

Validação laboratorial do teste de cortisol salivar e índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã no Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto

Artigo de Investigação Médica

6º Ano - Mestrado Integrado em Medicina - 2010/2011
Unidade Curricular Dissertação / Projecto / Relatório de Estágio
Responsável: António Martins da Silva

Área de Investigação: Endocrinologia

Autor: António Miguel Araújo Ferreira

-Aluno 6º Ano MIM ICBAS/HSA-CHP – tomiguelmail@gmail.com

Orientadora: Profª Doutora Maria Helena Cardoso

-Chefe de Serviço no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo no HSA-CHP
– helenacardoso@icbas.up.pt

Co-Orientador: Dr. José Carlos Oliveira

-Director do Serviço de Química Clínica do HSA-CHP - director.sqc@hgsa.min-saude.pt

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Helena Cardoso pela competência e sentido didáctico com que orientou esta tese, por todo o tempo que generosamente me dedicou, pela sua enorme capacidade de trabalho pois são raras as pessoas que conheço tão activas o que me dá motivação extra para o meu futuro profissional e, muito importante, por toda a simpatia e boa disposição.

Ao Doutor José Carlos Oliveira pelos úteis ensinamentos, disponibilidade e paciência que teve comigo das inúmeras vezes que o incomodei com dúvidas e “pequenos” favores, obtendo sempre como resposta novos conhecimentos e simpatia.

À D. Cláudia e à Técnica Júlia pela simpatia e toda a ajuda que me prestaram na realização desta tese. Tiveram um sorriso para me dar sempre que algo não estava a correr pelo melhor.

Aos elementos do Serviço de Química Clínica que participaram directa ou indirectamente neste trabalho, pela simpatia e atenção com que me recebiam das inúmeras vezes que lá recorri.

A todos os voluntários que participaram neste estudo, um bem haja.

Aos meus Amigos, por estarem sempre a meu lado e pelo apoio incondicional.

À Ângela por todo o amor, amizade e compreensão.

À minha Família, Pai, Mãe e André, sem eles nunca teria a possibilidade de realizar esta tese ou este curso.

Resumo

Introdução: Apesar da baixa prevalência do Síndrome de Cushing, a suspeita clínica é frequente devido a sintomas comuns como obesidade, hipertensão, hirsutismo, perturbações menstruais, osteoporose, impotência, distúrbios psiquiátricos ou astenia. Tendo em conta a dificuldade no diagnóstico é necessária verificação bioquímica, onde os testes laboratoriais adquirem grande importância. No Hospital Santo António-CHP, os intervalos de referência propostos para a técnica do cortisol salivar e índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã encontram-se dependentes de validação interna.

Objectivos: Validação dos valores de referência, encontrados na literatura, para os exames do cortisol salivar e do índice cortisol/creatinina na urina nocturna numa população de indivíduos saudáveis.

Metodologia: Participaram neste estudo 37 indivíduos saudáveis e 5 doentes com Síndrome de Cushing. Foram medidos o índice cortisol/creatinina na urina nocturna e os níveis de cortisol salivar às 23h-24h e 07h-08h por método ECLIA (Roche Diagnostics) num analisador Cobas e411.

Resultados: Os intervalos de referência determinados para o índice cortisol/creatinina foram de 1,940-21,026 nmol/mmol de Creatinina; para o cortisol salivar entre as 23h-00h de 0,0318 - 0,3761 µg/dL; e para o cortisol salivar entre as 07h-08h de 0 - 1,069 µg/dL. As medições de cortisol salivar confirmaram a presença do ciclo circadiano do cortisol na população de referência e uma interrupção deste ciclo nos doentes com Síndrome Cushing, apresentando valores de cortisol nocturno significativamente aumentados. Para um valor de cut-off de 0,371 µg/dL no teste do cortisol salivar nocturno, obteve-se 100% de sensibilidade e 97% de especificidade.

Conclusões: Na amostra estudada, os valores de referência determinados para o teste de cortisol salivar ao deitar (23-24h) e ao levantar (07-08h), e do índice cortisol/creatinina na urina nocturna foram concordantes com os recomendados na literatura, permitindo o início da utilização dos valores da literatura no HSA-CHP. Devido ao tamanho reduzido da amostra de doentes não foi possível retirar conclusões definitivas sobre o valor de cut-off determinado para o diagnóstico de Síndrome de Cushing.

PALAVRAS-CHAVE: Cortisol Salivar, Índice cortisol/creatinina, hipercortisolismo, intervalos de referência, Síndrome de Cushing

Abstract

Introduction: Despite the low prevalence of Cushing's syndrome, clinical suspicion is often due to common symptoms such as obesity, hypertension, hirsutism, menstrual disorders, osteoporosis, impotence, psychiatric disturbances and asthenia. Given the difficulty in diagnosing biochemical verification is required, where the laboratory tests acquire great importance. At Hospital de Santo António-CHP, the reference values proposed for the technique of salivary cortisol and cortisol/creatinine ratio in the overnight urine are dependent on internal validation.

Objectives: Validation of the reference values, found in the literature, for the salivary cortisol test and cortisol/creatinine ratio in overnight urine in a population of healthy individuals.

Methodology: 37 healthy subjects and 5 patients with Cushing's syndrome were studied. Cortisol/creatinine ratio in overnight urine and salivary cortisol levels at 23h-24h and 07h-08h were collected and analysed by ECLIA method (Roche Diagnostics) in a Cobas e411 analyzer.

Results: The reference intervals determined for cortisol/creatinine ratio in overnight urine were 1.940 to 21.026 nmol/mmol of creatinine; for salivary cortisol between 23h-00h were 0.0318 to 0.3761 mg/dL; and for salivary cortisol between the 07h-08h were 0 to 1.069 mg/dL. Salivary cortisol measurements confirmed the presence of cortisol circadian rhythm in the reference population and a disruption of this cycle in patients with Cushing's syndrome was reported, with late night cortisol measurements being significantly increased. For a cut-off value of 0.371 mg / dL in the night salivary cortisol test, we obtained 100% sensitivity and 97% specificity.

Conclusions: In this sample, the reference values determined for salivary cortisol at bedtime (23-24h), morning time (07-08h), and the cortisol/creatinine ratio in overnight urine were consistent with those recommended in the literature, allowing the use of these values in the HSA-CHP. Due to the small sample size of patients it was not possible to draw definitive conclusions about the cut-off value determined for the diagnosis of Cushing's syndrome.

KEYWORDS: Salivary Cortisol; Cortisol/creatinine ratio, hipercortisolism, reference ranges, Cushing's Syndrome

Índice

Introdução	1
Material e Métodos	4
População.....	4
Metodologia.....	5
Análise Estatística.....	6
Resultados	7
Discussão	12
Bibliografia.....	15
Anexos	
Anexo I	18
Anexo II	19
Anexo III	20
Anexo IV	21

Introdução

O cortisol é um glucocorticosteróide produzido pela glândula supra-renal, essencial nos mecanismos de resposta ao stress. Desempenha também um importante papel na regulação da pressão arterial, sistema imune e do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras. O cortisol circula no plasma como cortisol livre, cortisol ligado às proteínas e metabolitos do cortisol. O cortisol livre é a hormona fisiologicamente activa, não está ligada às proteínas e, portanto, pode actuar directamente nos locais teciduais. Em condições normais, menos de 5% do cortisol circulante é livre. Apenas o cortisol não ligado e os seus metabolitos são filtrados no glomérulo, sendo excretadas quantidades aumentadas de esteróides livres na urina em estados caracterizados por hipersecreção de cortisol (Melmed and Jameson, 2005).

Apesar da baixa prevalência de Síndrome de Cushing, a suspeita clínica é frequente devido a sintomas comuns como obesidade, hipertensão, hirsutismo, perturbações menstruais, impotência, distúrbios psiquiátricos, astenia ou osteoporose (Orth, 1995). Como consequência da dificuldade em identificar doentes com hipercortisolismo endógeno com base somente nas características clínicas, os testes de laboratoriais adquirem grande importância.

O diagnóstico de Síndrome de Cushing exige verificação bioquímica de hipercortisolismo endógeno (Melmed and Jameson, 2005), portanto o primeiro passo no rastreio é verificar a elevação patológica dos níveis de cortisol, inferindo assim uma alteração anormal do ritmo circadiano do cortisol.

Em indivíduos normais e numa situação sem stress, os níveis de cortisol plasmático têm pico máximo de manhã e valores mínimos por volta da meia-noite ($<50\text{nmol/L}$; $<2\text{mg/dL}$). Nos doentes com Síndrome de Cushing este ritmo não se verifica, podendo os valores matinais do cortisol sérico encontrar-se dentro do normal, enquanto os valores nocturnos estão aumentados ($>7,5\text{mg/dL}$ - provável diagnóstico de Cushing) (Stewart, 2008). Na prática, o uso do cortisol plasmático total para avaliação do ritmo circadiano é fonte de grande quantidade de falsos positivos pois os valores do cortisol plasmático são alterados pelo stress da venopunção, doença intercorrente e o internamento inerente, pelo que não é usado como teste de rastreio. Para além destes factores, como mais de 90% do cortisol se encontra ligado a proteínas, qualquer situação que altere o equilíbrio das mesmas como a gravidez ou fármacos, vai alterar os

valores deste teste. Stewart (2008) afirma que não é prático nem económico manter um doente internado 48h para realizar este teste na ausência de stress.

A European Society of Endocrinology recomenda a utilização de um de quatro testes para o screening de S. Cushing: cortisol livre na urina de 24h, cortisol salivar às 24h, teste de supressão com 1 mg de dexametasona ou o teste de supressão com 2 mg de dexametasona em 48h (Liemann et al. 2008)

O cortisol livre urinário de 24h permite inferir o cortisol livre plasmático (Stewart, 2008) e é um dos testes utilizados no HSA-CHP para diagnóstico de S. Cushing. Quando os níveis de cortisol plasmático aumentam, a capacidade de ligação da transcortina (globulina transportadora de cortisol) é saturada, aumentando assim a excreção urinária de cortisol livre. Findling and Raff (2005) concluem que apesar da capacidade de traduzir o cortisol circulante activo e de ter sido considerado o gold standard para rastreio de Cushing, o facto da colheita decorrer durante 24h torna-o num método sujeito a muitos erros, originando falsos-negativos. Apesar da sua utilidade para diagnóstico, o teste de cortisol livre urinário pode ser normal em 8-15% dos doentes com síndrome de Cushing (Arnaldi et al. 2003; Findling and Raff 2005).

Cronin C. (1990), Newell-Price et. al (1998) e Arnaldi G et. al (2003) identificaram o teste de supressão com dexametasona como um teste útil para o rastreio de S. Cushing. Meikle AW, et al. (1982) e Isidori AM, et al. (2003) demonstraram que o teste de supressão com dexametasona tem uma sensibilidade elevada (95%), no entanto apresenta baixa especificidade. Wood et al. (1997), Findling et al. (2004) avaliaram a sensibilidade deste teste como exame de rastreio e demonstram que múltiplas variáveis, como respostas inconstantes à dexametasona e métodos de análise heterogéneos podem condicionar um aumento de falsos negativos. O internamento hospitalar, por vezes necessário, pode elevar os custos de realização deste teste.

Novas técnicas de rastreio fidedignas, de fácil colheita, não invasivas, não dolorosas, que evitam o stress prévio à colheita e permitem o rastreio do S. Cushing, como o cortisol salivar e o índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã, estão disponíveis e podem ser uma alternativa. Arnaldi et al. 2003; Raff et al. 1998; Yaneva 2003, demonstraram que o teste do cortisol salivar à meia-noite é um teste válido para rastreio de Síndrome de Cushing apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 96% para um cut-off de 2.0ng/mL de cortisol; não é afectado por alterações das proteínas pois não é conjugado, estando assim em equilíbrio com o cortisol livre plasmático; e é independente da taxa de produção salivar (Bolufer et al. 1989; Read et

al. 1990). Findling and Raff, 2005; Sakihara et al 2010 concluem que o teste do cortisol salivar permite inferir directamente o cortisol livre circulante e tem resultados superiores aos restantes testes de diagnóstico, sendo muito mais fácil e prático de realizar. Nieman (2009) classifica o teste de cortisol salivar como muito útil no diagnóstico de S. Cushing cíclico pela facilidade de colheita e por permitir colheitas seriadas durante um determinado período de tempo sem alterar a rotina diária do doente, pois as amostras salivares podem permanecer 1 semana à temperatura ambiente, permitindo o envio durante este período para laboratório por correio, sem perda da actividade do cortisol (Wood, 2009).

O índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã baseia-se na premissa de que o período em que ocorre maior variação dos níveis de cortisol em qualquer indivíduo saudável é durante a noite. Corcuf e colaboradores (1998) demonstraram que este exame pode ser particularmente útil quando se suspeita de Cushing cíclico, sendo fácil e simples de realizar. O valor proposto para o diagnóstico de S. Cushing é um índice superior a 25 nmol cortisol/mmol de creatinina (Stewart, 2008).

Cohen (2006) e DeSantis (2007) demonstraram que os valores de cortisol variam de população para população. Wood (2009) recomenda a determinação dos intervalos de referência para a população na qual o teste será utilizado.

No HSA-CHP, os valores de referência propostos para a técnica do cortisol salivar foram obtidos através da revisão da literatura (Beko, 2009) e a sua utilização encontra-se dependente de validação interna. Como tal, o presente trabalho de investigação tem como objectivo a validação dos intervalos de referência, encontrados na literatura, para os exames do cortisol salivar e do índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã (nocturna).

Como objectivo secundário pretendeu-se confirmar a utilidade do teste de cortisol salivar às 24:00h e do índice cortisol/creatinina na urina nocturna no diagnóstico de doentes com Síndrome de Cushing.

Material e Métodos

O presente estudo decorreu entre Novembro de 2010 e Junho de 2011. O projecto do estudo, consentimento informado (Anexo I), formulário de dados (Anexo II e III) e informação aos participantes foram aprovados pela Comissão de Ética para a Saúde. Todos os participantes deram consentimento informado.

População

Grupo de Referência: Os participantes (N=37, 13 homens e 24 mulheres com idades compreendidas entre 18-65 anos) foram recrutados através de amostragem por conveniência dos funcionários do HSA-CHP, alunos do ICBAS e seus familiares. Para o grupo de referência foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: indivíduos entre os 18 e os 65 anos que dêem o seu consentimento informado; e como critérios de exclusão os seguintes: indivíduos com doença psiquiátrica, doença endócrina conhecida, obesos, hábitos alcoólicos marcados, dor crónica, síndrome de ovários poliquísticos e distúrbios do sono, doença hepática, administração recente ou passada de glucocorticoides, hormona tiroideia ou insulina, evidência de lesões sangrantes na cavidade oral ou nasal, história clínica de infecção aguda, ciclo sono-vigília alterado e sintomatologia sugestiva de Cushing. Os participantes responderam a um inquérito (Anexo II) com a finalidade de excluir clínica compatível com Síndrome de Cushing, estados clínicos sugestivos de pseudo-Cushing ou possíveis condições capazes de alterar o ciclo de cortisol endógeno. Foram recolhidas urinas de 24 horas de modo a confirmar analiticamente a ausência de Síndrome de Cushing e dentro de uma semana, num mesmo dia, duas colheitas de amostras salivares (23:00h-24:00H e 07:00h-08:00h) e uma colheita de urina nocturna de 10 horas. 13 dos participantes foram seleccionados numa primeira fase, anterior ao protocolo de estudo actual, em que não estava incluído o doseamento do índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã e urina de 24 horas, excluindo-se Síndrome de Cushing pela clínica.

Grupo Doentes: A informação foi obtida dos processos hospitalares. No período do estudo foram diagnosticados e seleccionados cinco doentes com Síndrome de Cushing seguidos na consulta externa de Endocrinologia do HSA-CHP. Informação Clínica dos Doentes: 1 com Doença de Cushing tratado cirurgicamente por via

transfenoidal com cura clínica e analítica nos primeiros meses pós cirurgia mas com recidiva dos valores analíticos do cortisol actualmente; 1 com Doença de Cushing tratada cirurgicamente por via transfenoidal, sem critérios de cura. 2 com Doença de Cushing diagnosticada através do teste de estimulação combinada dexametasona-CRH, supressão com alta dose de dexametasona, e ressonância magnética, aguardam tratamento; 1 com Síndrome de Cushing ACTH dependente diagnosticada através do teste de estimulação combinada dexametasona-CRH, supressão com alta dose de dexametasona, sem imagem conclusiva, aguarda cateterismo dos seios petrosos. No estudo foram revistos os resultados dos testes de cortisol salivar às 23-24h e às 07-08h. Num dos doentes apenas foi doseado o cortisol nocturno. Não se obtiveram os resultados da urina nocturna por ausência dos mesmos.

Metodologia

A colheita salivar foi realizada em dispositivo próprio, Sallivete, sendo entregues instruções verbais e escritas (Anexo IV) para realização da mesma (entre as 23:00h-00:00h e 07:00h-08:00h). Foi pedido aos voluntários para repousar uma hora antes da colheita, não ingerir alimentos sólidos e líquidos ou lavar os dentes até 30 minutos antes da colheita pois estas intervenções podem alterar os níveis de cortisol salivar (Wood, 2009). A Sallivete pode ser guardada até 7 dias à temperatura ambiente (Chen et al,1992), no entanto os participantes entregaram o dispositivo no dia da colheita. A saliva é extraída do algodão da Salivette por centrifugação sendo o doseamento do cortisol na saliva realizado através de Imunoensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA) de acordo com as instruções de utilização do fabricante “COBAS e411” (Elecsys and cobas e analyzers, 2008-02, V 13 English).

A colheita de urina de 24 horas e nocturna foi realizada em recipiente próprio para colheita fornecido aos participantes juntamente com instruções verbais e escritas. O doseamento de cortisol foi realizado através da técnica ECLIA. O doseamento de creatinina foi realizado pelo método de Jaffe num analisador Roche Integra 800.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa SPSS® versão 17 e Analyse-it®. A determinação da normalidade das variáveis em estudo foi realizada através do teste Shapiro-Wilk com um $\alpha=0,05$ e da análise gráfica Normal Q-Q plot. A determinação dos intervalos de referência das variáveis com distribuição normal foi determinada pela fórmula Média \pm 2xDP, enquanto que as variáveis com distribuição não normal foram normalizadas por transformação logarítmica e determinados os intervalos de referência por reconversão logarítmica. A verificação da variação do cortisol manhã/noite foi realizada através de teste T para amostras emparelhadas com um $\alpha=0,05$. As variações por género e comparação do cortisol salivar à noite entre doentes/não doentes através do teste não paramétrico Mann-Whitney U com um $\alpha=0,05$. As variações por género e comparação do cortisol salivar de manhã entre doentes/não doentes através do teste t para amostras independentes com um $\alpha=0,05$. O valor cut-off para diagnóstico de Síndrome de Cushing no teste do cortisol salivar à noite, sensibilidade e especificidade foram determinadas através da análise por curva ROC.

Resultados

Caracterização da População e Intervalos de Referência

Para exclusão analítica de Síndrome de Cushing no grupo de referência foi utilizado o teste cortisol livre na urina de 24 horas, obtendo-se nos participantes sujeitos ao teste valores dentro dos limites de referência.

Tabela 1 – Caracterização da população e Intervalos de Referência

Características	Grupo Referência	Grupo Doentes
<i>População</i>	37	5
<i>Género (H/F)</i>	13/24	0/5
<i>Idade (anos)</i>		
18-25	11	0
25-35	9	3
35-55	11	0
55-65	5	2
<i>Cortisol Urina 24h ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)</i>	N=24	
Média \pm Desvio Padrão	42,759 \pm 16,286	
Mediana	46,39	
Intervalo Referência	10,19-75,33	
<i>I.Cortisol/Creatinina (nmol/mmolcreat)</i>	N=24	
Média \pm Desvio Padrão	7,658 \pm 4,500	
Mediana	6,000	
Intervalo Referência Amostra	1,940-21,026	
Intervalo Referência HSA-CHP	0,6 - 17,4	
<i>Cortisol Salivar 23h-24h ($\mu\text{g}/\text{dL}$)</i>	N=37	N=5
Média \pm Desvio Padrão	0,135 \pm 0,118	0,667 \pm 0,359
Mediana	0,105	0,533
Intervalo Referência	0,0318 - 0,3761	
Intervalo Referência HSA-CHP	0,198 - 0,202	
<i>Cortisol Salivar 07h-08h ($\mu\text{g}/\text{dL}$)</i>	N=37	N=4
Média \pm Desvio Padrão	0,523 \pm 0,273	0,582 \pm 0,086
Mediana	0,498	0,608
Intervalo Referência	0 - 1,069	
Intervalo Referência HSA-CHP	0,0 - 0,650	

A tabela I descreve as características gerais da população e os valores obtidos no grupo de referência e doentes. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores do cortisol salivar à noite por género ($p=0,272>0,05$) ou classe etária ($p=0,170>0,05$). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores cortisol salivar da manhã por género ($p=0,415>0,05$) ou classe etária ($p=0,656>0,05$). No teste do índice cortisol/creatinina da urina nocturna não se verificaram diferenças por escalão etário ($p=0,271>0,05$), no entanto verificaram-se variações estatisticamente significativas por género ($p=0,02<0,05$). A tabela II contém os resultados do doseamento cortisol salivar da manhã e noite, índice cortisol/creatinina na urina nocturna e cortisol livre na urina de 24 horas.

Os testes utilizados para determinar os intervalos de referência foram obtidos de acordo com os resultados dos testes de normalidade das variáveis em estudo. Os valores do cortisol salivar entre as 07-08h apresentaram distribuição normal, enquanto os do índice cortisol/creatinina na urina nocturna e do cortisol salivar entre as 23-24h apresentaram distribuição não normal. Os valores de referência calculados no grupo de referência (Tabela 1) para o índice cortisol/creatinina na urina nocturna foram de 1,940-21,026 nmol/mmolCreatinina (Figura 1); para o cortisol salivar entre as 23h-00h de 0,0318 - 0,3761 $\mu\text{g/dL}$ (Figura 2); para o cortisol salivar entre as 07h-08h de 0 - 1,069 $\mu\text{g/dL}$ (Figura 3).

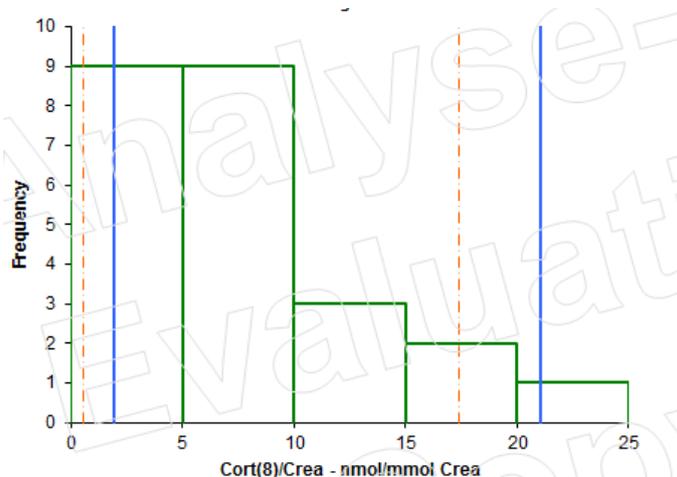


Figura 1 - Intervalo de Referência Índice Cortisol/Creatinina na urina nocturna (nmol cortisol/mmol creatinina): Linha contínua - Intervalos de referência da amostra de referência; Linha descontinua – Intervalos de referência HSA-CHP

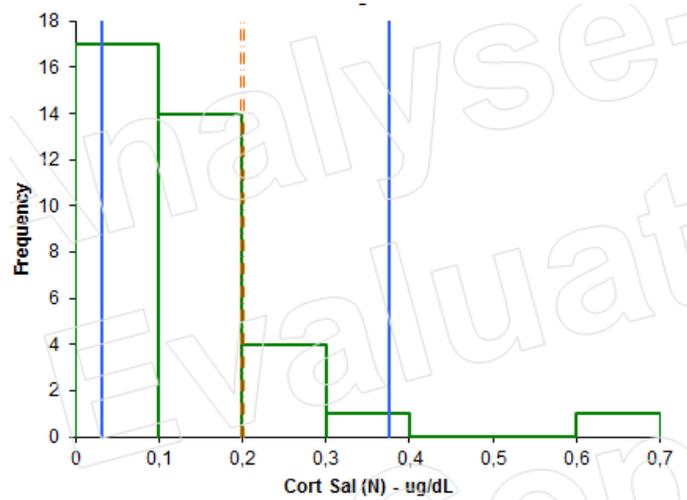


Figura 2 - Intervalo de Referência Cortisol Salivar Noite $\mu\text{g/dL}$ (23h-24h). Linha contínua - Intervalos de referência da amostra de referência; Linha descontinua – Intervalos de referência HSA-CHP

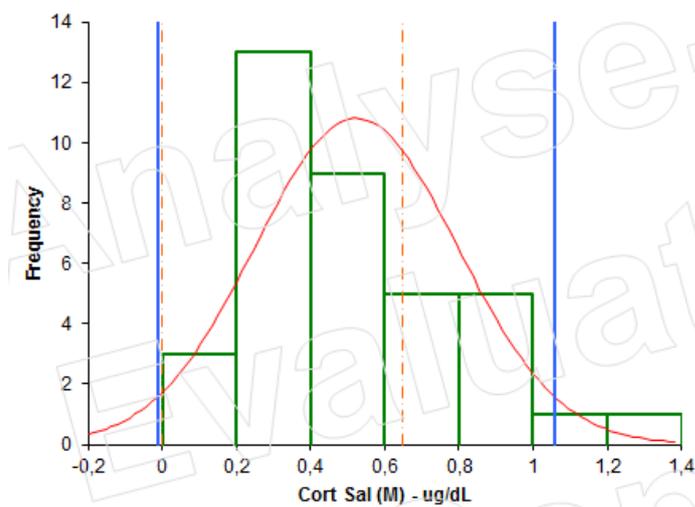


Figura 3 - Intervalo de Referência Cortisol Salivar Manhã $\mu\text{g/dL}$ (07-08h). Linha contínua - Intervalos de referência da amostra de referência; Linha descontinua – Intervalos de referência HSA-CHP

Tabela 2 – Doseamento cortisol salivar manhã e noite, índice cortisol/creatinina na urina nocturna e cortisol livre na urina de 24 horas

Grupo Referência	Cortisol Salivar (µg/dL)		Cortisol Urinário	
	Manhã (07-08h)	Noite (23-24h)	I.Cortisol/Creatinina (nmol/mmolcreat)	Cortisol urina 24h (µg/24h)
1	0,366	0,036	4,29	46,46
2	0,564	0,055	7,11	29,56
3	0,418	0,081	9,08	54,57
4	0,850	0,057	5,13	78,74
5	0,814	0,102	4,02	54,13
6	0,594	0,083	5,68	17,48
7	0,498	0,098	5,35	28,35
8	0,672	0,080	4,66	15,05
9	0,864	0,091	10,58	52,98
10	0,224	0,146	3,67	49,54
11	0,339	0,229	2,92	37,44
12	0,309	0,128	2,17	55,81
13	0,726	0,144	7,80	11,39
14	0,581	0,119	4,03	23,97
15	0,882	0,275	8,72	48,18
16	0,231	0,105	17,10	42,25
17	0,168	0,655	3,83	53,43
18	0,787	0,242	12,41	63,66
19	1,220	0,145	16,88	64,17
20	1,070	0,140	21,14	47,15
21	0,534	0,164	7,13	46,39
22	0,688	0,124	6,31	43,51
23	0,885	0,339	2,70	28,80
24	0,533	0,248	11,08	38,86
25	0,386	0,078		
26	0,352	0,075		
27	0,389	0,040		
28	0,328	0,054		
29	0,018	0,098		
30	0,727	0,138		
31	0,454	0,084		
32	0,364	0,134		
33	0,301	0,084		
34	0,257	0,032		
35	0,145	0,052		
36	0,517	0,142		
37	0,308	0,114		
Grupo Doentes				
1	0,458	0,402		17,4
2	0,611	1,290		256,3
3	0,605	0,475		982,7
4	-	0,533		275
5	0,656	0,634		476

Cortisol Salivar 07h-08h vs Cortisol Salivar 23h-24h no Grupo de referência

Os valores nocturnos e matinais do cortisol salivar no grupo de referência são estatisticamente diferentes ($p=0,000<0,05$), sendo os valores matinais consistentemente superiores aos nocturnos.

Cortisol Salivar 07h-08h vs Cortisol Salivar 23h-24h no Grupo Doentes com Síndrome Cushing

No grupo de doentes com Síndrome de Cushing os valores nocturnos e matinais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p=0,576>0,05$), devido ao aumento dos valores nocturnos.

Grupo Referência vs Grupo S. Cushing no Cortisol Salivar entre as 07h-08h

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,672>0,05$) para os valores de cortisol salivar das 07h-08h entre os dois grupos.

Grupo Referência vs Grupo S. Cushing no Cortisol Salivar entre as 23h-24h

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001<0,05$) para os valores de cortisol salivar das 23h-24h entre o Grupo de Referência e o Grupo dos Doentes com Síndrome de Cushing.

Critérios para diagnóstico Síndrome de Cushing pelo teste cortisol salivar nocturno

O valor da área sob a curva ROC para o cortisol salivar, entre as 23h-24h, é de $0,978\pm 0,022$ (IC 95% 0,00 a 1,0). A partir da curva ROC para um valor de cut-off de $0,371 \mu\text{g/dL}$ o teste de cortisol salivar nocturno apresentou 100% de sensibilidade e 97% de especificidade.

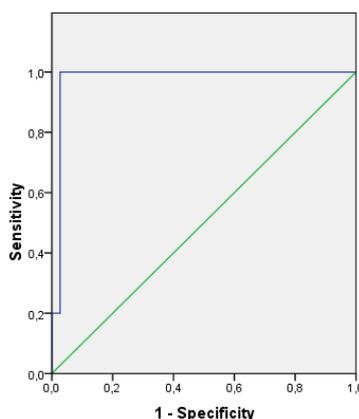


Figura 4 – Curva ROC do teste de Cortisol Salivar entre as 23h-24h para o diagnóstico da Síndrome de Cushing.

Discussão

Comparando os valores de referência determinados na população em estudo com os valores de referência propostos para utilização no HSA-CHP, (obtidos através da revisão de literatura) verificou-se concordância dos intervalos de referência para o índice cortisol/creatinina na urina nocturna e cortisol salivar nocturno. Em relação ao cortisol salivar matinal os valores obtidos foram superiores aos propostos pela literatura, embora o intervalo de referência determinado na nossa amostra inclua esses limites. Este facto poderá ser explicado pelo tamanho reduzido ou características particulares da nossa amostra de referência.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores do cortisol salivar nocturno e cortisol salivar matinal por género e classe etária. No entanto, para o índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã, foi evidente a significância estatística para a diferença dos valores entre homens e mulheres, o que pode sugerir variações do ciclo de cortisol de acordo com o género. Mentzel e Wiedmann (1993) descrevem variações do cortisol plasmático entre elementos de sexo oposto, no entanto são raros os estudos que evidenciam este achado. Deste modo, a escassez de trabalhos que fundamentem este resultado aliada à ausência de diferença entre género para outras variáveis, não permite concluir se este resultado se deve a uma efectiva diferença entre género ou a um achado ocasional.

Na população de referência, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores de cortisol salivar das 23 horas e os valores das 07 horas que são explicadas pela preservação do padrão circadiano do cortisol em indivíduos saudáveis. Para o grupo de doentes com Síndrome de Cushing essa diferença não se verifica, o que evidencia a disrupção do ciclo do cortisol característica desta doença e é justificável pela obtenção de valores elevados de cortisol nocturno. A comparação dos níveis de cortisol às 23h entre os participantes saudáveis e doentes evidenciou diferenças estatisticamente significativas devido à elevação dos valores do cortisol nos doentes, confirmando os resultados esperados. É entre as 23-24h que as concentrações fisiológicas de cortisol são mínimas e a variação entre os valores normais e os de hipercortisolismo patológico são máximos, sendo este o fundamento da utilização do teste do cortisol salivar nocturno.

O valor de cut-off do teste do cortisol salivar nocturno que apresenta maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de Síndrome de Cushing (0,351 $\mu\text{g/dL}$) determinado na população em estudo foi sobreponível ao proposto no HSA-CHP (0,37 $\mu\text{g/dL}$). Através da análise da curva ROC dos valores do teste de cortisol salivar nocturno, para um valor cut-off de 0,371 $\mu\text{g/dL}$ obteve-se uma sensibilidade de 100% e especificidade de 97%. Deste modo, dos 5 participantes do grupo com Síndrome de Cushing todos foram identificados com a doença, enquanto dos 37 participantes saudáveis, apenas 1 foi identificado como doente (Figura 4). No entanto, devido ao reduzido tamanho da amostra de doentes não é possível retirar conclusões definitivas dos resultados.

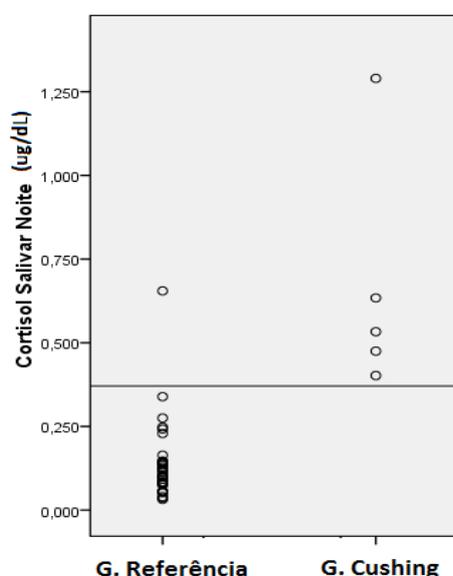


Figura 5 – Distribuição valores do cortisol salivar no grupo de referência e doentes com Síndrome Cushing, A linha horizontal representa o valor cut-off (0,37) para diagnóstico de Síndrome de Cushing determinado por curva ROC.

A tabela III contém dados de dois estudos, em que foi utilizado o método ECLIA, nos quais os autores concluíram que o teste de cortisol nocturno é um excelente método para o rastreio de Síndrome de Cushing. Como se pode constatar, para cada estudo o valor de cut-off determinado foi diferente. Santos RJ, Sobrinho LG et.al (2010), num estudo português realizado no IPO de Lisboa, concluíram que na determinação dos valores de cortisol salivar, o método e modo de colheita variam, sendo essencial que cada laboratório defina os seus valores de referência.

Tabela III – Valores de cut-off para o cortisol salivar nocturno de outros autores

Autores	Cut-off ($\mu\text{g/dL}$)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Yaneva et al. (2003)	0,2250	100	84
Shi et al (2009)	0,5147	93,4	94,2

O presente estudo permitiu a comparação dos valores de referência de uma população seleccionada (onde foram evitados possíveis factores modificadores dos níveis de cortisol, tais como fármacos, ciclo sono-vigília alterado ou outras doenças endócrinas) com os valores sugeridos pela literatura e, deste modo, avaliar a viabilidade do início da sua utilização na rotina médica no HSA-CHP.

O reduzido tamanho da amostra de doentes foi uma importante limitação que inviabiliza a retirada de conclusões definitivas relativas ao valor de cut-off a utilizar para diagnóstico de Síndrome de Cushing. A dificuldade na obtenção de uma amostra significativa de doentes explica-se pela baixa prevalência de Síndrome de Cushing e pelo curto período de duração do estudo. De modo a corrigir este problema seria necessário aumentar a amostra, alargando o período de tempo disponível para a obtenção de potenciais novos casos da doença.

Relativamente ao índice cortisol/creatinina na urina nocturna, não foi possível comparar os doseamentos do grupo de referência com o grupo de doentes com S. Cushing e determinar os valores de cut-off diagnósticos devido à ausência de dados dos doentes.

De modo a obter-se resultados sem factores confundidores oriundos da colheita e processamento das amostras, deveriam ter sido colhidas amostras de urina e saliva em duplicado apesar da evidência, Sakihara et. al (2010), suportar apenas a utilização de uma única amostra.

Em conclusão, na amostra estudada, os valores de referência determinados para o teste de cortisol salivar e índice cortisol/creatinina para diagnóstico de Síndrome de Cushing são concordantes com os valores propostos pela literatura, permitindo o início da utilização dos valores da literatura no HSA-CHP. Devido ao reduzido tamanho da amostra de doentes, não foi possível validar os valores de cut-off para diagnóstico de Síndrome de Cushing no cortisol salivar.

Bibliografia

- Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, et al (2003) Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 88:5593-5602.
- Beko G, Varga I, Glaz E, et al. (2010) Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods. *Clin. Chim. Acta*;411:364-7.
- Chen Y-M, Cintron NM, Whitson PA. (1992) Long-term storage of salivary cortisol samples at room temperature. *Clin. Chem.* 38:304-305.
- Cohen S, Schwartz JE, Epel E, et al. (2006) Socioeconomic Status, Race, and Diurnal Cortisol Decline in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Psychosomatic Medicine*;68:41-50.
- DeSantis AS, Adam EK, Doane LD, et al. (2007) Racial/ethnic differences in cortisol diurnal rhythms in a community sample of adolescents. *Journal of Adolescent Health*;41:3-13.
- Findling JW, Raff H, Aron DC. (2004) The low-dose dexamethasone suppression test: a reevaluation in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* ;89:1222-6.
- Findling JW, Raff H (2005) Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab. Clin. North. Am.* ; 34:385-402.
- HERSHEL RAFF, et.al (1998) Late-Night Salivary Cortisol as a Screening Test for Cushing's Syndrome; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2681-2686, doi 10.1210/jc.83.8.2681
- Isidori AM, Kaldas GA, Mohammed S, et al (2003) Discriminatory value of the low-dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5299-5306.
- Jean-Benoît Corcuf, et.al (1998) Overnight urinary free cortisol determination: A screening test for the diagnosis of Cushing's syndrome; *Clinical Endocrinology* 48, 503-508

- Jinetz-Mentzel L. And Wiedemann, Gudrun (1993), Establishment of reference ranges for cortisol in neonates, infants, children and adolescents; Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem. Vol. 31, pp 525-529
- Leibowitz G, Tsur A, Chayen SD, et al. (1996) Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic subjects. Clin Endocrinol (Oxf). 44:717–722.
- Meikle AW (1982) Dexamethasone suppression tests: usefulness of simultaneous measurement of plasma cortisol and dexamethasone. Clin Endocrinol (Oxf) 1982; 16:401-408.
- Melmed, Shlomo and Jameson, J. Larry (2005) Disorders of the anterior pituitary and hypothalamus In: Kasper et al., Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York, NY:McGraw-Hill; 2005:946.
- Mosnier-Pudar H, Thomopoulos P, Bertagna X, et al. (1995) Long-distance and long-term follow-up of a patient with intermittent Cushing's disease by salivary cortisol measurements. Eur. J. Endocrinol. 133:313–316.
- Newell-Price J et al (1998) The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. Endocr Rev 1998; 19:647-672. Cronin C, et al. (1990) The overnight dexamethasone test is a worthwhile screening procedure. Clin Endocrinol (Oxf) 1990; 33:27-33.
- Nieman, Lynnette et al (2009); Measurement of cortisol in serum and saliva; UpToDate, October 2009, downloaded at May 2011
- Orth DN (1995) Cushing's syndrome.; N Engl J Med 1995;332:791–803
- Stewart, Paul M. (2008) Chapter 14; The Adrenal Cortex, in Kronenberg, Henry M. et.al; Williams Textbook of Endocrinology, 11th ed.; Philadelphia, PA 19103-2899
- Raff H, Raff JL, Findling JW (1998) Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:2681-2686.
- Sakihara, Satoru, Kageyama, Kazunori (2010) Evaluation of Plasma, Salivary, and Urinary Cortisol Levels for Diagnosis of Cushing's Syndrome; Endocrine Journal, 57 (4), 331-337

- Shi SR, Gan W, Zhou XT, et al. (2009) Diagnostic value of salivary cortisol in cushing's syndrome. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009;40:298e301.
- Wood PJ, Barth JH, Friedman DB, et al. (1997) Evidence for the low dose dexamethasone suppression to screen for Cushing's syndrome—recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem* 1997;34:222–9.
- Wood, Peter; Salivary steroid assays – research or routine? (2009) *Annals of Clinical Biochemistry* 2009: 46: 183-196
- Yaneva M, Kirilov G, Zacharieva S. (2009) Midnight salivary cortisol, measured by highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay, for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Cent Eur J Med* 2009;4:59e64.
- Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugue M, et al: (2003) Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 89:3345-3351.

ANEXO I

Eu, António Miguel Araújo Ferreira, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS e HGSA, no âmbito unidade curricular “Dissertação / Projecto / Relatório de Estágio” do Mestrado Integrado em Medicina estou a realizar sob supervisão e orientação da Prof. Dra. Maria Helena Cardoso, Chefe Serviço do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, e em colaboração com o Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo e o Serviço de Química Clínica deste Hospital, um estudo científico, no qual sou o investigador principal, em que se pretende validar a técnica de cortisol salivar e o índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã no Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

Com essa finalidade, gostaríamos de poder contar com a sua colaboração através da colheita de amostras salivares, à noite antes de dormir e ao acordar, e de uma amostra da primeira urina da manhã. Além das colheitas realizaremos um breve questionário relativo a alguns dados pessoais e clínicos. A resposta a este questionário ocupará no máximo 2 minutos do seu tempo e é absolutamente confidencial. Os resultados que obtivermos serão avaliados respeitando a confidencialidade dos dados. A participação neste estudo não terá custos para os participantes.

A realização deste estudo foi autorizada pelo Hospital, mas só responde se quiser e ao que quiser.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____
aceito participar no estudo sobre “Validação laboratorial do teste de cortisol salivar e índice cortisol/creatinina na primeira urina da manhã no Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto”, tendo sido informado de como vai decorrer o estudo e que a confidencialidade de toda a informação que der a meu respeito será respeitada.

Assinatura do Aluno:

Porto, ____ de _____ de 2011

ANEXO II

Participante nº _____

-----Formulário nº1 – Caracterização Participante-----

(A aplicar ao Grupo de Referência)

Idade _____ Sexo _____ Data / / _____.

Peso _____ Altura _____ IMC _____.

	Sim	Não
Sintomatologia sugestiva de Cushing		
Glucocorticoides, hormona tiroideia, insulina		
Doença psiquiátrica		
Doença endócrina		
Hábitos alcoólicos		
Dor crónica		
História doença ginecológica		
Distúrbios do sono		
Doença hepática		
Lesões sangrantes na cavidade oral ou nasal		
Sintomatologia de Infecção aguda		

Assinatura do Aluno:

Porto, ____ de _____ de 2011

ANEXO III

ANEXO IV

Instruções para colheita de saliva para análises

Data da colheita: / / ; Hora da colheita da noite: ___H___M

Hora da colheita da manhã: ___H___M

- Não deve tocar com os dedos no algodão onde vai ser feita a colheita. Para colocar o algodão na boca basta destapar o tubo de plástico e incliná-lo de forma a que o algodão seja transferido directamente para a boca.

Da mesma forma, após a colheita o algodão deve ser devolvido ao tubo de plástico que o transporta sem o auxílio das mãos.

Tapar o tubo de plástico após a colheita e guardá-lo à temperatura ambiente, evitando a exposição à luz solar directa. Não guardar em locais onde possa haver aumento da temperatura como no porta-luvas do automóvel. Não deixar o recipiente dentro do automóvel (pelas temperaturas atingidas no interior do habitáculo quando exposto ao sol ou nos períodos de calor).

- Mastigar o algodão durante 2 minutos e durante mais 1 ou 2 minutos adicionais, colocá-lo debaixo da língua de forma a ficar embebido em saliva.

Colocar o algodão no tubo de plástico de acordo com as instruções acima descritas.

- Não usar baton ou cremes labiais na hora da colheita.

- Não deve ser feito nenhum tratamento dentário nas 24h que antecederam a colheita.

- A colheita da manhã deve ser realizada logo após o acordar, na posição sentada, ainda antes de se levantar da cama.

- Na colheita da noite, entre as 23 e 24h, deve permanecer em repouso durante 1 hora antes da colheita.

- Não esquecer: nos 30 minutos anteriores à colheita não lavar ou escovar os dentes, não usar fio dental, não palitar os dentes, não comer, não beber outras bebidas que não a água, nem mascar pastilha elástica.

Instruções para colheita de urina para análises

Colheita Urina 24h:

-A colheita de urina de 24h consiste em recolher toda a urina entre uma dada hora de um dia e a mesma hora do dia seguinte. À hora de início apenas esvazia a bexiga, rejeitando essa urina e a partir daí junta toda a urina até à mesma hora do dia seguinte, inclusive. Portanto, rejeita a urina da altura em que inicia a recolha e aproveita toda a urina inclusive a do momento em que termina.

Colheita Urina Nocturna:

-Na colheita de urina da noite recolhe a urina entre as 22h e as 08h da manhã, portanto às 22h urina e rejeita a urina e a partir daí até às 08h da manhã inclusive junta toda a urina.