo foram analisadas as concentrações salivares de cortisol e de DHEA e a associação desses hormônios com os escores de ansiedade, depressão e estresse em pacientes portadores de líquen plano oral com o objetivo de identificar biomarcadores e fatores de risco para essa doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÍQUEN PLANO ORAL

O líquen plano é uma doença mucocutânea, inflamatória crônica, que afeta a mucosa bucal e apresenta predileção por pacientes de meia-idade, do sexo feminino e da raça branca (EISEN, 2002; SOUSA; ROSA, 2005; GONSALVES; CHI; NEVILLE, 2007; PAKFETRAT, 2009; VAN DER WAAL, 2009). McCartan e Healy (2008) em um estudo meta-analítico evidenciaram que a prevalência do LPO é de 1,27%, sendo de 1,57% no sexo feminino e de 0,96% no masculino.

Andreasen (1968) descreveu seis formas de apresentação clínica do LPO: reticular, erosivo, atrófico, placa, papular e bolhoso. Cada uma das formas clínicas apresenta as seguintes características (MOLLAOGLU, 2000):

- Líquen plano reticular: forma mais comum, afeta preferencialmente a mucosa jugal, mas outras regiões como o dorso e as bordas laterais da língua, a gengiva e o palato podem ser também acometidas. As lesões são caracterizadas pela presença das estrias de Wickham que se entrelaçam adquirindo um padrão anular ou rendilhado.

- Líquen plano erosivo: segunda forma clínica mais comum, as lesões apresentam-se eritematosas e ulceradas e na sua periferia é comum a presença das estrias de Wickham. A maioria dos pacientes afetados apresenta sintomatologia (ardência e dor).

- Líquen plano atrófico: apresenta-se como áreas eritematosas difusas que podem exibir na sua periferia as estrias de Wickham. O envolvimento gengival é comum, bem como a presença de sintomatologia, principalmente quando a mucosa entra em contato com alimentos cítricos e condimentados (PAKFETRAT et al., 2009).

- Líquen plano em placa: forma mais encontrada em pacientes fumantes. Caracteriza-se por placas brancas semelhantes à leucoplasia, com predileção pelo dorso da língua.

- Líquen plano papular: forma rara que se caracteriza por pápulas brancas com cerca de 0,5mm de diâmetro.

- Líquen plano bolhoso: variante rara do LPO, caracterizada por vesículas ou bolhas que ao romperem-se deixam a superfície ulcerada e dolorosa. Essas lesões são encontradas com maior frequência na mucosa jugal (terço posterior) e nas bordas laterais da língua.

Na mucosa afetada de um mesmo paciente podem ser observadas lesões atróficas, ulceradas e ceratóticas, ou seja, a associação de mais de uma forma de apresentação da doença (THORN et al. 1988; VAN DER WAAL, 2009). Ao exame histopatológico, as lesões de LPO exibem hiperkeratose (nas formas reticular, em placa e papular), degeneração hidrópica da camada de células basais do epitélio e infiltrado de linfócitos, predominantemente T, disposto em faixa no tecido conjuntivo subjacente. A espessura da camada espinhosa varia e as cristas interpapilares podem estar ausentes ou hiperplásicas, mas com frequência encontram-se pontiagudas ou em forma de “dentes de serra” (MOLLAOGLU, 2000; EISEN, 2002; SUGERMAN et al., 2002; ARISAWA et al., 2008; DO PRADO; MAROCCHIO; FELIPINI, 2009).

Determinadas lesões bucais como a leucoplasia, o penfigóide benigno de mucosa e o lúpus eritematoso (sistêmico ou discóide) podem exibir aspecto clínico semelhante às do LPO (SCULLY; CARROZZO, 2008). Além dessas lesões, a reação liquenóide a drogas e a materiais restauradores também deve ser incluída no diagnóstico diferencial do LPO (DO PRADO; MAROCCHIO; FELIPINI, 2009).

Reação liquenóide a drogas é a denominação de lesões com características clínicas e microscópicas semelhantes às do LPO, que se desenvolvem devido ao uso de medicamentos como os sais de ouro, penicilina, tetraciclina, anti-inflamatórios não esteroidais, agentes beta bloqueadores, drogas para tratamento da tuberculose e da hanseníase, antimaláricos, antiarrítmicos, antiepiléticos, anti-hipertensivos, diuréticos, anti-histamínicos e hipoglicemiantes orais, dentre outros (HALEVY; SHAI, 1993; FOX; HARRELL; MEHREGAN, 2005; PUA; SCOLYER; BARNETSON, 2006). O risco de desenvolvimento de reações adversas na pele e mucosas aumenta nos indivíduos que utilizam múltiplos medicamentos (BJERRUM et al., 1998; KRAGELUND et al., 2003). A semelhança entre as lesões do LPO e as de origem medicamentosa dificulta o diagnóstico etiológico imediato (LOUREIRO et al., 2004; VAN DER WAAL, 2009). Sendo assim, é importante que os profissionais

reconheçam essas alterações e procurem por meio de anamnese dirigida observar uma possível relação de causa e efeito (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2008).

A reação liquenóide por contato (RLC) é o resultado do contato direto da mucosa bucal com materiais restauradores dentais como amálgama (SEGURA-EGEA; BULLÓN-FERNÁNDEZ, 2004; ISSA et al., 2005), resina composta (LIND, 1988), níquel, paládio e ouro (DITRICOVA et al., 2007), sendo notavelmente mais frequentes ao contato com materiais metálicos em comparação aos não metálicos (COBOS-FUENTES et al., 2009). Restaurações antigas de amálgama podem sofrer corrosão e reações eletroquímicas com a liberação de íons metálicos como o mercúrio, principal agente causador da RLC (WONG; FREEMAN, 2003). O diagnóstico dessas lesões baseia-se nas características clínicas e, principalmente, na relação direta com a restauração (SEGURA-EGEA; BULLÓN-FERNÁNDEZ, 2004; ISSA et al., 2005). A substituição do material restaurador e a involução das lesões suportam o diagnóstico de RLC (BERNARDES et al., 2007).

Thorn et al. (1988) estudaram o curso clínico do LPO em 611 pacientes portadores da doença, que foram acompanhados por período de um a 26 anos (média de 7,5 anos). Foram observadas diferenças na evolução do LPO de acordo com a forma de apresentação das lesões. A forma papular foi observada principalmente na fase inicial da doença. O tipo erosivo, embora mais persistente que o papular, também apresentou tempo de evolução curto. A forma atrófica caracterizou-se por períodos de remissão, com aparecimento de novas lesões em sítios distintos. As lesões em placa foram as mais estáveis, ou seja, as que menos sofreram alterações durante a investigação e foram observadas com maior frequência em pacientes tabagistas. As lesões reticulares foram as que apresentaram maior tempo de evolução em comparação às demais formas de apresentação clínica dessa doença. O tipo papular de LPO foi associado a pacientes com idade inferior a 50 anos e as lesões atróficas a indivíduos com idade superior a 60 anos.

Xue et al. (2005) investigaram as características clínicas do LPO em 674 pacientes, 66% do sexo feminino e 34% do masculino. A idade dos pacientes variou de 10 a 78 anos, com média de 49 anos para as mulheres e de 52 anos para os homens. A apresentação clínica mais comum foi a reticular (51,3%), seguida pela erosiva (39,1%) e atrófica (9,6%). A maioria dos pacientes (90,9%) apresentava lesões em diversos sítios, mas lesões isoladas foram encontradas no vermelhão do

lábio inferior (8,9%) e na gengiva (0,2%). A mucosa jugal (74,6%) foi a região envolvida com maior frequência, seguida pelo dorso da língua (32,3%), vermelhão do lábio inferior (32,3%), gengiva (30,4%), bordas laterais e ventre da língua (29,7%) e mucosa labial (11,9%). Os sítios menos envolvidos foram o palato (2,6%), o vermelhão do lábio superior (1,91%) e o assoalho bucal (1,91%). O tempo de evolução da doença e a presença de sintomatologia foram significativamente superiores no grupo de pacientes com LPO erosivo em comparação às formas reticular e atrófica da doença.

Pakfetrat et al. (2009) investigaram as características clínico-patológicas do LPO em 420 pacientes, 65% do sexo feminino e 35% do masculino. A idade dos indivíduos variou de 13 a 75 anos, com média de 41,6 anos. Desconforto foi o sintoma mais frequente, relatado por 52,6% dos pacientes, descoloração da mucosa foi a segunda queixa mais comum, seguida de dor, aspereza e prurido. A forma reticular foi observada em 77% dos pacientes. A maioria dos indivíduos exibia lesões em vários sítios, sendo a mucosa jugal o local mais envolvido, seguido pela língua, gengiva, mucosa e vermelhão labial. Vinte e dois por cento dos pacientes apresentavam desordens psicológicas e 68% eram portadores de outras alterações sistêmicas.

2.1.1 Etiologia e patogênese do líquen plano oral

A etiologia do LPO ainda é desconhecida e motivo de controvérsia na literatura, mas fatores genéticos e adquiridos têm sido investigados como possíveis causadores desta doença. Evidências sugerem que o LP seja um processo imunológico iniciado por um antígeno interno ou externo que altera as células da camada basal do epitélio de revestimento, deixando-as suscetíveis à resposta imune celular, com ativação das células de Langerhans (apresentadoras de antígenos), linfócitos TCD4, TCD8 e produção de citocinas como interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (WALSH et al., 1990; DORREGO et al., 2002; LIU et al., 2009).

Dorrego et al. (2002) caracterizaram o infiltrado inflamatório e a distribuição de moléculas de adesão celular em lesões de LPO. A expressão imunoistoquímica

dos marcadores de células mononucleares CD4, CD8, CD1a e das moléculas de adesão celular *leucocyte function-associated antigen-1* (LFA-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) foi investigada em biópsias de LPO e de tecidos orais normais. A expressão de CD4, CD8, CD1a, LFA-1, VCAM-1 e ICAM-1 foi superior nas amostras de LPO em comparação com os controles. O infiltrado de linfócitos foi principalmente representado por células TCD8 (citotóxicas) e foi observado número elevado de células dendríticas CD1a (células de Langerhans) na camada de células basais do epitélio. As moléculas de adesão celular investigadas estão envolvidas no movimento das células T dos vasos sanguíneos para o epitélio, na ativação de linfócitos e na destruição dos ceratinócitos basais. LFA-1 é expressa em linfócitos T, ICAM-1 é expressa em células endoteliais e em ceratinócitos e VCAM-1 é expressa em vasos sanguíneos. Os autores sugerem que no LPO ocorra uma resposta imune frente a antígenos (exógenos ou endógenos) presentes nos ceratinócitos, que ativam as células de Langerhans. Estas células apresentam o antígeno aos linfócitos TCD4, que migram para a lâmina própria da mucosa oral por meio da ativação das moléculas de adesão. Os ceratinócitos respondem às injúrias com a produção de citocinas, que promovem juntamente com linfócitos TCD4 e com moléculas de adesão, a proliferação de linfócitos TCD8, que causam a injúria ao tecido epitelial. As células *T-helper* são classificadas em dois subgrupos com base na produção de citocinas. O subgrupo Th1 é caracterizado pela produção de IFN- γ , IL-2 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que são citocinas ativadoras de macrófagos e de linfócitos T citotóxicos. As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e são cruciais para a produção de anticorpos. O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 está envolvido na patogênese de algumas doenças auto-imunes. Liu et al. (2009) analisaram a expressão de IFN- γ e IL-4, bem como a proporção entre essas citocinas na saliva de pacientes com LPO. As amostras de saliva foram coletadas entre 8 h e 10 h da manhã e os níveis de IFN- γ e IL-4 foram analisados por meio de *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA). O nível de IFN- γ foi significativamente menor nos pacientes com LPO em comparação aos indivíduos-controle, enquanto o nível de IL-4 foi superior nos pacientes com LPO. Além disso, os pacientes que apresentavam lesões erosivas exibiram níveis de IL-4 superiores aos que apresentavam lesões reticulares. A proporção IFN- γ /IL-4 foi significativamente menor nos pacientes com LPO em comparação aos indivíduos-

controle. Os níveis superiores de IL-4 podem refletir um mecanismo de defesa do organismo na tentativa de restabelecer as alterações imunes promovidas pelo IFN- γ no LPO. Os resultados demonstram a predominância da resposta Th2 no líquen plano e que os níveis salivares de IL-4 podem estar associados à gravidade dessa doença.

Scardina et al. (2009) investigaram a angiogênese nas lesões de LPO por meio da imunodeteção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do marcador CD34 e das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1. Foram obtidas amostras de tecido de 30 pacientes com LPO e de 30 indivíduos saudáveis. O número de vasos sanguíneos e a imunorreatividade de VEGF, VCAM-1 e ICAM-1 foram significativamente superiores nas amostras de LPO em comparação com as amostras-controle. Segundo os autores, a angiogênese presente no LPO pode contribuir na patogênese dessa doença.

Após a identificação do vírus da hepatite C (HCV), diversos estudos relataram a possível associação entre esse vírus e o LPO. Figueiredo et al. (2002) investigaram a prevalência do LPO em pacientes com hepatite C. A amostra foi constituída por três grupos: um composto por 68 pacientes com LPO, o segundo por 126 pacientes com infecção pelo HCV e o terceiro por 898 indivíduos-controle. Dos pacientes com LPO, 8,8% (n=6) apresentaram o vírus da hepatite C. Do grupo de indivíduos infectados pelo HCV, 4,7% (n=6) possuíam LPO confirmado por exame histopatológico. Dos pacientes-controle, 0,6% (n=6) eram portadores de LPO. A prevalência de HCV no grupo de pacientes com LPO foi significativamente maior ao ser comparada com a da população da cidade de São Paulo (1,4%). Além disso, a prevalência do LPO no grupo de pacientes com HCV (4,7%) foi significativamente maior do que no grupo-controle.

Grossmann et al. (2009) avaliaram a prevalência de lesões na mucosa oral em 215 pacientes com hepatite C, 115 homens e 100 mulheres com média de idade de 50 anos. O LPO foi observado em 2,3% dos pacientes, revelando prevalência superior dessa doença em pacientes com HCV em comparação à população em geral.

Michele et al. (2007) estudaram a possível associação entre o HCV e o LPO em três grupos de pacientes: 82 com diagnóstico de LPO, 165 com infecção por HCV e 466 indivíduos saudáveis. No grupo de pacientes com líquen, 10,8% dos indivíduos com mais de 50 anos exibiam infecção por HCV. Dos pacientes com

infecção pelo vírus da hepatite C, 5,5% (n=8) apresentavam LPO. No grupo-controle 10% dos indivíduos com mais de 50 anos exibiam infecção por HCV. Os autores sugerem que não existe uma clara associação entre o LPO e o vírus da hepatite C.

Yarom et al. (2007) investigaram a prevalência de infecção por HCV em 62 pacientes com diagnóstico histopatológico de LPO, 48 do sexo feminino e 14 do masculino, com média de idade de 60 anos. Dois grupos serviram como controle, o primeiro foi constituído por 65 pacientes portadores de outras lesões bucais (hiperkeratose, candidíase, estomatite aftosa recorrente e pênfigo vulgar). Fizeram parte do segundo grupo-controle 225.452 indivíduos saudáveis com idades entre 17 e 65 anos. A prevalência de infecção por HCV no grupo de pacientes com LPO foi de 4,8%, no primeiro grupo-controle foi de 1,5% e no segundo grupo-controle, de 0,1%. Esses dados evidenciam a maior prevalência de HCV no grupo de pacientes com LPO em comparação com a população em geral. Os autores sugerem que a pesquisa de anticorpos para esse vírus deveria ser realizada em todos os pacientes portadores de LPO.

Transtornos psicológicos como depressão, ansiedade e estresse têm sido investigados na etiopatogênese do LPO. Allen et al. (1986) avaliaram o perfil psicológico de 48 pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO. Para avaliação das variáveis psicológicas foram empregados o *State-Trait Anxiety Inventory* (STAI) e a *Social Readjustment Rating Scale* (SRRS). Foram utilizados dois grupos-controle, um com 32 pacientes portadores de fibroma e o outro com 44 pacientes saudáveis. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, não suportando o conceito de que o LPO seja uma doença que ocorra em indivíduos mais ansiosos e estressados.

Hampf et al. (1987) avaliaram a saúde mental de 56 pacientes com LPO e de 44 indivíduos-controle por meio do instrumento *Cornell Medical Index* (CMI). Os pacientes com LPO exibiram frequência superior de distúrbios mentais em comparação aos pacientes-controle.

Macleod (1992) investigou a correlação do LPO com o estresse por meio do *General Health Questionnaire* (GHQ). Fizeram parte da amostra 30 pacientes com LPO confirmado histologicamente, e 30 pacientes saudáveis emparelhados por sexo com os do grupo-caso. Não houve diferença significativa entre ambos para o estresse.

McCartan (1995) investigou os níveis de ansiedade e depressão em pacientes com LPO. A amostra foi constituída por 50 pacientes, 37 do sexo feminino e 13 do masculino, com média de idade de 50,5 anos. Para determinar os escores de ansiedade e depressão foram aplicados os instrumentos *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)* e *Cattell 16PF Questionnaire (16PF)*. Não foi encontrada associação entre ansiedade e depressão com o LPO. Também não houve diferença significativa entre os níveis de ansiedade e depressão quando os pacientes que apresentavam lesões erosivas foram comparados aos que exibiam as outras formas clínicas da doença.

Rojo-Moreno et al. (1998) investigaram a presença de alterações psicológicas em pacientes com LPO. O grupo-caso foi composto por 100 pacientes com LPO e o grupo-controle por 50 indivíduos saudáveis. Os pacientes com líquen exibiram maior tendência para a ansiedade e depressão e mostraram-se mais conservadores, emotivos, com maior dificuldade para adaptarem-se a novas situações e mais suscetíveis a medicações para tratamento das desordens emocionais quando comparados com os pacientes do grupo-controle. Os escores dos testes que mediram os níveis de ansiedade e depressão foram mais elevados nos pacientes com a doença. Nesse estudo, os pacientes com LPO erosivo e não erosivo também foram comparados e os primeiros apresentaram escores de depressão mais elevados.

Vallejo e Zarabozo (2000) avaliaram os níveis de ansiedade de 40 pacientes com LPO, 16 com lesões reticulares e 24 com lesões atrófico-erosivas. O grupo-controle foi constituído por 40 pacientes com hiperplasia fibrosa, granuloma piogênico ou candidíase, emparelhados por sexo e idade com os pacientes-caso. A *Hamilton Anxiety Scale (HAS)* revelou nível mais elevado de ansiedade nos pacientes com LPO. Os pacientes com lesões atrófico-erosivas apresentaram níveis ainda maiores de ansiedade do que os indivíduos com lesões reticulares.

Vallejo et al. (2001) avaliaram os níveis de ansiedade e depressão de 80 pacientes portadores de LPO, distribuídos de acordo com a presença de lesões erosivas. O grupo-controle foi constituído por pacientes com úlceras aftosas recorrentes, úlceras traumáticas, hiperplasias fibrosas ou fibroepiteliais. Para avaliar os níveis de ansiedade foi aplicada a HAS e para a depressão a *Montgomery-Asberg Depression Rating Scale (MADRS)*. Os escores de ambos os testes foram mais elevados nos grupos caso do que no controle, evidenciando a associação do

LPO com a ansiedade e a depressão. Entre os grupos-caso, os escores de ansiedade e depressão foram mais elevados nos portadores de LPO erosivo em comparação às outras formas clínicas da doença.

Chaudhary (2004) comparou os níveis de ansiedade, depressão e estresse entre pacientes portadores de LPO e dois grupos de pacientes-controle. O grupo denominado de controle positivo foi composto por pacientes com SAB ou síndrome da dor e disfunção miofacial, doenças nas quais a presença de alterações psicológicas é bem reconhecida. Fizeram parte do grupo-controle negativo indivíduos saudáveis. Para avaliação das alterações psicológicas foram aplicados os instrumentos GHQ e HADS, cujos escores foram superiores nos pacientes com LPO em comparação com o grupo-controle negativo. Não foi observada diferença significativa entre o grupo de pacientes com LPO e o grupo-controle positivo. O autor sugere a possível participação dessas alterações psicológicas na patogênese do LPO.

Monti et al. (2006) avaliaram por meio de questionários as características psicológicas e a saúde geral de pacientes portadores de LPO. A amostra foi constituída por 31 pacientes entre a quarta e sexta décadas de vida. A maioria não apresentava sintomatologia e, quanto à saúde geral, a hipertensão arterial e o diabetes foram as doenças mais relatadas. Quando questionados sobre fatores que contribuíssem para o aparecimento ou exacerbação das lesões, aborrecimentos, nervosismo, ansiedade e estresse foram as respostas mais frequentes. Nesse estudo, o perfil do paciente com LPO foi de um indivíduo nervoso, aborrecido, ansioso e portador de problemas sistêmicos.

Lundqvist et al. (2006) avaliaram a associação entre depressão, ansiedade e estresse com o LP erosivo em 46 pacientes portadores de lesões na mucosa bucal e genital. Fizeram parte do grupo-controle 357 indivíduos. Para avaliação de depressão, ansiedade e estresse foram aplicados os instrumentos *The Beck Depression Inventory* (BDI), STAI e *General Perceived Stress Questionnaire* (PSQ), respectivamente. Os escores desses instrumentos foram superiores nos pacientes com LP erosivo em comparação com os indivíduos-controle.

Manolache, Seceleanu-Petrescu e Benea (2008) investigaram o papel do estresse como fator etiológico do LP por meio do instrumento SRRS. Fizeram parte do grupo-caso 46 pacientes com LP oral e/ou cutâneo e do grupo-controle, pacientes portadores de outras doenças cutâneas como micoses, tumores benignos

ou dermatites de contato. Houve diferença significativa entre os grupos quanto à variável investigada, 31 (67,39%) pacientes com LP exibiram sintomas de estresse, que foi observado em 10 (21,73%) indivíduos-controle.

2.2 CORTISOL

O cortisol (Figura 1), esteróide sintetizado na zona intermediária do córtex das glândulas adrenais é o principal hormônio glicocorticóide secretado em humanos, pois atua na maioria das células do organismo ao atravessar a membrana celular e ligar-se a receptores intracelulares específicos (MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999; GUYTON, 2002).

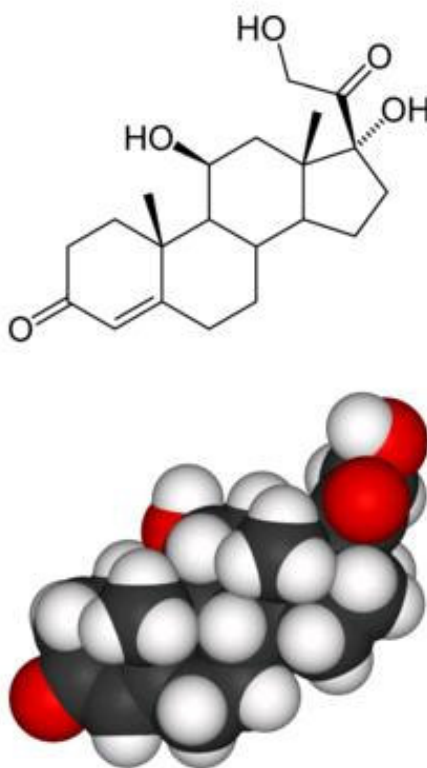


Figura 1 - Molécula de cortisol. Disponível em: <http://www.fnquimica.com/bioquimica-f15/molecula-de-cortisol-t156.htm> Acesso em: 26 maio. 2010.

Esse esteróide é secretado de forma pulsátil, exibe ritmo circadiano, com níveis mais elevados pela manhã e declínio ao longo do dia. Em pessoas saudáveis, o nível sérico de cortisol varia entre 10 e 20 $\mu\text{g/dL}$ às 8 h da manhã. Por volta das 16

h, esses níveis caem para metade do valor matinal e à meia-noite variam entre 1,8 e 5 µg/dL (KIRSCHBAUM; HELLHAMMER, 2000; VILAR, 2006). Sua secreção é controlada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que é ativado na presença de estímulos psicológicos, fisiológicos ou ambientais. Na ativação do eixo HPA ocorre a liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que ativa a liberação de adrenocorticotropina (ACTH) pela hipófise que, por sua vez, estimula as adrenais a secretarem cortisol (GUYTON, 2002; KING; HEGADOREN, 2002). Sob situações de estresse físico ou emocional, como por exemplo, traumatismos, queimaduras, infecções e ansiedade há a liberação de CRH e ACTH e dentro de minutos, aumento da secreção de cortisol pela glândula adrenal em até 20 vezes. O cortisol exerce efeito de *feedback* sobre o hipotálamo e sobre a hipófise, diminuindo a formação de CRH e ACTH, respectivamente (MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999; GUYTON, 2002).

No sangue, 10% do cortisol está livre e biologicamente ativo, enquanto 90% está associado a proteínas (SCHIMMER; PARKER, 1996; MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999). A forma combinada (cortisol + proteína) serve como reservatório a ser utilizado, principalmente, quando o indivíduo é submetido a situações de estresse (MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999; GUYTON, 2002). Na saliva, 100% do cortisol está livre e biologicamente ativo (BAUM; GRUNBERG, 1997; KING et al., 2000).

A análise das concentrações de cortisol pode ser realizada na urina, no sangue e na saliva (WEINSTEIN et al., 1999). Segundo Heim et al. (2001), em amostras de sangue são encontradas pequenas quantidades de cortisol livre que não refletem diretamente a atividade da glândula adrenal. A análise de cortisol na saliva tem sido defendida em função da facilidade da coleta dessa secreção, por ser um método não invasivo e no qual várias amostras podem ser obtidas em diferentes horários do dia para avaliar o ciclo circadiano desse esteróide. Além disso, a coleta de saliva não causa estresse ao paciente, o que poderia alterar os níveis de cortisol (KING et al., 2000; KIRSCHBAUM; HELLHAMMER, 2000; TRILCK et al., 2005; VILAR, 2006; POLL et al., 2007). Alterações no fluxo salivar não influenciam nos níveis de cortisol devido ao tamanho reduzido e a alta solubilidade do lipídio presente nas moléculas desse hormônio, o que facilita sua difusão através das membranas das células epiteliais das glândulas salivares. Kirschbaum e Hellhammer (2000) mostraram que o cortisol, quando injetado por via endovenosa, começa a ser

secretado pela saliva em menos de um minuto. Além disso, seus níveis salivares chegam ao ponto máximo entre um e dois minutos depois dos níveis séricos (BAUM; GRUNBERG, 1997).

O cortisol exerce diversos efeitos no organismo tais como: estimulação da gliconeogênese, diminuição da utilização de glicose pelas células (antagoniza ações da insulina sobre o metabolismo da glicose), promoção da mobilização de ácidos graxos (a serem utilizados para a produção de glicose), contribuição para a perda muscular, diminuição da síntese de colágeno (promovendo adelgaçamento cutâneo e das paredes vasculares), inibição da síntese de colágeno tipo I, diminuição da diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, diminuição da absorção de cálcio intestinal, aceleração da reabsorção óssea, modulação da excitabilidade, do comportamento e do humor, propriedades anti-inflamatórias e supressão a respostas imunes (JONES; ROLLMAN; BROOKE, 1997; RÖDSTRÖM et al., 2001; POLL et al., 2007). O excesso de cortisol contribui para o desenvolvimento de diabete, hipertensão, cardiopatias e osteoporose (GIBSON et al., 1999; BOYER, 2000). Níveis elevados de cortisol têm sido encontrados em indivíduos estressados, ansiosos e deprimidos (KANEGANE et al., 2009; SELANDER et al., 2009).

McCartan, Lamey e Wallace (1996) mensuraram a ansiedade e o nível de cortisol salivar em pacientes com estomatite aftosa recorrente. Foram incluídos no grupo-caso pacientes com lesões aftosas recorrentes e no controle, pacientes cujas lesões regrediram após tratamento de alterações hematológicas. A ansiedade foi medida por meio do HADS e os níveis de cortisol salivar por radioimunoensaio. A ansiedade e os níveis de cortisol salivar estavam elevados nos pacientes do grupo-caso em comparação aos controles, constatando a associação entre essas variáveis com a estomatite aftosa recorrente.

Vedhara et al. (2003) investigaram a associação dos níveis de cortisol salivar com estresse, ansiedade e depressão em 54 mulheres com doenças nos tecidos mamários (52 com diagnóstico de lesão benigna e duas, de lesão maligna). Para mensuração dos níveis de cortisol foram coletadas cinco amostras de saliva das pacientes nos seguintes horários: das 7 h às 8 h, 60 min após a primeira coleta, das 12 h às 13 h, das 16 h às 17 h e das 23 h às 24 h. Para avaliar o estresse foi utilizada a *Perceived Stress Scale* (PSS) e para a ansiedade e a depressão foi empregada a HADS. Não foi encontrada associação entre os níveis de cortisol com estresse, ansiedade e depressão em mulheres com doenças mamárias.

Amenábar et al. (2008) analisaram os níveis de cortisol salivar e os escores de ansiedade em pacientes com SAB. Fizeram parte da amostra 30 pacientes com SAB (24 mulheres e seis homens), com média de idade de 61 anos, e 30 pacientes saudáveis emparelhados por sexo e idade com o grupo-caso. Para determinação dos níveis de cortisol, a saliva dos pacientes foi coletada em três períodos diferentes ao longo do dia, o primeiro entre 8 h e 9 h (antes do café da manhã), o segundo entre 11 h e 13 h (antes do almoço) e o terceiro entre 20 h e 21 h (antes do jantar). Para determinar os escores de ansiedade foi aplicado o *The Beck Anxiety Inventory (BAI)*. Os pacientes com SAB apresentaram níveis mais elevados de cortisol e escores superiores de ansiedade quando comparados aos indivíduos-controle.

Em função de o estresse elevar os níveis de cortisol e de os pacientes com LPO relatarem agravamento dos sintomas dessa doença frente a situações estressantes, Rödström et al. (2001) mensuraram as concentrações salivares desse esteróide em 10 pacientes portadores de LPO erosivo. Fizeram parte do grupo-controle 10 indivíduos saudáveis, emparelhados por sexo e idade com os pacientes-caso. Para determinação das concentrações de cortisol, amostras de saliva foram coletadas a cada 15 minutos entre 9 h e 11 h. Durante o período de coleta salivar, foi aplicado o *Interactive Colour-Word Procedure (ICWP)*, um instrumento que mede a suscetibilidade do indivíduo quando o mesmo é exposto a situações de estresse. Nessa pesquisa a *Visual Analogue Scale (VAS)* e a *Mood Adjective Check List (MACL)* foram aplicadas para avaliar o nível de estresse crônico, acumulado ao longo da vida. Não houve diferença entre os grupos caso e controle para as variáveis analisadas. Nesse estudo não foi encontrada correlação entre níveis de cortisol e estresse em pacientes portadores de LPO.

Koray et al. (2003) investigaram a associação entre os níveis de ansiedade e de cortisol salivar em 40 pacientes com LPO. Para mensuração do cortisol, a saliva dos pacientes foi coletada entre 9 h e 9 h e 15 minutos e para avaliação da ansiedade foi aplicado o STAI. Nos pacientes com LPO, foram observados níveis mais elevados de cortisol e escores de ansiedade superiores em comparação aos controles. Os autores não encontraram correlação entre os níveis de cortisol e a ansiedade em pacientes com LPO e controles e enfatizam que a etiopatogenia dessa doença é complexa e presumivelmente dependente de fatores genéticos e ambientais, assim como do estilo de vida dos indivíduos.

Seoane et al. (2004) investigaram diferenças nos níveis séricos de cortisol entre pacientes portadores de LPO nas formas reticular e atrófico-erosiva. A amostra foi constituída por 62 pacientes, distribuídos em dois grupos conforme a apresentação clínica das lesões. Além do nível de cortisol sérico, foram avaliadas as variáveis sexo, idade, localização, dimensões e tempo de evolução das lesões. A forma atrófico-erosiva apresentou tempo de evolução superior, lesões mais extensas e envolvimento simultâneo de vários sítios. Quanto à localização, as lesões reticulares foram encontradas preferencialmente na mucosa jugal e as atrófico-erosivas na língua, gengiva e assoalho bucal. Não foram encontradas diferenças entre as formas reticular e atrófico-erosiva quanto aos níveis séricos de cortisol, sexo e idade.

Ivanovski et al. (2005) avaliaram o perfil psicológico de 40 mulheres, com idades entre 30 e 60 anos, portadoras de LPO nas formas reticular e erosiva. Fizeram parte do grupo-controle 25 pacientes saudáveis, emparelhadas por idade com as pacientes-caso. Foi aplicado o *Minnesota Multiphasic Personality Inventory* (MMPI) com o propósito de analisar as características de depressão, histeria, hipocondria, presença de manias, paranóia, esquizofrenia e desvio psicopático. As concentrações séricas de cortisol foram mais elevadas nas pacientes com LPO do tipo erosivo em comparação às pacientes-controle e às que apresentavam lesões reticulares. Quanto ao resultado do MMPI, os escores foram superiores nas pacientes com LPO em comparação aos indivíduos-controle para a depressão, histeria e hipocondria, sem diferença entre os grupos quanto à presença de manias, paranóia, esquizofrenia e desvio psicopático. Os autores sugerem que alterações emocionais podem levar à psicossomatização contribuindo para o início e expressão clínica do LPO.

Shah, Ashok e Sujatha (2009) analisaram os níveis de cortisol salivar e os escores de depressão, ansiedade e estresse em 30 pacientes com LPO, 17 do sexo feminino e 13 do masculino, com média de idade de 40 anos. O grupo-controle foi constituído por 30 indivíduos emparelhados por sexo e idade com os pacientes-caso. Indivíduos com alterações sistêmicas como diabetes e hipertensão, doenças cardiovasculares, disfunções renais e hepáticas foram excluídos desse estudo. A saliva dos pacientes foi coletada entre 9 h e 10 h da manhã e o nível de cortisol foi mensurado por meio de radioimunoensaio. Para avaliação da depressão, ansiedade e estresse foi aplicado o *Depression, Anxiety and Stress Scale* (DASS). Os

pacientes com LPO exibiram níveis elevados de depressão, ansiedade e estresse. Para avaliação de diferenças entre as formas de apresentação clínica da doença, os pacientes com LPO foram distribuídos em dois subgrupos: erosivo e não-erosivo. Não houve diferença quanto às variáveis psicológicas desses subgrupos. Os níveis de cortisol salivar estavam elevados em 56,6% dos 30 pacientes com a doença. No grupo com LPO, foi observada correlação positiva entre os níveis de cortisol e os sintomas de depressão e estresse. Nesse estudo não é apresentada a comparação dos níveis de cortisol salivar e dos escores de ansiedade, depressão e estresse entre os pacientes com LPO e controles.

2.3 DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

A DHEA é um hormônio esteróide (Figura 2) produzido nas glândulas adrenais, nas gônadas e também no sistema nervoso central (NIESCHLAG et al., 1973; KIBALY et al., 2008, NEWMAN; PRADHAN; SOMA, 2010). A DHEA e sua forma sulfatada (DHEAS) são os esteróides circulantes mais abundantes nos seres humanos e, apesar de não apresentarem atividade androgênica intrínseca, são precursores dos hormônios sexuais, principalmente, da testosterona e do estrogênio (KROBOTH et al., 1999; BECKER, 2001). Na corrente sanguínea, 98% da DHEA encontra-se ligada à albumina e 2% está na forma livre.

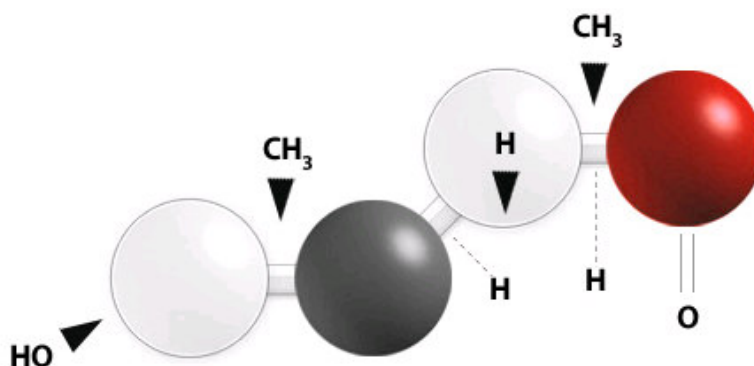


Figura 2 - Molécula de DHEA. Disponível em: <http://www.centerpointe.com/images/ph_dhea.jpg> Acesso em: 26 maio. 2010.

Assim como o cortisol, a DHEA exibe variação circadiana com pico de elevação matinal, declínio durante o dia, secreção mínima à noite e elevação abrupta durante o sono profundo (BECKER, 2001). Embora a concentração de DHEA no sangue oscile em paralelo com os níveis de cortisol, esse esteróide parece não sofrer controle de *feedback* à nível do eixo HPA (WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BEISHUIZEN; THIJIS; VERMES, 2002). O mecanismo responsável pela regulação da secreção adrenal de DHEA ainda é controverso (WOLF; KIRSCHBAUM, 1999).

A DHEA exibe variação marcante ao longo das diferentes faixas etárias. Na infância e no início da adolescência sua produção é pequena, aumenta consideravelmente nos adultos jovens, quando atinge o nível máximo, e após os 35 anos inicia seu declínio (BÉLANGER, 1994; WOLKOWITZ et al., 1997; MICHAEL et al., 2000; CHEN; PARKER, 2004). Nos idosos a produção de DHEA equivale somente de 10 a 20% da quantidade produzida dos 17 aos 25 anos (ORENTREICH et al., 1992). A redução gradativa dos níveis de DHEA com o avançar da idade está associada à deterioração de diversas funções fisiológicas (LEDOCHOWSKI et al., 2001).

A DHEA e a DHEAS apresentam um importante papel na regulação do humor e na sensação de bem estar, melhorando a memória e prevenindo o declínio do sistema cognitivo (WOLKOWITZ et al., 1999; MARKOWSKI et al., 2001). Níveis baixos de DHEA foram observados em pacientes com doenças cardiovasculares, doenças degenerativas, tumores malignos, artrite reumatóide, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (WOLKOWITZ et al., 1997), indivíduos que sofreram queimaduras, com anorexia nervosa, síndrome de Cushing, diabetes, esquizofrenia, depressão e doença de Alzheimer (KROBOTH et al., 1999; WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BECKER, 2001).

Segundo Wolkowitz et al. (1997), a diminuição dos níveis de DHEA está associada à redução da massa muscular e da imunidade, presença de osteoporose, aumento do tecido adiposo, resistência à insulina, incidência de diabetes tipo II, assim como, aumento da capacidade de transformação maligna. Esses autores constataram que a DHEA é um importante modulador da resposta imune, embora seus mecanismos de ação não sejam completamente compreendidos.

Kibaly et al. (2008) avaliaram o papel da DHEA, sintetizada na medula espinal, na modulação da dor em ratos portadores de dor neuropática. A expressão do gene P450c17, responsável pela transcrição da proteína sintetizadora de DHEA,

estava suprimida na medula espinal de ratos com neuropatia, assim como o nível de DHEA. Após administração intratecal aguda de DHEA nesses animais, foi observada imediata redução do limiar nociceptivo, bem como ação antinociceptiva retardada. Entretanto, o tratamento crônico com DHEA aumentou e manteve elevado o limiar de nocicepção nos animais com neuropatia e nos controles, sugerindo que metabólitos androgênicos (testosterona), gerados pela administração diária da DHEA, exerçam efeitos analgésicos. Os resultados desse estudo demonstram que a DHEA produzida na medula espinal é um esteróide modulador dos mecanismos da dor.

Fernandes et al. (2009) analisaram as concentrações salivares de DHEA, os escores de depressão e desesperança em 30 pacientes do sexo feminino com queixa de ardência bucal, com idades entre 42 e 81 anos. Fizeram parte do grupo-controle, 30 pacientes saudáveis emparelhadas por idade. As amostras de saliva foram coletadas pela manhã e à noite para análise da DHEA e os sintomas de depressão e de desesperança foram investigados pelos instrumentos BDI e *The Beck Hopelessness Scale* (BHS), respectivamente. As pacientes com SAB exibiram concentrações matinais de DHEA significativamente inferiores às do grupo-controle, mas não houve diferença entre os grupos para os escores de depressão e de desesperança. Não foi observada correlação entre as concentrações salivares de DHEA e os escores de depressão e de desesperança em pacientes com SAB. Segundo os autores, permanece discutível se a redução dos níveis desse esteróide representa uma resposta adaptativa à síndrome ou se é a responsável pelo agravamento e perpetuação dos sintomas desta doença.

A DHEA parece desempenhar papel importante na fisiopatologia da depressão. Michael et al. (2000) analisaram os níveis desse esteróide, assim como de cortisol em indivíduos com depressão. Três grupos de sujeitos com idades entre 20 e 64 anos foram estudados: 44 pacientes com depressão, 35 com histórico de depressão e em remissão total ou parcial dos sintomas e 41 indivíduos-controle. Para análise dos níveis de DHEA e cortisol, amostras de saliva foram coletadas às 8 h e 20 h por quatro dias. Os níveis matinais e noturnos de DHEA foram menores nos pacientes com depressão, intermediários nos pacientes com histórico de depressão e mais elevados nos indivíduos saudáveis. Para os níveis matinais e noturnos de cortisol houve diferença entre o grupo de pacientes com depressão em relação aos demais. O *ratio* cortisol/DHEA também foi avaliado, com diferença significativa entre

o grupo com depressão em comparação aos dois outros. Segundo os autores, alterações nos níveis de DHEA, um esteróide com ações conhecidas no cérebro, pode ter papel intrínseco na depressão, contribuindo para o entendimento dessa condição.

Estudos em adultos e adolescentes, com diagnóstico de depressão maior, sugerem que essa 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) encontraram concentrações significativamente menores de DHEA salivar, às oito horas da manhã, em 82 adolescentes com depressão maior com idades entre 8 e 16 anos. Herbert et al. (1996) relataram que a ocorrência de alterações psicogênicas em um grupo de 68 adolescentes com depressão maior, pânico ou desordem fóbica foi significativamente associada à falta de DHEA matinal.

Young, Gallagher e Porter (2002) analisaram o *ratio* cortisol/DHEA na saliva de 39 pacientes com depressão, que não estavam fazendo uso de medicação há pelo menos seis semanas. Os resultados foram comparados aos de 41 indivíduos saudáveis. O *ratio* cortisol/DHEA foi significativamente mais alto nos pacientes com depressão em comparação aos indivíduos-controle, podendo ser um marcador salivar de depressão.

Evidências sugerem que pacientes depressivos apresentam níveis baixos de DHEA e níveis elevados de cortisol. El-Tawil (2010) acredita ser mais confiável a análise do *ratio* DHEA/cortisol no soro e na saliva do que a mensuração desses hormônios separadamente. Larsen et al. (2003) afirmaram que sob situações prolongadas de estresse pode haver adaptação do *ratio* cortisol/DHEA com níveis aparentemente normais desses hormônios mascarando alterações psicológicas.

Straub et al. (2004) investigaram os níveis de cortisol, DHEA e DHEAS na urina de 30 pacientes com artrite reumatóide, 32 com LES e 54 indivíduos saudáveis. Os níveis de DHEA e DHEAS foram inferiores nos pacientes-caso em comparação aos controles. Para o cortisol não houve diferença entre os grupos.

Estudos clínicos têm testado os efeitos da administração de DHEA em pacientes com LES e muitos defendem que o tratamento com esse esteróide pode melhorar a qualidade de vida dos portadores dessa doença. Chang et al. (2004) estudaram os efeitos da administração sistêmica de DHEA sobre as citocinas em mulheres com LES. Trinta mulheres com LES receberam 200mg de DHEA ao dia ou

placebo durante 24 semanas. Níveis significativamente menores de IL10 foram observados nas pacientes após 24 semanas de tratamento com DHEA em comparação com o grupo-controle. As citocinas, dentre elas as interleucinas, desempenham um papel importante na promoção de danos aos tecidos no LES. Por esse motivo, os autores sugerem a utilização de DHEA no tratamento de pacientes com essa doença.

Pillemer et al. (2004) investigaram a eficácia da administração da DHEA no tratamento da síndrome de Sjögren. Vinte e oito pacientes portadores dessa doença foram tratados com 200mg de DHEA ao dia ou com placebo, por via oral, durante 24 semanas. Após esse período, foram avaliados o fator reumatóide, a velocidade do fluxo salivar e as mucosas bucal e ocular. Não houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis analisadas. Apesar das evidências que sugerem que a DHEA possa exercer um papel no tratamento de doenças auto-imunes, esse estudo não suportou a eficácia desse hormônio na terapia de pacientes com a síndrome de Sjögren.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as concentrações salivares de DHEA e cortisol e a associação desses hormônios com os escores de ansiedade, depressão e estresse em pacientes portadores de líquen plano oral com o objetivo de identificar biomarcadores e fatores de risco para essa doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar, por meio de radioimunoensaio, as concentrações salivares de DHEA e de cortisol em pacientes portadores de LPO e controles.
2. Verificar o *ratio* cortisol/DHEA em pacientes portadores de LPO e controles.
3. Avaliar, por meio de inventários, os sintomas de depressão, ansiedade e estresse em pacientes com LPO e controles.
4. Verificar se existe correlação entre as concentrações salivares de DHEA e cortisol com os escores de depressão, ansiedade e estresse em pacientes portadores de LPO.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (ANEXO B) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

4.2 DELINEAMENTO

Estudo clínico transversal, controlado e observacional (ESTRELA, 2001; PEREIRA, 2001; JEKEL; KATZ; ELMORE, 2005).

4.3 VARIÁVEIS

- Independente: a presença do líquen plano oral.
- Dependente: as concentrações salivares de DHEA, de cortisol, o *ratio* cortisol/DHEA e os níveis de depressão, ansiedade e estresse.

4.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra foi constituída por 62 pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital São Lucas da PUCRS que foram assim distribuídos:

- Grupo-caso: 31 pacientes portadores de líquen plano oral, nas suas diferentes formas clínicas, com diagnóstico comprovado por exame histopatológico.

- Grupo-controle: 31 pacientes sem lesões na mucosa bucal em acompanhamento emparelhados por sexo e apresentando a mesma faixa etária dos pacientes do grupo-caso.

4.4.1 Critérios de inclusão

- Grupo-caso: pacientes com idade superior a 30 anos, portadores de LPO com comprovação histopatológica.
- Grupo-controle: pacientes com idade superior a 30 anos, sem lesões na mucosa bucal.

Foram incluídos os pacientes que, depois de esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos do estudo, concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B).

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que:

- Apresentassem a síndrome da ardência bucal.
- Apresentassem lesões na mucosa bucal com exceção do Líquen plano.
- Apresentassem neoplasias malignas ou que tivessem sido submetidos a tratamento quimio ou radioterápico.
- Apresentassem doenças auto-imunes como lupus eritematoso, artrite reumatóide ou síndrome de Sjögren.
- Apresentassem alterações no hemograma, nas concentrações séricas de glicose, ferro, ácido fólico e vitamina B12.
- Apresentassem o fator antinuclear (FAN) ou anti-DNA reagentes.
- Utilizassem fármacos antidepressivos, ansiolíticos, esteróides anabolizantes, drogas anti-inflamatórias esteroidais ou imunossupressoras nos 30 dias anteriores ao exame físico.

- Pacientes do sexo feminino que fizessem terapia de reposição hormonal da menopausa.

4.5 PROCEDIMENTOS

4.5.1 Anamnese e exame físico

Os dados de identificação do paciente, da anamnese e do exame físico foram registrados na ficha de coleta de dados (APÊNDICE C). Na anamnese foram incluídos os dados relativos à história médica e utilização de medicamentos. Nos pacientes com LPO, o tempo de evolução das lesões, a presença de sintomatologia e tratamentos prévios foram também registrados.

No exame físico intra-bucal foram registradas as formas clínicas (ANDREASEN, 1968; MOLLAOGLU, 2000) e localização das lesões. O diagnóstico de LPO de todos os pacientes foi confirmado por exame histopatológico (MOLLAOGLU, 2000; SUGERMAN et al., 2002; ARISAWA et al., 2008).

Após anamnese e exame físico, foram solicitados a todos os pacientes da amostra os seguintes exames laboratoriais: hemograma, glicemia em jejum, dosagens séricas de ácido fólico, de ferro e de vitamina B12, FAN, anti-DNA e anti-HCV. Os resultados obtidos também foram registrados na ficha de coleta de dados.

4.5.2 Inventários para investigação dos sintomas de depressão, ansiedade e estresse

Para a determinação da presença e intensidade da depressão foi utilizada a versão em português do *The Beck Depression Inventory* (BDI), (BECK et al., 1961). O BDI apresenta aplicabilidade clínica e em pesquisa (CUNHA, 2001) por ser um instrumento capaz de medir por aproximação quantitativa a presença e a gravidade dos sintomas de depressão em indivíduos de 17 a 80 anos de idade. É uma escala

de auto-relato que contem 21 itens, cada um com quatro alternativas que representam graus crescentes de depressão com escores de 0 a 3 (ANEXO C). A soma dos escores de cada item fornece o escore total que permite a classificação dos níveis de depressão (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos níveis de depressão

Nível	Escore
Mínimo	0 - 11
Leve	12 - 19
Moderado	20 - 35
Grave	36 - 63

Fonte: CUNHA, J. A. **Manual da versão em português das escalas Beck**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2001.

O *The Beck Anxiety Inventory* (BAI) foi empregado para mensurar a intensidade dos sintomas de ansiedade (BECK et al., 1988). A versão em português (CUNHA, 2001) 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 um com uma escala de quatro pontos que refletem níveis crescentes de cada sintoma de ansiedade (ANEXO D). O escore total permite a classificação dos níveis de ansiedade (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos níveis de ansiedade

Nível	Escore
Mínimo	0 - 10
Leve	11 - 19
Moderado	20 - 30
Grave	31 - 63

Fonte: CUNHA, J. A. **Manual da versão em português das escalas Beck**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2001.

O Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de Lipp (ISSL) (LIPP, 2005) foi empregado para avaliar a presença de estresse, o tipo e a fase de sintoma existente. O ISSL foi validado no Brasil em 1994 e representa um modelo quadrifásico para o estresse, que desde então, tem sido amplamente utilizado na clínica e em pesquisas científicas. É composto por três quadros que referem os sintomas relacionados com o estresse experimentados pelo indivíduo nas últimas 24

horas (quadro 1, fase de alerta), na última semana (quadro 2, fases de resistência e quase exaustão) e no último mês (quadro 3, fase de exaustão). Cada quadro é ainda subdividido em “a” e “b”, onde “a” representa os sintomas fisiológicos e “b” os sintomas psicológicos do estresse (ANEXO E). O ISSL inclui 37 itens de natureza fisiológica e 19 de caráter psicológico. Os itens assinalados fornecem para cada quadro um resultado bruto que é transformado em porcentagem e refletirá a presença ou ausência do estresse, a fase do estresse na qual o indivíduo se encontra e a predominância de sintomas fisiológicos ou psicológicos (Figura 3).

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

Figura 3 – Diagnóstico do estresse.

Fonte: LIPP, M. E. N. **Manual do Inventário de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp (ISSL)**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2005.

Os três inventários apresentam confiabilidade, consistência interna e validade podendo ser aplicados tanto em pacientes psiquiátricos, quanto na população em geral. Após a aplicação pelo pesquisador, os resultados dos inventários foram interpretados por um psicólogo da Faculdade de Psicologia da PUCRS e os escores obtidos foram registrados na ficha de coleta de dados do paciente.

4.5.3 Coleta de saliva para análise das concentrações de DHEA e cortisol

As amostras de saliva para determinação das concentrações de DHEA e cortisol foram coletadas em dois momentos no mesmo dia: pela manhã e à noite. Para cada indivíduo foram fornecidos dois recipientes transparentes de polipropileno com tampa, com capacidade de 80mL (Deskarplás®, Rio de Janeiro, Brasil),

devidamente identificados para cada período de coleta. Os pacientes foram orientados a coletar a saliva entre 8 h e 10 h da manhã (antes do café da manhã) e entre 19 h e 21 h (antes do jantar) seguindo as recomendações especificadas a seguir:

- Não escovar os dentes nem ingerir ou colocar na boca qualquer substância por uma hora antes das coletas.
- Não aplicar nos lábios medicamentos ou cosméticos.
- No momento da coleta, permanecer sentado e com os olhos abertos.
- Com a cabeça inclinada para baixo depositar toda a saliva que for se acumulando na boca no interior do frasco, durante 5 minutos.
- Guardar o frasco fechado no congelador ou no freezer.

Os frascos foram recolhidos pelo pesquisador no dia seguinte e, logo após, armazenados em freezer a -20°C até a data da mensuração das concentrações salivares da DHEA e do cortisol.

4.5.4 Análise das concentrações de DHEA e cortisol na saliva

A mensuração das concentrações de DHEA e de cortisol foi realizada no Laboratório Vitrus. As análises foram feitas em duplicatas e em baterias seriadas com kits específicos para cada hormônio por meio da técnica de radioimunoensaio.

Após o descongelamento, as amostras foram transferidas para tubos de polietileno e centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm (rotações por minuto) com a finalidade de precipitar as proteínas salivares e obter saliva límpida no sobrenadante (Figuras 4, 5 e 6).



Figura 4 – Recipientes contendo saliva coletada pela manhã e à noite.
Fonte: A autora (2010).

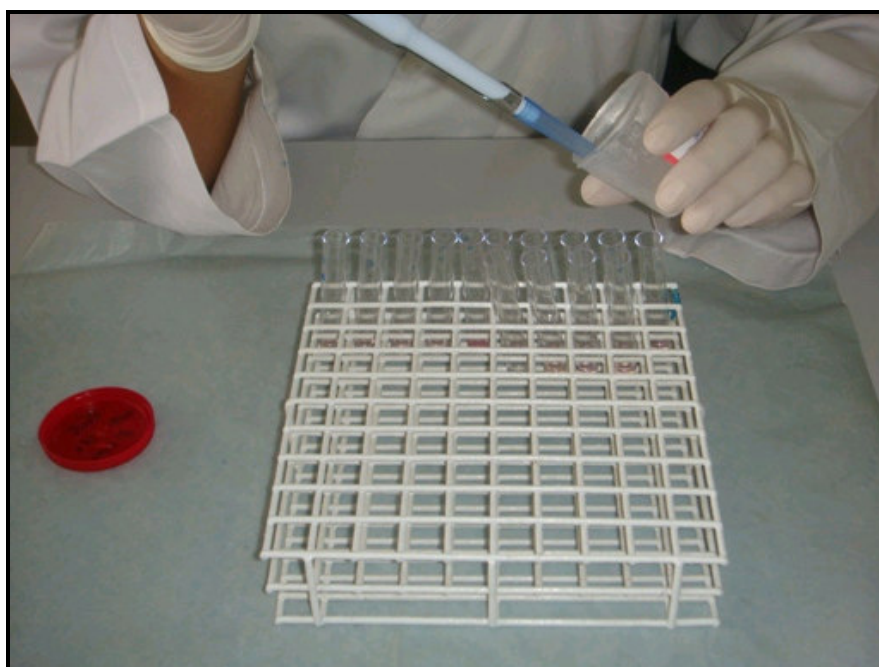


Figura 5 – Transferência da saliva do recipiente para o tubo de polietileno.
Fonte: A autora (2010).



Figura 6 - Centrifugação das amostras de saliva para precipitação de mucinas.
Fonte: A autora (2010).

Para a mensuração das concentrações salivares da DHEA foi utilizado o Kit *DSL®-8900 DHEA RIA* (*Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, Texas, USA*) com anticorpo específico e monoclonal para esse hormônio seguindo as especificações do fabricante (ANEXO F, Figura 7).



Figura 7 – Kit para mensuração das concentrações de DHEA na saliva.
Fonte: A autora (2010).

O kit *Coat-A-Count® Cortisol* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, Califórnia, USA) foi utilizado para análise das concentrações salivares de cortisol por meio de radioimunoensaio seguindo as especificações do fabricante (ANEXO G, Figura 8).



Figura 8 – Kit para mensuração das concentrações de cortisol na saliva.
Fonte: A autora (2010).

O ensaio para análise da DHEA seguiu o princípio competitivo de fase líquida, no qual o esteróide contido na amostra compete com a DHEA marcada com I^{125} pelos sítios de ligação ao anticorpo específico. Após o período de incubação, as moléculas ligadas ao anticorpo foram precipitadas por centrifugação. A concentração da amostra foi determinada pela contagem da radiação do precipitado. Para o ensaio de cortisol, o teste seguiu o princípio de fase sólida, no qual o anticorpo já vem aderido ao tubo-teste. De forma similar à DHEA, os níveis de cortisol da amostra competem com o cortisol radioativo (cortisol I^{125}) pelos sítios do anticorpo contido no tubo. Após o período de incubação de três horas, o sobrenadante foi aspirado e a radiação remanescente em cada tubo foi mensurada.

A radiação dos tubos foi medida no contador de radiação *Gamma C12®* (EURO-DPC) (Figura 9) durante um minuto para o cortisol e dois minutos para a DHEA. Ambas as medidas foram expressas em contagens por minuto (cpm).

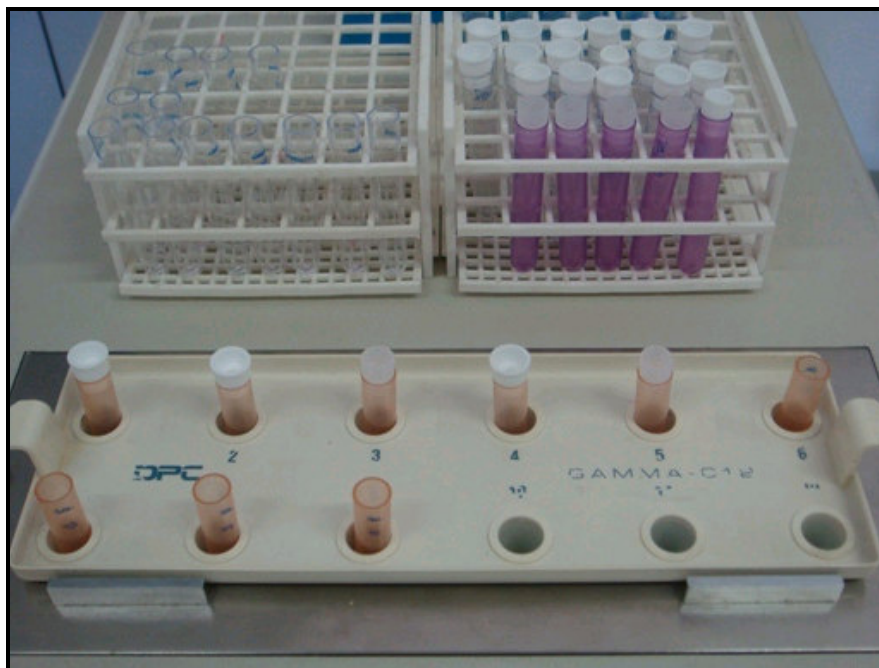


Figura 9 – Tubos de ensaio acondicionados no contador *Gamma C12®* (EURO-DPC).
Fonte: A autora (2010).

O *software* específico do equipamento calculou as concentrações da DHEA e do cortisol em cada amostra de saliva (Figura 10).

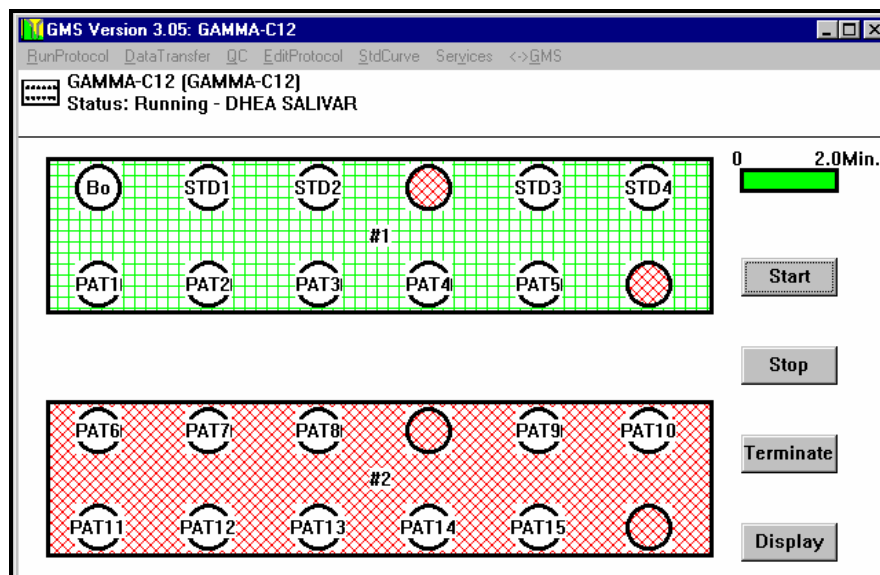


Figura 10 – Contagem da radiação gama remanescente dos ensaios por meio do *software* específico do equipamento *Gamma C12®* (EURO-DPC).
Fonte: A autora (2010).

A sensibilidade definida como a concentração mínima de DHEA diferente de zero para o *kit DSL®-8900 DHEA RIA* é de 0,009ng/mL ou 0,031nmol/L. A sensibilidade do *kit Coat-A-Count® Cortisol* é de 0,2µg/dL ou 5,5nmol/L.

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados, 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, por mediana e intervalos interquartis (percentil 25 e percentil 75).

O teste t de Student foi aplicado para avaliar a diferença entre os grupos quanto à variável idade. Os testes Exato de Fisher e Qui-quadrado (χ^2) foram aplicados na avaliação da associação entre as variáveis categóricas. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para comparar os grupos com relação aos níveis de DHEA, cortisol, *ratio* cortisol/DHEA e quanto aos sintomas de depressão, ansiedade e estresse. O Coeficiente de Correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e ansiedade. Para verificar a associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com a presença de estresse foi aplicado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 10.0.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

5.1.1 Caracterização da amostra segundo sexo e idade

Dos 62 pacientes que constituíram a amostra, 54 (87%) eram do sexo feminino e oito (13%) do masculino. A idade dos pacientes com LPO variou de 32 a 71 anos com média de 53,84 anos ($\pm 10,46$). No grupo-controle a idade dos pacientes variou de 30 a 81 anos, com média de 55,55 anos ($\pm 11,77$). Não houve diferença significativa entre os grupos com relação a essa variável (teste t de Student, $p=0,548$).

5.1.2 Caracterização dos casos de líquen plano oral

Dos 31 pacientes com LPO, 12,9% ($n=4$) apresentaram o anti-HCV reagente e 9,6% ($n=3$) estavam infectados pelo vírus da hepatite C. No grupo-controle não houve casos de infecção por esse vírus.

Cinquenta e cinco por cento ($n=17$) dos pacientes apresentavam associação das formas reticular e atrófico-erosiva, 25,8% ($n=8$) exibiam somente lesões reticulares, 9,6% ($n=3$) apresentavam lesões atrófico-erosivas e 9,6% ($n=3$), associação das formas papular, reticular e em placa (Figuras 11 e 12). Dos 31 pacientes com a doença, 87% ($n=27$) exibiam lesões em vários sítios. Os sítios mais acometidos foram a mucosa jugal (31,9%) e as bordas laterais da língua (17,4%). Em ordem decrescente, as lesões também se manifestaram no dorso e ventre da língua, gengiva inserida, rebordo alveolar, fundo de sulco, mucosa labial, vermelhão labial, região retromolar e palato (Tabela 3).



Figura 11 – Líquen plano oral erosivo
Fonte: A autora (2010).



Figura 12 – Líquen plano oral reticular e papular
Fonte: A autora (2010).

Tabela 3 – Distribuição dos casos de líquen plano oral segundo a localização das lesões

Sítios de localização das lesões	n	%
Mucosa jugal	22	31,90
Língua		
Bordas laterais	12	17,40
Dorso	10	14,50
Ventre	5	7,24
Lábio		
Limite vermelho e mucosa	1	1,44
Vermelho	2	2,90
Mucosa	3	4,34
Gengiva inserida	4	5,80
Rebordo alveolar	4	5,80
Fundo de sulco	3	4,34
Palato	1	1,44
Região retromolar	2	2,90
Total	69	100

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

Dezessete pacientes com LPO (55%) apresentavam sintomatologia. Nestes, a queimação foi o sintoma mais frequente, presente em 11 pacientes. Dor foi a queixa em três casos e associação de ambos os sintomas, foi referida por três pacientes.

O tempo de evolução das lesões variou de cinco meses a 16 anos, com mediana de 24 meses (13,0 - 78,0), (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos casos de líquen plano oral segundo o tempo de evolução das lesões

Tempo de evolução (meses)	n	%
Até 11 meses	3	9,7
Entre 12 e 23 meses	9	29,0
Entre 24 e 35 meses	4	12,9
Entre 36 e 47 meses	3	9,7
Entre 48 e 59 meses	3	9,7
Mais de 60 meses	9	29,0
Total	31	100,0

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

5.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS PACIENTES COM LÍQUEN PLANO ORAL E CONTROLES

5.2.1 História médica e uso de medicamentos

Doenças cardiovasculares e gastrointestinais foram as alterações sistêmicas mais frequentes dos pacientes da amostra. Não houve diferença entre os grupos caso e controle quanto à presença dessas alterações (Tabela 5).

Tabela 5 – Alterações sistêmicas dos pacientes dos grupos caso e controle

Alterações sistêmicas	Grupos				p
	Caso		Controle		
	n	%	n	%	
Ausência de alterações	2	6,5	7	22,6	0,147
Cardiovasculares	12	38,7	12	38,7	1,000
Gastrointestinais	12	38,7	8	25,8	0,416
Artrose	4	12,9	3	9,7	1,000
Respiratórias	1	3,2	2	6,5	1,000
Endócrinas	4	12,9	5	16,1	1,000
Outras	14	45,2	7	22,6	0,106

Teste Exato de Fisher

Legenda: n= frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

Os medicamentos mais utilizados pelos pacientes com LPO e controles foram os hipotensores, diuréticos e analgésicos. Os pacientes com LPO apresentaram frequência significativamente maior de uso de antiácidos do que os indivíduos-controle (teste Exato de Fisher, $p=0,031$), (Tabela 6).

Tabela 6 – Medicamentos utilizados pelos pacientes dos grupos caso e controle

Tipo de medicamento	Grupos				p
	Caso		Controle		
	n	%	n	%	
Hipotensores	11	36,7	10	32,3	0,791
Diuréticos	8	26,7	5	16,1	0,363
Antiácidos	10	33,3	3	9,7	0,031
Cálcio	5	16,7	4	12,9	0,731
Repositores secreção tireoidiana	2	6,7	3	9,7	1,000
Hipoglicemiantes	2	6,7	1	3,2	0,616
Analgésicos	11	36,7	8	25,8	0,416
Homeopáticos, naturais	3	10,0	2	6,5	0,671
Outros	10	33,3	9	29,0	0,786
Não utiliza medicamentos	6	20,0	8	25,8	0,762

Teste Exato de Fisher

Legenda: n= frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

5.2.2 Sintomas de depressão, ansiedade e estresse

Os escores do inventário BDI, para determinação da intensidade dos sintomas de depressão, variaram de 0 a 39 pontos, com mediana de 10,0 (5,00-14,00), nos pacientes com LPO e de 2 a 21 pontos, com mediana de 9,0 (6,00-13,00), nos indivíduos-controle. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para essa variável (teste de Mann-Whitney, $p=0,832$), (Tabela 7).

Tabela 7 – Escores de depressão dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BDI

	Grupos						p
	Caso			Controle			
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Escore do BDI	10,00	5,00	14,00	9,00	6,00	13,00	0,832

Teste de Mann-Whitney

Fonte: A autora (2010).

Os escores de depressão foram categorizados nos níveis mínimo/leve e moderado/grave e, por meio do teste Qui-quadrado (χ^2), ($p=0,198$), verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de depressão

Níveis de Depressão	Grupos				Total	
	Caso		Controle		n	%
	n	%	n	%		
Mínimo/leve	26	83,9	30	96,8	56	90,3
Moderado/grave	5	16,1	1	3,2	6	9,7
Total	31	100,0	31	100,0	62	100,0

$\chi^2 = 1,66$; $p = 0,198$

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

Os escores do inventário BAI, para determinação da intensidade dos sintomas de ansiedade, variaram de 0 a 41 pontos, com mediana de 9,0 (5,00-14,00), nos pacientes com LPO e de 0 a 27 pontos, com mediana de 6,0 (4,00-9,00), nos pacientes-controle. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para essa variável (teste de Mann-Whitney, $p=0,061$), (Tabela 9).

Tabela 9 – Escores de ansiedade dos pacientes dos grupos caso e controle, obtidos por meio do inventário BAI

Escores do BAI	Grupos						p
	Caso			Controle			
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
	9,00	5,00	14,00	6,00	4,00	9,00	0,061

Teste de Mann-Whitney

Fonte: A autora (2010).

Os escores do BAI foram categorizados nos níveis mínimo/leve e moderado/grave e, por meio do teste χ^2 ($p=0,351$), não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto aos níveis de ansiedade

Níveis de ansiedade	Grupos				Total	
	Caso		Controle		n	%
	n	%	n	%		
Mínimo/leve	27	87,1	30	96,8	57	91,9
Moderado/grave	4	12,9	1	3,2	5	8,1
Total	31	100,0	31	100,0	62	100,0

$\chi^2 = 0,87$; $p = 0,351$

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

Os pacientes com LPO e controles foram categorizados quanto à presença ou ausência de estresse conforme os escores do inventário ISSL. Dezoito pacientes com LPO e 15 indivíduos-controle apresentaram sintomas de estresse, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto a essa variável (χ^2 , $p=0,611$), (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença de estresse (inventário ISSL)

ISSL	Grupos				Total	
	Caso		Controle		n	%
	n	%	n	%		
Sem estresse	13	41,9	16	51,6	29	46,8
Com estresse	18	58,1	15	48,4	33	53,2
Total	31	100,0	31	100,0	62	100,0

$\chi^2 = 0,26$; $p = 0,611$

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

A Tabela 12 demonstra a distribuição dos pacientes de acordo com a presença e fases do estresse: alerta, resistência, quase-exaustão e exaustão. Não houve diferença significativa entre os pacientes com LPO e controles quanto às fases do estresse (teste de Mann-Whitney, $p=0,483$).

Tabela 12 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto à presença e fases do estresse

Fases do estresse		Grupo-caso	Grupo-controle	Total
Sem estresse	n	13	16	29
	%	41,9	51,6	46,8
Com estresse/ fase alerta	n	3	1	4
	%	9,7	3,2	6,5
Com estresse/ fase resistência	n	12	13	25
	%	38,7	41,9	40,3
Com estresse/ fase quase-exaustão	n	2	0	2
	%	6,5	0,0	3,2
Com estresse/ fase exaustão	n	1	1	2
	%	3,2	3,2	3,2
Total	n	31	31	62
	%	100,0	100,0	100,0

Teste de Mann-Whitney, $p=0,483$

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

A Tabela 13 evidencia a distribuição dos pacientes de acordo com a presença e tipo predominante de sintomas de estresse: físicos, psicológicos ou ambos. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos tipos de sintomas de estresse (teste de Mann-Whitney, $p=0,678$).

Tabela 13 – Distribuição dos pacientes dos grupos caso e controle quanto ao tipo predominante de sintomas de estresse

Tipos de sintomas do estresse		Grupo-caso	Grupo-controle	Total
Sem estresse	n	13	16	29
	%	41,9	51,6	46,8
Com estresse/ sintomas físicos	n	5	2	7
	%	16,1	6,5	11,3
Com estresse/ sintomas psicológicos	n	12	12	24
	%	38,7	38,7	38,7
Com estresse/ sintomas físicos e psicológicos	n	1	1	2
	%	3,2	3,2	3,2
Total	n	31	31	62
	%	100,0	100,0	100,0

Teste de Mann-Whitney, $p=0,678$

Legenda: n = frequência; % = porcentagem

Fonte: A autora (2010).

5.2.3. Concentrações salivares de DHEA e cortisol

As medianas das concentrações salivares de DHEA pela manhã (M) foram de 0,75nmol/L (0,46-0,99) no grupo de pacientes com LPO e de 0,66nmol/L (0,51-1,22) no grupo-controle. Nas amostras salivares coletadas à noite (N), as medianas das concentrações de DHEA foram de 0,41nmol/L (0,32-0,65) nos pacientes com LPO e de 0,50nmol/L (0,34-0,76) nos indivíduos-controle. Não houve diferença significativa entre os grupos para as concentrações salivares matinais (teste de Mann-Whitney, $p=0,888$) e noturnas de DHEA (teste de Mann-Whitney, $p=0,297$), (Tabela 14, Figura 13).

As medianas das concentrações salivares matinais de cortisol foram de 13,5nmol/L (10,5-21,3) no grupo-caso e de 14,1nmol/L (8,6-18,3) no grupo-controle. Nas amostras salivares coletadas à noite, as medianas das concentrações de cortisol foram de 3,80nmol/L (2,8-5,1) nos pacientes com LPO e de 3,90nmol/L (3,0-4,4) nos controles. Não foi observada diferença significativa entre os grupos para as concentrações salivares matinais (teste de Mann-Whitney, $p=0,443$) e noturnas de cortisol (teste de Mann-Whitney $p=0,983$), (Tabela 14, Figura 14).

Tabela 14 – Concentrações salivares matinais e noturnas de DHEA e de cortisol (nmol/L) dos pacientes dos grupos caso e controle

	Grupos						p
	Caso			Controle			
	Mediana (nmol/L)	Percentil 25	Percentil 75	Mediana (nmol/L)	Percentil 25	Percentil 75	
DHEA M	0,75	0,46	0,99	0,66	0,51	1,22	0,888
DHEA N	0,41	0,32	0,65	0,50	0,34	0,76	0,297
Cortisol M	13,50	10,50	21,30	14,10	8,60	18,30	0,443
Cortisol N	3,80	2,80	5,10	3,90	3,00	4,40	0,983

Teste de Mann-Whitney

Legenda: M = manhã; N = noite

Fonte: A autora (2010).

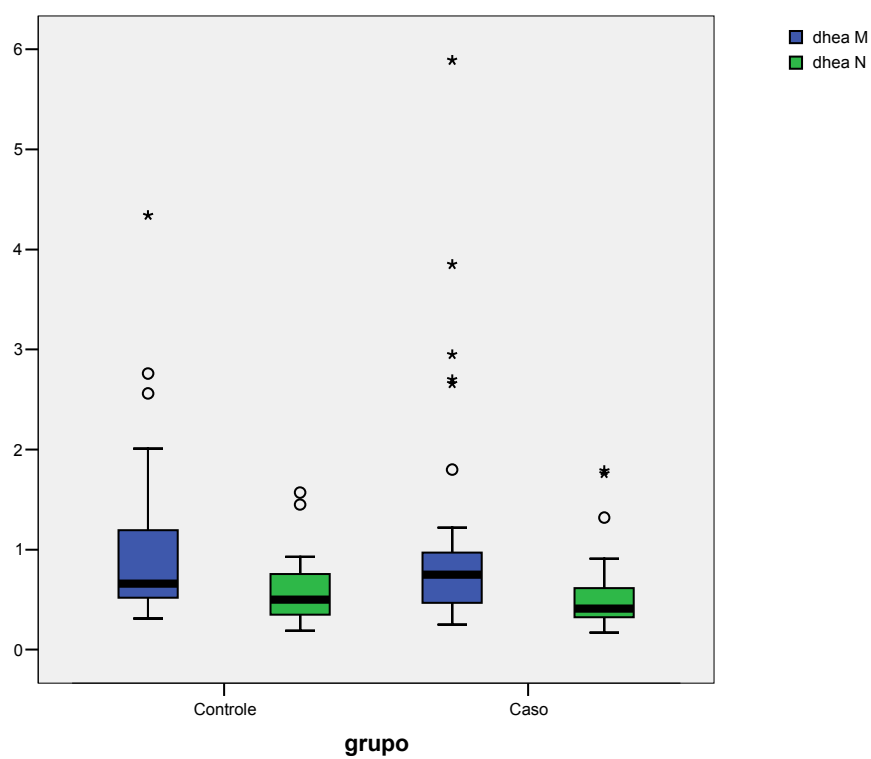


Figura 13 – Concentrações de DHEA nos grupos caso e controle
Fonte: A autora (2010).

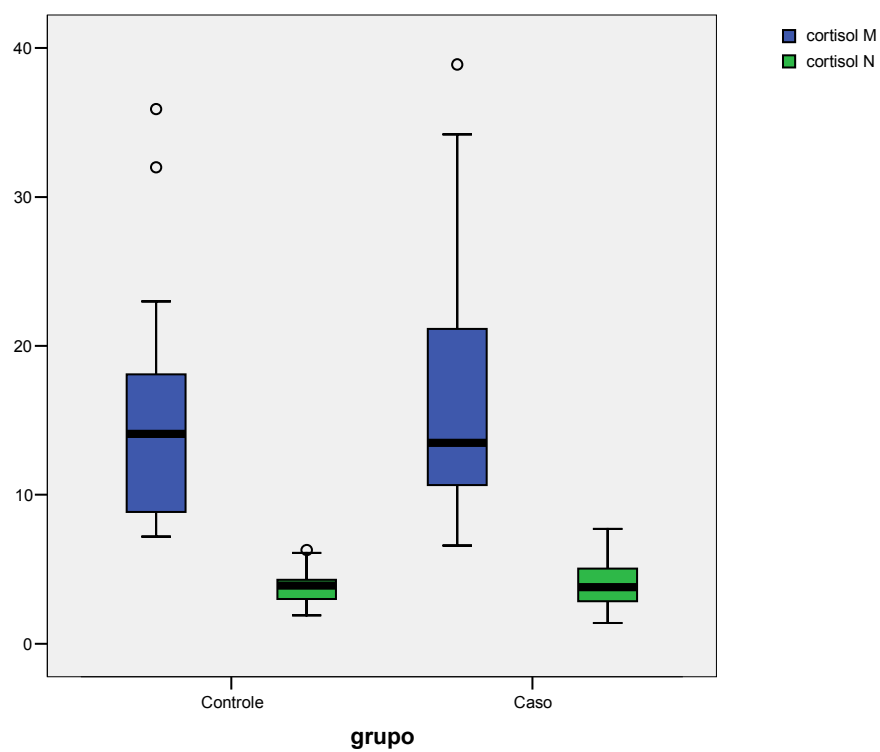


Figura 14 – Concentrações de cortisol nos grupos caso e controle
Fonte: A autora (2010).

Ao comparar-se a diminuição das concentrações de DHEA entre as amostras salivares coletadas pela manhã e à noite, verificou-se não haver diferença entre os pacientes com LPO e controles (teste de Mann-Whitney, $p=0,210$, Tabela 16). Também não houve diferença entre os grupos quanto à variação das concentrações salivares matinais e noturnas de cortisol (teste de Mann-Whitney, $p=0,451$, Tabela 15).

Tabela 15 – Variação percentual dos níveis de DHEA e de cortisol entre as amostras coletadas pela manhã e à noite nos pacientes dos grupos caso e controle

	Grupos						p
	Caso			Controle			
	Mediana %	Percentil 25	Percentil 75	Mediana %	Percentil 25	Percentil 75	
Variação da DHEA	-38,71	-51,43	-29,27	-33,87	-46,94	-22,50	0,210
Variação do cortisol	-74,78	-82,41	-66,38	-74,14	-77,91	-65,12	0,451

Teste de Mann-Whitney
 Legenda: % = porcentagem
 Fonte: A autora (2010).

Não houve diferença entre os grupos quando foi avaliado o *ratio* cortisol/DHEA das amostras salivares matinais (teste de Mann-Whitney, $p=0,526$) e noturnas (teste de Mann-Whitney, $p=0,678$), (Tabela 16)

Tabela 16 – *Ratio* cortisol/DHEA (nmol/L) das amostras salivares matinais e noturnas dos pacientes dos grupos caso e controle

	Grupo						p
	Caso			Controle			
	Mediana nmol/L	Percentil 25	Percentil 75	Mediana nmol/L	Percentil 25	Percentil 75	
Cortisol/DHEA M	19,46	12,21	27,50	17,41	11,28	27,12	0,526
Cortisol/DHEA N	7,44	5,28	10,38	6,67	5,24	10,58	0,678

Teste de Mann-Whitney
 Legenda: M = manhã; N = noite
 Fonte: A autora (2010).

5.2.4 Correlação e associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os sintomas de depressão, ansiedade e estresse

O Coeficiente de Correlação de Spearman foi empregado para verificar a correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e de ansiedade. Não foi observada correlação significativa entre essas variáveis (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17 – Correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e ansiedade nos pacientes com líquen plano oral

	Escore de depressão		Escore de ansiedade	
	Coeficiente de correlação de Spearman	p	Coeficiente de correlação de Spearman	p
DHEA M	0,058	0,755	0,064	0,733
DHEA N	0,024	0,900	0,131	0,483
Cortisol M	0,231	0,211	-0,095	0,612
Cortisol N	0,126	0,499	0,132	0,479

Legenda: M = manhã; N = noite
Fonte: A autora (2010).

Tabela 18 – Correlação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com os escores de depressão e ansiedade nos pacientes-controle

	Escore de depressão		Escore de ansiedade	
	Coeficiente de correlação de Spearman	p	Coeficiente de correlação de Spearman	p
DHEA M	0,036	0,847	0,046	0,806
DHEA N	-0,067	0,722	-0,079	0,672
Cortisol M	0,181	0,331	0,081	0,664
Cortisol N	0,186	0,316	-0,167	0,370

Legenda: M = manhã; N = noite
Fonte: A autora (2010).

As concentrações de DHEA e de cortisol também não exibiram associação significativa com o estresse nos grupos caso e controle (teste de Mann-Whitney), (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 – Associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com a presença de estresse nos pacientes com líquen plano oral

	Sem estresse			Com estresse			p
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
DHEA M	0,66	0,45	0,84	0,90	0,50	2,67	0,146
DHEA N	0,39	0,33	0,48	0,51	0,26	0,85	0,312
Cortisol M	13,50	9,40	20,70	13,65	11,18	23,43	0,465
Cortisol N	3,00	2,30	4,70	3,95	3,20	5,58	0,125

Teste de Mann-Whitney

Legenda: M = manhã; N = noite

Fonte: A autora (2010).

Tabela 20 – Associação entre as concentrações de DHEA e de cortisol com a presença de estresse nos pacientes-controle

	Sem estresse			Com estresse			p
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
DHEA M	0,86	0,52	1,89	0,63	0,51	1,12	0,281
DHEA N	0,51	0,33	0,87	0,47	0,36	0,66	0,545
Cortisol M	14,50	9,95	18,20	13,20	8,00	18,30	0,423
Cortisol N	3,90	3,30	4,18	3,60	2,80	4,40	0,545

Teste de Mann-Whitney

Legenda: M = manhã; N = noite

Fonte: A autora (2010).

6 DISCUSSÃO

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica, de natureza imunológica, que acomete com frequência a mucosa bucal. Embora a prevalência das lesões bucais seja relativamente elevada, sua etiopatogenia permanece desconhecida. Evidências sugerem que o processo imunológico seja iniciado por antígenos externos ou internos que alteram as células da camada basal do epitélio, deixando-as suscetíveis à resposta imune celular (WALSH et al., 1990; DORREGO et al., 2002; LIU et al., 2009). Entretanto, outros fatores como transtornos psicológicos e alterações neuroendócrinas são também propostos, uma vez que o LPO exibe predileção por pacientes do sexo feminino, de meia-idade e com perfil psicológico semelhante (ROJO-MORENO et al., 1998; VALLEJO; ZARABOZO, 2000; VALLEJO et al., 2001; PROLO et al., 2002; IVANOVSKI et al., 2005; MONTI et al., 2006; MANOLACHE; SECELEANU-PETRESCU; BENEÁ, 2008).

A literatura sugere que transtornos psicológicos podem estar associados à etiopatogenia do LPO. Uma vez que esses transtornos elevam as concentrações de cortisol e promovem diminuição das de DHEA (GOODYER et al., 1996; HERBERT et al., 1996; MICHAEL et al., 2000; KORAY et al., 2003; AMENÁBAR et al., 2008; KANEGANE et al., 2009; SELANDER et al., 2009), no presente estudo, foram investigados os níveis salivares de ambos os esteróides e sua associação com estresse, ansiedade e depressão em pacientes portadores de LPO.

Não foram observadas diferenças significativas para os escores e os níveis de depressão, ansiedade e estresse entre os pacientes com LPO e controles, embora os escores dos pacientes-caso tenham sido mais elevados. Na avaliação da ansiedade, a diferença entre os grupos foi muito próxima a de um valor significativo ($p=0,06$), demonstrando uma tendência de associação dessa variável com o LPO. A ausência de diferença entre os grupos caso e controle quanto à ansiedade pode ser explicada pelo tamanho da amostra. Para as demais variáveis psicológicas investigadas essa tendência não foi constatada, demonstrando a ausência de associação da depressão e do estresse com o LPO.

O envolvimento psicossomático na etiopatogenia do LPO ainda é motivo de controvérsia entre os autores. Hampf et al. (1987), Rojo-Moreno et al. (1998), Vallejo e Zarabozo (2000), Koray et al. (2003), Chaudhary (2004), Ivanovski et al. (2005),

Lundqvist et al. (2006), Manolache, Seceleanu-Petrescu e Benea (2008) evidenciaram associação positiva entre o LPO e a presença de depressão, ansiedade e estresse. Entretanto, os estudos de Allen et al. (1986), Macleod (1992), McCartan (1995) e Rödström et al. (2001) não suportaram tal hipótese. Inventários psicométricos têm sido aplicados nos pacientes portadores de LPO com o propósito de avaliar o perfil psicológico dos mesmos, a fim de apontar ou não a causalidade psicogênica dessa doença. A utilização de diferentes inventários, bem como a subjetividade dos mesmos e a falta de padronização metodológica dos estudos podem ser apontados como possíveis fatores responsáveis pela controvérsia existente em relação a este tema. Esses fatores impossibilitam que se chegue a uma conclusão em relação ao papel dos transtornos psicológicos na etiopatogenia dessa doença (MACLEOD, 1992; VENTURINI et al., 2006). Neste estudo, os inventários BDI, BAI e ISSL foram utilizados para determinação da intensidade dos sintomas de depressão, ansiedade e estresse, respectivamente. Esses três instrumentos apresentam confiabilidade, consistência interna e validade 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 depressão, da ansiedade e do estresse (CHRISTENSEN et al., 1994; KIMMEL et al., 2000; KARKOW et al., 2004; AMENÁBAR et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; MUTSUURA et al., 2009).

Alguns dos pacientes deste estudo, por diminuição ou perda de julgamento crítico ou de reconhecimento dos sintomas, por timidez, vergonha ou outro motivo não revelado, podem ter escolhido respostas não condizentes com os verdadeiros sentimentos, mascarando os sintomas de depressão, ansiedade e estresse. No presente estudo, foram incluídos no grupo-controle pacientes sem lesões e sem sintomas de ardência bucal atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Portanto, o grupo-controle foi formado por pacientes atendidos em um Serviço especializado no tratamento de doenças bucais e não selecionados em uma amostra da população em geral o, que também pode ter contribuído para a ausência de diferença significativa entre os grupos quanto às variáveis psicológicas investigadas. Além disso, para que não houvesse influência nas análises salivares, foram excluídos pacientes que estivessem fazendo uso de fármacos ansiolíticos e/ou antidepressivos. Dessa forma, é provável que, a exclusão desses pacientes,

presumivelmente com um perfil depressivo, ansioso e/ou estressado, tenha influenciado nos escores dos instrumentos no grupo de pacientes com LPO.

O estresse está intimamente relacionado com depressão e ansiedade, podendo conduzir a uma e a outra enfermidade, ou em certos casos, às duas. O estresse, bem como outras alterações psicológicas podem modificar funções imunes e predispor ao desenvolvimento de algumas doenças, mas essa associação não está totalmente compreendida (ANDERSSON; LORENTZEN; ERICSSON-DAHLSTRAND, 2000; WINDLE et al., 2001; BOSCH et al., 2003). Segundo Marshall et al. (1998), mais do que suprimir o sistema imune, o estresse psicológico promove sua desregulação. Os autores investigaram os níveis das citocinas Th1 e Th2 em indivíduos submetidos a situações de estresse. Houve diminuição da produção de IFN- γ acompanhada de elevação da produção de IL-10, diminuição do *ratio* IFN- γ /IL-10, sugerindo que o estresse psicológico promova alterações no equilíbrio Th1/Th2, com aumento da resposta Th2. Liu et al. (2009), ao analisarem a expressão dessas citocinas na saliva, demonstraram que pacientes com LPO exibem predominância da resposta Th2.

O estresse promove ativação do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo com a liberação de corticosteróides e catecolaminas para auxiliar nos mecanismos de adaptação do organismo e na modulação do sistema imunológico. O excesso de cortisol promove a supressão do sistema imune (GIBSON et al., 1999; BOYER, 2000), portanto, a partir dessa perspectiva teórica, disfunções no eixo HPA podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção de doenças auto-imunes. Se o estresse não é seguido por um nível elevado de cortisol sérico, a ativação do sistema imune pode não ser adequadamente controlada e uma reação imune adversa prevalecerá (RÖDSTRÖM et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que os níveis de cortisol encontram-se elevados em pacientes estressados, ansiosos e deprimidos e, por essa razão, o cortisol poderia ser utilizado como um marcador biológico dessas alterações psicológicas (McCARTAN; LAMEY; WALLACE, 1996; KORAY et al., 2003; AMENÁBAR et al., 2008; SHAH; ASHOK; SUJATHA, 2009). Considerando que a elevação das concentrações de cortisol pela ativação do eixo HPA é um fator importante à prevenção de doenças auto-imunes, as concentrações salivares desse esteróide e sua associação com alterações psicológicas têm sido também investigadas em pacientes com LPO (RÖDSTRÖM et al., 2001; KORAY et al., 2003;

SEOANE et al., 2004; IVANOVSKI et al., 2005; SHAH; ASHOK; SUJATHA, 2009). No presente estudo não foi evidenciada diferença significativa entre os níveis de cortisol e de estresse entre os grupos caso e controle corroborando os achados de Rödström et al. (2001). Shah, Ashok e Sujatha (2009) defendem a associação do LPO com níveis elevados de cortisol salivar, ansiedade, depressão e estresse, entretanto, em seu estudo não apresentam a comparação dessas variáveis entre pacientes com a doença e controles.

Em contrapartida aos resultados do presente estudo, Koray et al. (2003) encontraram concentrações salivares de cortisol e escores de ansiedade superiores em pacientes com LPO em comparação aos controles. Entretanto, também não observaram correlação entre as variáveis estudadas. A média de idade dos pacientes desse estudo foi de 35 anos, inferior ao que é descrito na literatura para pacientes com LPO. No presente estudo foi observada uma tendência para associação do LPO com ansiedade, mas os níveis de cortisol não diferiram entre os grupos.

Ivanovski et al. (2005) encontraram níveis superiores de cortisol em pacientes com LPO erosivo em comparação aos pacientes com a forma reticular da doença e aos controles. Os níveis de cortisol não diferiram entre os pacientes com LPO reticular e controles. No presente estudo, os pacientes com LPO não foram distribuídos em grupos distintos de acordo com a forma clínica das lesões, mas incluídos em um único grupo em função do tamanho da amostra. Essa diferença entre ambos os estudos pode ter contribuído para os resultados contrastantes, sugerindo que o perfil psicológico do paciente pode desempenhar um papel mais importante na forma erosiva da doença.

A DHEA é um hormônio esteróide produzido nas glândulas adrenais, nas gônadas e no sistema nervoso central, razão pela qual é também chamada de neuroesteróide (NIESCHLAG et al., 1973; KIBALY et al., 2008, NEWMAN; PRADHAN; SOMA, 2010). Seus mecanismos de ação no organismo humano não são completamente compreendidos. Assim como o cortisol, a DHEA parece desempenhar importante papel na fisiopatologia da depressão (KROBOTH et al., 1999; WOLF; KIRSCHBAUM, 1999; BECKER, 2001; FERNANDES et al., 2008), regula o humor e a sensação de bem-estar (WOLKOWITZ et al., 1999), protegendo o cérebro contra os efeitos negativos do estresse (KAMINSKA et al., 2000), além de ser importante moduladora da resposta imune (WOLKOWITZ et al., 1997). Suas

concentrações diminuem gradualmente com o avançar da idade e esta redução está associada à deterioração de diversas funções fisiológicas (LEDOCHOWSKI, 2001).

Concentrações circulantes de DHEA estão diminuídas em pacientes com algumas doenças auto-imunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (DERKSEN, 1998). 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 nos níveis de DHEA contribui para a desregulação do balanço das citocinas (redução das citocinas Th1 e aumento das Th2), o que pode estar envolvido na patogênese de diversas doenças auto-imunes. Pelos seus efeitos modulatórios sobre o sistema imune, a administração da DHEA tem sido investigada no tratamento dessas doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, produzindo efeitos benéficos, com diminuição da atividade de doença. Entretanto, o mecanismo pelo qual a DHEA exerce esses efeitos não está claro, mas sua capacidade de reduzir a apoptose das células imunes e equilibrar a produção de citocinas pode oferecer alguma explicação (SUZUKI et al., 1995; HAZELDINE; ARLT; LORD, 2010).

Na literatura internacional não há até o momento estudos que tenham analisado os níveis desse esteróide em pacientes com LPO. Como o líquen é uma doença imunológica, mais comum em mulheres de meia-idade e há relatos de sua associação com variáveis psicológicas, no presente estudo foi aventada a hipótese de que as concentrações salivares de DHEA pudessem estar reduzidas em pacientes com essa doença bucal. Foram analisadas as concentrações salivares desse esteróide e sua associação com os sintomas de depressão, ansiedade e estresse em pacientes com LPO. Entretanto, os resultados não evidenciaram diferença significativa entre os pacientes portadores de LPO e os indivíduos-controle não suportando a hipótese de que a redução das concentrações de DHEA pudesse ser um biomarcador salivar para essa doença.

A DHEA exibe efeitos fisiológicos opostos aos dos glicocorticóides. Michael et al. (2000), Young, Gallagher, Porter (2002) e El-Tawil (2010) sugerem ser mais confiável realizar a análise sérica ou salivar do *ratio* cortisol/DHEA do que a mensuração destes esteróides separadamente. Young, Gallagher e Porter (2002) ao mensurarem de forma isolada os níveis de cortisol e DHEA, não encontraram diferença entre os pacientes depressivos e os controles. Entretanto, o *ratio* cortisol/DHEA estava mais elevado nos pacientes portadores de depressão, podendo ser um importante marcador do estado de doença (MICHAEL et al., 2000;

YOUNG; GALLAGHER; PORTER, 2002). No presente estudo, o *ratio* cortisol/DHEA também foi avaliado e apesar de mais elevado nos pacientes com LPO em relação aos controles, não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos para as amostras salivares matinais e noturnas.

Na saliva, a maior parte do cortisol e da DHEA encontram-se na forma livre e biologicamente ativa e sua concentração independe da velocidade do fluxo salivar (VINING; McGINLEY; SYMONS, 1983; RÖDSTRÖM et al., 2001). Ao avaliar os níveis de cortisol e DHEA no sangue e na saliva, Ahn et al. (2007) evidenciaram que os níveis salivares desses esteróides refletem os níveis séricos e que, sua mensuração na saliva é uma ferramenta útil e prática na avaliação da função adrenal. As amostras de saliva são obtidas por meio de técnicas não invasivas, não estressantes e não onerosas, que podem ser realizadas por pessoas não treinadas em ambulatório ou na própria residência do paciente. Além disso, a coleta dessa secreção permite a obtenção de várias amostras ao longo do dia, o que propicia a avaliação do ritmo circadiano dos esteróides (CASTRO; MOREIRA, 2002; RAFF, 2009). Neste estudo optou-se por mensurar esses hormônios na saliva, resultando em excelente colaboração dos pacientes, que puderam coletar as amostras em suas residências, em dois momentos no mesmo dia, o que permitiu avaliar a variação diurna dos esteróides investigados. As amostras de saliva foram cuidadosamente armazenadas com o propósito de eliminar possíveis erros na dosagem do cortisol e da DHEA. Múltiplos congelamentos e descongelamentos dessas amostras reduzem em aproximadamente 5% os níveis de cortisol devido à adesão das moléculas na superfície do recipiente que contem o fluido. Neste estudo as amostras salivares foram congeladas e descongeladas uma única vez.

Dos 31 pacientes com LPO que constituíram a amostra, 87% eram do sexo feminino, com média de idade de 53 anos. Esses dados estão de acordo com a literatura que demonstra a predileção dessa doença por pacientes do sexo feminino e de meia-idade (HAMPF et al., 1987; THORN et al., 1988; ROJO-MORENO et al., 1998; EISEN, 2002; KRAGELUND et al., 2003; SOUSA; ROSA, 2005; XUE et al., 2005; INGAFU et al., 2006; PAKFETRAT, 2009). Quanto à forma de apresentação clínica da doença, os tipos reticular e atrófico-erosivo foram encontrados com maior frequência e os sítios mais envolvidos foram a mucosa jugal e as bordas laterais da língua, o que também corrobora os achados de outros autores (EISEN, 2002; XUE et al., 2005; PAKFETRAT et al., 2009). Além disso, a associação de mais de uma

forma clínica da doença e a ocorrência de lesões em vários sítios foram encontradas na maioria dos casos deste estudo, estando de acordo com a literatura (THORN et al. 1988; XUE et al., 2005; PAKFETRAT et al., 2009; VAN DER WAAL, 2009).

Os pacientes com LPO e controles foram emparelhados por sexo e exibiram a mesma amplitude de faixa etária. A maioria dos pacientes da amostra encontrava-se na sexta década de vida. As doenças cardiovasculares e gastrointestinais foram as mais frequentes, mas não houve diferença entre os grupos quanto à presença dessas alterações. Gorsky et al. (1996) e Xue et al. (2005) também não encontraram associação entre diabetes e doenças cardiovasculares com o LPO. Monti et al. (2006) relataram que a hipertensão e o diabetes são as alterações sistêmicas mais frequentes em pacientes com LPO, entretanto, em sua investigação não foi incluído um grupo-controle para provar a veracidade de tal relação. A associação do LPO com alterações sistêmicas deve ser apontada de forma cuidadosa, uma vez que esta doença acomete preferencialmente indivíduos de meia-idade e, portanto, com maiores chances de relação ocasional com outras alterações sistêmicas. Quanto ao uso de medicamentos, os pacientes com LPO apresentaram frequência de uso significativamente maior de antiácidos do que os indivíduos-controle. Esse resultado foi um achado ocasional, não evidenciando nenhuma razão aparente para essa observação isolada.

Pacientes que utilizassem medicamentos anti-hipertensivos, diuréticos, hipoglicemiantes, anti-inflamatórios não esteroidais, antibióticos ou antimaláricos, que poderiam causar reações liquenóides, não foram excluídos da amostra, pois a listagem de fármacos supostamente passíveis de promover essas lesões é infundável e sua exclusão acarretaria na impossibilidade de realização do estudo. Ao serem selecionados, os pacientes eram questionados quanto ao tempo de uso de cada fármaco e tempo de evolução do LPO. Quando havia claramente uma relação de causa e efeito, o paciente era excluído da amostra.

A associação do vírus da hepatite C com o LPO tem sido relatada na literatura, mas os resultados são controversos. No presente estudo, investigação da infecção pelo HCV foi realizada em todos os pacientes com LPO e três indivíduos (9,6%) exibiram tal infecção, percentual superior ao encontrado na população em geral. Corroborando com tal achado, estão os resultados de Figueiredo et al. (2002), Yarom et al. (2007) e Grossmann et al. (2009), que encontraram prevalência superior de infecção por HCV nos pacientes com LPO. Estudos em diferentes países

como Itália (CARROZZO et al., 1996; MIGNOGNA et al., 1998), Espanha (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 1996; BAGÁN et al., 1998), Estados Unidos (BEAIRD et al., 2001) e Japão (TANEI; WATANABE; NISHIYAMA, 1995) confirmaram associação entre o HCV e o LPO. Sequências de HCV foram expressas em lesões biopsiadas de LPO sugerindo a possibilidade da sua participação na patogênese desta doença (ARRIETA et al., 2000; NAGAO et al., 2000; CARROZZO et al., 2002). Entretanto, ressalta-se que não estão definidos se mecanismos comuns estão envolvidos na patogênese destas duas entidades ou se esta associação é apenas coincidente. A pesquisa de anticorpos para esse vírus deveria ser realizada em todos os pacientes portadores de LPO.

Os pacientes que constituíram a amostra foram esclarecidos sobre o LPO e quanto à inexistência de um tratamento curativo. Essa doença pode reduzir a qualidade de vida dos indivíduos, principalmente nos casos que apresentam lesões atróficas, erosivas e bolhosas, que estão associadas à dor ou sensação de queimação. O tratamento do LPO é paliativo e visa o alívio da sintomatologia (SCULLY et al., 1998; DELAVARIAN et al., 2010). No presente estudo, dezessete pacientes com a doença apresentavam sintomas de dor e/ou queimação e, por isso, foram tratados com corticosteróides tópicos ou sistêmicos. Os pacientes que além dos sintomas físicos de queimação e dor apresentaram escores compatíveis com depressão, ansiedade ou estresse nos instrumentos empregados foram encaminhados para tratamento psicológico. Os indivíduos com LPO deste estudo continuam em acompanhamento periódico no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial do Hospital São Lucas da PUCRS.

A etiopatogenia do LPO é complexa e presumivelmente dependente da interação de fatores genéticos, ambientais, assim como do estilo de vida dos indivíduos. Nesse estudo não foi constatada associação significativa dos sintomas de depressão, ansiedade e estresse com o LPO, mas deve-se considerar que houve uma tendência à sua associação com ansiedade. No segmento da população mais suscetível ao desenvolvimento do LPO, a doença poderia ser iniciada ou agravada por eventos estressantes, os quais não causariam esta enfermidade no restante da população. Na amostra investigada, não houve diferença para as alterações psicológicas. Os esteróides analisados também não exibiram níveis distintos entre os pacientes com LPO e controles, não podendo, nestas condições, ser considerados biomarcadores salivares para essa doença.

Este foi o primeiro estudo a investigar os níveis salivares de DHEA em pacientes com LPO, pois esse esteróide parece estar relacionado com depressão e com a modulação da resposta imune. Nas condições deste estudo, os pacientes com LPO não exibiram níveis distintos desse esteróide, de cortisol, nem do *ratio* cortisol/DHEA, não suportando a interação psiconeuroendócrina sugerida para essa doença.

7 CONCLUSÕES

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

1. As concentrações salivares dos esteróides DHEA e cortisol não diferem entre pacientes portadores de LPO e controles, portanto, nas condições deste estudo, não podem ser empregadas como biomarcadores salivares associados a essa doença.
2. O *ratio* cortisol/DHEA não difere entre indivíduos com LPO e controles não podendo ser empregado como biomarcador para essa doença.
3. Os sintomas de depressão e estresse não diferem entre pacientes com LPO e controles. Na investigação da ansiedade, a diferença entre os grupos foi muito próxima a de um valor significativo, demonstrando uma tendência de associação dessa variável com o LPO.
4. Não há correlação entre as concentrações salivares de DHEA e cortisol com os escores de depressão, ansiedade e estresse em indivíduos com LPO.

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.

ALLEN, C. M. et al. Relation of stress and anxiety to oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v.61, n.1, p.44-6, Jan. 1986.

AMENÁBAR, J. M. et al. Anxiety and salivary cortisol levels in patients with burning mouth syndrome: a case-control study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.105, n.4, p.460-5, Apr. 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.

ANDREASEN, J. O. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.25, n.1, p.31-42, Jan. 1968.

ARISAWA, E. A. L. et al. Clinicopathological analysis of oral mucous autoimmune disease: A 27-year study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.13, n.2, p.94-7, Feb. 2008.

ARRIETA, J. J. Detection of hepatitis C virus replication by In situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus. **Hepatology**, Baltimore, v.32, n.1, p.97-103, July 2000.

BAGÁN, J. V. et al. Preliminary investigation of the association of oral lichen planus and hepatitis C. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.85, n.5, p.532-6, May 1998.

BAUM, A.; GRUNBERG, N. 1997. Measurement of stress hormones. In: COHEN, S.; KESSLER, R. C.; GORDON, L. U. **Measuring stress: a guide for health and social scientists**. New York: Oxford University Press, 1997. p.175-192.

BEAIRD, L. M. et al. Incidence of hepatitis C in lichen planus. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v.44, n.2, p.311-2, Feb. 2001.

BECK, A. T. et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. **J Consul Clin Psychol**, Washington, v.56, n.6, p.893-7, Dec. 1988.

BECK, A. T. et al. An inventory for measuring depression. **Arch Gen Psychiatry**, Chicago, v.4, p.561-71, June 1961.

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

BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G.; VERMES, I. Decreased levels of 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.

BERNARDES, V. de F. et al. Lesão liquenóide oral relacionada ao amálgama. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v.82, n.6, p.549-52, Nov./Dez. 2007.

BJERRUM, L. et al. Polypharmacy: correlations with sex, age and drug regimen. A prescription database study. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v.54, n.3, p.197-202, May 1998.

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.

BOYER, P. Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? **Acta Psychiatr Scand Suppl**, Copenhagen, v.102, n.406, p.24-9, Nov. 2000.

CARROZZO, M. et al. Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.25, n.10, p.527-33, Nov. 1996.

CARROZZO, M. et al. Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. **J Hepatol**, Amsterdam, v.37, n.3, p.364-9, Sept. 2002.

CASTRO, M.; MOREIRA, A. C. Diagnóstico Laboratorial da Síndrome de Cushing. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v.46, n.1, p.97-105, Fev. 2002.

CHANG, D. M. et al. Dehydroepiandrosterone suppresses interleukin 10 synthesis in women with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, London, v.63, n.12, p.1623-6, Dec. 2004.

CHAUDHARY, S. Psychosocial stressors in oral lichen planus. **Aust Dent J**, Sydney, v.49, n.4, p.192-5, Dec. 2004.

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

CHRISTENSEN, A. J. et al. Predictors of survival among hemodialysis patients: effect of perceived family support. **Health Psychol**, Hillsdale, v.13, n.6, p.521-5, Nov. 1994.

COBOS-FUENTES, M. J. et al. Oral lichenoid lesions related to contact with dental materials: a literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.14, n.10, p.514-20, Oct. 2009.

CUNHA, J. A. **Manual da versão em português das escalas Beck**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2001.

DELAVARIAN, Z. et al. The evaluation of psychiatric drug therapy on oral lichen planus patients with psychiatric disorders. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.15, n.2, p.322-7, Mar. 2010.

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

DITRICOVA, D. et al. Oral lichenoid lesions and allergy to dental materials. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, Prague, v.151, n.2, p.333-9, Dec. 2007.

DO PRADO, R. F.; MAROCCHIO, L. S.; FELIPINI, R. C. Oral lichen planus versus oral lichenoid reaction: difficulties in the diagnosis. **Indian J Dent Res**, Ahmedabad, v.20, n.3, p.361-4, July/Sept. 2009.

DORIA, A. et al. Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, Hagerstown, v.47, n.2, p.202-9, Apr. 2002.

DORREGO, M. V. et al. Oral lichen planus: immunohistology of mucosal lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.31, n.7, p.410-4, Aug. 2002.

EISEN, D. A clinical features, malignant potential and systemic association of oral lichen planus. A study of 723 patients. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v.46, n.2, p.207-14, Feb. 2002.

EL-TAWIL A. M. Is the DHEAS/cortisol ratio a potential filter for non-operable constipated cases? **World J Gastroenterol**, Beijing, v.16, n.6, p.659-62, Feb. 2010.

ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001.

FERNANDES, C. S. D. 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.

FERNÁNDEZ-TORRES, R. et al. Erupción liquenóide inducida por olanzapina. **Actas Dermosifiliogr**, Madrid, v.99, n.3, p. 221-4, Apr. 2008.

FIGUEIREDO, L. C. et al. Oral lichen planus and hepatitis C virus infection. **Oral Dis**, Copenhagen, v.8, n.1, p.42-6, Jan. 2002.

FOX, G. N.; HARRELL, C. C.; MEHREGAN, D. R. Extensive lichenoid drug eruption, due to glyburide: a case report and review of the literature. **Cutis**, Denville, v.76, n.1, p.41-5, July 2005.

GIBSON, E. L. et al. Increased salivary cortisol reliably induced by a protein-rich midday meal. **Psychosom Med**, Baltimore, v.61, n.2, p.214-24, Mar./Apr. 1999.

GONSALVES, W. C.; CHI, A. C.; NEVILLE, B. W. Common oral lesions: part I. Superficial mucosal lesions. **Am Fam Physician**, Kansas City, v.75, n.4, p.501-7. Feb. 2007.

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.

GORSKY, M. et al. Clinical characteristics and treatment of patients with oral lichen planus in Israel. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.82, n.6, p.644-9, Dec. 1996.

GROSSMANN, S. de M. et al. Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. **J Public Health Dent**, Raleigh, v.69, n.3, p.168-75, Summer 2009.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALEVY, S.; SHAI, A. Lichenoid drug eruptions. **J Am Acad Dermatol**, St. Louis, v.29, n.2, p.249-55, Aug.1993.

HAMPF, B. G. C. et al. Psychiatric disturbance in patients with oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.63, n.4, p.429-32, Apr. 1987.

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.

HEIM, C. et al. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. **Am J Psychiatry**, Hanover, v.158, n.4, p.575-81, Apr. 2001.

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

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev**, Baltimore, v.17, n.20, p.187-205. Apr. 1996.

INGAFOU, M. et al. No evidence of HCV infection or liver disease in British patients with oral lichen planus. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v.27, n.1, p.65-6, Feb. 1998.

ISSA, Y. et al. Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. **Br Dent J**, London, v.198, n.6, p.361-6, Mar. 2005.

IVANOVSKI, K. et al. Psychological profile in oral lichen planus. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.32, n.10, p.1034-40, Oct. 2005.

JEKEL, J. F.; KATZ, D. L.; ELMORE, J. G. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed S.A., 2005.

JONES, D. A.; ROLLMAN, G. B.; BROOKE, R. I. The cortisol response to psychological stress in temporomandibular dysfunction. **Pain**, Amsterdam, v.72, n.1-2, p.171-82, Aug. 1997.

KAMINSKA, M. et al. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) counteracts decremental effects of corticosterone on dentate gyrus LTP. Implications for depression. **Brain Res Bull**, Phoenix, v.52, n.3, p.229-34, June 2000.

KANEGANE, K. et al. Dental anxiety and salivary cortisol levels before urgent dental care. **J Oral Sci**, Tokyo, v.51, n.4, p.515-20, Dec. 2009.

KARKOW, F. J. et al. Subjective versus objective stress in noncritically ill hospitalized and outpatient adult men. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, São Paulo, v.59, n.4, p.161-7, Aug. 2004.

KIBALY, C. et al. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. **FASEB J**, Bethesda Md, v.22, n.1, p.93-104, Jan. 2008.

KIMMEL, P. L. et al. Dyadic relationship conflict, gender, and mortality in urban hemodialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, Baltimore, v.11, n.8, p.1518-25, Aug. 2000.

KING, J. A. et al. Sequence and seasonal effects of salivary cortisol. **Behav Med**, Washington, v.26, n.2, p.67-73, Summer 2000.

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.; HELLHAMMER, D. H. **Encyclopedia of stress**. San Diego, California: Academic Press, 2000.

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.

KRAGELUND, C. et al. Oral lichen planus and intake of drugs metabolized by polymorphic cytochrome P450 enzymes. **Oral Dis**, Copenhagen, v.9, n.4, p.177-87. July 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.

LARSEN, P. et al. **Williams textbook of endocrinology**. 10th. ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 2003.

LEDOCHOWSKI, M. et al. Dehydroepiandrosterone, ageing and immune activation. **Exp Gerontol**, Oxford, v.36, n.10, p.1739-47, Nov. 2001.

LERESCHE, L.; DWORKIN, S. F. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v.30, n.1, p.91-103, Oct. 2002.

LIND, P. O. Oral lichenoid reactions related to composite restorations. Preliminary report. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v.46, n.1, p.63-5, Feb. 1988.

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

LIU, W. et al. IFN-Gamma and IL-4 in Saliva of Patients with Oral Lichen Planus: A Study in an Ethnic Chinese Population. **Inflammation**, New York, v.32, n.3, p.176-81, June 2009.

LOUREIRO, C. C. S. et al. Efeitos adversos de medicamentos tópicos e sistêmicos na mucosa bucal. **Rev Bras Otorrinolaringol**, São Paulo, v.70, n.1, p.106-11, Jan./Fev. 2004.

LUNDQVIST, E. N. et al. Psychological health in patients with genital and oral erosive lichen planus. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.20, n.6, p.661-6, July 2006.

MACLEOD, R. I. Psychological factors in oral lichen planus. **Br Dent J**, London, v.173, n.3, p.88, Aug. 1992.

MANOLACHE, L.; SECELEANU-PETRESCU, D.; BENEVA, V. Lichen planus patients and stressful events. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Amsterdam, v.22, n.4, p. 437-41, Apr. 2008.

MARKOWSKI, M. et al. Memory-enhancing effects of DHEAS in aged mice on a win-shift water escape task. **Physiol Behav**, Oxford, v.72, n.4, p.521-5, Mar. 2001.

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. Psychological factors associated with oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.24, n.6, p.273-5, July 1995.

McCARTAN, B. E.; HEALY, C. M. The reported prevalence of oral lichen planus: a review and critique. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.37, n.8, p.447-53, Sept. 2008.

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.357-9, Aug. 1996.

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.

MICHELE, G. et al. Hepatitis C virus chronic infection and oral lichen planus: an Italian case-control study. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, London, v.19, n.8, p.647-52, Aug. 2007.

MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. As glândulas adrenais. In: AIRES, M de M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MIGNOGNA, M. D. et al. Oral lichen planus and HCV infection: a clinical evaluation of 263 cases. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v.37, n.8, p. 575-8, Aug. 1998.

MOLLAOGLU, N. Oral lichen planus: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, London, v.38, n.4, p.370-7, Aug. 2000.

MONTI, L. M. et al. Avaliação da condição psicológica e de saúde de pacientes portadores de líquen plano. **Rev Odontol Araçatuba**, Araçatuba, v.27, n.2, p.123-8, Jul./Dez. 2006.

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.

NAGAO, Y. et al. Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29, n.6, p.259-66, July 2000.

NEWMAN, A. E.; PRADHAN, D. S.; SOMA, K. K. Dehydroepiandrosterone and corticosterone are regulated by season and acute stress in a wild songbird: jugular versus brachial plasma. **Endocrinology**, Springfield, v.149, n.5, p.2537-45, May 2010.

NIESCHLAG, E. et al. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. **J Endocrinol**, Bristol, v.57, n.1, p.123-34, Apr. 1973.

ORENTREICH, N. et al. Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.75, n.4, p.1002-4, Oct. 1992.

PAKFETRAT, A. et al. Oral lichen planus: A retrospective study of 420 Iranian patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.14, n.7, p.315-8, July 2009.

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

PILLEMER, S. R. et al. Pilot clinical Trial of dehydroepiandrosterone (DHEA) versus placebo for Sjögren's syndrome. **Arthritis Rheum**, Atlanta, v.51, n.4, p.601-4, Aug. 2004.

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.

PROLO, P. et al. Psychoneuroimmunology in oral biology and medicine: the model of oral lichen planus. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.966, p.429-40, June 2002.

PUA, V. S.; SCOLYER, R. A.; BARNETSON, R. S. Pravastatin-induced lichenoid drug eruption. **Australas J Dermatol**, Sydney, v.47, n.1, p.57-9, Feb. 2006.

RAFF H. Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's syndrome and adrenal insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v.94, n.10, p.3647-55, Oct. 2009.

RÖDSTRÖM, P. O. et al. Erosive oral lichen planus and salivary cortisol. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.30, n.5, p.257-63, May 2001.

ROJO-MORENO, J. L. et al. Psychologic factors and oral lichen planus: a psychometric evaluation of 100 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.86, n.6, p.687-91, Dec. 1998.

SÁNCHEZ-PÉREZ, J. et al. Lichen planus and hepatitis C virus: prevalence and clinical presentation of patients with lichen planus and hepatitis C virus infection. **Br J Dermatol**, Oxford, v.134, n.4, p.715-9, Apr. 1996.

SCARDINA, G. A. et al. Angiogenesis of Oral Lichen Planus: A possible pathogenetic mechanism. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.14, n.11, p.558-62, Nov. 2009.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their analogues; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: HARDMAN, J. G.; LIMBERG, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

SCULLY, C.; CARROZZO, M. Oral mucosal disease: Lichen planus. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v.46, n.1, p.15-21, Jan. 2008.

SCULLY, C. et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.9, n.1, p.86-122. 1998.

SEGURA-EGEA, J. J.; BULLÓN-FERNÁNDEZ, P. Lichenoid reaction associated to amalgam restoration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.9, n.5, p.423-4, Nov./Dec. 2004.

SELANDER, J. et al. Saliva cortisol and exposure to aircraft noise in six European countries. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, N.C., v.117, n.11, p.1713-7, Nov. 2009.

SEOANE, J. et al. Oral lichen planus: a clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.15, n.1, p.9-12. 2004.

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/Sept. 2009.

SOUSA, F. A. C. G. de; ROSA, L. E. B. Perfil epidemiológico dos casos de líquen plano oral pertencentes aos arquivos da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. **Cienc Odontol Bras**, São Paulo, v.8, n.4, p.96-100, Out./Dez. 2005.

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.

SUGERMAN, P. B. et al. The pathogenesis of oral lichen planus. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v.13, n.4, p.350-65. 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.

TANEI, R.; WATANABE, K.; NISHIYAMA, S. Clinical and histopathologic analysis of the relationship between lichen planus and chronic hepatitis C. **J Dermatol**, Tokyo, v.22, n.5, p.316-23, May 1995.

THORN, J. J. et al. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.17, n.5, p.213-8, May 1988.

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

TRILCK, M. et al. Salivary cortisol measurement--a reliable method for the diagnosis of Cushing's syndrome. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, Heidelberg, v.113, n.4, p.225-30, Apr. 2005.

VALLEJO, M. J. G. P. et al. Anxiety and depression as risk factors for oral lichen planus. **Dermatology**, Switzerland, v.203, n.4, p.303-7. 2001.

VALLEJO, M. J. G. P.; ZARABOZO, G. H. Anxiety as an etiologic factor in oral lichen planus (OLP). **Med Oral**, Madrid, v. 5, n.1, p.7-13, Jan./Feb. 2000.

VAN DER WAAL, I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.14, n.7, p.310-4, July 2009.

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

VENTURINI, D. et al. Fatores psicogênicos associados ao líquen plano bucal:revisão da literatura. **Rev Odont Ciênc**, Porto Alegre, v.21, n.52, p.191-98, Abr./Jun. 2006.

VILAR, L. **Endocrinologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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.

WALSH, L. J. et al. Immunopathogenesis of oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.19, n.9, p.389-96, Oct. 1990.

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.905-11, Oct. 2001.

WOLF, O. T.; KIRSCHBAUM, C. Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animal and humans. **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.

WONG, L.; FREEMAN, S. Oral lichenoid lesions (OLL) and mercury in amalgam fillings. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.48, n.2, p.74-9, Feb. 2003.

XUE, J. L. et al. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.34, n.8, p.467-72, Sept. 2005.

YAROM, N. et al. Association between hepatitis C virus infection and oral lichen planus in Israeli patients. **Isr Med Assoc J**, Ramat Gan, v.9, n.5, p.370-2, May 2007.

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.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - grupo de pacientes portadores de líquen plano oral

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO DE PACIENTES COM LIQUEN PLANO ORAL

Título da pesquisa: “Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, escores de depressão, ansiedade e stress em pacientes com líquen plano oral”.

I. Justificativa e objetivos da pesquisa:

O líquen plano é uma doença que afeta a mucosa e a pele, muito comum na mucosa oral. As lesões orais podem apresentar-se de diferentes formas clínicas e em muitos casos provocam ardência e dor.

O mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões ainda permanece desconhecido. Com o intuito de identificar possíveis fatores de risco para a doença, esta pesquisa apresenta como objetivos:

- verificar se existe diminuição da concentração do hormônio DHEA e aumento da concentração do cortisol na saliva de pacientes com líquen plano oral.
- conhecer a relação entre a depressão, a ansiedade e o stress e a manifestação do líquen plano oral.

II. Procedimentos a serem realizados:

- Os participantes responderão a questionários com perguntas sobre depressão, ansiedade e stress.
- Exame da boca e coleta de saliva para análise dos níveis de DHEA e de cortisol. Serão fornecidos frascos para os pacientes e a coleta de saliva será realizada pelos mesmos, nas suas casas, nos seguintes horários: entre 8:00 e 10:00 da manhã (antes do café da manhã) e entre 19:00 e 21:00 (antes do jantar). Armazenar os frascos no congelador ou no freezer até serem recolhidos pelo pesquisador. Sendo assim os participantes não terão custo de deslocamento.
- Serão solicitados exames laboratoriais incluindo hemograma, glicemia, dosagens de ácido fólico, de ferro, de vitamina B12, fator anti-nuclear (FAN), anti-DNA, anti-HCV, concentrações séricas de cortisol e de DHEA. Para a realização destes exames, os participantes não terão custo.

III. Riscos ou desconfortos esperados:

- É importante ressaltar que não existem riscos aos pacientes, pois trata-se do preenchimento de questionários, exame da boca, exame de sangue e coleta de saliva.
- Os telefones do Serviço de Estomatologia, assim como, das pesquisadoras Fernanda Gonçalves Salum e Carla Girardi serão fornecidos aos participantes para que possam entrar em contato se algum imprevisto ocorrer, não importando dia e horário.
- O único desconforto é que, caso seja necessária alguma medicação para tratamento da sintomatologia do líquen plano erosivo, esta deverá ser iniciada logo após a coleta da saliva, ou seja, no dia seguinte ao do exame físico e preenchimento dos questionários.

IV. Benefícios que se pode obter:

- Somente no final desta pesquisa se poderá concluir a presença de benefícios para os indivíduos portadores de líquen plano oral e/ou com distúrbios psicológicos.
- Caso exista correlação entre as concentrações salivares de DHEA e de cortisol com os escores de depressão, ansiedade e stress em pacientes com líquen plano oral haverá uma abordagem multidisciplinar no tratamento desta enfermidade, envolvendo principalmente a estomatologia e a psicologia.

- No término, cada indivíduo receberá um laudo contendo as concentrações salivares dos hormônios (DHEA e cortisol) e o resultado dos questionários aplicados para depressão, ansiedade e stress.

V. Garantia de resposta a qualquer pergunta e compromisso com informação atualizada da pesquisa:

- Será concedido a todos os participantes, o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos ou outros assuntos relacionados com a pesquisa.
- Compromisso dos pesquisadores de fornecer informação atualizada aos participantes.

VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

- Todos os participantes terão a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento e acompanhamento no Serviço de Estomatologia.

VII. Garantia de privacidade:

- Os participantes não serão identificados. O caráter confidencial das informações relacionadas a cada indivíduo será mantido.
- Será dada garantia que todo o material coletado e as informações fornecidas serão confidenciais e, somente serão utilizados nesta pesquisa, em aulas expositivas, na apresentação de trabalhos em eventos científicos e na publicação de artigos em revistas científicas, sendo que o nome do participante, nunca aparecerá.

VIII. Disponibilidade de tratamento médico e indenização em casos de danos:

- Nos casos em que existirem danos à saúde, causados diretamente por esta pesquisa, os participantes receberão tratamento médico e indenização conforme a lei.

IX. Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa:

- Os participantes não terão qualquer custo referente à sua participação nesta pesquisa.
- Nos casos em que existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

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

Qualquer dúvida em relação ao estudo ou se você não quiser mais fazer parte do trabalho, pode entrar em contato com as pesquisadoras Fernanda Gonçalves Salum pelo telefone (51) 81829945, Carla Girardi pelo telefone (51) 81880115 e (51) 37791411 ou ainda, com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no (51) 33203345.

Consentimento Pós-Informação

Eu _____ fui esclarecido sobre a pesquisa:
“Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, escores de ansiedade, depressão e stress em pacientes com líquen plano oral” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2008.

Assinatura: _____

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

Título da pesquisa: “Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, escores de depressão, ansiedade e stress em pacientes com líquen plano oral”.

I. Justificativa e objetivos da pesquisa:

O líquen plano é uma doença que afeta a mucosa e a pele, muito comum na mucosa oral. As lesões orais podem apresentar-se de diferentes formas clínicas e em muitos casos provocam ardência e dor.

O mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das lesões ainda permanece desconhecido. Com o intuito de identificar possíveis fatores de risco para a doença, esta pesquisa apresenta como objetivos:

- verificar se existe diminuição da concentração do hormônio DHEA e aumento da concentração do cortisol na saliva de pacientes com líquen plano oral.
- conhecer a relação entre a depressão, a ansiedade e o stress e a manifestação do líquen plano oral.

Como o Sr.(a) não apresenta lesões na mucosa oral que comprometam os resultados deste estudo, sua participação no grupo de pacientes-controle, ou seja, sem o líquen plano oral é de suma importância para que se possa comparar os resultados dos pacientes que apresentam esta doença com os de pacientes saudáveis.

II. Procedimentos a serem realizados:

- Os participantes responderão a questionários com perguntas sobre depressão, ansiedade e stress.
- Exame da boca e coleta de saliva para análise dos níveis de DHEA e de cortisol. Serão fornecidos frascos para os pacientes e a coleta de saliva será realizada pelos mesmos, nas suas casas, nos seguintes horários: entre 8:00 e 10:00 da manhã (antes do café da manhã) e entre 19:00 e 21:00 (antes do jantar). Armazenar os frascos no congelador ou no freezer até serem recolhidos pelo pesquisador. Sendo assim os participantes não terão custo de deslocamento.
- Serão solicitados exames laboratoriais incluindo hemograma, glicemia, dosagens de ácido fólico, de ferro, de vitamina B12, fator anti-nuclear (FAN), anti-DNA, anti-HCV, concentrações séricas de cortisol e de DHEA. Para a realização destes exames, os participantes não terão custo.

III. Desconfortos ou riscos esperados:

- É importante ressaltar que não existem riscos, pois trata-se do preenchimento de questionários, exame da boca, exame de sangue e coleta de saliva.
- Os telefones do Serviço de Estomatologia, assim como, das pesquisadoras Fernanda Gonçalves Salum e Carla Girardi serão fornecidos aos participantes para que possam entrar em contato se algum imprevisto ocorrer, não importando dia e horário.

IV. Benefícios que se pode obter:

- No término, cada indivíduo receberá um laudo contendo as concentrações salivares dos hormônios (DHEA e cortisol) e o resultado dos questionários aplicados para depressão, ansiedade e stress.

V. Garantia de resposta a qualquer pergunta e compromisso com informação atualizada da pesquisa:

- Será concedido a todos os participantes, o direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos ou outros assuntos relacionados com a pesquisa.
- Compromisso dos pesquisadores de fornecer informação atualizada aos participantes.

VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

- Todos os participantes terão a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e deixar de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento e acompanhamento no Serviço de Estomatologia.

VII. Garantia de privacidade:

- Os participantes não serão identificados. O caráter confidencial das informações relacionadas a cada indivíduo será mantido.
- Será dada garantia que todo o material coletado e as informações fornecidas serão confidenciais e, somente serão utilizados nesta pesquisa, em aulas expositivas, na apresentação de trabalhos em eventos científicos e na publicação de artigos em revistas científicas, sendo que o nome do participante, nunca aparecerá.

VIII. Disponibilidade de tratamento médico e indenização em casos de danos:

- Nos casos em que existirem danos à saúde, causados diretamente por esta pesquisa, os participantes receberão tratamento médico e indenização conforme a lei.

IX. Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa:

- Os participantes não terão qualquer custo referente à sua participação nesta pesquisa.
- Nos casos em que existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

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

Qualquer dúvida em relação ao estudo ou se você não quiser mais fazer parte do trabalho, pode entrar em contato com as pesquisadoras Fernanda Gonçalves Salum pelo telefone (51) 81829945, Carla Girardi pelo telefone (51) 81880115 e (51) 37791411 ou ainda, com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no (51) 33203345.

Consentimento Pós-Infomação

Eu _____ fui esclarecido sobre a pesquisa:
“Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, escores de ansiedade, depressão e stress em pacientes com líquen plano oral” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2008.

Assinatura: _____

APÊNDICE C - Ficha de coleta de dados

FICHA nº: _____ Data: __/__/____

Paciente: ()Grupo-caso ()Grupo-controle

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome:.....
 Endereço:.....
 Bairro:..... Cidade:..... CEP:.....
 Telefone residencial:..... Celular:.....
 Sexo: ()Masculino ()Feminino
 Data de nascimento:..... Idade:.....anos
 Nº do registro no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucomaxilofacial
 do Hospital São Lucas da PUCRS.....

QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO:

Etnia: ()Branca ()Negra ()Amarela Outra:.....
 Estado Civil:.....
 Profissão:.....

ANAMNESE:

Apresenta algum problema de saúde: ()Sim ()Não
 Qual.....
 Está tomando algum medicamento: ()Sim ()Não
 Qual

PACIENTES DO GRUPO-CASO:

Há quanto tempo apresenta as lesões.....
 Presença de sintomatologia: ()Sim ()Não
 Qual.....
 Apresenta os sintomas todos os dias: ()Sim ()Não
 Fez algum tratamento para essas lesões: ()Sim ()Não
 Qual.....

EXAME FÍSICO:

Forma clínica das lesões.....
 Localização das lesões.....
 Presença de prótese: ()Sim ()Não
 Total: ()Superior ()Inferior Parcial: ()Superior ()Inferior
 Presença de outras lesões na mucosa oral.....

EXAMES HEMATOLÓGICOS:

Eritrócitos (3,9 a 5,9 milhões)	
Hematocrito (36 a 56%)	
Hemoglobina M: 12-16 H: 14-18	
VCM (80-96)	
CHCM (32,5 a 36)	
HCM (27 a 31)	
RDW (12 a 15)	
VSG	
Leucócitos (3.600 a 11.000)	
Neutrófilos segmentados (3.000 a 6.000)	
Neutrófilos bastonados (100 a 600)	
Plasmócitos	
Basófilos	
Eosinófilos	
Monócitos	
Linfócitos	
Plaquetas (150.000 a 400.000)	
Glicose (70 a 110 mg/dL)	
Ácido fólico (>3)	
Ferro (50 a 170 ug/dL)	
Vitamina B12 (225 a 1000)	
Fator anti-nuclear	
Anti-DNA	
Anti-HCV	
Cortisol sérico	
DHEA sérico	

INSTRUMENTOS:

Depressão (BDI).....
Ansiedade (BAI).....
Estresse (ISSL).....

CONCENTRAÇÕES SALIVARES:

DHEA.....
Cortisol.....

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 03 de setembro de 2007

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0031/07

Intitulado: Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de cortisol, escores de depressão, ansiedade e stress em pacientes com líquen plano oral

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Salum

Pesquisadores Associados: Carla Girardi; Clarice Luz

Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *31 de agosto de 2007*.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS



Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
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)
da PUCRS



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

Ofício 048/08-CEP

Porto Alegre, 08 de janeiro de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03931, intitulado:
**“Análise das concentrações salivares de desidroepiandrosterona (DHEA) e de
cortisol, escores de depressão, ansiedade e stress em pacientes com líquen
plano oral”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente
data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
entregues a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Fernanda Gonçalves Salum
N/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 Depressão de Beck (BDI)



Data: _____

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

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome o cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.**

<p>1 0 Não me sinto triste. 1 Eu me sinto triste. 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto. 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.</p> <p>2 0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro. 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro. 2 Acho que nada tenho a esperar. 3 Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.</p> <p>3 0 Não me sinto um fracasso. 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum. 2 Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos. 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.</p> <p>4 0 Tenho tanto prazer em tudo como antes. 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes. 2 Não encontro um prazer real em mais nada. 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.</p> <p>5 0 Não me sinto especialmente culpado. 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo. 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo. 3 Eu me sinto sempre culpado.</p> <p>6 0 Não acho que esteja sendo punido. 1 Acho que posso ser punido. 2 Creio que vou ser punido. 3 Acho que estou sendo punido.</p> <p>7 0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo. 1 Estou decepcionado comigo mesmo. 2 Estou enojado de mim. 3 Eu me odeio.</p>	<p>8 0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros. 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros. 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas. 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece.</p> <p>9 0 Não tenho quaisquer idéias de me matar. 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria. 2 Gostaria de me matar. 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade.</p> <p>10 0 Não choro mais que o habitual. 1 Choro mais agora do que costumava. 2 Agora, choro o tempo todo. 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queira.</p> <p>11 0 Não sou mais irritado agora do que já fui. 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava. 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo. 3 Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar.</p> <p>12 0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas. 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar. 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas. 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas.</p> <p>13 0 Tomo decisões tão bem quanto antes. 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava. 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes. 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões.</p>
---	---

Subtotal da Página 1 **CONTINUAÇÃO NO VERSO**

"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.
BDI é um logotipo da Psychological Corporation.

<p>14 0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes.</p> <p>1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo.</p> <p>2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo.</p> <p>3 Acredito que pareço feio.</p> <p>15 0 Posso trabalhar tão bem quanto antes.</p> <p>1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa.</p> <p>2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa.</p> <p>3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho.</p> <p>16 0 Consigo dormir tão bem como o habitual.</p> <p>1 Não durmo tão bem como costumava.</p> <p>2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir.</p> <p>3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir.</p> <p>17 0 Não fico mais cansado do que o habitual.</p> <p>1 Fico cansado mais facilmente do que costumava.</p> <p>2 Fico cansado em fazer qualquer coisa.</p> <p>3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.</p> <p>18 0 O meu apetite não está pior do que o habitual.</p> <p>1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser.</p> <p>2 Meu apetite é muito pior agora.</p> <p>3 Absolutamente não tenho mais apetite.</p>	<p>19 0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente.</p> <p>1 Perdi mais do que 2 quilos e meio.</p> <p>2 Perdi mais do que 5 quilos.</p> <p>3 Perdi mais do que 7 quilos.</p> <p>Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim _____ Não _____</p> <p>20 0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual.</p> <p>1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação.</p> <p>2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa.</p> <p>3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.</p> <p>21 0 Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo.</p> <p>1 Estou menos interessado por sexo do que costumava.</p> <p>2 Estou muito menos interessado por sexo agora.</p> <p>3 Perdi completamente o interesse por sexo.</p>
---	---

_____ Subtotal da Página 2

_____ Subtotal da Página 1

_____ Escore Total.

ANEXO D - 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 0	Levemente Não me incomodou muito 1	Moderadamente Foi muito desagradável mas pude suportar 2	Gravemente Difícilmente pude suportar 3
1. Dormência ou formigamento.				
2. Sensação de calor.				
3. Tremores 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 logotipo da Psychological Corporation.

ANEXO E - Inventário de Sintomas de *Stress* para Adultos de LIPP (ISSL)

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

Marilda Emmanuel Novaes Lipp

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Local de Nascimento _____/____/____
dia mês ano Cidade Estado País

Idade: _____ Sexo: M() F() Escolaridade: _____

RG: _____ CPF: _____

Curso/Série: _____ Escola/Instituição: _____ Públ. () Priv. ()

Lateralidade: Destro () Sinistro () Ambidestro () Profissão: _____

Função: _____ Data da Aplicação: ____/____/____
dia mês ano

Aplicador: _____ Início: _____ Término: _____

Autorizo uso sigiloso em pesquisa: _____

assinatura

C D R O
P I A A

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.



Casa do Psicólogo®

© 2005 Casa do Psicólogo®. Reservados os direitos de publicação em língua portuguesa à Casa do Psicólogo®, Rua Mourato Coelho, 1.059 - 05417-011 - São Paulo - SP - Tel./Fax: (11) 3034-3600, e-mail: testes@casadopsicologo.com.br - <http://www.casadopsicologo.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
(Muito suor, suadeira)
- () 5. TENSÃO MUSCULAR
- () 6. APERTO DA MANDÍBULA/
RANGER OS DENTES
- () 7. DIARRÉIA PASSAGEIRA
- () 8. INSÔNIA
(Dificuldade para dormir)
- () 9. TAQUICARDIA
(Batedeira no peito)
- () 10. HIPERVENTILAÇÃO
(Respirar ofegante, rápido)
- () 11. HIPERTENSÃO ARTERIAL
SÚBITA E PASSAGEIRA
(Pressão alta)
- () 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 (Problemas de pele)
- () 7. HIPERTENSÃO ARTERIAL (Pressão alta)
- () 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 (Estar muito nervoso)
- () 12. DÚVIDA QUANTO A SI PRÓPRIO
- () 13. PENSAR CONSTANTEMENTE EM UM SÓ ASSUNTO
- () 14. IRRITABILIDADE EXCESSIVA
- () 15. DIMINUIÇÃO DA LIBIDO (Sem vontade de sexo)

QUADRO 3a

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

- () 1. DIARRÉIA FREQUENTE
 () 2. DIFICULDADES SEXUAIS
 () 3. INSÔNIA
 (Dificuldade para dormir)
 () 4. NÁUSEA
 () 5. TIQUES
 () 6. HIPERTENSÃO ARTERIAL CONTINUADA
 (Pressão alta)
 () 7. PROBLEMAS DERMATOLÓGICOS PROLONGADOS
 (Problemas de pele)
 () 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. SENSAÇÃO 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

ANÁLISE

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

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

Quartos	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
Livreria e Editora

© 2000 Casa do Psicólogo[®] Livreria e Editora Ltda. Reservados os direitos de publicação em língua portuguesa a Casa do Psicólogo[®] Livreria e Editora Ltda. Rua Alves Guimarães, 456 - 05410-000 - São Paulo - SP - Tel: (11) 3067-4033, 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 I		Parte I		Fase 4	
Alerta	Resistência	Exaustão			
Resultado Bruto	Porcentagem	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
		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 F – Bula do kit da DHEA

ENGLISH

DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) RIA

DSL-8900



Diagnostic Systems Laboratories, Inc.
Corporate Headquarters, 445 Medical Center Blvd.
Webster, Texas 77598-4217 USA
General Business: Tel: 281.332.9678
Customer Assistance Center: Tel: 800.231.7970 Fax: 281.338.1895
e-mail: info@dslabs.com
Website: <http://www.dslabs.com>



OBI-DSL
Cherwell Innovation Centre
Upper Heyford
Oxon OX25 5HD UK
Tel: 018.6923.8077
Fax 018.6923.8078
Email: Info-uk@DSLabs.com

Revision date: April 4, 2005

This Package Insert (IFU) is intended for Professional Use and must be read completely before product use.

I. INTENDED USE

The DSL-8900 DHEA Radioimmunoassay Kit provides materials for the quantitative measurement of dehydroepiandrosterone in serum or plasma. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

II. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Dehydroepiandrosterone (DHEA; androstenedione; 3 β -hydroxy-5-androsten-17-one) is a C₁₉ steroid produced in the adrenal cortex and, to a lesser extent, gonads [1-3]. DHEA serves as a precursor in testosterone and estrogen synthesis. Due to the presence of a 17-oxo (rather than hydroxyl) group, DHEA has relatively weak androgenic activity, which has been estimated at ~10% that of testosterone [1]. However in neonates, peripubertal children and in adult women, circulating DHEA levels may be several-fold higher than testosterone concentrations, and rapid peripheral tissue conversion to more potent androgens (androstenedione and testosterone) and estrogens may occur. Moreover, DHEA has relatively low affinity for sex-hormone binding globulin. These factors may enhance the physiologic biopotency of DHEA. The physiologic role of DHEA has not been conclusively defined [4,5]. A variety of *in vitro* effects, including antiproliferative effects in different cell lines and effects on enzyme-mediated cell metabolism, have been reported. *In vivo* studies suggest that DHEA may affect cholesterol and lipid metabolism, insulin sensitivity and secretion and immune function. Abnormal DHEA levels have been reported in schizophrenia [6] and obesity [7]. Therapeutic administration of DHEA has been proposed for several conditions, including obesity and cardiovascular disease [4,5]. Serum DHEA levels are relatively high in the fetus and neonate, low during childhood, and increase during puberty [8,9]. Increased levels of DHEA during adrenarche may contribute to the development of secondary sexual hair. Serum DHEA levels progressively decline after the third decade of life [4,10,11]. No consistent changes in serum DHEA levels occur during the menstrual cycle or pregnancy; however, parity may lower serum DHEA levels in premenopausal women [12]. DHEA has a rapid metabolic clearance rate as compared to its sulfated conjugate, DHEA-S. Because of this, serum DHEA levels are 100-1000 fold lower than DHEA-S levels. In addition, serum DHEA levels show significant diurnal variation which is dependent on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [4,10]. Serum DHEA levels increase in response to exogenous ACTH administration [7]. Measurement of serum DHEA is a useful marker of adrenal androgen synthesis. Abnormally low levels may occur in hypoadrenalism, and elevated levels occur in several conditions; including virilizing adrenal adenoma and carcinoma [13], 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiencies and in some cases of female hirsutism [3]. Since very little DHEA is produced by the gonads, measurement of DHEA levels may aid in the localization of androgen source in virilizing conditions. The DSL DHEA radioimmunoassay uses a sensitive and specific antibody with low cross-reactivity to other physiologic compounds, including DHEA-S. Unlike other methods for DHEA measurement, the DSL-8900 DHEA RIA does not require prior sample extraction.

III. PRINCIPLE OF THE TEST

The procedure follows the basic principle of radioimmunoassay where there is competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites [14]. The amount of [¹²⁵I]-labeled DHEA bound to the antibody is inversely proportional to the concentration of the unlabeled DHEA present. The separation of free and bound antigen is easily and rapidly achieved using a double antibody system.

IV. REAGENTS SUPPLIED

The DSL-8900 DHEA RIA Kit contains sufficient reagents for 100 tubes. Each kit contains the following reagents:

A. DHEA Standards:

One vial, 2 mL, labeled A, containing 0 ng/mL and five vials, 1 mL each, labeled B-F, containing concentrations of approximately 0.2, 1.0, 2.5, 10 and 30 ng/mL (0.7-103.8 nmol/L) DHEA (synthetic) in a protein-based (BSA) buffer with sodium azide as a preservative. Refer to vial labels for exact concentrations. Store unopened at 2-8° C until expiration. For longer periods, store at -20°C or lower until expiration date.

STANDARDIZATION NOTE: Due to the lack of universally accepted reference material, the reference preparation of DHEA Standards & Controls was obtained from Steraloids, Inc., USA, purified by HPLC, purity verified (single spot) by Thin Layer Chromatography and performance verified by immunoassay.

B. DHEA [1-125] Reagent: (RED)

One bottle, 55 mL, containing <5 µCi (185 kBq) of [1-125]-labeled DHEA in a protein-based (BSA) buffer with sodium azide as a preservative. Store at 2-8°C until expiration date.

C. DHEA Antiserum: (BLUE)

One vial, 11 mL, containing rabbit anti-DHEA serum in a protein-based buffer (BSA) with sodium azide as a preservative. Store at 2-8°C until expiration date.

D. Precipitating Reagent:

One bottle, 100 mL, containing goat anti-rabbit gamma globulin serum in a buffer with polyethylene glycol as a precipitating aid and sodium azide as a preservative. Store at 2-8°C until expiration date.

E. DHEA Controls:

Two vials, 1 mL each, containing low and high levels of DHEA in a protein-based (BSA) buffer with sodium azide as a preservative. Store unopened at 2-8° C until expiration. For longer periods, store at -20°C or lower until expiration date.

NOTE: All reagents and samples must be allowed to reach room temperature (~25 °C) and mixed thoroughly by gentle inversion before use.

V. PRECAUTIONS

For *in vitro* use only. Not for Internal or External Use in Humans or Animals

CAUTION: RADIOACTIVE MATERIAL

Refer to the radiation regulations, standards, and procedures applicable to your facility for handling, storage, and disposal of radioactive materials. For United States Customers: This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians, clinical laboratories, research institutions, or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or its radiation to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and a general license of the NRC or of a state with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority. To minimize the risk of radiation exposure, handle radioactive materials as recommended by appropriate regulatory standards and in "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," 1999, published by the International Atomic Energy Agency. The following universal Good Laboratory Practices should be observed:

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic materials are being handled.
- Do not pipet by mouth.
- Wear lab coats and disposable gloves when handling immunodiagnostic materials.
- Wash hands thoroughly afterwards.
- Cover working area with disposable absorbent paper.
- Wipe up all spills immediately and decontaminate affected surfaces.
- Avoid generation of aerosols.
- Provide adequate ventilation.
- Handle and dispose of reagents and materials in compliance with applicable regulations.

WARNING: POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

This kit may contain some reagents made with human source material (e.g. serum or plasma) or used in conjunction with human source materials. The material in this kit has been tested by FDA recommended methods and found to be non-reactive for HIV-1/2 Antibodies, HCV and HBsAg. No available test method can offer complete assurance of eliminating potential biohazardous risk. Handle all reagents and patient samples at a Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th Edition, April 1999.

WARNING: POTENTIAL CHEMICAL HAZARD

Some of the reagents in this kit contain sodium azide as a preservative at concentrations below the regulatory limit of < 0.1%. Although significantly diluted, concentrated sodium azide is an irritant to skin and mucous membranes and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides, especially if accumulated. This substance is in diluted form, and therefore, may minimize exposure risks significantly but not completely. Avoid contact with skin, eyes, and clothing. In case of contact with any reagents, wash area thoroughly with water and seek medical advice. Dispose of all nonradioactive and nonhazardous reagents by flushing with large amounts of water to prevent buildup of chemical hazards in the plumbing system. For further information regarding hazardous substances in the kit, please refer to the component specific MSDS, either at www.DSLabs.com or by request.

VI. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma should be used and the usual precautions for venipuncture should be observed. Specimens may be stored at 2-8°C for up to 24 hours and should be frozen at -20°C or lower for longer periods. Do not use hemolyzed or lipemic specimens. Serum and EDTA-plasma values for 21 samples (serum values ranging from 0.48 to 5.87 ng/mL) were compared using the DSL-8900 RIA Kit. Results are as follows:

$$[\text{serum}] = 1.02 [\text{plasma}] + 0.019$$

$$r^2 = 0.96, p < 0.0001$$

VII. PROCEDURAL NOTES

A thorough understanding of this package insert is necessary for successful use of the product. Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques and accurately following the package insert. A standard curve must be included with each assay. Do not mix various lots of any kit component within an individual assay. Do not use any component beyond the expiration date shown on its label. After removing assay reagents from the refrigerator, allow them to reach room temperature (~25°C) before pipetting. Unused reagents should be stored as specified in the Reagent Section. Standards and Controls should be mixed before use by inverting or swirling gently rather than vortexing. To insure a homogeneous mixture of the reagents in each assay tube, gentle and thorough shaking or vortexing is essential. Failure to obtain the appropriate values for controls may indicate imprecise manipulations, improper sample handling or deterioration of reagents. Failure to blot tubes adequately following decantation may result in poor replication and spurious values.

VIII. TEST PROCEDURE

A. Materials Supplied:

Materials supplied in the DSL DHEA RIA Kit, Catalog No. DSL-8900

MATERIAL	QUANTITY	CATALOG NO.
DHEA Standard A	One Vial	DSL-8901
DHEA Standard B	One Vial	DSL-8902
DHEA Standard C	One Vial	DSL-8903
DHEA Standard D	One Vial	DSL-8904
DHEA Standard E	One Vial	DSL-8905
DHEA Standard F	One Vial	DSL-8906
DHEA Antiserum	One Bottle	DSL-8910
DHEA [I-125] Reagent	One Vial	DSL-8920
Precipitating Reagent	One Bottle	DSL-1230
DHEA Control Level I	One Vial	DSL-8951
DHEA Control Level II	One Vial	DSL-8952

B. Materials Required But Not Supplied:

- 12 x 75 mm plastic or glass test tubes
- Test tube rack for 12 x 75 mm tubes
- Deionized water
- Precision pipette to deliver 100 µL
- Precision repeating pipette to deliver 100 µL, 500 µL and 1 mL
- Vortex mixer
- Temperature-controlled waterbath, 37°C ± 2°C
- Centrifuge (1500 x g, preferably refrigerated)
- Sponge test tube rack or similar device for decantation
- Absorbent material for blotting tubes
- Gamma counter
- Semi-log graph paper or computer RIA data analysis program

C. Assay Procedure:

Allow all reagents to reach room temperature (~25 °C) and mix thoroughly by gentle inversion before use. After reconstitution of Standards and Controls, mix thoroughly, avoiding foam. Standards, Controls and unknowns should be assayed in duplicate.

1. Label and arrange test tubes in duplicate for Total Counts, Non-Specific Binding (NSB), Standards, Controls and unknowns.
2. Add 100 µL of the Standards, Controls or unknowns to the appropriate tubes. Add 200 µL 0 ng/mL DHEA Standard to the NSB tubes.
3. Add 500 µL of DHEA [I-125] Reagent to all tubes.
4. Add 100 µL of DHEA Antiserum to all tubes, except the Total Count and NSB tubes. Vortex all tubes.
5. Incubate all tubes at 37°C for 1 hour.
6. Add 1 mL of Precipitating Reagent to all tubes except Total Count tubes. *This reagent should be shaken thoroughly before use.*
7. Vortex and incubate all tubes at room temperature (~25°C) for 10-15 minutes.
8. Centrifuge all tubes (preferably refrigerated), except Total Count tubes, for 15-20 minutes at 1500 x g (approximately 3000 rpm).
9. Decant all tubes, except Total Count tubes, by simultaneous inversion with a sponge rack into a radioactive waste receptacle. Allow them to drain on absorbent material for 15-30 seconds and gently blot the tubes to remove any droplets adhering to the rim before returning them to the upright position. Failure to blot tubes adequately may result in poor replication and spurious values.
10. Count all tubes in a gamma counter for one minute.

IX. RESULTS

The results in this package insert were calculated using log-linear curve fit. Other data reduction methods may give slightly different results.

- A. Calculate the mean counts per minute (cpm) for each Standard, Control and unknown. Subtract the mean cpm of the NSB tubes from all counts to obtain corrected counts. Calculate the % B/T or % B/Bo for each Standard, Control and unknown as follows:

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Mean Sample Counts} - \text{NSB Counts}}{\text{Mean Total Counts} - \text{NSB Counts}} \times 100$$

$$\% \text{ B/Bo} = \frac{\text{Mean Sample Counts} - \text{NSB Counts}}{\text{Mean Counts of 0 ng/mL Standard} - \text{NSB Counts}} \times 100$$

- B. Plot a curve of % B/T or % B/Bo for the Standards against the DHEA concentration on semi-log graph paper. Draw a standard curve through the mean of the duplicate points.
 C. Determine the DHEA concentration from the means of the duplicate counts of each control and unknown from the standard curve.
 D. Any sample reading greater than the highest Standard should be diluted appropriately with the 0 ng/mL DHEA Standard and reassayed.
 E. Any sample reading less than the lowest Standard should be reported as such.

X. LIMITATIONS

- The reagents supplied in this kit are optimized to measure DHEA levels in serum or EDTA plasma.
- Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- Hemolyzed and lipemic specimens may give false values and should not be used.
- The results of this assay should be used in conjunction with other pertinent clinical information.

XI. QUALITY CONTROL

- Non-specific binding (NSB), greater than 7% may indicate reagent deterioration, contamination, or technical error.
- DSL Controls or other commercial controls should fall within the established confidence limits. The confidence limits for the DSL Controls are printed on the Control vial labels.

TYPICAL DHEA STANDARD CURVE DATA

TUBE NO.	TUBE LABEL	BOUND (cpm)	MEAN (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	DHEA (ng/mL)
1,2	TOTAL COUNTS	80771 81690	81231			
3,4	NSB	1879 1880	1880	2.3		
	STANDARDS					
5,6	A	42435 41492	41963	51.7	100.0	0
7,8	B	35804 35730	35767	44.0	85.2	0.2
9,10	C	23702 23519	23610	29.1	56.3	1.0
11,12	D	15813 15518	15665	19.3	37.3	2.5
13,14	E	6206 6827	6516	8.0	15.5	10.0
15,16	F	3046 2900	2973	3.7	7.1	30.0
	CONTROLS					
17,18	Level I	31557 31601	31579	38.9	75.2	0.34
19,20	Level II	16248 16830	16539	20.4	39.4	2.26

ED₅₀ = 1.35 ng/mL

CAUTION: The above data must not be employed in lieu of data obtained by the user in the laboratory.

XII. EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own normal and pathologic range values for DHEA. The following values for normal adults were established using the DSL-8900 DHEA Kit:

SEX	N	AGE (yr, mean ± SD)	MEDIAN (ng/mL)	ABSOLUTE RANGE (ng/mL)
Male	33	47 ± 31, range 16 - 79	4.6	1.4 - 12.5
Female	61	51 ± 29, range 22 - 80	3.0	0.8 - 10.5

For the population as a whole, DHEA levels were inversely correlated with age ($r^2 = 0.28$, $p = 0.007$).

XIII. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

All performance characteristics are stated in ng/mL. To convert to nmol/L:
 $\text{ng/mL} \times 3.46 = \text{nmol/L}$

A. Sensitivity:

The theoretical sensitivity or minimum detection limit, defined as the minimal concentration of DHEA that can be distinguished from 0 at the 95% confidence limit, was obtained by interpolating the mean minus 2 SD cpm for 7 replicate sets (14 tubes) of the 0 ng/mL DHEA Standard into the adjusted standard curve (logistic curve fit). For the DSL-8900 Kit the calculated minimum detection limit is 0.009 ng/mL.

B. Precision:

The intra-assay precision was determined from the mean of 10 replicates each.

SAMPLE	N	MEAN (ng/mL)	STANDARD DEVIATION (ng/mL)	COEFFICIENT OF VARIATION (%)
I	10	0.98	0.03	3.1
II	10	2.66	0.10	3.8
III	10	9.88	0.27	2.7

The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for 10 separate runs.

SAMPLE	N	MEAN (ng/mL)	STANDARD DEVIATION (ng/mL)	COEFFICIENT OF VARIATION (%)
I	10	1.02	0.07	6.9
II	10	2.56	0.22	8.6
III	10	9.68	0.37	3.8

C. Recovery:

Three serum samples containing different levels of endogenous DHEA were spiked with known quantities of DHEA and assayed.

SAMPLE	ENDOGENOUS (ng/mL)	ADDED (ng/mL)	EXPECTED (ng/mL)	OBSERVED (ng/mL)	RECOVERY (%)
I	0.25	0.39	0.64	0.66	103
		1.13	1.38	1.21	88
		4.58	4.83	4.37	90
II	1.15	0.39	1.54	1.62	105
		1.13	2.28	1.99	87
		4.58	5.73	5.06	88
III	6.86	0.39	7.25	7.82	108
		1.13	7.99	8.04	101
		4.58	11.44	10.89	95

D. Linearity:

Three serum samples were diluted with 0 ng/mL DHEA Standard and assayed.

SAMPLE	DILUTION FACTOR	EXPECTED (ng/mL)	OBSERVED (ng/mL)	RECOVERY (%)
I	---	---	4.72	---
	1:2	2.36	2.45	104
	1:4	1.18	1.25	106
	1:8	0.59	0.65	110
	1:16	0.29	0.33	114
	1:32	0.14	0.17	121
II	---	---	9.76	---
	1:2	4.88	4.78	98
	1:4	2.44	2.38	98
	1:8	1.22	1.15	94
	1:16	0.61	0.55	90
	1:32	0.30	0.32	107
III	---	---	15.38	---
	1:2	7.69	8.26	107
	1:4	3.84	3.91	102
	1:8	1.92	1.97	103
	1:16	0.96	1.08	113
	1:32	0.48	0.44	92

E. Specificity:

The cross-reactivity of the DHEA antiserum has been measured against various compounds. The percent cross-reactivity is expressed as the ratio of the DHEA concentration to the concentration of the reacting compound at 50% binding of the 0 ng/mL DHEA Standard.

COMPOUND	% CROSS-REACTIVITY
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	100
DHEA-Sulfate	0.020
Isoandrosterone	0.733
Androstenedione	0.460
5 α -Androstane-3, 17-dione	0.240
11-Deoxycortisol	0.061
Progesterone	0.045
5-Androstene-3 β , 17 β -diol	0.041
Androsterone	0.034
Dexamethasone	0.031
Testosterone	0.028
19-Hydroxyandrostenedione	0.023
Androstanolone (5 α -Dihydrotestosterone)	0.011
5 β -Androsten-3 α -ol-17-one	0.010
5 α -Androstane-3 α , 17 β -diol	0.008
5 β -Androstane-3, 17-dione	0.005
4-Androsten-11 β -ol-3, 17-dione	0.005
5(10)Estron-17 α -Ethinyl-17 β -ol-3-one	0.003
Norethindrone	ND
Spirolactone	ND
4-Androsten-17 β -ol-3, 11-dione	ND
4-Androsten-17 α -Ethinyl-17 β -ol-3-one	ND
5 β -Androstan-3 α , 17 β -diol	ND
5 β -Androstan-3 β , 17 β -diol	ND
Aldosterone	ND
Corticosterone	ND
Cortisol	ND
Danazol	ND
Estriol	ND
Estrone	ND
Norethindrone	ND
Prednisone	ND
Spirolactone	ND
Triamcinolone	ND

ND = Non-Detectable (<0.001)

F. Method Comparisons:

The DSL-8900 DHEA non-extraction RIA has been compared to 2 other assays in 2 separate studies, both of which use an organic solvent sample extraction step. Results are as follows:

1. DSL-8900 RIA vs. Research Assay (R-Assay)

n=24 serum samples

mean values:

DSL 8900: 6.3 \pm 2.8 ng/mL

R-Assay: 6.0 \pm 3.3 ng/mL

regression:

[R-assay] = 1.1 [DSL-8900] - 1.2

r² = 0.98, p < 0.0001

2. DSL-8900 RIA vs. Commercial Assay (C-Assay)

n=45 serum samples

mean values:

DSL-8900: 3.2 \pm 2.8 ng/mL

C-Assay: 3.2 \pm 2.6 ng/mL

regression:

[C-assay] = 0.90 [DSL-8900] + 0.34

r² = 0.98, p < 0.0001

These results indicate that the DSL-8900 non-extraction DHEA RIA is virtually equivalent to methods requiring organic solvent extraction.

The DSL-8900 DHEA RIA Kit has been compared to the DSL-9000 ACTIVE® DHEA Coated-Tube RIA Kit.

Results are as follows:

n=56 serum samples

Mean values:

DSL-9000: 2.56 \pm 1.55 ng/mL

DSL-8900: 2.64 \pm 1.45 ng/mL

regression:

[DSL-9000] = 1.03 [DSL-8900] - 0.16

r² = 0.94, p < 0.001

XIV. REFERENCES

1. Dorfman RI, Shipley RA: *Androgens*. John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Meikle AW, Daynes RA, Araneo BA: Adrenal androgen secretion and biologic effects. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20:381-400, 1991.
3. Pang S, Riddick L: Hirsutism. IN Lifshitz F (ed): *Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, pp. 259-291.
4. Nafziger AN, Herrington DM, Bush TL: Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: their relation to cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* 13:267-293, 1991.
5. Berdancier CD, Parente JA Jr, McIntosh MK: Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB J* 7:414-419, 1993.
6. Erb JL, Kadane JB, Tourney 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* 52:181-186, 1981.
7. De Pergola G, Giagulli VA, Garruti G, 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 Peretti 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. Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier 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. Zumoff B, Rosenfeld RS, Stain 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 normal adults. *J Clin Endocrinol Metab* 57:330-333, 1980.
11. Carlström K, Brody S, Lunell N-O, Lagrelus A, Möllerström G, Poussette Å, Rannevik G, Stege R, von Schoultz B: Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. *Maturitas* 10:297-306, 1988.
12. Key TJA, Pike MC, Wang 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: Virilizing adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature. *Pediatrics* 76:437-444, 1985.
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.

Acknowledgement:

DSL acknowledges the contributions of Dr. M. Nazeem Nanjee (Department of Internal Medicine, Bowman Gray School of Medicine, Wake Forest University) in the validation and performance testing of the DSL-8900 DHEA RIA.

ANEXO G - Bula do kit do cortisol

Valore Medio:
13,8 µg/dL (Siero)
13,5 µg/dL (Eparina)
16,2 µg/dL (EDTA)
13,7 µg/dL (SST)

I risultati indicano che il plasma EDTA *non* è accettabile.

Specificità: L'antisiero Coat-A-Count Cortisolo è altamente specifico per il cortisolo, con una crossreattività verso altri steroidi presenti in natura o medicinali somministrati come terapia e presenti nei campioni estremamente bassa. (Vedi tabella "Specificity".)

Benchè alcuni steroidi presentino una limitata crossreattività, le loro concentrazioni fisiologiche normali sono basse se comparate al cortisolo, quindi non interferiranno in maniera significativa con il dosaggio Coat-A-Count Cortisolo. Esiste, tuttavia, una crossreattività osservata di circa 76% con il prednisolone, che deve essere considerato in quei pazienti sottoposti a questa terapia. Poiché il prednisone viene convertito in prednisolone *in vivo*, occorre fare attenzione con le determinazioni di cortisolo per i pazienti sottoposti ad entrambe le terapie.

Comparazione di Metodi: Il dosaggio è stato comparato al Cortisolo Doppio Anticorpo su 89 campioni. Mediante regressione lineare:

(CAC) = 1,02 (DA) - 0,25 µg/dL
r = 0,970

Valore Medio:
18,8 µg/dL (Coat-A-Count)
18,7 µg/dL (Doppio Anticorpo)

Effetto delle Proteine: Per simulare le concentrazioni delle varie proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 2,0 mL di un pool di sieri umani è stato liofilizzato e quindi ricostituito con vari volumi d'acqua (1, 2, 3 e 4 mL). Ciascuna aliquota ricostituita è stata quindi dosata con il dosaggio Coat-A-Count Cortisolo. Notare che le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentano una concentrazione di proteine estremamente elevata, nell'ordine di 14 g/dL. Questi risultati indicano che anche variazioni notevoli nelle proteine totali non hanno nessun effetto clinico significativo sul dosaggio Coat-A-Count Cortisolo. (Vedi

tabella "Protein Effect" per dati rappresentativi).

Assistenza Tecnica

All'Estero: contattare il proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Siemens Medical Solutions Diagnostics è certificato ISO 13485:2003.

Português

Coat-A-Count Cortisol

Utilização: O Coat-A-Count Cortisol é um radioimunoensaio concebido para a medição quantitativa de cortisol (hidrocortisona, Composto F) no soro, na urina e no plasma heparinizado. Destina-se estritamente ao uso de diagnóstico *in vitro* como auxiliar na avaliação clínica do estado supra-renal.

Números de catálogo: **TKCO1** (100 tubos), **TKCO2** (200 tubos), **TKCO5** (500 tubos)



O kit de 100 tubos contém menos de 5,5 microcuries (204 quilobecquerels) de cortisol ¹²⁵I radioactivo; o kit de 200 tubos contém menos de 11 microcuries (407 quilobecquerels); e o kit de 500 tubos contém menos de 27,5 microcuries (1018 quilobecquerels).

Sumário e explicação do teste

O cortisol (hidrocortisona, Composto F) é o esteroide em circulação mais abundante e o principal glucocorticóide segregado pelo córtex supra-renal. Fisiologicamente eficaz na actividade anti-inflamatória e na manutenção da pressão sanguínea, o cortisol está igualmente envolvido na gluconeogénese, na absorção do cálcio e na secreção de ácido gástrico e pepsina.

Como indicador da função cortico-supra-renal, a medição dos níveis de cortisol no sangue é útil no diagnóstico diferencial das doenças de Addison e de Cushing, do hipopituitarismo, e da hiperplasia e do carcinoma supra-renais.⁴

Uma grande variedade de testes de estimulação e supressão — estimulação de ACTH, Reserva de ACTH, Supressão

de Dexametasona — pode fornecer informações de apoio sobre a função cortico-supra-renal.^{4,5,6} Foi detectada a existência de concentrações anómalas de cortisol em pacientes com infecções agudas, dores fortes, diabetes mellitus ou insuficiência cardíaca, e em mulheres grávidas ou submetidas a terapêutica com estrogénios. Além disso, alguns síndromas de virilização e condições iatrogénicas provocam o aumento dos níveis de esteróides naturais para concentrações elevadas (não fisiológicas) que podem interferir directamente nos ensaios de cortisol, a menos que seja utilizado um anti-soro altamente específico.

Princípio do Procedimento

O procedimento Coat-A-Count Cortisol é um radioimunoensaio de fase sólida em que cortisol marcado com ¹²⁵I compete durante um período de tempo fixo com o cortisol na amostra do paciente por locais de fixação de anticorpos. Como o anticorpo é imobilizado contra a parede de um tubo de polipropileno basta decantar o sobrenadante para concluir a competição e isolar a fracção ligada ao anticorpo do cortisol marcado radioactivamente. Após a contagem do tubo num contador gama, obtém-se um número que, através de uma curva de calibração, é convertido numa medição do nível de cortisol presente na amostra do paciente.

Reagentes a pipetar: 1

Tempo Total de Incubação: 45 minutos.

Contagens Totais na Iodação: aproximadamente 90.000 cpm.

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Armazenar a uma temperatura de 2–8°C num frigorífico destinado à recepção de materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis em vigor.

Não utilizar os reagentes após o prazo de validade.

Alguns componentes fornecidos com este kit podem conter material de origem humana e/ou outros ingredientes

potencialmente perigosos que requerem determinadas precauções.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Radioactividade

A Siemens Medical Solutions Diagnostics tem de receber uma cópia de qualquer certificado de licença relativo a radioisótopos (Específica ou Geral) emitida em nome de um cliente dos EUA antes de poder enviar kits ou componentes com material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente com a licença Específica adequada. Com uma licença Geral, estes materiais radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários que pratiquem medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais — e unicamente para testes clínicos ou laboratoriais *in vitro* que não envolvam a administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação em seres humanos ou outros animais. A sua aquisição, recepção, armazenagem, utilização, transferência e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e a uma licença (Geral ou Específica) da Comissão de Regulamentação Nuclear dos EUA ou de um Estado com o qual a NRC tenha estabelecido um acordo de aplicação de controlo legal.

Manusear materiais radioactivos em conformidade com os requisitos da licença Geral ou Específica. Para minimizar a exposição à radiação, o utilizador deverá cumprir as directivas definidas na

publicação do National Bureau of Standards sobre o manuseamento seguro de materiais radioactivos (*Safe Handling of Radioactive Materials* – Manual N.º 92, editado a 9 de Março de 1964) e em publicações posteriores editadas pelas autoridades estatais e federais norte-americanas.

Limpar imediatamente qualquer derrame e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar a geração de aerossóis. Eliminar os resíduos radioactivos sólidos de acordo com os requisitos da licença. Os detentores de licenças Gerais (detentores do formulário 483 da NRC) podem eliminar os resíduos radioactivos sólidos como resíduos não radioactivos, após a remoção dos rótulos. Os detentores de licenças Específicas (Formulário 313 da NRC) devem consultar o Título 10 do Código de Regulamentos Federais (*Code of Federal Regulations*), Parte 20. Os detentores de licenças em Estados com os quais tenham sido estabelecidos acordos deverão consultar os regulamentos adequados do respectivo Estado. Os detentores de licenças Gerais podem eliminar os resíduos radioactivos líquidos do tipo contido neste produto através de um cano de esgoto de laboratório. Os detentores de licenças têm de remover ou tornar ilegíveis os rótulos dos recipientes vazios de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os detentores de licenças Específicas podem eliminar pequenas quantidades de resíduos radioactivos líquidos do tipo utilizado neste produto através de um cano de esgoto de laboratório. Consultar os regulamentos adequados e aplicáveis ao respectivo laboratório.

Materiais Fornecidos: Preparação Inicial

Tubos Revestidos com Anticorpos de Cortisol (TKO1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos para cortisol e embalados em saquetas de fecho hermético. Proteger da humidade, fechando de novo cuidadosamente as saquetas após a abertura: estável a uma temperatura de 2–8°C até ao prazo de validade indicado na saqueta. Cor: Azul claro.

TKO1: 100 tubos. **TKO2:** 200 tubos.
TKO5: 500 tubos.

Cortisol ¹²⁵I (TKO2)

Cortisol iodado com agentes bloqueadores para proteínas de ligação de esteróides, fornecido na forma líquida, pronto a usar. Cada frasco contém 105 mL. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante pelo menos 30 dias depois de aberto, ou até ao prazo de validade indicado no frasco.

TKO1: 1 frasco. **TKO2:** 2 frascos.
TKO5: 5 frascos.

Calibradores de Cortisol (TKO3–8)

Calibradores de cortisol, prontos a usar, em soro humano processado. O frasco A do calibrador zero contém 2,0 mL, enquanto os restantes frascos dos calibradores B a F contêm 1,0 mL cada. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante pelo menos 30 dias depois de aberto, ou até ao prazo de validade indicado no frasco. A duração dos calibradores pode ser prolongada por congelamento. Se necessário, aliquotar para evitar o descongelamento e congelamento repetidos.

TKO1: 1 conjunto. **TKO2:** 1 conjunto.
TKO5: 2 conjuntos.

Os calibradores contêm, respectivamente, 0, 1, 5, 10, 20 e 50 microgramas de cortisol por decilitro (µg/dL) em soro humano processado; equivalente a 0, 27,6, 138, 276, 552 e 1 380 nanomoles por litro (nmol/L). Os pontos de calibração intermédios podem ser obtidos misturando os calibradores nas proporções adequadas.

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos

Contador gama — compatível com tubos standard 12x75 mm

Misturador giratório

Preparação de Urina

Tubos com tampas — adequados à preparação com diclorometano.

Diclorometano — qualidade espectrofotométrica (também designado por cloreto de metileno)

Micropipetas: 50 µL e 500 µL. A pipeta de 50 µL deve ser do tipo de transporte positivo.

Evaporador com azoto comprimido.

Radioimunoensaio

Tubos lisos de polipropileno de 12×75 mm — para utilização como tubos NSB, disponíveis na Siemens Medical Solutions Diagnostics

Micropipetas: 25 µL e 1,0 mL

Banho-maria — capaz de manter a temperatura de 37°C. Nunca é adequada a utilização de um forno ou de uma placa de aquecimento.

Dispositivo de decantação de espuma — disponível na Siemens Medical Solutions Diagnostics

Papel milimétrico logit-log — disponível na Siemens Medical Solutions Diagnostics (Números de catálogo: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control; containing cortisol as one of over 25 assayed constituents, is available from Siemens Medical Solutions Diagnostics (Números de catálogo: CON6).

Colheita

Soro e Plasma

O paciente não necessita de estar em jejum e não são necessárias preparações especiais. Colher sangue por punção venosa¹⁰ para tubos lisos (sem anticoagulante) ou heparinizados, e separar o soro ou plasma das células. Não é aceitável a utilização de plasma de EDTA. (Ver secção Tipos de Amostras Alternativas). Como o cortisol apresenta um ritmo circadiano, a data e a hora da colheita devem ser registadas.

Recomenda-se a utilização de uma ultracentrífuga para clarificar as amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Coat-A-Count Cortisol não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas

pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 25 µL de soro ou plasma por tubo.

Armazenamento: 7 dias a 2–8°C ou 2 meses a –20°C.⁸ Antes de proceder ao ensaio, deixar que as amostras atinjam a temperatura ambiente (15–28°C) e misturar por agitação ou inversão *suaves*. Aliquotar, se necessário, a fim de evitar o descongelamento e congelamento repetidos. Não tentar descongelar espécimens congelados aquecendo-os em banho-maria. As amostras de paciente que se preveja que contenham concentrações de cortisol superiores à do calibrador mais elevado (50 µg/dL) deverão ser diluídas com o calibrador zero antes do ensaio.

Urina Colher uma amostra de urina de 24 horas sem conservante, mantendo o espécimen refrigerado durante a colheita. Registrar o volume total em mililitros.

Volume Necessário (procedimento de extracção): 0,5 mL de urina.

Armazenamento: 7 dias a 2–8°C ou um mês a –20°C.⁸

Preparação de Amostras de Urina:

Aviso –Diclorometano: Não pipetar com a boca. Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor. Evitar chamas expostas.

- 1 Rotular um tubo de polipropileno 12x75 mm para cada amostra de urina.

Tubos adequados e com tampas de fecho hermético estão disponíveis na Siemens Medical Solutions Diagnostics. Não utilizar nesta fase tubos revestidos com anticorpos.

- 2 Pipetar 500 µL de cada amostra de urina para o tubo preparado.

Se a amostra estiver turva ou se se tiver formado um precipitado, começar por centrifugar a urina e trabalhar com o sobrenadante.

- 3 **Preparação:** Adicionar 1,0 mL de diclorometano a cada tubo. Tapar bem.

Não pipetar diclorometano com a boca.

4 Misturar por inversão suave durante 5 a 10 minutos.

Utilizar um rotador mecânico configurado para 15 a 20 rotações por minuto.

5 Centrifugar durante 5 minutos a cerca de 1500×g, para separar as duas camadas.

Qualquer amostra parcialmente emulsionada deve ser vigorosamente agitada e novamente centrifugada.

6 Remover a maior parte da camada superior, tendo o cuidado de não agitar a camada intermédia.

Utilizar um aspirador de torneira de água. (Aspirar até à camada intermédia pode conduzir à contaminação da camada de diclorometano por contacto com material da fase aquosa.)

7 Evaporação: Transferir 50 µL da fase inferior (diclorometano) para cada um dos dois tubos revestidos com anticorpos de cortisol.

Pipetar todas as preparações directamente para o fundo do tubo, utilizando uma micropipeta de transporte positivo. Ter cuidado para que nenhuma parte da camada superior entre no tubo de ensaio.

8 Evaporar até secar completamente, sob um fluxo suave de azoto à temperatura ambiente (15-28°C).

Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor. Evitar chamas expostas.

Uma vez secos, submeter os tubos (devidamente rotulados) a um ensaio que inclua um conjunto de tubos de calibrador (Soro). Continuar (etapa 2 do procedimento do radioimunoensaio) adicionando 25 µL do calibrador zero A, e assim por diante. Os resultados em microgramas de cortisol (livre) por 100 mL de urina (µg/dL) podem ser lidos directamente a partir da curva de calibração. Não é necessário um factor de correcção.

Não deverão passar mais de 30 minutos entre a transferência da preparação para o tubo revestido (etapa 7 do procedimento

de preparação) e a adição do marcador (etapa 3 do procedimento do radioimunoensaio). O procedimento de preparação pode ser interrompido após a etapa 6, armazenando a camada de infranadante em recipiente hermeticamente fechado num congelador a -20°C.

Procedimento de Radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15 -28°C) antes da sua utilização.

1 Tubos lisos: Rotular quatro tubos de polipropileno lisos (não revestidos) de 12×75 mm com T (contagens totais) e NSB (ligação não específica), em duplicado.

Dado que a ligação não específica no procedimento Coat-A-Count é caracteristicamente baixa, os tubos NSB podem ser omitidos com segurança sem comprometer a precisão ou o controlo de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular doze tubos revestidos com anticorpos de cortisol com A (ligação máxima) e com B a F, em duplicado. Rotular tubos revestidos com anticorpos de cortisol adicionais, também em duplicado, para controlos e amostras de paciente

Calibradores	µg/dL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Amostras de Urina: Uma vez secos, os tubos revestidos utilizados para evaporar as preparações deverão ser devidamente rotulados e incorporados na sequência de tubos de amostra de paciente.

2 Pipetar 25 µL do calibrador zero A para os tubos NSB e A, e também para cada um dos tubos de evaporação de amostras de urina. Pipetar 25 µL de cada calibrador restante, controlo e amostra de paciente para os tubos preparados.

Pipetar directamente para a base do tubo.

É boa prática usar uma micropipeta de ponta descartável, substituindo a ponta entre cada amostragem, a fim de evitar contaminação entre amostras.

- 3 Adicionar **1,0 mL** de cortisol ¹²⁵I a cada tubo. Agitar no misturador.

Os laboratórios equipados com um pipetador-diluidor fiável podem efectuar as etapas 2 e 3 em simultâneo. Não deverão passar mais de 10 minutos durante a dispensação do marcador. Reservar os tubos T para a contagem na etapa 6; não necessitam de mais processamento.

- 4 Incubar durante **45 minutos a 37°C**.

Utilizar o procedimento de banho-maria; não é adequada a utilização de um forno nem de uma placa de aquecimento. Períodos de incubação mais prolongados não afectam significativamente o ensaio.

- 5 Decantar completamente.

Remover toda a humidade visível melhorará significativamente a precisão. Decantar o conteúdo de todos os tubos (à excepção dos tubos T) usando um dispositivo de decantação de espuma, e deixá-los drenar durante 2 ou 3 minutos. De seguida, sacudir os tubos vigorosamente contra papel absorvente para eliminar todas as gotas residuais.

- 6 Contar durante **1 minuto** num contador gama.

Cálculo dos Resultados

Para obter resultados em termos de concentração a partir de uma representação logit-log da curva de calibração, começar por calcular a média das contagens por minuto corrigidas com NSB de cada par de tubos:

Contagens Líquidas CPM Média *menos* CPM Média **NSB**

De seguida, determinar a ligação de cada par de tubos como uma percentagem da ligação máxima (MB), considerando as

contagens corrigidas com NSB dos tubos A como 100%:

Porcentagem de Ligação = (Contagens Líquidas / Contagens Líquidas **MB**) × 100

O cálculo pode ser simplificado, omitindo a correcção para a ligação não específica; as amostras dentro da gama dos calibradores produzem virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente a partir da CPM Média.

Usando papel milimétrico logit-log, representar a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) relativa à Concentração no eixo horizontal (logarítmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e desenhar uma linha recta aproximando a trajectória destes pontos. Os resultados das amostras desconhecidas podem ser então lidos a partir da linha, por interpolação.

É boa prática analisar os resultados para verificar a concordância entre as réplicas, e para construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam processados por computador) como verificação visual da adequação da transformação usada e como forma de detectar pontos de calibração desviantes. Recomendamos também o acompanhamento destes parâmetros de redução de dados.

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

%NSB = 100 × (Média Contagens NSB / Contagens Totais)

%MB = 100 × (Contagens reais / Contagens Totais)

E as linhas interceptadas percentuais de 20, 50 e 80, onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

De notar que outras abordagens, por ex., uma implementação correcta da logística de 4 parâmetros, são também aceitáveis. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985; 31:1264-71:

Amostras de Urina:

As concentrações de cortisol livre na urina podem ser lidas directamente a partir da curva de calibração. Não é necessário um

factor de correcção. (A introdução do dobro da amostra habitual) de 25 µL no tubo de ensaio na etapa 7 do procedimento de preparação compensa exactamente a diluição de 1:2 verificada ao preparar 0,5 mL de urina em 1,0 mL de diclorometano.)

Para determinar o nível de cortisol livre na urina por dia em microgramas, basta multiplicar o resultado em µg/dL pelo volume de urina de 24 horas em decilitros:

$$\mu\text{g}/24 \text{ horas} = \mu\text{g}/\text{dL} \times (\text{Volume Total em mililitros}) / 100$$

Exemplo de ensaio: Para ilustração apenas, não serve para calcular os resultados de outro ensaio. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio".)

Controlo de Qualidade

Controlos (ou pools de soro) com pelo menos dois níveis de concentração de cortisol — baixo e alto — devem ser submetidos por rotina a ensaio como amostras desconhecidas.

Transmitir os resultados de paciente apenas se os resultados do controlo para o referido ensaio satisfizerem os critérios definidos pelo laboratório como critérios de admissibilidade.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio os números de lote dos componentes usados, bem como as datas em que foram reconstituídos ou abertos pela primeira vez. Recomendamos igualmente que sejam representados em gráfico os resultados de dia para dia — conforme descrito, por exemplo, em Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. De notar que as amostras de repetição podem funcionar como uma ferramenta adicional útil para a monitorizar a precisão inter-ensaio, e que os pares de tubos de controlo podem ser espaçados ao longo do ensaio a fim de ajudar a verificar a ausência de desvio significativo.

Ensaio sem Solventes:

Para obter resultados fiáveis, o diclorometano tem de apresentar pelo menos uma qualidade espectrofotométrica e a fonte de azoto, se utilizada, não pode contaminar os tubos de evaporação com óleo ou humidade. (A utilização de um

ardil contendo sulfato de cálcio ajuda a prevenir essa contaminação.) Para verificar a pureza destes reagentes, que não são fornecidos com o kit, recomendamos o processamento periódico de um "ensaio sem solventes". Este procedimento implica a preparação e o ensaio com água destilada ou esterilizada da forma prescrita para as amostras de urina, de modo a confirmar que produz uma concentração aparente de cortisol essencialmente de zero, ou seja, inferior ao limite de detecção do ensaio.

Valores de Referência

Soro

Foram obtidos os seguintes valores previstos para o cortisol em circulação.

Variação de Ritmo Diurno	<i>manhã:</i> 5 – 25 µg/dL (138 – 690 nmol/L) ^{1,6,9} <i>tarde:</i> Aprox. metade dos valores da manhã.
Estimulação ACTH	Mais do dobro (normalmente 3 a 5 vezes) dos valores basais ^{4,5}
Reserva de ACTH (supressão de metirapona)	Inferior aos valores basais (controlo) ^{5,6}
Supressão de dexametasona	Inferior aos valores basais (controlo) para os testes de despiste, dose reduzida e dose elevada ^{4,5}

Urina

Um estudo com amostras de urina de 24 horas de 33 voluntários de laboratório saudáveis produziu uma gama absoluta de 21 a 85 µg/24 horas, com uma média de 48 µg/24 horas. Estes resultados são coerentes com uma gama de referência de 20 a 90 µg/24 horas para o nível de cortisol livre na urina, de acordo com o indicado na literatura de referência.⁷

Estes limites devem ser considerados apenas como *directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitação

Os resultados de cortisol no soro e na urina podem apresentar valores falsamente elevados em amostras obtidas de pacientes submetidos a tratamento com prednisolona ou prednisona (convertida para prednisolona *in vivo*). É portanto necessário ter cuidado nas determinações dos níveis de cortisol em pacientes sob terapêutica com estes e outros corticosteróides sintéticos estruturalmente relacionados.

Características do Ensaio

Consulte Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do doseamento. Os resultados são expressos como microgramas de cortisol por decilitro ($\mu\text{g/dL}$). Todos os resultados foram obtidos com base em amostras de soro.

Factor de conversão:
 $\mu\text{g/dL} \times 27,59 \rightarrow \text{nmol/L}$

Calibração: 1 – 50 $\mu\text{g/dL}$
 (27,6 – 1 380 nmol/L)

Sensibilidade Analítica: 0,2 $\mu\text{g/dL}$
 (5,5 nmol/L)

Precisão Intra-ensaio (entre ensaios)
 Foram calculadas estatísticas para cada uma de sete amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos num único ensaio. (Ver tabela “Precisão Intra-ensaio”.)

Precisão Inter-ensaio (ensaio a ensaio)
 Foram calculadas estatísticas para cada uma de três amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos. (Ver tabela “Precisão Inter-ensaio”.)

Efeito Fim-de-Série: nenhum até aproximadamente 700 tubos.
 (Ver tabela “Efeito Fim-de-Série”.)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Ver tabela “Linearidade”.)

Recuperação: Foram submetidas a ensaio amostras a que foram adicionadas três soluções de cortisol de 1 para 19 (130, 250 e 475 $\mu\text{g/mL}$). (Ver a tabela “Recuperação”.)

Bilirrubina: A presença de bilirrubina em concentrações até 200 mg/L não tem qualquer efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemólise: A Presença de eritrócitos em concentrações até 30 $\mu\text{L/mL}$ não tem efeito no resultado, dentro da precisão do ensaio.

Lipémia: O calibrador de 50 $\mu\text{g/dL}$ foi diluído em série com um pool de soro lipêmico. Este procedimento provoca o aumento do grau de lipémia à medida que a concentração de cortisol vai diminuindo (devido principalmente ao calibrador). Todas as diluições foram testadas juntamente com o pool lipêmico sem qualquer adição. Os resultados demonstram boas recuperações, mesmo na presença de lipémia grave.

Tipo de amostra alternativa: Para determinar o efeito de amostras alternativas, foi colhido sangue de 40 voluntários em tubos secos, com EDTA, heparinizados e tubos de vacum SST[®] da Becton Dickinson. Todas as amostras foram testadas através do procedimento Coat-A-Count Cortisol. Regressão linear:

(Heparina) = 0,93 (Soro) + 0,59 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,988$

(EDTA) = 1,17 (Soro) – 0,03 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,998$

(SST) = 0,94 (tubos simples) + 0,70 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,995$

Médias:
 13,8 $\mu\text{g/dL}$ (Soro)
 13,5 $\mu\text{g/dL}$ (Heparina)
 16,2 $\mu\text{g/dL}$ (EDTA)
 13,7 $\mu\text{g/dL}$ (SST)

Os resultados demonstram que a utilização de plasma de EDTA *não é aceitável*.

Especificidade: O anti-soro Coat-A-Count Cortisol é altamente específico para o cortisol, com uma reactividade cruzada extremamente baixa a outros esteróides naturais ou fármacos terapêuticos que possam estar presentes nas amostras de paciente. (Ver tabela de “Specificity”.)

Embora alguns esteróides demonstrem uma ligeira reactividade cruzada, as suas concentrações fisiológicas normais são baixas quando comparadas com o cortisol, pelo que não causam uma interferência significativa no procedimento Coat-A-Count Cortisol. Observou-se contudo uma reactividade cruzada de aproximadamente 76% com a prednisolona, o que terá de ser tomado em consideração no caso de pacientes submetidos a esta terapêutica. Uma vez

que a prednisona é convertida em prednisolona *in vivo*, é necessário ter cuidado nas determinações dos níveis de cortisol em pacientes sob qualquer uma destas terapêuticas.

Comparação de Métodos: O ensaio foi comparado com o ensaio Double Antibody Cortisol em 89 amostras de paciente.

Regressão linear:

(CAC) = 1,02 (DA) – 0,25 µg/dL
r = 0,970

Médias:

18,8 µg/dL (Coat-A-Count)

18,7 µg/dL (Double Antibody)

Efeito das Proteínas: Para simular diversas concentrações de proteínas, foram efectuadas experiências em que alíquotas de 2,0 mL de pool de soro humano foram submetidas ao processo de congelamento-secagem e, em seguida, reconstituídas com diversos volumes de água (1, 2, 3 e 4 mL). Cada alíquota reconstituída foi então testada através do procedimento Coat-A-Count Cortisol. Note-se que as alíquotas reconstituídas com metade do volume original representam uma concentração proteica extremamente elevada, na ordem dos 14 g/dL. Estes resultados indicam que mesmo grandes variações no teor de proteínas totais não têm um efeito clinicamente significativo sobre o ensaio Coat-A-Count Cortisol. (Consultar a tabela "Efeito das Proteínas" para ver dados representativos.)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.


O Sistema da Qualidade da Siemens Medical Solutions Diagnostics está registado sob a norma ISO 13485:2003.

 **SIEMENS**
Siemens Medical Solutions
Diagnostics
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2006-12-29

PITKCO – 6



 **EC REP** DPC Siemens GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00