

Salivary cortisol to assess the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in healthy children under 3 years old

*Cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal em
crianças saudáveis menores de 3 anos*

Margarete L. Silva¹, Márcia C. Mallozi², Giesela F. Ferrari³

Resumo

Objetivo: Estabelecer intervalos de concentrações referenciais de cortisol salivar em crianças saudáveis, nos períodos matutino e vespertino, verificando os fatores de interferência nessa dosagem e a possibilidade de presença de ritmo circadiano.

Métodos: Pesquisa observacional controlada, incluindo aleatoriamente 91 crianças com idade de 45 dias a 36 meses, residentes em comunidade de Santo André (SP). Critérios de inclusão: nutridas, saudáveis, sem febre ou uso de corticóide, subdivididas em faixas etárias (cinco subgrupos) com intervalo de 6 meses. Houve coleta de saliva domiciliar nos períodos manhã e tarde para dosagem de cortisol, sob radioimunoensaio com anticortisol 3-oxima-albumina bovina.

Resultados: Os cinco subgrupos apresentaram dosagens matutinas superiores às vespertinas ($p < 0,001$), com diferença superior a 30% a partir de 1 ano de idade. Valor médio em nmol/L foi de 557,86 (manhã) e 346,36 (tarde). Observou-se correlação linear negativa na dosagem matutina para horas de repouso e frequência de dieta ($p < 0,05$); na vespertina, para medidas antropométricas ($p < 0,05$).

Conclusões: Foram estabelecidos valores de referência de normalidade de cortisol salivar em crianças saudáveis, e aos 45 dias foi possível observar ritmo circadiano, que atingiu maturidade aos 12 meses de vida. Privações de sono e dieta elevaram valores de cortisol matutino.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(2):121-126: Saliva, ritmo circadiano, eixo hipofisário-adrenal, supressão.

Introdução

Um grande obstáculo na interpretação dos exames laboratoriais do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HHA) em pediatria é a influência do medo e da ansiedade mediante

Abstract

Objective: To establish reference concentration intervals for salivary cortisol in healthy children, in the morning and in the afternoon, investigating factors that interfere with the concentration measured and the possibility that circadian rhythms are present.

Methods: A controlled observational study was carried out with 91 children aged 45 days to 36 months, selected at random and living in Santo André, state of São Paulo, Brazil. Inclusion criteria were: healthy, well-nourished, free from fever and corticoid use, subdivided by age group (five subsets) at 6-month intervals. Saliva was collected during home visits in the morning and afternoon. Cortisol was radioimmunoassayed with cortisol 3-oxime-bovine albumin antiserum.

Results: The five subsets exhibited higher cortisol concentration during the morning than in the afternoon ($p < 0.001$), and this difference passed 30% from 1 year of age onwards. Mean concentrations, in nmol/L, were 557.86 (morning) and 346.36 (afternoon). A negative linear correlation was observed between morning concentrations and hours' sleep and frequency of meals ($p < 0.05$), and in the afternoon with anthropometric measurements ($p < 0.05$).

Conclusions: Reference values for normal salivary cortisol in healthy children were established. At 45 days it was possible to observe circadian rhythms, which reached maturity at 12 months of life. Sleep and food deprivation increased morning cortisol levels.

J Pediatr (Rio J). 2007;83(2):121-126: Saliva, circadian rhythm, pituitary-adrenal axis, suppression.

procedimentos de coleta, totalmente invasivos, exemplificados pela punção venosa e pelo contato com pessoas estranhas (médicos e grupo de enfermagem), o que favorece o estresse, alterando os resultados de dosagem de cortisol¹.

1. Mestre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP. Auxiliar de ensino, Disciplina de Pediatria, Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP.
2. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, SP.
3. Doutora. Professora assistente, Disciplina de Pneumologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP.

Este artigo é parte da tese intitulada "Valores de referência de cortisol salivar para a avaliação adrenal em crianças menores de três anos, sem patologias", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, para a obtenção de título de mestre, em 17/04/2002.

Artigo submetido em 11.09.06, aceito em 16.11.06.

Como citar este artigo: Silva ML, Mallozi MC, Ferrari GF. Salivary cortisol to assess the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in healthy children under 3 years old. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(2):121-126.

doi 10.2223/JPED.1598

Outra particularidade na criança deve-se ao seu metabolismo imaturo, que pode gerar complicações inesperadas na análise laboratorial, como hipoglicemia grave durante teste de tolerância à insulina¹.

Os exames de avaliação hipofisária-adrenal incluem medida de cortisol endógeno, denominado cortisol basal, dosagem do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e testes dinâmicos de supressão e de estímulo. Na prática clínica, o sangue e a urina são os meios mais utilizados para dosar o cortisol basal. No entanto, são recursos que apresentam aspectos negativos, por necessitarem de punção venosa e pela dificuldade de coleta de urina sem perdas, durante 24 h, especialmente nos lactentes e nas meninas².

Dosagem de cortisol na saliva proporciona um método de fácil coleta e fidedigno para avaliar a função adrenal. É um exame alternativo e mais sensível quando comparado às técnicas plasmática e urinária, além de permitir repetidas coletas sem estresse ou espoliação sanguínea^{1,3-11}. Os trabalhos de literatura mostram a aplicabilidade da dosagem de cortisol salivar para o estudo do ritmo circadiano¹²⁻¹⁵, das alterações da função cognitiva e da interferência do estresse sobre o eixo, desencadeado por ansiedade, depressão, síndrome do pânico e privação do sono¹. O emprego mais recente desse método é no diagnóstico da síndrome de Cushing^{2,16,17}. Todavia, a literatura é escassa de informações a respeito dos níveis de normalidade de cortisol salivar na infância.

O presente estudo propõe estabelecer taxas de concentração de cortisol mensurado na saliva em menores de 3 anos, saudáveis, nos períodos matutino e vespertino, avaliando os fatores de interferência nessa dosagem. Outro objetivo é identificar a presença de ritmo circadiano e a idade em que o eixo HHA passa a ser maturo.

Métodos

Estudo observacional controlado, aprovado pela comissão de ética e pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC e da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, com livre consentimento de participação pela assinatura do responsável. Participaram 91 crianças com idade de 45 dias a 36 meses, submetidas a coleta de saliva para dosagem de cortisol salivar. Como critérios de inclusão, foram considerados grau nutricional adequado, sem antecedência de cardiopatia, nefropatia ou neuropatia, ausência de febre no mínimo 48 h e sem uso de corticóide sistêmico, inalatório ou tóxico, pelo menos há 15 dias.

A seleção das crianças foi por levantamento de prontuários do ambulatório da Faculdade de Medicina do ABC, em Santo André (SP), em outubro de 2001, avaliando grau nutricional adequado e faixa etária (critério de inclusão). Na análise, houve subdivisão por faixa etária com intervalos de 6 meses da seguinte forma: subgrupo 1: 45 dias |— 6 meses; subgrupo 2: 6 |— 12 meses; subgrupo 3: 12 |— 18 meses; subgrupo 4: 18 |— 24 meses; subgrupo 5: 24 |— 36 meses.

No domicílio, foram conferidas as medidas antropométricas e aplicado questionário para avaliar número de refeições

diárias e horas de sono, além dos outros critérios de inclusão estabelecidos. Foram obtidas amostras salivares sob supervisão do pesquisador, nos períodos manhã (7 às 10 h) e tarde (15 às 18 h), respeitando intervalo mínimo de 30 minutos das refeições¹⁸. Na coleta, instilou-se ácido cítrico a 5% no leito sublingual, permitindo o aumento do fluxo de saliva¹⁹. Foram aspirados 0,5 a 1 mL de saliva da cavidade oral, transferidos a um tubo Eppendorff e estocados em *freezer* com armazenamento a -20 °C até o ensaio⁹.

A fração livre de cortisol salivar foi determinada em duplicata, em um mesmo ensaio, por técnica de radioimunoensaio, sem extração, com anticorpo anticortisol 3-oxima acoplado à albumina bovina⁹. A variação interensaio com *pool* médio de corticóide de 251 ng/dL foi de 11,5%, e no intra-ensaio, inferior a 10%, com sensibilidade de 1,7 nmol/L. Os valores de dosagem de cortisol salivar foram expressos em nmol/L e percentis.

Realizou-se a análise estatística pelo programa BioEstat 3.0. Aplicou-se o teste *t* de Student para verificar a homogeneidade da amostra em relação ao número de crianças em cada subgrupo, horário de coleta nos dois períodos e tempo de sono. Os subgrupos foram comparados em relação à dosagem de cortisol salivar por teste *t* de Student e análise de variância (ANOVA), com nível de decisão alfa de 0,01. Os dados tiveram transformação logarítmica devido à distribuição assimétrica. Fatores de interferência na dosagem de cortisol, como sexo, peso, estatura, superfície corporal, horas de sono noturno e número de refeições diárias, foram analisados por regressão linear múltipla.

Considerando erro β de 5%, erro α 1%, uma diferença de 211,5 nmol/L entre as médias, de 136,4 nmol/L entre os desvios padrão dos dois grupos (matutino e vespertino) e uma variância de 95%, o tamanho amostral determinado foi de 71 crianças para cada grupo.

Resultados

As 91 crianças, 46 do sexo masculino, não apresentaram diferenças na distribuição da faixa etária entre o cinco subgrupos ($p = 0,99$) no horário de coleta de saliva (matutino, $p = 0,17$; vespertino, $p = 0,38$) e no período de repouso noturno ($p = 0,37$), mostrando homogeneidade da amostra.

As dosagens do cortisol salivar matutino e vespertino comparadas pelo teste *t* de Student mostraram que o cortisol da manhã era mais alto que o da tarde em todas as idades ($p < 0,001$) (Figura 1). As diferentes faixas etárias apresentaram médias de cortisol iguais ($p > 0,05$), no período da manhã e no período da tarde, pelo teste de ANOVA (Figura 1).

Em relação às horas de sono noturno de todas as crianças, a média e o desvio padrão foram de $10 \pm 2,5$ h ($p = 0,37$). Quanto ao número de refeições diárias, as crianças menores de 1 ano tinham oito, e as crianças maiores, quatro.

Houve correlação linear negativa do cortisol matutino entre horas de sono noturno ($p = 0,026$) e número de refeições diárias ($p = 0,017$). Em relação ao sexo, não foi observada diferença estatística na dosagem matutina ($p = 0,17$) e vespertina

tina ($p = 0,46$). Medidas antropométricas relacionadas ao peso, estatura e superfície corpórea mostraram correlação linear negativa para a dosagem salivar vespertina ($p < 0,05$).

A Figura 2 ilustra valores medianos de cortisol salivar matutino e vespertino e suas amplitudes, em percentagem, nos cinco subgrupos. Essa amplitude é a diferença entre o valor mediano da medida de cortisol matutino do valor vespertino de cada subgrupo etário. Amplitude acima de 30% e com significado estatístico (ANOVA) a partir de 12 meses de vida (subgrupo 3, $p = 0,0002$).

Os valores médios (\pm erro padrão médio) observados para a dosagem matutina foram $557,86 \pm 37,72$ nmol/L, com variação de 76,88 a 1.620,08 nmol/L (percentis 2,5 a 97,5), e para a vespertina foram de $346,36 \pm 23,42$ nmol/L, com variação de 50,92 a 1.169,36 nmol/L (percentis 2,5 a 97,5) (Tabela 1).

Cortisol salivar (nmol/L)

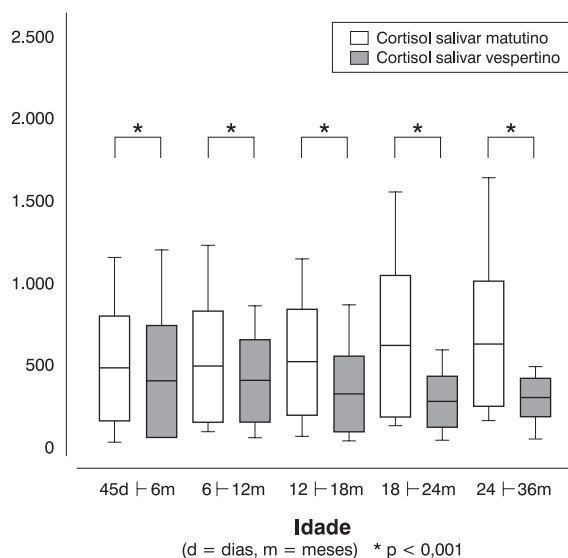


Figura 1 - Dosagens matutina e vespertina de cortisol salivar, de acordo com a idade ($n = 91$), representação em quartis

Discussão

A dosagem de cortisol na saliva surgiu na década de 1960, com trabalhos pioneiros que identificaram corticosteróides no fluido de parótida. No entanto, na época houve baixa repercussão, porque as técnicas eram pouco sensíveis, exigindo volumes de saliva impraticáveis. Os métodos radioimunológicos para a dosagem de hormônios esteróides reacenderam o interesse pela mensuração na saliva, destacando os estudos da Escola Médica da Universidade do País de Gales, em Cardiff, que mostrou, através de numerosas publicações, a viabilidade prática desse exame¹⁹.

O método radioimunológico utiliza o sobrenadante, no caso saliva centrifugada, adicionado ao anticorpo específico contra o cortisol e ao cortisol radioativo. Em semelhança à diálise, ocorre o equilíbrio da concentração de cortisol radioativo ligado ao anticorpo e do cortisol salivar a ser dosado,

Cortisol salivar (nmol/L)

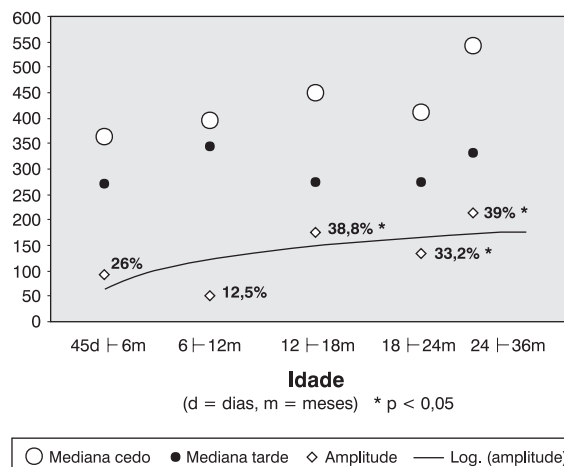


Figura 2 - Variação percentual e tendência da amplitude entre as dosagens matutina e vespertina de cortisol salivar, de acordo com a idade ($n = 91$)

também ligado ao anticorpo. Um cintilador líquido faz a contagem da concentração do complexo cortisol radioativo e anticorpo, traduzindo o valor de cortisol livre no sobrenadante⁹.

A garantia da qualidade do método é o anti-soro, conforme sua afinidade para os metabólitos esteróides, sendo o mais utilizado o cortisol-3-oxima acoplado à albumina bovina, com origem a partir da imunização em coelhos. Esse anti-soro foi sintetizado no laboratório Fleury pelo Prof. Dr. José Gilberto H. Vieira em 1975²⁰ e é comparável aos melhores anti-soros descritos na literatura. O exame tem alta especificidade ao cortisol (100%), baixa reação cruzada para cortisona (8,5%), corticosterona (1,6%) e 11-deoxicortisol (7,9%), dexametasona e budesonida (abaixo de 0,1%), sem reação cruzada significativa (menor que 1%) para outros esteróides.

No plasma, o cortisol, em sua maior concentração, permanece ligado às proteínas específicas, sendo a parte livre responsável pela atividade biológica do hormônio. Pelo método de dosagem de cortisol na saliva, é possível avaliar exclusivamente a fração livre de cortisol basal, sem necessitar de métodos de extração pela capacidade dialítica da membrana basal das glândulas salivares. Isso é importante, porque aumenta a confiabilidade técnica, independente da existência de hipoproteinemia⁸⁻¹⁰. Outra vantagem é a estabilidade das amostras salivares à temperatura ambiente por 1 semana, possibilitando o envio do material por correio ao laboratório, por exemplo, sem perda da atividade do cortisol²¹. Ainda, a coleta de saliva, em diferentes períodos do dia, pode estabelecer o ritmo circadiano de forma prática e não-invasiva^{1,6,8,11,14,15}.

Estudos comparativos da dosagem salivar com a plasmática livre relatam boa correlação em crianças e adultos^{2,4,9,13}. As variações correspondentes das dosagens de cortisol, avaliadas concomitantemente nas amostras salivares e séricas, mesmo sob diferentes técnicas laboratoriais, em resposta aos testes de estímulo com ACTH e de supressão com dexametasona, validam a confiabilidade do exame sali-

Tabela 1 - Distribuição em percentis das dosagens matutina e vespertina de cortisol salivar em crianças até 36 meses de idade (n = 91)*

Percentis	Cortisol salivar matutino	Cortisol salivar vespertino
	nmol/L	nmol/L
2,5	76,88	50,92
5	150,75	66,13
10	204,16	118,61
15	226,18	143,53
20	254,39	174,74
25	288,00	200,14
30	309,83	212,89
35	334,10	250,00
40	398,26	268,44
45	411,27	276,07
50	462,43	291,91
55	518,79	322,83
60	549,13	347,98
65	621,39	373,41
70	670,52	426,01
75	832,37	462,43
80	944,51	504,62
85	1.043,93	568,79
90	1.134,10	693,64
95	1.328,61	899,42
97,5	1.620,08	1.169,36

Média (\pm erro padrão): cortisol matutino, 557,86 \pm 37,72 nmol/L; cortisol vespertino, 346,36 \pm 23,42 nmol/L.

* Técnica de dosagem: radioimunoensaio competitivo com anticorpo anticortisol-3-oxima acoplado à albumina bovina.

var^{1,8,13,16,19}. Quanto à dosagem em urina 24 h, Jerjes et al.²² mostraram, em adultos sob corticoterapia, a equivalência à dosagem salivar na avaliação do eixo HHA.

Apesar da demonstração clara da aplicabilidade da dosagem de cortisol salivar, é surpreendente a sua baixa utilização. Somente nos últimos anos esse método foi mais divulgado, porém ainda dispendioso de um número restrito de pesquisas em crianças¹. No presente estudo, observamos facilidade e rapidez da coleta, podendo ser realizada em qualquer ambiente sem maiores recursos técnicos e estruturais, além de não haver risco de perda de material, como pode ocorrer na coleta de urina 24 h em crianças pequenas. Em relação ao paciente, o procedimento não induz ao choro, pois não proporciona estímulos dolorosos.

O cortisol é o principal glicocorticóide endógeno capaz de interferir na atividade orgânica, influenciando a retroinibição do eixo HHA. Sua síntese é sincrônica, com valor máximo pela manhã, decrescente no decorrer do dia e mínimo à noite, determinando o ritmo circadiano. Tumor adrenal ou hipofisário, produção ectópica de ACTH, cirurgia, sépsis, trauma, doença de Addison e, especialmente, corticoterapia exógena são alguns dos fatores que podem interferir no eixo HHA, alterando o ritmo circadiano.

Na análise laboratorial do eixo HHA, é importante considerar a possibilidade de divergência dos resultados entre as

diferentes técnicas, dificultando a real interpretação do comprometimento orgânico. Foram registrados casos de tratamento com esteróide que, mesmo apresentando prejuízo do crescimento, fraturas e catarata, tinham testes laboratoriais por dosagem de cortisol plasmático pela manhã e estímulo ACTH sintético inalterados²³. Esses achados colocaram a real dúvida da qualidade do método de laboratório, levando à necessidade de reconsideração do mesmo.

O reconhecimento da superioridade do cortisol salivar aos métodos de dosagem plasmática e de urina 24 h veio em 2002, nos EUA²⁴. Em relação à corticoterapia, a eficácia do cortisol salivar foi demonstrada por Patel et al.²⁵ ao monitorizarem pacientes em uso de corticóide nasal, com coleta de saliva pela manhã. Esses autores observaram que a dosagem de cortisol salivar é um método não-invasivo e econômico, de valor preditivo positivo de 100% em comparação ao teste de ACTH.

Na avaliação do eixo HHA, é imprescindível observar a presença do ritmo circadiano. A decisão dos horários de coleta foi baseada em estudos prévios^{1,12,14,26}, que mostram queda dos níveis de cortisol a partir das 16 h com nadir entre 20 e 24 h. No presente estudo, fica clara a queda dos valores, pois sendo a média de horário de coleta da tarde às 16 h, observamos a diferença das dosagens matutinas e vespertinas em todos os subgrupos.

Diante da imaturidade da criança, há dúvida quanto à idade de início de ritmo, sendo que a literatura mais atual considera que esse sincronismo se inicia entre 8 a 12 semanas^{4,14,15}. Outros autores colocam que a criança pode apresentar diferença na dosagem de cortisol entre os períodos do dia, mas que essa diferença só assumirá uma amplitude semelhante ao adulto quando o ritmo for maduro. Zurbrügg²⁷ sugeriu que, a partir de 2 anos, é possível ocorrer o amadurecimento circadiano.

No presente estudo, as 91 crianças apresentaram medidas de cortisol salivar matutinas superiores às vespertinas ($p < 0,001$), caracterizando a presença de ritmo integralmente nos subgrupos etários. Além disso, notamos que, conforme há o aumento da idade, a diferença entre as medidas de dosagem do cortisol matutino e vespertino torna-se mais evidente, sendo de valor significativo a partir de 12 meses. Segundo Santiago et al.¹⁵, um ritmo circadiano que atinge a maturidade deve apresentar pelo menos 33% de diferença na medida de dosagem de cortisol entre os períodos. Esse percentual de amplitude foi notado em nossa análise após 1 ano, permitindo concluir que nessa população de crianças saudáveis, aos 45 dias de vida é possível expressar ritmo circadiano, com total maturidade acima de 1 ano de idade.

Inúmeros fatores ambientais e comportamentais, denominados de sincronizadores, interferem na dosagem de cortisol e, portanto, na expressão circadiana. Um sincronizador não cria um ritmo, ele apenas influencia a sua expressão, alterando o período do seu pico relacionado à hora do dia, sendo alimentação e repouso exemplos clássicos²⁸. A interferência da dieta sobre o cortisol foi ilustrada por Oliveira et al.²⁶, que dosaram corticosterona sérica em camundongos com acesso livre e restrito à dieta, observando maior taxa de corticosterona pela manhã, durante a restrição de dieta, não ocorrendo o mesmo com a vespertina. Em relação ao sono, o cortisol sérico é menor durante o repouso do que em atividade²⁹. Os nossos resultados mostraram correlação linear negativa para a medida matutina de cortisol entre as horas de sono noturno ($p = 0,026$) e número de refeições diárias ($p = 0,017$). Isso significa que privações de sono e de dieta funcionam como um mecanismo de estresse, elevando produção matutina de cortisol, conforme os relatos da literatura²⁸.

Sabendo que a criança de baixa idade, sem dúvida, apresenta maior número de refeições diárias e horas de sono e que isso, de acordo com os dados anteriores, pode refletir em baixa taxa de cortisol matutino, torna-se compreensível a amplitude acima de 33% somente após 1 ano. Outro aspecto interessante é o aparecimento de ritmo circadiano no prematuro em período cronológico semelhante ao do neonato a termo¹² ou até antes¹³. Dessas observações, podemos sugerir que o fator envolvido na maturidade do eixo HHA não é verdadeiramente uma data fixa, mas sim a influência do ambiente, dos hábitos e da cultura entre os povos.

Quanto aos fatores de interferência na dosagem de cortisol, observamos que o sexo não influenciou na dosagem, con-

cordando com outros autores^{4,5}. Por outro lado, o peso, a estatura e a superfície corporal mostraram correlação linear negativa para a dosagem vespertina de cortisol. Não foi encontrada na literatura referência sobre correlação negativa somente no período vespertino para essa faixa etária em relação aos dados antropométricos. Kiess et al.⁵ notaram que a dosagem de cortisol salivar apresentou dependência da idade, principalmente a partir dos 6 anos, com correlação positiva de acordo com o estágio puberal e com o peso em todos os horários de coleta: manhã, tarde e noite. Essas observações exaltam a influência do desenvolvimento corporal na dosagem de cortisol, muito provavelmente aliado às alterações hormonais da adolescência.

Linder et al.³⁰, avaliando crianças e adolescentes de 8 a 17 anos, mostraram que a produção diária de cortisol na criança é quase 50% menor (adolescente: 12 mg/m²/dia; criança: 7 mg/m²/dia). Dessa forma, ressaltamos a importância de se realizar estudos sobre valores de cortisol em faixa etária pediátrica exclusiva e a existência de uma padronização de valores de dosagem de cortisol salivar correspondente à primeira infância, adolescência e adultos. Na literatura, encontramos referência de dosagem de cortisol salivar apenas para adultos. Partindo da homogeneidade entre os subgrupos etários, houve a disposição para a análise das 91 amostras, com o propósito de se estabelecer os valores de referência de normalidade de cortisol salivar esperados para crianças saudáveis. Estabeleceu-se a unidade de nmol/L para os valores de cortisol salivar em virtude de ser a expressão mais freqüente na literatura internacional, apesar de encontrarmos referências nacionais em µg/dL e ng/dL^{1-3,9,12-16}.

Conclusão

Dosagem de cortisol basal na saliva é método simples para a triagem de avaliação da atividade adrenal, podendo ser aplicada nas crianças de forma prática e não-invasiva. Os fatores de interferência a serem considerados nessa dosagem são as privações do repouso e da dieta, que provavelmente podem desencadear o estresse, aumentando a síntese matutina de cortisol. Peso, estatura e superfície corporal correlacionam negativamente com a dosagem vespertina de cortisol salivar.

Considerando menores de 3 anos, saudáveis, sob a técnica de dosagem de cortisol salivar por radioimunoensaio e anticorpo anticortisol-3 oxima-albumina bovina, os valores médios (\pm erro padrão médio) esperados para a dosagem matutina foram 557,86 \pm 37,72 nmol/L, com variação de 76,88 a 1.620,08 nmol/L (percentis 2,5 a 97,5) e para a vespertina, 346,36 \pm 23,42 nmol/L, com variação de 50,92 a 1.169,36 nmol/L (percentis 2,5 a 97,5).

É certa a presença de ritmo circadiano aos 45 dias de vida, porém sua maturidade estará completa, garantindo uma resposta semelhante ao comportamento adulto, a partir de 1 ano de idade, conforme a observação nesta amostra estudada. O importante é ressaltar que, muito provavelmente, não

existam datas fixas para a expressão da atividade circadiana do eixo HHA. Ao contrário, esse período pode ser mutável na dependência de variações das características ambientais e costumes da população específica.

Referências

1. Castro M, Moreira AC. [Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal](#). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:358-67.
2. Castro M, Elias PC, Quidute AR, Halah FP, Moreira AC. [Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests](#). *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:878-82.
3. Fogaça MC, Carvalho WB, Peres CA, Lora MI, Hayashi LF, Verreschi ITN. [Cortisol salivar como indicador da função adrenocortical em lactentes saudáveis com massagem terapêutica](#). *Sao Paulo Med J.* 2005;123:215-18.
4. Francis SJ, Walker RF, Riad-Fahmy D, Hughes D, Murphy JF, Gray OP. [Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations](#). *J Pediatr.* 1987;111:129-33.
5. Kiess W, Meidert A, Dressendörfer RA, Schriever K, Kessler U, König A, et al. [Salivary cortisol levels throughout childhood and adolescence: relation with age, pubertal stage, and weight](#). *Pediatr Res.* 1995;37:502-6.
6. Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP. [Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function](#). *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66:343-8.
7. Malamud D, Tabak L. [Saliva as a diagnostic fluid](#). *Ann NY Acad Sci.* 1993;694:1-343.
8. Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, Shimada T, Miura F, Sato T. [Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum](#). *Clin Chim Acta.* 1981;110:245-53.
9. Vieira JGH, Noguti KO, Hidal JT, Russo EMK, Maciel RMB. [Ensaio do cortisol na saliva como um método para avaliação da fração livre sérica](#). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1984;28:8-10.
10. Walker RF. [Salivary corticosteroids: clinical and research applications](#). *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989;27:234-5.
11. Woolston JL, Gianfredi S, Gertner JM, Paugus JA, Mason JW. [Salivary cortisol: a nontraumatic sampling technique for assaying cortisol dynamics](#). *J Am Acad Child Psychiatry.* 1983;22:474-6.
12. Antonini SR, Jorge SM, Moreira AC. [The emergence of salivary cortisol circadian rhythm and its relationship to sleep activity in preterm infants](#). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;52:423-6.
13. Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE Jr. [Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants](#). *J Pediatr.* 2002;140:116-8.
14. Custódio RJ. [Avaliação da idade do aparecimento do ritmo circadiano do cortisol salivar em gêmeos \[tese\]](#). São Paulo (Departamento de Endocrinologia): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2005.
15. Santiago LB, Jorge SM, Moreira AC. [Longitudinal evaluation of the development of salivary cortisol circadian rhythm in infancy](#). *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44:157-61.
16. Martinelli CE Jr., Sader SL, Oliveira EB, Daneluzzi JC, Moreira AC. [Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children](#). *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999;51:67-71.
17. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou I, Nieman LK. [Night time salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome](#). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4515-21.
18. Magnano CL, Diamond EJ, Gardner JM. [Use of salivary measurements in young infants: a note of caution](#). *Child Dev.* 1989;60:1099-101.
19. Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF. [Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva](#). *Clin Chem.* 1978;24:1460-3.
20. Vieira JGH, Noguti KO, Rayol MP, Maciel RMB. [Desenvolvimento e caracterização de método para a dosagem de cortisol livre urinário](#). *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000;44:233-8.
21. Chen YM, Cintron NM, Whitson PA. [Long-term storage for salivary cortisol samples at temperature](#). *Clin Chem.* 1992;38:304.
22. Jerjes WK, Cleare AJ, Wood PJ, Taylor NF. [Assessment of subtle changes in glucocorticoid negative feedback using prednisolone: comparison of salivary free cortisol and urinary cortisol metabolites as endpoints](#). *Clin Chim Acta.* 2006;364:279-86.
23. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Pulmonary Allergy Drugs Advisory Committee, Endocrinology and Metabolic Drugs Advisory Committee. [Orally inhaled/intranasal corticosteroids and growth in children](#). Bethesda: FDA; 1998.
24. National Asthma Education and Prevention Program. [Expert Panel Report: Guidelines for the diagnosis and management of asthma update on selected topics 2002](#). *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:S141-219.
25. Patel RS, Wallace AM, Hinnie J, McGarry GW. [Preliminary results of a pilot study investigating the potential of salivary cortisol measurements to detect occult adrenal suppression secondary to steroid nose drops](#). *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2001;26:231-4.
26. Oliveira MHA, Antunes Rodrigues J, Leal AMO, Elias LLK, Moreira AC. [Circadian variations of plasma atrial natriuretic peptide and corticosterone in rats with continuous or restricted access to food](#). *Life Sciences.* 1993;53:1795-801.
27. Zurbrugg RP. [Hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. A contribution to its assessment, development and disorders in infancy and childhood with special reference to plasma cortisol circadian rhythm](#). *Monogr Paediatr.* 1976;7:1-83.
28. Spangler G. [The emergence of adrenocortical circadian function in newborns and infants and its relationship to sleep, feeding and maternal adrenocortical activity](#). *Early Hum Dev.* 1991;25:197-208.
29. Tennes K, Vernadakis A. [Cortisol excretion levels and daytime sleep in one-year-old infants](#). *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;44:175-9.
30. Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, Cassorla F. [Cortisol production rate in childhood and adolescence](#). *J Pediatr.* 1990;117: 892-6.

Correspondência:
 Margarete Lopes da Silva
 Rua Sosuke Shigekiyo, 68 – Jardim Patente
 CEP 04243-240 – São Paulo, SP
 Tel.: (11) 6947.1087
 E-mail: igorlopes@uol.com.br