

INSUFICIENCIA SUPRARRENAL RELATIVA EN PACIENTES CIRRÓTICOS

FEDERICO OROZCO¹, MARÍA ANDERS¹, JOSÉ MELLA¹, FLORENCIA ANTINUCCI¹, PATRICIA PAGANO², PAULA ESTEBAN², MARIANO CARTIER³, GUSTAVO ROMERO³, BETTINA FRANCINI¹, RICARDO MASTAI¹

¹Servicio de Hepatología y Unidad de Trasplante, ²Laboratorio Central, Hospital Alemán,

³Unidad de Hepatología, Hospital Bonorino Udaondo, Buenos Aires, Argentina.

Resumen La insuficiencia suprarrenal relativa (ISR) es frecuente en pacientes cirróticos con sepsis grave, asociándose a un pobre pronóstico. Se desconoce su importancia en condiciones de enfermedad estable. El objetivo del trabajo ha sido evaluar la prevalencia de la ISR en una serie de pacientes cirróticos estables y su relación con el deterioro de la función hepática. Se determinó el impacto de la ISR en la supervivencia y se correlacionaron los niveles entre el cortisol basal en plasma y saliva en sujetos controles y cirróticos. Fueron incluidos 47 pacientes ambulatorios y 16 controles. La funcionalidad del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal se valoró mediante la prueba de estimulación con 250 µg de ACTH sintética EV, definiendo la ISR como delta cortisol < 9 µg/dl. Respecto al grado de deterioro de la función hepática, 22 tenían un Child-Pugh ≤ 8 y 25 pacientes ≥ 9. La prevalencia de ISR fue de un 22%, siendo significativamente más elevada en aquellos con mayor deterioro de la función hepática (8/32 vs. 3/13, p < 0.05). Se observó correlación entre el cortisol salival y el plasmático basal (r = 0.6, p < 0.0004). Por último, la supervivencia fue más elevada en los pacientes sin ISR al año (97%) y a los tres años (91%) que aquellos que desarrollaron esta complicación (79 % y 51%, p < 0.05, respectivamente). En resumen, la prevalencia de ISR es elevada en los pacientes con cirrosis estable y se relaciona con un deterioro de la función hepática y una mayor mortalidad.

Palabras clave: insuficiencia suprarrenal relativa, cirrosis, función hepática, ACTH, supervivencia, Child-Pugh

Abstract *Adrenal insufficiency in cirrhotic patients.* Relative adrenal insufficiency (RAI) is a common finding in cirrhotic patients with severe sepsis, and increased mortality. Its significance is unknown in stable conditions. The aim of this study was to evaluate the prevalence of RAI in stable cirrhotic patients at different stages of the disease. Also, the impact of RAI on the survival was evaluated and basal cortisol levels between plasma and saliva was correlated in control subjects and cirrhotic patients. Forty seven ambulatory patients and 16 control subjects were studied. RAI was defined as a serum cortisol increase of less than 9 µg/dl from baseline after the stimulation with 250 mg of synthetic ACTH. Twenty two had Child-Pugh ≤ 8 and 25 ≥ 9. The prevalence of RAI in patients with stable cirrhosis was 22%. A higher incidence of RAI was observed in patients with a Child-Pugh ≥ 9 (8/32) than in those with ≤ 8 (3/13, p < 0.05). A correlation between salivary cortisol and basal plasma cortisol (r = 0.6, p < 0.0004) was observed. Finally, survival at 1 year (97%) and 3 years (91%) was significantly higher without RAI than those who developed this complication (79% and 51%, p < 0.05, respectively). In summary, the prevalence of RAI is frequent in patients with stable cirrhosis and that it is related to the severity of liver disease and increased mortality.

Keywords: relative adrenal insufficiency, cirrhosis, liver function, ACTH, survival, Child-Pugh

El cortisol es una hormona pluripotente fundamental en la adaptación del organismo frente a situaciones de estrés. Asimismo, presenta importantes efectos inmunomoduladores lo que permite proteger al organismo de respuestas inflamatorias exageradas, siendo esencial en el mantenimiento del tono y de la permeabilidad vascular, y potencia los procesos catabólicos, con lo que proporciona energía a los diferentes órganos¹⁻⁵. En la actualidad, se conoce que una producción adrenal inadecuada de cortisol con respecto a las necesidades periféricas, de-

finida como insuficiencia suprarrenal relativa (ISR), se asocia con una mayor incidencia de *shock* resistente a los tratamientos habituales y con una mayor mortalidad en pacientes críticos⁴.

Estudios recientes indican que la ISR es muy frecuente tanto en pacientes con hepatitis fulminante como en cirróticos con *shock* séptico⁶⁻¹⁰. Estos hallazgos han estimulado el uso de hidrocortisona sobre la resolución del *shock* y la supervivencia en una serie consecutiva de pacientes cirróticos con *shock* séptico, demostrando su utilidad sobre ambos parámetros, sugiriendo que el tratamiento de la ISR puede tener un impacto positivo sobre la historia natural del *shock* séptico en la cirrosis hepática¹⁰. Sin embargo, diferentes aspectos diagnósticos y terapéuticos de la ISR en pacientes cirróticos se encuentran aún sin

resolver. Es por ello que el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la prevalencia de la ISR en una serie amplia de pacientes cirróticos estables y su relación con el grado de deterioro de la función hepática. De igual manera, se determinó el impacto de la ISR en la supervivencia de los pacientes cirróticos. Por último, se correlacionó la determinación entre el cortisol basal determinado en plasma y saliva en sujetos controles y cirróticos.

Materiales y métodos

En el presente estudio se incluyeron en forma prospectiva 47 adultos de ambos sexos con diagnóstico de cirrosis estable, definida en forma similar a estudios previos, pacientes ambulatorios, sin sepsis ni alteraciones hemodinámicas significativas^{11, 12}, controlados en los servicios de Hepatología del Hospital Bonorino Udaondo y del Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires. El diagnóstico de cirrosis se basó en criterios histológicos, de laboratorio, clínicos y/o ultrasonográficos. Fueron excluidos aquellos con diagnóstico previo de insuficiencia suprarrenal, cardiopatía previa al diagnóstico de cirrosis, enfermedad de Cushing, terapia con corticoides mayor a un mes y que no haya sido suspendida seis meses previo al ingreso al estudio, daño estructural documentado del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, embarazo y cualquier descompensación clínica aguda de su hepatopatía crónica basal que haya requerido internación o uso de antibióticos dos semanas previas al ingreso al estudio. El protocolo fue aprobado por los comités de ética de ambos hospitales y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado previo al ingreso del estudio.

La gravedad de la insuficiencia hepática fue evaluada mediante la clasificación de Child-Pugh y el índice pronóstico MELD. Los valores utilizados para el cálculo de cada uno de estos índices fueron obtenidos el mismo día en que se evaluó la función suprarrenal. Para la valoración de la ISR se utilizó la prueba de estimulación adrenal con corticotropina o ACTH (Synacthen®), la cual consiste en la determinación de los niveles séricos de cortisol total antes y 60 minutos tras la administración endovenosa de ACTH (250 µg). Una reducción en la respuesta adrenal a la administración de ACTH o delta cortisol < 9 µg/dl, se considera diagnóstico de insuficiencia suprarrenal en pacientes crónicos^{2, 5}. La determinación del cortisol plasmático y salival se realizó mediante el uso de una técnica de electroquimioluminiscencia¹³⁻¹⁷. El coeficiente de variación tanto para el cortisol plasmático como salival fue inferior al 4%. Todas las determinaciones fueron realizadas durante la mañana (7-8 horas) con la intención de evitar la variabilidad del cortisol asociada a su estructura circadiana.

El análisis estadístico fue realizado con el sistema operativo SPSS 17.0 en su versión para Windows. Se analizaron variables cuantitativas con Chi cuadrado y cualitativas o nominales con método de *T-student* (datos pareados y no pareados). Se calculó la correlación de los datos mediante el coeficiente de Spearman. Los resultados fueron expresados en media con sus respectivos desvío o error estándar. El valor de *p* de relevancia estadística fue considerado inferior o igual a 0.5.

Resultados

En la Tabla 1 se expresan las características demográficas y clínicas de los sujetos controles y los pacientes cirróticos. Se incluyeron 47 pacientes y 16 controles; la

totalidad de los pacientes fueron evaluados en forma ambulatoria. El 70% eran varones y 30% mujeres, con una edad promedio 58 ± 10 años. Con respecto al grado de deterioro de la función hepática, 22 pacientes tenían un Child-Pugh ≤ 8 y 25 pacientes ≥ 9 , siendo la media de MELD de 13 ± 4 .

En la Fig. 1 se observan los valores de cortisol plasmático basal, post-ACTH y salival en sujetos controles y pacientes con cirrosis hepática. Los tres valores obtenidos fueron significativamente inferiores en el grupo de pacientes cirróticos que los observados en los sujetos controles. El delta cortisol fue menor a 9 µg/dl en el 22% de los pacientes cirróticos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a los sujetos controles ($p < 0.005$). Asimismo, los pacientes con un mayor deterioro de la función hepática presentaban una prevalencia mayor de ISR, puesto de manifiesto por delta cortisol < 9 µg/dl (Tabla 2). Se observó una correlación significativa entre el cortisol salival y el cortisol plasmático basal con un índice de relación de 0.6 ($p < 0.0004$). Por último, la supervivencia fue significativamente más elevada en los pacientes sin ISR al año (97%) y a los tres años (91%) que aquellos que desarrollaban esta complicación (79 % y 51%, $p < 0.05$, respectivamente) (Fig. 2).

TABLA 1.- Características demográficas y clínicas de los pacientes y grupo control al ingreso del estudio

	Cirrosis (n = 47)	Control (n = 16)
Edad	58 ± 1	48 ± 1
Sexo femenino (%)	14 (30)	10 (62)
Etiología (%)		ND
Alcohol	17 (36)	
Hepatitis C	14 (31)	
Criptogénica	6 (13)	
Cirrosis biliar primaria	4 (8)	
Hepatitis B	2 (4)	
Otras	4 (8)	ND
Child Pugh $\leq 8/\geq 9$ (n)	22/25	ND
Ascitis	21 (44)	ND
Encefalopatía grado I/II	25 (53)	ND
MELD	13 ± 4*	ND
HDL (mg/dl)	44 ± 3	67 ± 3
Na (mEq)	137 ± 4	140 ± 2
Creatinina (mg/dl)	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.3
Albúmina (mg/dl)	3.2 ± 1.1	4.4 ± 2.1
Bilirrubina (mg/dl)	1.8 (0.4-14.4)**	ND
RIN	1.3 (0.6-2)	ND

HDL = Lipoproteínas de alta densidad. Na = Sodio.

* Media ± DE. **Mediana (rango intercuartil); ND: no disponible.

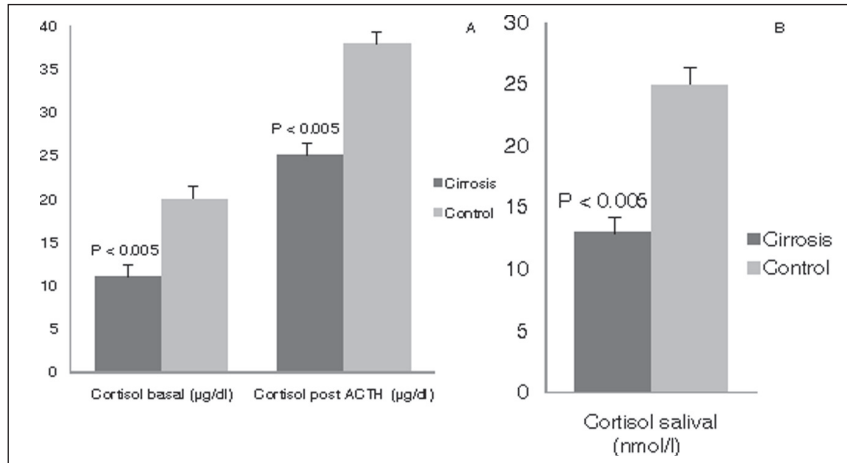


Fig. 1.– Niveles de cortisol plasmático basal, post ACTH (A) y cortisol salival en pacientes cirróticos y sujetos controles (B).

TABLA 2.– Análisis del cortisol en pacientes con diferentes grados de insuficiencia hepática

	Child Pugh ≤ 8 (n = 22)	Child Pugh ≥ 9 (n = 25)	P
Cortisol salival (nM/l)	14 ± 7	13 ± 7*	ns
Cortisol basal (µ/dl)	12 ± 6	10 ± 6	ns
Cortisol post ACTH (µ/dl)	27 ± 1	24 ± 1	ns
Δ < 9 µ/dl: n (%)	3 (13)	8 (32)	< 0.05

* Media ± DE.

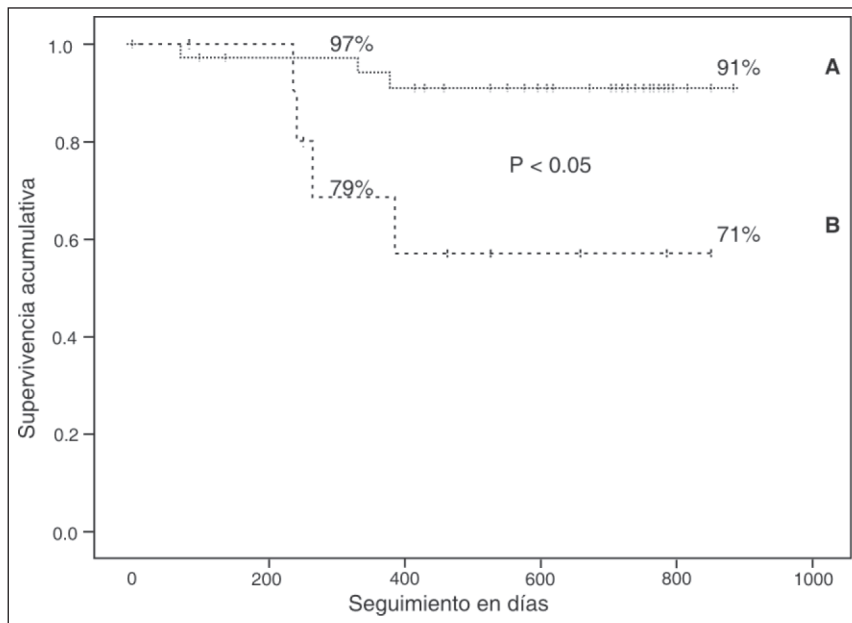


Fig. 2.– Supervivencia en los pacientes con cirrosis sin ISR (A) y con ISR (B).

Discusión

El presente estudio demuestra que la insuficiencia suprarrenal relativa es un hallazgo frecuente en pacientes con cirrosis hepática compensada, y que la misma se relaciona con el grado de deterioro de la función hepática. Asimismo, la presencia de una ISR se asocia a un peor pronóstico.

Hasta la actualidad, no existe un consenso sobre la definición de la ISR. Se reconoce que su diagnóstico no es posible a partir de parámetros clínicos¹⁻⁵, motivo por el cual la determinación, tanto del cortisol basal como el pico de cortisol luego de la prueba de estimulación con corticotropina (ACTH) y el incremento del cortisol son las pruebas más utilizadas para su diagnóstico¹⁻⁵. En nuestro estudio, al igual que la mayoría de los reportes, el diagnóstico de insuficiencia suprarrenal relativa se definió como una reducción en la respuesta a la ACTH (aumento en los valores de cortisol o delta cortisol menor a 9 µg/dl). En los últimos años se ha demostrado que la disfunción adrenal se ha asociado con el desarrollo de *shock* refractario y con una mayor mortalidad hospitalaria en pacientes críticos¹⁻⁵. Más recientemente, se observó que la ISR es un hallazgo muy frecuente en cirróticos con sepsis grave o *shock* séptico⁶⁻¹⁰. Asimismo, la respuesta del cortisol (incremento del cortisol tras la administración de ACTH) se correlacionó en manera inversa con diversos índices pronóstico que evaluaron la gravedad de la enfermedad crítica aplicada a pacientes cirróticos, como el SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), el APACHE III (*Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation III*) y el OSF (*Organ System Failure*)^{7, 18-20}. Por último, la mortalidad, tanto en la terapia intensiva como la intrahospitalaria, fueron significativamente mayores en los pacientes con ISR²⁰. Estos hallazgos evaluados en forma conjunta sugirieron la posibilidad de evaluar los riesgos y beneficios de la administración de corticoides en estos pacientes. En este sentido, estudios de cohortes, dos de carácter retrospectivo y otro prospectivo, fueron dirigidos a evaluar los efectos de la administración de hidrocortisona sobre la resolución del *shock* séptico y la supervivencia hospitalaria^{6, 8, 10}. El estudio de Fernández y col., demostró que la administración de dosis bajas de hidrocortisona en pacientes con *shock* séptico e ISR se asocia con una clara mejoría en la resolución de la hipotensión y la supervivencia¹⁰, sugiriendo que la evaluación y el tratamiento de la disfunción adrenal puede influir en forma positiva sobre la historia natural.

En nuestro estudio, la prevalencia de ISR en pacientes cirróticos estables fue del 22 %, valor similar a estudios reportados previamente^{11, 12}. Asimismo, observamos una correlación positiva con el grado de deterioro de la función hepática expresado mediante la clasificación de Child-Pugh, dando origen según diferentes autores al llamado "síndrome hepato-adrenal"¹¹. El mecanismo de la ISR

en la cirrosis no se encuentra bien definido. Diferentes teorías como la reducción del flujo sanguíneo adrenal, la inhibición de la síntesis adrenal como consecuencia de los valores elevados de citocinas en plasma o las condiciones previas del eje hipotalámico-hipofisiario-suprarrenal han sido sugeridos en los últimos años²²⁻²⁶. Asimismo, se debe tener en cuenta que el colesterol es el principal precursor de la síntesis adrenal de esteroides, de manera que el 80% del cortisol circulante deriva del colesterol plasmático, principalmente del ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL). En nuestro estudio, al igual a lo observado en otras investigaciones, los valores de colesterol total y de cHDL fueron significativamente más bajos (144 ± 5 mg/dl vs. 200 ± 4 mg/dl, $p < 0.005$ y 44 ± 3 mg/dl vs. 67 ± 3 mg/dl, $p < 0.005$, respectivamente).

El valor pronóstico de la ISR en pacientes con cirrosis estable es aún incierto. En el presente estudio se asoció a una mayor mortalidad. Resultados similares han sido recientemente observados por Acevedo y col.²⁷, asociando la ISR al mayor desarrollo de síndrome hepato-renal tipo 1 y sepsis grave. Estos resultados evaluados en forma conjunta sugieren que los pacientes con ISR presentan un peor pronóstico.

Por último, debemos considerar que el cortisol circula en sangre principalmente unido a la proteína ligadora de corticosteroides y a la albúmina, con una cantidad mucho menor de hormona no unida a proteínas (cortisol iónico o libre), que es la responsable de sus efectos metabólicos²⁸⁻³³. En este sentido, se ha sugerido que el desarrollo de ISR puede estar sobreestimado por el estado de hipoalbuminemia en este grupo de pacientes. Sin embargo, la determinación del cortisol salival se considera valiosa, habiendo sido demostrada su correlación con el cortisol libre. En el presente estudio hemos utilizado esta prueba como una forma no invasiva de medir sus niveles^{11, 13-17, 34-36}. Una buena correlación entre ambas determinaciones fue observada en diferentes grados de severidad de la cirrosis, sugiriendo que la determinación de cortisol salival basal puede ser de utilidad en el diagnóstico de la insuficiencia suprarrenal. A pesar de los avances de los últimos años, diferentes aspectos diagnósticos y terapéuticos de la ISR en pacientes cirróticos se encuentran aún sin resolver. Por un lado, el uso de la prueba de estimulación con ACTH presenta importantes variaciones interindividuales, lo que dificulta la diferenciación entre una respuesta adrenal normal o patológica. De igual manera, esta técnica evalúa los valores de cortisol total (cortisol libre más la fracción asociada a proteínas), lo que puede inducir a un falso diagnóstico. Por otra parte, el tipo, la dosis y la duración del tratamiento sustitutivo con esteroides en pacientes cirróticos con ISR aún no ha sido definido.

En resumen, la prevalencia de ISR es elevada en los pacientes con cirrosis compensada y se relaciona con un mayor deterioro de la función hepática. Asimismo, la presencia de ISR se asocia a una mayor mortalidad. La

determinación de cortisol salival puede ser una alternativa en enfermos con diversos grados de hepatopatías.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Laboratorio Novartis la provisión de Synacthen® utilizada en la evaluación de la función adrenal.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

- Maxime V, Lesur O, Annane D. Adrenal insufficiency in septic shock. *Clin Chest Med* 2009; 30: 17-27.
- Cooper M, Stewart P. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. Review Article. *N Engl J Med* 2003; 348: 727-34.
- Bornstein S. Predisposing factors for adrenal insufficiency. Review Article. *N Engl J Med* 2009; 360: 2328-39.
- Marik PE, Pastores SM, Annane D, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008; 36: 1937-49.
- Hamrahian A, Oseni T, Arafah B. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004; 350: 1629-38.
- Marik P, Gayowski T, Starzl T. The hepatoadrenal syndrome: A common yet unrecognized clinical condition [on behalf of the Hepatic Cortisol Research and Adrenal Pathophysiology Study Group] *Crit Care Med* 2005; 33: 1254-9.
- de Jong MF, Beishuizen A, Spijkstra JJ, Groeneveld AB. Relative adrenal insufficiency as a predictor of disease severity, mortality, and beneficial effects of corticosteroid treatment in septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35: 1896-903.
- Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002; 36: 395-402.
- Tsai MH, Peng YS, Chen YC, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006; 43: 673-81.
- Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: Effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006; 44: 1288-95.
- Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, et al. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2011; 54: 243-50.
- Galbois A, Rudler M, Massard J, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010; 52: 839-45.
- Pecori Giraldi F, Ambrogio AG, De Martin M, Fatti L, Scacchi M, Cavagnini F. Specificity of first-line test for the diagnosis of Cushing's Syndrome: assessment in large series. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4123-9.
- Putignano P, Toja P, Dubini A, Pecori Giraldi F, Corsello SM, Cavagnini F. Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening test for Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4153-7.
- Baid S, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman L. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assay to establish hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3102-7.
- Kurd Zerikly R, Amiri L, Faiman C, et al. Diagnostic characteristics of late-night salivary cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 4555-9.
- Raff H. Utility of salivary cortisol measurements in Cushing's Syndrome and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3647-55.
- Hung PD, Sterling RK. Predicting outcome of critically ill patients with cirrhosis admitted to the intensive care unit: who's keeping score? *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 203-5.
- Cholongitas E, Senzolo M, Patch D, et al. Risk factors, sequential organ failure assessment and model for end-stage liver disease scores for predicting short term mortality in cirrhotic patients admitted to intensive care unit. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 883-93.
- Tsai MH, Chen YC, Ho YP, et al. Organ system failure scoring system can predict hospital mortality in critically ill cirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 251-7.
- Cholongitas E, Senzolo M, Patch D, et al. Review article: scoring systems for assessing prognosis in critically ill adult cirrhotics. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 453-64.
- O'Beirne J, Holmes M, Agarwal B, et al. Adrenal insufficiency in liver disease – What is the evidence? Review article. *J Hepatol* 2007; 47: 418-23.
- Borzio M, Salerno F, Piantoni L, et al. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 41-8.
- Theocharidou E, Krag A, Bendtsen F, Moller S, Burroughs AK. Cardiac dysfunction in cirrhosis – does adrenal function play a role? A hypothesis. *Liver Int* 2012; 32: 1327-32.
- Ratanarat R, Cazzavillan S, Ricci Z, et al. Usefulness of a molecular strategy for the detection of bacterial DNA in patients with severe sepsis undergoing continuous renal replacement therapy. *Blood Purif* 2007; 25: 106-11.
- Ruiz-del-Arbol L, Monescillo A, Arocena C, et al. Circulatory function and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 439-47.
- Acevedo J, Fernández J, Prado V, Silva A, et al. Relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis: Relationship to short-term risk of severe sepsis, hepatorenal syndrome, and death. *Hepatology* 2013; 58: 1757-65.
- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 58-68.
- Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990; 11: 5-46.
- Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989; 10: 232-74.
- Mendel CM, Kuhn RW, Weisiger RA, et al. Uptake of cortisol by the perfused rat liver: validity of the free hormone hypothesis applied to cortisol. *Endocrinology* 1989; 124: 468-76.
- Mendel CM, Miller MB, Siiteri PK, Murai JT. Rates of dissociation of steroid and thyroid hormones from human serum albumin. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 245-50.
- Davidson JS, Bolland MJ, Croxson MS, Chiu W, Lewis JG. A case of low cortisol-binding globulin: use of plasma free cortisol in interpretation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis tests. *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 237-9.
- Raff H, Raff J.L, Findling JW. Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2681-6.
- Deutschbom T, Broecker-Preuss M, Flitsch F, et al. Salivary cortisol as a diagnostic tool for hyper and hypocortisolism improved screening by an automated immunoassay. *Endocr Rev* 2011; Vol. 32 (03_Meeting Abstracts) P3-569.
- Carrasco C, García M, Goycoolea M, et al. Reproducibility of late-night salivary cortisol using an automated immunoassay system and performance of one or two sample in the diagnosis of Cushing Syndrome. *Endocr Rev* 2011; Vol. 32 (03_Meeting Abstracts) P3-570.