



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto



UTILIDADE DO TESTE DO GLUCAGON NO DIAGNÓSTICO DAS DEFICIÊNCIAS DE GH E CORTISOL EM PEQUENAS LESÕES HIPOFISÁRIAS

VIVIANE CHAVES DE CARVALHO ROCHA

**São Luís - MA
2018**

VIVIANE CHAVES DE CARVALHO ROCHA

**UTILIDADE DO TESTE DO GLUCAGON NO DIAGNÓSTICO
DAS DEFICIÊNCIAS DE GH E CORTISOL EM PEQUENAS
LESÕES HIPOFISÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração:

Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Linha de Pesquisa:

Saúde e Metabolismo Humano –
Alterações Endócrinas.

Orientador:

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria.

Coordenadora:

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares
Brandão Nascimento.

**São Luís - MA
2018**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Rocha, Viviane Chaves de Carvalho.
UTILIDADE DO TESTE DO GLUCAGON NO DIAGNÓSTICO DAS
DEFICIÊNCIAS DE GH E CORTISOL EM PEQUENAS LESÕES
HIPOFISÁRIAS / Viviane Chaves de Carvalho Rocha. - 2018.
98 f.

Orientador(a): Manuel dos Santos Faria.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Sao Luis, 2018.

1. Deficiência de cortisol. 2. Deficiência de GH. 3.
Microadenoma não-funcionante. 4. Microprolactinoma. 5.
Teste do Glucagon. I. Faria, Manuel dos Santos. II.
Título.

VIVIANE CHAVES DE CARVALHO ROCHA

**UTILIDADE DO TESTE DO GLUCAGON NO DIAGNÓSTICO
DAS DEFICIÊNCIAS DE GH E CORTISOL EM PEQUENAS
LESÕES HIPOFISÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: / / **2018**.

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. João Francisco Furtado Neto (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dra. Adriana Maria Guimarães Sá Beckman (Examinador)
Faculdade Estácio de São Luís

Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

À melhor parte de mim: Heitor e Alice!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por que dele vem toda a força.

Ao meu pai (*in memoriam*), meu ídolo, meu exemplo de pessoa aguerrida, de persistência, honra e inteligência.

À minha mãe, que sempre foi exemplo de resiliência, dedicação e amor aos filhos.

Ao meu esposo pelo incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos, sobrinhos, minha família, com quem sempre tenho os momentos mais amenos.

Aos amigos e colegas de profissão Gilvan Cortês e Sabrina Damianse, pelo companheirismo, pela ajuda nas horas difíceis e pelas conversas leves e descontraídas ao longo destes anos.

A minha querida amiga Flora, um dos presentes que a UFMA me deu desde 1993, e que desde então é uma companheira, amiga, e aquela que sempre esteve presente nos melhores e piores momentos : amiga que amo!!!!

As minhas amigas queridas: Vanise, Luísa e Cassandra, vocês são uma presença constante e que tornam minha vida mais leve. Obrigada!

A todos os colegas da Endocrinologia, residentes, enfermeiros, seguranças, pessoal do administrativo e da limpeza, todos profissionais que contribuem sobremaneira para o funcionamento de excelência do nosso serviço.

À técnica de enfermagem Cléo e à enfermeira Rômia, pela ajuda na realização dos testes e pela paciência e disponibilidade SEMPRE dispensadas: a vocês meu muito obrigada!

Às enfermeiras e técnicas de enfermagem Vivian, Cléo, Fátima, Josete, e a todos os funcionários do CEPEC pela ajuda constante.

Ao aluno, Fernando Santos, que me acompanhou desde o início na coleta de dados e que teve importância fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os pacientes que participaram do estudo, minha enorme gratidão!

Ao meu orientador, professor, amigo, Dr. Manuel dos Santos Faria, profissional ético, admirável, um guia, e um grande influenciador, ainda na minha tenra formação na graduação, para a escolha da Endocrinologia como especialidade a ser seguida: minha gratidão!

‘Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.’

(Fernando Pessoa)

RESUMO

É consensual na literatura a investigação do eixo hipotálamo-hipofisário com testes de estímulo somente em lesões hipofisárias maiores que 1cm. Os tumores hipofisários menores que 1cm podem apresentar deficiências de GH e cortisol aos testes de estímulo. Avaliamos neste trabalho a resposta do GH e cortisol ao Teste do Glucagon de 3h de duração (dose fixa: 1mg e 1,5mg de Glucagon em <90 kg e ≥91 kg, respectivamente) em 40 pacientes com lesões hipofisárias menores que 1cm, e posterior realização do Teste de Tolerância à Insulina (ITT) para confirmação das deficiências. No Teste do Glucagon, 3,7% (n=1) dos microprolactinomas não responderam ao GH (<3 ng/mL) e 77,8% (n=21) apresentaram valor de cortisol >18 µg/dL, enquanto 37,5% dos microadenomas não-funcionantes tiveram subresposta ao GH. Todos os 40 pacientes obtiveram valores de GH>1 ng/mL. As deficiências de GH e cortisol não foram confirmadas no ITT nos pacientes que apresentaram deficiências ao Teste do Glucagon. Nossos achados demonstram que o Teste do Glucagon apresenta um elevado número de resultados falsos-positivos com maiores valores de *cut-offs*. O Teste do Glucagon mostrou-se um opção segura quando há contra-indicação ao Teste de Tolerância à Insulina. Os testes de estímulo não devem ser rotineiramente indicados na avaliação do eixo hipotalâmico-hipofisário em lesões menores que 1cm, a não ser nos casos que haja alterações metabólicas/clínicas sugestivas de tais deficiências ou diminuição progressiva de IGF1 e cortisol durante o acompanhamento rotineiro destes pacientes. Há uma necessidade de adequação dos *cut-offs* tanto para GH quanto para o cortisol.

Palavras-Chaves: Microprolactinomas. Microadenomas Não-Funcionantes. Teste de Estímulo com Glucagon. Dose Fixa. Teste de Tolerância à Insulina. Deficiência de GH. Deficiência de Cortisol.

ABSTRACT

The consensus in the literature is that the hypothalamic–pituitary axis should be investigated with stimulus tests only for pituitary lesions larger than 1 cm. Pituitary tumors smaller than 1 cm may present deficiencies of growth hormone and cortisol to the stimulus tests. We evaluated the response of growth hormone and cortisol to the glucagon test of 3 h duration (fixed dose: 1mg and 1,5mg Glucagon on 90 kg and $\geq$ 90kg, respectively) in 40 patients with pituitary lesions smaller than 1 cm, followed by an insulin tolerance test (ITT) to confirm the deficiencies. In the glucagon test, 3.7% (n=1) of the microprolactinomas did not respond to growth hormone (<3 ng/mL) and 77.8% (n= 21) presented cortisol values >18 μ g/dL, while 37.5% of the nonfunctioning microadenomas had a sub-growth hormone (GH deficiency). All 40 patients had growth hormone value >1 ng/mL. Deficiencies of growth hormone and cortisol were not confirmed by the ITT in patients who had on Glucagon Test deficiencies . Our findings demonstrate that the glucagon test has a high number of false positive results with higher cutoff values. The glucagon test has been shown to be a safe option when there is a contraindication to the ITT. Stimulus tests should not be routinely indicated for evaluation of the hypothalamic–pituitary axis in cases of lesions smaller than 1 cm, except in cases where there are metabolic or clinical alterations suggestive of such deficiencies or progressive decreases of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and cortisol during routine follow-up of these patients. There is a need for adequate cutoffs for both growth hormone and cortisol.

Keywords:Microprolactinomas, Nonfunctioning microadenomas, Glucagon stimulation test; Fixed dose; Insulin tolerance test, Growth hormone deficiency, Cortisol deficiency

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AGLs	Ácidos Graxos livres
AVP	Arginina Vasopressina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPEC	Centro de Pesquisa Clínica
cm	Centímetros
COMIC	Comissão Científica
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio de Crescimento
GHRH	Hormônio Hipotalâmico Liberador do Hormônio de Crescimento
GHRP 6	Hormônio de Crescimento Estimulador do Peptídeo 6
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 ou Somatomedina C
IM	Intramuscular
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
LH	Hormônio Luteinizante
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PRL	Prolactina
RM	Ressonância Magnética
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

SC	Subcutânea
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Teste do Glucagon
TG	Teste do Glucagon
TSH	Hormônio Tireoestimulante
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização geral dos 40 pacientes com pequenas lesões hipofisárias incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	29
Tabela 2: Distribuição das respostas de GH e Cortisol ao Teste de Glucagon de acordo com o tipo de lesão hipofisária nos 40 pacientes incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, SãoLuís(MA).....	30
Tabela 3: Diferenças variáveis referentes ao nível de glicose entre as categorias de resposta ao Teste de Glucagon nos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	33
Tabela 4: Coeficiente de correlação de Spearman (r_s) entre as medidas de GH, Cortisol e Glicose nos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	35
Tabela 5: Análise de regressão linear múltipla para o Pico de GH e Nadir de Glicose no Teste Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Regulação da secreção de GH no eixo hipotalâmico-hipofisário.....	20
Figura 2: Participantes incluídos no estudo (amostra) com lesões hipofisárias pequenas no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)	25
Figura 3: Resposta durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas no diagnóstico de deficiências de GH e Cortisol e resposta da glicemia	31
Figura 4: Níveis de GH (a), Cortisol (b) e Glicose (c) durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	32
Figura 5: Distribuição da ocorrência do Pico de GH, Pico de Cortisol e Nadir de Glicose durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	33
Figura 6: Correlação de Pearson entre os picos de GH e Cortisol dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas no Teste do Glucagon no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)	34
Figura 7: Análise comparativa do Pico de GH, Pico de Cortisol e Nadir de Glicose entre ITT e Teste do Glucagon	36
Figura 8: Efeitos colaterais durante o Teste do Glucagon nos 40 pacientes incluídos no estudo com lesões hipofisárias pequenas no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Tipo de Estudo	23
4.2 Local e Período do Estudo	23
4.3 Critérios de Inclusão	23
4.4 Critérios de Não-Inclusão	23
4.5 Participantes do Estudo (Amostra)/Coleta de Dados	24
4.6 Aspectos Éticos	27
4.7 Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES.....	48
Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	49
APÊNDICE B: Ficha-Protocolo de Pesquisa	52
ANEXOS	56
Anexo A: Parecer de Autorização COMIC - HUUFMA	57
Anexo B: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	59
Anexo C: Normas editoriais/Normas para os autores	65
Anexo D: Artigo submetido: Usefulness of the Glucagon Test in the Diagnosis of Growth Hormone and Cortisol Deficiencies in Small Pituitary Lesions	73

1 INTRODUÇÃO

Adenomas hipofisários são proliferações clonais que respondem por cerca de 10-15% dos tumores intracranianos, sendo o terceiro tipo mais comum após meningiomas e gliomas (SCHEITHAUER et al, 2006, ASA, 2011). Podem ser diagnosticados de forma incidental, ou seja, quando não suspeitados a partir de uma investigação inicial, em até 20% dos indivíduos e menos frequentemente, quando de um quadro clínico correspondente, apresentando uma prevalência de cerca de 80 casos por cada 100.000 habitantes (EZZAT *et al.*, 2004; DALY et al, 2006; FERNANDEZ et al, 2010). Os adenomas hipofisários não funcionantes representam, aproximadamente, de 15-39% de todos os tumores hipofisários, com uma prevalência de 70-90 casos/1.000.000 habitantes, enquanto que os prolactinomas têm uma prevalência de 60-100 casos/1.000.000 habitantes e são os mais frequentes dentre os tumores hipofisários secretores (MELMED, 2015).

Em decorrência da inatividade hormonal de alguns tumores hipofisários, muitas destas lesões tendem a ser assintomáticas e não-secretoras. Usualmente escapam da detecção mais precoce e somente serão reconhecidas quando tornarem-se grandes o suficiente para exercerem compressão local e sintomas relacionados como alterações de campo visual e de pares cranianos, dentre outras. Bioquimicamente, uma ou mais deficiências hipofisárias estão presentes ao diagnóstico em 62-85% dos adenomas hipofisários não funcionantes maiores que 1cm (macroadenomas). Adicionalmente, testes dinâmicos são necessários em muitos casos para avaliação das deficiências, particularmente da reserva de GH (Hormônio de Crescimento) e o eixo ACTH (Hormônio Adrenocorticotrófico)/adrenal através da dosagem de cortisol (CAROSI *et al.*, 2015; SNYDER, 2015). Hipopituitarismo tem sido reportado em uma frequência estimada de 4-21 casos/100.000 habitantes na ausência de grandes lesões hipofisárias (REGAL *et al.*, 2001).

Os microadenomas não-funcionantes (<1cm) são a forma mais comum de incidentaloma hipofisário e, dependendo das séries, representam de 50-90% dos incidentalomas sólidos. Dentre os adenomas descobertos incidentalmente, mais de 99% são microadenomas. Estudos prévios de autópsia demonstraram uma prevalência de tumores hipofisários clinicamente não-funcionantes de cerca de 27%, mas com o advento do uso rotineiro de exames de imagens, como TC (Tomografia Computadorizada) e RM (Ressonância Magnética) de 1,5 e 3 Tesla, o achado incidental

de lesões hipofisárias tem aumentado substancialmente (YUEN *et al.*, 2008). Em imagens de RM, áreas de hipossinal sugerindo microadenoma hipofisário assintomático foram relatadas em 10% dos indivíduos saudáveis. À TC, a porcentagem varia de 4 a 20% quando há lesão maior que 3 mm (GALLAND *et al.*, 2015).

O acometimento patológico da glândula hipofisária determina, geralmente, predomínio na deficiência de GH, e isto explicaria a elevada prevalência de deficiência de GH em macroadenomas hipofisários ($\geq 1\text{cm}$), entretanto é pouco referenciada na literatura sua prevalência em microadenomas. Clinicamente, a deficiência de GH no adulto está associada com aumento da obesidade centrípeta, disfunções psicológicas, fraqueza muscular, fadiga, dificuldade de concentração, mal-estar geral, além de alterações metabólicas (MELMED, 2015). Já a deficiência do cortisol pode estar associada a adinamia, fadiga crônica, perda de peso, e nos casos mais graves, hipotensão ou choque. Assim, torna-se relevante a importância da detecção precoce destas deficiências.

O último Consenso da Endocrine Society Clinical Practice Guidelines (MOLITCH *et al.*, 2011), recomenda teste provocativo para avaliar GH nos macroadenomas em adultos, em um contexto clínico apropriado, seria mandatório para confirmação diagnóstica quando os níveis de IGF-1 são normais. Já em pacientes com microadenomas e níveis normais de IGF-1, não há consenso sobre a avaliação com testes provocativos. O teste considerado padrão-ouro para investigação é o Teste de Tolerância à Insulina (ITT), entretanto naqueles casos em que há contra-indicação, o GHRH-Arginina, quando disponível, e o Teste do Glucagon (TG) poderão ser realizados. Lembrando que o teste GHRH-Arginina não é mais disponibilizado em muitos países, inclusive no Brasil. (PAWLIKOWSKI; KUNERT-RADEK; RADEK, 2008; MOLITCH *et al.*, 2011; TABARIN; PEREZ, 2011; Há numerosos trabalhos na literatura corroborando o uso do ITT e TG na avaliação de patologias hipotálamo-hipofisárias, avaliação do eixo de GH e cortisol no pós-operatório de cirurgias hipofisárias e radioterapia. No entanto, não há dados suficientes na literatura que corroborem a investigação rotineira das deficiências de GH e cortisol com testes de estímulo em microadenomas hipofisários, bem como em cisto de bolsa de Rathke e sela parcialmente vazia. Desta forma, torna-se relevante a investigação destas deficiências em decorrência das manifestações sutis dos déficits de cortisol e GH que podem já estar presentes ao diagnóstico e não serem detectadas apenas com as dosagens basais do cortisol e IGF1 (Fator de Crescimento Semelhante à insulina 1 ou Somatomedina C.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os microadenomas hipofisários tendem a ser assintomáticos, podendo não apresentar secreção hormonal e, assim, escaparem de uma detecção precoce. O eixo somatotrófico é usualmente a primeira deficiência apresentada da hipófise anterior, o que poderia explicar a alta prevalência de deficiência de GH nos macroadenomas hipofisários que pode se apresentar de forma leve, tornando o diagnóstico no adulto, por vezes, um desafio, visto que não há um marcador, como a perda do crescimento linear que ocorre nas crianças com deficiência de GH. Os sinais/sintomas podem ser inespecíficos com alteração da composição corporal, perda de massa óssea, fadiga, adinamia ou alterações metabólicas como resistência insulínica e alterações glicêmicas com alta morbi-mortalidade e que podem ser revertidas com a reposição do GH. A deficiência de GH de início na fase adulta, usualmente, resulta de danos à hipófise que são mais comuns causados por cirurgia e/ou radioterapia para adenomas benignos. As deficiências de GH e cortisol, ainda assintomáticas, em microprolactinomas e microadenomas não-secretores, chamam a atenção para a possibilidade de reposição com melhora da morbidade e qualidade de vida, ou mesmo prevenção de deficiência grave de cortisol com risco de choque e óbito.

O cisto da Bolsa de Rathke é uma lesão que acomete a hipófise, mais precisamente a *pars intermedia* (localizada entre a hipófise anterior e posterior), proveniente das células cuboides ou das células epiteliais colunares ciliadas. É remanescente decorrente da obliteração incompleta da bolsa de Rathke durante o desenvolvimento embrionário. Embora estudos de autópsias indiquem que 20% das lesões hipofisárias incidentalmente descobertas são cistos da bolsa de Rathke. Achados clínicos relacionados a eles são incomuns, entretanto os pacientes podem apresentar cefaleia, distúrbios visuais, hiperprolactinemia e graus variados de hipopituitarismo decorrentes da compressão da haste hipotálamo-hipofisária ou reação inflamatória na hipófise secundária à lesão. Raramente há necessidade de indicação cirúrgica, particularmente naqueles com compressão do quiasma óptico e que, conseqüentemente, evoluem com alteração de campo visual. Cohan et al., (2004) revisaram 250 pacientes submetidos a cirurgia transesfenoidal por tumores hipofisários, onde 10% (24 pacientes) eram portadores de cisto de bolsa de Rathke. As características clínicas comumente encontradas foram: cefaleia (83%),

hiperprolactinemia (38%), irregularidade menstrual (60%), disfunção sexual em homens (60%) e falência dos hormônios da hipófise anterior: deficiência de GH - 33%; hipoadrenalismo - 50%; hipotireoidismo central – 40% e Diabetes Insipidus em 33%. Não há indicação de teste de estímulos, rotineiramente, na investigação de deficiências hipofisárias nos cistos da bolsa de Rathke (COHAN et al., 2004).

O achado de Sela Parcialmente Vazia é um dos diagnósticos diferenciais das patologias hipofisárias realizados com eficiência por meio de Ressonância Magnética da hipófise. Caracteriza-se por herniação da aracnoide supraselar para o interior da sela túrcica com consequente aumento da pressão líquórica local e, secundariamente, ocorre expansão óssea e remodelamento selar, além de achatamento da glândula hipofisária. Pode cursar com cefaleia, alterações clínicas decorrentes da hiperprolactinemia e de graus variados de hipopituitarismo, ou mais comumente, apresentar-se sem alterações clínicas e/ou hormonais. É um achado incidental em muitos casos e pode ser considerada, também, uma variante da normalidade onde há uma insuficiência do diafragma selar. Na ausência de cirurgia, radioterapia hipotálamo-hipofisária ou tratamento prévio medicamentoso para tumor hipofisário, ela é definida como Sela Parcialmente Vazia Primária (SAINDANE et al, 2013).

As diretrizes atuais recomendam avaliação inicial dos microadenomas não-funcionantes com dosagens apenas de prolactina e IGF1. A investigação do setor corticotrófico (ACTH/cortisol) somente deverá ser realizada na presença de sinais/sintomas de Síndrome de Cushing, enquanto a investigação da deficiência de GH nos adultos com testes provocativos deverá ser realizada em portadores de tumores hipofisários >1 cm, exceto nos pacientes com 3 ou mais deficiências hipofisárias e IGF-1 diminuído na investigação inicial, nos quais os testes provocativos tornam-se dispensáveis. Não há recomendações acerca desta investigação em microadenomas, especialmente para prolactinomas e os não-funcionantes. A suspeita de deficiência de GH deve ser realizada em grupos selecionados, tais como: doença hipotálamo-hipofisária conhecida, outras deficiências hipofisárias já estabelecidas, história de cirurgia/irradiação hipofisárias prévias, tratamento de tumor do Sistema Nervoso Central, Traumatismo Cranio-encefálico e hemorragia aracnoide (MOLITCH, 2011).

A acurácia na investigação do eixo hipotálamo-hipofisário é essencial em pacientes com doenças hipofisárias. Testes alternativos ao ITT têm sido propostos há décadas para esta avaliação, como Arginina (BELLONE et al, 2000); GHRH +

Arginina (AIMARETTI et al, 2000; MAGHINE et al, 2002; CORNELI et al, 2007;); GHRP-6, GHRP6 + GHRH (POPOVIC et al, 2000; PETERSEN et al, 2002;); e CRH (Hormônio Liberador de Corticotrofina) e, também, teste do ACTH sintético com doses mais baixas de 1µg (SCHMIDT et al, 2003). Entretanto, nem todos estes testes têm a capacidade de avaliar cortisol e GH simultaneamente, além do que alguns não estão disponíveis ou são muito dispendiosos. O IGF1 pode não ser um marcador confiável, sobretudo em pacientes com doenças e/ou uso de medicamentos que interfiram na sua avaliação, tais como: diabetes descompensado, doenças tiroideanas descompensadas, uso de estrogênios..., podendo ser um fator confundidor para o clínico decidir quem deve ou não ter a reserva de GH avaliada por teste de estímulo em microadenomas não secretores, particularmente na ausência de sinais/sintomas clínicos evidentes.

A avaliação de insuficiência adrenal é importante na investigação de lesões hipofisárias, sobretudo após pacientes submetidos a cirurgia e/ou radioterapia. As manifestações podem apresentar-se de forma grave através de choque e culminar em óbito, ou de forma sutil com quadro de fadiga crônica, perda de peso inexplicada e tonturas.

O Teste de Tolerância à Insulina foi desenvolvido no final dos anos de 1960, e desde então é considerado o melhor teste para avaliação da resposta de GH e cortisol em pacientes com doença hipotálamo-hipofisária (GREENWOOD, 1966; PLUMPTON, 1969). O mecanismo pelo qual a hipoglicemia no ITT promove secreção de GH é através da supressão da somatostatina, esta com efeito inibitório na secreção de GH, e da estimulação dos receptores α -adrenérgicos via GHRH. É um teste de boa aplicabilidade e fácil execução, porém apresenta algumas contra-indicações, tais como: coronariopatia, crises convulsivas, pacientes idosos, arritmias cardíacas, levando à necessidade de avaliação do eixo hipotálamo-hipofisário com outros testes de estímulos, com vários deles não disponíveis em vários países ou de custo muito elevado. Diante destas limitações, vem ganhando destaque o uso do Teste do Glucagon como um teste reprodutível e seguro na avaliação dos eixos de GH e ACTH/cortisol, sobretudo em adultos. Trata-se de um teste muito utilizado no Reino Unido e, cada vez mais vem sendo utilizado nos Estados Unidos desde 2008, quando não mais se disponibilizou o GHRH-Arginina, este considerado por vários autores a melhor alternativa ao ITT para avaliar a reserva de GH (YUEN, 2008; BRABANT, 2009; YUEN, 2011). Algumas vantagens do Teste do Glucagon em relação aos demais são os poucos efeitos colaterais, segurança e tolerabilidade,

mesmo em pacientes com hipopituitarismo, facilidade na administração do Glucagon SC (subcutânea) ou IM (intramuscular) e possibilidade de testar, simultaneamente, os eixos somatotrófico (GH) e corticotrófico (ACTH/cortisol), além de não sofrer influência do sexo e da deficiência de GH de causa hipotalâmica na resposta ao GH. Os efeitos colaterais mais comuns são: náuseas, vômitos, dor abdominal e hipoglicemia tardia. Uma limitação deste teste é o fato de ser longo, em geral com coletas de 30 em 30 minutos até o tempo 180 ou mesmo até 210 a 240 minutos, como foi inicialmente padronizado (LIN, 1974; SCHMIDT, 2003, CONCEIÇÃO, 2003; GIUFRIDA, 2009; BERG, 2010; TORPY, 2015; YUEN *et al.*, 2016).

Permanece ainda indeterminado o mecanismo pelo qual o glucagon estimula tanto a secreção de GH como de ACTH/cortisol. Sabe-se, no entanto, que não se deve à hipoglicemia reativa, uma vez que o pico de estímulo do GH ocorre entre os tempos 90 e 120 minutos e o pico do cortisol entre os tempos 150 e 180 minutos, enquanto a hipoglicemia, por outro lado, é tardia, podendo ocorrer mesmo, após a terceira hora. No caso do GH, o mecanismo estimulatório mais provável parece ocorrer através da inibição na liberação da somatostatina. Ademais, postula-se que ocorra um estímulo mediado pelo aumento dos ácidos graxos livres (AGLs) e até mesmo uma estimulação noradrenérgica induzida pelo glucagon tem sido descrita, via α -receptores, através do estímulo ao GH via secreção do GHRH (LEONG *et al.*, 2001) (Figura 1). Já os mecanismos envolvidos na estimulação do eixo corticotrófico são ainda bem menos esclarecidos. Sabe-se, entretanto, que o glucagon *per se* não funciona como secretagogo de GH e ACTH, uma vez que o estímulo ocorre somente após a utilização IM ou SC e não após a administração endovenosa da medicação. Há a hipótese de que a proteólise do glucagon IM possa gerar um fragmento peptídico com atividade secretagoga destes hormônios.

Regulação da secreção

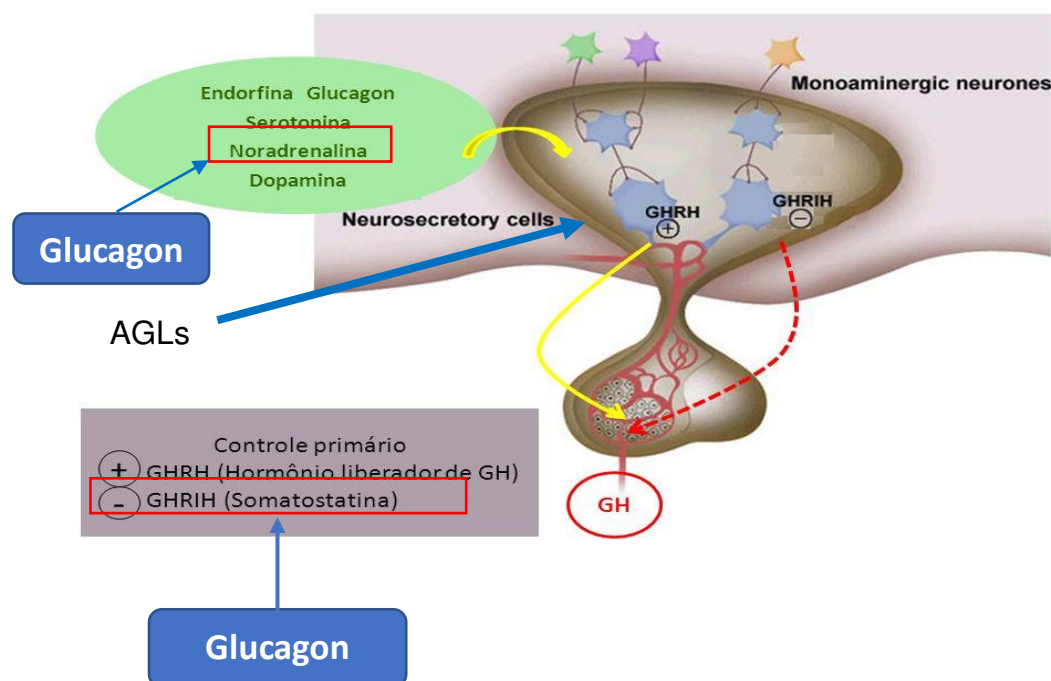


Figura 1: Regulação da secreção de GH no eixo hipotalâmico-hipofisário (imagem adaptada do Google. Acessada 25.07.18. Disponível em: <https://slideplayer.com.br/slide/8767784/>)

YUEN et al, 2008 avaliaram a prevalência de deficiência dos hormônios da hipófise anterior em microadenomas hipofisários através do teste GHRH-Arginina com deficiência de GH comprovada em 50% dos 38 pacientes avaliados, mesmo com IGF1 normal, justificando a necessidade de testes de estímulo mesmo em tumores pequenos.

Por outro lado, CAROSI et al, 2015 avaliaram o eixo hipotálamo-hipofisário em macro e microadenomas hipofisários não-secretores através dos testes ITT e ACTH sintético com dose de 1µg com achados de deficiência isolada de cortisol em 7% dos macroadenomas e 14,4% em microadenomas; enquanto a deficiência isolada da GH foi de 7,8 e 8,9%, respectivamente. Surpreendentemente, o hipocortisolismo foi a deficiência mais comum em microadenomas, achado este que confronta o dogma ainda amplamente aceito que as deficiências dos hormônios hipofisários seguem uma ordem cronológica, iniciando pela deficiência de GH, e posteriormente, LH (Hormônio Luteinizante)/FSH (Hormônio Folículo estimulante),

TSH (Hormônio Tireoestimulante), e culminando, com a deficiência de ACTH/cortisol.

Em publicação recente de HAMRAHIAN, 2016 não houve diferença estatisticamente significativa entre o pico de GH no TG quando comparou-se dose fixa de Glucagon (1 mg e 1,5mg em <90 e ≥90 kg, respectivamente) com a dose corrigida pelo peso (0,03 mg/kg), sendo o método com dose fixa mais tolerável sob o ponto de vista de efeitos colaterais. O TG foi originalmente descrito com duração de 4h, mas alguns estudos têm sugerido diminuição para 3h justificando que até 85% do estímulo de GH ocorre entre os 120 e 180 min, e também, a resposta do cortisol não foi alterada de forma significativa com o teste de menor duração, portanto o TG é uma alternativa para avaliação de reserva de GH em doenças hipofisárias, entretanto tem potência moderada para avaliação da reserva de ACTH/cortisol (BERG et al, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta hormonal dos eixos somatotrófico e corticotrófico em pequenas lesões hipofisárias através do Teste do Glucagon.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a magnitude das respostas de GH e cortisol no Teste do Glucagon;
- Avaliar a segurança/efeitos colaterais durante o Teste do Glucagon;
- Comparar os não-respondedores ao GH e cortisol com IMC e idade no Teste do Glucagon;
- Avaliar as respostas do GH e cortisol através do ITT nos pacientes que apresentaram deficiências no Teste do Glucagon.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo e analítico, transversal.

4.2 Local e Período do Estudo

A triagem dos pacientes foi realizada na Unidade de Endocrinologia e Metabologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA - Unidade Presidente Dutra), onde é realizado o atendimento aos pacientes. A realização das Ressonância Magnética e dosagens hormonais foram feitas na sede do Hospital Universitário, nos setores de Radiologia e Diagnóstico por Imagem e laboratório, respectivamente, enquanto o teste de estímulo com Glucagon e o ITT foram realizados no Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC da UFMA. O estudo estendeu-se de novembro de 2016 a maio de 2018.

4.3 Critérios de Inclusão

- Lesões hipofisárias menores que 1cm
- Maiores de 16 anos e que concordaram em participar da pesquisa e assinarem o TCLE. O TCLE dos menores de 18 anos foi assinado pelo responsável legal.

4.4 Critérios de Não-inclusão

- tumores hipofisários produtores de cortisol (Doença de Cushing)
- tumores hipofisários produtores de GH (Acromegalia);

- gestantes;
- tumores hipofisários produtores de gonadotrofinas (FSH e LH);
- tumores hipofisários produtores de TSH;
- tumores hipofisários cursando com déficits dos hormônios hipofisários
- doenças tiroideanas não compensadas;
- doenças infecciosas em atividade;
- doenças agudas ou crônicas não compensadas;
- história de crises convulsivas;
- história de doença arterial coronariana;
- sem acompanhamento no ambulatório há mais de 5 anos;
- pacientes que se recusaram a realizar o Teste do Glucagon.

4.5 Participantes do Estudo (Amostra)/Coleta de Dados

Foram selecionados, inicialmente, 97 pacientes com lesões hipofisárias menores que 1cm em acompanhamento ou iniciando sua avaliação no ambulatório de Neuroendocrinologia do HUUFMA (Figura 02). Todos os 41 pacientes foram incluídos após lido e assinado TCLE e todas as dúvidas acerca dos testes terem sido dirimidas. (APÊNDICE A).

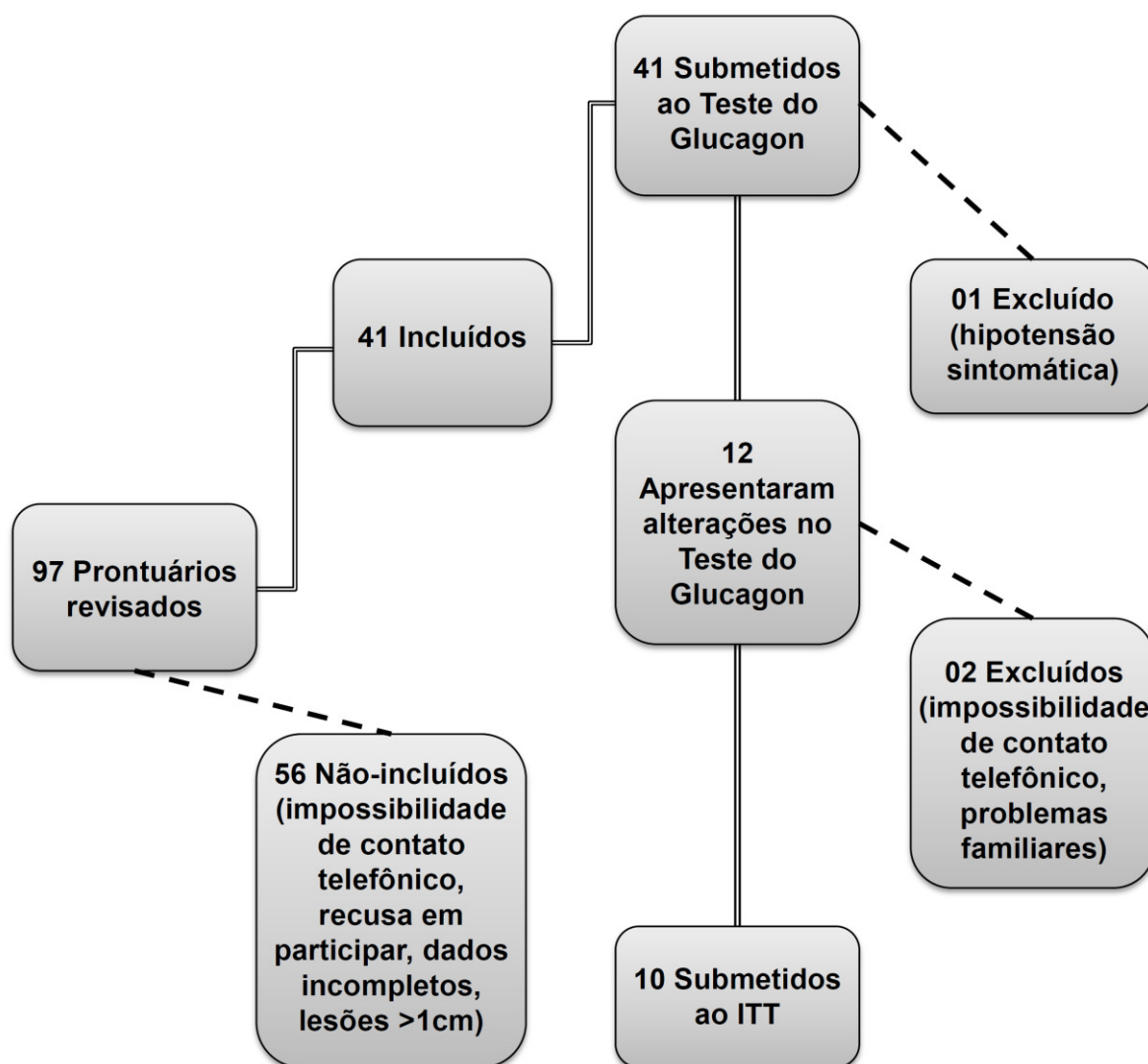


Figura 2: Participantes incluídos no estudo (amostra) com lesões hipofisárias pequenas no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)

Os prontuários dos participantes do estudo foram revisados quanto à clínica, exames de laboratório, dosagens dos hormônios hipofisários e os exames de imagem da hipófise, além dos critérios de inclusão e não-inclusão.

O diagnóstico foi estabelecido a partir do quadro clínico correspondente e associado a exame de imagem de RM compatível com adenoma e outras lesões hipofisárias com níveis plasmáticos normais de cortisol e de IGF-I. Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes apresentam, por definição, níveis hormonais normais ou baixos de PRL e TSH/T4 livre, com supressão adequada de cortisol ao teste com dexametasona para excluir Doença de Cushing. Todos incluídos no nosso estudo apresentavam dosagens basais normais de cortisol, GH e demais hormônios hipofisários. Os prolactinomas foram definidos de acordo com diretrizes publicadas, assim como o diagnóstico de Doença de Cushing e TSHomas,

tumores produtores de GH e GnRH, estes excluídos deste trabalho (NIEMAN et al., 2008; BECK-PECCOZ et al., 2009; MELMED et al., 2015;).

Os prontuários foram revisados para as dosagens de GH, IGF1, ACTH, cortisol e prolactina, e demais exames da função hipofisária (TSH, T4 livre, FSH, LH, testosterona e estradiol) e todos os exames foram registrados em ficha-protocolo (APÊNDICE B). Os participantes com alterações nestas dosagens hormonais, foram excluídos, exceto aqueles com prolactina elevada e lesões menores que 1 cm, estes inclusos no grupo dos microprolactinomas. Todos apresentavam níveis de IGF1 normais para idade e sexo.

As Ressonâncias Magnéticas dos pacientes incluídos foram reavaliadas por um único radiologista com experiência em Neurorradiologia para confirmação do achado imagenológico e avaliação do tamanho da lesão.

Foram elegíveis 41 pacientes para o teste de estímulo para avaliação de GH e Cortisol com Glucagon (GlucaGen® HypoKit 1mg-1UI, Novo Nordisk A/S DK-2820 Gentofte/Denmark). Após um jejum de cerca de 8h, o paciente teve o peso e a PA aferidos, e posteriormente, foram coletadas amostras de sangue para dosagem de GH, cortisol e glicemia basais (antes da injeção do Glucagon), e realizada a injeção IM em coxa (face superior) de 1 mg e 1,5 mg nos pacientes com < 90 kg e ≥ 90 kg, respectivamente, realizando-se subsequentes coletas de GH, cortisol e glicose nos tempos 90, 120, 150 e 180 minutos. Acesso venoso periférico foi mantido com solução fisiológica. Durante toda a duração do teste o paciente teve assistências médica e de enfermagem. Ao final da avaliação a PA (Pressão Arterial) foi novamente aferida.

Dez dos 12 pacientes que apresentaram deficiências de GH (pico < 3 ng/mL) e cortisol (pico <18 µg/dL) no Teste do Glucagon foram submetidos ao ITT, considerado padrão-ouro para avaliação dos eixos somatotrófico e corticotrófico, excetuando-se dois pacientes que não puderam ser contactados. Os pacientes antes de realizado o ITT tiveram peso e PA aferidos. Foi feita dose de 0,15 UI/kg de insulina regular em bolus através de acesso venoso periférico e realizadas as coletas de glicose, cortisol e GH basais e com 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para validação do teste o paciente deveria apresentar hipoglicemia <40 mg/dl. Todos os pacientes submetidos ao ITT tiveram frequência cardíaca e PA aferidas antes, durante e após o teste.

As dosagens de GH no Teste do Glucagon foram realizadas por Eletroquimioluminescência (Immulite® 2000, Siemens, United Kingdom; sensibilidade: 0,01 ng/mL; zona de trabalho: 0,05-40 ng/mL) e as dosagens de GH

dos ITTs foram feitas por Quimioluminescência [ensaio calibrado tendo como referência o Segundo Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde – WHO Second International Standard 98/574 (BRISTOW, 2001). Análise de sensibilidade: $>0,01$ ng/mL. Precisão intra e inter-ensaio de 1 ng/mL]. As dosagens de cortisol foram realizadas por Eletroquimioluminescência-ECLIA, Cobas 601, Elecsys® Cortisol II, Roche (limite de detecção de 0,054 µg/dL; repetibilidade $>1,81$ µg/dL-32,62 µg/dL, $\leq 5\%$ CV; precisão intermédia $> 1,81$ µg/dL-32,62 µg/dL, $\leq 6\%$ CV) e as de glicemias pelo método Hexoquinase enzimático, Cobas® C-501.

4.6 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão-COMIC/HUUFMA em 10 de maio de 2016, em atendimento à Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares e Parecer Consubstanciado pelo CEP, CAAE 57658016.0.0000.5086 liberado em 18 de novembro de 2016. (ANEXOS A e B).

Os participantes foram detalhadamente informados sobre os objetivos da pesquisa, e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), incluídos no estudo.

4.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados através dos recursos do software GraphPad Prism versão 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva utilizando medidas de frequência absoluta, frequência relativa, média e desvio-padrão. Gráficos de barras, de linhas, de dispersão e box-plot foram utilizados para representar a distribuição amostral dos dados.

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada através do teste Lilliefors. Após este procedimento os testes Wilcoxon e Mann-Whitney foram selecionados para a análise comparativa das variáveis contínuas. Os valores do pico de GH e pico de Cortisol foram transformados em Log para análise de correlação de

Pearson. As demais correlações foram processadas com o coeficiente de correlação de Spearman. Um modelo de regressão linear múltiplo foi aplicado para avaliar o efeito nos desfechos pico de GH e nadir de Glicose.

O Teste Exato de Fisher foi utilizado para analisar a distribuição do tipo de lesão hipofisária e a categoria de resposta ao Teste do Glucagon. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

5 RESULTADOS

Um total de 40 pacientes com média de idade de $37,1 \pm 11,2$ anos (de 16 a 63 anos) foram incluídos no presente estudo. Observou-se que uma maior frequência de pacientes do sexo feminino (92,5%) e na faixa etária entre 30 e 49 anos (60%). As categorias de sobrepeso e obesidade foram detectadas em 47,5% e 30% da amostra, respectivamente. Os tipos de lesão mais prevalentes foram microprolactinoma (67,5%), seguida por microadenoma não funcionante (20%), cisto de bolsa de Rathke e sela parcialmente vazia, foram diagnosticados em apenas 5 indivíduos avaliados. (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização geral dos 40 pacientes com pequenas lesões hipofisárias incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)

Variáveis	n	(%)
Sexo		
Feminino	37	(92,5)
Masculino	3	(7,5)
Faixa etária		
Até 29 anos	12	(30,0)
30 a 39 anos	8	(20,0)
40 a 49 anos	16	(40,0)
50 anos ou mais	4	(10,0)
Categoria de IMC*		
Peso baixo (<18)	1	(2,5)
Peso normal (18 a 24,9)	8	(20,0)
Sobrepeso (25 a 29,9)	19	(47,5)
Obesidade (≥30)	12	(30,0)
Diagnóstico da lesão hipofisária		
Microprolactinoma	27	(67,5)
Microadenoma não funcionante	8	(20,0)
Cisto de Bolsa de Rathke	3	(7,5)
Sela Parcialmente Vazia	2	(5,0)

*IMC = Índice de massa corporal (OMS=Organização Mundial da Saúde)

Encontramos deficiências de GH e cortisol em 10 pacientes com microadenomas (06 microprolactinomas e 04 microadenomas não-funcionantes). Deficiências de GH e cortisol foram evidenciadas em 01 paciente com Sela Parcialmente Vazia e de cortisol em um paciente com Cisto de Bolsa de Rathke, respectivamente. Dentre os microprolactinomas, encontramos em 22,2% (06 pacientes) deficiência de cortisol, enquanto nos microadenomas não-funcionantes a deficiência mais comumente encontrada foi de GH em 03 pacientes (37,5%). Destacamos que 01 microprolactinoma e microadenoma não-funcionante apresentaram deficiências de GH e cortisol concomitantemente. Houve diferenças significantes na resposta do GH entre os tipos de lesão ($P=0,031$), porém entre as lesões analisadas não houve diferenças no resultado do cortisol. (Tabela 2)

Tabela 2: Distribuição das respostas de GH e Cortisol ao Teste de Glucagon de acordo com o tipo de lesão hipofisária nos 40 pacientes incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

Lesão hipofisária	Pico do GH (> 3 ng/mL)		Pico do Cortisol (>18 µg/dL)	
	Sim	Não	Sim	Não
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Microprolactinoma	26 (96,3)	1 (3,7) ^a	21 (77,8)	6 (22,2) ^a
Micro Não-funcionante	5 (62,5)	3 (37,5) ^b	6 (75)	2 (25) ^b
Cisto de Bolsa de Rathke	3 (100)	0 (0)	2 (66,7)	1 (33,3)
Sela Parcialmente Vazia	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)	0 (0)
P valor	0,031*		0,909	

* Diferenças estatisticamente significantes através do teste Exato de Fisher.

^a 01 paciente apresentou deficiências de ambos (GH e cortisol)

^b 01 paciente apresentou deficiências de ambos (GH e cortisol)

A Figura 3 revela que 35 pacientes apresentaram pico de GH maior que 3 ng/mL (87,5%), 31 mostraram pico de Cortisol maior que 18 µg/dL (77,5%) e 12 pacientes (30%) apresentaram valor de glicose menor ou igual a 70 mg/dL durante o acompanhamento de 180 minutos após início do Teste. Quando utilizamos ponto de corte de 1 ng/mL para o GH, todos obtiveram resposta na avaliação.

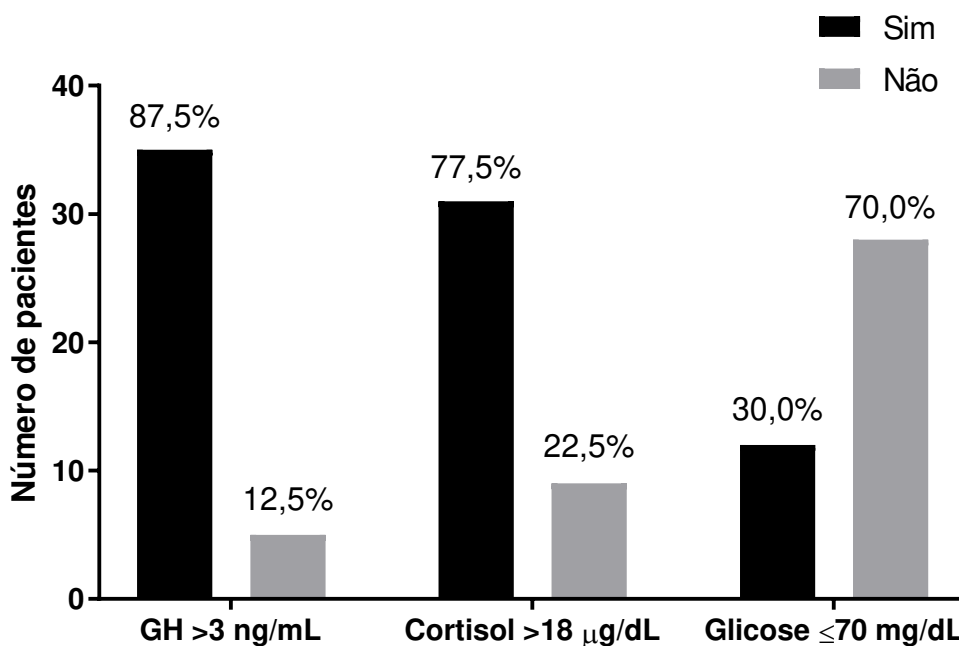
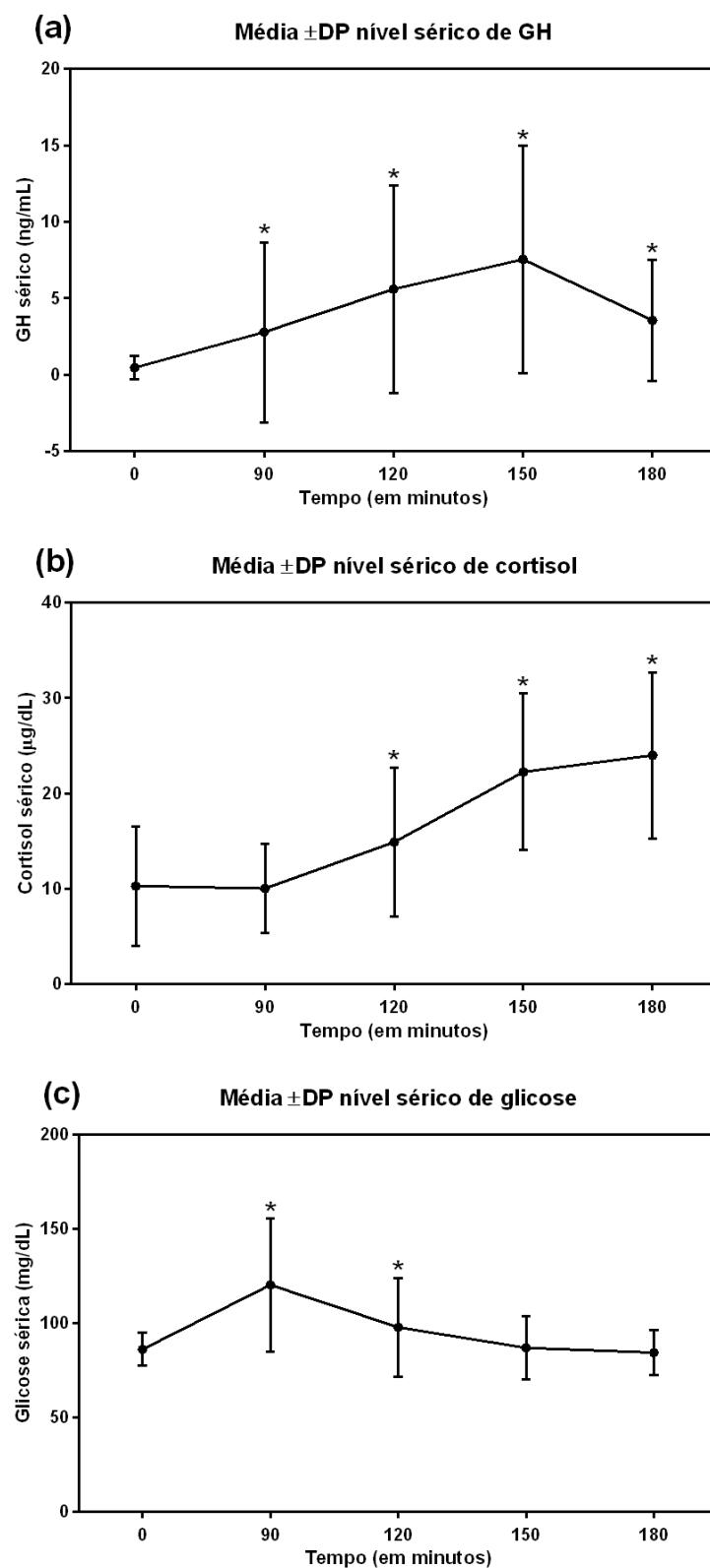


Figura 3: Resposta durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas no diagnóstico de deficiências de GH e Cortisol e resposta da glicemia.

As Figura 4 e 5 ilustram os valores de média e desvio-padrão do GH, cortisol e glicose durante o seguimento do teste e a distribuição dos picos de GH e cortisol e nadir de glicose, respectivamente. Em todos os tempos avaliados o valor de GH foi estatisticamente mais elevado que o basal ($P < 0,05$), sendo que a média do pico de GH foi de 7,55 ng/mL. O pico de GH foi observado no tempo 150 minutos em 50% dos pacientes. Para o cortisol, os tempos 120, 150 e 180 minutos apresentaram valores mais elevados que o basal ($P < 0,05$), com o último tempo apresentando a maior média na amostra (24 µg/dL). O pico de cortisol foi observado em 77,5% dos pacientes aos 180 minutos. Quanto ao nível de glicose, notou-se um incremento significativo na concentração em comparação com o baseline ($P < 0,05$) aos 90 minutos sendo o nadir no tempo de 180 minutos.



*Indica diferenças estatisticamente significante em comparação com o tempo 0 através do Teste Wilcoxon ($P < 0,05$).

Figura 4: Níveis de GH (a), Cortisol (b) e Glicose (c) durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

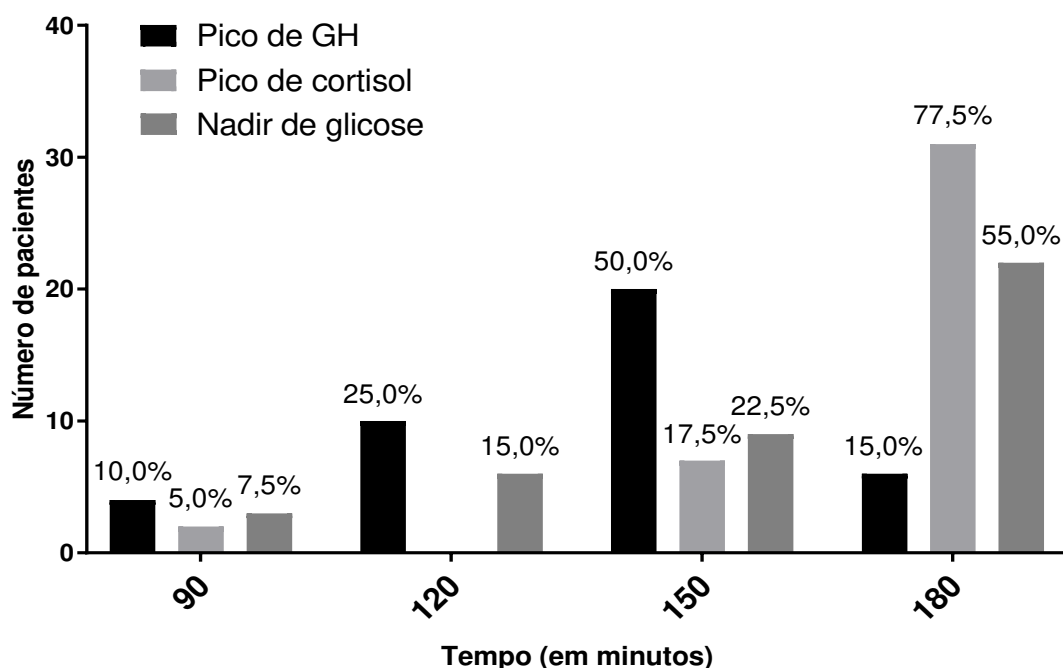


Figura 5: Distribuição da ocorrência do Pico de GH, Pico de Cortisol e Nadir de Glicose durante o Teste do Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA)

A análise comparativa das médias de glicose entre os grupos dos respondedores e os não-respondedores ao GH e cortisol está expressa na Tabela 3. Evidenciou-se que o nível de glicose basal foi estatisticamente mais baixo entre os pacientes que atingiram o pico de GH ($P=0,010$) e pico de cortisol ($P=0,014$) durante o Teste do Glucagon. As demais medidas de glicose não apresentaram diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 3. Diferenças variáveis referentes ao nível de glicose entre as categorias de resposta ao Teste de Glucagon nos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

Variáveis	Pico do GH (>3 ng/mL)		P	Pico do Cortisol (>18 µg/dL)		P
	Sim	Não		Sim	Não	
	Média ±dp	Média ±dp		Média ±dp	Média ±dp	
Glicose basal	84,6 ±7,6	97,2 ±9,3	0,010*	84,2 ±7,5	93,1 ±9,6	0,014*
Glicose (pico)	117,5 ±28,2	154,4 ±52,1	0,101	121,8 ±30,9	123,3 ±43,3	0,685
Glicose (nadir)	79,4 ±13,6	85,2 ±14,7	0,378	80,5 ±14,6	78,9 ±10,9	0,974

*Indica diferenças estatisticamente significantes através do teste Mann-Whitney ($P < 0,05$).

A análise de correlação linear revelou que o valor do pico de GH e cortisol apresentam uma correlação diretamente proporcional e significativa ($r = 0,353$; $P = 0,025$), demonstrando a capacidade do glucagon em estimular ambos os eixos. (Figura 6).

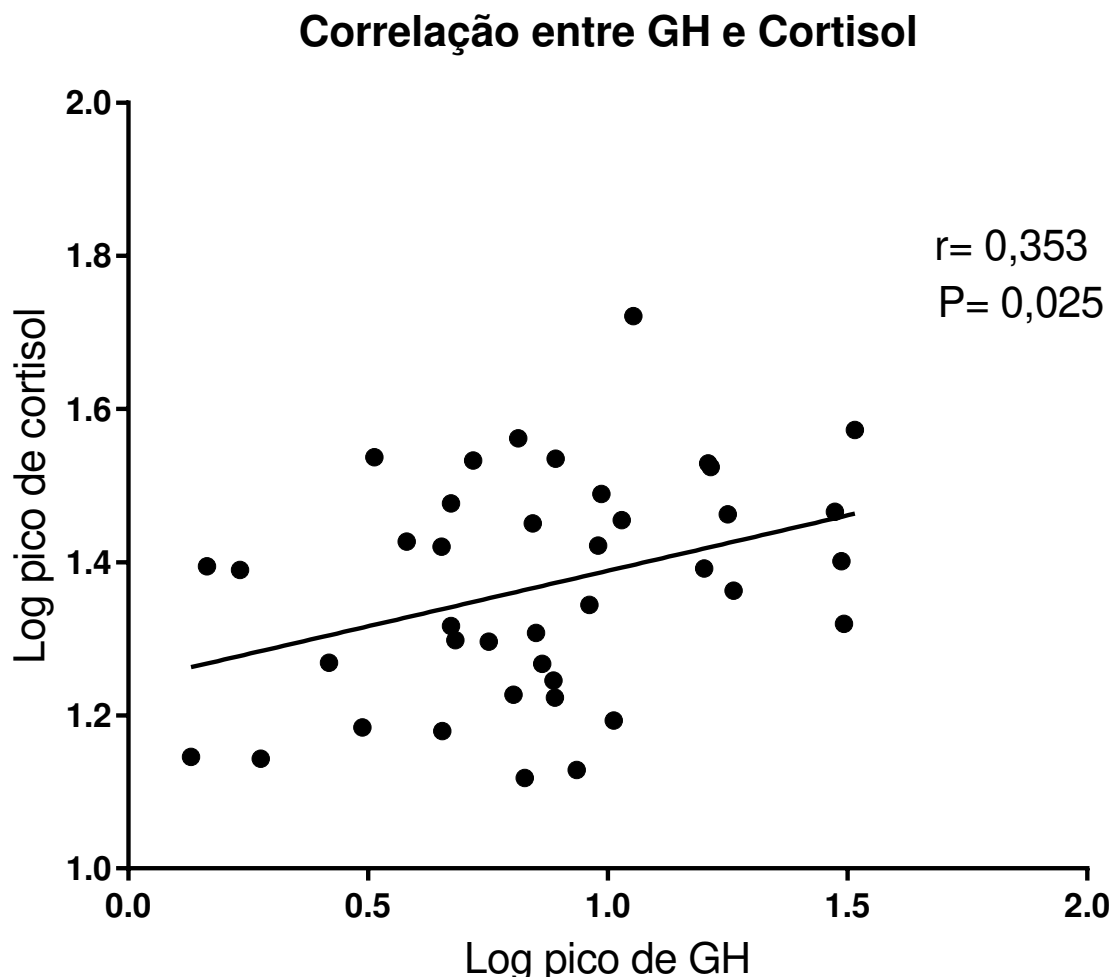


Figura 6: Correlação de Pearson entre os picos de GH e Cortisol dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas no Teste do Glucagon no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

A Tabela 4 expressa as medidas de correlação das variáveis contínuas com as medidas de GH, cortisol e glicose. Os dados revelaram que quanto maior o IMC menor foi o pico ($r_s = -0,44$; $P = 0,003$) e a variação do GH ($r_s = -0,46$; $P = 0,002$). Além disso, os dados também mostraram que quanto mais jovem ($r_s = 0,31$; $P = 0,040$) e menor o IMC ($r_s = 0,35$; $P = 0,023$), mais baixo foi o valor de glicose durante o seguimento.

Tabela 4: Coeficiente de correlação de Spearman (r_s) entre as medidas de GH, Cortisol e Glicose nos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

Variáveis	Pico de GH	Pico de Cortisol	Nadir de Glicose
	Pico	Pico	Nadir
Idade (em anos)	$r_s = -0,16$	$r_s = -0,01$	$r_s = 0,31^*$
IMC (kg/m^2)	$r_s = -0,44^*$	$r_s = 0,03$	$r_s = 0,35^*$

r_s = coeficiente de correlação de Spearman. IMC = Índice de massa corporal. *Indica correlação estatisticamente significativa.

A Tabela 5 expressa o resultado da análise multivariada. Observou-se que o IMC apresentou efeito inverso e o pico de Cortisol efeito direto no pico de GH. Para o nadir de glicose as variáveis idade e pico de Cortisol apresentaram efeito direto mesmo após o ajustamento multivariado.

Tabela 5: Análise de regressão linear múltipla para o Pico de GH e Nadir de Glicose no Teste Glucagon dos 40 pacientes com lesões hipofisárias pequenas incluídos no estudo no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

Variáveis	R^2 (valor P)	Pico de GH	R^2 (valor P)	Nadir de Glicose
		β (valor P)		β (valor P)
	31,7% (0,008)		45,3% (0,001)	
Idade (em anos)		+0,03 (0,802)		+0,50 (0,003)*
IMC (kg/m^2)		-0,78 (0,010)*		+0,50 (0,275)
Pico de cortisol		+0,38 (0,023)*		+0,77 (0,001)*
Pico de GH		-		-0,25 (0,308)
Nadir de Glicose		+0,11 (0,308)		-

β = Coeficiente de regressão. R^2 = Coeficiente de determinação. IMC = Índice de massa corporal. *Indica medida estatisticamente significativa.

Foi realizada a análise comparativa entre os testes nos pacientes que realizaram os dois procedimentos. O ITT apresentou medidas estatisticamente mais elevadas do pico de GH ($12,2 \pm 5,8$ versus $4,3 \pm 3,3$) e cortisol ($25,7 \pm 5,6$ versus $17,2 \pm 4,2$), e mais baixas de glicose ($P = 0,005$). (Figura 7).

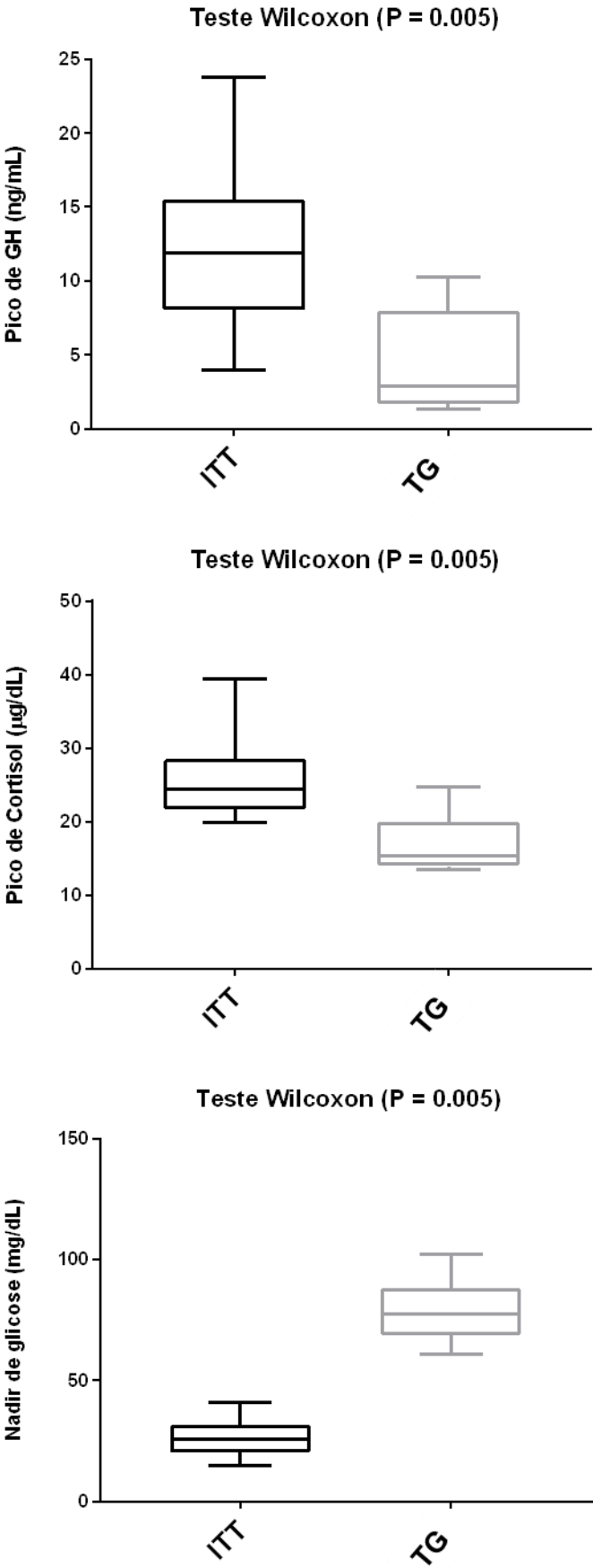


Figura 7 Análise comparativa do Pico de GH, Pico de Cortisol e Nadir de Glicose entre ITT e Teste do Glucagon.

Todos os pacientes submetidos ao ITT por apresentarem valores de deficiências de GH ou cortisol, obtiveram resposta a ambos. Ao utilizarmos no Teste do Glucagon o valor <1 ng/mL para deficiência de GH, obtivemos respostas em todos. Se utilizarmos o *cut-off* de $16 \mu\text{g/dL}$ para o cortisol, encontramos deficiência em 02 pacientes (01 microprolactinoma e 01 microadenoma não-funcionante).

O Teste do Glucagon mostrou-se bastante seguro e os sintomas mais relatados pelos pacientes foram náuseas (50%) no tempo médio de 118,6 minutos, e vômitos ocorreram em 20% dos pacientes no tempo médio de 123,7 minutos. Outros sinais/sintomas relatados foram: sonolência, tonturas, dor abdominal, cefaleia, porém leves (Figura 8). Um dos pacientes teve o teste interrompido com 120 minutos de duração por apresentar hipotensão sintomática.

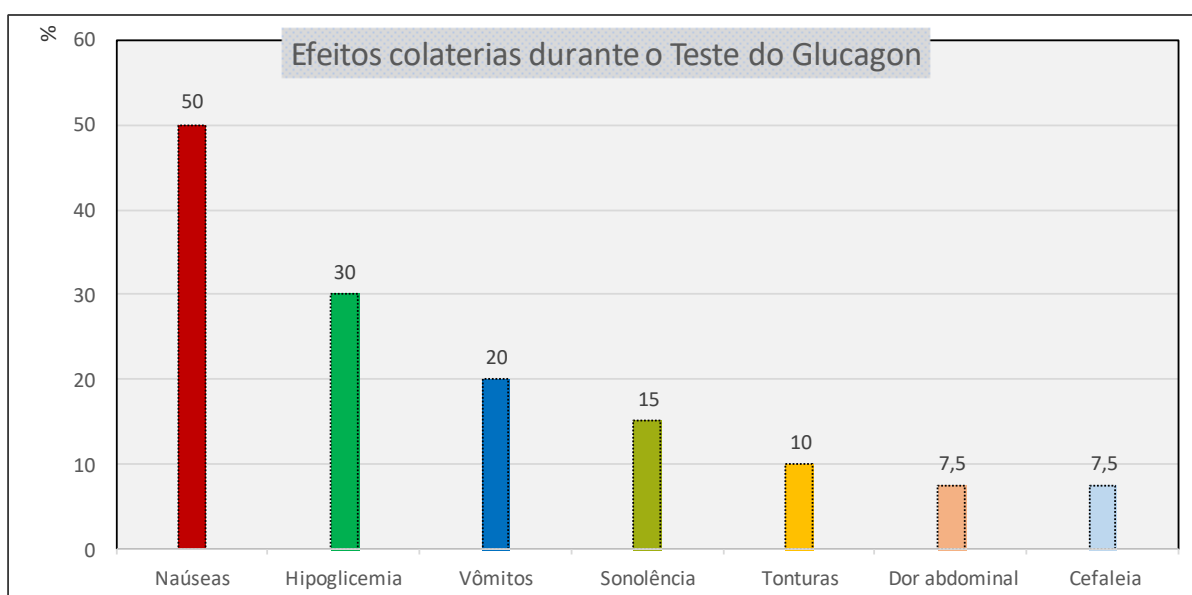


Figura 8: Efeitos colaterais durante o Teste do Glucagon nos 40 pacientes incluídos no estudo com lesões hipofisárias pequenas no período de 2016 a 2018, São Luís (MA).

6 DISCUSSÃO

São escassos os dados na literatura que se refiram à avaliação de microadenomas hipofisário, cisto de Bolsa de Rathke e Sela Parcialmente Vazia com o Teste do Glucagon com o objetivo de avaliar concomitantemente as respostas de GH e cortisol, e que utilizaram o ITT para ratificar tais deficiências encontradas.

Em nosso estudo encontramos deficiências de GH ou cortisol em 10 pacientes do total de 35 microadenomas (28,6%), sendo 06 microprolactinomas e 04 microadenomas não-funcionantes. Dentre os 27 microprolactinomas, observamos em 22,2% (06 pacientes) deficiência de cortisol, enquanto nos microadenomas não-funcionantes a deficiência mais comumente encontrada foi de GH em 03 pacientes (25%). Já Yuen et al, 2008 avaliaram 38 pacientes com microadenomas hipofisários não-secretores, encontrando em 19 pacientes (50%) deficiência de GH com o Teste GHRH-Arginina, e utilizaram o Teste do ACTH sintético na dose de 1 µg para avaliar deficiência de cortisol naqueles com cortisol basal baixo, encontrando deficiência deste hormônio em 3%, porém não utilizaram o ITT.

Vários são os trabalhos que avaliaram a efetividade do Teste do Glucagon na avaliação hipofisária, sendo uma alternativa segura e factível quando há contra-indicação ao ITT, ou não disponibilidade do GHRH-Arginina. Muitos utilizaram valores de <3 ng/mL e <18 µg/dL, conforme nosso trabalho, para diagnóstico de deficiências de GH e cortisol, respectivamente (GOMEZ, 2002; CONCEIÇÃO, 2003; TOOGOOD, 2012; YUEN, 2013,), porém muitos sugeriram valores de 1-5 ng/mL para GH, e para o cortisol de 9-18 µg/dL, ou utilizaram duração diferente do teste, melhorando assim, a especificidade. (DIRI, 2015; HAMRAHIAN, 2016; BERG, 2010; BEHAN, 2017; TAVARES, 2017;). O Guideline de 2011 da Endocrine Society, recomenda *cut-off* de 2,5-3 ng/mL para definição de deficiência severa de GH. (MOLITCH *et al*, 2011). Sugere-se, também, mudança de *cut-off* conforme Teste do Glucagon seja realizado com dose fixa ou dose calculada pelo peso (0,03mg/kg) (YUEN, 2013).

O nosso estudo mostrou que os pacientes que apresentaram deficiências de GH e cortisol no Teste do Glucagon e que foram submetidos ao ITT, todos foram responsivos. Ao utilizarmos o valor de 1 ng/mL para o GH, todos apresentaram resposta ao Glucagon.

Recente estudo de BEHAN, 2017 avaliou deficiências dos hormônios hipofisários em 35 pacientes portadores de microprolactinomas avaliados através dos testes de Glucagon e ITT com achado de 8,57% (03 pacientes) com deficiências assim definidas: ACTH/cortisol (02 pacientes) e ACTH/cortisol (cortisol $<16 \mu\text{g/dL}$) e GH ($<5 \text{ ng/mL}$) concomitantes (01 paciente), inclusive 01 paciente apresentou quadro clínico severo de insuficiência adrenal com necessidade de hidrocortisona, além de reposição de GH. Em nossa série, quando utilizamos o ponto de corte de $16 \mu\text{g/dL}$, encontramos 02 pacientes com deficiências de cortisol no Teste do Glucagon (01 microprolactinoma e microadenoma não funcionante), ambos responsivos ao ITT.

Classicamente, o Teste do Glucagon é de 3-4h de duração, mas há trabalhos, inclusive o último Guideline para diagnóstico de deficiência de GH no adulto que corroboram o teste com duração mínima de 3h, pois a maioria do pico de GH ocorre entre 120 e 180 minutos, achados condizentes com os do nosso estudo em que o pico de GH ocorreu em 85% até os 150 minutos (MOLITCH, 2011). Adicionalmente, BERG et al preconizaram que a diminuição da duração para 3h não levou a perda da utilidade diagnóstica do teste e, assim, reduzindo custos e tornando-o mais factível, reservando o ITT para casos criteriosamente selecionados, sobretudo aqueles com valores de GH e cortisol na `área cinzenta`, e conforme já relatado em outros trabalhos, o pico de cortisol ocorreu até os 180 minutos no Teste de Glucagon (MITCHELL, 1970; CAIN, 1972; LITTLE, 1989; ORME, 1998; GOMEZ, 2002; LEONG, 2001; BERG, 2010). Segundo a avaliação no Teste do Glucagon com dose fixa, HAMRAHIAN, 2016 evidenciou pico tardio de GH (após 3h) em somente 4.7% e do cortisol em 14.3% dos avaliados.

Ademais, outro estudo multicêntrico comparou o Teste do Glucagon em grupos: dose fixa (grupos com 3h e 4h de duração, respectivamente) com o de dose calculada pelo peso (4h de duração) em doenças hipofisárias diversas. Demonstrou-se resposta semelhante do GH com dose fixa com 3h e 4h, não havendo, portanto, diferença nas respostas com a duração do teste, entretanto, o grupo de dose corrigida pelo peso e duração de 4h apresentou maior pico de GH e nadir de glicose. Os pacientes que foram submetidos ao teste com duração de 3h e 4h com dose fixa, obtiveram resposta ao GH em 81,3% e 80%, respectivamente, entre os tempos de 90 a 180 minutos, corroborando os achados no presente estudo. A resposta do cortisol não foi avaliada nos pacientes que se submeteram à dose fixa com duração de 3h, mas os que foram submetidos a 4h, a resposta do cortisol foi mais tardia,

ocorrendo entre 210 e 240 minutos que naqueles submetidos à dose fixa e duração de 4h. Por não haver diferenças significativas na resposta do GH com duração de 3h ou 4h e pela resposta do cortisol ser mais tardia no teste de 4h, e, paradoxalmente, mais precoce no de 3h, isto ratifica a escolha de dose fixa de glucagon quando se opta por teste de menor duração. Quanto aos achados dos tempos do pico de GH e cortisol, nossos resultados foram semelhantes, a maioria do pico de GH ocorreu entre 120 e 150 minutos (75%) e do cortisol por volta dos 180 minutos (77,5%). Nossos dados mostraram pico de glicose nos 90 minutos e nadir com 180 minutos, semelhantes aos deste multicêntrico. (YUEN, 2013)

Adicionalmente, YUEN et al demonstraram que na avaliação realizada com dose fixa, a idade correlacionou-se negativamente com os picos de GH e cortisol, e o IMC somente com o pico de GH, enquanto em nossa avaliação houve correlação negativa do IMC com pico e variação do GH, porém não houve com o pico de cortisol nem com a idade (YUEN, 2013). Outros trabalhos, apesar de realizados em pacientes com diagnósticos pré-estabelecidos de deficiência de GH, não evidenciaram associação de pico de GH e IMC (GOMEZ, 2002; CONCEIÇÃO, 2003; HAMRAHIAN, 2016). Importante salientar que a obesidade interfere na secreção de somatostatina, estimulando-a, e assim inibindo a secreção de GH, além da somatostatina ter papel, também, na inibição direta da secreção de GHRH pelos núcleos ventromedial e arqueado do hipotálamo.

Neste trabalho de YUEN 2013, houve correlação negativa do basal, pico e nadir de glicose com o pico de GH, mas não com o cortisol; enquanto em nossa avaliação encontramos resultados semelhantes somente com a glicemia basal que foi mais baixa entre os pacientes que atingiram os picos de GH e cortisol ($P=0,010$ e $P=0,014$, respectivamente), diferentemente do estudo acima. Quanto à glicemia basal maior nos não-respondedores de GH e cortisol, talvez haja inferência do papel da resistência insulínica que não foi abordado no presente estudo. Não houve, em nosso trabalho, diferença significativa do nadir da glicemia com o pico de GH, mas houve correlação positiva do nadir de glicose com o pico de cortisol após análise multivariada. Nossos resultados reforçam os trabalhos anteriores no que se refere ao mecanismo de secreção de GH e cortisol no Teste de Glucagon ser pouco ou não-dependente das flutuações glicêmicas *per se*, (WALDHAUSL et al, 1976; RAO et al, 1987; GIUFFRIDA et al, 2009;)

Não achamos correlação negativa com a idade na resposta do GH, diferentemente do que foi demonstrado em outros estudos, talvez por nossa

população amostral ser de pacientes mais jovens (GOMEZ, 2002; DIRI, 2015; HAMRAHIAN, 2016;). Houve, adicionalmente, em nosso estudo, uma correlação positiva da idade e pico de cortisol e com nadir da glicose, e não achamos correlação do pico de cortisol com o IMC, achados semelhantes relatados na série de BERG et al, 2010. Provavelmente estes valores mais baixos de glicose em indivíduos com menor idade e menor IMC tenham relação com o papel do peso e da resistência insulínica.

Em outro trabalho utilizou-se o TG estendido com duração de 4h, ITT e Teste do ACTH sintético para avaliação de deficiências de GH e cortisol em 28 pacientes com lesões hipofisárias que se apresentavam com 1 ou mais déficits hipofisários ao diagnóstico. Propuseram o *cut-off* de 1ng/ml para TG com dose fixa de 1mg e 1,5mg IM para <90 e ≥90kg, respectivamente, evitando-se desta forma, excesso no diagnóstico de deficiência, em pacientes suficientes de GH, quando se utiliza o valor de 3 ng/mL. Foi sugerido, ainda, através da análise de curva ROC que há uma necessidade de mudanças, também, no ponto de corte de cortisol na curva do glucagon para um valor menor. (HAMRAHIAN et al, 2016).

No presente estudo uma paciente apresentou nível mais alto de cortisol ainda na amostra basal, sendo já anteriormente relatado em outros trabalhos e que presumivelmente reflete resposta do cortisol ao stress associado com o procedimento (YUEN, 2013; LEONG, 2001; RAO, 1987).

Os achados das intercorrências de náuseas e vômitos por volta dos 120 minutos de duração do Teste do Glucagon nestes trabalhos, também foram semelhantes com os nossos achados, sendo este tempo crucial para monitoramento do paciente, por vezes havendo necessidade do uso de antieméticos, o que não foi necessário em nenhum dos nossos pacientes. (YUEN, 2013; TAVARES, 2017).

A limitação do nosso trabalho é, sobretudo, relacionada ao tamanho da amostra e à ausência de um grupo controle.

7 CONCLUSÃO

É necessário o seguimento cuidadoso e periódico com dosagens dos hormônios hipofisários, não somente GH e cortisol, e seleção criteriosa daqueles que terão benefícios em uma investigação mais aprofundada com um teste de estímulo, elegendo, sobretudo, aqueles com alterações metabólicas e/ou diminuição progressiva do IGF1.

O Teste do Glucagon mostrou-se uma alternativa segura e de execução acessível para avaliação do eixo hipotálamo-hipofisário, e requer mudanças em *cut-offs* tanto para GH quanto cortisol, sobretudo utilizando valores diferentes para indivíduos com peso normal e obesos. Parece ter eficácia comprometida em lesões hipofisárias menores que 1cm, ou necessidade, nestes casos, de prolongado do teste por 4h, sobretudo para avaliação do cortisol.

Em decorrência do pico de GH ser mais precoce e, geralmente é a primeira deficiência hipofisária a ocorrer, sugerimos o Teste do Glucagon, com duração de 3h. Naqueles com resultados duvidosos, tanto para GH quanto cortisol, cabe a indicação do ITT, ou o Teste do ACTH sintético, para avaliação apenas do cortisol. Desta forma, recomendamos o Teste do Glucagon de curta duração como a opção inicial na investigação das deficiências de GH e/ou cortisol, por trata-se de um teste com menor custo, menos efeitos colaterais e maior segurança.

REFERÊNCIAS

- AIMARETTI, G.; BAFFONI, C.; BELLONE, S.; Di VITO L., CORNELI, G.; ARVAT, E. et al. Retesting Young adults with childhood-onset growth hormone (GH) deficiency with GH-releasing-hormone-plus-arginine test. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 85, 3693-3699. 2000.
- ASA S.L. AFIP atlas of tumor pathology. Fourth series. Fascicle 15. **Tumors of the Pituitary Gland**. ARP AFIP, Washington DC. 2011.
- BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L.; MANNAVOLA, D.; CAMPI I. Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. v. 23, n. 5, p. 597-606. 2009.
- BEHAN, L.A.; MOYLES, P.; CUESTA, M.; ROGERS, B.; CROWLEY, R.K.; RYAN J. et al. The incidence of anterior pituitary hormone deficiencies in patients with macroprolactinoma and idiopathic hyperprolactinaemia. **Clinical Endocrinology**. 87 (3):257-263. 2017.
- BELLONE, J.; AIMARETTI, G.; BELLONE, S.; BAFFONI, C.; ORIGLIA, C.; CAPPA M. et al. Sequential administration of arginine and arginine plus GHRH to test somatotroph function in short children. **Journal of endocrinology Investigation**. 23, 97-101. 2000.
- BERG, C.; MEINEL, T.; LAHNER, H.; YUECE, A.; MANN, K.; PETERSENN S. Diagnostic Utility of the Glucagon Stimulation Test in Comparison to the Insulin Tolerance Test in Patients Following Pituitary Surgery. **European Journal of Endocrinology**. 162, 477-482. 2010.
- BRABANT, G.; POLL, E.M.; JONSSON, P.; POLYDOROU, D.; KREITSCHMANN-ANDERMAHR, I. "Etiology, baseline characteristics, and biochemical diagnosis of GH deficiency in the adult: are there regional variations?" **European Journal of Endocrinology**, vol. 161, supplement 1, pp. S25–S31. 2009.
- BRISTOW, A.F.; JESPERSEN, A.M. The Second International Standard for somatropin (recombinant DNA-derived human growth hormone): preparation and calibration in an international collaborative study. **Biologicals**. Jun;29(2):97-106. 2001.
- CAIN J.P.; WILLIAMS G.H.; DLUHY R.G. Glucagon-initiated human growth hormone release: a comparative study. **Can Med Assoc J**. 107: 617-622. 1972.
- CAROSI, G.; MALCHIODI, E.; FERRANTE, E.; SALA, E.; VERRUA, E.; PROFKA. E. et al. Hypothalamic-Pituitary Axis in Non-Functioning Pituitary Adenomas: Focus on the Prevalence of Isolated Central Hypoadrenalism. **Neuroendocrinology**. 102(4):267-273. 2015.
- COHAN, P.; FOULADI A.; ESPOSITO F.; MARTIN, N.A.; KELLY, D.F. Symptomatic Rathke`s cleft cysts: A report of 24 cases. **J. Endocrinol. Invest** 2004, 27: 943-948.

CONCEIÇÃO, F.L.; SILVA, A.; LEAL COSTA, A.J.; VAISMAN, M. Glucagon stimulation test for the diagnosis of GH deficiency in adults. **J. Endocrinol Invest.** 26: 1065-1070. 2003.

CORNELI, G.; Di SOMMA, C.; PRODAM, F.; BELLONE, J.; BELLONE, S.; GASCO, V. et al Cut-off limits of the GH response to GHRH plus arginine test and IGF-1 levels for the diagnosis of GH deficiency in late adolescents and Young adults. **European Journal of Endocrinology.** 157, 701-708. 2007.

DALY, AF.; RIXHON, M.; ADAM, C.; DEMPEGIOTI, A.; TICHOMIROWA, M.A.; BECKERS, A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 91, p. 4769-4775. 2006.

DIRI, H.; KARACA, Z.; SIMSEK, Y.; TANRIVERDI, F.; UNLUHIZARCI, K.; SELCUKLU, A. et al. Can a glucagon stimulation test characterized by lower cut-off value be used for the diagnosis of growth hormone deficiency in adults? **Pituitary.** 18: 884-892. 2015.

EZZAT, S.; ASA, S.L.; COULDWELL, W.T.; BARR, C.E.; DODGE, W.E.; VANCE, M.L. et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. **Cancer.** v. 101, p. 613–619. 2004.

FERNANDEZ, A.; KARAVITAKI, N.; WASS, J.A. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). **Clin Endocrinol (Oxf).** v. 72, n. 3, p. 377-382. 2010.

GALLAND, F.; VANTYGHEM, M-C.; CAZABAT, L.; BOULIN, A.; COTTON, F.; BONNEVILLE J-F. et al. Management of nonfunctioning pituitary incidentaloma. **Annaels d'Endocrinologie.** 76, 191-200. 2015.

GIUFFRIDA, F.M.; BERGER, K.; MONTE, L.; OLIVEIRA C.H.; HOFF A.O.; MACIEL R.M. et al. Relationship between GH response and glycemic fluctuations in the glucagon stimulation test. **Growth Hormone & IGF Research.** 19:77-81. 2009.

GOMEZ, J.M.; ESPADERO, R.M.; ESCOBAR-JIMENEZ, F.; HAEKINS, F.; PICO, A.; HERRERA-POMBO J.L. et al. Growth hormone release after flucagon as a reliable test of growth hormone assessment in adults. **Clin Endocrinol (Oxf).** 56: 329-334. 2002.

GREENWOOD, F.C.; LANDON, J.; STAMP T.C. The plasma sugar, free fatty acid, cortisol and growth hormone response to insulin in control subjects. **Journal of Clinical Investigation.** 45, 429-436. 1966.

HAMRAHIAN, A.H.; YUEN, K.C.J.; GORDON, M.B.; PULASKI-LIEBERT, K.; BENA, J.; BILLER B.M.K. Revised GH and cortisol cut-points for the glucagon stimulation test in the evaluation of GH and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in adults: results from a prospective randomized multicenter study. **Pituitary.** 19: 332-341. 2016.

LEONG, K.S.; WALKER, A.B.; MARTIN, I.; WILE, D.; WILDING, J.; MacFARLANE, I.A. Na audit of 500 subcutaneous glucagon stimulation tests to asses growth hormone and ACTH secretion in patientes with hypothalamic-pituitary disease. **Clinical Endocrinology**. 54, 463-468. 2001.

LIN T.; TUCCI, J.R. Provocative tests of growth-hormone release. A comparison of results with seven stimuli. **Annals of Internal Medicine**. 80, 464-469. 1974.

LITTLE, M.D.; GIBSON, S.; WHITE, A.; SHALET, S.M. Comparison of the ACTH and cortisol responses to provocative testing with glucagon and insulin hypoglycaemia in normal subjects. **Endocrinol (Oxf)**. 31: 527-533. 1989.

MAGHINE, M.; CAVIGLIOLI, F.; TINELLI, C.; AUTELLI, M.; ARICÓ, M.; AIMARETTI, G. et al. GHRH plus arginine in the diagnosis of acquired GH deficiency of childhood-onset. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 87, 2740-2744. 2002.

MELMED, S. Pituitary Tumors. **Endocrinol Clin N Am**. (44): 1-9p. 2015.

MITCHELL, M.L.; BYRNE, M.J.; SANCHEZ, Y.; SAWIN, C.T. Detection of growth-hormone deficiency: the glucagon stimulation test. **N Engl J Med**. 282: 539-541. 1970.

MOLITCH, M.E.; CLEMMONS, D.R.; MALOZOWSKI, S.; MERRIAM, G.R.; LEE VANCE, M. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 96, n. 6, p. 1587-609. 2011.

NIEMAN, L.K.; BILLER, B.M.; FINDLING, J.W.; NEWELL-PRICE, J.; SAVAGE, M.O.; STEWART, P.M. et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. 2008, v. 93, n. 5, p. 1526-40.

ORME S, M.; PRICE, A.; WEETMAN, A.P.M.; ROSS, R.J. Comparison of the diagnosis the diagnostic utility of the simplified and standard i.m. glucagon stimulation test (IMGST). **Clin Endocrinol (Oxf)** 49: 773-778. 1998.

PAWLIKOWSKI, M.; KUNERT-RADEK, J.; RADEK, M. Silent corticotropinoma. **Neuro Endocrinology Letters**. 29: 347-350. 2008.

PETERSEN, S.; JUNG, R.; BEIL, F.U. Diagnosis of growth hormone deficiency in adults by testing with GHRP-6 alone or in combination with GHRH: comparison with the insulin tolerance test, **European Journal of Endocrinology**. 146, 667-672. 2002.

PLUMPTON, F.S.; BESSER, G.M. The adrenocortical response to surgery and insulin induced hypoglycemia in corticosteroid treated subjects. **British Journal of Surgery**. 56, 216-219. 1969.

POPOVIC, V.; LEAL, A.; MICIC, D.; KOPPESCHAAR, H.P.F.; TORRES, E.; PARAMO, C. et al. GH-releasing hormone and GH-releasing peptide-6 for diagnostic testing in GH-deficient adults. **Lancet**. 356, 1137-1142. 2000.

RAO R.H.; SPATHIS G.S. Intramuscular glucagon as a provocative stimulus for the assessment of pituitary function: growth hormone and cortisol responses. **Metabolism**. 36: 658-663. 1987.

REGAL M., PARAMO C., SIERRA S.M., GARCIA-MAYOR R.V. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult caucasian population in northwestern Spain. **Clinical Endocrinology**. 55, 735-740. 2001,

SAINDANE A.M.; LIM P.P.; AIKEN, A.; CHEN Z.; HUDGINS P.A. Factors Determining the Clinical Significance of an "Empty" Sella Turcica. **American Journal of Roentgenology**. 200, may, 1125-1131. 2013.

SCHEITHAUER, B.W. *et al.* Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. **Neurosurgery**. v 59, p. 341–353. 2006.

SCHMIDT, I.L.; LAHNER, H.; MANN, K.; PETERSENN, S. Diagnosis of adrenal insufficiency: evaluation of the corticotrophin-releasing hormone test and basal serum cortisol in comparison to the insulin tolerance test in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 88, 4193-4198. 2003.

SNYDER P.J. Incidentally discovered sellar masses (pituitary incidentalomas). **UPtodate**. Accessed October 2015.

TABARIN, A.; PEREZ, P. Pros and cons of screening for occult Cushing's syndrome. **Nature Reviews Endocrinology**. 7: 445-456. 2011.

TAVARES, A.B.W.; SEIXAS-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, D.G.H.; PINHEIRO, M.F.C.; VAISMAN, M.; CONCEIÇÃO, F.L. Growth hormone and cortisol secretion in the elderly evaluated using the glucagon stimulation test. **Endocrine**. 56: 317-324. 2017.

TOOGOOD, A.; BRABANT, G.; MAITER, D.; JONSSON, B.; FELDT-RASMUSSEN, U.; KOLTOWSKA-HAGGSTROM, M. et al. Similar clinical features among patients with severe adult growth hormone deficiency diagnosed with insulin tolerance test or arginine or glucagon stimulation tests. **Endocr Pract**. 18 (3): 325-334. 2012.

TORPY, D.J. Screening for ACTH-dependent Hypercortisolism in Patients with Pituitary Incidentaloma. **European Journal of Endocrinology**. Commentary, 172:4, C1-C4. 2015.

WALDHAUSL, W.; HAYDL, H.; NOWOTNY, P. ACTH and cortisol responses to glucagon stimulation. **J Clin Endocrinol Metab**. 43: 675-678. 1976.

YUEN, C.J.; BILLER, B.M.K.; KATZNELSON, L.; RHOADS, S.A.; GUREL, M.H.; CHU O. et al. Clinical characteristics, timing of peak responses and safety aspects

of two regimens of the glucagon stimulation test in evaluating growth hormone and cortisol secretion in adults. **Pituitary**. 16: 220-230. 2013.

YUEN, C.J.K. Glucagon Stimulation Testing in Assessing for Adult Growth Hormone Deficiency: Current Status and Future Perspectives. **ISRN Endocrinology**. 11: 1-6p. 2011.

YUEN, C.J.K.; TRITOS, N.A.; SAMSON, S.L.; HOFFMAN, A.R.; KATZNELSON, L. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: Update on Growth Hormone Stimulation Testing and Proposed Revised Cut-point for the Glucagon Stimulation Test in the Diagnosis of Adult Growth Hormone Deficiency. **Endocrine Practice** vol 22 n. 10. 2016.

YUEN, KC.; COOK, D.M; SAHASRANAM, P.; PATEL, P.; GHODS, D.E.; SHAHINIAN, H.K. *et al.* Prevalence of GH and other Anterior Pituitary Hormone Deficiencies in Adults with Nonsecreting Pituitary Microadenomas and Normal Serum IGF-1 Levels. **Clinical Endocrinology**. 69: 292-298. 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: Avaliação dos Eixos Somatotrófico e Corticotrófico em Microadenomas Hipofisários Não-funcionantes e Microprolactinomas

ORIENTADOR: Manuel dos Santos Faria

MESTRANDA: Viviane Chaves de Carvalho Rocha

O Senhor (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como nome “Avaliação dos Eixos Somatotrófico e Corticotrófico em Microadenomas Hipofisários Não-funcionantes e Microprolactinomas”.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar se pacientes que apresentam um tumor na glândula hipófise menores que 1cm que não secrete quantidades excessivas de nenhum hormônio hipofisário e, também, se nos tumores que secretem o hormônio prolactina têm alguma deficiência hormonal através do teste feito com a substância glucagon. Para confirmar estes achados, torna-se necessário comparar esse grupo de pacientes a um grupo de pessoas que não apresentam tumor de hipófise os quais serão submetidos a uma Ressonância da glândula Hipófise e que serão chamados grupo controle.

Abaixo está descrito o procedimento a ser seguido para aqueles que concordarem em participar:

Se o Senhor (a) for um participante dessa pesquisa, seus dados serão coletados através da consulta de seu prontuário e/ou de sua avaliação clínica, assim como da avaliação dos resultados dos exames de Ressonância de Hipófise e laboratoriais que serão solicitados para o Senhor (a).

Os exames de laboratório serão realizados por meio de coleta de sangue. Nós faremos a limpeza de seu braço com álcool e puncionaremos uma veia para coletar o sangue de seu braço utilizando uma técnica estéril e sempre com material descartável.

O Teste com o Glucagon será realizado com acompanhamento médico e serão coletadas amostras de sangue durante um período de 3h, após injeção de glucagon por via intramuscular (coxa).

RISCOS

Na realização dos Testes do Glucagon e Teste de Tolerância à Insulina os riscos são mínimos, porém, sendo os mais frequentemente relatados: náuseas, tonturas, cefaleia (dor de cabeça), vômitos, no Teste do Glucagon, e náuseas, sonolência e hipoglicemia (açúcar

baixo), no Teste de Tolerância à Insulina (ITT), e os risco de pequenos sangramentos ou equimoses no local da punção venosa. Durante todo o período de realização dos testes os pacientes terão acesso venoso periférico (punção de veia do antebraço) mantido com Soro Fisiológico 0,9%. Serão medidas a pressão arterial, pulso e glicemias (dosagens do açúcar no sangue) por médico e equipe de enfermagem durante todo período de duração do Teste. As coletas das amostras do sangue serão realizadas através da veia do antebraço já puncionada. Caso haja necessidade de correção da hipoglicemia (açúcar baixo), esta será realizada com glicose a 50% através da veia já puncionada.

Não há riscos relacionados à realização de Ressonância Magnética da Hipófise.

BENEFÍCIOS

Em caso de alterações nos seus exames, o Sr (a) será encaminhado para tratamento com os médicos do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão Unidade Presidente Dutra (HUUFMA).

Espera-se que os resultados desse estudo traga mais benefícios no diagnóstico e cuidado de pacientes com tumores de hipófise.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

O Registro da participação neste estudo será confidencial, até o limite permitido pela lei. No entanto, agências regulamentadoras Federais no Brasil e o Comitê de Ética podem inspecionar e copiar registros pertinentes à pesquisa e estes podem conter informações identificadoras.

Os registros de cada indivíduo serão guardados e somente os pesquisadores membros da equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente será preservada. Os Resultados serão relatados de forma sumariada e o indivíduo não será identificado.

Os dados coletados nesta pesquisa só serão utilizados para o proposto neste estudo sendo, portanto, garantido a não utilização para outro fim sem a autorização do indivíduo doador ou do seu representante legal, mediante a elaboração de um novo protocolo de pesquisa, com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Toda participação é voluntária. O Senhor (a) tem o direito de se recusar a participar e de desistir de participar dessa pesquisa a qualquer momento, mesmo que ela já tenha sido

iniciada. Se isso acontecer e o Senhor (a) for um paciente com um tumor na glândula hipófise, garantimos que não terá qualquer prejuízo no seu tratamento e que esse tratamento não será diferente caso participe ou não dessa pesquisa. Caso decida participar, garantimos que não terá qualquer gasto financeiro.

ESCLARECIMENTOS

Estamos dispostos a dar todo e qualquer esclarecimento sobre esta pesquisa e tirar qualquer dúvida, a qualquer momento. Caso tenha interesse em ser informado dos resultados desta pesquisa, este é um direito seu e temos o dever de lhe informar. Para isso, basta entrar em contato com o número telefônico do pesquisador responsável presente nesta folha.

Não haverá prejuízos financeiros, mas também, não haverá remuneração para a participação na pesquisa.

Data _____/_____/_____

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do participante da pesquisa

Endereço:

Rua Barão de Itapari, 227 – Centro,

Fone: (98) 991123098

APÊNDICE B: Ficha-Protocolo de Pesquisa**FICHA-PROTOCOLO DE PESQUISA****Avaliação dos Eixos Somatotrófico e Corticotrófico nos Microadenomas Hipofisários Não-funcionantes e Microprolactinomas**

Nº PRONTUÁRIO: _____ D.N.: ____/____/____
 NOME: _____ SEXO: ____ IDADE: ____
 PESO: _____ ESTADO CIVIL: _____
 ENDEREÇO: _____ TELEFONE: _____

ANAMNESE/EXAME FÍSICO:

- | | | |
|--|---|--|
| ☐ Galactorreia | ☐ Ginecomastia | ☐ Diarreia |
| ☐ Cefaleia | ☐ Ganho de peso | ☐ Tonturas |
| ☐ Oligo/amenorreia | ☐ Disfunção erétil | ☐ Uso de drogas ilícitas: _____ |
| ☐ Acne | ☐ Depressão | |
| ☐ Perda de peso | ☐ Constipação | ☐ Hipotensão postural |
| ☐ Alteração da libido | ☐ Queda de pelos axilares/pubianos | ☐ Escurecimento da pele |
| ☐ Fadiga | | |

DIAGNÓSTICO DO TUMOR HIPOFISÁRIO:

- ☐ Microprolactinoma (<1cm)
☐ Microadenoma não-funcionante (<1cm)

OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS:

- | | | |
|-------------------------------------|---|---|
| ☐ HAS | (data): _____ | ☐ Hipotireoidismo primário |
| ☐ DM | ☐ Dislipidemia | ☐ AVE prévio (data): _____ |
| ☐ IAM prévio | ☐ Nódulo tireoideano | |

EXAMES DE IMAGEM:

TC de sela: _____

RM de hipófise: _____

Campimetria: _____

US Pélvica ou USTV: _____

EXAMES LABORATORIAIS:

EXAMES DATA											
LH											
FSH											
estradiol											
progesterona											
testosterona											
Cortisol basal											
Cortisol pós- 1mg											
IGF1											
GH basal											
TSH											
T4 livre											
Anti-TPO											
Anti-Tg											
prolactina											
macroprolactina											
ACTH											
βHCG											
cálcio											
albumina											
fósforo											
PTH											
ureia											
creatinina											
Na+											
K+											
Hg/Ht											
leucócitos											
plaquetas											
glicemia jejum											
Vitamina D											
DHEA											
sDHEA											

TRATAMENTO:

- () Medicamentoso
 (a) Bromoergocriptina
 (b) Cabergolina

() Cirúrgico: CTE

Data: _____

Motivo: _____

TESTE DO GLUCAGON (Data): ____ / ____ / ____

EXAMES TEMPOS	BASAL	90min	120min	150min	180min
GH					

EXAMES TEMPOS	BASAL	90min	120min	150min	180min
Glicose					

EXAMES TEMPOS	BASAL	90min	120min	150min	180min
Cortisol					

PA antes do teste _____

PA após teste _____

INTERCORRÊNCIAS DURANTE O TESTE DO GLUCAGON:

() Náuseas: em qual tempo do teste? _____

() Vômitos: em qual tempo do teste? _____

() Dor abdominal: em qual tempo do teste? _____

() Hipoglicemia: em qual tempo do teste? _____

() Cefaléia: em qual tempo do teste? _____

() Tonturas: em qual tempo do teste? _____

() Outros: Quais? _____

Em qual tempo do teste? _____

TESTE TOLERÂNCIA À INSULINA – ITT

DATA: ____/____/____

NOME _____

Peso: _____

EXAMES TEMPOS	BASAL	15min	30min	60min	90min	120min
Glicose						

ANTES DO TESTE

PA _____
FC _____

APÓS TESTE

PA _____
FC _____

INTERCORRÊNCIAS DURANTE O ITT

- () Náuseas: em qual tempo do teste? _____
- () Vômitos: em qual tempo do teste? _____
- () Dor abdominal: em qual tempo do teste? _____
- () Hipoglicemia: em qual tempo do teste? _____
- () Cefaléia: em qual tempo do teste? _____
- () Tonturas: em qual tempo do teste? _____
- () Alteração do nível de consciência? _____
- () Convulsão? _____
- () Outros: Quais? _____
- Em qual tempo do teste? _____

ANEXOS

Anexo A: Parecer de Autorização COMIC - HUUFMA

		UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA COMISSÃO CIENTÍFICA – COMIC – HUUFMA	
PARECER DE AUTORIZAÇÃO			
Financiamento		Finalidade do projeto	
☒ (x) Recurso Próprio ☐ () Fomento Público Nacional ☐ () Fomento Público Internacional ☐ () Fomento Privado Nacional / Ind. Farmacêutica ☐ () Fomento Privado Internacional / Ind. Farmacêutica		☐ () Graduação ☐ () Especialização ☐ () Residência Multiprofissional ☐ () Residência Médica ☐ () Residência Buco Maxilo ☐ () Iniciação Científica ☐ () Dep. Acadêmico ☒ (x) Mestrado ☐ () Doutorado ☐ () Serviço/HU-UFMA ☐ () Outros/ Multicêntrico	
		Nº do Protocolo: 23523.001725/2016-97 Data de Entrada: 12/04/2016 Nº do Parecer: 40/2016 Parecer: APROVADO	

I - IDENTIFICAÇÃO:

Título: Avaliação dos Eixos Somatotrófico e Corticotrófico em Microadenomas Hipofisários Não-funcionantes e Microprolactinomas		
Pesquisador Responsável: Manuel dos Santos Faria		
Maior Titulação: Doutorado		
Equipe Executora: Viviane Chaves de Carvalho Rocha, Gilvan Cortês Nascimento, Sabrina da Silva Pereira Damianse		
Unidade onde será realizado: ☒ (x) HUPD ☐ () HUMI ☐ () CEPEC ☐ () Biobanco ☐ () Anexos		
Sector de realização: Endocrinologia		
Cooperação estrangeira: (não)	Multicêntrico: (não)	Coparticipante (não)

II - OBJETIVOS

- **Geral:** Avaliar a resposta dos eixos somatotrófico e corticotrófico em microadenomas hipofisários não-funcionantes e em microprolactinomas pelo teste de glucagon.

- **Específicos:** Avaliar a resposta do eixo somatotrófico nos microadenomas não-funcionantes e microprolactinomas; Avaliar a resposta do eixo corticotrófico nos microadenomas não-funcionantes e microprolactinomas; Avaliar a efetividade e segurança do teste de Glucagon para avaliação dos tumores hipofisários clinicamente não-funcionantes menores que 1cm e nos microprolactinomas.

III – CRONOGRAMA: Início da coleta: Julho/2016

Final do estudo: Novembro/2017

IV - NÚMERO ESTIMADO DA AMOSTRA: 70

V - RESUMO DO PROJETO: Os tumores hipofisários não funcionantes acometem 15-39% de todos os tumores hipofisários, enquanto que os prolactinomas têm uma prevalência de 500 casos/1.000.000 habitantes. Os eixos de GH/IGF1 e ACTH/cortisol, nestes tumores, são rotineiramente avaliados, mas sem testes provocativos ou de estímulo. Há poucos dados na literatura mostrando a prevalência de deficiência de GH e cortisol nos adenomas não secretores menores que 1cm (microadenomas), bem como nos prolactinomas, além de escassez de dados, também, acerca da segurança e aplicabilidade do teste de Glucagon para avaliação do eixo somatotrófico (GH) e corticotrófico(cortisol) nestes tumores como substituto do ITT (teste de estímulo com insulina), considerado o padrão-ouro, em casos onde há contra-indicação deste. O objetivo principal deste estudo é avaliar a resposta dos eixos somatotrófico e corticotrófico em microadenomas hipofisários não-funcionantes e em microprolactinomas pelo teste de glucagon. Trata-se de um estudo descritivo e analítico, prospectivo, de uma amostra por conveniência de pacientes com adenomas hipofisários não secretores e de microprolactinomas atendidos no ambulatório

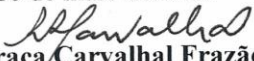
de neuroendocrinologia do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). Financiamento próprio.

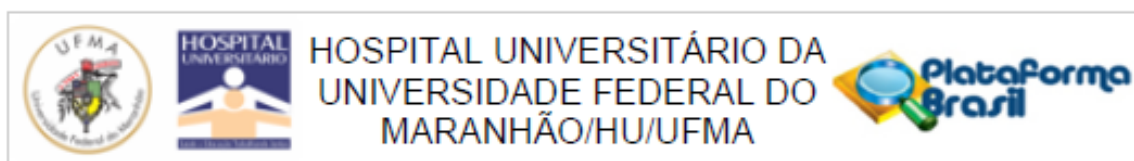
VI – PARECER: Aprovado

A aprovação representa a autorização para a coleta de dados no âmbito do HU-UFMA, fundamentado na Resolução 001/CAHU/UFMA De 03 de agosto de 2007. entretanto **o início da coleta de dados** está condicionado à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/HU-UFMA **em atendimento à Resolução CNS nº 466/12** e suas complementares, considerando que os aspectos éticos não são avaliados pela COMIC.

Após o término da pesquisa, o pesquisador deverá encaminhar o relatório final (resumo, cópia em CD) à Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP-HU-UFMA).

São Luís, 10 de maio de 2016


Prof. Dra. Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
Gerente de Ensino e Pesquisa-GEP/HUUFMA

Anexo B: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa -CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação dos Eixos Somatotrófico e Corticotrófico em Microadenomas Hipofisários Não-funcionantes e Microprolactinomas

Pesquisador: Manuel dos Santos Faria

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 57658016.0.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.832.986

Apresentação do Projeto:

Os tumores hipofisários não funcionantes acometem 15-39% de todos os tumores hipofisários, enquanto que os prolactinomas têm uma prevalência de 500 casos/1.000.000 habitantes. Os eixos de GH/IGF1 e ACTH/cortisol, nestes tumores, são rotineiramente avaliados, mas sem testes provocativos ou de estímulo. Há poucos dados na literatura mostrando a prevalência de deficiência de GH e cortisol nos adenomas não secretores menores que 1cm (microadenomas), bem como nos prolactinomas, além de escassez de dados, também, acerca da segurança e aplicabilidade do teste de Glucagon para avaliação do eixo somatotrófico (GH) e corticotrófico (cortisol) nestes tumores como substituto do ITT (teste de estímulo com insulina), considerado o padrão-ouro, em casos onde há contra-indicação deste. O grupo será constituído de pacientes com adenomas hipofisários não secretores e que estejam em acompanhamento ou iniciando sua avaliação no ambulatório de neuroendocrinologia do HUUFMA, e, também, os tumores hipofisários produtores de prolactina menores que 1cm (microprolactinomas); maiores de 18 anos de idade, assim como de indivíduos da população geral que constituirão o grupo controle pareado por sexo e idade. Estimamos o número total de 70 participantes do estudo. Todos serão submetidos a Ressonância Magnética (RM) de hipófise. O diagnóstico da enfermidade será firmado a partir de um quadro clínico correspondente e associado a exame de imagem compatível com adenoma hipofisário com níveis

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

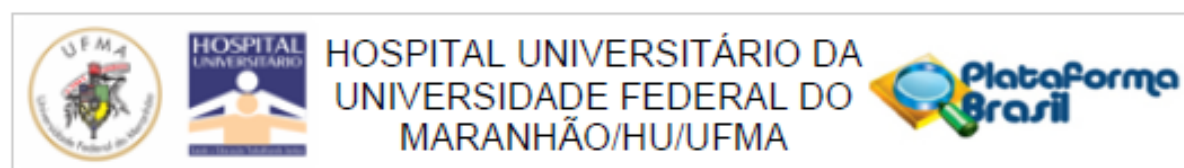
Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.832.986

plasmáticos normais de cortisol e de IGF-I. Adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes apresentarão, por definição, níveis hormonais normais ou baixos de PRL e TSH/T4 livre, com supressão adequada de cortisol ao teste de supressão com dexametasona para excluir Doença de Cushing; Prolactinomas serão definidos de acordo com diretrizes publicadas, assim como o diagnóstico de Doença de Cushing e

TSHomas. Após avaliação dos critérios de inclusão, os pacientes serão submetidos ao Teste de estímulo de GH e Cortisol com Glucagon. Após o jejum, será coletada amostra de sangue para dosagem de GH, cortisol e glicemia, e aplica-se glucagon por via SC na dose de 0,03mg/kg (máximo de 1mg), realizando-se subsequentes coletas de GH basal e com 60, 90, 120 e 180 minutos; dosagem de glicemia aos 30, 60, 90 e 120min; e cortisol com 150 e 180 minutos.

Crítérios de inclusão:

- a) Microadenomas hipofisários não-funcionantes e tumores produtores de prolactina menores que 1cm (microprolactinomas), cujo tamanho será avaliado pela RM de hipófise;
- b) Maiores de 18anos e que concordarem em participar da pesquisa e assinarem o TCLE;

Crítérios de exclusão

- a) menores de 18 anos;b) Tumores hipofisários produtores de cortisol (Doença de Cushing)c) Tumores hipofisários produtores de GH (acromegalia);d) Gestantes;e) Tumores hipofisários produtores de gonadotrofinas (FSH e LH);f) Tumores hipofisários produtores de TSH;g) Tumores hipofisários com múltiplos déficits (panhipopituitarismo)h) Doenças tiroideanas não compensadas;i) Doenças infecciosas em atividade;j) Doenças agudas ou crônicas não compensadas.

Todos os participantes do estudo realizarão avaliações clínica e laboratorial, e estudo de imagem através de Ressonância Magnética. Na avaliação laboratorial serão realizados dosagens de GH, IGF, ACTH, cortisol e prolactina, e demais exames da função hipofisária (TSH, T4 livre, FSH, LH, testosterona e estradiol). Caso haja alterações nestas dosagens, excesso de produção hormonal, o participante será automaticamente excluído, pois trata-se de amostras de pacientes com tumores hipofisários funcionantes (secretores). Todos os participantes serão submetidos ao Teste do Glucagon realizado com 1mg de glucagon IM, e coletas de amostras sanguíneas para GH, cortisol e glicose nos tempos basal, 90, 120, 150 e 180 minutos. Trata-se de um estudo descritivo e analítico, prospectivo, de uma amostra por conveniência de pacientes com adenomas hipofisários não secretores e de microprolactinomas atendidos no ambulatório de neuroendocrinologia do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). O

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

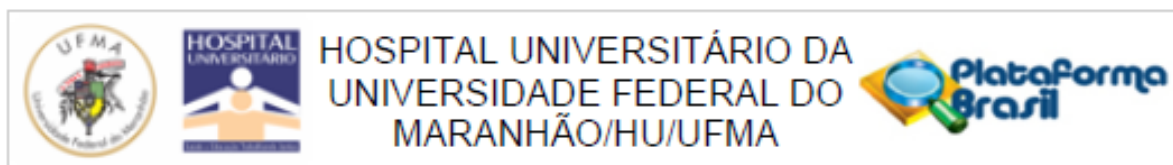
UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.832.986

estudo será realizado no HUUFMA Unidade Presidente Dutra, onde se dará o atendimento dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle e a realização de Ressonância Magnética e dosagens hormonais e Teste de estímulo com glucagon no Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC da UFMA, onde a coleta de sangue para os exames bioquímicos e hormonais será realizada. Nas variáveis com distribuição normal será aplicado o teste t de Student independente e não havendo distribuição normal será aplicado o teste de Mann Whitney. Para comparação das variáveis categóricas serão aplicados o teste do qui-quadrado de independência ou o teste exato de Fisher quando apropriado. Em todos os testes, o nível de significância aplicado será de 5%, ou seja, será considerado estatisticamente significativo quando o valor “p” 0,05. Financiamento próprio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a resposta dos eixos somatotrófico e corticotrófico em microadenomas hipofisários não-funcionantes e em microprolactinomas pelo teste de glucagon.

Objetivo Secundário:

- a) Avaliar a resposta do eixo somatotrófico nos microadenomas não-funcionantes e microprolactinomas;
- b) Avaliar a resposta do eixo corticotrófico nos microadenomas não-funcionantes e microprolactinomas;
- c) Avaliar a efetividade e segurança do teste de Glucagon para avaliação dos tumores hipofisários clinicamente não-funcionantes menores que 1cm e nos microprolactinomas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos possíveis associados à participação neste estudo são os seguintes: Os riscos relacionados à coleta de sangue que são sangramentos ou equimoses que podem ocorrer em um pequeno número de pessoas que realizam esses procedimentos. Ocorrência de náuseas, vômitos, dor abdominal ou hipoglicemia tardia (queda do açúcar no sangue), mas que são eventos raros e o senhor ficará sob avaliação durante todo o período da coleta de sangue. Não há riscos relacionados à realização de Ressonância Magnética da Hipófise.

Benefícios:

Em caso de alterações nos seus exames, o Sr (a) será encaminhado para tratamento com os médicos do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão Unidade Presidente Dutra (HUUFMA). Espera-se que os resultados desse estudo traga mais benefícios no diagnóstico e cuidado de pacientes com tumores de hipófise.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

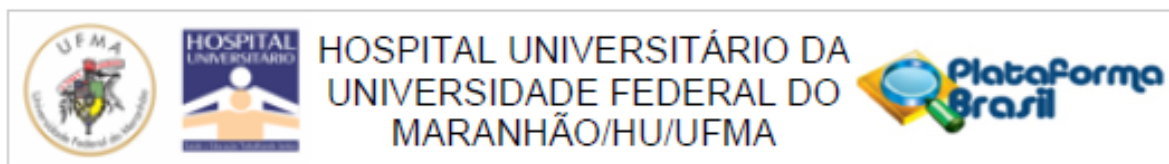
UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.832.986

tumores de hipófise.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

65.020

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante, pois pretende avaliar a resposta dos eixos somatotrófico e corticotrófico em microadenomas hipofisários não-funcionantes e em microprolactinomas pelo teste de glucagon. Os resultados desse estudo permitirão um maior conhecimento e embasamento para os profissionais da área, contribuindo para a rapidez no diagnóstico e assistência aos pacientes com tumores de hipófise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra (em Word).

O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade. Atende as exigências da Norma Operacional nº 001/13.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

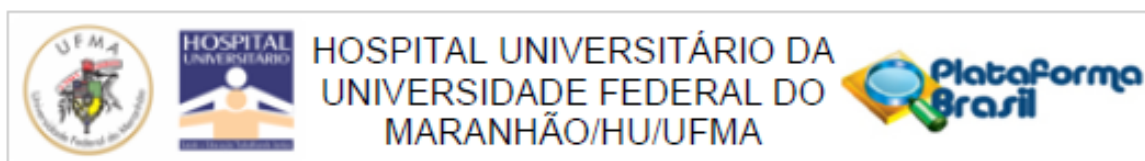
UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.832.986

Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_731115.pdf	18/11/2016 13:04:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_atual.docx	18/11/2016 12:56:41	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	18/11/2016 12:53:38	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Cronograma	Cronograma_atual.docx	18/11/2016 12:35:00	Manuel dos Santos Faria	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	18/11/2016 12:33:10	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	carta.pdf	21/10/2016 11:05:49	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	CEPEC.pdf	18/10/2016 20:23:30	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	197.pdf	18/10/2016 20:12:38	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	196.pdf	18/10/2016 20:11:45	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração de Pesquisadores	195.pdf	18/10/2016 20:11:25	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Scan_Doc0183.pdf	30/08/2016 08:42:36	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Scan_Doc0190.pdf	30/08/2016 08:42:09	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Scan_Doc0188.pdf	30/08/2016 08:41:38	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Scan_Doc0189.pdf	30/08/2016 08:39:43	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	07/07/2016 10:00:42	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	termodecompromisso.pdf	07/07/2016 09:58:46	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração do	Scan_Doc0185.pdf	04/06/2016	Manuel dos Santos	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

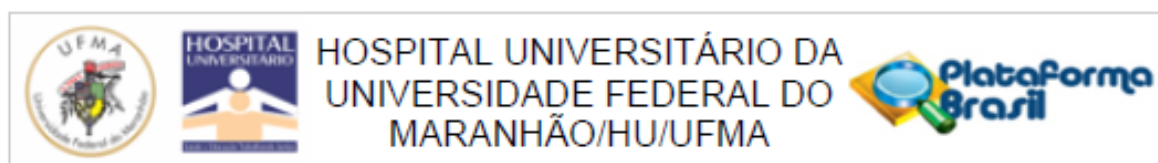
Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.832.986

Patrocinador	Scan_Doc0185.pdf	20:09:15	Faria	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Scan_Doc0184.pdf	04/06/2016 19:53:48	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Folha de Rosto	Scan_Doc0180.pdf	04/06/2016 16:29:29	Manuel dos Santos Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 23 de Novembro de 2016

Assinado por:
FABIO FRANÇA SILVA
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Anexo C: Normas editoriais/Normas para os autores

Neuroendocrinology

International Journal for Basic and Clinical Studies on Neuroendocrine Relationships



Guidelines for Authors

www.karger.com/nen_guidelines

- Introduction
- Manuscript Submission
- Conditions
- Plagiarism Policy
- Arrangement
- References
- Digital Object Identifier (DOI)
- Supplementary Material
- Self-Archiving/Green Open Access, Author's Choice™,
- Funding Organizations (NIH etc.)
- Proofs
- E-pub First
- Reprints

Introduction

The Editorial Board of 'Neuroendocrinology' welcomes articles for review that report new observations on interactions between the brain and the endocrine system.

Papers that are published deal with both basic and clinical subjects. Editorials, summaries of meetings, and reviews of timely topics in basic and clinical neuroendocrinology are also published, but these items are accepted only at the invitation of the Editor-in-Chief.

Manuscript Submissions

Manuscripts written in English should be submitted online.

Should you have any problems with your submission, please contact the Editorial Office at editor@nen-edinburgh.org

Editorial Office 'Neuroendocrinology'

Prof. Dr. Robert Millar

79 Louis Braille Way

Gorebridge

Midlothian EH23 4LD (UK)

Editorial Manager

Dr. Allison Kirsop

E-Mail editor@nen-edinburgh.org

Manuscripts should contain unpublished results of research work, and should be as concise as possible.

The following presentation is recommended:

Abstract, Introductory statement on the purpose of the studies, Materials and Methods, Results, Discussion, and References.

Current abbreviations should be used throughout the text and tables:

- for pituitary hormones ACTH, beta-END, FSH, GH, LH, TSH
- for neuropeptides CRH, not CRF; GAL; GHRH, not GRF; GnRH, not LHRH; NPY; NT; SRIH, not SRIF; VIP etc.

and a definition should be provided the first time each abbreviation appears. Please limit abbreviations to those in common use, and avoid other abbreviations and acronyms.

Manuscripts should contain novel, original data. As a rule, the Editorial office commits itself to achieve initial review of manuscripts within less than 60 days; average interval between submission and publication is 7–9 months.

Authors of articles reporting mostly confirmatory, fragmentary or preliminary findings may be notified within 2 weeks that their manuscript will not be submitted to formal review. Such a proposal will be made by the associate Editors assisted by one member of the Editorial Board. This procedure is intended to provide rapid feedback to authors of manuscripts which have a poor chance of being accepted. Authors have the opportunity to appeal against the decision.

Contributors should know that one of the criteria considered in reviewing manuscripts is the humane and proper treatment of animals. The editors realize that the use of anesthetics, analgesics, and tranquilizers would defeat the purpose of some experiments. However, the

use of painful or otherwise noxious stimuli must be carefully and thoroughly justified in the paper.

Papers that do not meet these criteria will not be accepted for publication.

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of Neuroendocrinology and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

For legal reasons, we must receive your 'Submission Statement' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Arrangement

Title page: The first page of each paper should carry the title, the authors' full first and last names, and the name of the institute or department where the authors conducted their research work.

In addition, the following should be put on the title page:

1. A short title for use as a running head.
2. A list of 3–9 key words.
3. The name and complete mailing address as well as phone and fax numbers of the

individual to whom correspondence, proofs, and requests for reprints should be addressed.

NB: Authors wishing to preserve the phonetic meaning of diacritics (PubMed reduces diacritics to their root characters) must spell their names accordingly when submitting manuscripts (e.g. Müller should be Mueller).

Abstract: Each paper must have a short abstract describing procedures, observations and conclusions, which will appear at the beginning of the article. Abstracts should not exceed 250 words.

Footnotes: Avoid footnotes if at all possible. When essential, they should be numbered consecutively and typed at the foot of the appropriate page.

Acknowledgements: Including, where relevant, credit to the sources of grant support.

Tables and illustrations: Tables (numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate sheets, and each should have a suitable heading. Illustrations should be numbered in Arabic numerals and legends for the figures should be submitted on a separate page. For the reproduction of illustrations, only good drawings and original photographs can be accepted; negatives or photocopies cannot be used. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations on one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm) or provide crop marks. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of all the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).

Examples

(a) Papers published in periodicals: Sun J, Koto H, Chung KF: Interaction of ozone and allergen challenges on bronchial responsiveness and inflammation in sensitised guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:191–195.

(b) Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books: Parren PWHI, Burton DR: Antibodies against HIV-1 from phage display libraries: Mapping of an immune response and progress towards antiviral immunotherapy; in Capra JD (ed): *Antibody Engineering*. *Chem Immunol*. Basel, Karger, 1997, vol 65, pp 18–56. Papers that have been submitted to a journal but are not yet accepted should not be listed in the bibliography, but the data in them can be referred to in the text as unpublished observations. If details of methods are only available in papers that are ‘in press’, copies of the papers should be included with the manuscript submitted to *Neuroendocrinology*, so that the editorial referees can have adequate information to judge the manuscript.

Reference Management Software: Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Supplementary Material

Multimedia files and other supplementary files, directly relevant but not essential to the conclusions of a paper, enhance the online version of a publication and increase its visibility on the web. These files will undergo editorial review. The Editors reserve the right to limit the

scope and length of the supplementary material. Multimedia and supplementary material should meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing. Files should not exceed 10 MB in size. Figures and tables need to have titles and legends, and all files should be supplied separately and labeled clearly. All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material and it will be hosted online at <https://karger.figshare.com> under a CC BY license. Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for supplementary material.

Self-Archiving/Green Open Access

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. For all self-archiving, the posted manuscripts must:

Be used for noncommercial purposes only Be linked to the final version on www.karger.com

Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article: [insert full citation, e.g. Cytogenet Genome Res 2014;142:227–238 (DOI: 10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)].

For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.karger.com. The

option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

The final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

Follow the terms of the relevant Creative Commons license

Be linked to the final version on www.karger.com

Include the following statement:

'The final, published version of this article is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Funding Organizations (NIH etc.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their paper Open Access through Author's Choice™, the embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility of the article. Karger also complies with other funders' requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC.

Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

Proofs

Unless indicated otherwise, a PDF for correction is sent to the corresponding author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author.

E-pub First

All articles are published electronically ahead of print with a DOI number and are supplemented later with the definite reference of the printed version. The articles become available immediately after the authors' approval to publication, with the added advantage of being citable much earlier than in print. Authors can influence the time of appearance by promptly returning the proofs.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the PDF. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.

Anexo D: Artigo submetido: Usefulness of the Glucagon Test in the Diagnosis of Growth Hormone and Cortisol Deficiencies in Small Pituitary Lesions

Usefulness of the Glucagon Test in the Diagnosis of Growth Hormone and Cortisol Deficiencies in Small Pituitary Lesions

Viviane Chaves de Carvalho Rocha^a

Gilvan Cortes Nascimento^a

Sabrina da Silva Pereira Damianse^a

Allysson Milhomem Rocha^b

Marcelo Magalhães Silva^c

Fernando Santos Fontes^d

Manuel dos Santos Faria^e

^aEndocrinology and Metabolism Service of the University Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA), São Luís (MA), Brazil

^bService of Radiology and Imaging Diagnosis of UDI Hospital, São Luís (MA), Brazil

^cBiologist of the Clinical Research Center of the University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil

^dGraduated from the Medical School of the Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil

^eCoordinator of the Endocrinology and Metabolism Service of the Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA), São Luís (MA), Brazil

Viviane Chaves de Carvalho Rocha - first author

Email vcc2007@terra.com.br

Institution Name: Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA) and Research Center of the Federal University of Maranhão (CEPEC -HUUFMA)

Address: Rua Barão de Itapary, Centro, São Luís (MA) CEP 65020070 tel 5198) 32109-1250

Acknowledgments: We thank all patients included in this research, CEPEC, and HUUFMA

Short title:

Key words: nonfunctioning microadenomas, microprolactinomas, stimulus test with glucagon, fixed dose, insulin tolerance test, growth hormone deficiency, cortisol deficiency

ABSTRACT

The consensus in the literature is that the hypothalamic–pituitary axis should be investigated with stimulus tests only for pituitary lesions larger than 1 cm. Pituitary tumors smaller than 1 cm may present deficiencies of growth hormone and cortisol to the stimulus tests. We evaluated the response of growth hormone and cortisol to the glucagon test of 3 h duration (fixed dose) in 40 patients with pituitary lesions smaller than 1 cm, followed by an insulin tolerance test (ITT) to confirm the deficiencies. In the glucagon test, 3.7% of the microprolactinomas did not respond to growth hormone (<3 ng/mL) and 77.8% presented cortisol values >18 μ g/dL, while 37.5% of the nonfunctioning microadenomas had a sub-growth hormone (GH deficiency). All 40 patients had growth hormone value >1 ng/mL. Deficiencies of growth hormone and cortisol were not confirmed by the ITT. Our findings demonstrate that the glucagon test has a high number of false positive results with higher cutoff values. The glucagon test has been shown to be a safe option when there is a contraindication to the ITT. Stimulus tests should not be routinely indicated for evaluation of the hypothalamic–pituitary axis in cases of lesions smaller than 1 cm, except in cases where there are metabolic or clinical alterations suggestive of such deficiencies or progressive decreases of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and cortisol during routine follow-up of these patients. There is a need for adequate cutoffs for both growth hormone and cortisol.

INTRODUCTION

Microadenomas tend to be asymptomatic and may be nonsecretory and thus escape early detection. Growth hormone deficiency is usually the first deficiency to occur in the anterior pituitary gland, which could explain the high prevalence of growth hormone deficiency in pituitary macroadenomas that may present in a mild form, thus making growth hormone deficiency difficult to diagnose in the adult because there is no biological marker, such as, for example, linear growth retardation that occurs in children with growth hormone deficiency. Signs and symptoms may be nonspecific, with changes in body composition, loss of bone mass, fatigue, and adynamia or metabolic alterations with insulin resistance and glycemic changes with high morbidity and mortality that can be reversed by growth hormone replacement. Asymptomatic deficiencies in growth hormone and cortisol in small pituitary lesions call attention to the possible need for hormone replacement for improvement of the quality of life or for prevention of severe cortisol deficiency with risk of shock and death.

The Consensus of the Endocrine Society Clinical Practice Guidelines [1] recommends conducting a provocative test to evaluate the somatotrophic axis in macroadenomas in adults in an appropriate clinical context. The test is mandatory for diagnostic confirmation when insulin-like growth factor 1 (IGF-1) levels are normal. There is no consensus on the use of provocative tests in microadenomas with normal levels of IGF-1. The gold standard test for research is the ITT (insulin tolerance test) [2,3]. Alternative tests to the ITT for this evaluation were proposed decades ago, such as arginine [4]; GHRH + arginine [5]; GHRP-6; GHRP6 + GHRH [6,7]; and CRH, as well as a synthetic ACTH test with lower doses of 1 µg [8]. However, not all of these tests have the ability to evaluate cortisol and growth hormone simultaneously, and some are not available or are very expensive. IGF1 may not be a reliable marker, especially in patients with diseases and/or use of medications that interfere with their evaluation, and it may be a confounding factor for the clinician deciding who should or should not have the growth hormone reserve assessed by stimulus test in nonsecretory microadenomas, particularly in the absence of obvious clinical signs and symptoms.

In view of the contraindications to the ITT, the use of the glucagon test as a reproducible and safe test in the evaluation of the axes of growth hormone and

ACTH/cortisol deficiencies, especially in adults, has been emphasized. The glucagon test is widely used in the United Kingdom and has been increasingly used in the United States since 2008, when GHRH-arginine became no longer available. It is considered by many authors to be the best alternative to the ITT to evaluate the reserve of growth hormone [9-11].

Some advantages of this test compared with most other tests are its few side effects, safety, and tolerability even in patients with hypopituitarism, ease of administration of glucagon subcutaneously or intramuscularly, and the possibility of simultaneously testing somatotrophic (growth hormone) and corticotrophic (ACTH/cortisol) hormones, in addition to not being influenced by sex and growth hormone deficiency of hypothalamic cause in the response to growth hormone. The most common side effects are nausea, vomiting, abdominal pain, and late hypoglycemia. One limitation of this test is that it has a long duration, usually requiring collection of samples every 30 min up to 180 or even 210–240 min, as was initially standardized [8,12-17].

There are insufficient data in the literature to corroborate the routine investigation of growth hormone and cortisol deficiencies with stimulus tests in pituitary microadenomas, as well as in Rathke's cleft cyst or partially empty saddle. Thus, the present study is relevant to the investigation of these deficiencies due to the subtle manifestations of cortisol and growth hormone deficiencies that may already be present at diagnosis and not be detected by only the baseline cortisol and IGF-1 levels. In addition, the study evaluates the safety of the glucagon test.

MATERIALS AND METHODS

We selected 97 patients with pituitary lesions smaller than 1 cm who were being followed up or were beginning their evaluation at University Hospital of Maranhão University (HUUFMA), Brazil, from November 2016 to May 2018. This work was approved by the Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa CEP-HUUFMA). All participants signed informed consent.

The charts were reviewed for growth hormone, IGF-1, ACTH, cortisol, and prolactin and other pituitary function tests (TSH, free T4, FSH, LH, testosterone, and estradiol). Participants with alterations in these hormonal levels were excluded, except for those with high prolactin and lesions smaller than 1 cm, included in the group of microprolactinomas, and also nonsecreting smaller than 1 cm. All

participants had normal IGF-1 levels for their age and sex.

Magnetic resonance imaging results were reassessed by a single radiologist with experience in neuroradiology to confirm the imaging findings and lesion size.

Forty-one patients were eligible for the growth hormone and cortisol evaluation glucagon stimulation test (GlucaGen® HypoKit 1 mg-1UI, Novo Nordisk A/S DK-2820 Gentofte/Denmark) stimulation test. After a fast of at least 8 h, blood samples were collected for measurement of basal growth hormone, cortisol, and glycaemia, and intramuscular thigh injection of 1 mg and 1.5 mg was performed in patients weighing <90 kg and ≥90 kg, respectively. Blood samples for measurement of growth hormone, cortisol, and glucose were collected at 90, 120, 150, and 180 min. One patient with symptomatic hypotension during the test was excluded.

All 12 patients with deficiencies of growth hormone (peak <3 ng/mL) or cortisol (peak <18 µg/dL) on the glucagon test underwent the ITT, except for two patients who could not be contacted. A dose of 0.15 IU/kg was administered in a regular insulin bolus through peripheral venous access, and measurements of baseline glucose, cortisol, and growth hormone were performed at 15, 30, 60, 90, and 120 min. The heart rate and blood pressure of patients undergoing the ITT were measured before, during, and after the test.

The growth hormone levels in the glucagon test were measured by electrochemiluminescence (Immulite® 2000, Siemens, United Kingdom; sensitivity, 0.01 ng/mL; working range, 0.05–40 ng/mL), and the growth hormone levels of the ITTs were measured by quimioluminescence (assay calibrated with reference to the Second International Standard of the World Health Organization–WHO Second International Standard 98/574; sensitivity analysis, >0.01 ng/mL; intra- and interassay accuracy, 1 ng/mL). Cortisol levels were measured by electrochemiluminescence (ECLIA, Cobas 601, Elecsys® Cortisol II, Roche; detection limit, 0.054 µg/dL; repeatability, >1.81–32.62 µg/dL; ≤5% CV; intermediate precision, >1.81–32.62 µg/dL; ≤6% CV) and those of glucose by the enzymatic hexokinase method (Cobas® C-501).

STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed with GraphPad Prism software version 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Descriptive statistics were initially calculated using measures of absolute frequency, relative frequency, mean, and standard deviation. Bar, line, dipper, and box-plot charts were used to represent the distribution of the

data.

The normality of data distribution was assessed by the Lilliefors test. After this procedure, the Wilcoxon and Mann–Whitney tests were selected for comparative analysis of continuous variables. Peak growth hormone and peak cortisol values were transformed into logs for Pearson correlation analysis. Other correlations were expressed by Spearman's correlation coefficient. A multiple linear regression model was applied to evaluate the effect on the growth hormone peak and minimum glucose outcomes.

Fisher's exact test was used to analyze the distribution of the type of pituitary lesion and the category of response to the glucagon test. The level of significance adopted for all tests was 5%.

RESULTS

A total of 40 patients with a mean age of 37.1 ± 11.2 years (range, 16–63 years) were included in the study. The proportion of female patients was 92.5%, and 60% of patients were between 30 and 49 years old. The proportions of overweight and obese patients were 47.5% and 30%, respectively. The most prevalent type of lesion was microprolactinoma (67.5%), followed by nonfunctioning microadenoma (20%) (Table 1). We found deficiencies of growth hormone and cortisol in 10 microadenomas (6 microprolactinomas and 4 nonfunctioning microadenomas). All patients with Rathke's pouch cyst presented GH >3 ng/mL, and all with partially empty sella responded to cortisol. Cortisol deficiency was found in 22.2% of microprolactinomas (six patients), whereas in nonfunctioning microadenomas the most commonly found deficiency was that of growth hormone in three patients (37.5%). We emphasize that one microprolactinoma and one nonfunctioning microadenoma presented with concomitant deficiencies of growth hormone and cortisol. All patients included in the study had normal IGF-1 levels for their sex and age. There were significant differences in the growth hormone response between the types of lesions ($P = 0.031$), but among the lesions analyzed there were no differences in the cortisol results (Table 2).

Figure 1 shows that within 180 min after initiation of the procedure, 35 patients (87.5%) had a growth hormone peak ≥ 3 ng/mL, 31 (77.5%) had a cortisol peak ≥ 18 μ g/dL, and 12 patients had a glucose level ≤ 70 mg/dL. When we used a 1 ng/mL *cutoff* point for growth hormone, all 40 patients obtained a response in the evaluation

with Glucagon Test.

Figures 2 and 3 show the mean and standard deviation values for growth hormone, cortisol, and glucose during the follow-up of the test and the distribution of growth hormone and cortisol peaks and glucose nadirs. At all evaluated times, the growth hormone level was significantly higher than baseline ($P < 0.05$), and the mean growth hormone peak was 7.55 ng/mL. The growth hormone peak was observed within 150 min in 50% of patients. Cortisol levels were higher than baseline at 120, 150, and 180 min ($P < 0.05$), with the highest mean level (24 μ g/dL) at 180 min. Peak cortisol was observed in 77.5% of patients at 180 min. A significant increase in glucose level compared with baseline was observed at 90 min ($P < 0.05$), and the nadir was observed at 180 min.

Table 3 compares mean glucose levels between responders and nonresponders to growth hormone and cortisol. The baseline glucose level was significantly lower among patients who reached a growth hormone peak ($P = 0.010$) and a cortisol peak ($P = 0.014$) during the glucagon test. There were no significant differences between the groups in other glucose measurements.

Linear correlation analysis revealed that the values of the growth hormone and cortisol peaks had a directly proportional and significant correlation ($r = 0.353$, $P = 0.025$), demonstrating the ability of glucagon to stimulate both the growth hormone and the cortisol axes (Figure 4).

Table 4 shows the correlations between continuous variables and measurements of growth hormone, cortisol, and glucose. The data showed that the higher the body mass index (BMI), the lower the peak of GH ($r_s = -0.44$, $P = 0.003$) and the growth hormone variation ($r_s = -0.46$, $P = 0.002$). The data also showed that the younger the patient ($r_s = 0.31$, $P = 0.040$) and the lower the BMI ($r_s = 0.35$; $P = 0.023$), the lower the glucose value during follow-up.

Table 5 shows the results of the multivariate analysis. BMI had an inverse effect and the cortisol peak had a direct effect on the growth hormone peak. Age and peak cortisol variables had direct effects on the glucose nadir, even after multivariate adjustment.

A comparative analysis of the test results was performed between the patients who underwent the two procedures. Compared with the glucagon test, the ITT presented significantly higher measurements of peak growth hormone (12.2 ± 5.8 versus 4.3 ± 3.3) and cortisol (25.7 ± 5.6 versus 17.2 ± 4.2) and lower glucose

measurements ($P = 0.005$) (Figure 5).

All the patients who underwent the ITT because they presented growth hormone or cortisol deficiencies on GST were able to respond to both (GH and cortisol). When using a value of <1 ng/mL in the glucagon test for growth hormone deficiency, we obtained answers in all 40 patients. If we used the cutoff of 16 μ g/dL for cortisol, we found deficiency in two patients (one microprolactinoma and one nonfunctioning microadenoma).

The glucagon test was shown to be very safe. The symptoms most commonly reported by the patients were nausea in 50% at a mean time of 118.6 min and vomiting in 20% at a mean time of 123.7 min. Other signs or symptoms reported were mild forms of somnolence, dizziness, abdominal pain, and headache (Figure 6). One of the patients had the 120 min interrupted test because of symptomatic hypotension.

DISCUSSION

In our study, we found deficiencies of growth hormone, cortisol, or both in 10 microadenomas (17.5%), consisting of 6 microprolactinomas and 4 nonfunctioning microadenomas. Cortisol deficiency was observed in 12.5% of microprolactinomas (five patients), while in nonfunctioning microadenomas the most commonly found deficiency was that of GH in three patients (37.5%). None of the microprolactinomas had growth hormone deficiency alone. Yuen et al. (2008) evaluated 38 patients with nonsecretory pituitary microadenomas and found growth hormone deficiency in 19 patients (50%) with the GHRH-arginine test, which has not been available since 2008 [19]. Yuen et al. also used the synthetic ACTH test at a dose of 1 μ g to evaluate cortisol deficiency in those with low basal cortisol and found that this hormone was insufficient in 3% of patients. The ITT was not used.

Several studies have evaluated the effectiveness of pituitary evaluation with the glucagon test, which is a safe and feasible alternative when there is a contraindication to the ITT or when GHRH-arginine is not available. Many studies used values of <3 ng/mL and <18 μ g/dL, in accordance with our study, for the diagnosis of growth hormone and cortisol deficiencies, respectively. However, many studies suggested values of 1 – 5 ng/mL for growth hormone or 9 – 18 μ g/dL for cortisol, or used different test times [16,18-20], thus improving specificity [12,21-24]. In the 2011 Guideline of the Endocrine Society, a cutoff of 2.5 – 3 ng/mL is

recommended for the definition of severe growth hormone deficiency [1]. It is also suggested to change the cutoff, as the glucagon test is performed with a fixed dose or a dose calculated by weight [19].

Our evaluation showed that all patients who had growth hormone and cortisol deficiencies on the glucagon test and who underwent the ITT were responsive. When we used a value of 1 ng/mL for growth hormone, all of them had a response to glucagon. The change in values for growth hormone and cortisol deficiencies in the glucagon test is indispensable for better accuracy of test.

A recent series by Behan (2017) evaluated deficiencies of pituitary hormones in 35 patients with microprolactinomas by the glucagon and ITT tests. [21] Of the 35 patients, 8.57% (3 patients) had defined deficiencies, consisting of ACTH/cortisol deficiency in 2 patients and concomitant ACTH/cortisol (cortisol <16 µg/dL) and growth hormone (<5 ng/mL) deficiencies in 1 patient, including 1 patient who presented with a severe clinical picture of adrenal insufficiency with need for hydrocortisone, in addition to growth hormone replacement [21]. None of the patients evaluated in this study presented with cortisol deficiency <16 µg/dL. In our series, when we used the cutoff point of 16 µg/dL, we found two patients with cortisol deficiency by the glucagon test (one microprolactinoma and one nonfunctioning microadenoma), both of them responsive to the ITT.

Classically, the glucagon test takes 3–4 h to perform. However, there are reports, including the last Guideline for the diagnosis of growth hormone deficiency in adults, that corroborate the test with a minimum duration of 3 h, since the majority of the growth hormone peak occurs between 120 and 180 min, findings consistent with those of our study in which the growth hormone peak occurred up to 150 min in 85% of patients [1]. Berg et al. stated that decreasing the duration to 3 h did not lead to loss of the diagnostic utility of the test and reduced costs and made it more feasible, reserving the ITT for carefully selected cases, overlapping those with growth hormone values and cortisol in the gray area (that with doubtful values to deficiencies), and as already reported in other studies, the cortisol peak occurred up to 180 min in the glucagon test [12,18,25-29]. According to evaluation by the glucagon test with fixed dose, Hamrahan found late peaks (after 3 h) of growth hormone and cortisol in only 4.7% and 14.3%, respectively, of evaluated patients [24].

Another multicenter study compared the glucagon test in fixed-dose groups (with 3 and 4 h duration) with the dose calculated by weight (4 h duration) in various

pituitary diseases [19]. A similar response of growth hormone with a fixed dose at 3 and 4 h was demonstrated. However, the corrected dose by weight group, with a duration of 4 h, had a higher growth hormone peak and glucose nadir. Patients who underwent the 3- and 4-h fixed-dose tests had growth hormone responses of 81.3% and 80%, respectively, between 90 and 180 min, corroborating the findings of the present study. The cortisol response was not evaluated in patients who received a fixed dose with a duration of 3 h, but in those who underwent a 4-h test, the cortisol response was later, occurring between 210 and 240 min on the than those submitted to test with fixed dose and duration of 4 h. Because there were no significant differences in growth hormone response between the 3- and the 4-h tests, and the cortisol response was later in the 4-h test and earlier in the 3-h test, the choice of fixed-dose glucagon with shorter duration was considered preferable. We found that growth hormone and cortisol peaks occurred at similar times; the majority of growth hormone peaks (75%) occurred between 120 and 150 min and the majority of cortisol peaks (77.5%) at around 180 min. Our data showed glucose peak at 90 min and glucose nadir at 180 min, similar to the results of the multicenter study. [19].

Yuen et al. showed that in the fixed-dose evaluation, age was negatively correlated with growth hormone and cortisol peaks and BMI was negatively correlated only with growth hormone peak, whereas in our evaluation, BMI was negatively correlated with cortisol peaks as well as growth hormone variation; however, there was no correlation between peak cortisol and age [19]. Other studies, although performed in patients with a pre-established diagnosis of growth hormone deficiency, did not show an association between peak growth hormone and BMI [16,18,24]. It is important to note that obesity stimulates the secretion of somatostatin, thus inhibiting the secretion of growth hormone, and somatostatin also plays a role in the direct inhibition of GHRH secretion by the ventromedial nucleus and the arcuate nucleus of the hypothalamus.

In the study by Yuen *et al.*, the growth hormone peak was negatively correlated with basal, peak, and nadir glucose, but not with cortisol values [19], whereas we found similar results only with baseline glycaemia, which was lower among patients who achieved growth hormone and cortisol peaks ($P = 0.010$ and $P = 0.014$, respectively), a finding different from that of the above study. Regarding the higher basal glycaemia in nonresponders to growth hormone and

cortisol, there may be an involvement of insulin resistance that was not addressed in the present study. In our study, there was no significant difference in nadir glucose values with respect to GH peak, but there was a positive correlation between glucose nadir and cortisol peak after multivariate analysis. Our work reinforces previous studies showing that the mechanism of secretion of growth hormone and cortisol in the glucagon test has little or no dependence on glycemic fluctuations per se [30-32].

We found no negative correlation between age and the growth hormone response, unlike what has been demonstrated in other studies, perhaps because our sample population consisted of younger patients [8,23,24]. In addition, in our study, age was positively correlated with peak cortisol and glucose nadir, and we did not find a correlation between cortisol peak and BMI, findings similar to those of Berg et al. (2010). These lower glucose values in individuals of younger age and lower BMI are probably related to body weight and insulin resistance.

In another study, extended TG with a duration of 4 h, the ITT, and the synthetic ACTH test were used to assess deficiencies of growth hormone and cortisol in 28 patients with pituitary lesions who presented with one or more pituitary deficits at diagnosis. The authors proposed a 1 ng/mL *cutoff* for glucagon test with fixed doses of 1 mg and 1.5 mg for patients weighing <90 kg and ≥90 kg, respectively, thus avoiding an excess number of diagnoses of deficiency in patients with sufficient growth hormone, when using the value of 3 ng/mL. It has also been suggested from receiver operating characteristic curve analysis that there is a need for a change in the cutoff point of cortisol in the glucagon curve to a lower value [24].

In the present study, a patient presented with a higher level of cortisol in the baseline sample (before of glucagon injection), previously related in other studies, this presumably reflects a cortisol response to stress associated with the procedure [24,25,30].

The findings of nausea and vomiting at around 120 min in two studies [19,22] were also similar to our findings, indicating the need for patient monitoring, sometimes requiring the use of antiemetics, which was not necessary in any of our patients [19,22].

The main limitations of our study are the small number of patients and the absence of a control group.

CONCLUSION

Periodic follow-up with measurement of levels of pituitary hormones, not only growth hormone and cortisol, and careful selection of those who will benefit from further investigation with a stimulus test are required.

The glucagon test proved to be a safe alternative for evaluation of growth hormone and cortisol deficiencies. However, it requires changes in the cutoffs for both growth hormone and cortisol for better diagnostic accuracy, especially when different values are used for normal and obese individuals. The test may have a compromised efficacy in pituitary lesions smaller than 1 cm, requiring a prolonged test for 4 h, especially for the evaluation of cortisol, which has a later response.

Because the growth hormone peak is earlier, and, generally, growth hormone deficiency is the first pituitary deficiency to occur in hypopituitarism, we suggest a glucagon test of 3 h. In patients with doubtful results for both growth hormone and cortisol, we prefer the ITT or the synthetic ACTH test due to the discomfort of longer tests, as well as the higher cost of the glucagon test.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1 Molitch, ME, Clemmons Dr, Malozowski S, Merriam GR & Lee Vance M: Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96(6): 1587-609.
- 2 Tabarin A & Perez P: Pros and cons of screening for occult Cushing's syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 2011, 7: 445-456.
- 3 Pawlikowski M, Kunert-Radek J & Radek M: Silent corticotropinoma. *Neuro Endocrinol Lett* 2008, 29: 347-350.
- 4 Bellone J, Aimaretti G, Bellone S, Baffoni C, Origlia C, Cappa M & Ghigo E: Sequential administration of arginine and arginine plus GHRH to test somatotroph function in short children. *J Endocrinol Invest* 2000, 23: 97-101.
- 5 Aimaretti G, Baffoni C, Bellone S, Di Vito L, Corneli G, Arvat E, Benso L, Camani F & Ghigo E: Retesting Young adults with childhood-onset growth hormone (GH) deficiency with GH-releasing-hormone-plus-arginine test. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 3693-3699.
- 6 Petersen S, Jung R & Beil FU: Diagnosis of growth hormone deficiency in adults by testing with GHRP-6 alone or in combination with GHRH: comparison with the insulin tolerance test. *Eur J Endocrinol* 2002, 146: 667-672.
- 7 Popovic V, Leal A, Micic D, Koppeschaar HPF, Torres E, Paramo C, Obradovic S, Diegues C & Casanueva FF: GH-releasing hormone and GH-releasing

- peptide-6 for diagnostic testing in GH-deficient adults. *Lancet* 2000, 356: 1137-1142.
- 8 Schmidt IL, Lahner H, Mann K & Petersenn S: Diagnosis of adrenal insufficiency: evaluation of the corticotrophin-releasing hormone test and basal serum cortisol in comparison to the insulin tolerance test in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88, 4193-4198.
 9. Brabant G, Poll EM, Jonsson P, Polydorou D, & Kreitschmann-Andermahr I: Etiology, baseline characteristics, and biochemical diagnosis of GH deficiency in the adult: are there regional variations? *Eur J Endocrinol* 2009, 161(1): S25-S31.
 10. Yuen CJK: Glucagon Stimulation Testing in Assessing for Adult Growth Hormone Deficiency: Current Status and Future Perspectives. *ISRN Endocrinology* 2011, 1-6.
 11. Yuen CJ, Biller BMK, Katznelson L, Rhoads SA, Gurel MH, Chu O, Corazzini V, Spiller K, Gordon MB, Salvatori R & Cook DM: Clinical characteristics, timing of peak responses and safety aspects of two regimens of the glucagon stimulation test in evaluating growth hormone and cortisol secretion in adults. *Pituitary* 2013, 16: 220-230.
 12. Berg C, Meinel T, Lahner H. *et al*: Diagnostic Utility of the Glucagon Stimulation Test in Comparison to the Insulin Tolerance Test in Patients Following Pituitary Surgery. *Eur J Endocrinol* 2010, 162: 477-482.
 13. Torpy DJ: Screening for ACTH-dependent Hypercortisolism in Patients with Pituitary Incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2015. Commentary, 172:4, C1-C4.
 14. Lin T & Tucci JR: Provocative tests of growth-hormone release. A comparison of results with seven stimuli. *Ann Intern Med* 1974, 80: 464-469.
 15. Giuffrida FM, Berger K, Monte L, Oliveira CH, Hoff AO, Maciel RM & Vieira JG: Relationship between GH response and glycemic fluctuations in the glucagon stimulation test. *Growth Horm IGF Res* 2009, 19: 77-81.
 - 16 Conceição FL, Silva A, Leal Costa AJ & Vaisman M: Glucagon stimulation test for the diagnosis of GH deficiency in adults. *J Endocrinol Invest* 2003, 26: 1065-1070.
 - 17 Yuen CJK, Tritos NA, Samson SL, Hoffman AR & Katznelson L: American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: Update on Growth Hormone Stimulation Testing and Proposed Revised Cut-point for the Glucagon Stimulation Test in the Diagnosis of Adult Growth Hormone Deficiency. *Endocr Pract* 2016.
 - 18 Gomez JM, Espadero RM, Escobar-Jimenez F, Haekins F, Pico A, Herrera-Pombo JL, Vilardell E, Duran A, Mesa J, Faure E & Sanmarti A: Growth hormone release after flucagon as a reliable test of growth hormone assessment in adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002, 56: 329-334.
 - 19 Yuen KC, Cook DM, Sahasranam P, *et al*: Prevalence of GH and other Anterior Pituitary Hormone Deficiencies in Adults with Nonsecreting Pituitary Microadenomas and Normal Serum IGF-1 Levels. *Clin Endocrinol* 2008, 69: 292-298.

- 20 Toogood A, Brabant G, Maiter D, Jonsson B, Feldt-Rasmussen U, Koltowska-Haggstrom M, Rasmussen AK, Buchfelder M, Saller B & Biller BM: Similar clinical features among patients with severe adult growth hormone deficiency diagnosed with insulin tolerance test or arginine or glucagon stimulation tests. *Endocr Pract* 2012, 18 (3): 325-334.
- 21 Behan LA, Moyles P, Cuesta M, Rogers B, Crowley RK, Ryan J, Brennan P, Smith D, Tormey W, Sherlock M & Thompson CJ: The incidence of anterior pituitary hormone deficiencies in patients with macroprolactinoma and idiopathic hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 2017, 87 (3):257-263.
- 22 Tavares, ABW, Seixas-da-Silva IA, Silvestre DHS, Pinheiro MFC, Vaisman M & Conceição FL: Growth hormone and cortisol secretion in the elderly evaluated using the glucagon stimulation test. *Endocrine* 2017, 56: 317-324.
- 23 Diri H, Karaca Z, Simsek Y, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Selcuklu A & Kelestimur F: Can a glucagon stimulation test characterized by lower cut-off value be used for the diagnosis of growth hormone deficiency in adults? *Pituitary* 2015, 18: 884-892.
- 24 Hamrahian AH, Yuen KCJ, Gordon MB, Pulaski-Liebert K, Bena J & Biller BMK: Revised GH and cortisol cut-points for the glucagon stimulation test in the evaluation of GH and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in adults: results from a prospective randomized multicenter study. *Pituitary* 2016, 19: 332-341.
- 25 Leong KS, Walker AB, Martin I, Wile D, Wilding J & Macfarlane IA.: An audit of 500 subcutaneous glucagon stimulation tests to assess growth hormone and ACTH secretion in patients with hypothalamic-pituitary disease. *Clin Endocrinol* 2001, 54, 463-468.
- 26 Littley MD, Gibson S, White A Shalet SM: Comparison of the ACTH and cortisol responses to provocative testing with glucagon and insulin hypoglycaemia in normal subjects. *Endocrinol (Oxf)* 1989, 31: 527-533.
- 27 Orme SM, Price A, Weetman AP & Ross RJ: Comparison of the diagnosis the diagnostic utility of the simplified and standard i.m. glucagon stimulation test (IMGST). *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998, 49: 773-778.
- 28 Cain JP, Williams GH & Dluhy RG: Glucagon-initiated human growth hormone release: a comparative study. *Can Med Assoc J* 1972, 107: 617-622.
- 29 Mitchell ML, Byrne MJ, Sanchez Y & Sawin CT: Detection of growth-hormone deficiency: the glucagon stimulation test. *N Engl J Med* 1970, 282: 539-541.
- 30 Rao RH & Spathis GS: Intramuscular glucagon as a provocative stimulus for the assessment of pituitary function: growth hormone and cortisol responses. *Metabolism* 1987, 36: 658-663.
- 31 Waldhausl W, Haydl H & Nowotny P: ACTH and cortisol responses to glucagon stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 43: 675-678.

Table 1. General characteristics of study patients

Variables	n	(%)
Sexo		
Female	37	(92,5)
Male	3	(7,5)
Age group		
Until 29	12	(30,0)
30 to 39	8	(20,0)
40 to 49	16	(40,0)
≥ 50 anos	4	(10,0)
BMI category		
Low weight (<18)	1	(2,5)
Normal weight (18 a 24,9)	8	(20,0)
Overweight (25 a 29,9)	19	(47,5)
Obesity (≥30)	12	(30,0)
Types of pituitary lesions		
Microprolactinoma	27	(67,5)
Nonsecreting microadenoma	8	(20,0)
Rathke'cleft cyst	3	(7,5)
Partially empty sella	2	(5,0)

BMI, body mass index

Table 2. Distribution of the growth hormone and cortisol responses to the glucagon test according to the type of pituitary lesion

Pituitary Lesions	growth hormone peak (≥ 3 ng/mL)		Cortisol peak (≥ 18 μ g/dL)	
	Yes	No	Yes	No
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Microprolactinoma	26 (96,3)	1 (3,7) ^a	21 (77,8)	6 (22,2) ^a
Nonsecreting microadenoma	5 (62,5)	3 (37,5) ^b	6 (75)	2 (25) ^b
Rathke' cleft cyst	3 (100)	0 (0)	2 (66,7)	1 (33,3)
Partially empty sella	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)	0 (0)
P valor	0,031*		0,909	

*Statistically significant differences (Fisher's Exact Test).

^a One patient presented with deficiencies of both growth hormone and cortisol (microadenoma group)

^b One patient presented with deficiencies of both growth hormone and cortisol (nonsecreting microadenoma group)

Table 3. Variables differences in glucose level among the categories of glucagon test response

Variables	GH peak (> 3 ng/mL)		P	Cortisol peak (> 18 µg/dL)		P
	Yes	No		Yes	No	
	Mean ± dp	Mean ± dp		Mean ± dp	Mean ± dp	
Basal glucose	84,6 ±7,6	97,2 ±9,3	0,010*	84,2 ±7,5	93,1 ±9,6	0,014*
Glucose (peak)	117,5 ±28,2	154,4 ±52,1	0,101	121,8 ±30,9	123,3 ±43,3	0,685
Glucose (nadir)	79,4 ±13,6	85,2 ±14,7	0,378	80,5 ±14,6	78,9 ±10,9	0,974

Δ = variation *Indica diferenças estatisticamente significantes - Teste Mann–Whitney (P < 0,05).

Table 4. Spearman correlation coefficient (rs) between growth hormone, cortisol, and glucose

Variables	growth hormone peak	Cortisol peak	Glucose nadir
	Peak	Peak	Nadir
Age (years)	rs= -0,16	rs= -0,01	rs= 0,31*
BMI (kg/m ²)	rs= -0,44*	rs= 0,03	rs= 0,35*

rs, Spearman correlation coefficient; BMI, body mass index.

*Statistically significant correlation.

Table 5. Multiple linear regression analysis of growth hormone peak and glucose nadir in the glucagon test

Variables	R ² (valor P)	growth hormone pico	R ² (valor P)	Glucose Nadir
		β (P value)		β (valueP)
	31,7% (0,008)		45,3% (0,001)	
Age (years)		+0,03 (0,802)		+0,50 (0,003)*
BMI (kg/m ²)		-0,78 (0,010)*		+0,50 (0,275)
Cortisol peak		+0,38 (0,023)*		+0,77 (0,001)*
GH peak		-		-0,25 (0,308)
Glucose nadir		+0,11 (0,308)		-

β, regression coefficient; R², coefficient of determination; BMI, body mass index.

* Statistically significant difference.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Response during the glucagon test in the diagnosis of growth hormone and cortisol deficiencies. GH, growth hormone

Figure 2. Levels of (a) growth hormone, (b) cortisol, and (c) glucose during the glucagon test. * $P < 0.05$ (Wilcoxon test). GH, growth hormone

Figure 3. Distribution of the occurrence of growth hormone peak, cortisol peak, and glucose nadir during the glucagon test. GH, growth hormone

Figure 4. Pearson's correlation between peak growth hormone and peak cortisol in the glucagon test. GH, growth hormone

Figure 5. Comparative analysis of growth hormone peak, cortisol peak, and glucose nadir between the ITT and GST. GH, growth hormone; Glucagon Stimulating Test; ITT, insulin tolerance test

Figure 6. Side effects of the glucagon test

FIGURES

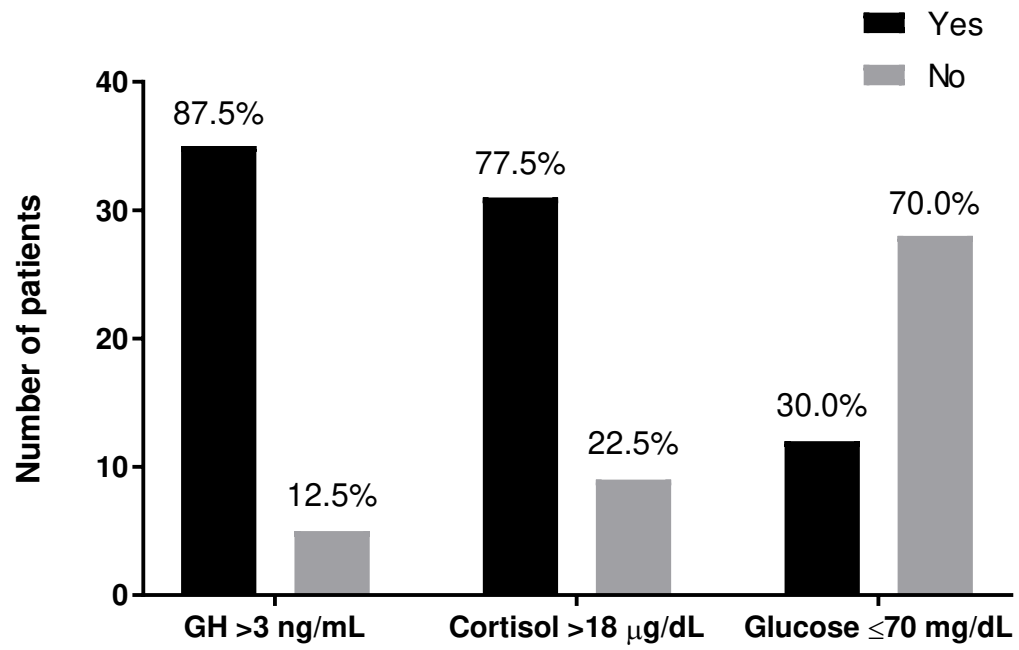


Figure 1

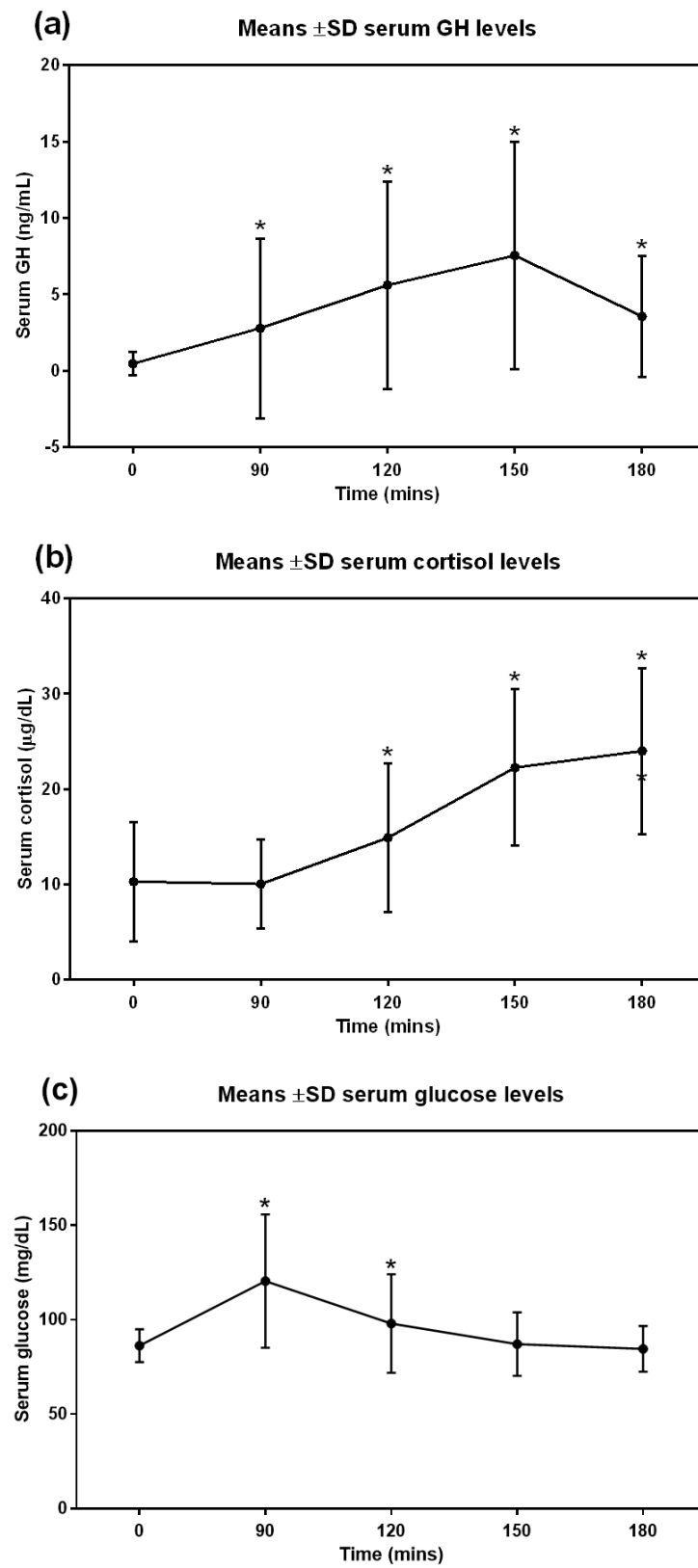


Figure 2

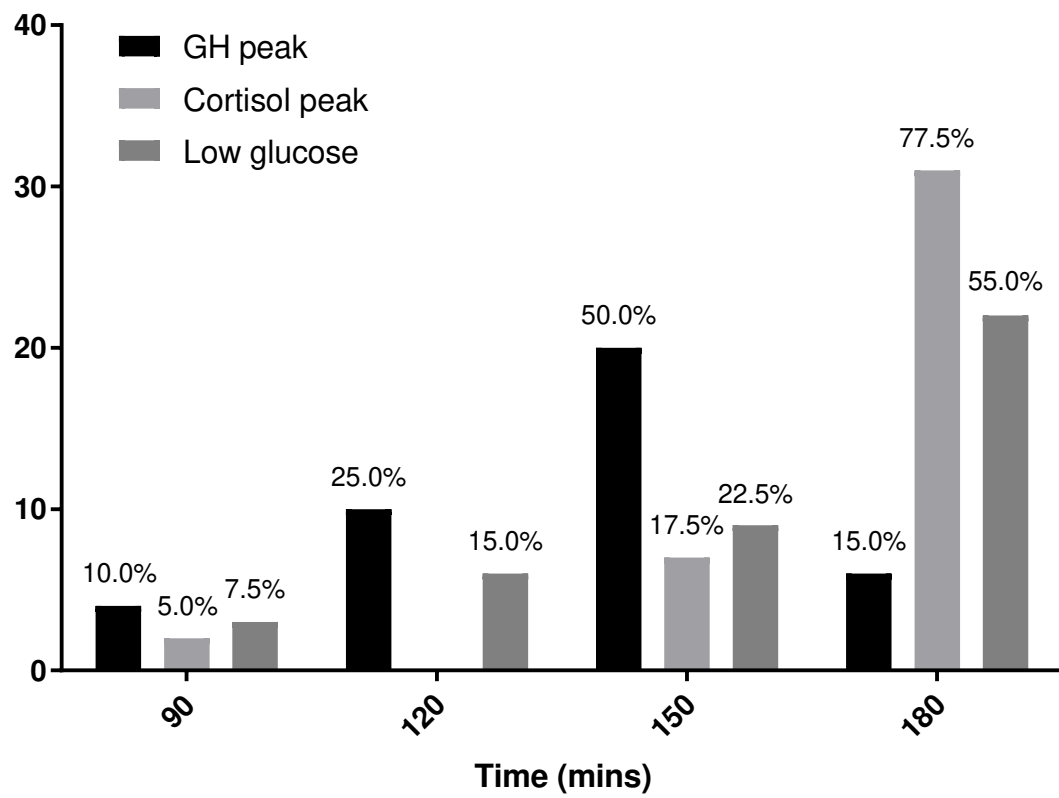


Figure 3

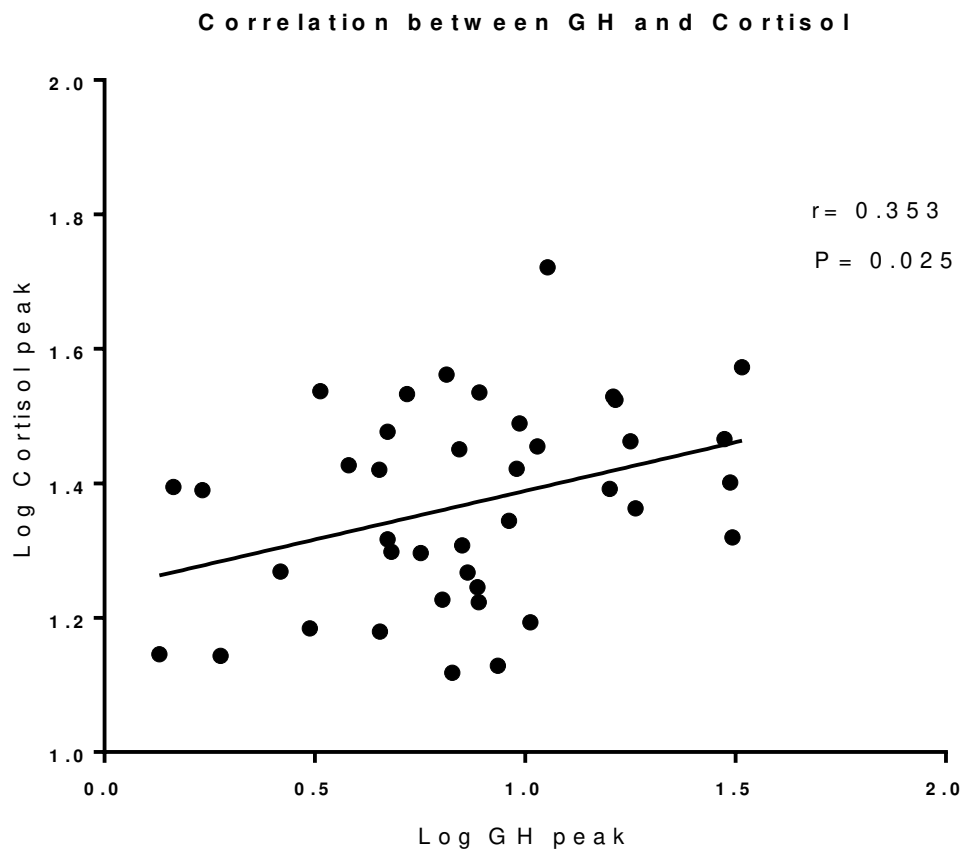


Figure 4

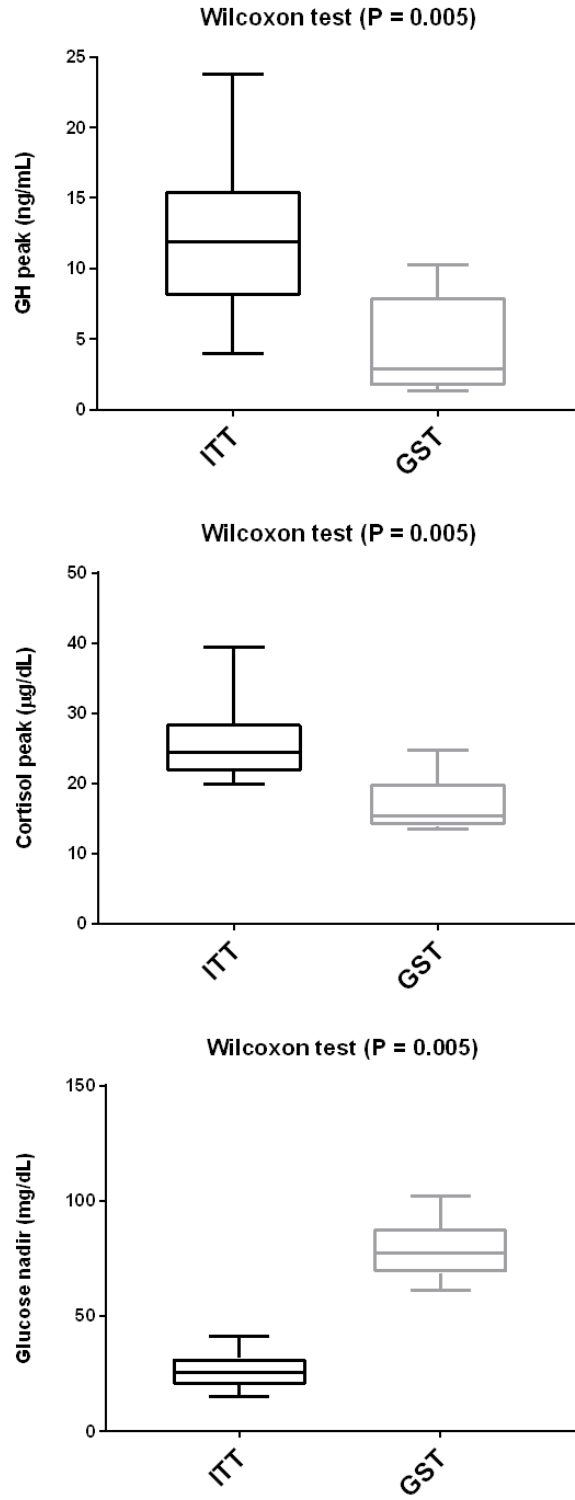


Figure 5

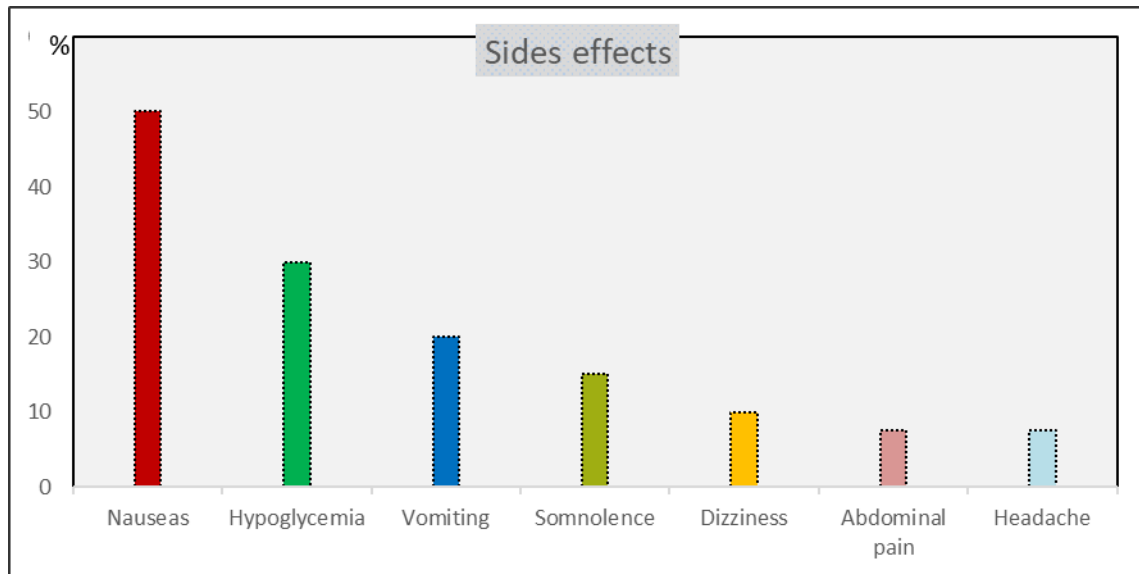


Figure 6