

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MEDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

70
142

**“EVALUACIÓN DE LA RENTABILIDAD
DIAGNÓSTICA (EFICACIA-COSTE) DE
LA DETERMINACIÓN DEL CORTISOL
EN SALIVA EN EL DIAGNÓSTICO DEL
SÍNDROME DE CUSHING”**



Antonio León Justel

619287215

011803320

124572007

UNIVERSIDAD DE SEVILLA


FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MEDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN DEL ROCIO
SERVICIO DE BIOQUÍMICA CLINICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
LIBRERÍA, S.L. 1947

Registro de esta Tesis Doctoral
Nº 102 Número 323 de Libro
Fecha 21-02-07

El Jefe del Registro de Tesis,
Rosa Raffello



"EVALUACIÓN DE LA RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA (EFICACIA-COSTE) DE LA DETERMINACIÓN DEL CORTISOL EN SALIVA EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE CUSHING"

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
ANTONIO LEÓN JUSTEL
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
FARMACIA

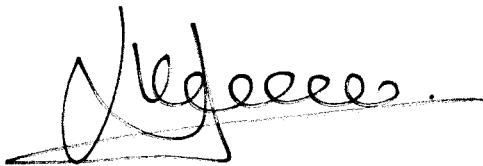
SEVILLA 2007

D. Juan Miguel Guerrero Montavez, Catedrático del departamento de Bioquímica Medica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: que D. Antonio León Justel, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección, y en el Servicio de Bioquímica Clínica de Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, el presente trabajo de investigación, titulado: "Evaluación de la rentabilidad diagnóstica (eficacia-coste) de la determinación del cortisol en saliva en el diagnóstico del síndrome de Cushing", que ha sido objeto de su tesis doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

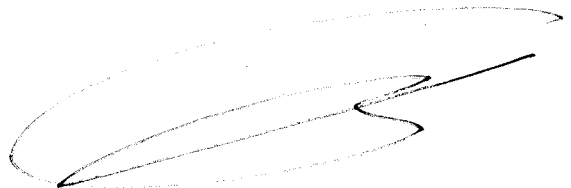
Sevilla, 16 de Enero de 2007

El director



Fdo. Juan Miguel Guerrero Montavez

El interesado



Fdo. Antonio León Justel

1 INTRODUCCIÓN

- 1.1 ANATOMIA DE LAS GLANDULAS SUPRARRENALES
- 1.2 ZONAS FUNCIONALES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL
- 1.3 EMBRIOGÉNESIS Y DESARROLLO POSTNATAL
- 1.4 BIOSÍNTESIS DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES
 - 1.4.1 Transporte del colesterol al interior de la mitocondria y conversión del colesterol en pregnenolona (P-450-scc)
 - 1.4.2 Sistema 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -OHS)
 - 1.4.3 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa (P-450-C17)
 - 1.4.4 21-hidroxilasa (P-450-C21)
 - 1.4.5 11 β -hidroxilasa, 11 α -hidroxisteroide deshidrogenasa, 18-hidroxilasa y 18-oxidasa (P-450-C11)
- 1.5 CONTROL DE LA SECRECIÓN SUPRARRENAL DE ESTEROIDES
 - 1.5.1 Regulación de la secreción de cortisol por el eje CRH-ACTH
 - 1.5.2 Control de la secreción de aldosterona por el sistema renina-angiotensina
 - 1.5.3 Control de la secreción de andrógenos suprarrenales
- 1.6 CIRCULACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO
 - 1.6.1 Glucocorticoides
 - 1.6.2 Mineralocorticoides
 - 1.6.3 Andrógenos
- 1.7 ACCIONES DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES
 - 1.7.1 Glucocorticoides
 - 1.7.2 Mineralcorticoides
 - 1.7.3 Andrógenos suprarrenales
- 1.8 ENFERMEDADES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL
 - 1.8.1 Exceso de glucocorticoides
 - 1.8.1.1 Síndrome de Cushing
 - 1.8.1.1.1 Etiología
 - A) Dependientes de la ACTH
 - 1 Enfermedad de Cushing
 - 2 Síndrome de secreción ectópica de ACTH
 - 3 Síndrome de producción ectópica de la hormona liberadora de corticotropina
 - 4 Hiperplasia suprarrenal macronodular
 - B) Causas independientes de la ACTH
 - 1 Adenomas y carcinoma suprarrenal
 - 2 Hiperplasia suprarrenal nodular pigmentada primaria y complejo Carney.
 - 3 Síndrome de McCune-Albright
 - 4 hiperplasia macronodular y expresión aberrante de receptores
 - C) Síndrome de Cushing Iatrogénico
 - D) Otras causas
 - 1 Síndrome de Cushing normocortisolémico-Síndrome de hiperreactividad del cortisol
 - 2 Síndrome de Cushing cíclico

-
- 3 Síndrome de Cushing durante el embarazo
 - 4 Síndrome de Cushing subclínico e incidentaloma adrenal
 - 5 Síndromes pseudo-Cushing
 - 1.8.1.1.2 Cuadro clínico
 - 1.8.1.1.3 Diagnóstico
 - 1.8.1.1.3.1 Diagnóstico del síndrome
 - 1.8.1.1.3.1.1 Cortisol libre urinario
 - 1.8.1.1.3.1.2 Ritmo de cortisol sérico
 - 1.8.1.1.3.1.3 Frenación con dosis bajas (prueba rápida, y simple) de dexametasona
 - 1.8.1.1.3.1.4 Prueba de frenación rápida (prueba de Nugent)
 - 1.8.1.1.3.1.5 Prueba de frenación simple con dexametasona
 - 1.8.1.1.3.1.6 Determinación del cortisol plasmático nocturno
 - 1.8.1.1.3.1.7 Determinación del cortisol salival nocturno
 - 1.8.1.1.3.1.8 Prueba combinada: frenación simple débil con dexametasona y estímulo con hormona liberadora de ACTH (CRH)
 - 1.8.1.1.3.2 Diagnóstico de la etiología
 - 1.8.1.1.3.2.1 Determinación de la ACTH
 - 1.8.1.1.3.2.2 Prueba de frenación fuerte o reforzada con dexametasona
 - 1.8.1.1.3.2.3 Prueba de frenación fuerte o reforzada con dexametasona
 - 1.8.1.1.3.2.4 Muestreo del seno petroso inferior
 - 1.8.1.1.3.2.5 Otras pruebas
 - 1.8.1.1.3.2.6 Técnicas de imagen
- 1.9 DETERMINACIÓN BIOQUÍMICA DEL CORTISOL TOTAL Y LIBRE
 - 1.9.1 Métodos cromatográficos
 - 1.9.2 Métodos Inmunométricos
 - 1.9.2.1 Principio
 - 1.9.2.2 Métodos isotópicos
 - 1.9.2.3 Métodos no isotópicos
 - 1.9.3 Determinación del cortisol libre

2 HIPOTESIS DE TRABAJO

3 OBJETIVOS

- 3.1 Objetivos primarios
 - 3.2 Objetivos secundarios
 - 3.3 Objetivo final
-

4 MATERIAL Y MÉTODOS

- 4.1 Sujetos de estudio
- 4.2 Protocolo
 - 4.2.1 Variables
 - 4.2.2 Procedimiento analítico
 - 4.2.2.1 Determinación del cortisol libre urinario
 - 4.2.2.2 Determinación del cortisol en saliva
 - 4.2.2.3 Determinación del cortisol en sangre
- 4.3 Evaluación analítica de la determinación del cortisol en un analizador automático E170
 - 4.3.1 Imprecisión
 - 4.3.2 Error sistemático
 - 4.3.2.1 Prueba de recuperación
 - 4.3.2.2 Prueba de comparación
 - 4.3.3 Estudio de linealidad
 - 4.3.4 Límite de detección
- 4.4 Validación del procedimiento de recogida de muestras de saliva y envío postal de las mismas
- 4.5 Valores de referencia
- 4.6 Análisis de costes
- 4.7 Análisis estadísticos

5 RESULTADOS

- 5.1 Evaluación analítica de la determinación del cortisol en un analizador automático E170
 - 5.1.1 Imprecisión
 - 5.1.2 Error sistemático
 - 5.1.2.1 Prueba de recuperación
 - 5.1.2.2 Prueba de comparación
 - 5.1.3 Estudio de linealidad
 - 5.1.4 Límite de detección
 - 5.2 Validación del procedimiento de recogida de muestras de saliva
 - 5.3 Valores de referencia de cortisol en saliva
 - 5.4 validación clínica de la determinación del cortisol en saliva
 - 5.4.1 Características generales del grupo de estudio
 - 5.4.2 Screenig de hipercortisolismo
 - 5.3.2.1 Sujetos sanos
 - 5.3.2.2 Pacientes sospecha analítica de hipercortisolismo
 - 5.4.3 Curvas COR
 - 5.3.3.1 Cortisol en saliva 23 horas
 - 5.3.3.2 Cortisol en saliva 8 horas
 - 5.3.3.3 Cortisol en plasma 23 horas
 - 5.3.3.4 Cortisol en plasma 23 horas
 - 5.3.3.5 Cortisol libre urinario
 - 5.3.3.6 Cortisol plasmático tras frenación con Dexametasona
 - 5.3.3.7 Cortisol saliva tras frenación con Dexametasona
 - 5.4.4 Caracterización de las pruebas diagnósticas
-

5.3.4.1 Cortisol en saliva 23 horas

5.3.4.2 Cortisol en saliva 8 horas

5.3.4.3 Cortisol en plasma 23 horas

5.3.4.4 Cortisol en plasma 23 horas

5.3.4.5 Cortisol libre urinario

5.3.4.6 Cortisol plasmático tras frenación con
dexametasona

5.3.4.7 Cortisol saliva tras frenación con dexametasona

5.5 Costes

6 DISCUSION

7 CONCLUSIONES

8 BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

1 ACTH	Corticotropina
2 ADH	Homona Antidiurética
3 AMPc	Adenosín 3´-5´-monofosfato cíclico.
4 ANP	Peptido Natriurético Atrial
5 CBG	Globulina transportadora de esteroides
6 CLU	Cortisol libre urinario
7 Cm	Centímetro
8 CP 23	Cortisol plasmático 23 horas
9 CP 8	Cortisol plasmático 8 horas
10 CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
11 CS 23	Cortisol en saliva 23 h
12 CS 8	Cortisol en saliva 8 h
13 CV	Coefficiente de variación
14 DHEA	Deshidroepiandrosterona
15 DHEA-S	Deshidroepiandrosterona-sulfato
16 DHT	Dihidro-Testosterona
17 DNA	Ácido Desoxiribonucleico
18 DOCA	11-Desoxicorticosterona
19 DS	Desviación estándar
20 EC	Enfermedad de Cushing
21 SC	Síndrome de Cushing
22 ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
23 ECLIA	Electroquimioluminiscencia
24 g	Gramos
25 GH	Hormona de Crecimiento
26 GIP	Péptido Inhibidor Gástrico
27 h	Horas
28 HCG	Coriogonadotropina
29 HLA	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
30 HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
31 IFCC	Internacional Federation off Clinical Chemistry
32 IGF1	Factor de Crecimiento Insulinoide 1
33 IL-1	Interleuquina 1
34 LDL	Lipoproteína de baja densidad
35 LH	Luteotropina
36 min	Minutos
37 mL	Mililitro
38 mL	Microlitro
39 mm	Milímetros
40 MSH	Hormona Estimulante del Melanocito
41 NAD	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido
42 NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
43 POMC	Pro-opimelanocortina

44 PS	Seudo-Cushing.
45 RIA	Radioinmunoanálisis
46 RM	Resonancia Magnética Nuclear
47 RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
48 SHBG	Globulina transportadora de esteroides sexuales
49 SNC	Sistema nervioso central
50 STAR	Steroid Acute Regulatory Protein
51 T	Testosterona
52 TAC	Tomografía Axial Computerizada
53 VIP	Peptido Vasoactivo intestinal

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANATOMIA DE LAS SUPRARENALES

Las glándulas suprarrenales están localizadas en contacto con los polos superiores de ambos riñones. Su peso en el adulto es de unos 4 g. Desde abajo hacia arriba constan de cabeza, cuerpo y cola. La porción exterior, el córtex, tiene una coloración amarillenta y circunda la porción central, la médula, de color gris pálido.

La corteza suprarrenal consta de tres zonas: glomerular, fascicular y reticular. La zona glomerular consiste en agregados dispersos de células pequeñas con pocas gotas lipídicas. La zona más extensa es la fascicular, formada por células claras con inclusiones lipídicas, dispuestas en forma de columnas entre la glomerular o la cápsula y la zona interna reticular. Las células de la reticular son eosinofílicas, con escaso contenido lipídico y pueden contener lipofuscina.

Las suprarrenales están irrigadas por el plexo capsular, compuesto por ramas que proceden de la arteria frénica inferior, la aorta y las arterias renales. Los sinusoides de la fascicular, reticular y de la médula drenan hacia las venas medulares y, por lo tanto, a la vena central. Ésta desemboca, en el lado derecho, a la vena cava inferior y, en el lado izquierdo, a la vena renal (1).

Se ha descrito un plexo de fibras nerviosas en la corteza suprarrenal humana. Estas fibras nerviosas podrían regular la función del córtex al regular la irrigación vascular. Pero también parecen regular, a través de neurotransmisores, el crecimiento y la respuesta funcional del córtex (1).

1.2 ZONAS FUNCIONALES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL

La corteza suprarrenal produce tres tipos de esteroides: los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos).

La figura 1.1 muestra las vías de la esteroidogénesis con las actividades enzimáticas implicadas en ellas. Las zonas fascicular y reticular constituyen una unidad funcional que produce cortisol y andrógenos y son reguladas por la Adrenocorticotropina (ACTH) (1,2). Las células de ambas zonas expresan los

enzimas necesarios para la biosíntesis de glucocorticoides y de andrógenos, pero datos bioquímicos e inmunohistoquímicos parecen indicar que los andrógenos se sintetizan fundamentalmente en la zona reticular por la presencia en ella del enzima sulfotransferasa, necesario para la síntesis de deshidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), uno de los principales andrógenos suprarrenales (3). La aldosterona, principal mineralocorticoide, es sintetizada en la zona glomerular bajo el control principal del sistema renina-angiotensina (1,2,4), siendo su síntesis cuantitativamente inferior a la de cortisol, lo cual concuerda con una menor expresión de P-450-scc y P-450-C11. Las células de la fascicular y de la reticular parecen tener un origen común, siendo funcionalmente distintas por la presencia o no de sulfotransferasa, pero pueden presentar idénticas características funcionales. Las células de la glomerular, en cultivo, pueden llegar a presentar el mismo tipo de esteroidogénesis que las células de la fascicular y de la reticular, sugiriendo que la influencia de factores locales regularía la diferenciación de estas células: el aumento de la concentración de glucocorticoides inhibiría la producción de aldosterona por las células de la glomerular, mientras que el bloqueo de la síntesis de cortisol mantendría la diferenciación de la glomerular. Se sugiere que las diferencias funcionales entre las tres zonas estarían reguladas por factores locales, tales como la vascularización, la inervación y posibles interacciones con la matriz extracelular.



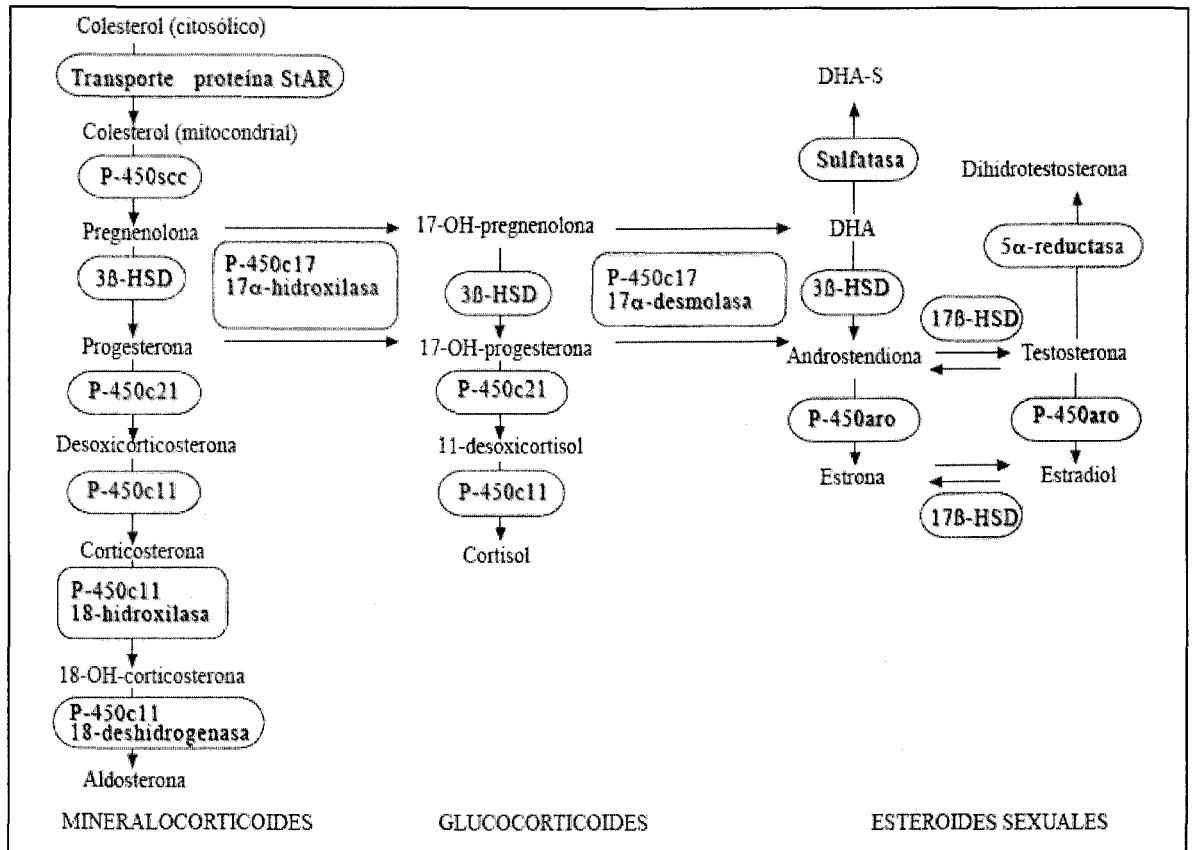


Figura 1.1 Esquema de la esteroidogénesis suprarrenal y gonadal. StAR (Steroid Acute Regulatory protein); P-450scc (colesterol-desmolasa); 3β -HSD (3β -hidroxisteroide-deshidrogenasa); P-450c17 (17α -hidroxilasa/17,20-desmolasa o liasa); P-450c21 (21-hidroxilasa); P-450c11 (11β -hidroxilasa, corticosteronametiloxidasa tipo I, CMO-I o 18-hidroxilasa y corticosterona-metiloxidasa tipo II, CMO-II o 18-deshidrogenasa); 17β -HSD (17β -hidroxisteroide-deshidrogenasa o 17- ceto-reductasa); 5α -reductasa; sulfatasa; P-450aro (aromatasa).

1.3 EMBRIOGÉNESIS Y DESARROLLO POSTNATAL

La corteza suprarrenal se desarrolla a partir del tejido mesenquimal adyacente al epitelio celómico, cerca del ribete urogenital. Comienza a ser identificable en el estadio embrionario de 7-8 mm, se distingue como una masa de células inmaduras a los 10-15 mm, a los 20-25 mm se distinguen las zonas definitiva y fetal, siendo evidentes a los 50 mm.

Aunque la ACTH regula la expresión de todos los genes de la esteroidogénesis, la regulación inicial de la diferenciación de las glándulas suprarrenales y el inicio de la esteroidogénesis parecen ser independientes del

ACTH. Se ha demostrado que es necesaria la expresión de un gen para un receptor nuclear «huérfano» (para el que no se conoce aún hormona) llamado SF-1 (Steroidogenic Factor 1) para el desarrollo tanto de las glándulas suprarrenales como de las gónadas y de las células gonadotropas (5-7). También es necesaria la expresión de otro gen llamado DAX-1 (codifica una proteína también perteneciente a la superfamilia de los receptores nucleares), situado en el brazo corto del cromosoma X, cuya delección o mutación provoca la falta o desarrollo insuficiente de la suprarrenal y de las células gonadotropas (8).

La corteza suprarrenal fetal está constituida por dos zonas: una exterior, representa aproximadamente la cuarta parte, dará lugar al córtex definitivo y está formada por células pequeñas e inmaduras, mientras que la mayor parte, denominada córtex fetal, está compuesta por células eosinófilas grandes. Después del nacimiento, la zona fetal desaparece progresivamente, siendo sustituida por la zona definitiva a los 6 meses de edad. Se discute si esta sustitución es debida a una rápida degeneración de las células grandes eosinófilas o más bien a una reducción de tamaño y a un cambio de diferenciación y organización celulares hasta constituir la zona fasciculada (9). Durante la vida fetal la glándula suprarrenal crece exponencialmente. Igual que durante la vida postnatal, la actividad mitótica está limitada a la capa más exterior subcapsular formada por células basófilas relativamente indiferenciadas.

Estas células se multiplican rápidamente, contribuyendo centrípetamente, a través de una zona de transición, a la zona fetal que aumenta progresivamente de volumen, llegando a ocupar hasta el 80 % de la glándula.

El peso de la suprarrenal al nacer es de unos 4-5 g y disminuye a 2.5 g a las 2 semanas, llegando a pesar menos de 1 g al año de edad. Después, la suprarrenal aumenta de peso hasta alcanzar el definitivo entre los 15 y los 20 años. Se discute si las tres zonas del córtex definitivo están bien delimitadas a partir de los 2 años, de los 8-9, o la maduración no es completa hasta los 18 (10).

1.4 BIOSÍNTESIS DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES

El precursor de todas las hormonas esteroideas es el colesterol. Éste puede proceder de la ingesta dietética o puede ser sintetizado a partir del acetato y del coenzima A (acetilCoA). Las células esteroideogénicas pueden sintetizar *de novo* el colesterol u obtenerlo movilizando la reserva intracelular de ésteres del colesterol o importando lipoproteínas plasmáticas. El 80 % aproximadamente del colesterol utilizado para la esteroideogénesis procede de las lipoproteínas plasmáticas (11) y las células suprarrenales poseen receptores de membrana para las LDL (12) que las internalizan y, al nivel de los lisosomas, los ésteres del colesterol son hidrolizados, liberándose colesterol que es utilizado como sustrato para la esteroideogénesis. El 20 % restante del colesterol utilizado para la esteroideogénesis procede, en condiciones normales, de la biosíntesis intracelular de colesterol a partir del acetilCoA. En las células suprarrenales la ACTH aumenta el número de receptores para las LDL, así como la actividad del enzima colesterol esterasa que libera colesterol libre a partir de sus ésteres, aumentando, por lo tanto, la cantidad de colesterol libre intracelular (13).

Todas las hormonas esteroideas comparten una estructura común: la molécula de ciclopentanofenantreno (figura 1.2). Los derivados con 18 átomos de carbono (C18) son los estranos, los C19 los androstanos y los C21 los pregnanos (figura 1.2). La conversión del colesterol en los diversos esteroides comporta la acción de una serie de enzimas (figura 1.1) pertenecientes, la mayoría de ellos, a la familia de las proteínas citocrómicas P-450. Estas proteínas son 6 oxidasas captadoras de hierro que ocupan un lugar terminal en la cadena de transporte de electrones que media la biotransformación de muchas sustancias de origen endógeno y exógeno (figura 1.3). La amplia familia de proteínas citocrómicas P-450 (pico de absorbancia a 450 nm cuando están reducidas) consiste en más de 10 familias de proteínas codificadas por más de 100 genes y pseudogenes. En la corteza suprarrenal las proteínas P-450 están localizadas en la mitocondria o en el retículo endoplásmico (microsomales) (figura 1.3 y 1.4): las mitocondriales requieren una proteína

sulfatoférrica y una flavoproteína como transportadores intermedios de electrones, mientras que las microsomales sólo requieren una flavoproteína. Todas estas proteínas P-450 requieren NADPH como donante de electrones (2).

La regulación de las actividades enzimáticas P-450 en las diferentes zonas de la suprarrenal depende de los estímulos tróficos, de la demanda fisiológica (volumen intravascular, concentraciones séricas de sodio o de glucosa, etc.), y del gradiente de oxígeno y de esteroides a través del lecho capilar que atraviesa las tres capas de la corteza suprarrenal (14).

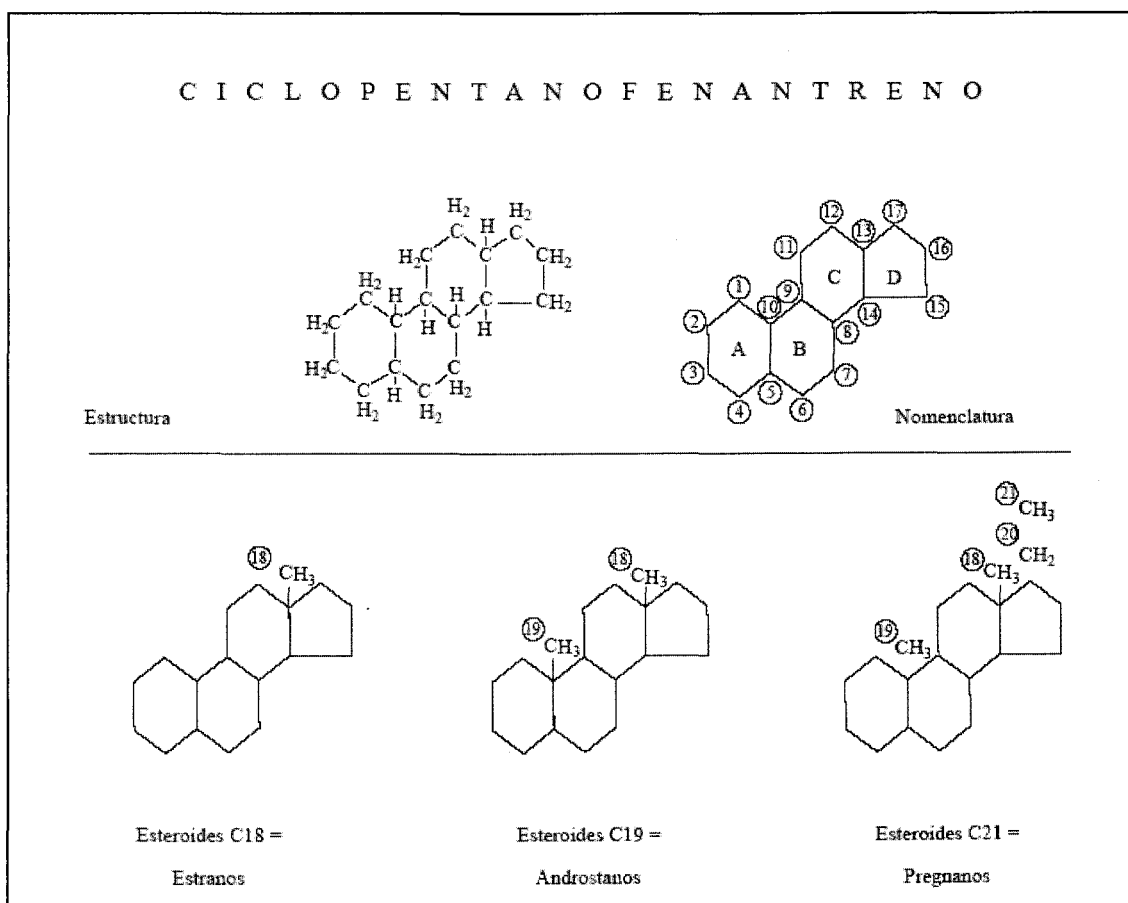


Figura 1.2 Estructura química y nomenclatura del ciclopentanofenantreno (panel superior) y estructura de los derivados esteroideos C18 (estrano), C19 (androstano) y C21 (pregnano) (panel inferior).

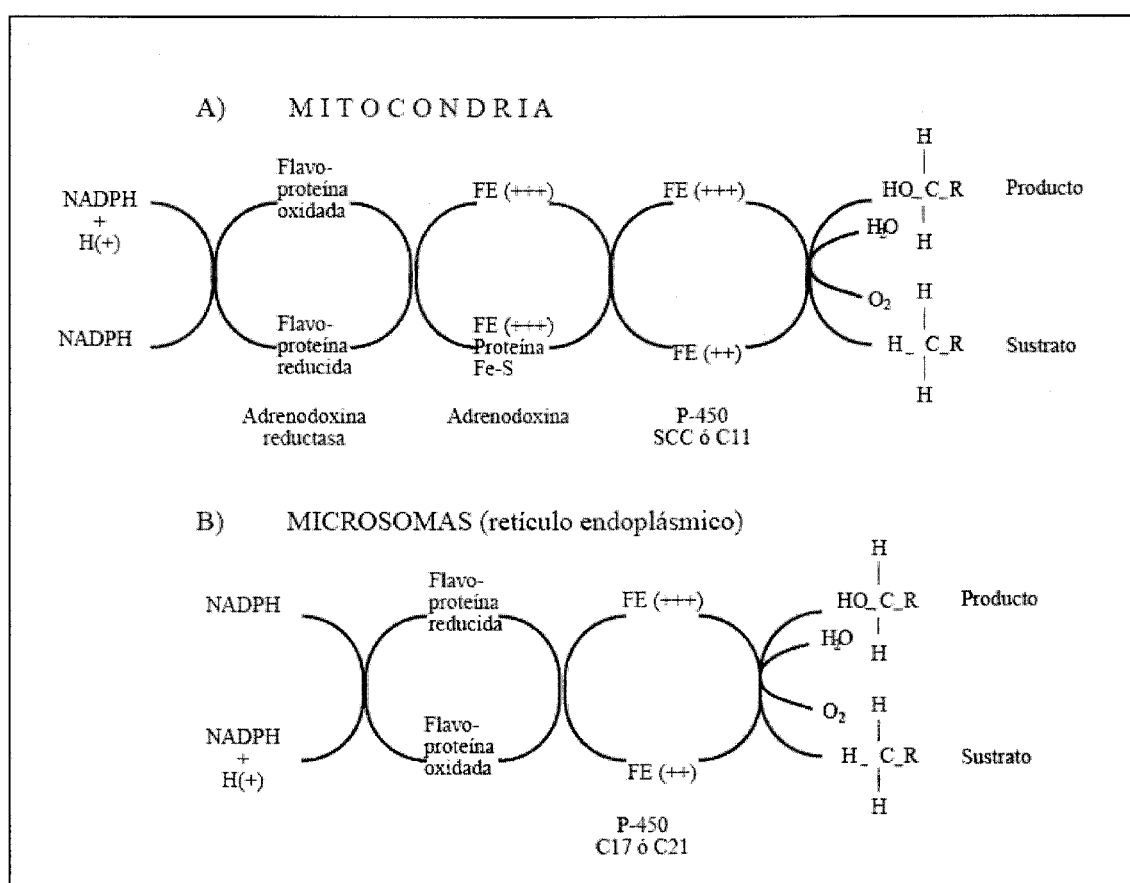


Figura 1.3 Cadenas de transporte de electrones en los citocromos P-450 de las células del córtex suprarrenal. A) En la mitocondria. B) En los microsomas (éstos no requieren adrenodoxina como intermediario).

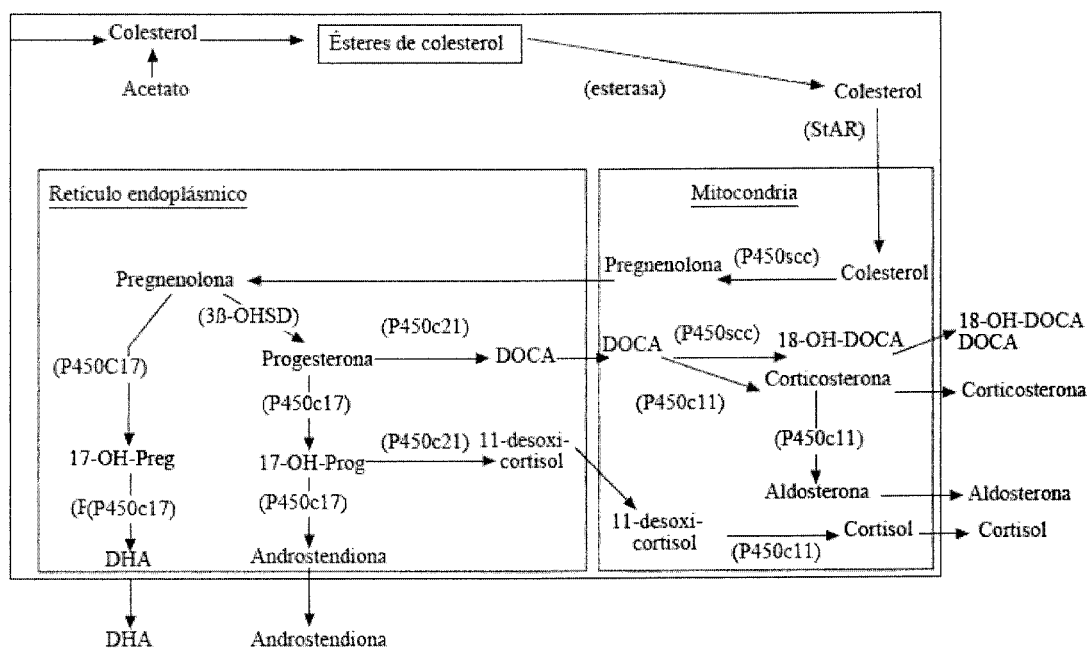


Figura. 1.4 Esteroidogénesis en una célula del córtex suprarrenal: organización subcelular, sustratos y enzimas implicados y principales esteroides secretados por la célula.

1.4.1 Transporte del colesterol al interior de la mitocondria y conversión del colesterol en pregnenolona (P-450-scc)

Es la primera etapa limitante en la esteroidogénesis suprarrenal. Esta etapa es mediada por el enzima colesterol desmolasa (P-450-scc = P-450-sidechain-cleavage) que interviene en tres reacciones químicas que permiten la transformación del colesterol en pregnenolona: Una 20α -hidroxilación, una 22-hidroxilación y el corte de la cadena lateral unida en posición 20-22 (figura 1.1 y 1.4). La síntesis de la proteína P-450-scc es estimulada por el ACTH: la unión de la ACTH a su receptor de membrana aumenta la concentración intracelular de AMPc, el cual estimula la actividad esterasa que libera colesterol de los ésteres almacenados y también aumenta las concentraciones de P-450-scc al aumentar su transcripción. P-450-scc está localizada en la membrana interna mitocondrial y sus transportadores intermedios de electrones son la proteína sulfatoférrica adrenodoxina y la flavoproteína adrenodoxina reductasa (figura 1.3).

Se han descrito varias proteínas específicas que intervienen en el transporte del colesterol libre al interior de la mitocondria (15) y entre ellas se ha demostrado que StAR (Steroid Acute Regulatory protein) es imprescindible para el desarrollo de la esteroidogénesis suprarrenal y gonadal, puesto que sus mutaciones provocan la llamada hiperplasia suprarrenal lipoidea (16,17) (tabla 1.1).

Los genes que codifican las tres proteínas que intervienen en la conversión del colesterol en pregnenolona (P-450-scc, adrenodoxina y adrenodoxina reductasa) han sido clonados y se conocen sus secuencias y localizaciones cromosómicas (tabla 1.1). P-450-scc está codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 15 (15q23-q24) (18) y consiste en una proteína de 521 aminoácidos. Se detecta RNAm para P-450-scc en la glándula suprarrenal, la placenta, el ovario y el testículo. Se han descrito variaciones en las cantidades de transcritos de P-450-scc en distintas etapas del desarrollo fetal. Se desconocen, por ahora, mutaciones en este gen que sean la causa del déficit de P-450-scc. La adrenodoxina está codificada por un gen en el cromosoma 11 (11q22) (19) y existen pseudogenes en el cromosoma 20 (20).

Se ha detectado RNAm para la adrenodoxina en suprarrenal y testículo y en tejidos fetales (suprarrenal, testículo, ovario, placenta, riñón, hígado y cerebro). Existen dos RNAm para la adrenodoxina reductasa, codificados por un solo gen en el cromosoma 17 (17q24-q25) (19). Ambos tipos de RNAm están presentes en la suprarrenal y en el testículo humanos (21).

Actividad enzimática	Proteína	Gen	Localización cromosómica
StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein)		StAR	8
P-450-scc (colesterol desmolasa)	mitocondrial 521 aa	CYP-scc	15 q23-q24
3 β -OHSD (3 β -hidroxisteroide-deshidrogenasa/ Δ 4- Δ 5-isomerasa)	microsomal 372 aa	3 β -HSD I y II	1 p13
P-450-c17 (17 α -hidroxilasa/ 17,20-liasa)	microsomal 508 aa	CYP-17	10 q24-q25
P-450-c21 (21-hidroxilasa)	microsomal 494 aa	CYP-21B (activo) CYP-21A (pseudogén)	6 p21
P-450-c11 (11 β -hidroxilasa/ 18-hidroxilasa/18-deshidrogenasa CMO I y CMO II)	mitocondrial 504 aa	CYP-11B1 CYP-11B2	8 q22 8 q24.3
Adrenodoxina	180 aa (preproteína)	Adrenodoxina	11 q22 (gen activo) 20 (pseudogenes)
Adrenodoxina-reductasa	492 aa	Adrenodoxina-reductasa	17 q24-q25

Tabla 1.1 Proteínas que intervienen en la esteroidogénesis y sus genes codificantes.

1.4.2 Sistema 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa (3 β -OHSD)

Media la conversión de pregnenolona en progesterona y de 17-OH-pregnenolona en 17-OH-progesterona (figura 1.1 y 1.4). Este paso es necesario para la biosíntesis de glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales. El sistema enzimático está localizado en el retículo endoplásmico y requiere NAD (22). Se detecta en córtex suprarrenal, gónadas, placenta, mama, próstata, hígado y piel. Es el único enzima de la esteroidogénesis suprarrenal no citocromo P-450. Realiza la reducción de un grupo 3 β -hidroxilo a 3-cetona y la isomerización de un doble enlace 5,6 a 3,4. Ambas actividades enzimáticas son realizadas por una sola proteína codificada por dos genes (HSD-3 β I y II) en el cromosoma 1 (23), de forma que existen dos isoenzimas, detectándose casi exclusivamente RNAm para el isoenzima de tipo II en suprarrenales y gónadas.

1.4.3 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa (P-450-C17)

La conversión de pregnenolona en 17-OH-pregnenolona y de progesterona en 17-OH-progesterona requiere una hidroxilación en posición 17 α . La conversión de ambos esteroides en DHEA y androstendiona (Δ 4), respectivamente, requiere la actividad 17,20-liasa (figura 1.1 y 1.4). Ambas actividades enzimáticas son realizadas por una única proteína, llamada P-450-C17 (24). Esta proteína es, pues, necesaria para la biosíntesis de glucocorticoides y de esteroides sexuales, pero no de mineralocorticoides. Así, las células de la zona glomerular carecen de este enzima, por lo que la esteroidogénesis procede hacia los mineralocorticoides; el hecho de que el sustrato sufra sólo una 17-hidroxilación o ambas, hidroxilación y corte de la cadena lateral, conduciendo a la síntesis de glucocorticoides o de esteroides sexuales, parece depender del aporte de electrones. P-450-C17 es una proteína microsomal que requiere una flavoproteína como intermediaria para la transferencia de electrones a partir del NADPH (figura 3). Se encuentra el mismo RNAm para P-450-C17 en córtex suprarrenal y en testículo. El gen codificador para esta proteína se halla en el cromosoma 10 (10q24-q25) (25). La proteína tiene 508 aa (tabla 1.1). Se han descrito diversas mutaciones

responsables del déficit aislado o combinado de 17 α -hidroxilación y 17,20-liasa. La transcripción de P-450-C17 es estimulada por la ACTH y el AMPc (26).

1.4.4 21-hidroxilasa (P-450-C21)

La conversión de 17-OH-progesterona en 11-desoxicortisol (compuesto S) y de progesterona en 11-desoxicorticosterona (DOCA) es mediada por el enzima 21-hidroxilasa (P-450-C21) (figura 1 y 4). El sustrato preferente es la 17-OH-progesterona, que lleva a la biosíntesis de los glucocorticoides, pero la utilización del sustrato progesterona es necesaria para la biosíntesis de mineralocorticoides. Esta actividad enzimática no es necesaria para la biosíntesis de los esteroides sexuales. La P-450-C21 es un citocromo microsomal que requiere, como la P-450-C17, una flavoproteína como transportador intermedio de electrones (Figura 1.3). Se detecta, por inmunohistoquímica, en las tres zonas del córtex suprarrenal pero es más abundante en las zonas glomerular y reticular (27). *In vitro*, la ACTH aumenta la transcripción de P-450-C21 (28).

Se clonaron dos genes en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) para P-450-C21 (29) en la región del complejo mayor de histocompatibilidad de clase III entre los locus para HLA-B y HLA-D. Los dos genes, CYP21B o CYP21 (activo) y CYP21A o CYP21P (pseudogén no transcrito) están duplicados alternativamente con los genes para el componente 4 del complemento (C4A y C4B). CYP21B codifica una proteína de 494 aa (tabla 1.1). Sus mutaciones son responsables del déficit de 21-hidroxilasa, una de las más frecuentes anomalías metabólicas en los humanos.

1.4.5 11 β -hidroxilasa, 11 α -hidroxisteroide deshidrogenasa, 18-hidroxilasa y 18-oxidasa (P-450-C11)

En la zona glomerular, la DOCA es hidroxilada en posición 11 β para convertirse en corticosterona, la cual puede ser convertida por 18-hidroxilación (corticosterona metil-oxidasa I o CMOI) en 18-hidroxi-corticosterona, la cual es convertida por una 18-oxidasa (CMOII) en aldosterona. En la zona fascicular, el 11-desoxicortisol es convertido por la 11 β -hidroxilasa en cortisol (figuras 1.1 y 1.4).

Se había descrito que una sola proteína P-450-C11 mediaba las tres actividades enzimáticas en la zona glomerular (30). Sin embargo, en la zona fascicular, P-450-C11 no parece tener apenas actividad CMOI ni CMOII. P-450-C11 es un citocromo mitocondrial que requiere, como la P-450-scc, adrenodoxina y adrenodoxina reductasa como intermediarios para el transporte de electrones (figura 1.3). La ACTH estimula la transcripción y aumenta la cantidad de proteína P-450-C11.

Se han clonado dos genes en el cromosoma 8 (a nivel 8q22 y 8q24.3) (31, 32) (tabla 1.1) que codifican P-450-C11: CYP11B1 y CYP11B2. Tienen un 93 % de homología estructural y codifican dos proteínas (P-450-C11 β y P-450-aldo, respectivamente) (33). CYP11B1 produce mayor cantidad de RNAm en las células suprarrenales y es regulado por el ACTH, mientras que el producto de CYP11B2 es necesario para las últimas etapas de la biosíntesis de la aldosterona en la zona glomerular (33,34). Se han descrito numerosas mutaciones responsables de deficiencias de 11 β -hidroxilasa y de CMOI y II.

1.5 CONTROL DE LA SECRECIÓN SUPRARRENAL DE ESTEROIDES

1.5.1 Regulación de la secreción de cortisol por el eje CRH-ACTH

Desde 1930, es sabido que la secreción suprarrenal de cortisol está regulada por el péptido de origen hipofisario ACTH. La ACTH hipofisaria es uno de los productos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC), péptido de 241 aminoácidos, cuyo gen está localizado en el cromosoma 2 (35). A partir de la POMC se generan varios péptidos por procesamiento postranslacional: lipotropinas, MSH (Melanocyte Stimulating Hormone), β -endorfina y ACTH.

La ACTH natural consiste en 39 aminoácidos, tiene una vida media en sangre periférica de 7-12 minutos y su derivado sintético 1-24, con el extremo N-terminal, tiene la misma actividad esteroideogénica, aunque su vida media es algo más corta. La ACTH actúa a través de receptores específicos de membrana (36) que requieren la presencia de calcio para su interacción. Éste activa una adenilciclase, produciéndose un aumento de AMPc que activa una proteinquinasa AMPc-dependiente y la fosforilación de proteínas. Existen dos tipos de efectos de la ACTH sobre la esteroideogénesis: los agudos, producidos en pocos minutos y los crónicos, que requieren horas o días. El efecto agudo de la ACTH consiste en aumentar la transformación del colesterol en pregnenolona, la primera etapa limitante en la esteroideogénesis: esto se consigue activando el enzima P-450-scc. Los efectos crónicos de la ACTH consisten en aumentar la síntesis de la mayoría de enzimas de la esteroideogénesis y en efectos sobre la síntesis de proteínas y DNA de las células suprarrenales, provocando hipertrofia e hiperplasia (37). La ACTH también estimula la síntesis de otras proteínas necesarias para la esteroideogénesis, como los receptores para LDL, la adrenodoxina, la proteína transportadora del colesterol al interior de la mitocondria (StAR) y, en la suprarrenal fetal, la HMG-CoA reductasa necesaria para la síntesis *de novo* del colesterol.

Si bien ya a partir de 1948 se describió que la secreción de ACTH por la hipófisis estaba regulada por el SNC a través del hipotálamo, no fue hasta 1955 (38, 39) cuando se describió la existencia de un péptido hipotalámico que estimulaba la secreción de ACTH, al que se llamó CRH (Corticotropin Releasing Hormone), no llegándose a la purificación y descripción de la estructura

bioquímica de 41 aminoácidos hasta 1981 (40). Posteriormente, se ha descrito la expresión de CRH en otros tejidos no hipotalámicos como el cerebro, el hígado, el páncreas, el testículo, el intestino y la placenta. Existe un solo gen para el CRH localizado en el cromosoma 8 (41). El mecanismo de acción del CRH sobre las células hipofisarias incluye en ellas la presencia de receptores específicos de membrana, la activación de una adenilciclase con aumento de AMPc, proteinquinasas y la estimulación de la transcripción del gen de POMC y del procesamiento de su RNAm (42).

Aunque el CRH es el principal regulador de la síntesis de ACTH, otros factores también la regulan como la arginina-vasopresina (AVP), las catecolaminas, la angiotensina II, la serotonina, la oxitocina, el péptido natriurético atrial (ANP), la colecistoquinina, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y otros (43). La regulación de la secreción de CRH es poco conocida, aunque se sabe que la norepinefrina la inhibe y la serotonina la estimula (44, 45).

El retrocontrol del eje CRH-ACTH-cortisol queda establecido por la acción inhibitoria de los glucocorticoides sobre la síntesis y secreción de CRH, ACTH y arginina-vasopresina.

La secreción de ACTH ocurre en pulsos muy breves que se traducen por la pulsatilidad de las concentraciones plasmáticas. El ritmo circadiano resulta de un aumento importante de la amplitud y no de la frecuencia de los pulsos entre 3-5 horas después del inicio del sueño, alcanzando un máximo entre pocas horas antes del despertar y una hora después, disminuyendo progresivamente la amplitud a lo largo de la mañana, siendo mínimos por la tarde-noche. En consecuencia, los niveles plasmáticos de ACTH y de cortisol son máximos a primera hora de la mañana y mínimos por la tarde-noche.

1.5.2 Control de la secreción de aldosterona por el sistema renina-angiotensina

El mayor regulador de la secreción de aldosterona es la angiotensina II. Su origen y regulación han sido descritos durante los últimos 20 años. Procede de un precursor de origen hepático, el angiotensinógeno, cuyo metabolismo corre a cargo de dos enzimas, la renina y el enzima de conversión (ECA). La renina es un enzima proteolítico que actúa sobre el angiotensinógeno, formándose un decapeptido, la angiotensina I, que tiene una débil acción vasopresora. La angiotensina I es transformada por el ECA, de origen pulmonar, en el octapeptido angiotensina II (figura 1.5) que presenta una acción vasomotora más intensa. La renina es secretada por las células del aparato yuxtaglomerular renal y su síntesis es negativamente regulada por la aldosterona. La secreción de renina es regulada a través de un sistema de barorreceptores en las arteriolas contiguas a las células yuxtaglomerulares. El aumento de los niveles circulantes de aldosterona provoca un aumento de retención de sodio y de agua con el consiguiente aumento de la tensión sanguínea; este aumento de tensión regularía negativamente la renina a través de los barorreceptores del aparato yuxtaglomerular; al revés, una disminución del volumen sanguíneo, con una caída de la tensión, condicionaría un aumento de síntesis de renina. También parece que la concentración de sodio y la osmolaridad a nivel de los túbulos próximos al aparato yuxtaglomerular regulan la secreción de renina. Asimismo, las fibras nerviosas simpáticas cercanas al aparato yuxtaglomerular también parecen actuar sobre la secreción de renina (4).

La acción de la angiotensina II sobre las células de la glomerular suprarrenal pasa a través de su unión a receptores de membrana de alta afinidad, asociados a una o más proteínas GTP-dependientes (46). El principal mecanismo de transducción de señal es la activación de una fosfolipasa C que hidroliza PIP₂ a IP₃, el cual libera iones calcio intracelulares y 1,2-diacilglicerol, el cual activa una proteinquinasa C y la entrada de calcio extracelular. Todo ello conlleva una estimulación tanto de la conversión de colesterol en pregnenolona como de corticosterona en aldosterona (4,47,48).

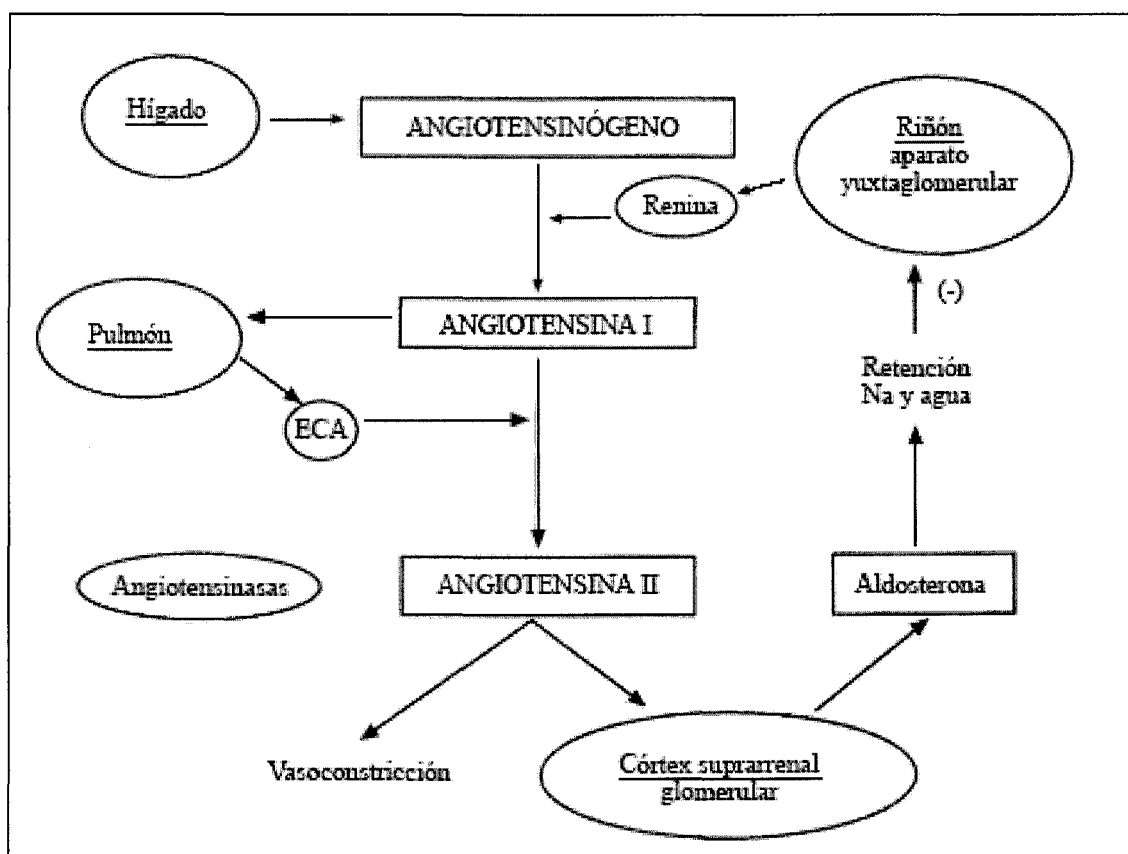


Figura 1.5 Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Enzimas proteolíticos que intervienen en la síntesis de angiotensina II: renina y ECA (enzima de conversión de la angiotensina I).

Si bien el principal regulador de la síntesis de aldosterona es la angiotensina II, desde hace años se había descrito que la ACTH tenía también una acción estimuladora aguda, aunque el estímulo es de corta duración y, en cambio, la administración crónica de ACTH no consigue mantener ningún estímulo, sino más bien una disminución en los niveles circulantes de aldosterona, contrariamente a lo que ocurre con el cortisol. Se sabe que sólo las células de la zona glomerular sintetizan aldosterona y sólo ellas responden a la angiotensina II. Se piensa que un posible mecanismo para la desaparición de la estimulación de la aldosterona bajo la acción crónica de la ACTH podría ser la estimulación simultánea, por éste, de la síntesis por las células de la fascicular de otros esteroides con acción retenedora de sodio como la DOCA y la 18-OH-DOCA, además de la propia acción retenedora de sodio del cortisol, que podrían inhibir la síntesis de renina.

El potasio también estimula directamente la secreción de aldosterona y la aldosterona disminuye las concentraciones séricas de potasio al estimular su

excreción renal. Existe, pues, una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de aldosterona y de potasio. El mecanismo de acción del potasio pasa a través de la despolarización de la membrana plasmática, lo cual activa los canales de calcio aumentando la entrada de calcio extracelular (46, 49); el potasio también provoca un pequeño aumento del AMPc.

La vasopresina (AVP) tiene *in vitro* un débil efecto estimulador de la síntesis de aldosterona (50).

1.5.3 Control de la secreción de andrógenos suprarrenales.

El córtex suprarrenal sintetiza y secreta precursores comunes para glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales. Entre ellos, los precursores que pueden ser metabolizados periféricamente a andrógenos biológicamente activos testosterona (T) y dihidro-testosterona (DHT) son la deshidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEA-S) y la androstendiona. Las concentraciones circulantes de DHEA-S son las más elevadas entre todos los esteroides, incluido el cortisol, y los cambios en sus niveles de secreción desde la vida fetal hasta la vejez (secreción máxima durante la vida fetal por la zona fetal del córtex, disminución de secreción durante la infancia, aumento independiente del cortisol durante la fase llamada adrenarquia, antes de la pubertad gonadal y, finalmente, disminución de secreción durante la vejez, también independientemente del cortisol) han parecido indicar que podría existir una regulación de la secreción de DHEA, independiente de la realizada por el ACTH. Así se postuló la existencia de una hormona hipofisaria a la que se llamó «Adrenal Androgen Stimulating Hormone» (AASH) (51). Parker et al. (52) describieron un péptido hipofisario, de 18aa, con posible actividad AASH, siendo este péptido la fracción 79-96 de la POMC. Sin embargo, su actividad y especificidad no han sido claramente demostradas, por lo que la posible existencia de un péptido regulador de la secreción de DHEA queda por demostrar.

Existen otras hipótesis para explicar los cambios en los niveles de secreción de DHEA a lo largo de la ontogenia y que se relacionan con los posibles mecanismos de regulación, en las distintas etapas de la vida, de la

expresión del enzima 3 β -OHSD que, como hemos visto, media la transformación de pregnenolona en progesterona y de 17-OH-pregnenolona en 17-OH-progesterona, lo cual permite la síntesis de androstendiona, disminuyendo la de DHEA. El IGF-1 ha sido propuesto como posible regulador de la síntesis de andrógenos suprarrenales, puesto que su disminución en los estados de desnutrición y su reaumento con la renutrición son paralelos a los cambios en las concentraciones plasmáticas de DHEA en los pacientes con anorexia nerviosa (53).

1.6 CIRCULACIÓN, TRANSPORTE Y METABOLISMO DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES

1.6.1 Glucocorticoides

El principal glucocorticoide que circula en sangre periférica es el cortisol. Éste circula unido a una proteína específica (alta afinidad y especificidad), α 2-globulina glucosilada llamada transcortina o CBG (corticosteroid binding globulin) (54,55). *In vivo*, el 95 % del cortisol sanguíneo circula unido a proteínas, el 70 % a la transcortina y el resto, con menor afinidad, a la albúmina y a los hematíes. Sólo la fracción libre, no unida a proteínas, es considerada activa, por lo que, en condiciones normales, entre el 5 y el 8 % del cortisol circulante está libre para sus acciones biológicas. Otras hormonas, naturales o sintéticas, pueden unirse a la CBG desplazando el cortisol: Progesterona, aldosterona, DOCA, corticosterona, prednisona y prednisolona (56).

En condiciones normales, la vida media del cortisol es de 60-80 min. El metabolismo del cortisol, así como de todos los demás esteroides, tiene lugar principalmente en el hígado. En éste, el cortisol es rápidamente catabolizado a tetrahydrocortisol y tetrahydrocortisona principalmente, siendo éstos después conjugados con el ácido glucurónico y en menor proporción son sulfatados, para formar productos hidrosolubles que vuelven a la circulación por la vena hepática o son excretados a la luz intestinal con la bilis. El 90 % aproximadamente del cortisol, sus metabolitos y conjugados, son excretados

por el riñón en la orina, y el resto es eliminado por vía intestinal. Además, en el riñón tiene lugar el metabolismo de cortisol a cortisona (57).

1.6.2 Mineralocorticoides

El principal mineralocorticoide circulante en sangre periférica es la aldosterona, siendo menos activos, aunque su concentración sea superior, la DOCA y la corticosterona. La aldosterona se une a la CBG con el 10 % de afinidad, con respecto a la del cortisol, mientras que la corticosterona y la DOCA se unen a la CBG con afinidades respectivas del 100 y del 50 %. La vida media de la aldosterona es aproximadamente de 45 minutos. El hígado metaboliza prácticamente toda la aldosterona que llega a la circulación enterohepática, siendo los dos principales metabolitos excretados por la orina, la tetrahidroaldosterona y el glucurónido de aldosterona (57).

1.6.3 Andrógenos

Los dos principales precursores de andrógenos de origen suprarrenal son la androstendiona y la DHEA. Sólo son activos por metabolismo periférico y transformación en andrógenos activos, T o DHT. Androstendiona y DHEA se unen con mayor afinidad a la proteína de transporte de los esteroides sexuales SHBG que a la CBG, pero sus afinidades para la SHBG son muy inferiores a las de los andrógenos T y DHT.

Estos esteroides son metabolizados en parte en el hígado. Pero una proporción importante del metabolismo de estos esteroides tiene lugar en las gónadas, la piel y el tejido adiposo, formando parte de la interconversión entre los diversos esteroides sexuales. La vida media de la DHEA es sólo de 25 minutos; sin embargo, su principal metabolito sulfatado, la DHEA-S, producida al nivel de la corteza suprarrenal y del hígado, tiene una vida media de 8-11 horas.

En el adulto, el 15 % aproximadamente de la androstendiona circulante procede del metabolismo periférico de DHEA y T, procediendo el resto de suprarrenales y gónadas en proporciones similares. Puede ser transformada de

forma reversible en T por el enzima 17-cetorreductasa y de forma irreversible en estrona por el enzima aromatasas (P-450-AROM) (figura 1.1).

1.7 ACCIONES DE LOS ESTEROIDES SUPRARRENALES

1.7.1 Glucocorticoides

Su denominación hace referencia a acciones predominantes sobre el metabolismo intermediario, aun cuando los glucocorticoides influyen también sobre el metabolismo del agua y los electrólitos, y sobre casi todos los órganos y tejidos del organismo. Ejercen efectos muy importantes sobre el metabolismo hidrocarbonado. El cortisol constituye una hormona de contrarregulación con actividad antiinsulínica, de forma que disminuye la fijación de insulina al receptor y dificulta la captación tisular de glucosa (excepto en hígado, corazón, cerebro y hematíe). En el hígado el cortisol induce la síntesis de glucosa al estimular la gluconeogénesis e incrementa el depósito de glucógeno en el hígado (58). Además de inhibir la captación de aminoácidos y la síntesis proteica, estimula su movilización por catabolismo muscular, óseo, etc. El cortisol moviliza también los ácidos grasos (59), facilitando la activación de la lipasa celular por parte de las catecolaminas y péptidos hipofisarios. Por sí mismo el cortisol inhibe la lipólisis y bloquea la lipogénesis. Además, estimula el apetito, por lo que, en situaciones de hipersecreción, se produce un aumento de peso por incremento de la masa adiposa, que en estas circunstancias suele presentar una distribución centrípeta.

Algunas de las acciones de los glucocorticoides podrían representar mecanismos protectores en situaciones de ayuno, facilitando una situación metabólica estable en determinados tejidos, como cerebro, corazón y células sanguíneas. Asimismo, indirectamente el cortisol estimula la gluconeogénesis al inducir la liberación de glucagón. Se comprende que la secreción excesiva de cortisol, como ocurre en el síndrome de Cushing, produzca importantes alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, que conducen a la aparición de hiperglucemias e, incluso, cetosis. Por el contrario, en los casos de secreción insuficiente, como en la enfermedad de Addison, existe tendencia a la hipoglucemia, sobre todo en las situaciones de ayuno.

Los glucocorticoides desarrollan un papel vital en las situaciones de estrés, al bloquear la producción y la liberación de múltiples hormonas y neurotransmisores, como catecolaminas, prostaglandinas, cininas, etc., las cuales en ausencia de este control podrían conducir a un estado de shock. El cortisol mantiene la capacidad de respuesta del músculo liso arterial a los estímulos presores, participando en el mantenimiento de la presión arterial, el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo renal. En el síndrome de Cushing no es rara la hipertensión arterial y, por el contrario, en la enfermedad de Addison son habituales la hipotensión arterial y la disminución del gasto cardíaco.

Los glucocorticoides ejercen importantes efectos sobre la distribución y la excreción del agua corporal. El cortisol afecta la excreción renal de agua (disminuyendo la secreción de ADH), aumenta la tasa de filtración glomerular y la permeabilidad de la célula tubular, con lo que se incrementa el aclaramiento de agua libre (60). Desde el punto de vista fisiológico, el cortisol desarrolla acciones mineralcorticoides, más manifiestas obviamente cuando su producción es elevada, con una reabsorción tubular de sodio y excreción de potasio excesivas en estas condiciones. Concentraciones elevadas de cortisol disminuyen la absorción intestinal de calcio y aumentan su excreción renal, contribuyendo al desarrollo de osteopenia (61). Aprovechando este efecto excretor se utilizan los glucocorticoides a dosis farmacológicas para el tratamiento de ciertas hipercalcemias.

También inducen la producción de un factor tensioactivo, esencial para la maduración pulmonar fetal y cuya ausencia en prematuros contribuye a la aparición de un síndrome de distrés respiratorio. En el tracto digestivo los glucocorticoides inhiben la síntesis de DNA y aumentan la secreción del estómago, por lo que pueden favorecer la formación de úlceras gastroduodenales (62). Concentraciones elevadas de glucocorticoides desarrollan acciones antiinflamatorias muy importantes desde el punto de vista terapéutico. Los glucocorticoides modifican la inmunidad celular y, a dosis muy altas, llegan a inhibir la formación de anticuerpos. Los glucocorticoides ejercen efectos complejos sobre el cerebro. La administración de dosis farmacológicas de estas hormonas suele provocar euforia. En el síndrome de Cushing son

comunes los estados depresivos, que también se han descrito, con menor frecuencia, en pacientes con insuficiencia suprarrenal. Los glucocorticoides suprimen la secreción de ACTH, tienden a disminuir la liberación de ADH y aumentan la insulina y parathormona.

1.7.2 Mineralcorticoides

Estas hormonas, la más importante de las cuales es la aldosterona, actúan sobre el riñón (órgano diana más importante), el intestino y las glándulas salivales y sudoríparas, donde ejercen dos acciones vitales: regulan el volumen extracelular a través de la reabsorción tubular de sodio y mantienen la normopotasemia mediante la excreción de potasio por los túbulos colectores corticales (63). Además, la aldosterona y otros mineralcorticoides provocan la secreción de hidrogeniones en los túbulos colectores medulares. La ingestión de sodio influye sobre estos efectos hormonales: cuanto mayor es dicha ingestión y la cantidad de sodio que llega al túbulo, mayor es la cantidad de potasio eliminada por la orina. En el hiperaldosteronismo primario se produce el denominado "fenómeno de escape" del sodio, que impide la retención progresiva de sodio y la aparición de edemas, gracias probablemente a la liberación de factor natriurético auricular y a la aparición de cambios renales hemodinámicos.

1.7.3 Andrógenos suprarrenales

La DHEA, su sulfato y la androstenodiona son los más importantes. Los dos primeros se producen en mayor cantidad. Tienen una actividad androgénica muy débil y, aunque en los tejidos periféricos pueden transformarse en testosterona, en el hombre menos del 5% de la testosterona circulante tiene este origen. La secreción de andrógenos suprarrenales tiene importancia al llegar la pubertad.

1.8 ENFERMEDADES DE LA CORTEZA SUPRARRENAL

Las enfermedades de la corteza suprarrenal son relativamente infrecuentes, pero su importancia radica en la morbilidad y mortalidad en caso de no ser tratadas junto con la facilidad relativa del diagnóstico y la existencia de un tratamiento efectivo. En la tabla 1.2 se enumeran las alteraciones más frecuentes.

Exceso de glucocorticoides

Síndrome de Cushing

Síndromes pseudo-Cushing

Resistencia a los glucocorticoides

Déficit de glucocorticoides

Insuficiencia suprarrenal primaria

Insuficiencia suprarrenal secundaria

Tratamiento tras sustitución crónica con corticoesteroides

Hiperplasia suprarrenal congénita

Déficit de 21-hidroxilasa, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa,

17 α -hidroxilasa, 11 β hidroxilasa y StAR

Exceso de mineralocorticoides

Déficit de mineralocorticoides

Defectos en la síntesis de aldosterona

Defectos en la acción de aldosterona

Hipoaldosteronismo hiporreninémico

Incidentalomas, adenomas y carcinomas suprarrenales

Tabla 1.2 Enfermedades de la corteza suprarrenal. StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

1.8.1 Exceso de glucocorticoides

En 1912 Harvey Cushing fue el primero en describir el caso de una mujer de 23 años de edad con obesidad, hirsutismo y amenorrea (64), 20 años después postulo que este "síndrome poliglandular" se debía a una anomalía hipofisaria primaria que causaba con hiperplasia suprarrenal (65). Se demostró que los tumores suprarrenales causan el síndrome en algunos casos, pero la producción ectópica de ACTH no se caracterizo hasta mucho después, en 1962. El termino síndrome de Cushing (SC) se emplea para describir todas las causas y el termino enfermedad de Cushing (EC) se reserva para los casos de síndrome de Cushing dependientes de la hipófisis.

El síndrome de Cushing incluye los síntomas y signos asociados con una exposición prolongada a unos niveles elevados de glucocorticoides (tanto de origen endógeno como de origen exógeno), cuya severidad depende de la concentración de estos y del tiempo de exposición. El síndrome de Cushing iatrogénico es relativamente frecuente (66) y en mayor o menor medida se da en todos los pacientes sometidos a tratamiento esteroideo crónico. Las causas endógenas son mucho mas infrecuentes y entre ellas se encuentran los desordenes adrenales primarios como adenomas y carcinomas (67), producción ectópica de ACTH (68) o de CRH (69) y la estimulación adrenal por factores distintos de la ACTH (70).

1.8.1.1 Síndrome de Cushing

1.8.1.1.1 Etiología

Con relación a la distribución etiológica del SC varía según las fuentes, no obstante es la enfermedad de Cushing sin duda alguna, la causa más frecuente, oscilando entre el 60-80% del total de casos. Probablemente en las diferentes series publicadas en la literatura, existe un sesgo negativo en relación con la incidencia real del SC secundario a adenomas suprarrenales, dado que muchos de los estudios epidemiológicos se realizan en hospitales de referencia donde se derivan los casos de difícil diagnóstico. En la tabla 1.3 se recogen algunas de estas.

	Orth(83) (n=630)	Contreras(88) (n=50)	Verhelst(89) (n=91)	Tyrrell(90) (n=76)	Al-Saadi(91) (n=43)	Invitti(92) (n=426)	Flack(93) (n=118)
ACTH dependiente (%)	80	84	82	88	65	73	88
Enfermedad Cushing	68	78	63	79	60	68	80
Secrecion ectópica de ACTH	12	6	19	9	5	6	8
ACTH independiente (%)	20	16	18	12	35	27	12
Adenoma	10	4	11	8	19	19	7
Carcinoma	8	12	7	4	12	6	2
Hiperplasia macronodular	1	-	-	-	2	2	-
Hiperplasia micronodular	1	-	-	-	2	-	3

Tabla 1.3 La distribución etiológica resultante proviene del estudio de 146 pacientes propios más 484 obtenidos de artículos publicados en la literatura.

A) Dependientes de la ACTH

1 Enfermedad de Cushing

Una vez excluidas las causas iatrogénicas la causa mas común de síndrome de Cushing es la enfermedad de Cushing, que representa aproximadamente el 70% de los casos.

Existe una gran controversia acerca de la etiología de la enfermedad, si se trata de una afección hipofisaria primaria o secundaria a una anomalía en el hipotálamo (71). Estudios recientes han puesto de manifiesto que la mayoría de los adenomas hipofisarios secretores de ACTH eran de origen monoclonal, es decir, aunque el hipotálamo puede tener un papel iniciador del proceso, en la presentación, la afección depende de la hipófisis (72). La causa más usual es la presencia de un microadenoma hipofisario, de forma menos frecuente existe un macroadenoma y ocasionalmente la causa es la hiperplasia de células corticotropas. El carcinoma de células corticotropas es excepcional. La secreción episódica de ACTH aparece aumentada en amplitud y duración pero no en frecuencia y el ritmo circadiano del cortisol y la ACTH están ausentes. La hipercortisolemia crónica da lugar a una inhibición de la secreción tanto del CRH, como de la ACTH por las células corticotropas normales que finalmente sufren atrofia. Las células corticotropas adenomatosas, generalmente de origen monoclonal, son relativamente resistentes al *feedback* negativo del cortisol, de forma que aparece la inhibición a un nivel más alto. Esta característica es clínicamente importante dado que en la mayor parte de los casos la supresión

con dosis elevadas de Dexametasona permite distinguir la secreción de ACTH hipofisaria de la ectópica, ya que esta última es muy resistente a la acción de dicho *feedback*

2 Síndrome de secreción ectópica de ACTH

Hasta el 15% de los síndromes de Cushing pueden estar asociados a tumores no hipofisarios productores de ACTH. La mayoría de los casos se trata de tumores que afectan a tejidos neuroendocrinos cuyas células tiene capacidad para producir ACTH, aunque se desconoce el mecanismo por el que esto tumores desarrollan la secreción ectópica (73). En la mayoría de los casos se asocian a tumores indolentes, como los carcinoides bronquiales benignos o cáncer de pulmón de células pequeñas..

A diferencia de lo que ocurre en los adenomas hipofisarios en estos casos la producción de ACTH no responde al control de retroalimentación de los glucocorticoides, aunque hay que decir, que esta diferencia de sensibilidad a la retroalimentación, dista mucho de ser nítida, lo cual justifica la problemática del diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing ACTH dependiente.

3 Síndrome de producción ectópica de la hormona liberadora de corticotropina

Es una causa poco frecuente de síndrome de Cushing. Se han descrito algunos casos de tumores, generalmente carcinoides bronquial, medular de tiroides o carcinoma de próstata, productores de CRH. Al igual que en el caso anterior estos pacientes mantienen una resistencia a la retroalimentación negativa de los glucocorticoides.

4 Hiperplasia suprarrenal macronodular

Entre el 10 y el 40% de los casos de enfermedad de Cushing tienen asociado una hiperplasia suprarrenal bilateral. Aunque un porcentaje importante de los pacientes presenta unos niveles de ACTH relativamente bajos, la hiperplasia suprarrenal debe ser considerada como una forma de Síndrome de Cushing ACTH dependiente ya que parece que es el resultado de

una estimulación prolongada de ACTH sobre la suprarrenales que conduce a la formación de un adenoma suprarrenal autónomo.

B) Independientes de la ACTH

1 Adenomas y carcinoma suprarrenal

En los adultos los adenomas suprarrenales pueden llegar a representar hasta el 15% de los casos de síndrome de Cushing mientras que los carcinomas no suelen representar más del 5%. En contraste en los niños, hasta el 65% de los casos de SC tienen etiología suprarrenal (15% adenomas y 65% carcinomas) (74).

Los adenomas adrenales producen cortisol de forma muy eficiente y, adecuadamente, las concentraciones séricas de dehidroepiandrosterona (DHEA) son bajas. Raramente existe una elevación en los andrógenos adrenales por un aumento en la actividad 17,20 liasa, que convierte la 17-OH pregnenolona y 17-OH progesterona en DHEA y androstenodiona respectivamente.

Los carcinomas adrenales producen una cantidad aumentada tanto del cortisol como de otros esteroides adrenales. La eficiencia por unidad de peso en la conversión de colesterol a cortisol es baja, y la producción de otros precursores es desproporcionadamente elevada.

2 Hiperplasia suprarrenal nodular pigmentada primaria y complejo Carney.

Existe tanto la forma esporádica como la familiar. La forma familiar, que aparece en dos tercios de los casos también se denomina síndrome o complejo de Carney, es un trastorno autosómico dominante que afecta tanto a varones como a mujeres, especialmente a niños y jóvenes, aunque la transmisión ocurre más frecuentemente a través de las mujeres, posiblemente debido a la baja fertilidad de los varones por la presencia de tumores de células sólo de Sertoli en un 80% de los casos. En la mitad de los casos se asocia a lentiginosis pigmentada, nevos azules en *facies*, cuello y tronco, y tumores múltiples tanto endocrinos (tumores testiculares de células de Sertoli, bilaterales y multicéntricos, que pueden producir pubertad precoz, hipofisarios productores

de GH, o tiroideos) y no endocrinos (mixomas cutáneos, o auriculares, fibroadenomas mixoides mamarios y schwannomas melanóticos psamommatosos). Las glándulas suprarrenales aparecen normales o pequeñas (peso de ambas menor de 12 g), con nódulos corticales pardo-negruzcos de pequeño tamaño (menores de 5 mm) y atrofia cortical internodular. En la series pediátricas representan casi el 10% de los SC. Se han descrito mutaciones en el cromosoma 2p16 y en el 17q22-24. En esta última, la mutación de un gen supresor tumoral determina la ausencia de una proteína que determina en último término una activación de la proteína quinasa A (PRKAR1-alfa) y la activación del AMP cíclico.

3 Síndrome de McCune-Albright

El Síndrome de McCune-Albright en sus diferentes formas, la displasia fibrosa y la pigmentación cutánea pueden asociarse con hiperfunción hipofisaria, tiroidea, suprarrenal y gonadal. Aunque las manifestaciones mas frecuentes de este síndrome están relacionadas con el exceso de hormona del crecimiento y la precocidad sexual tan bien se han descrito casos de SC.

4 hiperplasia macronodular y expresión aberrante de receptores

Aparece en edades superiores a 40 años, y se caracteriza por la presencia de glándulas de un peso superior generalmente a 100 g, y nódulos no pigmentados mayores de 5 mm de diámetro, e incluso mayores de 4 cm. El córtex internodular aparece hipertrófico. La patogenia de la entidad se ha perfilado en los últimos años (75-76). Existe una sobreexpresión de receptores eutópicos, una expresión inapropiada de receptores ectópicos o "ilícitos" o bien un acoplamiento de receptores eutópicos a las vías de señal de la esteroidogénesis. Se ha descrito sobreexpresión de receptores del péptido inhibitorio gástrico (GIP), vasopresina, agonistas β -adrenérgicos, serotonina, IL-1, LH/HCG, e incluso leptina (75-76). La expresión ectópica de receptores se halla en más de un 25% de los adenomas adrenales unilaterales.

C) Síndrome de Cushing Iatrogénico

Es la causa más frecuente de SC y en EE.UU. más de 10 millones de personas reciben dosis farmacológicas de glucocorticoides. Está causado por la administración exógena de glucocorticoides sintéticos, raramente por la administración de ACTH y ocasionalmente se produce por la administración de megestrol que tiene una cierta acción intrínseca glucocorticoide. La administración exógena puede ocurrir de dos formas: aquellos pacientes que reciben glucocorticoides (orales, inhalados, o por vía intramuscular o tópica) como tratamiento de su enfermedad de base (enfermedades sistémicas, asma bronquial, etc.) y que constituye la causa más frecuente de hipercorticismismo y aquellos en que la ingesta es inadvertida o incluso subrepticia (SC facticio). Los glucocorticoides inhiben tanto el CRH como la ACTH y dan lugar a atrofia adrenocortical bilateral.

D) Otras causas

1 Síndrome de Cushing normocortisolémico-Síndrome de hiperreactividad del cortisol

Se trata de una entidad excepcional caracterizada por un aumento en la sensibilidad tisular al cortisol por incremento de la actividad o del número de receptores de los glucocorticoides (77). Las concentraciones séricas de cortisol pueden ser normales, o, de forma similar a la administración exógena de glucocorticoides, bajas o incluso indetectables. Las concentraciones de ACTH plasmática son indetectables.

2 Síndrome de Cushing cíclico

Se trata de la secreción intermitente de cortisol bien de forma cíclica, con una periodicidad regular de días o semanas, o bien episódica sin un patrón regular. La secreción de cortisol entre los diferentes episodios puede ser estrictamente normal. La mayor parte de los casos son secundarios a una enfermedad de Cushing (78).

3 Síndrome de Cushing durante el embarazo

Se trata de una situación infrecuente. Durante el embarazo los tumores adrenales, especialmente los adenomas, son más frecuentes que la enfermedad de Cushing (78). El síndrome ACTH ectópico es excepcional. En algunos casos el cuadro sufre regresión tras el parto y raramente reaparece con nuevos embarazos. De forma inusual ocurre por la expresión aumentada de receptores de LH/HCG. El cuadro se asocia a una mortalidad del feto superior al 25%, y el parto prematuro aparece en más del 50% de los casos (79). El paso del cortisol a través de la placenta da lugar a inhibición de las glándulas adrenales del feto.

4 Síndrome de Cushing subclínico e incidentaloma adrenal

Se entiende por incidentaloma adrenal toda masa detectada por una exploración de imagen (tomografía axial computarizada (TAC), ecografía, etc.) indicada por un problema no relacionado con patología adrenal. Hasta tal punto se han descrito diferentes alteraciones en el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA) que en el estudio de un incidentaloma adrenal se recomienda la prueba de frenación rápida con 1 mg de dexametasona con el fin de identificar el estado de hipercortisolismo subclínico (80). Aunque los límites de esta entidad no están bien perfilados, algunos autores han descrito que tras la resección del tumor adrenal aparece mejoría en diferentes factores de riesgo cardiovascular y también en la insulinoresistencia, lo que sugiere el beneficio de una intervención en estadios tempranos(81).

5 Síndromes pseudo-Cushing

Caracterizados por la aparición de alguno o todos los síntomas clínicos del SC junto con hipercortisolismo. Generalmente la resolución del problema base lleva a la desaparición del estado cushingoide. Varias son las causas descritas.

Alcohol: debe sospecharse en pacientes con una historia de intenso consumo de alcohol y con datos clínicos o bioquímicos sugerentes de hepatopatía crónica. La fisiopatología de este trastorno no es del todo conocida, la hepatopatía crónica suele estar asociada a alteraciones en el metabolismo del

cortisol aunque en los individuos alcohólicos se relaciona con un incremento de la secreción del cortisol relacionada probablemente con un estímulo del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales (HHS).

Trastornos psiquiátricos como la depresión suele cursar con síntomas clínicos parecidos a los del SC por mecanismos fisiológicos que no están suficientemente aclarados. Estas anomalías suele revertir con facilidad con la corrección del trastorno de base (82).

Obesidad: los pacientes con obesidad tienen unos niveles de secreción de cortisol ligeramente elevados debidos con casi toda seguridad a una activación del eje hipotálamo-hipófisis. Este incremento de secreción de cortisol no se refleja con un incremento de los niveles circulantes debido a un incremento del metabolismo hepático y el aclaramiento renal del cortisol.

1.8.1.1.2 Cuadro clínico

La mirada de manifestaciones propias del SC son reflejo de la exposición tisular al exceso de glucocorticoides (83). No todos los pacientes presentan todos los síntomas y los pacientes con producción leve o intermitente de glucocorticoides tienen menos manifestaciones que aquellos pacientes con producción muy aumentada. Aunque el SC es una entidad rara, muchas de las manifestaciones clínicas (por ejemplo, obesidad, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, etc.) son muy frecuentes en la población general y plantean el dilema de *qué* pacientes deben someterse al despistaje, ya que, además, ningún signo o síntoma es patognomónico de la entidad. Los signos y síntomas más frecuentes se exponen en la tabla 1.4.

SIGNOS Y SÍNTOMAS	Ross et al (84) (%) (n=70)	Urbanic et al (85) (%) (n=31)
Disminución de la libido	100	55
Obesidad	97	79
Facies de luna llena	88	-
Alteraciones menstruales	84	69
Hirsutismo	81	64
Hipertensión arterial	74	77
Equimosis	62	77
Depresión	62	48
Estrías rojo-vinosas	56	51
Debilidad	56	90
Giba de búfalo	54	-
Osteopenia/fracturas	50	48
Edema	50	48
Intolerancia oral a la glucosa	50	39
Cefalea	47	-
Acné	21	35

Tabla 1.4 Manifestaciones clínicas más frecuentes del síndrome de Cushing

La presencia y gravedad de los síntomas depende, entre otros factores, de: la edad, el sexo, la intensidad y la duración del hipercorticismismo y, obviamente, de la causa. Las manifestaciones clínicas aparecen en general progresivamente (83-86).

La obesidad constituye un signo muy frecuente. Habitualmente de localización centrípeta, abarca el tronco, el abdomen, la cara y el cuello. Es mucho más intensa en los niños que en los adultos. La facies de estos pacientes aparece redondeada (facies de luna llena), con las mejillas pronunciadas y rubicundas. El cuello aparece más ancho y corto debido a su engrosamiento por acumulación de grasa y a los depósitos de grasa en las regiones supraclaviculares y dorsocervical (cuello de búfalo) (84). En general coexiste aumento de peso y de apetito, pero otras veces el peso se mantiene o disminuye al cursar con inapetencia. El incremento de peso podría estar

relacionado con el aumento de insulina que estimularía la lipogénesis. Es muy común que estos pacientes refieran debilidad muscular, atribuible generalmente a una miopatía esteroide proximal de extremidades superiores e inferiores, a veces con afectación adicional de los músculos glúteos. En los pacientes con síndrome de Cushing producido por ACTH ectópica, la miopatía puede llegar a ser muy intensa, agravada en estos casos por la frecuente hipopotasemia.

La piel aparece muy adelgazada por pérdida de tejido graso subcutáneo. Se observan estrías cutáneas de color rojo violáceo localizadas sobre todo en la parte inferior del abdomen, en caderas, en mamas y en la cara interna superior de los brazos, en las axilas y en los muslos. Son más frecuentes e intensas en los pacientes jóvenes. No deben confundirse con las que suelen presentar los adolescentes que ganan mucho peso rápidamente. Son frecuentes las equimosis y los hematomas, que aparecen con traumatismos mínimos. Las heridas suelen ser difíciles de cerrar y es característica su evolución tórpida, con lenta cicatrización. En los casos de síndrome de Cushing que cursan con secreción aumentada de ACTH y de otros péptidos más pequeños con actividad melanotrópica se produce un aumento de pigmentación cutánea, especialmente en las zonas expuestas a la luz y en las mismas localizaciones que se describen en la enfermedad de Addison. La hiperpigmentación suele ser más intensa en los casos de producción ectópica. En las mujeres y en presencia de un exceso de andrógenos, la enfermedad de Cushing y algunos carcinomas suprarrenales pueden cursar con seborrea, acné e hirsutismo. Con independencia de la causa de aparición, la oligomenorrea y la amenorrea son frecuentes y se relacionan probablemente con una inhibición de gonadotropinas por parte de los andrógenos. En los casos de adenomas suprarrenales productores de cortisol no suele haber trastornos menstruales.

La hipertensión arterial moderada, con renina baja y con presiones diastólicas superiores a 95-100 mmHg, es bastante habitual. Probablemente está relacionada con una expansión del volumen extracelular por retención de sodio. La presencia de edemas es más frecuente en los casos de síndrome de Cushing por producción ectópica de ACTH, en los que suele haber una combinación de aumentos de secreción de cortisol, corticosterona y 11-DOCA.

En casos excepcionales aparece un edema cíclico en pacientes que presentan una hipersecreción episódica de cortisol.

Muchos pacientes presentan trastornos psíquicos: depresión, labilidad emocional, irritabilidad a veces acompañada de ansiedad, accesos de pánico e incluso cuadros paranoicos. No es raro el insomnio, relacionado con la elevación nocturna del cortisol. Probablemente más del 50% de los pacientes presentan algún tipo de alteración psíquica.

Hay intolerancia a la glucosa, a veces con hiperglucemia en ayunas e hiperinsulinismo, y aparición de clínica de polidipsia y poliuria. La diabetes mellitus se encuentra en el 10-15% de los pacientes, los cuales suelen presentar antecedentes familiares de diabetes (87). La osteoporosis es común, aun en los pacientes jóvenes. En la displasia suprarrenal micronodular, la osteoporosis puede ser muy intensa, con aplastamientos vertebrales, así como fracturas costales o de otra localización por traumatismos mínimos. La necrosis vascular de la cabeza femoral o humeral es menos frecuente. Además de una absorción intestinal del calcio disminuida, se comprueba hipercalciuria que, por otra parte, facilita la formación de cálculos urinarios.

En niños hay un retraso del crecimiento y de la maduración ósea. Además de su acción catabólica, los glucocorticoides disminuyen la respuesta de la GH a varios estímulos, alterando el tono somatostatinérgico.

1.8.1.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico se debe establecer tanto por la presencia de sintomatología clínica como por los trastornos bioquímicos. Es decir, una vez se haya llevado a cabo una sospecha clínica se deberán realizar las pruebas diagnósticas. Éstas, a su vez, llevan inicialmente al diagnóstico del síndrome y van seguidas de las pruebas que establecen la etiología (94-96). No existe, sin embargo, un consenso general del protocolo diagnóstico.

Los dos estadios diagnósticos son:

1. Inicialmente diagnóstico sindrómico: demostración del hipercortisolismo.

2. En segundo lugar determinar la etiología: si es ACTH-dependiente o no y en el primer caso determinar la fuente de ACTH: Enfermedad de Cushing o síndrome de ACTH ectópica.

1.8.1.1.3.1 Diagnóstico del síndrome

Antes de evaluar a un paciente con posible SC se debe haber excluido la administración exógena, tanto yatrogénica como facticia de glucocorticoides. Salvo en la administración de hidrocortisona tanto el cortisol sérico como la ACTH plasmática y la excreción urinaria de cortisol son bajos.

Las pruebas iniciales, de cribaje, deben tener una alta sensibilidad. Tras descartar el SC exógeno, la hipersecreción de cortisol se demuestra mediante la determinación de la excreción urinaria de cortisol, la pérdida del ritmo circadiano de cortisol, y finalmente por la pérdida de la supresión normal de la secreción de cortisol tras administración de bajas dosis de dexametasona.

Existen, sin embargo, cuadros que presentan hipercortisolismo sin presencia de un SC:

1. Estados de estrés.
2. Obesidad grave, sobre todo con cúmulo visceral.
3. Síndrome de los ovarios poliquísticos.
4. Fármacos: carbamacepina, etc.
5. Síndrome de pseudo-Cushing.

1.8.1.1.3.1.1 Cortisol libre urinario

Es una prueba de referencia en el diagnóstico del SC y constituye la forma más directa y fiable de la secreción de cortisol, ya que es una medida integrada de la concentración sérica libre de cortisol no unido a las proteínas (principalmente la CBG o transcortina). Con el fin de minimizar los errores en la recolección de orina se aconseja su determinación en, al menos, dos muestras junto con la determinación de la excreción urinaria de creatinina. Numerosos estudios indican una sensibilidad y especificidad superior al 90%. En el SC los valores de cortisol urinarios suelen ser de 2-4 veces superiores al valor máximo de la normalidad [(normal < 360 nmol/24 h (227 µg/24 h)]. Los pacientes con

seudo-Cushing pueden tener una excreción urinaria elevada aunque inferior a dos o cuatro veces el valor superior de referencia. Por el contrario, el cortisol libre urinario puede ser falsamente negativo en el SC cíclico si se recoge orina durante la fase inactiva del cuadro y también en la insuficiencia renal grave.

1.8.1.1.3.1.2 Ritmo de cortisol sérico

La secreción de cortisol sigue un ritmo circadiano que se pierde en el SC y en otras situaciones de forma inespecífica. En el SC aunque los valores de cortisol por la mañana suelen ser normales los valores por la tarde disminuyen menos del 50% del valor de la mañana.

1.8.1.1.3.1.3 Frenación con dosis bajas (prueba rápida, y simple) de dexametasona

En condiciones normales la administración exógena de dexametasona determina una supresión de la secreción de ACTH por la hipófisis normal y consecuentemente la disminución en la secreción de cortisol sérico y de su excreción urinaria.

1.8.1.1.3.1.4 Prueba de frenación rápida (prueba de Nugent)

Se trata de una prueba sencilla, de cribaje, que se lleva a cabo con la administración de 1 mg de dexametasona a las 23 h con posterior determinación de cortisol sérico a las 8 h del día siguiente. La supresión normal prácticamente excluye la posibilidad de un SC, por el contrario la ausencia de frenación obliga a practicar otras pruebas, como la frenación simple, para confirmar el SC. Los criterios clásicos de normalidad de la prueba eran de un valor de cortisol sérico inferior a 138 nmol/l (5 µ g/dL). Sin embargo, en los últimos años los criterios se han modificado exigiéndose un valor por debajo de 50 nmol/l (1,8 µ g/dL). De esta forma la sensibilidad es muy elevada aunque la especificidad es limitada, aumentando el número de falsos positivos (hasta en un 30%), especialmente en individuos con obesidad, pseudo-Cushing, aumento de la CBG (embarazo, ingesta de estrógenos, etc.), algunos fármacos (carbamecepin, etc.) o enfermedad aguda o crónica.

1.8.1.1.3.1.5 Prueba de frenación simple con dexametasona

Es la prueba estándar que establece el diagnóstico de SC. Después de la determinación del cortisol sérico y del cortisol urinario en situación basal se procede a la administración de 0,5 mg de dexametasona cada 6 horas durante 2 días y la cuantificación de la concentración de cortisol sérico al finalizar el segundo día junto con la determinación del cortisol libre urinario del segundo día. La respuesta normal es un descenso de la concentración de cortisol sérico por debajo de 138 nmol/L (5 µg/dL). El cortisol en orina de 24h debe descender por debajo de 27 nmol/24h (10 µg/24h)(94). La prueba ofrece, en la mayor parte de los estudios, una sensibilidad y especificidad superior al 90%, especialmente cuando se exige el criterio del descenso de la concentración de cortisol sérico, más que la disminución en orina. Es una prueba laboriosa que exige un cumplimiento máximo del paciente. En aquellos pacientes en que las pruebas anteriores no son concluyentes u ofrecen resultados equívocos se deben realizar otras pruebas para identificar los pacientes con SC.

1.8.1.1.3.1.6 Determinación del cortisol plasmático nocturno

En condiciones normales se produce un progresivo descenso de la concentración plasmática de cortisol con un nadir a la medianoche. Esta disminución se produce también en individuos obesos y en la depresión. Por el contrario, en el SC una determinación aislada del cortisol plasmático a las 23 o 24 h permite identificar correctamente a la mayor parte de los pacientes. Dadas las condiciones estrictas de su determinación esta prueba se reserva principalmente para casos dudosos o como complemento de otras pruebas que ayuden a dilucidar el SC especialmente de aquellos pacientes con pseudo-Cushing. La prueba precisa de la hospitalización del paciente, no se debe realizar la primera noche por el estrés inicial, el paciente debe estar dormido y no debe ser advertido de la extracción que se va a llevar a cabo. En nuestro medio estos requisitos hacen que la prueba sea de difícil aplicación (96). Aunque se han establecido diferentes puntos de corte en el cribaje del SC,

concentraciones de cortisol sérico por debajo de 50 nmol/L (1,8 µg/dL) prácticamente lo descartan.

1.8.1.1.3.1.7 Determinación del cortisol salival nocturno

La concentración de cortisol en saliva es reflejo de la porción libre, biológicamente activa, de cortisol, de forma que algunos grupos realizan la determinación de cortisol salival nocturno y puede utilizarse en lugar de su determinación en suero (97). La saliva se recoge fácilmente, y se realiza generalmente en 3 noches consecutivas. El cortisol es estable incluso a temperatura ambiente y puede recogerse en el domicilio del paciente. Se trata de un método no invasivo, especialmente útil en pacientes con sospecha de SC cíclico en que es aconsejable la recogida de muestras durante periodos largos de tiempo. Los valores de referencia se deben validar en cada laboratorio.

1.8.1.1.3.1.8 Prueba combinada: frenación simple débil con dexametasona y estímulo con hormona liberadora de ACTH (CRH)

Aunque cada una de estas pruebas por separado ofrecen un alto grado de solapamiento entre los pacientes con SC de otros estados con alteración del eje HHA, como los estados de pseudo-Cushing, la obesidad exógena, trastornos de la alimentación, etc., la prueba combinada es muy útil para el diagnóstico diferencial entre ambos grupos (98). Tras la realización de la prueba de frenación simple con dexametasona, la administración de 100 µg de CRH, 2 horas después de la última dosis de dexametasona, da lugar a los 15 minutos a una concentración de cortisol sérico superior a 38,6 nmol/L (1,4 µg/dL) en el 100% de los pacientes con SC (98).

Cualquier prueba que incluya la administración de Dexametasona obliga, para su correcta interpretación, a la supresión de sustancias que dan lugar a través de la inducción de enzimas que dependen del citocromo p-450, a un aumento en el aclaramiento hepático del fármaco, como el alcohol, barbitúricos, difenilhidantoína, rifampicina, etc., que puede dar lugar a falsos positivos. Por el contrario, aquellos estados en que existe disminución en el aclaramiento, como en la insuficiencia renal o hepática, pueden ocasionar falsos negativos.

Algunos autores propugnan la determinación de dexametasona en suero para clarificar los casos confusos.

1.8.1.1.3.2 Diagnóstico de la etiología

Tras establecer el diagnóstico de SC, se deben llevar a cabo diferentes pruebas que orientan a la etiología precisa del síndrome. Estas pruebas únicamente se realizarán una vez el diagnóstico del síndrome esté bien establecido.

1.8.1.1.3.2.1 Determinación de ACTH plasmática

La cuantificación de ACTH en plasma permite categorizar al paciente con SC como ACTH dependiente o independiente. Dado que, al igual que el cortisol, la secreción de ACTH es episódica se recomienda su determinación en al menos dos ocasiones en días diferentes. En presencia de una producción aumentada de cortisol unos valores plasmáticos de ACTH por debajo del límite de detección catalogan al SC de ACTH-independiente. Aunque los valores tienden a ser más elevados en el SC ACTH ectópico que en la enfermedad de Cushing existe un gran solapamiento y habitualmente no permite el diagnóstico diferencial entre ambas entidades.

Unos valores séricos de DHEA disminuidos abogan a favor de una patología adrenal primaria (salvo en el carcinoma adrenal); mientras que este metabolito aparece normal o discretamente elevado en los estados de SC ACTH-dependiente.

1.8.1.1.3.2.2 Prueba de frenación fuerte o reforzada con dexametasona

Consiste en la administración de 2 mg de dexametasona cada 6 horas durante 2 días. Se cuantifica el cortisol sérico al finalizar el segundo día junto con la determinación del cortisol libre urinario del segundo día. La respuesta normal es un descenso del cortisol sérico por debajo del 50% del valor basal y una reducción del cortisol libre en orina de 24h de un 10%-20% del basal.

La prueba de frenación reforzada consigue suprimir parcialmente la secreción de ACTH en la mayor parte (80%-90%) de los corticotropinomas, mientras que los tumores que producen ACTH de forma ectópica son resistentes al feedback negativo. Sin embargo, hasta un 10%-20% de los tumores ectópicos, principalmente tumores carcinoides bronquiales, de timo o páncreas pueden ser sensibles a las dosis elevadas de glucocorticoides y consiguen la frenación de forma similar a los tumores hipofisarios.

En los tumores adrenales existe una ausencia de frenación dado que la secreción de cortisol es completamente autónoma y la secreción de ACTH ya es muy baja y no puede disminuir más. Algunos autores han realizado variaciones a la prueba estándar de frenación reforzada con Dexametasona, como la administración de 8 mg de dexametasona en dosis nocturna única, o la administración intravenosa de dexametasona 1mg/h durante 7 h. En la actualidad, no obstante, algunos autores sugieren el abandono de esta prueba para el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Cushing y el síndrome de ACTH ectópica, dado su bajo poder predictivo, incluso con modificación de los criterios de interpretación de la prueba (99). Como alternativa propugnan la combinación de la prueba de estimulación con CRH y la resonancia magnética, y si se precisa el muestreo del seno petroso inferior.

1.8.1.1.3.2.3 Prueba de estimulación con CRH

La mayoría de los tumores hipofisarios y algunos ectópicos productores de ACTH responden a la administración de CRH con una elevación en la secreción de ACTH y de cortisol (100). Por el contrario, en los tumores adrenales la respuesta del cortisol y ACTH a la administración de CRH es escasa o nula.

1.8.1.1.3.2.4 Muestreo del seno petroso inferior

Tras la cateterización de los senos petrosos inferiores, se procede a la toma de muestras de forma simultánea de ambos y de sangre periférica, lo que permite la cuantificación de ACTH plasmática antes y tras la estimulación con CRH (101). En la enfermedad de Cushing se consigue un gradiente central:

periferia superior a 2 en estado basal y superior a 3 tras el estímulo con CRH. Una relación entre las concentraciones plasmáticas de ACTH superior a 1.5 entre ambos senos petrosos lateraliza correctamente la ubicación del adenoma hipofisario en más del 60% de los casos. La prueba exige un centro experimentado en esta técnica y aunque los resultados son muy discordantes parece que predice correctamente la localización del tumor en más del 60% de los casos. Se trata de una prueba invasiva y costosa, no exenta de morbilidad que se reserva para aquellos pacientes con SC ACTH-dependiente con lesiones hipofisarias dudosas (< 5mm) o ausentes o bien si se dispone de una sola prueba hormonal positiva. La prueba no es diagnóstica de SC, los gradientes hallados en sujetos normales se solapan con los obtenidos en pacientes con SC, por lo que esta prueba se debe realizar únicamente cuando el diagnóstico de SC ACTH dependiente está bien establecido.

1.8.1.1.3.2.5 Otras pruebas

Otros procedimientos diagnósticos como la clásica prueba de la metopirona o la hipoglucemia insulínica, el estímulo con naloxona, o desmopresina (102), o la más novedosa cuantificación de la producción de cortisol por métodos isotópicos no están generalizados y no forman parte de los algoritmos diagnóstico habituales.

Ante la sospecha de tumor oculto productor de ACTH ectópica se llevará a cabo la determinación de marcadores bioquímicos de los tumores más frecuentes como el carcinoma medular de tiroides, tumor carcinoide, feocromocitoma y otros tumores neuroendocrinos.

1.8.1.1.3.2.6 Técnicas de imagen

Las técnicas de imagen son imprescindibles para localizar y caracterizar los tumores productores de ACTH así como para visualizar las glándulas suprarrenales y la presencia de tumores adrenales (103).

La resonancia magnética (RM) con administración de contraste con gadolinio es la técnica de elección para visualizar la región hipotálamo-hipofisaria. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño solamente un 50%-60% de los tumores

hipofisarios se logran visualizar. Se ha de tener presente la posibilidad de localizar incidentalomas hipofisarios, es decir, microadenomas hipofisarios no funcionantes presentes hasta en un 10%-20% de individuos normales. Por tanto, las técnicas de localización se realizarán únicamente tras haber establecido el diagnóstico de SC por las pruebas hormonales. A causa de que muchos pacientes con síndrome de ACTH ectópica pueden ser clínica y bioquímicamente indistinguibles de la enfermedad de Cushing, la presencia de una lesión hipofisaria, sobre todo menor de 5 mm, siempre se ha de valorar con cautela.

Para la visualización de las glándulas suprarrenales la TAC es la técnica de elección. En el SC ACTH-dependiente aparece hiperplasia bilateral en la mayor parte de los casos, en un 30% las glándulas aparecen de tamaño normal y hasta en un 15% aparece hiperplasia nodular. En el SC ACTH-independiente la TAC muestra un tumor adrenal unilateral en la mayor parte de los casos, con atrofia de la glándula contralateral. En el caso del adenoma éste suele tener un tamaño que oscila entre 2 y 4 cm de diámetro. Cuando el tumor es mayor de 6 cm se debe sospechar un carcinoma adrenal. Por el contrario, la presencia de un tumor único inferior a 2 cm debe hacer pensar en la posibilidad de un incidentaloma suprarrenal. La presencia de hiperplasia adrenal bilateral ACTH-independiente muestra, en el caso de que ésta sea macronodular, nódulos superiores a 2 cm. En la displasia adrenal los nódulos son pequeños y en ocasiones las glándulas adrenales aparecen de tamaño normal.

En los pacientes en los que se sospeche el síndrome ACTH ectópico se debe practicar TAC o RM torácica o abdominal. Sin embargo, en ocasiones los tumores son de pequeño tamaño, especialmente los de origen neuroendocrino y pueden permanecer ocultos. De hecho, se considera que, en el momento del diagnóstico del SC, uno de cada tres tumores ectópicos productores de ACTH no se puede localizar. Por el contrario, más del 80% de estos tumores cuando son localizados son metastásicos o son extirpables de forma incompleta. Dado que muchos de ellos expresan receptores de somatostatina, se dispone de técnicas de localización con la administración del análogo de la somatostatina,

octréotido marcado especialmente cuando el tumor expresa receptores del tipo 2.

1.9 Determinación del cortisol total y libre

El 95% del cortisol circula en sangre periférica unido a proteínas plasmáticas (apartado 1.6), fundamentalmente unido a la CBG 70% y el resto unido a otras proteínas como la albúmina. La función que desempeñan estas proteínas de transporte no esta suficientemente aclarada pero parece que podrían desempeñar un papel protector de cortisol frente a la inactivación hepática o filtración renal. En este sentido, la fracción unida a proteínas actuaría como reservorio circulante de cortisol ya que la fracción biológicamente activa es la libre, apenas un 5% del cortisol total. Los procedimientos de medida del cortisol, implican, procedimientos de extracción con disolventes orgánicos o de precipitación proteica para cuantificar ambas fracciones, la libre y la unida a proteínas.

De forma general, podríamos considerar cuatro tipos de métodos de determinación de cortisol. Métodos basados en la reacción de Porter-Silber, métodos fluorimétricos, métodos cromatográficos y métodos inmunométricos. En la práctica, los métodos de Porter-Silber y los métodos fluorimétricos han sido sustituidos por métodos cromatográficos o inmunométricos, mucho mas sensibles y específicos.

1.9.1 Métodos cromatográficos

Los tipos de métodos cromatográficos de determinación del cortisol incluyen, cromatografía gaseosa, cromatografía líquida y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como, las combinaciones de estos con la espectrometría de masas. Todos estos métodos se basan en la separación, en una columna cromatográfica, del cortisol y sus metabolitos y la posterior cuantificación utilizando detectores electroquímicos. Aunque estos métodos son altamente sensibles y específicos y, además, permiten cuantificar el cortisol y sus metabolitos, plantean problemas importantes de practicabilidad, que hace que su uso en la actualidad de haya relegado a la investigación o a la validación

de otros métodos analíticos. La combinación de la cromatografía gaseosa y la espectrometría de masas se considera el método de referencia para la determinación del cortisol.

1.9.2 Métodos inmunométricos

Son los que se utilizan con mayor frecuencia en el laboratorio clínico. En el mercado existen disponibles una gran cantidad de adaptaciones de estos métodos, en diferentes sistemas analíticos automáticos y semiautomáticos, para la cuantificación del cortisol.

1.9.2.1 Principio

En la actualidad hay desarrollados un gran número de inmunoensayos que utilizan diferentes tipos de anticuerpos, protocolos, marcadores (isotópicos y no isotópicos) y principios de medida, incluyendo el conteo beta y gamma, fotometría, fluorimetría y quimioluminiscencia. La mayoría de los inmunoensayos utilizan anticuerpos de origen animal, obtenidos tras la sensibilización con derivados del cortisol unidos a proteínas. Los anticuerpos obtenidos frente al cortisol-21-hemisuccinato y el cortisol-3-carboximetiloxina han sido ampliamente utilizados para un gran número de inmunoensayos directos que no requieren extracción previa de los derivados del cortisol.

Los más recientes métodos de determinación, utilizan anticuerpos monoclonales específicos obtenidos por técnicas de hibridación. Son métodos directos que no requieren proceso de extracción previa, e implican la utilización de sustancias como el ácido 8-anilino-1-naftaleno-sulfónico, el salicilato o tratamientos a bajo pH o por calor que desplazan al cortisol de su unión a las proteínas plasmáticas. Estos métodos tienen una elevada precisión en comparación con los métodos que requieren extracción, derivada de la escasa manipulación de las muestras antes de su procesamiento y la variabilidad propia del procedimiento de extracción

1.9.2.2 Métodos isotópicos

Utilizan, en su mayoría, el ^{125}I como marcador. Existen una gran variedad de radioinmunoensayos para la determinación del cortisol, aunque todos ellos, utilizan un procedimiento similar. Las muestras se incuban, en unos tubos de polipropileno con las paredes recubiertas de anticuerpos frente al cortisol, en presencia de cortisol marcado con ^{125}I que compite con el cortisol de la muestra por su unión a estos anticuerpos, el contenido del tubo se elimina por aspiración y se cuenta la radioactividad residual (cortisol marcado con ^{125}I unido a los anticuerpos) que será inversamente proporcional a la cantidad de cortisol presente en la muestra analizada. Otros, utilizan una doble separación en fase líquida en las que un segundo anticuerpo precipita el anticuerpo primario y después de una centrifugación y aspiración del sobrenadante, se cuenta la actividad del trazador o suspensión en fase sólida utilizando partículas recubiertas de anticuerpos específicos.

En general, los radioinmunoensayos directos para la cuantificación del cortisol son precisos, sensibles y presentan una buena correlación con los procedimientos de referencia, cromatografía de gases/espectrometría de masas. De acuerdo con la revisión del College American Pathologist Ligand Assay, la mayoría de los diferentes kits comerciales tienen una imprecisión, expresada como coeficiente de variación, inferior al 10% para un rango de concentraciones de cortisol de entre 280 y 1100 nmol/L.

1.9.2.3 Métodos no isotópicos

La mayoría de los sistemas analíticos para la determinación del cortisol utilizan métodos no isotópicos. Es frecuente que estos métodos utilicen marcadores enzimáticos como la fosfatasa alcalina o la β -galactosidasa, cuya actividad es determinada mediante métodos fotométricos, luminiscencia o quimioluminiscencia. Dependiendo de que requieran fase de lavado o no, se tienden a clasificar en heterogéneos u homogéneos.

1.9.3 Determinación del cortisol libre

El cortisol libre representa la fracción del cortisol biológicamente activa, y es prácticamente independiente de la concentración de proteínas transportadoras. Numerosos métodos han sido utilizados para la determinación del cortisol libre en sangre, pero en su mayoría son procedimientos costosos y muy laboriosos, por lo que en la práctica habitual, se suele recurrir a la estimación del cortisol libre mediante la cuantificación de la excreción urinaria del cortisol libre. Aproximadamente el 2% del cortisol se elimina por la orina, libre, no unido a proteínas, por lo que la estimación del cortisol libre urinario es un procedimiento útil para el de screening de situaciones de hipercortisolismo.

El cortisol libre también puede medirse en la saliva. La concentración del cortisol libre en saliva depende de la concentración de cortisol no unido a proteínas y es independiente del flujo de formación de saliva. La ausencia de interferentes en la saliva (metabolitos del cortisol o cortisol unido a proteínas) hace que no sea necesario realizar extracción previa a la determinación. Las figuras 1.6 y 1.7 representan la correlación entre el cortisol en saliva y suero, la figura 1.6 la relación entre el cortisol en saliva y el cortisol total en suero y a la figura 1.7 la relación entre el cortisol en saliva y el cortisol no unido a proteínas en suero.

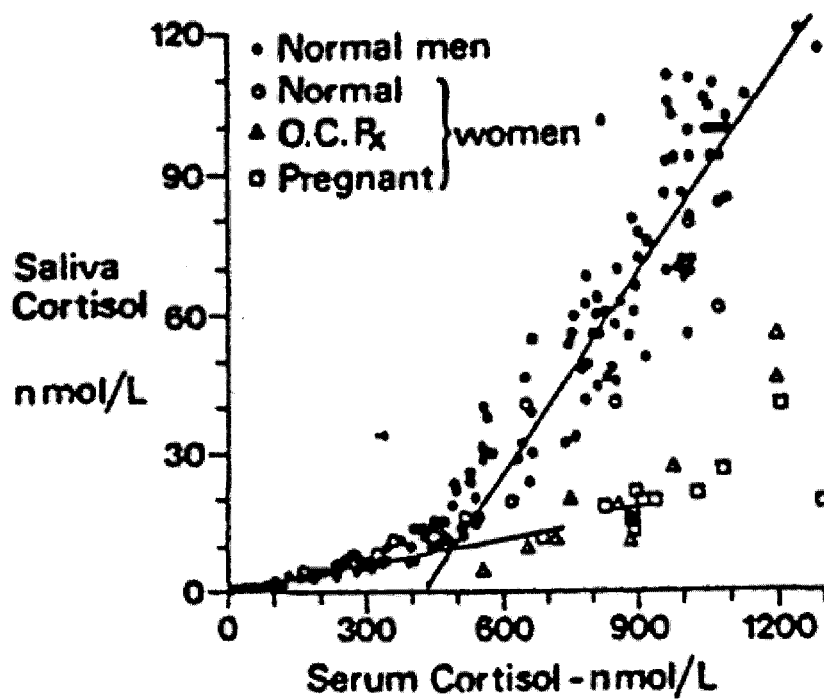


Figura 1.6 Relación del cortisol en saliva y el cortisol total en suero.

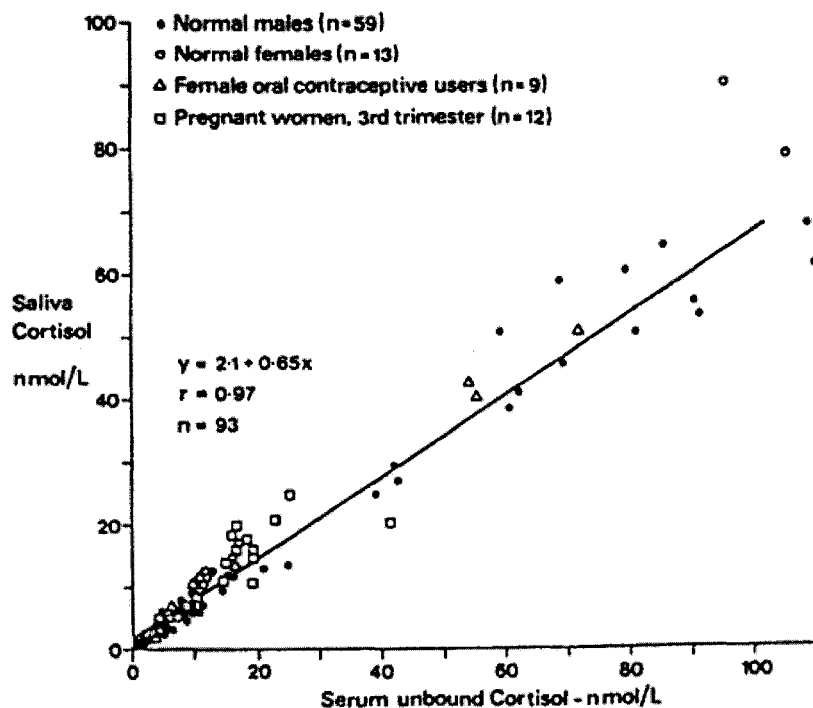


Figura1.7 Relación del cortisol en saliva y el cortisol libre en suero.

La mayoría de los inmunoensayos disponibles para la determinación del cortisol total pueden utilizarse también para la determinación del cortisol libre.

La determinación del cortisol libre en saliva puede realizarse directamente, ya que como decíamos anteriormente, en la saliva no aparecen de forma normal sustancias que puedan interferir en la determinación.

La determinación del cortisol libre en orina requiere una extracción de la muestra previa a la determinación, ya que, en la orina, se encuentran presentes una gran cantidad de interferentes que dan problemas de reactividad cruzada con los anticuerpos utilizados en el ensayo (metabolitos o conjugados del cortisol). La mayoría de las sustancias que interfieren en la determinación del cortisol, son más hidrosolubles que este, por lo que el cortisol libre puede extraerse utilizando disolventes orgánicos como el Diclorometano o el Acetato de Etilo. Normalmente la muestra se mezcla con el solvente orgánico en una proporción de 1:5, y una vez producida la separación de fases, la fase orgánica se lleva a sequedad por evaporación, el residuo se resuspende en un buffer adecuado y la solución resultante se utiliza como muestra en el proceso de determinación. El cálculo de la concentración de cortisol libre se realizará atendiendo a las diluciones realizadas en el proceso de extracción. La extracción con disolventes orgánicos incrementa notablemente la imprecisión de los ensayos, por lo que en estos casos, la utilización de técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución sería una alternativa a tener en cuenta.

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Partiendo de la necesidad de realizar un screening de situaciones de hipercortisolismo en las poblaciones de riesgo y que el hipercortisolismo se encuentra asociado a enfermedades con una elevada prevalencia (diabetes, obesidad, hipertensión, etc.), la cuantificación del cortisol es una determinación analítica muy habitual en la práctica clínica.

Los métodos analíticos que disponemos en la actualidad plantean problemas importantes a la hora de establecer programas de screening en grandes poblaciones de riesgo ya que o no tienen suficiente capacidad de discriminación o cuando la tienen, no son adecuados desde el punto de vista metodológico. Ya que implican la necesidad de ingreso hospitalario del paciente o como poco la recogida de muestras de orina durante 24 horas.

Nuestra hipótesis de trabajo: la utilización de muestras de saliva para identificar situaciones de hipercortisolismo en poblaciones de riesgo es una herramienta útil, fácil de realizar (las muestras las recoge el paciente de forma fácil, en su propio domicilio y pueden ser remitidas para su análisis por correo postal), de bajo coste y con una eficacia diagnóstica comparable a los procedimientos analíticos que actualmente se están utilizando en nuestro medio, y que implican el ingreso hospitalario del paciente de al menos 24 horas, para identificar situaciones de hipercortisolismo.

3 OBJETIVOS

En relación con lo expresado, nos proponemos abordar los siguientes objetivos, enmarcados en el desarrollo y puesta a punto de la determinación del cortisol en saliva para su utilización diagnóstica en el SC.

3.1 Objetivos primarios

1.- Evaluación analítica de la determinación del cortisol en saliva por Electroquimioluminiscencia en un analizador automático E 170 (Roche Diagnostic®).

2.- Caracterización diagnóstica de la determinación del cortisol en saliva en una población ambulatoria expresada como:

- Sensibilidad: Es la proporción de individuos enfermos que tienen prueba positiva, es decir la tasa de verdaderos positivos.
- Especificidad: es la proporción de individuos sanos que tienen prueba negativa, es decir la tasa de verdaderos negativos.
- Valor predictivo positivo: Es la probabilidad de que un individuo con una prueba positiva tenga la enfermedad, es decir enfermos con prueba positiva de entre todos los positivos.
- Valor predictivo negativo: Es la probabilidad de que un individuo con resultado negativo no tenga la enfermedad, es decir sanos con prueba negativa entre todos los negativos.
- Punto de corte: Se trata de establecer la distribución de la sensibilidad y la especificidad de la prueba en relación con distintos puntos de corte. Los distintos puntos de corte de la sensibilidad y la especificidad trazan un polígono cuya área bajo la curva nos da idea de la calidad de la información que proporciona la prueba diagnóstica. Cuanto mayor sea esa área, mejor será la prueba.
- Cociente de probabilidad: El cociente de probabilidad es la razón entre la probabilidad de un resultado en presencia de la enfermedad y la probabilidad de un resultado en ausencia de la enfermedad. Expresa cuántas veces más probable es que se encuentre un resultado en

personas enfermas en comparación con no enfermas. Cuando más se aleja el cociente del valor 1, hacia 0 o infinito, mejor es y más información aporta la prueba. Se utiliza para valorar la calidad de una prueba, y además, para calcular la "*probabilidad a posteriori*" de la enfermedad. Para una misma prevalencia o "*probabilidad a priori*", una prueba diagnóstica con un cociente de probabilidad positivo alto tiende a aumentar la "*probabilidad a posteriori*" de un resultado y viceversa, una prueba diagnóstica con un cociente de probabilidad negativo fuerte tiende a disminuir la "*probabilidad a posteriori*" de un resultado.

3.- Comparar la eficacia diagnóstica la determinación del cortisol en saliva, en una población ambulatoria, frente a los procedimientos analíticos que habitualmente se utilizan para confirmar situaciones de hipercortisolismo en nuestro medio (cortisol libre urinario, cortisol nocturno).

4.- Evaluación de la estabilidad del cortisol en los dispositivos de toma de muestras Salivette®, con el fin de determinar la viabilidad del envío por correo postal de las mismas.

3.2 Objetivos secundarios

1.- Evaluar el rendimiento y el coste económico del algoritmo diagnóstico que actualmente utilizamos en nuestro medio para el diagnóstico sindrómico de hipercortisolismo.

2.- Evaluar el rendimiento y el coste económico del algoritmo diagnóstico incluyendo la determinación del cortisol en saliva.

3.3 El objetivo final

Establecer el algoritmo de decisión para identificar situaciones de hipercortisolismo en poblaciones de riesgo que incluya la determinación del cortisol en saliva, basándonos en criterios estrictos de eficacia diagnóstica y costes.

4 MATERIAL Y MÉTODO

Estudio descriptivo transversal para valoración de una nueva prueba diagnóstica (cortisol en saliva).

4.1 Sujetos de estudio

El grupo de estudio esta formado por 611 pacientes que acudieron a las consultas externas de la Unidad de Gestión de Endocrinología de Hospitales Universitarios Virgen del Rocío con, al menos, tres signos o síntomas clínicos sugestivos de SC (tabla 1.4).

A todos los pacientes con sospecha clínica de SC, se les determinó el CLU para el despigamiento de hipercortisolismo, aquellos que con un resultado alterado ($CLU > 360 \text{ nmol}/24\text{h}$) se les repitió la determinación transcurridos unos días y se les solicito el cortisol en saliva a las 23 h y las 8 h.

Aquellos pacientes con CLU normal se catalogaron como sujetos sanos.

Aquellos pacientes con dos CLU alterados o con cortisol en saliva a las 23 h alterado, se les catalogó como pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo y se les realizó estudio de confirmación mediante prueba de supresión con Dexametasona 1 mg y perdida del ritmo de cortisol mediante la determinación del cortisol plasmático a las 23 h. A estos pacientes, además, se le solicito cortisol en saliva tras frenación con 1 mg de Dexametasona.

Una vez confirmado el hipercortisolismo y dependiendo del caso el diagnostico etiológico se realizó mediante la determinación de la ACTH plasmática, cateterismo de senos petrosos y técnicas de imagen.

4.2 Protocolo

A todos los participantes, previa información, se les practico:

-Historia clínica.

-Recogida de orina de 24 h, para la determinación del cortisol libre urinario.

-Recogida de muestras de saliva para la determinación de cortisol, a las 23 h y a las 8 h.

-Pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo: Extracción de sangre para la determinación del cortisol sérico a las 23 h, a las 8 h y tras frenación con 1 mg de Dexametasona y recogida de saliva para determinación de cortisol a las 23 h, a las 8 h y tras frenación con 1 mg de Dexametasona.

Las muestras se conservaron congeladas a -80°C hasta su análisis.

4.2.1 Variables

Diagnóstico, Edad, Sexo, IMC, Hipertensión (si/no), tratamiento esteroídico (si/no), concentraciones de cortisol obtenidas en diferentes tiempos y diferentes situaciones.

4.2.2 Procedimiento analítico

Para la determinación cuantitativa de cortisol en suero, plasma, orina y saliva utilizamos un inmunoanálisis competitivo de 18 min de duración que incluye una primera fase de separación con micropartículas magnéticas seguidas de una cuantificación por Electroquimioluminiscencia en los analizadores automáticos Elecsys MODULAR ANALITIC E 170 de Roche Diagnostic®, según el siguiente procedimiento:

1.- 20 μL de muestra se incuban, durante 9 min, con un anticuerpo biotinilado específico anti-cortisol y un derivado de cortisol marcado con quelato de rutenio. Los puntos de fijación del anticuerpo marcado son ocupados, según sea la concentración del analito en la muestra, en parte por el analito de la muestra y en parte por el hapteno marcado con rutenio provocando la formación del inmunocomplejo respectivo.

2.- La mezcla anterior se incuba durante 9 min en presencia de micropartículas recubiertas de estreptavidina, que se unen al inmunocomplejo por interacción de la biotina y la estreptavidina.

3.- La mezcla de reacción se traslada a la célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo de arrastre ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una

reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

4.- Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva master incluida en la definición de la técnica.

Para el control de calidad de la técnica analítica se utilizaron materiales de control liofilizados, Liphocheck Quantitative Urine Control (Bio-Rad Laboratorios) y PreciControl Universal (Roche Diagnostic), tratados y analizados de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

4.2.2.1 Determinación del cortisol libre urinario.

Las muestras orina, recogidas durante 24 h, se trataron con Diclorometano según el procedimiento recomendado por el proveedor:

1.- Se mezclan 600 μ L de orina con 3 mL de Diclorometano en un tubo de vidrio durante 7 min.

2.- Separación de las fases orgánicas y acuosas por centrifugación (5 min a 2500 xg).

3.- Retirar y desechar la fase líquida y eventuales residuos.

4.- Traspasar 1.5 mL de la fase orgánica a un tubo de vidrio limpio y llevar a sequedad por evaporación.

5.- Reconstituir el residuo seco con 300 μ L de reactivo Elecsys Diluent Universal e incubar durante 30 min a 15-25 °C mezclando 4 veces durante un minuto en un vortex .

4.2.2.2 Determinación del cortisol en saliva.

Para la recogida de las muestras de saliva se utilizará un dispositivo Salivette®, los especímenes para la determinación del cortisol se obtendrán por centrifugación (2 min a 1000xg) de las muestras de saliva.

4.2.2.3 Determinación del cortisol en sangre.

Las muestras de sangre se obtendrán por venopunción utilizando tubos estándar con gel de separación, Vacuette®. Los especímenes para la

determinación del cortisol se obtendrán por centrifugación (10 min a 3000xg) de las muestras de sangre.

4.3 Evaluación analítica de la determinación del cortisol en saliva en un analizador automático E170

La evaluación analítica de la determinación del cortisol implicó la realización de un estudio de imprecisión, linealidad y comparación.

4.3.1 Imprecisión

La imprecisión intraserie se determinó a tres concentraciones, utilizando muestras de pacientes con valores altos medios y bajos de cortisol en saliva. La imprecisión interserie se obtuvo utilizando materiales de control (PreciControl nivel 1 y nivel 2, Roche Diagnostic) que fueron analizados en un periodo de tres semanas, tres veces cada día utilizando el mismo lote de reactivos y la misma calibración. En ambos casos las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo EP5-A2 de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (130).

4.3.2 Error sistemático

La estimación del error sistemático lo realizamos por dos procedimientos, mediante la prueba de recuperación y estudio de comparación.

4.3.2.1 Prueba de recuperación

Consiste en añadir una concentración conocida de analito a una muestra y medir entonces el analito en la muestra con y sin adición. Se preparó una solución de cortisol con una concentración de 100 nmol/L y una mezcla de saliva. Se separaron 6 alícuotas de 10 mL de la mezcla de saliva y se adicionaron 0.5, 1 y 2 mL de la solución de cortisol a tres de ellas, de acuerdo con la tabla 4.1. Se determinaron las concentraciones de cortisol en las seis alícuotas preparadas por cuatriplicado.

	<i>Alícuota</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>
Mezcla de saliva (mL)	10	10	10	10	10	10	10
Solución cortisol 100 nmol/L (mL)	0,5		1			2	
Agua destilada		0,5		1			2
Concentración añadida cortisol nmol/L	4,76		9,09			16,67	

Tabla 4.1 Evaluación analítica, prueba de recuperación del cortisol en saliva. A1 mezcla de saliva A a la que se le adicionan 0.5 mL de la solución 100 nmol/L de cortisol, A2 mezcla de saliva A a la que se adicionan 0.5 mL de agua destilada. B1 mezcla de saliva A a la que se le adicionan 1 mL de la solución 100 nmol/l de cortisol, B2 mezcla de saliva B a la que se adicionan 1 mL de agua destilada. C1 mezcla de saliva C a la que se le adicionan 2 mL de la solución 100 nmol/l de cortisol, C2 mezcla de saliva C a la que se adicionan 2 mL de agua destilada.

4.3.2.2 Prueba de Comparación

Para el estudio de comparación, 50 muestras de saliva fueron procesadas simultáneamente en el E170 y por un procedimiento de referencia, el RIA.

4.3.2.3 Linealidad

Se estimó para un rango de cortisol de entre 0.5 y 100 nmol/L, Se utilizaron dos mezclas de muestras de saliva, una con concentraciones altas de cortisol próximas a 100 nmol/L y otra con concentraciones bajas, próximas a 0 nmol/L. La mezcla de concentración alta fue diluida con la mezcla de concentración baja hasta porcentajes finales la mezcla alta del 100%, 75%, 50%, 25%, 10% y 0%. La linealidad se determinó por comparación de los resultados de cortisol obtenidos del análisis por duplicado de las muestras y los valores esperados de acuerdo con el protocolo EP6-A de la NCCLS (131).

4.3.2.4 Límite de detección

El límite de detección equivale a la menor concentración medible del analito que puede distinguirse de cero. Teóricamente se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estándar por encima de calibrador mas bajo.

Para el cálculo del límite de detección utilizamos dos procedimientos diferentes:

Se determino el cortisol (21 veces intraciclo) a una muestra de suero salino fisiológico.

Una muestra de saliva con 12 nmol/L de cortisol se diluyó de forma sucesiva a concentraciones de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y se determino por duplicado la concentración de cortisol.

4.4 Validación del procedimiento de recogida de muestras de saliva y posterior envío postal de las mismas

Para la validación del procedimiento de recogida y envío postal de muestras de saliva Salivette®, 100 Controles sanos recogieron cuatro muestras de saliva, dos a las 23 h y otras dos a las 8 h. Una muestra, de las recogidas a las 23 y a las 8 h, se procesó de forma inmediata y las otras dos se almacenaron durante una semana a temperatura ambiente, al cabo de la semana se procesaron según el procedimiento habitual.

4.5 Valores de referencia

Para establecer los valores normales del cortisol en saliva, se estudio un grupo control que incluyó 100 sujetos sanos, seleccionados por un Endocrinólogo colaborador, que no evidenciaban signos ni síntomas de enfermedad de Cushing. Solo se incluyeron aquellos sujetos con niveles normales de tensión arterial, no obesos, no diabéticos, sin tratamiento con fármacos esteroides o consumo reciente de esteroides anticonceptivos y sin historia reciente de enfermedad psiquiátrica mayor.

4.6 Análisis de los costes

Se realizará un análisis de los costes que suponen las pruebas realizadas siguiendo el protocolo que se utiliza actualmente para el diagnostico del SC, frente al coste de las pruebas realizadas siguiendo el protocolo que implica la realización del cortisol en saliva.

Cálculo de la diferencia del sumatorio de costes directos e indirectos de 2 determinaciones de CLU frente a dos de cortisol en saliva remitido por correo postal para el objetivo 2. Cálculo de la diferencia del sumatorio de costes directos e indirectos de ingreso para determinación de cortisol plasmático a las 23 h frente a la de cortisol en saliva remitido por correo para el objetivo 3. Cálculo de la diferencia del sumatorio de costes directos e indirectos del algoritmo diagnóstico que utilizamos en la actualidad (dos determinaciones de CLU elevadas, cortisol plasmático tras supresión con dexametasona y cortisol plasmático nocturno con ingreso hospitalario) frente a cortisol en saliva nocturno y tras frenación con dexametasona extrahospitalario.

Se determinarán como costes directos de las determinaciones de CLU el coste del reactivo y como indirectos la jornada de trabajo perdida para la recogida de la muestra.

Se determinarán como costes directos de las determinaciones cortisol tras frenación con Dexametasona el coste del reactivo y la Dexametasona.

Se determinarán como costes directos de la determinación de cortisol plasmático a las 23 h el coste del reactivo y el del ingreso hospitalario por dos días, y como indirectos, las jornadas de trabajo perdida en su caso.

Se determinarán como costes del cortisol en saliva el del reactivo, el del dispositivo para su recogida y el coste del envío de las muestras por correo postal al laboratorio.

4.7 Análisis Estadístico

Se ha realizado un análisis descriptivo de las variables; media, desviación típica y percentiles para las variables cuantitativas y frecuencias para las variables cualitativas. Se ha llevado a cabo un análisis estadístico bivariado para evaluar las posibles asociaciones entre las distintas variables analizadas. El estudio de linealidad se realizó por regresión lineal (132), la comparación entre métodos se realizó utilizando Regresión Lineal de Passing-Bablok (133) y Análisis de Bland-Altman (134).

Cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, coeficiente de probabilidad y punto de corte.

Los datos se analizaron mediante el programa informático SPSS 10.0, una $p < 0.5$ fue considerada estadísticamente significativa.

5 RESULTADOS

5.1 Evaluación analítica de la determinación del cortisol en saliva

5.1.1 Imprecisión

El error de una medida es la diferencia entre el valor verdadero y el resultado obtenido. Un componente importante de este error, viene determinado por la imprecisión del procedimiento de medida. Esta imprecisión es ocasionada por factores incontrolables de dicho procedimiento que ocasionan errores aleatorios en mediciones repetidas. La dispersión de los resultados obtenidos debe seguir una distribución Gaussiana, cuanto mayor se la dispersión de los valores mayor es la imprecisión del procedimiento. Para la cuantificación de la imprecisión suele usarse la DS de los resultados obtenidos en múltiples repeticiones o también se expresa como la DS relativa a la media, el también llamado coeficiente de variación.

En la tabla 5.1 se presentan los resultados de imprecisión expresadas en términos de DS y CV.

	<i>Bajo</i>	<i>Medio</i>	<i>Alto</i>	<i>C bajo</i>	<i>C alto</i>
Intraserie ^a					
n 21					
Media, Cortisol	4,88	14,9	29,41	3,33	31,28
SD, %Hb A1c	0,25	0,32	0,37	0,22	0,95
CV, %	5,12	2,14	1,26	6,75	3,03
	<i>C bajo</i>		<i>C Alto</i>		
Total imprecisión ^b					
n 45					
Media, Cortisol	2,9		31,24		
SD, %Hb A1c	0,24		1,17		
CV, %	8,33		3,76		

Tabla 5.1. Evaluación analítica, estudio de imprecisión del procedimiento de medida. Resultados de imprecisión intraserie e imprecisión total expresados como coeficiente de variación (CV) y desviación estándar (DS) obtenidos para a) una mezcla de saliva con concentraciones bajas, medias y altas de cortisol y b) controles con concentraciones bajas (C bajo) y altas (C alto) de cortisol.

5.1.2 Error sistemático

El error sistemático es la diferencia entre la media de múltiples mediciones repetidas y el valor verdadero y constituye, junto con el error aleatorio (imprecisión analítica), un componente importante del error de la medida.

El error sistemático puede ser de dos tipos:

Independientes de la muestra: afecta a todas las muestras del mismo tipo y pueden estar asociados a calibraciones incorrectas o al efecto de componentes endógenos habituales en el sistema estudiado (efecto matriz).

Dependientes de la muestra: afecta a unas muestras si y a otras no. Este tipo de error esta causado por componentes endógenos o exógenos presentes en algunas muestras y que afectan a los resultados obtenidos.

Para conocer el error sistemático de un procedimiento de medida es necesario estimar el que es independiente de la muestra. La estimación de este error en nuestro caso, se realizó mediante pruebas de recuperación y de comparación de resultados frente a un procedimiento de referencia el RIA.

5.1.2.1 Prueba de recuperación

Los resultados de la prueba de recuperación se muestran en la tabla 5.2. La recuperación de cortisol de la mezcla A (concentración inicial 15.2 nmo/IL) tras adicionar 4.76 nmol/L de cortisol fue de 4.6, es decir de un 96.6 %. La recuperación de cortisol de la mezcla B (concentración inicial 15.9 nmo/IL) tras adicionar 9.09 nmol/L de cortisol fue de 9.0, es decir de un 99.1 %. La recuperación de cortisol de la mezcla C (concentración inicial 14.8 nmo/IL) tras adicionar 16.67 nmol/L de cortisol fue de 16.2, es decir de un 97.18 %. La media de la recuperación tras la adición de 4.6, 9.09 y 16.67 nmol/L de cortisol fue del 97.6%.

<i>Alícuota</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>
Media de cortisol nmol/L*	19,8	15,2	24,9	15,9	31	14,8
Recuperación de cortisol nmo/L	4,6		9		16,2	
Concentración añadida cortisol nmol/L	4,76		9,09		16,67	
Recuperación de cortisol en %	96,64		99,01		97,18	

* Obtenidos por cuadruplicado

Tabla 5.2. Evaluación analítica, prueba de recuperación Se presenta la recuperación del cortisol (nmo/L) en muestras de saliva. A1 mezcla de saliva A, a la que se le adicionan 0.5 mL de la solución 100 nmol/L de cortisol; A2 mezcla de saliva A, a la que se adicionan 0.5 mL de agua destilada. B1 mezcla de saliva B, a la que se le adicionan 1 mL de la solución 100 nmol/L de cortisol; B2 mezcla de saliva B, a la que se adicionan 1 mL de agua destilada. C1 mezcla de saliva C, a la que se le adicionan 2 mL de la solución 100 nmol/L de cortisol; C2 mezcla de saliva C, a la que se adicionan 2 mL de agua destilada.

5.1.2.2 Prueba de comparación

Para conocer el error sistemático del procedimiento de medida evaluado, se compararon los resultados obtenidos en 50 muestras de saliva analizadas por ECLIA con los resultados obtenidos del análisis de las mismas muestras por RIA. La comparación se realizó de acuerdo con el protocolo EP9-A de la NCCLS (130). Los resultados de la prueba de comparación se resumen en la tabla 5.3.

La media de cortisol obtenida por ECLIA fue de 23.57 nmol/L con una DS de 3.2, un valor mínimo de 0.5 nmol/L, un valor máximo de 83.0 nmol/L y una mediana de 15.1 nmol/L. La media de cortisol obtenida por RIA fue de 23.22 nmol/L con una DS de 3.16, un valor mínimo de 0.45 nmol/L, un valor máximo de 83.50 nmol/L y una mediana de 14.2 nmol/L.

	<i>ECLIA</i>	<i>RIA</i>
N (50)		
Valor mas bajo	0,50	0,45
Valor mas alto	83,00	82,50
Media	23,57	23,22
Mediana	15,10	14,20
DS de la media	3,20	3,16

Tabla 5.3 Evaluación analítica, estudio de comparación. Descriptiva de los resultados de cortisol (nmol/L) obtenidos en las muestras de saliva analizadas por ECLIA y RIA.

El estudio de comparación consistió en la realización de un estudio de regresión lineal de Passing Bablok y una comparación de las diferencias por el procedimiento de Bland y Altman.

El análisis de regresión de Passing Bablok (figura 5.1) mostró los siguientes resultados: Ecuación de regresión $Y = 0,0450 + 1,0119 X$ con una ordenada en el origen de 0,0450 (intervalo de confianza al 95% de -0,0476 a 0,0920), una pendiente de 1,0119 (intervalo de confianza al 95% de 1,0047 a 1,0195) y un coeficiente de correlación altamente significativo ($p < 0.0001$) con una r de 0.9997 (intervalo de confianza al 95% de 0,9995 a 0,9998).

El análisis gráfico de Bland y Altman (figura 5.2) muestra las diferencias obtenidas para cada muestra analizada frente a las medias de los resultados obtenidos por los dos procedimientos que se comparan. La media de las diferencias fue de 0.35 nmol/L con una la DS de +/- 1.96.

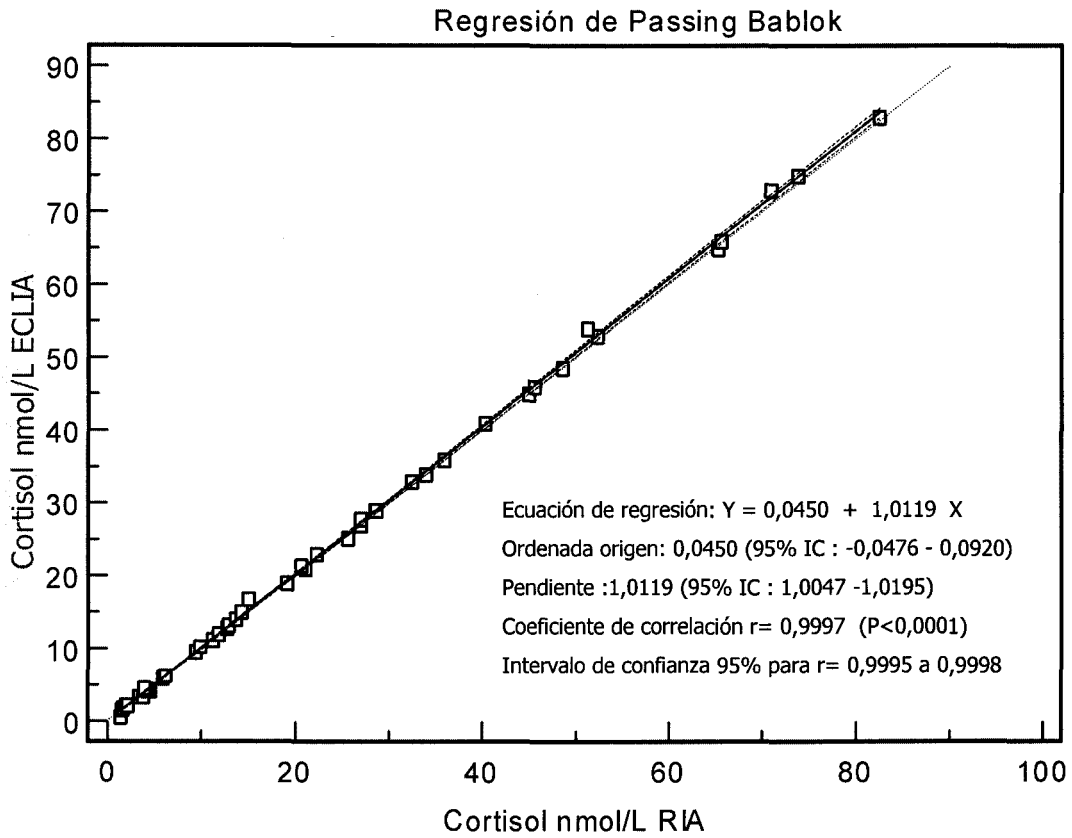


Figura 5.1 Evaluación analítica, Estudio de comparación. Análisis de regresión de Passing y Bablok. Se representa la relación entre los resultados de cortisol en saliva (mmol/L) obtenidos por ECLIA (eje Y) y los obtenidos por RIA (eje X).

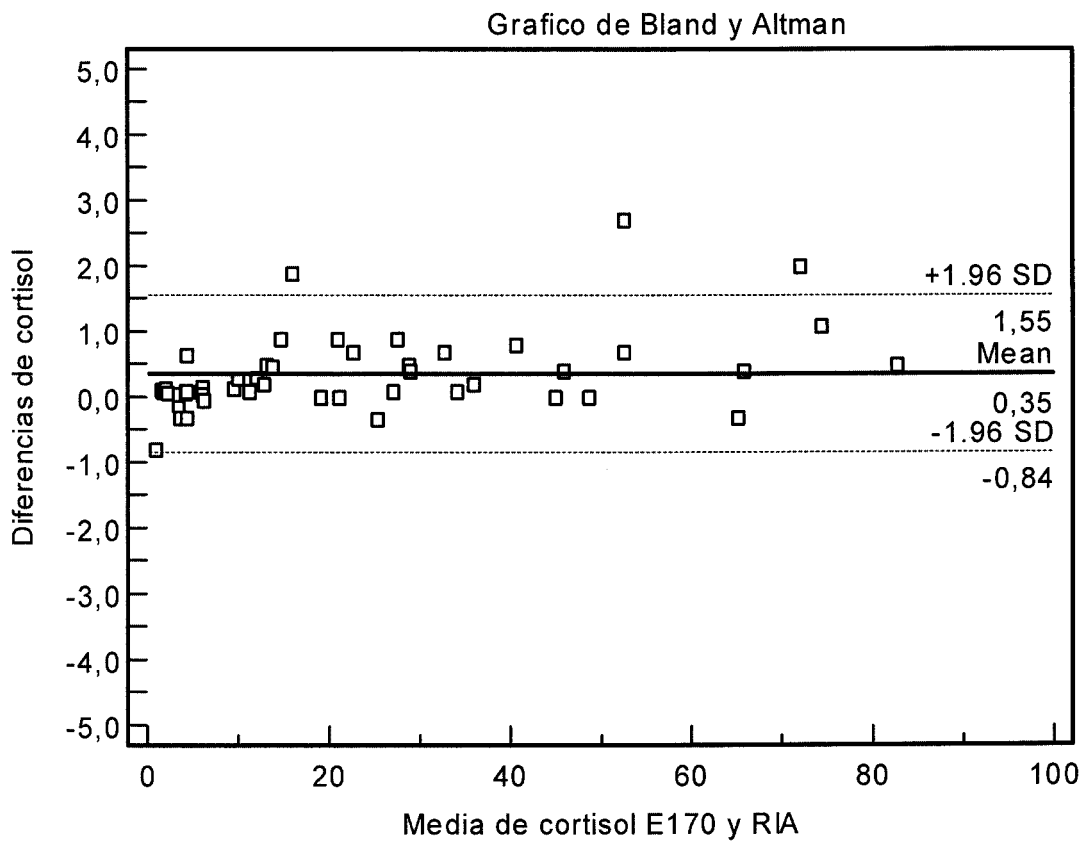


Figura 5.2 Evaluación analítica, estudio de comparación. Grafico de Bland y Altman. Se presentan las diferencias de los resultados de cortisol (nmol/L) obtenidas por ECLIA y RIA (eje Y) frente a las medias de cortisol (nmol/L).

5.1.3 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un ensayo para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en una muestra. Se estudio la linealidad de la determinación del cortisol en saliva en un E170 para un rango de concentraciones comprendidos entre 0.5 y 100 nmol/L. La Linealidad se determinó mediante un análisis de regresión lineal comparando los resultados de cortisol obtenidos del análisis por duplicado de las mezclas de saliva utilizadas [mezcla de saliva 1 (0.5 nmol/L) y mezcla de saliva 2 (100 nmo/L) unidas en proporción de 100%, 75%, 50%, 25%, 10% y 0%]. y los valores esperados de acuerdo con el protocolo EP6-A de la NCCLS (131).El análisis de regresión (figura 5.3) mostró los siguientes resultados: Ecuación de regresión $Y = -0,1052 + 0,9479 X$ con una ordenada en el origen de -0,1052 (intervalo de confianza al 95% de -0,1052 a -0,1052), una pendiente de 0,9479 (intervalo de confianza al 95% de 0,9479 a 0,9479).

5.1.4 Límite de detección

El límite de detección equivale a la menor concentración medible del analito que puede distinguirse de cero.

El límite de detección se obtuvo por dos procedimientos:

Determinación sucesiva de cortisol en muestras de suero salino fisiológico. Se realizaron 21 determinaciones en un mismo ciclo, en todos los casos los resultados de cortisol fueron inferiores a 0.5 nmol/L (media de las concentraciones 0.5 nmol/L).

Determinación del cortisol en una muestra de saliva (12 nmol/L) que se diluye sucesivamente con salino fisiológico al 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Los resultados obtenidos fueron 6.12, 3.4, 1.23, 0.82, 0.5, 0.5, 0.5 nmol/L.

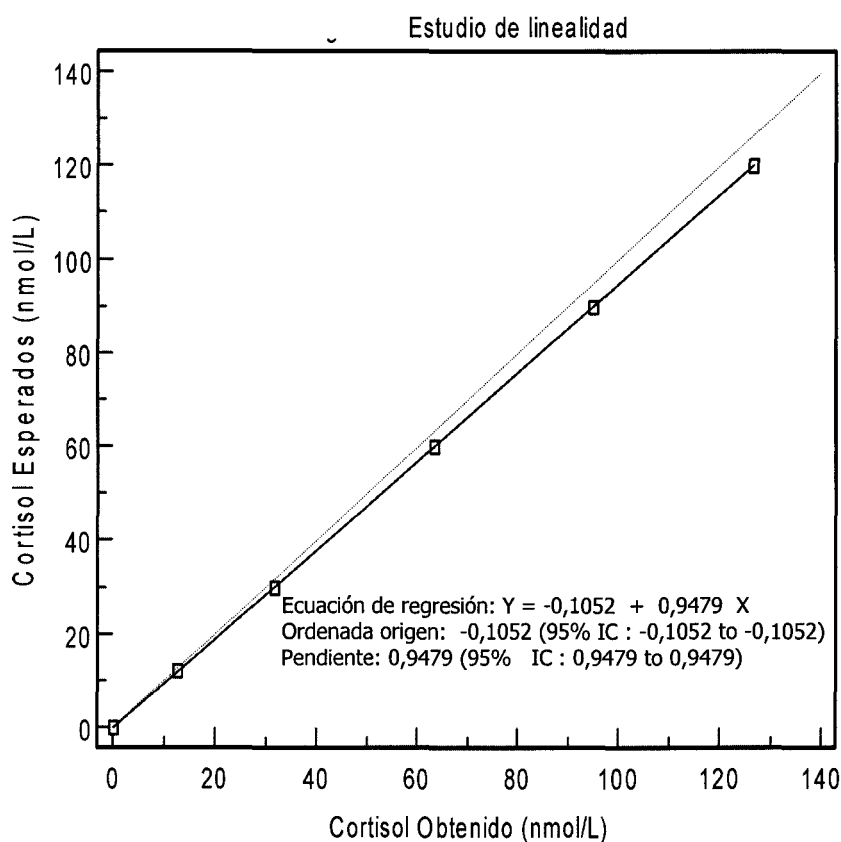


Figura 5.3 Evaluación analítica, estudio de linealidad. Análisis de regresión obtenido tras representar los valores esperados (eje Y) y los obtenidos tras el análisis por duplicado de 6 muestras obtenidas a partir de dos mezclas de saliva con concentraciones de 0.5 y 100 nmol/L unidas en proporciones de 100% de la mezcla 1 y 0% de la mezcla 2, 75% de la mezcla 1 y 25% de la mezcla 2, 50% de la mezcla 1 y 50% de la mezcla 2, 25% de la mezcla 1 y 75% de la mezcla 2, 0% de la mezcla 1 y 100% de la mezcla 2.

5.2 Evaluación de la estabilidad del procedimiento de recogida saliva , Salivette®

Para evaluar la viabilidad de una toma de muestras ambulatoria y envío postal de las mismas, valoramos, durante una semana, la estabilidad del cortisol conservado a temperatura ambiente en los dispositivos de recogida Salivette®. Para ello se compararon resultados de cortisol obtenidos en el momento de la entrega de las muestras en el laboratorio y tras un periodo de conservación de una semana a temperatura ambiente en el mismo dispositivo de recogida. Los resultados de cortisol obtenidos de las muestras de saliva en el momento de la entrega de las muestras en el laboratorio fueron media de cortisol 5.81 nmol/L con unas DS de 0.9669, un valor mínimo de 0.5 nmol/L, un valor máximo de 28.14 nmol/L y una mediana de 5.54 nmol/L. La media de cortisol obtenida tras una semana a temperatura ambiente fue de 5.96 nmol/L con unas DS de 0.8692, un valor mínimo de 0.5 nmol/L, un valor máximo de 21.52 nmol/L y una mediana de 5.60 nmol/L.

	<i>T0</i>	<i>T1</i>
N (50)		
Valor mas bajo	0,50	0,50
Valor mas alto	28,14	21,52
Media	5,81	5,96
Mediana	5,54	5,60
DS	0,9669	0,8692

Tabla 5.4 Evaluación analítica, estudio de estabilidad. Valores de cortisol (nmol/L) obtenidos en el momento de la recogida de la muestra (T0) y tras una semana a temperatura ambiente (T1).

Para evaluar la existencia de diferencias entre los resultados obtenidos en el momento de la entrega de la muestra y tras una semana de incubación a temperatura ambiente realizamos un análisis de regresión lineal de Passing Bablok y un análisis gráfico de Bland y Altman.

El análisis de Regresión de Passing Bablok (figura 5.4) mostró los siguientes resultados. Ecuación de regresión $Y = -0,0173 + 1,0345 X$ con una ordenada en el origen de $-0,0173$ (intervalo de confianza al 95% de $-0.3221 - 0.3722$), una pendiente de 1.0345 (intervalo de confianza al 95% de $0.9404 - 1.1746$) y un coeficiente de correlación altamente significativo ($p < 0.0001$) con una r de $0,9627$ (intervalo de confianza al 95% de $0,9283 - 0,9808$).

Para evaluar la existencia de diferencias entre los resultados obtenidos en el momento de la entrega de la muestra y tras una semana a temperatura ambiente se realizó un análisis gráfico de Bland y Altman (figura 5.5) en el que se muestran las diferencias obtenidas para cada muestra analizada frente a las medias de los resultados obtenidos por los dos procedimientos que se comparan. La media de las diferencias fue de -0.1 nmol/L con una la DS de ± 1.96 .

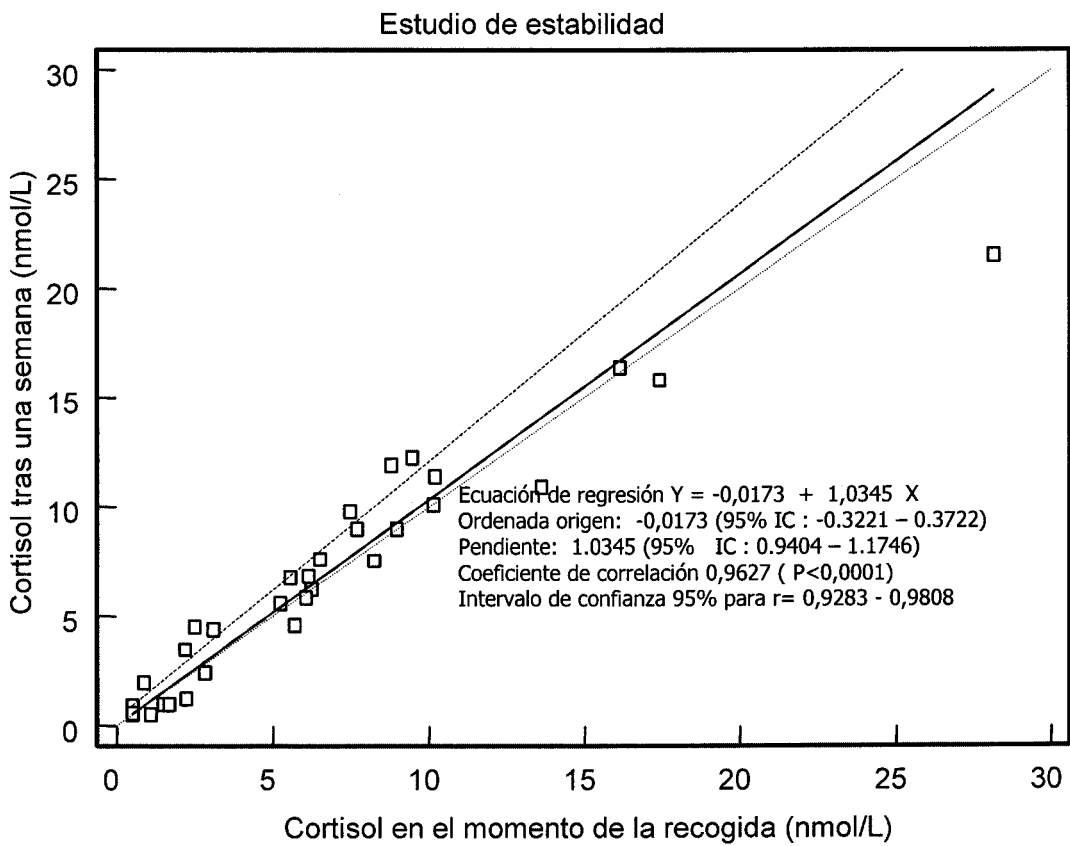


Figura 5.4 Evaluación analítica, estudio de estabilidad. Análisis de regresión de Passing y Bablok. Se representa la relación entre los resultados de cortisol en saliva (mmol/L) obtenidos en el momento de la entrega de la muestra (eje x) frente a los obtenidos tras una semana a temperatura ambiente (eje y).

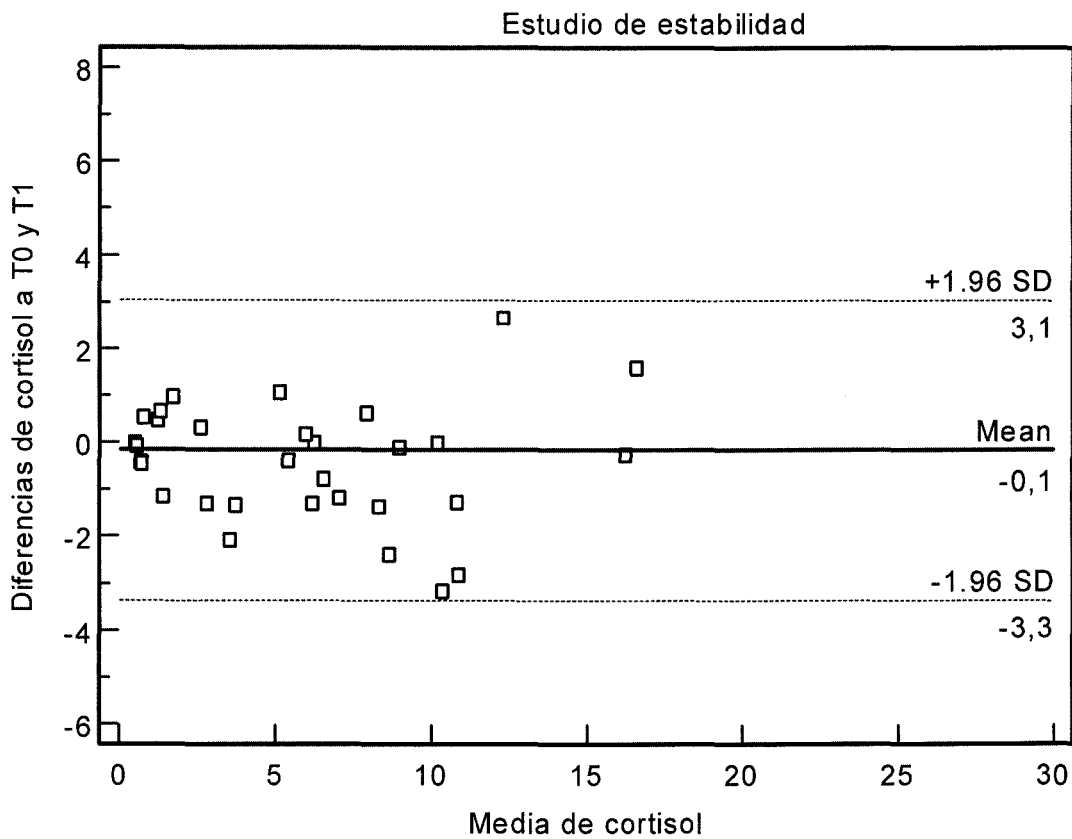


Figura 5.5 Evaluación analítica, estudio de estabilidad. Grafico de Bland y Altman. Se presentan las diferencias de los resultados de cortisol (nmol/L) obtenidas en el momento de la entrega de la muestra y tras una semana a temperatura ambiente (eje Y) frente a las medias de cortisol (nmol/L).

5.3 Valores de referencia de cortisol en saliva

Para establecer los valores normales del cortisol en saliva, se estudio un grupo control que incluyó 100 sujetos sanos, seleccionados por un Endocrinólogo colaborador, que no evidenciaban signos ni síntomas de enfermedad de Cushing. Solo se incluyeron aquellos sujetos con niveles normales de tensión arterial, no obesos, no diabéticos, sin tratamiento con fármacos esteroides o consumo reciente de esteroides anticonceptivos y sin historia reciente de enfermedad psiquiátrica mayor.

La distribución por sexos fue: hombres 28%, mujeres 72 % (tabla 5.5), con una media de edad de 30 años +/- 0.9 para el grupo de los hombres y de 42 años +/- 1.6 para el grupo de las mujeres (tabla 5.6) y un IMC de 26 +/- 0.4 para los hombres y de 24 +/- 0.3 para las mujeres (tabla 5.7).

Distribución por sexos grupo control.

	Frecuencia	Porcentaje
H	28	28,0
M	72	72,0
Total	100	100,0

Tabla 5.5 Grupo control. Distribución de sexos H= Hombre, M= Mujer.

Distribución por edades grupo control.

S		Estadístico	Error típ.
Edad H	Media	30,2857	,91844
	Mediana	28,0000	
	Mínimo	25,00	
	Máximo	39,00	
M	Media	42,7778	1,61640
	Mediana	36,0000	
	Mínimo	24,00	
	Máximo	69,00	

Tabla 5.6 Grupo control. Media, mediana, valor mínimo y máximo de las edades de los sujetos incluidos en el grupo control. H= Hombre, M= Mujer.

Distribución IMC grupo control.

Sexo			Estadístico	Error típ.
IMC	H	Media	26,1527	,42446
		Mediana	27,0000	
		Mínimo	22,09	
		Máximo	29,67	
M	M	Media	24,2757	,30984
		Mediana	23,7197	
		Mínimo	19,81	
		Máximo	28,60	

Tabla 5.7 Grupo control. Media, mediana, valor mínimo y máximo del IMC de los sujetos incluidos en el grupo control. H= Hombre, M= Mujer.

A todos los sujetos del grupo control se les determinó el cortisol a las 23 h y a las 8 h. La descriptiva de los resultados se expresan como media, DS, valor máximo, valor mínimo (tabla 5.8) y los percentiles 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95 y 97.5 (tabla 5.9). Para el cortisol a las 23 h, media 2.52 nmol/L y una DS de 0.194, un valor máximo de 6.24 nmol/L, un valor mínimo de 0.5 nmol/L, los percentiles 5, 50 y 95 fueron de 0.5, 2.1 y 5.82 nmol/L respectivamente. Para el cortisol a las 8 h, media 15.35 nmol/L y una DS de 0.97 un valor máximo de 44.5 nmol/L, un valor mínimo de 5.54 nmol/L, los percentiles 5, 50 y 95 fueron de 5.6, 12.2 y 33.86 nmol/L respectivamente.

Estadística descriptiva grupo control.

		Estadístico	Error típ.
CS23	Media	2,5084	,19468
	Mínimo	,50	
	Máximo	6,24	
CS8	Media	15,3591	,97137
	Mínimo	5,54	
	Máximo	44,50	

Tabla 5.8 Grupo control. Estadística descriptiva media, DS, valor mínimo y valor máximo del cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y cortisol en saliva a las 8 h (CS8).

Estadísticos descriptiva grupo control.

		CS23	CS8
N	Válidos	100	100
Percentiles	2,5	,5000	5,5400
	5	,5000	5,6180
	10	,5000	6,2000
	25	,5000	8,6000
	50	2,1600	12,2000
	75	4,1700	20,9000
	90	5,2300	26,5000
	95	5,6000	33,8660
	97,5	6,2400	44,5000

Tabla 5.9 Grupo control. Estadística descriptiva percentiles 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95 y 97,5 del cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y cortisol en saliva a las 8 h (CS8).

Para establecer los valores de referencia del cortisol en saliva a las 23 h y las 8 h, analizamos la distribución de los resultados. La aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov (tabla 5.10) mostró una p altamente significativa que indica que los resultados no siguen una distribución normal, lo que hace que, siguiendo las recomendaciones del IFCC, para el cálculo de los valores de normalidad utilizaremos un método no paramétrico basado en el cálculo de los percentiles y que implica la transformación logarítmica de los resultados. Para un intervalo de valores de referencia que incluya el 95% de la población obtenemos un intervalo de referencia de CS23 entre 0.28 nmol/L (intervalo de confianza al 90% de 0.2166 a 0.3651 nmol/L) y 6.00 (intervalo de confianza al 90% de 3.68 y 5.14 nmol/L). Para un intervalo de valores de referencia que incluya el 95% de la población obtenemos un intervalo de referencia de CS8 entre 4.35 nmol/L (intervalo de confianza al 90% de 3.68 a 5.14 nmol/L) y 39.29 (intervalo de confianza al 90% de 33.24 y 46.44 nmol/L)

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CS23	,169	92	,000	,882	92	,000
CS8	,190	92	,000	,846	92	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 5.10 Grupo control. Prueba de distribución (Kolmogorov-Smirnov) de los resultados cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y cortisol en saliva a las 8 h (CS8) de los sujetos incluidos en el grupo control.

Las frecuencias obtenidas para las dos variables analizadas cortisol en saliva a las 23 h y cortisol en saliva 8 h, se muestran en la figura 5.5 (A cortisol saliva 23 horas; B cortisol saliva 8 horas).

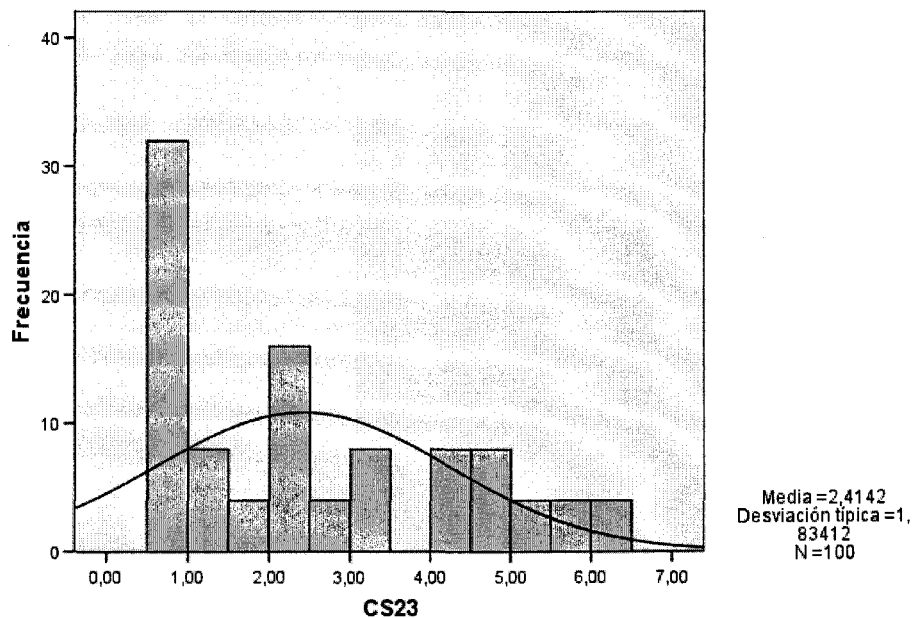


Figura 5.5A Grupo control. Frecuencias obtenidas para el cortisol en saliva a las 23 h (CS23). Se representa los resultados obtenidos (eje x) frente a las frecuencias observadas (eje y).

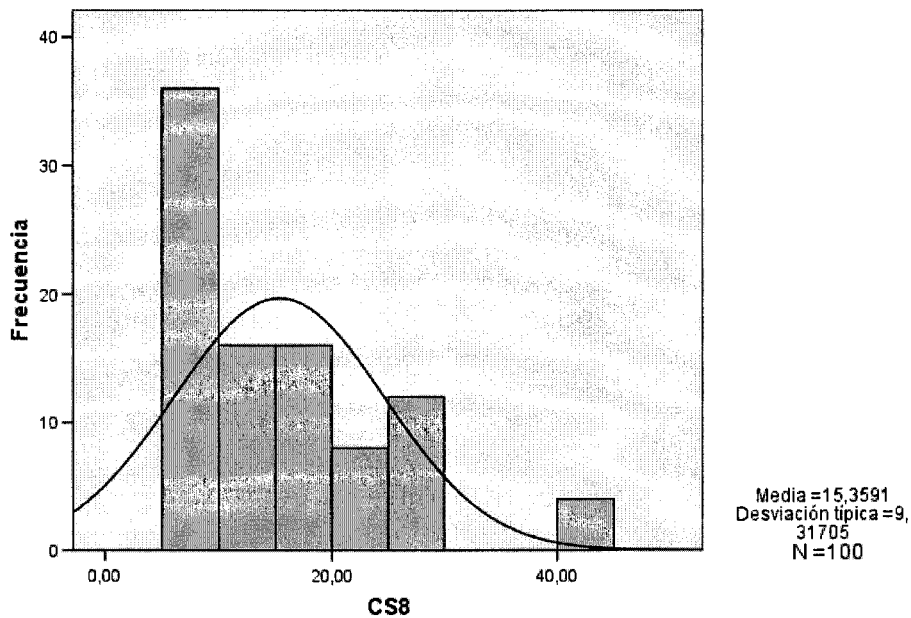


Figura 5.5B Grupo control. Frecuencias obtenidas para el cortisol en saliva a las 8 h (CS8). Se representa los resultados obtenidos (eje x) frente a las frecuencias observadas (eje y).

Para detectar la existencias de diferencias entre los valores cortisol en saliva en función del sexo de los controles realizamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney (tabla 5.10). No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.5$) entre los valores de cortisol en saliva obtenidos a las 23 horas y las 8 horas en función del sexo de los controles.

Estadísticos de contraste

	CS23	CS8
U de Mann-Whitney	864,000	880,000
W de Wilcoxon	3492,000	2960,000
Z	-1,118	-,136
Sig. asintót. (bilateral)	,263	,892

a. Variable de agrupación: Sexo

Tabla 5.10 Grupo control. Estadístico de contraste no paramétrico U de Mann-Whitney. Se descarta la existencia de diferencias significativas en los resultados del cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y a las 8 h (CS8) en función del sexo.

Para detectar la existencia de relaciones entre los valores de cortisol en saliva a las 23 h y a las 8h, la edad y el IMC de los sujetos del grupo control realizamos un análisis de regresión lineal (tablas 5.11 Y 5.12) y un estudio de correlación mediante el test no paramétrico de Spearman (tabla 5.13). No encontramos relación significativa entre el cortisol en saliva a las 23 y a las 8 h, la edad y el IMC solo encontramos una relación significativa entre el cortisol en saliva a las 23 h y a las 8 h (coeficiente de correlación de Spearman 0.260, P 0.012).

Relación Cortisol saliva edad.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	32,401	2,013		16,098	,000
CS23	2,849	,665	,397	4,284	,156

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	39,006	2,689		14,505	,000
CS8	-,009	,150	-,006	-,059	,953

a. Variable dependiente: Edad

Tabla 5.11 Grupo control. Resultados del estudio de regresión lineal entre el cortisol en saliva a las 23 h (CS23), a las 8 h (CS8) y la edad de los sujetos incluidos en el grupo control. No muestra una relación significativa entre el CS23 o CS8 y la edad.

Relación Cortisol saliva IMC

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	24,189	,436		55,515	,000
CS23	,254	,144	,175	1,761	,181

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	24,301	,547		44,463	,000
CS8	,042	,030	,143	1,369	,174

a. Variable dependiente: IMC

Tabla 5.12 Grupo control. Resultados del estudio de regresión lineal entre el cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y a las 8 h (CS8) e IMC de los sujetos incluidos en el grupo control. No muestra una relación significativa entre el CS23 o el CS8 e IMC.

Correlaciones

			CS23	IMC	CS8	Edad
Rho de Spearman	CS23	Coefficiente de correlación	1,000	,142	,260*	,233
		Sig. (bilateral)	.	,158	,012	,120
		N	100	100	92	100
	IMC	Coefficiente de correlación	,142	1,000	,243	,280**
		Sig. (bilateral)	,158	.	,320	,005
		N	100	100	92	100
	CS8	Coefficiente de correlación	,260*	,243	1,000	,122
		Sig. (bilateral)	,012	,320	.	,248
		N	100	100	100	100
	Edad	Coefficiente de correlación	,233	,280**	,122	1,000
		Sig. (bilateral)	,120	,005	,248	.
		N	100	100	100	100

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

**.. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 5.13 Grupo control Resultados del estudio de correlación entre el cortisol en saliva a las 23 h (CS23) y a las 8 h (CS8), edad e IMC de los sujetos incluidos en el grupo control. Muestra una correlación significativa entre el CS23 y el CS8 (coeficiente de correlación de Spearman 0.260).

5.4 Validación Clínica de la determinación del cortisol en saliva

5.4.1 Características generales del grupo estudiado.

El grupo de estudio esta formado por 611 pacientes que acudieron a las consultas externas de la Unidad de Gestión de Endocrinología de Hospitales Universitarios Virgen del Rocío con al menos tres signos o síntomas clínicos sugestivos de SC (tabla 1.3), 423 mujeres (30.8%) y 188 hombres (17.4%) con una media de edad de 44 +/- 0.91 años las mujeres y 50 +/- 1.35 años los hombres (tablas 5.14 y 5.15) .

Distribución por sexos.

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Hombre	188	30.8
	Mujer	423	69.2
	Total	611	100

Tabla 5.14 Características generales del grupo estudiado. Distribución de pacientes por sexo.

Distribución por edades.

sexo		Estadístico	Error tip.
Edad	Hombre Media	50,7249	1,35863
	Mediana	51,3959	
	Mínimo	9,22	
	Máximo	106,06	
Mujer	Media	44,9373	,91180
		44,1757	
	Mediana	42,4082	
	Mínimo	11,27	
	Máximo	107,06	

Tabla 5.15 Características generales del grupo estudiado. Distribución de pacientes por edad.

5.4.2 Screenig de hipercortisolismo

A todos los pacientes con sospecha clínica de SC, se les determinó el CLU para el despigaje de hipercortisolismo, aquellos pacientes que dieron un resultado alterado ($CLU > 360 \text{ nmol/24h}$) se les repitió la determinación transcurridos unos días, se les determinó el cortisol en saliva a las 23 horas y las 8 horas y se les catalogó como pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Aquellos con CLU normal se catalogaron como sujetos sanos. Aquellos pacientes con dos CLU alterados o con cortisol en saliva alterado (cortisol en saliva 23 h $> 10 \text{ nmo/L}$), se les programó ingreso hospitalario para estudio de confirmación de hipercortisolismo.

5.4.2.1 Sujetos sanos

Dentro de este grupo se incluyeron todos aquellos pacientes (536) con sospecha clínica de hipercortisolismo y con CLU dentro del rango de normalidad ($< 360 \text{ nmol/24h}$). De los 536 pacientes 366 (68.3 %) fueron mujeres y 170 hombres (31.7%), la media de edad de las mujeres fue de 45 ± 0.97 años y la de los hombres de 51 ± 1.43 años (tablas 5.16 y 5.17).

Distribución por sexo.

	Frecuencia	Porcentaje
Válidos Hombre	170	31,7
Mujer	366	68,3
Total	536	100,0

Tabla 5.16 Características generales de los sujetos sanos. Distribución por sexo.

Distribución por edades.

			Estadístico	Error típ.
Edad	Hombre	Media	51,6624	1,43175
		Mediana	53,9438	
		Mínimo	9,22	
		Máximo	106,06	
	Mujer	Media	45,2522	,97008
		Mediana	42,8164	
		Mínimo	5,76	
		Máximo	107,06	

Tabla 5.17 Características generales de los sujetos sanos. Distribución por edad.

A todos los sujetos se les determino el CLU. La descriptiva de los resultados se expresan como media, DS, valor máximo y valor mínimo (tabla 5.18) y los percentiles 5, 10, 25, 50, 75, 90 y 95 (tabla 5.19). En las mujeres media 125 nmol/24h y una DS de 3.8, un valor máximo de 338 nmol/ 24 h, un valor mínimo de 25 nmol/24h, los percentiles 5, 50 y 95 fueron de 10, 126 y 257 nmol/24h respectivamente. En los hombres, media 127.7 nmol/24h y una DS de 5.8 un valor máximo de 356 nmol/24h, un valor mínimo de 5.54 nmol/24h, los percentiles 5, 50 y 95 fueron de 13.2, 125 y 268 nmol/24h respectivamente.

Estadística descriptiva sujetos sanos.

Sexo			Estadístico	Error típ.
CLU	Hombre	Media	127,7235	5,86572
		Mínimo	15,00	
		Máximo	356,00	
	Mujer	Media	125,0219	3,80024
		Mínimo	25,00	
		Máximo	338,00	

Tabla 5.18 Resultados CLU en sujetos sanos. Estadística descriptiva, media, DS, valor mínimo y valor máximo.

Estadística descriptiva sujetos sanos.

Sexo	Percentiles						
	5	10	25	50	75	90	95
CLU Hombre	13,2000	19,0000	63,7500	125,5000	173,2500	222,7000	269,0000
CLU Mujer	10,0000	20,0000	70,2500	126,0000	166,0000	216,0000	257,6500

Tabla 5.19 Resultados CLU en sujetos sanos. Estadística descriptiva, percentiles 5, 10, 25, 50, 75, 90 y 95 .

Las frecuencias obtenidas para el CLU en los sujetos sanos se muestra en la figura 5.6 (A CLU Mujeres ; B CLU Hombres).

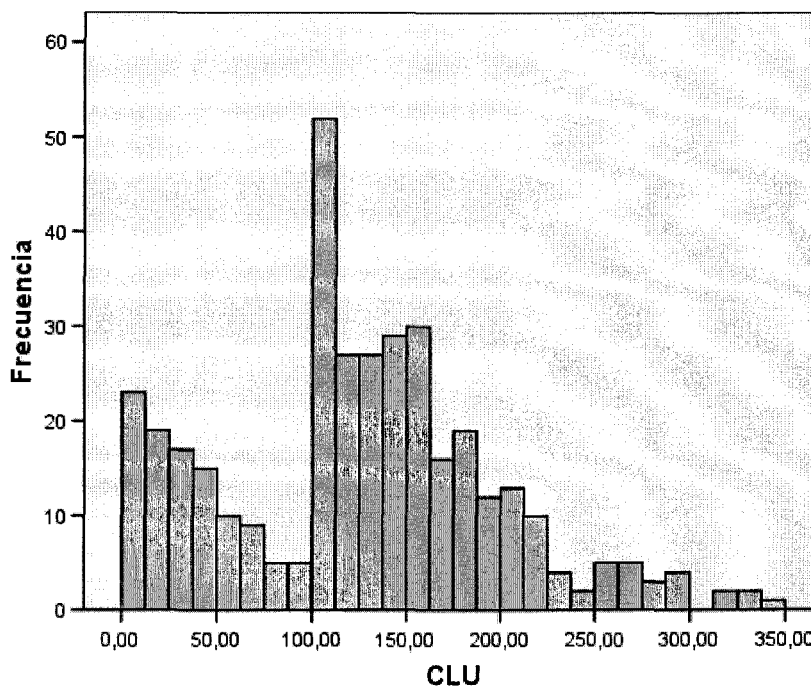


Figura 5.6A Resultados CLU sujetos sanos. Frecuencias obtenidas para el CLU en las mujeres. Se representa los resultados obtenidos (eje x) frente a las frecuencias observadas (eje y).

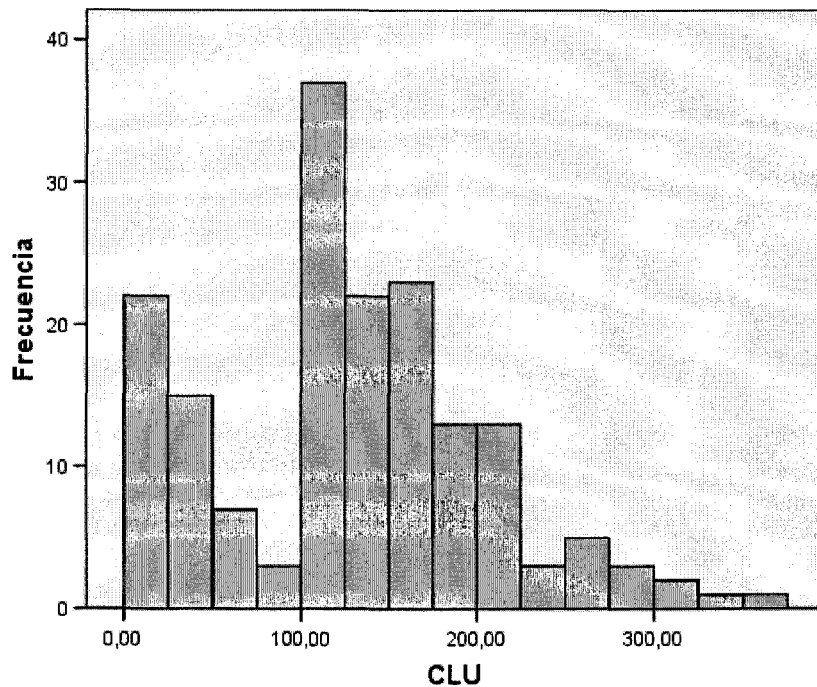


Figura 5.6B Resultados CLU sujetos sanos. Frecuencias obtenidas para el CLU en los hombres. Se representa los resultados obtenidos (eje x) frente a las frecuencias observadas (eje y).

Para detectar la existencias de diferencias entre los valores de CLU en función del sexo de los sujetos realizamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney (tabla 5.20). No encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.5$) entre los valores de CLU en función del sexo de los sujetos incluidos en este grupo

Estadísticos de contraste.

	CLU
U de Mann-Whitney	30512,500
W de Wilcoxon	97673,500
Z	-,358
Sig. asintót. (bilateral)	,720

a. Variable de agrupación: Sexo

Tabla 5.20 Resultados CLU sujetos sanos. Estadístico de contraste no paramétrico U de Mann-Whitney. Se descarta la existencia de diferencias significativas en los resultados del CLU en función del sexo los sujetos incluidos en este grupo, $p > 0.5$.

Para detectar la existencia de relaciones entre los valores de CLU y la edad de los sujetos incluidos en este grupo realizamos un análisis de regresión lineal (tablas 5.21) y un estudio de correlación mediante el test no paramétrico de Spearman (tabla 5.22). No encontramos relación significativa entre el CLU y la edad (coeficiente de correlación de Spearman 0.046, P 0.2).

Regresión lineal CLU edad

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	48,490	1,607		30,169	,000
	CLU	-,010	,011	-,038	-,869	,385

a. Variable dependiente: Edad

Tabla 5.21 Sujetos sanos. Regresión lineal entre el CLU y la edad. No muestra una relación significativa.

Correlaciones CLU edad.

			CLU	Edad
Rho de Spearman	CLU	Coeficiente de correlación	1,000	-,046
		Sig. (bilateral)	.	,289
		N	536	536
	Edad	Coeficiente de correlación	-,046	1,000
		Sig. (bilateral)	,289	.
		N	536	536

Tabla 5.22 Sujetos sanos. Resultados del estudio de correlación entre el CLU y la edad. No muestra relación significativa (coeficiente de correlación de Spearman 0.046, no significativo).

5.4.2.2 Pacientes sospecha analítica de hipercortisolismo

Se incluyeron dentro de este grupo 77 pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo, es decir, pacientes con sospecha clínica de hipercortisolismo con CLU alterado ($CLU_{x2} > 360\text{nmol}/24\text{h}$) o cortisol es saliva alterado ($CS_{23} > 10\text{nmol}/\text{L}$). A todos estos pacientes se les determinó cortisol en plasma y en saliva tras supresión con Dexametasona y se les programó ingreso hospitalario para confirmar la sospecha hipercortisolismo. El grupo incluía 58 mujeres (75.3%) y 19 hombres (24.7%) (tabla 5.23). La media de edad de las mujeres fue de 42 ± 2.6 años y en los hombres de 41 ± 3.6 años (tabla 5.24).

Distribución por sexos.

	Frecuencia	Porcentaje
Hombre	19	24,7
Mujer	58	75,3
Total	77	100,0

Tabla 5.23 Características generales de los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Distribución por sexo.

Distribución edad.

Sexo	N	Media	Error típ. de la media
Hombre	19	41,3727	3,63677
Mujer	58	42,2746	2,68176
Total	77	42,0521	2,19951

Tabla 5.24 Características generales de los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Distribución por edad.

Atendiendo a su IMC, calculado como peso Kg/talla² (m), los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo se clasificaron como normopeso (IMC < 29.9), sobrepeso (IMC >30 y <34.9) y obesidad (IMC >35). La distribución de los pacientes en función de su IMC fue de normopeso 40 (51.9%), sobrepeso 17 (22.07%) y obesos 20 (25.97%) (tabla 5.25)

Resúmenes de casos

IMC	N	% del total de N
NORMOPESO	40	51.94%
SOBREPESO	17	22.07%
OBESIDAD	20	25.97%
Total	77	100,0%

Tabla 5.25 Características generales de los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Distribución de pacientes en función de su IMC. Normopeso IMC <29.9, sobrepeso IMC >30 y < 34.9 y obesidad IMC > 35.

De los 77 pacientes incluidos en este grupo en 34 casos (45.9%) no se confirmó la sospecha analítica de hipercortisolismo y finalmente fueron clasificados como sanos, 10 casos (13.5%) fueron diagnosticados de pseudo-Cushing, en 30 casos (40.5%) el diagnóstico final fue de síndrome de Cushing y en tres casos no se pudo establecer un diagnóstico final (tabla 5.26).

Resumen diagnósticos.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1,00	30	40,5	40,5	40,5
2,00	10	13,5	13,5	54,1
3,00	34	45,9	45,9	100,0
Total	74	100,0	100,0	

Tabla 5.25 Características generales de los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Distribución de pacientes en función de su diagnóstico final. 1 Síndrome de Cushing, 2 pseudo-Cushing y 3 Sanos.

El origen del síndrome de Cushing fue suprarrenal en 6 casos (26.1%), 4 adenomas (17.4%) y dos hiperplasias suprarrenales bilaterales (8.7%) e hipofisario en 17 casos (73.9%), 16 microadenomas hipofisarios y 1 macroadenoma (4.3%) (tabla 5.26). De los pacientes diagnosticados de SC, el 62.7% eran mujeres con una edad de 40.5 +/- 2.9 años y el 37.3% hombres con una edad de 42.56 +/- 9 años.

Etiología Síndrome de Cushing.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	16	69,6	69,6	69,6
2	1	4,3	4,3	73,9
3	4	17,4	17,4	91,3
4	2	8,7	8,7	100,0
Total	23	100,0	100,0	

Tabla 5.26 Características generales de los pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Distribución de etiología del síndrome de Cushing. 1 microadenoma hipofisario (69.6%), 2 macroadenoma hipofisario (4.3%), 3 Adenoma suprarrenal (17.4%) y 4 hiperplasia suprarrenal bilateral (8.7%).

La descriptiva de los resultados de CLU, cortisol plasmático, cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona, Cortisol en saliva y cortisol en saliva tras supresión con dexametasona para los diferentes grupos diagnósticos se presenta como media y desviación típica (tablas 5.27 y 5.28). CLU: pacientes diagnosticados de SC 1026 +/- 195 nmol/24h, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 358 +/- 38 nmol/24h y pacientes diagnosticados como sanos 281 +/- 56 nmol/24h. Cortisol en saliva 23h: pacientes diagnosticados de SC 18.8 +/- 5.6 nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 7.8 +/- 2.4 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 2.91 +/- 0.27 nmol/L. Cortisol en saliva 8h: pacientes diagnosticados de SC 31 +/- 9.8 nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 14 +/- 3.7 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 11.4 +/- 1.8 nmol/L. Cortisol plasmático 23h: pacientes diagnosticados de SC 396 +/- 40 nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 116 +/- 17 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 99 +/- 7.0 nmol/L. Cortisol plasmático 8h pacientes diagnosticados de SC 805 +/- 39.1

nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 389 +/- 53.7 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 258 +/- 22.9 nmol/L. Cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona pacientes diagnosticados de SC 48 +/- 3.2 nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 13 +/- 1.9 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 4.9 +/- 0.98 nmol/L. Cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona pacientes diagnosticados de SC 336 +/- 19.1 nmol/L, pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing 46 +/- 3.1 nmol/L y pacientes diagnosticados como sanos 31 +/- 1.1 nmol/L.

Descriptiva.

GRUPO		CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
1	Media	1026,4133	18,8001	31,8014	396,3310	805,6280
	Error típ. de la media	195,19427	5,62925	9,85497	40,86077	39,19514
2	Media	358,8571	7,8464	14,3600	116,6267	389,1000
	Error típ. de la media	38,37194	2,42433	3,73344	17,84345	53,79556
3	Media	281,3333	2,9156	11,4919	99,0000	258,100
	Error típ. de la media	56,61934	,27230	1,89658	7,00000	22,9000

Tabla 5.27 Pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Descriptiva, expresada como media y desviación típica, de los resultados de CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23), cortisol en saliva 8h (CS_8), cortisol plasmático a las 23h (CP_23) y cortisol plasmático a las 8h (CP_8) en función del diagnóstico final. 1 Síndrome de Cushing, 2 pseudo-Cushing 3 pacientes sanos.

Resúmenes de casos

GRUPO		CS1M	CP1M
1	Media	48,2120	336,6000
	Error típ. de la media	3,231962	19,14729
2	Media	13,0640	46,5167
	Error típ. de la media	1,95948	3,10826
3	Media	4,9618	31,3667
	Error típ. de la media	,98354	1,12959

Tabla 5.28 Pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Descriptiva, expresada como media y desviación típica, de los resultados de cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona (CS1M) y cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona (CP1M) en función del diagnóstico final 1 Síndrome de Cushing, 2 pseudo-Cushing 3 pacientes sanos.

Para estudiar la existencia de diferencias entre los resultados de las distintas determinaciones de cortisol en función del diagnóstico final, realizamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (tabla 5.29). En todos los casos analizados CLU, cortisol en saliva 23h, cortisol en saliva 8h, cortisol plasmático a las 23h, cortisol plasmático a las 8h, cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona y cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos síndrome de Cushing, pseudo-Cushing y sujetos sanos.

Estadísticos de contraste

	CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
Chi-cuadrado	13,522	53,027	6,627	18,617	2,646
gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,001	,000	,036	,000	,026

a. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5.29 Pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Estadístico de contraste no paramétrico Kruskal-Wallis. Muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados de CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23), cortisol en saliva 8h (CS_8), cortisol plasmático a las 23h (CP_23) y cortisol plasmático a las 8h (CP_8) en función del diagnóstico final ($p < 0.5$).

Estadísticos de contraste

	CP1M	CS1M
Chi-cuadrado	8,131	8,531
gl	2	2
Sig. asintót.	,017	,014

a. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5.30 Pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo. Estadístico de contraste no paramétrico Kruskal-Wallis. Muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados de cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona (CS1M) y cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona (CP1M) en función del diagnóstico final ($p < 0.5$).

Para evaluar la existencia de diferencias significativas en función de la etiología, en los pacientes diagnosticados de Síndrome de Cushing, realizamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en razón de su etiología para el cortisol en saliva 23h, cortisol en saliva 8h, cortisol plasmático a las 23h, cortisol plasmático a las 8h y no encontramos diferencias para el CLU y cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona y cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona (Tablas 5.31 y 5.32)

Estadísticos de contraste

	CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
Chi-cuadrado	3,731	10,826	6,232	12,377	10,493
gl	3	3	3	2	3
Sig. asintót.	,292	,013	,101	,002	,015

a. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5.31 Pacientes diagnosticados de SC. Estadístico de contraste no paramétrico Kruskal-Wallis. Muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados de cortisol en saliva 23h (CS_23), cortisol en saliva 8h (CS_8), cortisol plasmático a las 23h (CP_23) y cortisol plasmático a las 8h (CP_8) en función de la etiología de síndrome de Cushing ($p < 0.5$).

Estadísticos de contraste

	CP_1M	CS_1M
Chi-cuadrado	1,350	3,055
gl	1	2
Sig. asintót.	,245	,217

a. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5.32 Pacientes diagnosticados de SC. Estadístico de contraste no paramétrico Kruskal-Wallis. No muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados cortisol en saliva tras supresión con Dexametasona (CS_1M) y cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona (CP_1M) en función de la etiología de síndrome de Cushing ($p > 0.5$).

En los pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing, encontramos una relación significativa entre los resultados alcanzados el IMC y la existencia o ausencia de hipertensión. La descriptiva de los resultados se expresa con media +/- DS (tablas 5.33 y 5.34). CLU: pacientes normopeso (IMC < 29.9) 242 +/- 36 nmol/24h, pacientes con sobrepeso (IMC >30 y <34.9) 257 +/- 75 nmol/24h y pacientes obesos (IMC >35) 445.2 +/- 68 nmol/24h, hipertensos 391 +/- 45.8 nmol/24h y no hipertensos 263 +/- 42 nmol/24h. Cortisol en saliva 23 h: pacientes normopeso 3.28 +/- 0.48 nmol/L, pacientes con sobrepeso 3.43 +/- 0.52 nmol/L y pacientes obesos 5.68 +/- 0.59 hipertensos 4.94 +/- 0.99 nmol/L , no hipertensos 4.57 +/- 0.59 nmol/L. Cortisol en saliva 8 h: pacientes normopeso 11.45 +/- 1.7 nmol/L, pacientes con sobrepeso 12.5 +/- 3.4 nmol/L y pacientes obesos 14.2 +/- 1.7, hipertensos 12.9 +/- 1.38 nmol/L , no hipertensos 11.08 +/- 1.8 nmol/L. Cortisol plasmático 23 h: pacientes normopeso 35.66 +/- 7.4 nmol/L, pacientes con sobrepeso 84.2 +/- 19 nmol/L y pacientes obesos 156 +/- 32 nmol/L, hipertensos 103.48 +/- 21.95 nmol/L , no hipertensos 96.9 +/- 13.4 nmol/L. Cortisol plasmático 8 h: pacientes normopeso 258 +/- 8.4 nmol/L, pacientes con sobrepeso 408.4 +/- 40 nmol/L y pacientes obesos 412 +/- 50 nmol/L, hipertensos 492 +/- 86 nmol/L , no hipertensos 427 +/- 80 nmol/L.

Resúmenes de casos

IMC		CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
1	Media	445,2500	5,6852	14,2630	156,6000	412,7375
	Error típ. de la media	68,52860	,48885	1,74036	32,03217	50,25314
2	Media	257,4444	3,6895	12,5200	84,2000	408,4000
	Error típ. de la media	75,92561	,59665	3,44371	19,68917	40,91650
3	Media	242,8000	3,2894	11,4550	35,6667	258,0000
	Error típ. de la media	36,10042	,52216	1,72982	7,44050	8,44050
Total	Media	322,4091	3,9353	13,0674	103,8727	400,1357
	Error típ. de la media	44,00166	,33757	1,20447	21,78353	58,27825

Tabla 5.33 Pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing. Descriptiva, expresada como media y desviación típica, de los resultados de CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23), cortisol en saliva 8h (CS_8), cortisol plasmático a las 23h (CP_23) y cortisol plasmático a las 8h (CP_8) en función del IMC. 1 obesos, 2 sobrepeso 3 normopeso.

Resúmenes de casos

HIPERTENSION		CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
1	Media	391,5333	4,9744	12,9641	103,4833	492,2636
	Error típ. de la media	45,89832	,99954	1,38772	21,95781	86,16848
0	Media	263,6154	4,5496	11,0806	96,9200	427,7500
	Error típ. de la media	42,75070	,59526	1,80715	13,48604	80,94982
Total	Media	332,1429	4,6938	12,3363	101,5529	444,7267
	Error típ. de la media	33,36236	,70520	1,10045	15,74530	64,56309

Tabla 5.34 Pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing Descriptiva, expresada como media y desviación típica, de los resultados de CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23), cortisol en saliva 8h (CS_8), cortisol plasmático a las 23h (CP_23) y cortisol plasmático a las 8h (CP_8) en función de la ausencia o no de hipertensión. 1 hipertensión y 0 no hipertensión.

Para evaluar la existencia de relaciones significativas entre los resultados de cortisol con el IMC y con la tensión arterial utilizamos el test no paramétrico Kruskal-Wallis, en el primer caso y el test no paramétrico de U de Mann-Whitney, en el segundo. En ambos casos encontramos una relación significativa del CLU, CS 23h y CP 23h con el IMC y la existencia de hipertensión (tablas 5.35y 5.36).

Estadísticos de contraste

	CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
Chi-cuadrado	5,714	14,217	1,93	6,861	1,031
gl	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,057	,001	,380	,032	,597

a. Prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 5.35 Pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing. Estadístico de contraste no paramétrico Kruskal-Wallis. Muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23h), cortisol plasmático 23 h (CP_23h) en función del IMC.

Estadísticos de contraste

	CLU	CS_23	CS_8	CP_23	CP_8
U de Mann-Whitney	56,000	606,500	203,500	26,000	19,000
W de Wilcoxon	147,000	2436,500	339,500	104,000	85,000
Z	-1,913	-2,093	-1,148	-,422	-,392
Sig. asintót. (bilateral)	,046	,036	,251	,023	,695

Tabla 5.36 Pacientes diagnosticados de pseudo-Cushing. Estadístico de contraste no paramétrico U de Mann-Whitney. Muestra diferencias estadísticamente significativas en los resultados CLU, cortisol en saliva 23h (CS_23h), cortisol plasmático 23 h (CP_23h) en función de la ausencia o no de hipertensión.

5.3.3 Curvas COR

Con las curvas COR se trata de observar la distribución de la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica en relación con diferentes puntos de corte. Las curvas ROC representan un índice de la exactitud con que una prueba diagnóstica discrimina los estados de salud a lo largo del espectro de trabajo de una prueba diagnóstica. Sólo el espectro entero de pares sensibilidad/especificidad aporta una imagen de la exactitud de una prueba. Las curvas ROC se construyen para cada punto de corte deseado situando la proporción de verdaderos positivos en el eje de la Y y la proporción de falsos positivos en el eje de las X. En unas ocasiones nos interesa más trabajar sobre la sensibilidad y en otras sobre la especificidad. Para establecer los puntos de corte y conocer el rendimiento global (área bajo la curva) de las determinaciones del cortisol en saliva se trazaron las curvas COR. Los distintos puntos de corte de la sensibilidad y de la especificidad trazan un polígono cuya área bajo la curva nos da una idea de la calidad de la información de dicha prueba diagnóstica. Cuanto más grande sea esa área, es decir, cuanto más se acerque el gráfico de la curva hacia el vértice superior izquierdo de la gráfica, mejor será esa prueba. En ese vértice, la sensibilidad y la especificidad son del 100%. Para comparar dos pruebas diagnósticas, se comparan las áreas bajo la curva. La curva con mayor área es la mejor (valorar intervalo de confianza de la diferencia y significación estadística).

5.2.3.1 Cortisol en saliva 23 horas

En la figura 5.7 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol en saliva a las 23 h en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 7.05 nmol/L.

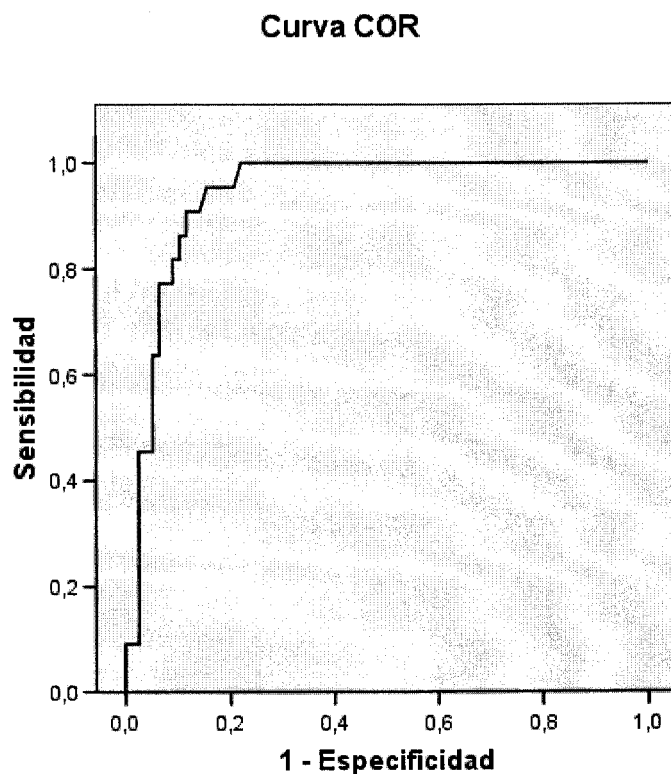


Figura 5.7 Cortisol en saliva a las 23 h. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el cortisol en saliva a las 23 h, 0.951 fue altamente significativo ($p < 0.0001$) (tabla 5.37).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CS23

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,951	,026	,000	,901	1,001

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.37 Cortisol en saliva 23h. Área bajo la curva COR.

5.2.3.2 Cortisol en saliva 8 horas

En la figura 5.8 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol en saliva a las 23 h en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 13.0 nmol/L.

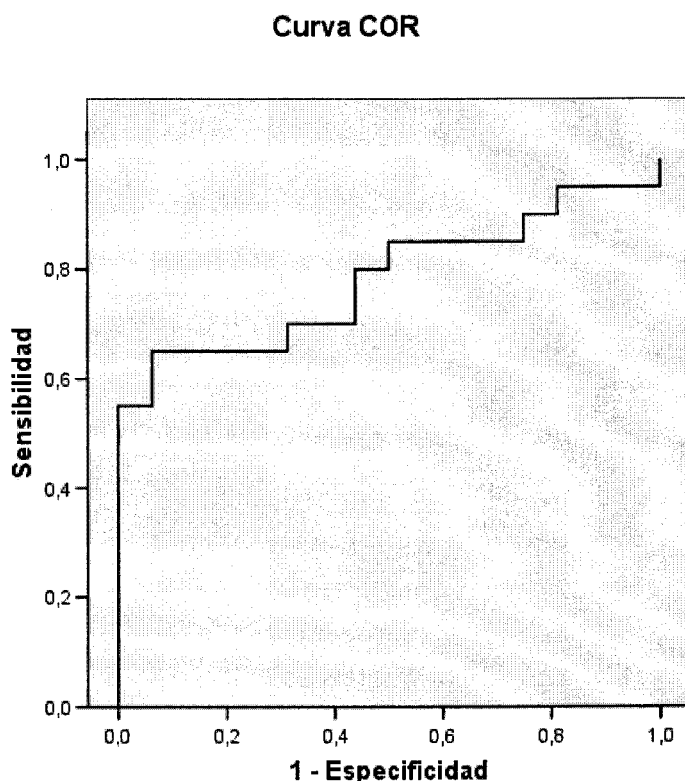


Figura 5.8 Cortisol en saliva a las 8 h. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el cortisol en saliva a las 23 h, 0.760 fue significativo ($p=0.011$) (tabla 5.38).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CS8

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,760	,083	,011	,597	,923

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.38 Cortisol en saliva 23h. Área bajo la curva COR.

5.2.3.3 Cortisol plasmático 23 horas

En la figura 5.9 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol plasmático las 23 h en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 210 nmol/L.

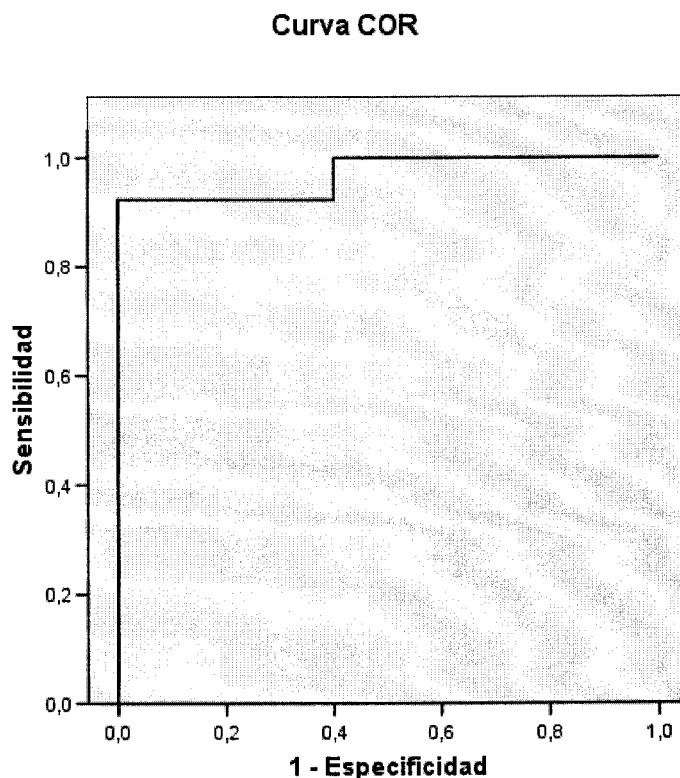


Figura 5.9 Cortisol en saliva a las 23 h. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el cortisol en saliva a las 23 h, 0.969 fue significativo ($p=0.003$) (tabla 5.39).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CP23

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,969	,038	,003	,895	1,043

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.39 Cortisol plasmático 23h. Área bajo la curva COR.

5.2.3.4 Cortisol plasmático 8 horas

En la figura 5.10 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol plasmático las 8 en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 520 nmol/L.

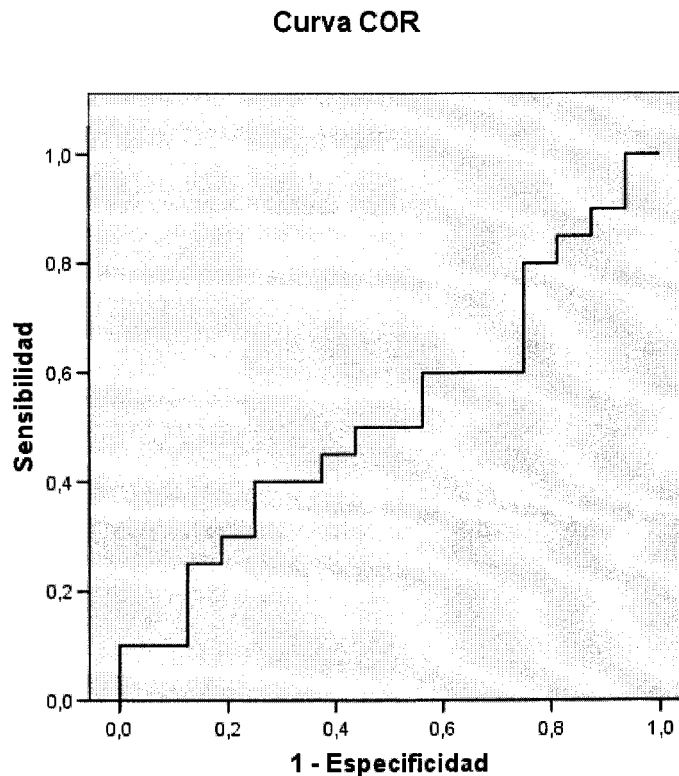


Figura 5.10 Cortisol en plasma a las 8 h. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el cortisol en saliva a las 23 h, 0.492 no fue significativo ($p=0.104$) (tabla 5.40).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CP8

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,492	,104	,941	,288	,696

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.40 Cortisol plasmático 8h. Área bajo la curva COR.

5.2.3.5 Cortisol libre urinario

En la figura 5.11 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del CLU en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 340 nmol/24h.

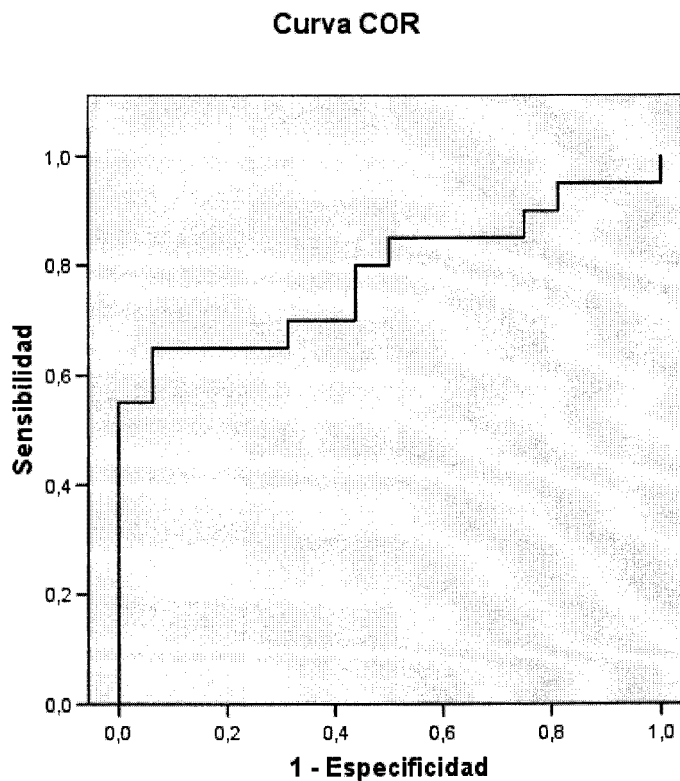


Figura 5.11 CLU. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el CLU, 0,781 fue significativo ($p=0.004$) (tabla 5.41).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CLU

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,781	,079	,004	,627	,935

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.41 CLU. Área bajo la curva COR.

5.2.3.6 Cortisol saliva tras frenación

En la figura 5.12 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol en saliva tras frenación con Dexametasona en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 8.1 nmol/L.

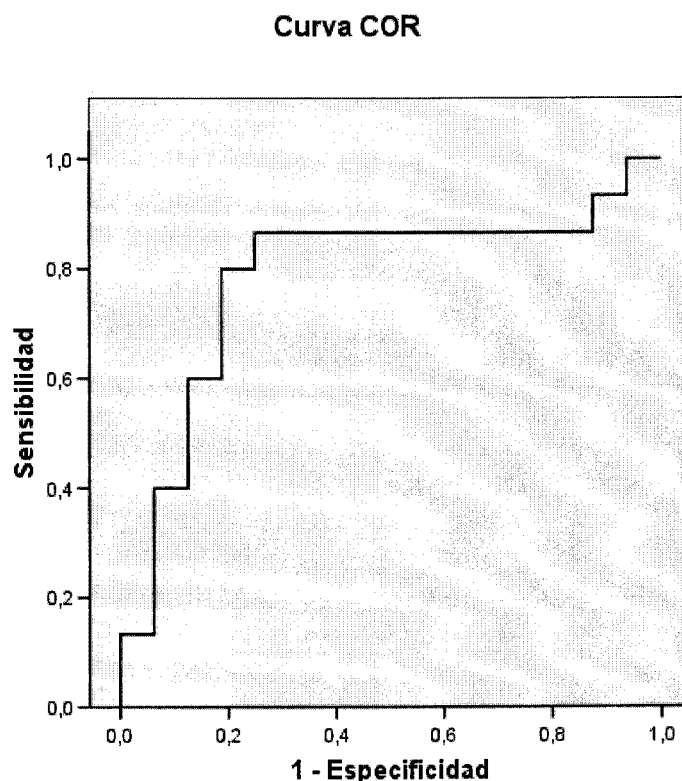


Figura 5.12 CLU. Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el CLU cortisol en saliva tras frenación con Dexametasona, 0.783 fue significativo ($p=0.007$) (tabla 5.42).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CS1M

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,783	,091	,007	,605	,962

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.42 Cortisol en saliva tras frenación con Dexametasona. Área bajo la curva COR.

5.2.3.7 Cortisol plasmático tras frenación

En la figura 5.13 se representa distribución de la sensibilidad y la especificidad del cortisol plasmático tras frenación con Dexametasona en relación con diferentes puntos de corte. El punto de corte óptimo corresponde a 52 nmol/L.

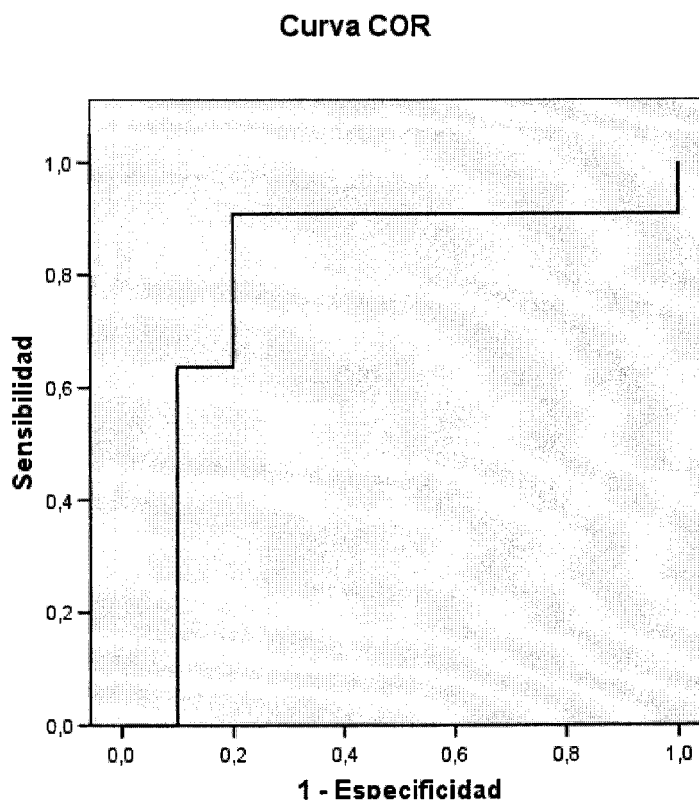


Figura 5.13 Cortisol plasmático tras frenación con Dexametasona Curva COR, representa la sensibilidad (eje Y) frente a 1-especificidad (eje X) para los diferentes puntos de corte.

El área bajo la curva obtenida para el CLU cortisol en saliva tras frenación con Dexametasona, 0,791 fue significativo ($p=0,024$) (tabla 5.43).

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: CP1M

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,791	,117	,024	,562	1,020

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Tabla 5.43 Cortisol plasmático tras frenación con Dexametasona. Área bajo la curva COR.

5.2.4 Caracterización de las pruebas diagnósticas

Para caracterizar a una prueba diagnóstica, es necesario disponer de un patrón de referencia o criterio estándar. La clasificación de los pacientes que se obtiene a través de la prueba diagnóstica en cuestión se contrasta con la clasificación de los mismos pacientes que realiza el criterio o patrón de referencia. En nuestro caso hemos utilizado como criterio estándar el diagnóstico clínico realizado por el Endocrinólogo lo que nos permite clasificar los sujetos de estudio en: 1. Verdadero positivo: enfermedad presente y resultado positivo. 2. Verdadero negativo: enfermedad ausente y resultado negativo. 3. Falso positivo: enfermedad ausente y resultado positivo. 4. Falso negativo: enfermedad presente y resultado negativo, y a partir de estos datos y los resultados de las pruebas analíticas, determinar:

Sensibilidad. Es la probabilidad de que un individuo enfermo tenga un resultado positivo. Tasa o proporción de verdaderos positivos. Enfermos con prueba positiva de entre todos los enfermos.

Especificidad. Es la probabilidad de que un individuo sin la enfermedad presente un resultado negativo en la prueba diagnóstica. Tasa, proporción de verdaderos negativos. Sanos con prueba negativa de entre todos los sanos.

Valor predictivo positivo. Es la probabilidad de que un individuo con una prueba positiva tenga la enfermedad. Enfermos con prueba positiva de entre todos los tests positivos. Este concepto se denomina también: probabilidad "a posteriori" o probabilidad "post-test".

Valor predictivo negativo. Es la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo no tenga la enfermedad. Libres de enfermedad con test negativo dentro de todos aquellos con test negativo.

Convencionalmente a la sensibilidad y especificidad son características de la prueba diagnóstica e independientes de la prevalencia. Sin embargo, los valores predictivos dependen estrechamente de la prevalencia de la enfermedad en la población en la que se aplica la prueba diagnóstica. Al aumentar la prevalencia crece el valor predictivo positivo para una misma sensibilidad y especificidad; esto se debe fundamentalmente a que disminuye el número de falsos positivos. De la misma manera, al disminuir la prevalencia

disminuye el valor predictivo positivo y aumenta el valor predictivo negativo porque para una misma sensibilidad y especificidad disminuyen los falsos negativos.

Cociente de probabilidad positivo. Expresa la probabilidad de encontrar un resultado positivo en un individuo enfermo frente a uno no enfermo.

Cociente de probabilidad negativo Expresa la probabilidad de encontrar un resultado negativo en un individuo no enfermo frente a uno enfermo.

5.2.4.1 Cortisol saliva 23 horas

En la tabla 5.44 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del cortisol en saliva a las 23 h. Sensibilidad 96% (intervalo de confianza al 95%, 80-99.3%). Especificidad 92.7% (intervalo de confianza al 95%, 84.9-96.6%), valor predictivo positivo 80% (intervalo de confianza al 95%, 62.7-90.5%), valor predictivo negativo 98.7% (intervalo de confianza al 95%, 93-99.8%), cociente probabilidad positivo 80% (intervalo de confianza al 95%, 62.7-90.5%), cociente de probabilidad negativo 1.3% (intervalo de confianza al 95%, 0.2-7 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO			
		IC 95%	
Sensibilidad	96,0%	80,5% a 99,3%	
Especificidad	92,7%	84,9% a 96,6%	
Valor predictivo positivo	80,0%	62,7% a 90,5%	
Valor predictivo negativo	98,7%	93,0% a 99,8%	
Proporción de falsos positivos	7,3%	3,4% a 15,1%	
Proporción de falsos negativos	4,0%	0,7% a 19,5%	
Exactitud	93,5%	87,1% a 96,8%	
Índice J de Youden	0,9		
CPP o LR(+)	13,12	6,05 a 28,46	
		Taylor Miettinen	
CPN o LR(-)	0,04	0,01 a 0,30	
		Taylor Miettinen	

CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)			
		IC 95%	
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	80,0%	62,7% a 90,5%	
1 - PPPP	20,0%	9,5% a 37,3%	
1 - PPPN	98,7%	93,0% a 99,8%	
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	1,3%	0,2% a 7,0%	

Tabla 5.44 Cortisol en saliva 23 h, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad.

5.2.4.2 Cortisol saliva 8 horas

En la tabla 5.45 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del cortisol en saliva a las 8 h. Sensibilidad 76.9% (intervalo de confianza al 95%, 49.7-91.8%). Especificidad 68% (intervalo de confianza al 95%, 54.2-79.2%), valor predictivo positivo 38.5% (intervalo de confianza al 95%, 22.4-57.5%), valor predictivo negativo 91.9% (intervalo de confianza al 95%, 78.7-97.2%), cociente probabilidad positivo 38.4% (intervalo de confianza al 95%, 22.4-57.4%), cociente de probabilidad negativo 8.1% (intervalo de confianza al 95%, 2.8-21.3 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO		
		IC 95%
Sensibilidad	76,9%	49,7% a 91,8%
Especificidad	68,0%	54,2% a 79,2%
Valor predictivo positivo	38,5%	22,4% a 57,5%
Valor predictivo negativo	91,9%	78,7% a 97,2%
Proporción de falsos positivos	32,0%	20,8% a 45,8%
Proporción de falsos negativos	23,1%	8,2% a 50,3%
Exactitud	69,8%	57,6% a 79,8%
Índice J de Youden	0,4	
CPP o LR(+)	2,40	1,46 a 3,97
		Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,34	0,12 a 0,95
		Taylor Miettinen

CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)		
		IC 95%
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	38,4%	22,4% a 57,4%
1 - PPPP	61,6%	42,6% a 77,6%
1 - PPPN	91,9%	78,7% a 97,2%
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	8,1%	2,8% a 21,3%

Tabla 5.45 Cortisol en saliva 8 h, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad.

5.2.4.3 Cortisol plasma 23 horas

En la tabla 5.46 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del cortisol plasmático a las 23 h. Sensibilidad 92.3% (intervalo de confianza al 95%, 66.7-98.6%). Especificidad 90.9% (intervalo de confianza al 95%, 49.1-99%), valor predictivo positivo 96% (intervalo de confianza al 95%, 70.8-99.6%), valor predictivo negativo 83.3% (intervalo de confianza al 95%, 43.6-97%), cociente probabilidad positivo 96% (intervalo de confianza al 95%, 70.8-99.6%), cociente de probabilidad negativo 16.6% (intervalo de confianza al 95%, 3-56.3 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO		
		IC 95%
Sensibilidad	92,3%	66,7% a 98,6%
Especificidad	90,9%	49,1% a 99,0%
Valor predictivo positivo	96,0%	70,8% a 99,6%
Valor predictivo negativo	83,3%	43,6% a 97,0%
Proporción de falsos positivos	9,1%	1,0% a 50,9%
Proporción de falsos negativos	7,7%	1,4% a 33,3%
Exactitud	91,9%	71,3% a 98,1%
Índice J de Youden	0,8	
CPP o LR(+)	10,15	0,72 a 143,36
		Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,08	0,01 a 0,56
		Taylor Miettinen

CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)		
		IC 95%
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	96,0%	70,8% a 99,6%
1 - PPPP	4,0%	0,4% a 29,2%
1 - PPPN	83,4%	43,7% a 97,0%
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	16,6%	3,0% a 56,3%

Tabla 5.46 Cortisol plasmático 23 h, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad.

5.2.4.4 Cortisol plasma 8 horas

En la tabla 5.47 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del cortisol plasmático a las 8 h. Sensibilidad 65% (intervalo de confianza al 95%, 43.3-81.9%). Especificidad 25% (intervalo de confianza al 95%, 10.2-49.5%), valor predictivo positivo 52% (intervalo de confianza al 95%, 33.5-70%), valor predictivo negativo 36.4% (intervalo de confianza al 95%, 15.2-64.6%), cociente probabilidad positivo 52% (intervalo de confianza al 95%, 33.5-70%), cociente de probabilidad negativo 63.7% (intervalo de confianza al 95%, 35.4-84.9 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO		
		IC 95%
Sensibilidad	65,0%	43,3% a 81,9%
Especificidad	25,0%	10,2% a 49,5%
Valor predictivo positivo	52,0%	33,5% a 70,0%
Valor predictivo negativo	36,4%	15,2% a 64,6%
Proporción de falsos positivos	75,0%	50,5% a 89,8%
Proporción de falsos negativos	35,0%	18,1% a 56,7%
Exactitud	47,2%	32,0% a 63,0%
Índice J de Youden	-0,1	
CPP o LR(+)	0,87	0,56 a 1,33
		Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	1,40	0,57 a 3,46
		Taylor Miettinen

CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)		
		IC 95%
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	52,0%	33,5% a 70,0%
1 - PPPP	48,0%	30,0% a 66,5%
1 - PPPN	36,3%	15,1% a 64,6%
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	63,7%	35,4% a 84,9%

Tabla 5.47 Cortisol plasmático 8 h, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad.

5.2.4.5 Cortisol libre urinario

En la tabla 5.48 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del CLU. Sensibilidad 85.7% (intervalo de confianza al 95%, 65.4-95%). Especificidad 90.9% (intervalo de confianza al 95%, 76.4-96.9%), valor predictivo positivo 85.7% (intervalo de confianza al 95%, 65.4-95%), valor predictivo negativo 90.9% (intervalo de confianza al 95%, 96.4-96.9%), cociente probabilidad positivo 85.7% (intervalo de confianza al 95%, 65.4-95%), cociente de probabilidad negativo 9.1% (intervalo de confianza al 95%, 3.1-23.6 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO			
		IC 95%	
Sensibilidad	85,7%	65,4% a 95,0%	
Especificidad	90,9%	76,4% a 96,9%	
Valor predictivo positivo	85,7%	65,4% a 95,0%	
Valor predictivo negativo	90,9%	76,4% a 96,9%	
Proporción de falsos positivos	9,1%	3,1% a 23,6%	
Proporción de falsos negativos	14,3%	5,0% a 34,6%	
Exactitud	88,9%	77,8% a 94,8%	
Índice J de Youden	0,8		
CPP o LR(+)	9,43	3,16 a 28,13	Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,16	0,05 a 0,45	Taylor Miettinen

CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)			
		IC 95%	
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	85,7%	65,4% a 95,0%	
1 - PPPP	14,3%	5,0% a 34,6%	
1 - PPPN	90,9%	76,4% a 96,9%	
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	9,1%	3,1% a 23,6%	

Tabla 5.48 CLU, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad.

5.2.4.6 Cortisol plasmático tras frenación

En la tabla 5.49 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del CLU. Sensibilidad 90.9% (intervalo de confianza al 95%, 62.3-98.4%). Especificidad 81.8% (intervalo de confianza al 95%, 52.3-94.9%), valor predictivo positivo 83.3% (intervalo de confianza al 95%, 55.2-95.3%), valor predictivo negativo 90% (intervalo de confianza al 95%, 59.6-98.2%), cociente probabilidad positivo 83.3% (intervalo de confianza al 95%, 55.2-95.3%), cociente de probabilidad negativo 10% (intervalo de confianza al 95%, 1.8-40.4 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO			
			<u>IC 95%</u>
Sensibilidad	90,9%		62,3% a 98,4%
Especificidad	81,8%		52,3% a 94,9%
Valor predictivo positivo	83,3%		55,2% a 95,3%
Valor predictivo negativo	90,0%		59,6% a 98,2%
Proporción de falsos positivos	18,2%		5,1% a 47,7%
Proporción de falsos negativos	9,1%		1,6% a 37,7%
Exactitud	86,4%		66,7% a 95,3%
Índice J de Youden	0,7		
CPP o LR(+)	5,00		1,41 a 17,76
			Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,11		0,02 a 0,73
			Taylor Miettinen
CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)			
			<u>IC 95%</u>
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	83,3%		55,2% a 95,3%
1 - PPPP	16,7%		4,7% a 44,8%
1 - PPPN	90,0%		59,6% a 98,2%
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	10,0%		1,8% a 40,4%

Tabla 5.49 Cortisol plasmático tras frenación con dexametasona, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad

5.2.4.7 Cortisol saliva tras frenación

En la tabla 5.50 se presentan los resultados de la caracterización diagnóstica del CLU. Sensibilidad 85.7% (intervalo de confianza al 95%, 60.1-96%). Especificidad 84.2% (intervalo de confianza al 95%, 62.4-94.5%), valor predictivo positivo 80% (intervalo de confianza al 95%, 54.8-93%), valor predictivo negativo 88.9% (intervalo de confianza al 95%, 67.2-96.9%), cociente probabilidad positivo 80% (intervalo de confianza al 95%, 54.8-92.9%), cociente de probabilidad negativo 11.1% (intervalo de confianza al 95%, 3.1-32.8 %).

PRUEBAS CON RESULTADO DICOTÓMICO		
		IC 95%
Sensibilidad	85,7%	60,1% a 96,0%
Especificidad	84,2%	62,4% a 94,5%
Valor predictivo positivo	80,0%	54,8% a 93,0%
Valor predictivo negativo	88,9%	67,2% a 96,9%
Proporción de falsos positivos	15,8%	5,5% a 37,6%
Proporción de falsos negativos	14,3%	4,0% a 39,9%
Exactitud	84,8%	69,1% a 93,3%
Índice J de Youden	0,7	
CPP o LR(+)	5,43	1,88 a 15,67
		Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,17	0,05 a 0,62
		Taylor Miettinen
Probabilidad pre-prueba (Prevalencia)	42,4%	
CÁLCULO DE LAS PROBABILIDADES POST-PRUEBA (Teorema de Bayes)		
		IC 95%
Probabilidad post-prueba positiva (PPPP)	80,0%	54,8% a 92,9%
1 - PPPP	20,0%	7,1% a 45,2%
1 - PPPN	88,9%	67,2% a 96,9%
Probabilidad post-prueba negativa (PPPN)	11,1%	3,1% a 32,8%

Tabla 5.50 Cortisol en saliva tras frenación con dexametasona, resultados de la caracterización diagnóstica expresados como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y cocientes de probabilidad

5.4 Costes

Se presenta un análisis de los costes por diagnóstico que suponen las pruebas realizadas siguiendo el protocolo que se utiliza actualmente para el diagnóstico del SC (CLU x2, cortisol plasmático tras frenación y cortisol plasmático nocturno), frente al coste por diagnóstico que siguiendo el protocolo que implica la realización del cortisol en saliva (cortisol en saliva 23h x 2, y cortisol saliva tras frenación). En la tabla 5.51 se detallan los costes en euros por determinación realizada. CLU 576.5 euros, cortisol en saliva 23 h 7.6 euros, cortisol plasmático 23 h 1176.11 euros, cortisol en saliva 8 h 7.6 euros, cortisol plasmático a las 8 h 6.11 euros, cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona 7 euros y cortisol saliva tras supresión con Dexametasona 7 euros.

		CLU	CS23	CP23	CS8	CP8	CP1M	CS1M
Coste prueba	Determinación	6	6	6	6	6	6	6
	Consumibles	0,5	0,4	0,11	0,4	0,11	1	1
	Envío postal		1,2		1,2			
Coste por día de baja laboral		570		570				
Coste por día de ingreso				600				
Total		576,5	7,6	1176,11	7,6	6,11	7	7

Tabla 5.51 Análisis de costes. Costes por determinación realizada, CLU 576.5 euros, cortisol en saliva 23 h 7.6 euros, cortisol plasmático 23 h 1176.11 euros, cortisol en saliva 8 h 7.6 euros, cortisol plasmático a las 8 h 6.11 euros, cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona 7 euros y cortisol saliva tras supresión con Dexametasona 7 euros.

En la tabla 5.52 se presentan los costes por diagnóstico realizado utilizando el algoritmo actual y el que incluye el cortisol en saliva. Coste por diagnóstico con el algoritmo actual, 3512.22 euros y con el que incluye el cortisol en saliva, 22.2 euros.

	CLU	CS23	CP23	CS8	CP8	CP1M	CS1M	Total
Sano algoritmo 2	1							576,5
Paciente algoritmo 1	2		2			1		3512,22
Sano algoritmo 2		1						7,6
Paciente algoritmo 2		2					1	22,2

Tabla 5.52 Análisis de costes por diagnóstico utilizando el algoritmo actual (1) y que implica el cortisol en saliva (2). Costes por diagnóstico realizado, en función de las pruebas realizadas y el coste de las mismas. CLU, cortisol en saliva 23 h (CS23), cortisol plasmático 23 h (CP23), cortisol en saliva 8 h (CS8), cortisol plasmático a las 8 h (CP8), cortisol plasmático tras supresión con Dexametasona (CP1M) y cortisol saliva tras supresión con Dexametasona (CS1M).

6 DISCUSIÓN

El síndrome de Cushing es una enfermedad grave, la supervivencia cuando el diagnóstico se hace en estadios muy evolucionados es de 4.7 años. Hace 20 años se estimaba que sólo el 50% de los pacientes tenían una supervivencia superior a cinco años y que por el contrario cuando el diagnóstico se hace precozmente y se resuelve la enfermedad, los estándares de mortalidad son equivalentes a los de la población normal (108,109). La incidencia del síndrome de Cushing se había estimado en aproximadamente 1:250.000 habitantes (110). Sin embargo, la sensibilidad de las determinaciones analíticas actuales para identificar las situaciones de hipercortisolismo (cortisol nocturno, cortisol en saliva y la valoración de la circadianidad del cortisol y su respuesta al feed-back de dexametasona) han permitido identificar un mayor número de casos en poblaciones de "riesgo", como diabéticos mal controlados, obesos con pobre respuesta al tratamiento dietético (111, 112) o en pacientes con hipertensión arterial severa de difícil control (113).

La incidencia del hipercortisolismo estable y persistente está estimada hoy en 10:1.000.000 de habitantes (114). El interés sin embargo de este problema no radica en el aumento progresivo de su incidencia, sino en la necesidad de hacer un screenig entre las poblaciones de riesgo. La cuestión que se plantea en la actualidad es, ¿a qué pacientes estamos obligados a realizarles una cuantificación del cortisol para despistaje de una situación de hipercortisolismo?. Las poblaciones en las que se debe realizar este screenig incluyen, pacientes con fenotipo de Cushing, diabetes mal controlada, obesidad, osteoporosis, hipertensión, en niños con retraso del crecimiento y en pacientes a los que se les ha diagnosticado un incidentaloma suprarrenal (115-117). En este sentido si nos atenemos a que la diabetes en el año 2020 afectará a una población de 300 millones de habitantes, a que la obesidad afecta a más del 30 % de la población de los países desarrollados y a que el resto de las otras indicaciones son cada vez más prevalentes, se estima que la cuantificación del cortisol será una determinación analítica habitual. ¿Pero qué determinaciones se deben realizar para este screenig y cómo debemos realizarlas?.

En nuestro medio, el algoritmo diagnóstico que se sigue implica: valoración clínica del paciente, en caso de que esté presente un fenotipo Cushingoide, se procede a la determinación del CLU para screenig de hipercortisolismo, si esta prueba es positiva (dos o más determinaciones alteradas de CLU) la confirmación diagnóstica del hipercortisolismo se realiza mediante la prueba de supresión con dexametasona y la determinación del cortisol nocturno para evaluar la pérdida del ritmo circadiano. Una vez confirmado el hipercortisolismo la etiología del mismo se identifica mediante la realización de otras pruebas (ACTH, cateterismo de senos petrosos, etc.) que no son objeto de este estudio. Disponemos, por tanto, de varios métodos analíticos pero como veremos a continuación, ninguno de ellos realizado aisladamente es idóneo.

La determinación del cortisol libre en orina se ha considerado el "gold estándar" para el diagnóstico del hipercortisolismo. Los frecuentes errores en la toma de la muestra por omisiones de alguna micción y la existencia de bastantes interferencias farmacológicas con esteroides sintéticos y otras drogas (118), hacen que su reproductibilidad sea baja, que se necesiten la recogida de al menos dos muestras y que los valores estén cuatro veces por encima del valor normal para garantizar el diagnóstico. La sensibilidad y la especificidad del CLU varia dependiendo de los autores consultados y oscila entre 75 y 100%, para la sensibilidad y entre el 95 y 98% para la especificidad (121). El CLU aparece elevado en algunas alteraciones no relacionadas con el SC como en la depresión endógena (hasta el 40% de pacientes con depresión tiene valores elevados de CLU), o en el síndrome de los ovarios poliquísticos y se ha visto que, un 15% de pacientes con SC probado tienen CLU dentro de los niveles de normalidad (119,120). Nuestros datos sugieren cifras de sensibilidad y especificidad semejantes a los descritos en la bibliografía y para un punto de corte de 340 nmol/L encontramos unos valores de sensibilidad del 85.7% y especificidad del 90.9 %. Algunos autores (122) proponen como alternativa a la utilización de la orina de 24 h la utilización de una muestra de orina de 12 h, recogida entre las 20 h a las 8 h. Los datos de sensibilidad y especificidad mostrados (100% y 97%) son esperanzadores pero es necesario una

experiencia y una extensa validación clínica para que pueda aceptarse como práctica habitual en el diagnóstico del SC.

La determinación del cortisol nocturno en suero representa una excelente alternativa para mejorar la sensibilidad diagnóstica en el SC. Se fundamenta en la pérdida del ritmo circadiano normal. En sujetos sin alteración del eje hipotálamo-hipofisario, la secreción de cortisol sigue un ritmo que ha sido bien descrito en la bibliografía y que implica un nadir de secreción que va desde las 23 h a la media noche y un máximo de secreción que oscila entre las 6 h y la 8 h (123-126). La utilización de esta prueba se basa en la observación de que en sujetos con SC este ritmo circadiano se pierde mientras que en sujetos sanos, en situaciones de PC o en obesos se mantiene. Durante la pasada década algunos autores han evaluado la eficacia diagnóstica del cortisol nocturno, tal y como se presenta en la tabla 6.1.

Autor	Año	Cortisol Cutoff* (nmol/L)	Grupo Control	TP/NCS	TN/NC	Sensitivity	Specificity
Newell-Price 129	1995	50	Normal	150/150	29/29	100%	100%
Papanicolaou 127	1998	207	Sospecha CS	225/234	23/23	96%	100%
Gorges 130	1999	251	Sospecha CS	97/103	135/144	94%	94%
Pikkarainen 131	2002	200	Normal	34/35	35/36	97.1%	97.2%
Papanicolaou 128	2002	242	Sospecha CS	117/121	18/18	97%	100%
Putignano 132	2003	331	Sospecha CS, obeso, normal	37/41	250/259	90.2%	96.5%
Putignano 133	2003	207	Obeso	57/58	97/117	98.3%	82.9%

Tabla 6.1 Sensibilidad y especificidad para el cortisol plasmático a las 23 h obtenidos de diferentes estudios sacados de la literatura. TP: total de test positivos; NCS total de casos de SC TN: total de test negativos; NC total de controles

Las cifras de sensibilidad especificidad y punto de corte varían en función de la población estudiada. El valor de 50 nmol/L consideramos que es demasiado bajo y aunque la sensibilidad puede ser próxima al 100% el número de falsos positivos a estudiar sería demasiado alto. El resto de estudios, proponen puntos de corte que oscilan entre 200 y 331 nmol/L con sensibilidad y especificidad entre 89-97.1% y 94-100%, respectivamente. Nuestro análisis COR nos da un punto de corte idóneo de 210 nmol/L con una sensibilidad de 92.3%, especificidad del 100% y área bajo la curva de 0.969. Aunque la eficacia diagnóstica del cortisol nocturno es elevada la realización de esta

prueba plantea inconvenientes importantes, relacionados con la necesidad del ingreso hospitalario del paciente durante, al menos, 48 h y su elevado coste.

La determinación del cortisol plasmático después de supresión nocturna con dexametasona se basa en la pérdida de la supresión normal del cortisol tras la administración de 1 mg de dexametasona. Si se consideran niveles de corte de <50 nmol/L, la sensibilidad de esta exploración es del 92.5% y su especificidad del 87.5%. Tiene sin embargo bastantes falsos positivos por lo que aisladamente no se considera un buen test de screenig (117). Nuestros datos sugieren un punto de corte de 52 nmol/L con una sensibilidad del 91%, una especificidad del 81.8% y un área bajo la curva de 0.79.

Dado que la población donde se debe realizar el screenig para el despistaje de hipercortisolismo es cada vez más amplia y que de otra parte ninguna de estas pruebas utilizada aisladamente es fiable, hemos planteado la posibilidad de utilizar la determinación del cortisol en saliva como alternativa para la screenig y confirmación del hipercortisolismo en pacientes con sospecha de SC.

La utilización de la saliva plantea ventajas importantes con respecto a las técnicas utilizadas habitualmente para el screenig y confirmación del hipercortisolismo y que están relacionadas:

1º con la facilidad para la toma de la muestra, que permite la toma de tantas muestras como sea necesario sin apenas trastorno para el paciente ya que se puede realizar en régimen ambulatorio

2º con la eficacia diagnóstica, que como veremos a continuación, es comparable, cuando no superior, a la de las técnicas utilizadas habitualmente para el despistaje del SC

3º con el ahorro en costes directos e indirectos que supone su utilización.

Los resultados que hemos obtenido en relación a la eficacia diagnóstica del cortisol en saliva, sugieren que la determinación a las 23 h constituye una herramienta diagnóstica de gran utilidad,. Para un punto de corte de 7.05 nmol/L alcanzamos una sensibilidad de 96%, una especificidad del 86% y un área bajo la curva de 0.951 ($p<0.001$), superiores a los resultados que hemos

obtenido para el CLU, cortisol tras supresión con dexametasona y comparables a los obtenidos para cortisol plasmático nocturno, aunque en este último caso, el área bajo la curva fue discretamente inferior, 0.969. La existencia de relaciones significativas entre los niveles de cortisol en saliva y alguno de los factores que dificultan el diagnóstico del SC como es la hipertensión o la obesidad, creemos que no limita su utilización ya que el resto de los test se ven igualmente afectados. La combinación de la determinación del cortisol en saliva nocturno con la determinación tras frenación con dexametasona mejora el rendimiento diagnóstico alcanzándose valores de sensibilidad y especificidad próximos al 100%. La utilización aislada de la determinación del cortisol en saliva tras frenación con dexametasona para un punto de corte de 8.1 nmol/L dio una sensibilidad del 91% y una especificidad del 99% con un área bajo la curva de 0.789, semejantes a los obtenidos para el cortisol plasmático tras supresión que para un punto de corte de 52 nmol/L ofrece una sensibilidad del 85.7%, especificidad del 84 % y área bajo la curva de 0.791.

Los resultados para el cortisol en saliva a las 8 de la mañana, al igual que el cortisol plasmático, ofrece un pobre rendimiento diagnóstico y no parece que aporte ninguna ventaja frente a la determinación nocturna o tras frenación.

La gran cantidad de determinaciones de cortisol a realizar, hace necesario que la cuantificación se pueda realizar en analizadores automáticos. Se ha evaluado su aplicación en un analizador E170 (Roche Diagnostic), totalmente automático y que proporciona rendimientos de 170 test/ h.

No se ha encontrado una normativa internacional donde se reflejen los requisitos de calidad concretos que deberían cumplir los procedimientos de medida empleados en el laboratorio clínico. En principio, los objetivos de calidad deben ser decididos por cada laboratorio a partir de la información disponible en la bibliografía, variabilidad biológica del analito que se mide, los criterios de cambios o diferencias de importancia médica, el estado del arte y las recomendaciones de la CLIA 88 (Clinical Laboratory Improvement Act, 1988).

La variabilidad biológica es uno de los parámetros que se utiliza a la hora de establecer los límites de imprecisión aceptables para un procedimiento de

medida. Se considera que una prestación óptima es aquella en la que la imprecisión es inferior a 0.25 veces la variabilidad biológica intraindividuo, una prestación aceptable es aquella en la que la imprecisión es inferior a 0.50 veces la variabilidad biológica intraindividuo y una prestación mínima es aquella en la que la imprecisión es inferior a 0.75 veces la variabilidad biológica intraindividuo (134), a partir de los resultados de variabilidad biológica intraindividuo de Simon K y colaboradores (135), los límites de imprecisión para la determinación del cortisol en saliva, óptimos, aceptables y mínimos debería oscilar entre 5.1%, 10.25% y 15.3%, respectivamente. En nuestro estudio, en ningún caso, la imprecisión interserie o intraserie superó los límites recomendados.

La diferencia mínima recomendada para un resultado obtenido por dos procedimientos de medida distintos también se calcula a partir de la variabilidad biológica, se acepta, que la diferencia no debe ser superior a 0.33 veces la variabilidad biológica (136). Para el cortisol en saliva la diferencia máxima aceptable, cuando se determina por dos procedimientos de medida distintos, sería del 6.75%, muy superior, a las diferencias encontradas entre los dos procedimientos evaluados (RIA y ECLIA), que en nuestro caso, fue de 0.35 (media de las diferencias de los resultados de cortisol obtenidos por ECLIA y RIA). La ecuación de regresión obtenida del estudio de comparación, mostró una pendiente de 1,0119 (95% IC: 1,0047 -1,0195) y un coeficiente de correlación con una $r = 0,9997$ ($P < 0,0001$). El estudio de linealidad mostró una relación lineal entre concentraciones de cortisol entre 0.5 y 120 nmol/L, con una pendiente de 0,9479 (95% IC: 0,9479 - 0,9479) y una sensibilidad analítica de 0.5 nmol/L.

Uno de las principales ventajas que tiene la determinación del cortisol en saliva es la facilidad de la toma de la muestra. Se trata de un procedimiento sencillo que se puede realizar de forma ambulatoria en el domicilio del paciente y posteriormente ser remitida al laboratorio por correo postal, sin necesidad de ningún desplazamiento ni pérdidas de tiempo por parte del paciente. Se evaluó la estabilidad del cortisol a temperatura ambiente en los dispositivos de recogida de muestras. Para una semana, no se producen diferencias significativas en los resultados de cortisol, media de las diferencias -0.1 nmol/L,

pendiente de regresión 1.0345 (95% IC: 0.9404 – 1.1746) y coeficiente de correlación $r= 0.9627$ (95% IC: 0,9283 - 0,9808 $p<0.0001$).

La aplicación de la determinación del cortisol en saliva al algoritmo diagnóstico del SC supone un ahorro importante, sobre todo en los costes indirectos, derivados de la facilidad para la toma de las muestras, que hace que no sea necesario el ingreso hospitalario de los pacientes o la recogida durante 24 horas de muestras de orina, reservándose estos procedimientos para aquellas situaciones en los que los resultados no sean definitivos. La aplicación de esta técnica permite, además, de una forma sencilla y barata, realizar screenig de hipercortisolismo en poblaciones de riesgo, como son los obesos, diabéticos o hipertensos, su uso en situaciones en los que se alteren las concentraciones de la proteína transportadora como son el embarazo, hipertiroidismo o en mujeres que consumen esteroides contraceptivos.

El algoritmo diagnóstico propuesto implica (figura 6.1): realización de cortisol en saliva nocturno y cortisol en saliva tras frenación con dexametasona, a todos aquellos pacientes que consulten por sospecha de SC. En caso de que las dos pruebas sean positivas se confirma el diagnóstico de hipercortisolismo y se procede a la realización del diagnóstico etiológico. En caso de que las dos pruebas sean negativas, se excluye el SC. Si los resultados son discordantes se propone repetir el estudio transcurridos unas semanas.

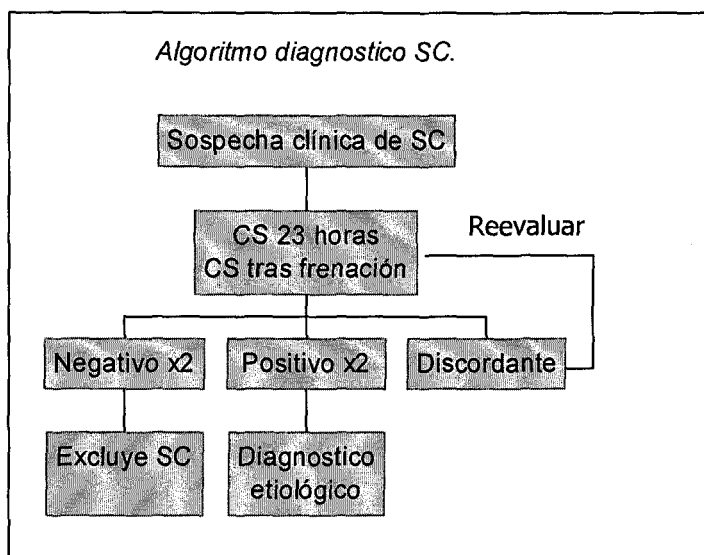


Figura 6.1 Algoritmo diagnóstico propuesto para el SC.

La utilización del algoritmo propuesto supone un ahorro económico considerable para todos los casos estudiados.

Paciente con sospecha clínica de SC en el que no se confirma el hipercortisolismo: coste algoritmo actual (CLUx2) 1153 euros, coste algoritmo propuesto (CS x2) 15.58 euros, Ahorro por paciente 1137.42 euros.

Paciente con sospecha clínica y analítica de SC: coste del algoritmo actual (CLUx2, CP23x2, CP1M) 3512.22 euros. Coste algoritmo propuesto (CS23 x2, CS1M) 24.4; Ahorro por paciente de 3487.82 euros.

Teniendo en cuenta la incidencia de los dos últimos años, la aplicación del algoritmo actual supondría un coste de 619.161 euros para el estudio de 611 pacientes con un resultados de 74 pacientes con sospecha analítica de hipercortisolismo y 21 diagnósticos de SC. La aplicación del algoritmo propuesto tendría un coste de diagnóstico de 8984 euros. El total de ahorro en costes para la población estudiada es de 610.177 euros por dos años, es decir un ahorro de 305.088 euros año.

8 CONCLUSIONES

1 El síndrome de Cushing es una enfermedad grave, la supervivencia cuando el diagnóstico se hace en estadios muy evolucionados es de 4.7 años, sin embargo, cuando se el diagnóstico se hace precozmente los estándares de mortalidad son equivalentes a los de la población normal, por lo que es necesario disponer de pruebas diagnosticas con una adecuada sensibilidad y especificidad para el screening de situaciones de hipercortisolismo.

2 Aunque la incidencia del hipercortisolismo permanece estable, en los últimos años esta surgiendo la necesidad de realizar screenig de hipercortisolismo en situaciones de riesgo como son la diabetes, obesidad, osteoporosis, hipertensión, etc. Teniendo en cuanto la prevalencia de estas situaciones de riesgo, en los próximos años la cuantificación del cortisol va a ser una determinación analítica muy extendida.

3 Las determinaciones que en la actualidad disponemos para el screening del hipercortisolismo plantean problemas importantes relacionados con la falta de rentabilidad diagnóstica, el coste o los errores diagnósticos derivados de la dificultad para la toma de la muestra.

4 La utilización del cortisol en saliva para el screenig de hipercortisolismo plantea ventajas importantes con respecto a las determinaciones que habitualmente se utilizan en estos casos y que están relacionadas con:

4.1 La facilidad de la toma de la muestra. El propio paciente puede recoger las muestras en su domicilio y luego remitirlas al laboratorio, para su análisis, por correo postal. La estabilidad del cortisol en los dispositivos de recogida de muestras Salivette® permiten una demora de entrega de hasta de una semana.

4.2 Bajo coste. La determinación del cortisol en saliva tiene un coste muy inferior al coste de las determinaciones que actualmente se utilizan para el screenig del hipercortisolismo, que en la mayoría de los casos, implican, el ingreso hospitalario del paciente o la perdida de jornadas de trabajo para la

recogida de orina durante 24 horas. El ahorro por diagnóstico de SC se ha estimado en 1137.42, euros lo que supone un ahorro anual de 23885.82 euros (para una incidencia de 21 diagnósticos de SC). El ahorro total estimado para un año en base a los resultados obtenidos es de 3487.82 euros (estudio de 611 pacientes con sospecha de SC).

4.3 Una eficacia diagnóstica comparable al cortisol plasmático nocturno considerado como el "gold-estándar" para confirmación de hipercortisolismo y superior al CLU. La determinación del Cortisol en saliva a las 23 h tiene una sensibilidad del 96% , especificidad del 92.7 %, valor predictivo positivo del 80% y valor predictivo negativo del 98.7% (para un punto de corte de 7.05 nmol/L), es decir, la utilidad estriba fundamentalmente en es descartar el hipercortisolismo ya que una prueba negativa excluye el hipercortisolismo en el 98.7 % de los casos y la probabilidad de tener hipercortisolismo con una prueba negativa es del 1.3% (probabilidad post-prueba negativa del 1.3%). La combinación del Cortisol en saliva a las 23 h con el cortisol en saliva tras frenación con dexametasona mejora la rentabilidad diagnóstica alcanzando cifras de sensibilidad y especificidad próximas al 100%.

4.4 La capacidad para adaptar esta técnica en analizadores automáticos que posibilitan la realización de un gran número de determinaciones en poco tiempo. Los resultados de la evaluación analítica del cortisol en saliva en el E 170 así lo demuestran. Todos los parámetros evaluados, imprecisión, exactitud, linealidad y límite de detección presentaron unos resultados que se consideran aceptables.

4.5 La facilidad de la toma de la muestra, el bajo coste de las determinaciones y la elevada sensibilidad diagnóstica hace posible la utilización del cortisol en saliva para el screenig de hipercortisolismo en poblaciones de riesgo, aspecto que a día de hoy con los procedimientos habituales no es posible realizar, ya que el riesgo afecta a enfermedades con una elevada prevalencia, como es, la diabetes, hipertensión, obesidad, anorexia nerviosa, trastornos psiquiátricos etc..

5 El algoritmo diagnóstico propuesto para el screenig y confirmación de hipercortisolismo, incluye la determinación de dos cortisol en saliva a las 23 horas combinados con una supresión con Dexametasona, a todos aquellos pacientes que consulten por sospecha clínica de hipercortisolismo.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. McNicol AM. The human adrenal gland. Aspects of structure, function and pathology. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.^a ed., pp. 1-42, Raven Press, New York, 1992.
2. Fraser R. Biosynthesis of adrenocortical steroids. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.^a ed., pp. 117-130, Raven Press, New York, 1992.
3. Barker EV, Hume R, Hallas A, Coughtrie MWH. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase in the developing human fetus: quantitative biochemical and immunological characterization of the hepatic, renal, and adrenal enzymes. *Endocrinology*, 134:982-989, 1994.
4. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.a ed., pp. 159-189, Raven Press, New York, 1992.
5. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.*, 8:654-662, 1994.
6. Barnhart K, Mellon PL. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone α -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol. Endocrinol.*, 8:878-885, 1994.
7. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.*, 18:361-377, 1997.
8. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*, 372:635-641, 1994.

-
9. Winter JSD. Fetal and neonatal adrenocortical development. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.^a ed., pp. 87-104, Raven Press, New York, 1992. 18
 10. Sasano N, Sasano H. The adrenal cortex. En: Kovacs K, Asa SL (eds). *Functional Endocrine Pathology*, pp. 546-584. Blackwell Scientific, Boston, 1990.
 11. Gwynne JT, Strauss JF. The role of lipoprotein in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.*, 3:299-329, 1982.
 12. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.*, 35:215-257, 1979.
 13. Beins DM, Vining R, Balasubramanian S. Regulation of neutral cholesterol esterase and acyl-CoA cholesterol acetyltransferase in the rat adrenal gland. *Biochem. J.*, 202:631-637, 1982.
 14. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of expression of adrenocortical enzymes. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.a ed., pp. 191-207, Raven Press, New York, 1992.
 15. Strott CA. The search for the elusive adrenal steroidogenic «regulatory» protein. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1:312-314, 1990.
 16. Lin D, Sugawara T, Strauss III JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, 267:1828-1831, 1995.
 17. Miller WL. Lessons from congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, 5:155-161, 1998.

-
18. Chung BC, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandos TK, Miller WL. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8962-8966, 1986.
19. Sparkes RS, Klisak I, Miller WL. Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450scc to 15q23-q24; adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25. *DNA Cell Biol.*, 10:359-365, 1991.
20. Morel Y, Picado-Leonard J, Wu DA, Chang CY, Mohandas TK, Chung BC, Miller WL. Assignment of the functional gene for adrenodoxin to chromosome 11q1.2-qterm and two adrenodoxin pseudogenes to chromosome 20cent-q13.1. *Am. J. Hum. Genet.*, 43:52-59, 1988.
21. Solish SB, Picado-Leonard J, Morel Y, Kuhu RW, Mohandas TK, Hanukoglu I, Miller WL. Human adrenodoxin reductase: two RNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen-q25 are expressed in steroidogenic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7104-7108, 1988.
22. Sauer LA, Chapman JC, Dauchy RT. Topology of 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in adrenal cortex mitochondria and microsomes. *Endocrinology*, 134:751-759, 1994.
23. Rhéaume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol. Endocrinol.*, 5:1147-1157, 1991.

-
24. Chung BC, Picado-Leonard J, Hanin M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE, Miller WL. Cytochrome P450C17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:407-411, 1987.
 25. Matteson KJ, Picado-Leonard J, Chung BC, Mohandas TK, Miller WL. Assignment of the gene for adrenal P450C17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase) to human chromosome 10. *J. Clin.Endocrinol. Metab.*, 63:789-791, 1986.
 26. DiBlasio AM, Voutilainen R, Jaffe RB, Miller WL. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme) and P450c17 (17 α -hydroxylase-17,20-lyase) in cultured human fetal adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65:170-175, 1987.
 27. Sasano H, White PC, New MI, Sasano N. Immunohistochemical localization of cytochrome P- 450c21 in human adrenal cortex and its relation to endocrine function. *Hum. Pathol.*, 19:181-185, 1988.
 28. John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4715-4719, 1986.
 29. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5111-5115, 1986.
 30. Miller WL. Structure of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Steroid. Biochem.*, 27:759-766,1987.
 31. Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-45011 β). *J. Biol. Chem.*, 264:20961-20967, 1989.

-
32. Taymans SE, Pack S, Pak E, Torpy DJ, Zhuang Z, Stratakis CA. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24.3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83:1033-1036, 1998.
33. Boon WC, Coghlan JP, Curnow KM, McDougall JG. Aldosterone secretion. A molecular perspective. *Trends Endocrinol. Metab.*, 8:346-354, 1997.
34. Muller J, Oertle M. Separate induction of the two isozymes of cytochrome P-450(11) β in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 47:213-221, 1993.
35. Owerbach D, Rutter WJ, Roberts JL. The proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ β -lipotropin) gene is located on chromosome 2 in humans. *Somat. Cell. Genet.*, 7:359-369, 1981.
36. Catalano RD, Stuve L, Ramachandran J. Characterization of corticotropin receptors in human adrenocortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62:300-304, 1986.
37. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:427-440, 1988.
38. Guillemin R, Rosenberg B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: study with combined tissue cultures. *Endocrinology*, 57:599-607, 1955.
39. Saffran M, Schally AV. Release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33:408-415, 1955.

-
40. Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:6517-6521, 1981.
41. Arbiser JL, Morton CC, Bruns GAP, Majzoub JA. Human corticotropin releasing hormone gene is located on the long arm of chromosome 8. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 47:113-116, 1988.
42. Millan MA, Samra AB, Wynn PC, Catt KJ, Aguilera G. Receptors and action of corticotropin-releasing hormone in the primate pituitary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64:1036-1041, 1987.
43. Fukata J, Imura H, Nakao K. Cytokines as mediators in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical function. *J. Endocrinol. Invest.*, 17:141-155, 1994.
44. Buckingham JC, Smith T, Loxley HD. The control of ACTH secretion. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.a ed., pp. 131-158, Raven Press, New York, 1992.
45. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP. Hormonal regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression: implications for the stress response and immune/inflammatory reaction. *Endocr.Rev.*, 409-420, 1994.
46. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:409-426, 1988.
47. Aguilera G, Catt KJ. Loci of action of regulators of aldosterone biosynthesis in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology*, 104:1046-1052, 1979.
48. Kramer RE, Gallant S, Brownie AC. Actions of angiotensin II on aldosterone biosynthesis in the rat adrenal cortex. *J. Biol. Chem.*, 255:3442-3447, 1980.

-
49. Kojima I, Kojima K, Rasmussen H. Intracellular calcium and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as mediators of potassium-induced aldosterone secretion. *Biochem. J.*, 228:69-76,1985.
50. Woodcock EA, McLeod JK, Johnston CI. Vasopressin stimulates phosphatidylinositol turnover and aldosterone synthesis in rat adrenal glomerulosa cells: comparison with angiotensin II. *Endocrinology*, 118:2432-2436, 1986.
51. Sklar CA, Kaplan SL, Grumbach MM. Evidence for dissociation between adrenarche and gonadarche. Studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotrophin deficiency and constitutionally delayed growth and adolescence. *J. Clin.Endocrinol. Metab.*, 51:548-556, 1980.
52. Parker LN, Lifrak ET, Odell WD. A 60,000 molecular weight human pituitary glycopeptide stimulates adrenal androgen secretion. *Endocrinology*, 113:2092-2096, 1983.
53. Winterer J, Gwirstman HE, George DT, Kaye WH, Loriaux DL, Cutler GB. Adrenocorticotropin-stimulated adrenal androgen secretion in anorexia nervosa: impaired secretion at low weight with normalization after long-term weight recovery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61:693-697, 1985.
54. Hammond GL, Smith CL, Goping IS, Underhill DA, Harley MJ, Reventos J, Musto NA, Gunsalus GL, Bardin CW. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5153-5157, 1987.

-
55. Underhill DA, Hammond GL. Organization of the human corticosteroid binding globulin gene and analysis of its 5'-flanking region. *Mol. Endocrinol.*, 3:1448-1454, 1989.
56. Orth DN, Kovacs WJ, DeBold CR. The adrenal cortex. En: Wilson JD, Foster DW (eds). *Williams-Textbook of Endocrinology*. 8.a ed., pp. 489-605, WB Saunders Co, Philadelphia, USA, 1992.
57. Brownie AC. The metabolism of adrenal cortical steroids. En: James VHT (ed). *The Adrenal Gland*, 2.a ed., pp. 209-224, Raven Press, New York, 1992.
58. Stalmans W, Laloux M. Glucocorticoides and hepatic glycogen metabolism. In Baxter JD, Rosseau GC (eds). *Glucocorticoid Hormone Action*. New York, Springer-Verlag, 1979, pp 518-533.
59. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, et al. Promoting effects of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; 84:1663-1670.
60. Marver D. Evidence of corticosteroid action along the nephron. *Am J Physiol* 1987; 246:F111-F123.
61. Canalis E. Clinical review 83: mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3441-3447.
62. Messer J, Reitman D, Sacks HS, et al. Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. *N Engl J Med* 1983; 309:21-24.
63. Loffing J, Summa V, et al. Mediators of aldosterone action in the renal tubule. *Curr Opin Nephrol Hipertens* 2001 Sep;10(5):667-75.

-
64. Cushing H. The pituitary body and its disorders: Clinical states produced by disorders of the hypophysis cerebri. Philadelphia, JB Lippincott, 1912.
65. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestation. Bull Johns Hopkins Hosp 1932;1:137-195.
66. Axelrod L. Glucocorticoid therapy. Medicine (baltimore). 1976; 55:39-65.
67. Malchoff DC et al. Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia: An unusual case of Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68:855-860.
68. Liddle GW et al. Clinical and laboratory studies of ectopic humoral syndromes. Recent Prog Horm Res 1969; 25:283-314.
69. Howlett TA, et al. Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1985; 14:911-945.
70. Bertagna X, et al. New causes of Cushing's syndrome. N Engl J Med 1992; 327:974-980.
71. Biller BMK. Pathogenesis of pituitary Cushing's syndrome: pituitary versus hypothalamic. Endocrinol Metab Clin North Am 1994;23: 547-554.
72. Biller BMK, et al. Clonal origins of adrenocorticotropin-secreting pituitary tissue in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1992; 75:1303-1309.
73. Kholer PC, Trump DL. Ectopic hormone syndromes. Cancer Invest 1986; 4:543-554.

-
74. Luton JP, Cerdas S, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factor , and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990; 322:1195-1201.
75. Lacroix A, Mircescu H, Hamet P. Clinical evaluation of the presence of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrinologist* 1999;9:9-15.
76. Lacroix A, N'Diaye, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and hormonal receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 2001;22:75-110
77. Newfield RS, Kalaitzoglou G, Licholai T, Chilton D, Ashraf J, Thompson EB, et al. Normocortisolemic Cushing's syndrome initially presenting with increased glucocorticoid receptor number. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:14-21.
78. Boscaro M, Barzon L, Sonino N. The diagnosis of Cushing's syndrome: atypical presentations and laboratory shortcomings. *Arch Intern Med* 2000;160:3045-53.
79. Guilhaume B, Sanson ML, Billaud L, Bertagna X, Laudat MH, Luton JP. Cushing's syndrome and pregnancy: aetiologies and prognosis in twenty-two patients. *Eur J Med* 1994;1:83-9.
80. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscoso L, et al. Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1440-8.
81. Terzolo M, Pia A, Ali A, Orella G, Reimondo G, Bovio S, et al. Adrenal incidentaloma: a new case of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:998-1003

-
82. Carroll BJ, Curtis BC. Neuroendocrine regulation in depression II. Discrimination from depressed and nondepressed patients. *Arch Gen Psychiatry* 1976; 33:1051-1058.
83. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:791-803.
84. Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome, killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet* 1982;2:646-649.
- 85 Urbanic RC, George JM. Cushing's disease: 18 years experience. *Medicine* 1981;60:14-24.
- 86 Nieman LK. Unusual causes of Cushing's syndrome. In *Clinical Endocrinology Update '97 Syllabus*. Dallas: The Endocrine Society press, 1997, pp 233-240.
87. Yanovski JA, Cutler GB. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;3:487-509.
88. Contreras P, Araya V. Síndrome de Cushing: Una revisión a propósito de una casuística nacional. *Rev Med Chile* 1995;123:350-362.
89. Verhelst JA, Trainer PJ, Howlett TA, Perry L, Rees LH, Grossman AB, et al. Short and long-term responses to metyrapone in the medical management of 91 patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1991;35:169-178.
90. Tyrrell JB, Findling JW, Aron DC, Fitzgerald PA, Forsham PH. An overnight high-dose dexamethasone suppression test for rapid differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Ann Intern Med* 1986;104:180-186.

-
91. Al-Saadi N, Diederich S, Oelkers W. A very high dose dexamethasone suppression test for differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 1998;48:45-51.
92. Invitti C, Giraldi PF, de Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. Study group of the Italian Society of Endocrinology on the pathophysiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:440-448
93. Flack MR, Oldfield EH, Cutler GB, Zweig MH, Malley JD, Chrousos GP, Loriaux DL. Urine free cortisol in the high doses dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of the Cushing's syndrome. *Ann Intern Med* 1992;116:211-217.
94. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson B, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 5593-602.
95. Newell-Price J, Trainer P, Besser GM, Grossmann AB. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing states. *Endocr Rev* 1998;19:647-72.
96. Gómez JM, Soler J, editores. Manual de pruebas funcionales de Endocrinología. Oviedo: Septe Ediciones;2002
97. Papanicolaou DA, Mullen N, Kyrou L, Nieman LK. Nighttime salivary cortisol: a useful test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4515-21.
98. Yanovski JA, Cutler Jr GB, Chrousos GP, Nieman LK. Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexametasone administrations. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's syndrome. *JAMA*

1993;269:2232-8.

99. Isidori AM, Kaltsas S, Mohammed S, Monis DG, Jenkins P, Chew SL, et al. Discriminatory value of the low dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5299-306
100. Newell-Price J, Morris DG, Drake WM, Korbonits M, Monson JP, Besser GM, et al. Optimal response criteria for the human CRH test in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1640-5.
101. Oldfield EH, Dopmann JL, Nieman LK, Chrousos GP, Miller DL, Katz DA, et al. Petrosal sinus sampling with and without corticotropin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 1991;325: 897-905.
102. Moro M, Putignano P, Losa M, Invitti C, Maraschini C, Cavagnini F. The desmopressin test in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing's state. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 3569-74.
103. Findling JW, Raff H. Newer diagnostic techniques and problems in Cushing's disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:191-210.
104. Rees DA, Hanna FW, Davies JS, Mills RG, Vafidis J, Scanlon MF. Long-term follow up results of transfenoidal surgery for Cushing's disease in a single centre using strict criteria for remission. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56:541-51.
105. Estrada J, Boronat M, Mielgo M, Magallón R, Millán I, Díez J, et al. The long term outcome of pituitary irradiation after unsuccessful transphenoidal surgery in Cushing's disease. *N Engl J Med* 1997;336: 172-7
106. Estrada J, García-Uría J, Lamas C, Alfaro J, Lucas T, Díez S, et al. The

complete normalization of the adrenocortical function as the criterion of cure after transphenoidal surgery for Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5698-9.

107. Nieman LK. Medical therapy of Cushing's disease. *Pituitary* 2003;5:77-82.

108. CM Plotz, CM AI Knowlton, C Ragan. The natural history of Cushing's syndrome. *Am J Med*, Nov 1952; 13(5): 597-614.

109. J. Lindholm, S. Juul, J. O. L. Jørgensen, J. Astrup, P. Bjerre, U. Feldt-Rasmussen, C. Hagen, J. Jørgensen, M. Kosteljanetz, L. Ø. Kristensen, P. Laurberg, K. Schmidt, and J. Weeke. Incidence and Late Prognosis of Cushing's Syndrome: A Population-Based Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Jan 2001; 86: 117 - 123.

110. M Reincke. Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, Mar 2000; 29(1): 43-56.

111. B Catargi, V Rigalleau, A Poussin, N Ronci-Chaix, V Bex, V Vergnot, H Gin, P Roger, A Tabarin. Occult Cushing's Syndrome in Type-2 Diabetes- *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Dec 2003; 88: 5808 - 5813.

112. G Leibowitz, A Tsur, SD Chayen, M Salameh, I Raz, E Cerasi, and DJ Gross Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, Jun 1996; 44(6): 717-22.

113 Miyamori, K Iki, and R Takeda Pre-clinical Cushing's syndrome: report of a case and the review of the literature. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, Jan 1994; 70(1): 25-30.

-
- 114 S Ouzounian, F Tissier, H Gouya, M Kujas, A Louvel, P Legmann, and X Bertagna. Cushing's syndrome and adrenal adenoma. Two surprising associations. *Presse Med*, Apr 2005; 34(7): 511-5.
115. S Midorikawa, H Sanada, S Hashimoto, T Suzuki, T Watanabe, and H Sasano. Analysis of cortisol secretion in hormonally inactive adrenocortical incidentalomas: study of in vitro steroid secretion and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes. *Endocr J*, Apr 2001; 48(2): 167-74.
116. John Newell-Price, Peter Trainer, Michael Besser, and Ashley Grossman The Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome and Pseudo-Cushing's States. *Endocr. Rev.*, Oct 1998; 19: 647 - 672.
117. G. Arnaldi, A. Angeli, A. B. Atkinson, X. Bertagna, F. Cavagnini, G. P. Chrousos, G. A. Fava, J. W. Findling, R. C. Gaillard, A. B. Grossman, B. Kola, A. Lacroix, T. Mancini, F. Mantero, J. Newell-Price, L. K. Nieman, N. Sonino, M. L. Vance, A. Giustina, and M. Boscaro. Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Dec 2003; 88: 5593 - 5602.
118. A. Wayne Meikle, James Findling, Mark M. Kushnir, Alan L. Rockwood, Gordon J. Nelson, and Alan H. Terry. Pseudo-Cushing Syndrome Caused by Fenofibrate Interference with Urinary Cortisol Assayed by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Aug 2003; 88: 3521 - 3524.
119. C Invitti, F Pecori Giraldi, A Dubini, M De Martin, and F Cavagnini Increased urinary free cortisol and decreased serum corticosteroid-binding globulin in polycystic ovary syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)*, Jul 1991; 125(1): 28-32.

-
120. Cecilia Invitti, Francesca Pecori Giraldi, Martina De Martin, and Francesco Cavagnini. Diagnosis and Management of Cushing's Syndrome: Results of an Italian Multicentre Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Feb 1999; 84: 440 - 448.
- 121 Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism*. 1979;28:955-977.
- 122 Corcuff JB, Tabarin A, Rashedi M, et al. Overnight urinary free cortisol determination: a screening test for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48:503-508.
- 123 Miller J, Crapo LM. The biochemical diagnosis of hypercortisolism. *Endocrinologist*. 1994;4:7-16.
- 124 Raff H, Findling JW. A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome. *Ann Intern Med*. 2003;138:980 -991.
- 125 Born J, Fehm HL. Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106:153-163.
- 126 Stewart PM. The adrenal cortex. In: Larsen PRKH, Melmed S, Polonsky KS, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2003:491-551.
- 123127 Dimitris A. Papanicolaou, Jack A. Yanovski, Gordon B. Cutler, Jr., George P. Chrousos, and Lynnette K. Nieman. A Single Midnight Serum Cortisol Measurement Distinguishes Cushing's Syndrome from Pseudo-Cushing States *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Apr 1998; 83: 1163 - 1167.

-
- 126.128 Dimitris A. Papanicolaou, Nancy Mullen, Ioannis Kyrou, and Lynnette K. Nieman. Nighttime Salivary Cortisol: A Useful Test for the Diagnosis of Cushing's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Oct 2002; 87: 4515 - 4521.
- 129 Newell-Price J, Trainer P, Perry L, et al. A single sleeping midnight cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;43:545-550.
- 130 Gorges R, Knappe G, Gerl H, et al. Diagnosis of Cushing's syndrome: re-evaluation of midnight plasma cortisol vs urinary free cortisol and low-dose dexamethasone suppression test in a large patient group. *J Endocrinol Invest*. 1999;22:241-249.
- 131 Pikkarainen L, Alfthan H, Markkanen H, et al. Midnight serum cortisol: comparison of healthy volunteers and hospitalized patients with Cushing's syndrome. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62:357-360.
- 132 Putignano P, Toja P, Dubini A, et al. Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4153- 4157.
- 133 Putignano P, Bertolini M, Losa M, et al. Screening for Cushing's syndrome in obese women with and without polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2003;26:539 -544.
- 134 Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, Ricós C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997; 34:8-12.
- 135 Simon K. Chiu, Christine P. Collier, Albert F. Clark. Salivary cortisol on Roche Elecsys immunoassay system: pilot biological variation studies. *Clin Biochem* 2003; 36:211-214.

136 Variación Biológica: De la teoría al práctica. Callum G. Fraser. AACPres Myo
2003.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el tribunal en el día de la fecha, integrado por los abajo firmantes, para evaluar la tesis doctoral de D. ANTONIO LEON JUSTEL

titulada *Evaluación de la rentabilidad Diagnóstica (eficacia-coste) de la determinación del cortisol en saliva en el diagnóstico del Síndrome de Cushing* acordó otorgarle la calificación de

Sevilla, a 31 de mayo de 2007

Vocal,

Presidente,

Vocal,

Secretario,

Vocal,

Doctorando,