



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMARCADORES SALIVARES NA SÍNDROME DE CUSHING

Trabalho submetido por
Rafael Fidalgo Mota Longo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

BIOMARCADORES SALIVARES NA SÍNDROME DE CUSHING

Trabalho submetido por
Rafael Fidalgo Mota Longo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Carlos Monteiro

outubro de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Carlos Monteiro por toda a sua ajuda, disponibilidade, trabalho e dedicação, sem a sua colaboração este trabalho não teria sido possível.

Ao Instituto Superior Ciências da Saúde Egas Moniz por estes anos maravilhosos, repletos de aprendizagem profissional e pessoal.

Aos meus pais, Almerinda Longo e Manuel Santos e irmão, Diogo Fidalgo por toda a educação, apoio, carinho e suporte que me deram, acreditando sempre que este trabalho seria possível.

Aos amigos que estiveram sempre a meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, durante este percurso académico.

Resumo

A síndrome de Cushing é um distúrbio metabólico que apresenta uma baixa taxa de incidência. O facto de a síndrome de Cushing ter uma incidência baixa e de alguns dos seus sinais serem facilmente confundíveis com sinais de doenças mais comuns como são os casos de obesidade, diabetes *mellitus* e alcoolismo fazem com que exista por parte da comunidade científica o “desafio” de realizar o diagnóstico. Apesar da baixa incidência apresenta uma elevada mortalidade e morbilidade, isto deve-se na maioria das vezes há presença de doenças cardiovasculares e complicações infecciosas resultantes da síndrome de Cushing.

Os biomarcadores têm sido alvos de vários estudos e hoje são elementos essenciais para a realização do diagnóstico da síndrome de Cushing. Tem existido nos últimos anos uma evolução no seu método de recolha e na utilização de biomarcadores.

A saliva para além de proteger os dentes e de iniciar o processo digestivo, tem sido estudada por conter biomarcadores de doenças como a cárie, cancro, entre outras. Em comparação com a recolha sanguínea, a recolha de saliva tem ganho o seu espaço no diagnóstico de várias doenças por permitir uma recolha de biomarcadores de fácil acesso e não ser tão invasivo para o paciente.

Neste trabalho iremos fazer uma revisão da literatura existente acerca dos biomarcadores que se encontram na saliva e que poderão dar informações importantes no diagnóstico e no tratamento da síndrome de Cushing.

Palavras-chave: Síndrome de Cushing, biomarcador, saliva, cortisol

Abstract

Cushing's syndrome is a metabolic disorder that has a low incidence rate. The fact that Cushing's syndrome has a low incidence and some of its signs are easily confused with the signs of more common diseases such as obesity, diabetes mellitus and alcoholism make the scientific community the "challenge" the diagnosis. Although the low incidence has a high mortality and morbidity, this is most often due to the presence of cardiovascular diseases and infectious complications resulting from Cushing's syndrome.

The biomarkers that have been the targets of studies and are now essential elements for the diagnosis of Cushing's syndrome. There has been an evolution in the collection and use of biomarkers in recent years.

Saliva in addition to protecting the teeth and starting the digestive process, has been studied because it contains biomarkers of diseases, cancer, among others. In comparison to blood collection the saliva has gained its space in the diagnosis of various diseases by allowing a collection of biomarkers easily accessible and not be so invasive to the patient.

In this study we will review the existing literature on the biomarkers found in saliva that could provide important information in the diagnosis and the treatment of Cushing's syndrome.

Keywords: Cushing syndrome, biomarker, saliva, cortisol

Índice Geral

I. Introdução	13
II. Desenvolvimento	17
1. Cortisol	17
1.1 Glândulas suprarrenais	17
1.2 Hormonas Esteroides suprarrenais	19
1.3 Regulação e secreção de glucocorticoides	22
1.3.1 Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal	22
1.3.2 Ritmo circadiano e Stress	23
1.3.3 Retroalimentação negativa	24
1.4 Transporte	26
1.5 Funções	27
1.5.1 Ação anti-inflamatória	27
1.5.2 Proteólise	28
1.5.3 Gliconeogénese	29
1.5.4 Lipólise	30
2. Síndrome de Cushing	31
2.1 Definição	31
2.2 Classificação	32
2.3 Fisiologia	33
2.4 Epidemiologia	35
2.5 Manifestações Clínicas	37
2.5.1. Síndrome de Cushing em crianças	41

2.5.2 Síndrome de Cushing durante a gravidez	42
2.6 Diagnóstico	43
2.6.1 Medição de cortisol livre urinário (CLU).....	44
2.6.2. Teste de supressão do cortisol pela dexametasona em baixas doses.....	46
2.6.3 Teste de Cortisol salivar (TCS)	47
2.6.4 Teste secundário: TSD-CRH	49
2.7. Diagnóstico diferencial	49
2.7.1 Síndrome de Cushing independente ACTH	50
2.7.2 Síndrome de Cushing dependente ACTH	51
2.8 Tratamento da Síndrome de Cushing	53
3. Saliva.....	55
3.1 Glândulas salivares	55
3.2 Secreção	57
3.3. Composição.....	58
3.4 Biomarcadores salivares	58
III. Conclusão	61

Índice de Figuras

Figura 1-Representação dos rins e glândulas suprarrenais	17
Figura 2-Córtex da glândula suprarrenal	18
Figura 3-A síntese das três classes principais de esteroides suprarrenais...	21
Figura 4-Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal.....	23
Figura 5-Representação esquemática do eixo hipotálamo hipófise.....	25
Figura 6-Representação esquemática do cortisol total.....	26
Figura 7-Tradução de glucocorticoides.....	28
Figura 8-Gliconeogénese.....	29
Figura 9-Fotografia de Harvey Cushing	31
Figura 10-Ilustração do hipotálamo e da hipófise.....	34
Figura 11-Proteína POMC	34
Figura 12-Paciente com síndrome de Cushing.	37
Figura 13-TC ao fêmur e coluna de paciente com síndrome de Cushing...	39
Figura 14-Representação das características clínicas	40
Figura 15-Algoritmo de síndrome de Cushing durante a gravidez.....	42
Figura 16-Algoritmo de diagnóstico de síndrome de Cushing.....	44
Figura 17-Gráfico de relação do cortisol salivar /24horas.....	48
Figura 18-TC da zona abdominal.....	50
Figura 19-BIPSS	52
Figura 20-Algoritmo de realização de BPISS.....	52
Figura 21-Fármacos utilizados na síndrome de Cushing.....	54
Figura 22-Representação das glândulas salivares major	56
Figura 23-Mecanismo entre capilar sanguíneo e as glândulas salivares	57

Índice de Tabelas

Tabela 1–Causas de síndrome de Cushing.....	33
Tabela 2-Proporção das causas de síndrome de Cushing	36
Tabela 3-Características clínicas da síndrome de Cushing.....	40
Tabela 4-Síndrome de Cushing em crianças.....	41
Tabela 5-Relação de marcadores salivares com várias patologias.	60

Lista de Siglas

ACTH- Hormona adrenocorticotrópica

AIMAH-Hiperplasia suprarrenal macronodular ACTH independente

CBG-Globulina de ligação a corticosteroides

CRH- Hormona libertadora de corticotrofina

CYP-Citocromo P450

TSD-Teste de supressão de Dexametasona

ECLIA-*Electro-chemiluminescence immunoassay*

ELISA-*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GRE-Elemento de resposta ao glucocorticoide

GR-Recetor de glucocorticoide

HPLC-Cromatografia líquida de alta performance

HPS-Eixo hipotálamo hipófise

HSD-Hidroxistoterodesidrogenase

MR-Recetor de mineralcorticoides

MSH-Hormona estimuladora de melanócito

OMS- Organização Mundial de Saúde

PEP- Fosfoenolpiruvato

PEPCK-Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

POMC-Pró-opiomelanocortina

PPNAD-Doença primária adrenocortical nodular pigmentada primária

RIA-Rádio imuno ensaio

RM-Ressonância magnética

SC-Síndrome de Cushing

Star-Proteína reguladora específica esteroide

TC-Tomografía computadorizada

CLU-Cortisol livre urinário

WHO-*World Health Organization*

ZF-Zona fascicular

ZG-Zona glomerular

ZR-Zona reticular

I. Introdução

Passaram alguns anos desde que o neurocirurgião Harvey W. Cushing descreveu pela primeira vez uma síndrome caracterizada pelo excesso patológico de glucocorticoides. Esta síndrome que ao longos dos anos tem sido alvo de vários estudos e publicações (Newell-price et al., 1998).

Um estudo recente revelou que cerca de 3 a 4% dos indivíduos com diabetes *mellitus* não controlada e com a presença de um fenótipo obeso tem grande possibilidade de vir a sofrer de síndrome de Cushing (Newell-Price, 2009).

A síndrome de Cushing (SC) apresenta maior probabilidade de ocorrer no género feminino (3:1) e o maior número de pessoas afetadas encontram-se dentro de uma faixa etária compreendida entre os 30 e os 40 anos (Steffensen, Bak, Zøylner Rubeck, & Jørgensen, 2010).

A síndrome de Cushing compreende os sinais e os sintomas associados a uma exposição prolongada a níveis elevados de glucocorticoides, nomeadamente o cortisol (Wagner-Bartak et al., 2017). Os glucocorticoides podem ter uma fonte exógena ou endógena. A causa mais comum é a exógena ou iatrogénica que se desenvolve proveniente de corticosteroides prescritos medicamente. A síndrome de Cushing endógena, pode ser causada por excesso da secreção de ACTH (hipófise ou outro tumor ectópico) ou pela superprodução suprarrenal (Nieman et al., 2008). A SC endógena está sub-dividida em dois tipos: ACTH dependente e ACTH independente (Bista & Beck, 2014).

A hormona adrenocorticotrópica é normalmente produzida através da estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. A existência de estímulos de stress e do ritmo circadiano vão promover a secreção de CRH (hormona transportadora de corticotropina) do núcleo hipotalâmico paraventricular para a hipófise anterior através da veia porta hipotalâmica. A CRH (hormona transportadora de corticotrofina) na hipófise anterior vai estimular as células corticotrópicas a produzirem e a libertar a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) para a corrente sanguínea. A ACTH presente no sangue vai estimular as glândulas suprarrenais à síntese e secreção de cortisol (Hatting, Tavares, Sharabi, Rines, & Puigserver, 2017).

A doença de Cushing é causada pela hipersecreção de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) através da ação de um adenoma hipofisário produtor de ACTH (Alwani et al., 2014). O excesso de ACTH que através do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal irá resultar em hipercortisolismo. Quando não diagnosticada e tratada de forma atempada pode levar à morte. Esta doença é responsável por um aumento da morbidade e mortalidade devido às suas complicações como por exemplo: infeções e distúrbios psiquiátricos resultantes da mesma (Bertagna et al., 2009).

Existe ainda a síndrome de Pseudo Cushing que se caracteriza pela presença de uma ou de todas as características clínicas da síndrome de Cushing. O paciente com Pseudo Cushing pode apresentar hipercortisolismo devido ao elevado consumo de álcool ,diabetes não controlada, obesidade e depressão (Papanicolaou, Yanovski, Cutler, Chrousos, & Nieman, 2009)

Uma vez que exista a suspeita de estarmos na presença de um paciente com síndrome de Cushing endógena e depois de confirmado o hipercortisolismo, saber qual a causa da hipersecreção é o próximo passo a realizar no diagnóstico. Contudo o diagnóstico inicial da SC deve ser realizado de forma clara e dos seus resultados não deve resultar qualquer dúvida para posteriormente partir para o diagnóstico diferencial. Pois os resultados dos testes nem sempre são conclusivos e há sempre fatores como características do paciente , uso de medicação e pouca especificidade do ensaio que podem dificultar o diagnóstico e atrasar qualquer necessidade ou cuidado a realizar ao paciente com síndrome de Cushing (Newell-Price, 2009).

Nos casos que apresentam níveis ligeiramente elevados de cortisol, definido como hipercortisolimo leve ou síndrome de Cushing subclínica, a realização do diagnóstico torna-se mais difícil, no entanto têm sido utilizados vários testes baseados na compreensão das características fisiológicas do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal para realizar o diagnóstico da SC. Os três testes mais aceites e mais utilizados são : (CLU) que consiste em medir o cortisol livre presente na urina num período de 24 horas, (TSD) teste de supressão do cortisol com dexametasona em baixas doses e ainda a medição e quantificação de cortisol salivar através da recolha de saliva (Castro & Moreira, 2007).

Os primeiros relatos de mortalidade com síndrome de Cushing descrevem nos anos 50, indivíduos com hipercortisolismo grave (níveis de cortisol elevados) e na sua maioria a morte ocorreu por doença vascular (enfarte do miocárdio, acidente vascular

cerebral) ou complicações infecciosas. Como forma de contrariar essa elevada taxa de mortalidade e morbidade a comunidade científica tem direcionado os seus estudos e investigações para que o diagnóstico realizado apresente elevada taxa de sensibilidade, especificidade e que seja menos invasivo e dispendioso de maneira a que possa ser praticado a uma larga escala (Nieman et al., 2008).

Na atualidade o uso de biomarcadores em estudos clínicos tornou-se tão comum que são utilizados como parâmetros primários (Strimbu & Tavel, 2011). Os biomarcadores atualmente são considerados ferramentas vitais no estudo de doenças, ajudam na deteção, avaliação de riscos, diagnóstico e monitorização das mesmas (Yoshizawa et al., 2013).

A utilização da saliva na obtenção de biomarcadores é atualmente das melhores abordagens a realizar no diagnóstico de pacientes com suspeita de síndrome de Cushing e vem sendo utilizada nos laboratórios de referência (Raff, 2013). Os estudos que envolveram saliva na recolha de biomarcadores apresentaram percentagens elevadas de sensibilidade e especificidade quando comparados com a tradicional recolha de sangue, o que se torna útil na realização do diagnóstico da síndrome Cushing (Sakihara et al., 2010).

Numa primeira fase desta revisão iremos rever a literatura sobre o cortisol e algumas das suas funções. Posteriormente iremos estudar a síndrome de Cushing, onde iremos definir e classificar as suas principais variáveis. Iremos fazer uma revisão acerca das manifestações, características clínicas bem como os testes mais atuais para o seu diagnóstico e quais as possibilidades de tratamento. Numa terceira e última fase iremos verificar o papel da saliva e a sua utilização na recolha de biomarcadores para o diagnóstico da síndrome de Cushing..

II. Desenvolvimento

1.Cortisol

O cortisol ou hidrocortisona é uma hormona que pertence ao grupo glucocorticoides e é sintetizada e secretada nas glândulas suprarrenais mais propriamente no Cortéx suprarrenal. Apresenta uma atividade multidirecional onde atua em vários processos fisiológicos e prepara a resposta do corpo à existência de um estímulo de stress (Whirledge & Cidlowski, 2010). A sua atividade afeta o metabolismo de proteínas, gorduras , controla a retenção de água , sódio , inibe processos inflamatórios e ainda transtornos mentais que estão na origem de euforia ou depressão (Stachowicz & Lebiedzińska, 2016).

1.1 Glândulas suprarrenais

As glândulas suprarrenais (Figura 1) localizam-se acima dos rins e inferiormente ao diafragma. As glândulas têm formas diferentes, a glândula direita apresenta uma forma mais triangular, enquanto que a glândula suprarrenal esquerda tem uma forma de meia lua e relaciona-se anatomicamente com o baço, estômago e pâncreas (Cardoso & Palma, 2009).

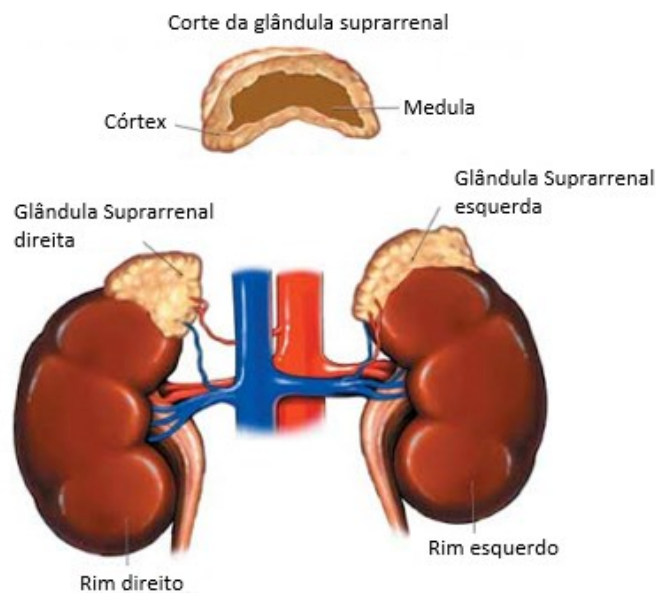


Figura 1-Representação dos rins, glândulas suprarrenais e corte da glândula suprarrenal (adaptada de <http://veterinariorb.blogspot.pt/2012/03/transtornos-das-glandulas-adrenais.html>)

Cada glândula apresenta um córtex e uma medula que são duas estruturas anatomicamente e funcionalmente distintas. O córtex é constituído por três zonas histológicas que são diferenciadas pela disposição das células secretoras: zona glomerular, zona fascicular e zona reticular (Figura 2). A zona glomerular ocupa cerca de 15 % do córtex, as suas células encontram-se agrupadas, são pequenas e apresentam núcleos pequenos em comparação com as outras zonas (fascicular e reticular). A zona fascicular constitui cerca de 75% do córtex, as suas células são grandes e carregadas de lípidos. A zona reticular localiza-se mais internamente e apresenta células irregulares e com pouco conteúdo lipídico. Estas três zonas são responsáveis pela produção das hormonas esteroides suprarrenais. A zona glomerular (zona mais externa) é responsável pela secreção de hormonas mineralocorticoides como a aldosterona e a desoxicorticosterona. A zona fascicular que se encontra na zona intermédia do córtex é responsável pela secreção de hormonas glucocorticoides em especial o cortisol e também de esteroides sexuais, estas últimas, em menor quantidade e por último na zona reticular a camada mais interna é responsável pela secreção de pequenas quantidades de androgénios e de glucocorticoides (Cardoso & Palma, 2009; Raff, Sharma, & Nieman, 2014).

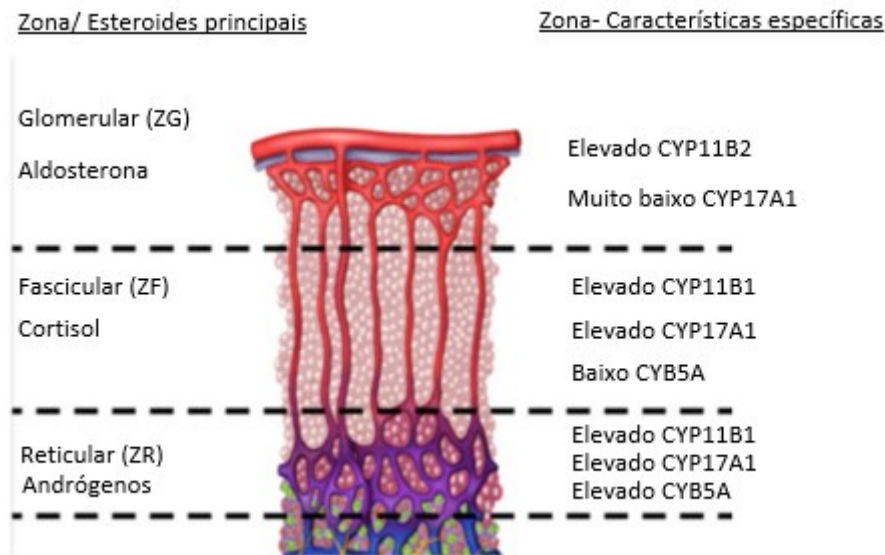


Figura 2- O córtex da glândula suprarrenal constituída por zonas específicas (zona glomerular, zona fascicular e zona reticular) onde ocorrem a síntese de diferentes hormonas (Gross, 2016)

1.2 Hormonas Esteroides suprarrenais

Em junho de 1905, Professor Ernest Starling utilizou e definiu pela primeira vez hormona como: “mensageiros químicos que são enviados na corrente sanguínea e que podem coordenar atividades e crescimento de diferentes partes do corpo”. Hoje em dia sabe-se da existência de várias classes de hormonas como as amins (adrenalina e noradrenalina) péptidos e proteínas (como por ex. oxitocina e leptina) e esteroides (testosterona e cortisol) (Tata, 2005).

As hormonas esteroides são derivadas do colesterol que sofrem várias modificações enzimáticas. A sua síntese é normalmente realizada nas gónadas e no córtex suprarrenal. O córtex suprarrenal produz três tipos principais de hormonas: glucocorticoides (cortisol, corticosterona), mineralcorticoides (aldosterona, desoxicorticosterona) e esteroides sexuais (principalmente andrógenos) (Coates, Gurnell, & Sarnyai, 2010). As enzimas esteroidogénicas são responsáveis pela biossíntese de várias hormonas derivadas do colesterol. Estas enzimas são específicas do citocromo P450 (CYPs), hidroxisteroides desidrogenases (HSDs) e enzimas redutases (Sanderson, 2006).

O colesterol vai ser transportado pela LDL e HDL para as células suprarrenais, no interior da célula, o colesterol vai ser transportado pela (StAR) proteína reguladora da síntese de esteroides do citoplasma para a membrana da mitocôndria, onde vai sofrer ação da enzima CYP11A1 (citocromo P450) e ser convertido em pregnenolona. A pregnenolona posteriormente irá dar origem a progesterona através da ação da enzima 3 β -hidroxistoteredesidrogenase tipo 2 (HSD3B2). A partir da pregnenolona e da progesterona originam-se todas as hormonas esteroides (Raff & Carroll, 2015).

Os mineralcorticoides são sintetizados na zona glomerular (zona mais externa do córtex suprarrenal) e requerem a ação de três enzimas. Numa primeira fase a 3 β -hidroxiesteroides desidrogenase tipo 2 (HSD3B2) que realiza a conversão irreversível do grupo hidroxilo num grupo ceto no carbono 3 e simultaneamente a isomerização de ligação dupla da posição 5 para a posição 4. Em seguida a progesterona irá ser convertida em deoxicorticosterona (DOC) pela enzima 21-hidroxilase (CYP21A2). Através da aldosterona sintetase (CYP11B2) vai ocorrer a catalisação e os três passos finais da síntese de aldosterona: 11 β -hidroxilação, 18-hidroxilação e 18 metiloxidação que vão dar estrutura hemiacetal carbono 11-18, característica da aldosterona. A conversão final de

corticosterona em aldosterona ocorre com ação da 18-OH corticosterona. A angiotensina 2 e o potássio extracelular são principais estimuladores da síntese de aldosterona, através do cálcio intracelular. A zona glomerular (ZG) é uma zona especializada para a síntese de aldosterona pois é a única zona que contém CYP11B2 e pouca 11 α -hidroxilase/17,20-liasa (CYP17A1) esta última que conduz a síntese de substratos esteroides para a síntese de cortisol e androgénios (Adina F. Turcu, 2016; X. L. Wang et al., 2000).

A androstenediona (AD), testosterona, desidroepiandrosterona (DHAE) e sulfato desidroepiandrosterona (DHAES) são as hormonas andrógenas suprarrenais e a sua síntese acontece principalmente na zona reticular (ZR) que é a mais interna do córtex suprarrenal. Por dia são produzidos em média cerca de 4 a 14 mg de desidroepiandrosterona (DHAE) e 20 a 25 mg de sulfato desidroepiandrosterona (DHEAS). A única enzima presente na síntese de DHEA e de androstenediona (AD) através da pregnenolona é a CYP17A1. É possível encontrar esta enzima na zona fascicular e também na zona reticular, mas apenas encontra-se na zona reticular a sua reação 17,20-liasa aumentada cerca de 10 vezes pelo cofator citocromo b5 (CYB5A), que se encontra ausente na zona fascicular. A sulfotransferase SULT2A1 tem a capacidade de alterar DHEA para DHEAS e que assim tem um papel fundamental na regulação da síntese de hormonas androgénias suprarrenais. O córtex suprarrenal sintetiza pequenas quantidades de testosterona pela ação de 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 5 (17 β HSD5) em androstenediona (AD) (Adina F. Turcu, 2016; Cardoso & Palma, 2009; Sanderson, 2006).

Dos glucocorticoides o cortisol é o principal representante e a sua síntese realiza-se na zona fasciculada e intermédia do córtex suprarrenal. A CYP17A1 vai catalisar a 17 α -hidroxilação da pregnenolona e progesterona com uma eficiência muito semelhante. A enzima vai clivar a ligação c17-c20 da 17-hidroxiprenenolona e da 17-hidroxiprogesteronona (17OHP). As duas reações ocorrem num único local ativo, mas com uma regulação diferente que com as atividades de HSD3B2 e de CYP21A2 tem ações semelhantes as da via mineralcorticoide, ou seja, converte 17-OH-pregnenolona em 11-desoxicortisol. No final da cadeia do cortisol há uma ação da 11 β -hidroxilase (CYP11B1) uma enzima que está amplamente relacionada com CYP11B2, que vai completar a cadeia convertendo 11-desoxicortisol em cortisol (Figura 3) (Adina F. Turcu, 2016).

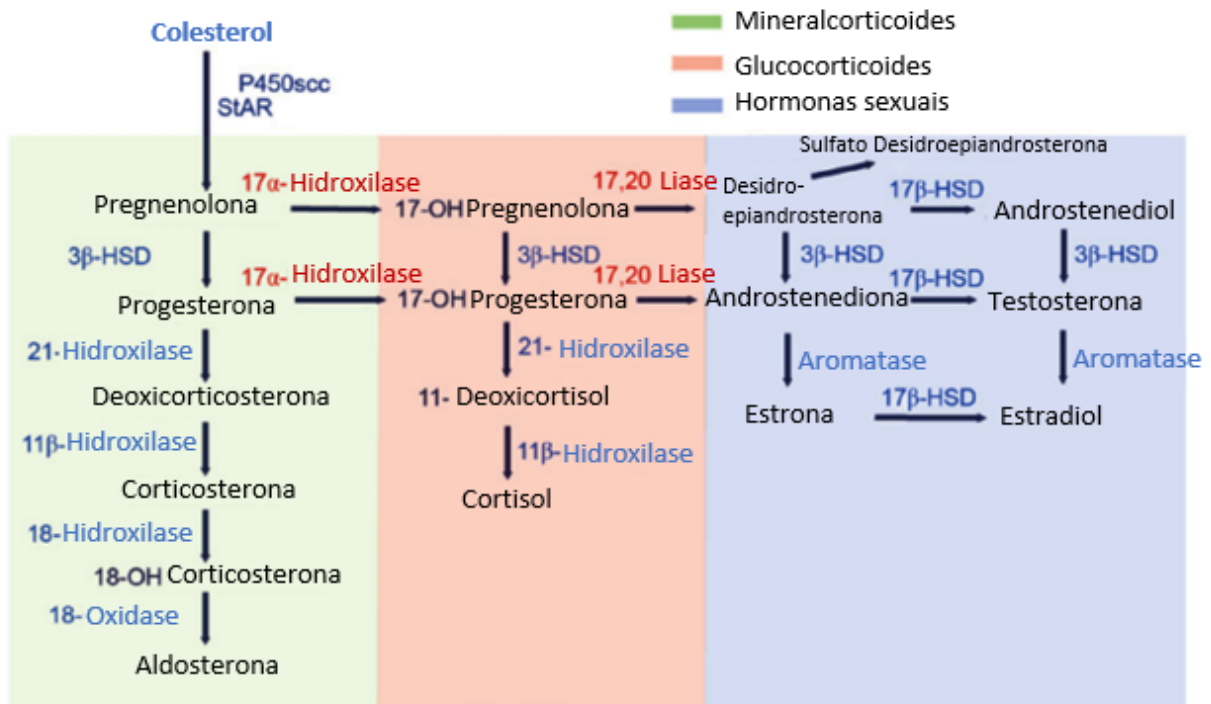


Figura 3- A síntese das três classes principais de esteróides suprarrenais. HSD- hidroxisteroide desidrogenase. Adaptada de (Xu, Hu, Yu, Zhang, & Yang, 2017).

1.3 Regulação e secreção de glucocorticoides

1.3.1 Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal

A hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e a hormona libertadora de corticotrofina (CRH) são responsáveis pela estimulação da secreção do cortisol através de um controlo por retroalimentação (Figura 4). O eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal envolve um processo de retroalimentação negativa que controla a síntese de CRH no hipotálamo a ACTH na hipófise anterior e a produção cortisol no córtex suprarrenal (Aguilar Cordero et al., 2014; Whitnall, Smyth, & Gainer, 1987) .

O ritmo circadiano e o stress vão induzir no núcleo supra quiasmático do sistema nervoso central (SNC) a realizar um *input* da hormona libertadora de corticotrofina (CRH) e de vasopressina (AVP) no núcleo paraventricular . As CRH vão ser enviadas para os capilares transportadores e posteriormente vão ser drenadas na porção anterior da hipófise. Onde vai estimular os corticotropos (células presentes na hipófise) a sintetizar a molécula precursora pro-opiomelanocortina (POMC). Em seguida irá ocorrer um processo de tradução da POMC que irá dar origem a ACTH, hormona lipotrópica (LPH), hormona estimuladora de melanócitos entre outros produtos. Esta hormona que vai ter como principal função unir-se aos recetores de melanocortina 2 (MC2R) presentes no córtex suprarrenal, mais propriamente na zona fasciculada e na zona reticular, onde vai ativar a proteína StAR. A proteína StAR depois de estimulada vai iniciar o transporte do colesterol para o interior da mitocôndria onde irá ocorrer a síntese de cortisol pela cadeia de glucocorticoides (Aguilar Cordero et al., 2014; Raff & Carroll, 2015) .

Depois de realizada a síntese de glucocorticoides o cortisol é libertado na corrente sanguínea onde se vai ligar reversivelmente à globulina CBG (globulina de ligação a corticosteroides) e formar um complexo que se vai denominar de cortisol plasmático ou então mantém-se na sua forma livre denominado de cortisol livre plasmático. Uma vez na corrente sanguínea vai percorrer o corpo através dos capilares até chegar a um tecido objetivo onde o cortisol se vai dissociar da CBG. (H. Y. Lin, Muller, & Hammond, 2010; Maidana, Bruno, & Mesch, 2013)

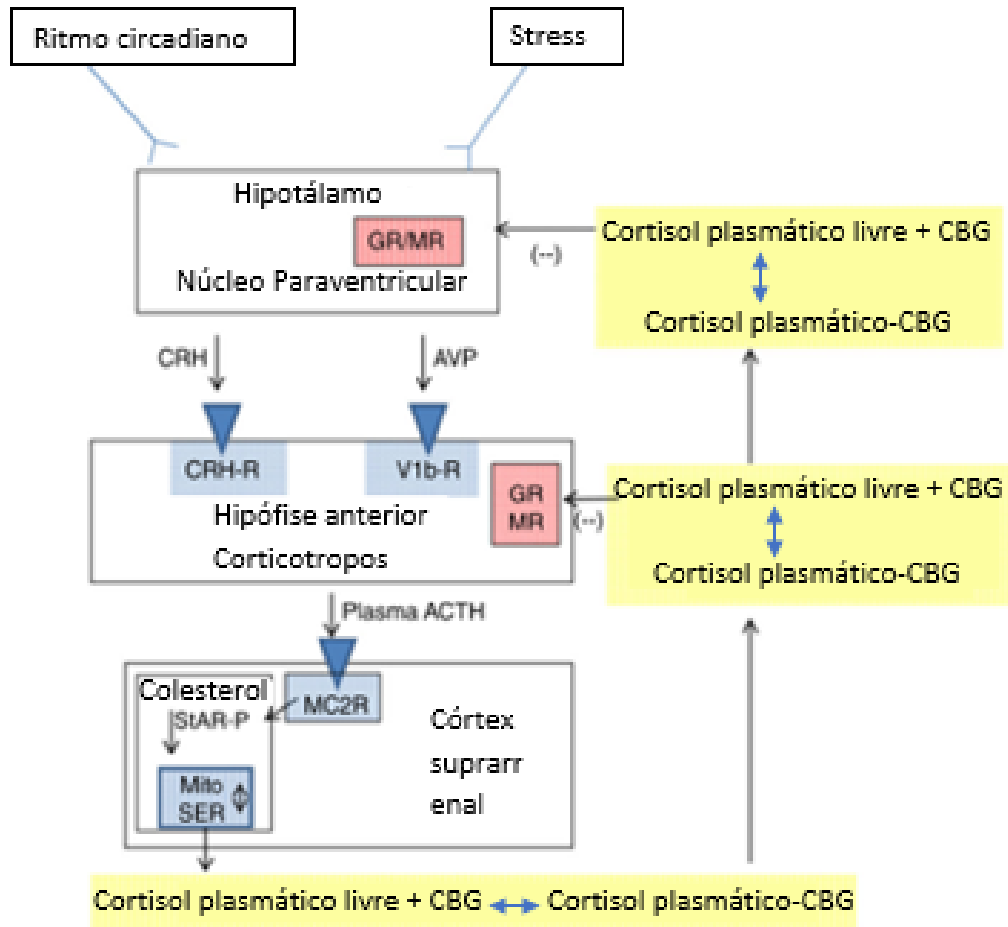


Figura 4 - Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. CBG-cortisol binding globulin; MR-recetor de mineralcorticoide; GR-glucocorticoide recetor; CRH- hormona libertadora de corticotrofina (Raff & Carroll, 2015).

1.3.2 Ritmo circadiano e Stress

Os seres vivos são constituídos por sistemas altamente complexos que tem como função manter um equilíbrio dinâmico ou homeostase. O stress é um estado que através de vários estímulos intrínsecos ou extrínsecos tem capacidade de alterar a homeostase. Como resposta a esses estímulos os organismos desenvolveram o “sistema de stress altamente sofisticado” e que responde de forma adaptativa para repor a homeostase. Além de enfrentar um amplo espectro de estímulos de stress externos/ internos os organismos estão sujeitos a mudanças ambientais associadas à rotação da Terra em relação ao Sol. Para que ocorra um ajuste da homeostase em sincronização com as atividades e com os ciclos do dia e da noite, os seres vivos têm um sistema “relógio” que influencia várias

funções fisiológicas de uma forma circadiana que se chama ritmo circadiano (Nicolaidis, Charmandari, Kino, & Chrousos, 2017).

Num caso de resposta ao stress o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal irá proceder à síntese de glucocorticoides (cortisol) que serão libertados posteriormente na corrente sanguínea (Figura 5) (Nader, Chrousos, & Kino, 2010). A sua libertação ocorre de forma pulsátil e influencia o ciclo de sono bem como a perceção de stress. O cortisol em condições normais mostra um ritmo circadiano que consiste num aumento de 50 a 75% durante os primeiros 30 minutos, após uma noite de sono. De seguida há uma diminuição abrupta da sua concentração e durante o resto do dia uma diminuição gradual até atingir um valor mínimo durante a noite. O aumento da sua concentração tem um carácter genético, enquanto que a sua variabilidade no declínio ao longo do dia pode ser influenciada por condições ambientais. Em condições fisiológicas favoráveis e estáveis o ritmo apresenta uma regularidade significativa, sem grande variabilidade a nível de idades, géneros, estágio de desenvolvimento ou composição corporal (Nader et al., 2010).

1.3.3 Retroalimentação negativa

Os glucocorticoides controlam o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HHS) através de um mecanismo de retroalimentação negativa (Figura 5) (Keller-Wood & Dallman, 1984). A presença de glucocorticoides na corrente sanguínea inibe o HHS. Num primeiro momento pensou-se que os glucocorticoides atuavam de forma a inibir a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal através de um processo de retroalimentação lenta e que envolvia alterações genómicas. No entanto há fortes evidências de que existe um processo de retroalimentação rápido em que é modulado rapidamente pela sensibilidade à taxa de secreção de glucocorticoides, mas o seu mecanismo exato ainda não foi caracterizado (Bamberger, Schulte, & Chrousos, 2008). O processo de retroalimentação lento atua sobre as alterações transcricionais e é regulado por GR (recetores de glucocorticoides) que se encontram localizados em várias regiões do cérebro e que atuam na resposta ao estímulo de stress. Depois de ocorrer uma secreção elevada de glucocorticoides por stress, estes vão ocupar os GR presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo impedindo a produção de CRH e posterior secreção de ACTH numa fase inicial do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. O hipotálamo e a hipófise contêm grandes quantidades de recetor de glucocorticoide (GR) e de recetor de

mineralocorticoide (MR) e quando se encontram ocupados por glucocorticoides, vão induzir uma inibição da síntese de glucocorticoides e da sua libertação induzida por stress (Palmieri et al., 2013; Smith & Vale, 2006).

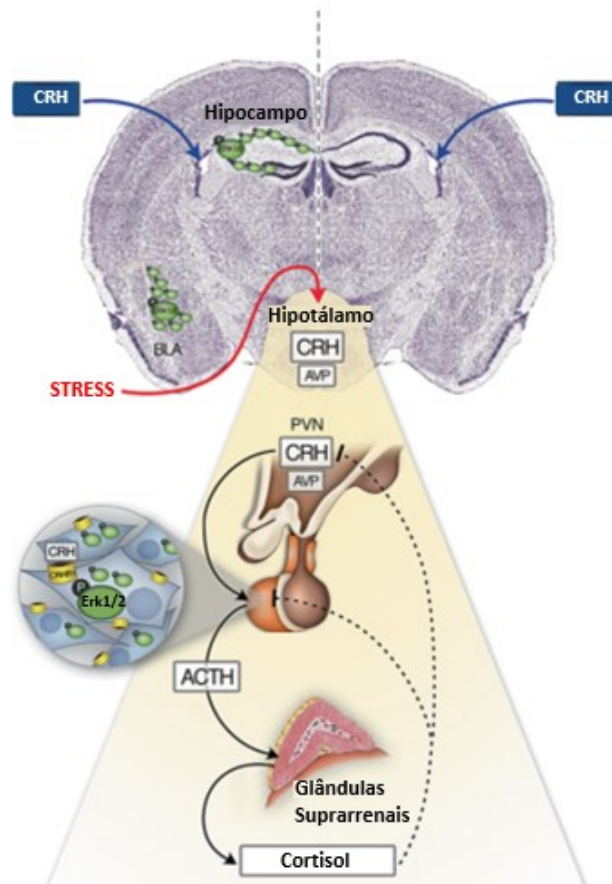


Figura 5 - Representação esquemática do eixo hipotálamo hipófise adaptado a partir de (Bonfiglio et al., 2011)

1.4 Transporte

A globulina de ligação a corticosteroides (CBG) é uma proteína que tem como principal função o transporte do cortisol. Cerca de 80%-90% do cortisol circulante está ligado a CBG, enquanto que 10-15% encontra se ligado a albumina e os restantes (cerca de 5%) encontram se na forma livre e ativa (Figura 6) (Gardill, Vogl, Lin, Hammond, & Muller, 2012; Hammond et al., 1987).

A CBG não se liga apenas ao cortisol, mas também á progesterona, corticosterona, desoxicorticosterona e alguns corticosteroides sintéticos análogos. É uma proteína produzida principalmente no fígado e regulado pelos estrogénios (Maidana et al., 2013).

O cortisol é libertado na circulação sanguínea onde se vai ligar à CBG numa proporção de 1/1 e posteriormente regular a sua entrega aos tecidos inflamatórios. (Cizza & Rother, 2012).

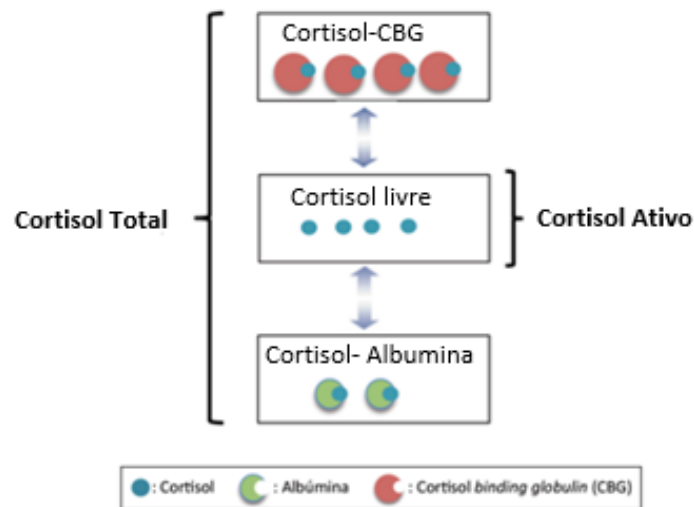


Figura 6 - Cortisol plasmático ligado a CBG e a albumina e cortisol livre (ativo) (Guerrero, 2017)

1.5 Funções

O cortisol apresenta várias funções no organismo, funções essas que são essenciais para a homeostase e preparação do organismo à resposta de um estímulo de stress físico e mental (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000).

No entanto se ocorrer um aumento de cortisol causado por stress crónico resulta numa inibição da diferenciação e de função dos osteoblastos. O excesso de cortisol vai promover a apoptose dos osteoblastos e osteócitos através da ativação da enzima caspase 3 e aumentam os osteoclastos.(Pivonello et al., 2016)

O excesso de cortisol para além de ter um efeito negativo a nível ósseo também aumenta a sensibilidade dos tecidos presentes nos vasos sanguíneos e do coração através da noradrenalina, vasopressina e angiotensina II, que resulta num aumento de pressão arterial (Walker, 2007). Contudo o cortisol afeta ainda a regulação térmica do corpo. A nível muscular é de salientar que a presença de cortisol vai levar à ocorrência de reações catabólicas (Stachowicz & Lebedzińska, 2016).

1.5.1 Ação anti-inflamatória

Os glucocorticoides apresentam funções anti-inflamatórias e imunossupressoras. Começaram a ser utilizados para fins terapêuticos no séc. XX e estão amplamente recomendados no tratamento de várias doenças. Contudo podem originar um conjunto de efeitos colaterais como a hipertensão, osteoporose e diabetes (Suh & Park, 2017).

Os glucocorticoides presentes na corrente sanguínea atravessam a membrana celular e ligam-se aos recetores de glucocorticoides (GR) e formam o complexo GR/HSP90 (Figura 7). Depois do glucocorticoide estar ligado ao complexo GR/HSP90, a porção HSP90 vai-se desconectar do recetor de glucocorticoide e este último vai ser enviado para o núcleo onde se liga ao ADN e interage com os co-activadores (CoA) ativando o complexo de iniciação da transcrição. A existência de uma ligação entre o complexo glucocorticoide/GR e o fator nuclear NFκB vai reduzir a secreção de citocinas pro-inflamatórias (Drougat, Espiard, & Bertherat, 2015; Garabedian, Harris, & Jeanneteau, 2017).

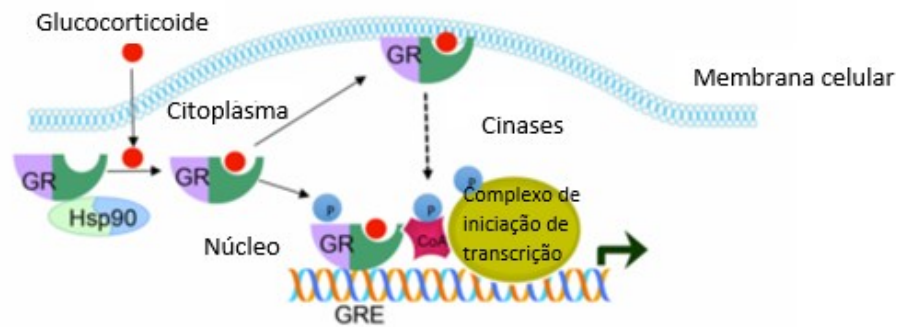


Figura 7- Processo de tradução realizada pelo receptor de glucocorticóide. Elemento receptor de glucocorticóides-(GRE), adaptado a partir de (Garabedian et al., 2017).

1.5.2 Proteólise

O bioquímico e citologista Christian de Duve descobriu o lisossoma e com essa descoberta assumiu que as proteínas celulares eram degradadas (de Duve, Pressman, Gianetto, Wattiaux, & Appelmans, 1955). Mais tarde foi descoberto o sistema ubiquitina-proteossoma (UPS), é um mecanismo que realiza a degradação de proteínas (proteólise) e que está envolvido na regulação de vários processos celulares (Ciechanover & Ciechanover, 2006). Os glucocorticóides vão atuar na proteólise através da ativação do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS). A estimulação da UPS é mediada por genes envolvidos na atrofia muscular como a atrogina-1 e MuRF-1, duas ubiquitinas ligases que preparam as proteínas para a sua lise. Os glucocorticóides vão provocar alterações ao nível de dois fatores um anabólico (IGF-I) e um catabólico (miostatina). Alterações essas que são um aumento da produção da miostatina e uma diminuição do factor IGF-I e que contribuem para a atrofia muscular (Schakman, Gilson, & Thissen, 2008).

1.5.3 Gliconeogénese

A gliconeogénese é um processo metabólico em que se sintetiza glucose a partir de compostos não glucídicos, como por exemplo o lactato ou a glutamina. Consiste em várias etapas reversíveis em que são utilizadas as mesmas enzimas que na glicólise, no entanto existem três etapas que são irreversíveis, nomeadamente: Conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato (PEP) pela via oxaloacetato através da PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase), desfosforilação de 1,6-bifosfato de frutose e desfosforilação de glucose 6-fosfato que é realizada pela G6Pase (Yip, Geng, Shen, & Ding, 2017).

Os glucocorticoides vão induzir a gluconeogénese, através dos recetores de glucocorticoides que se localizam no fígado e que vão produzir PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e G6Pase (glucose-6-fosfatase), duas enzimas moduladoras da gluconeogénese (Figura 8) (M. Wang, 2005). Da gliconeogénese vai resultar uma maior concentração de glucose na corrente sanguínea (hiperglicemia) (Reaven, 1988).

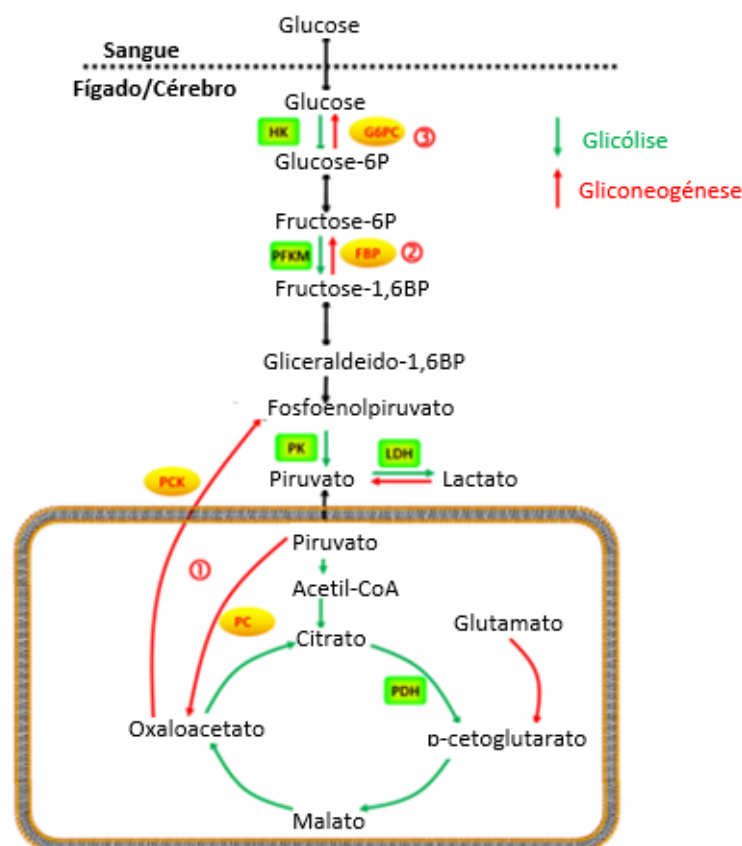


Figura 8- Gliconeogénese é o processo metabólico que sintetiza glucose através de piruvato, lactato e glutamina. Adaptado a partir de (Yip et al., 2017)

1.5.4 Lipólise

A lipólise é o processo bioquímico responsável pelo catabolismo do triacilglicerol (TAG) armazenado nos adipócitos (Lass, Zimmermann, Oberer, & Zechner, 2011). Os glucocorticoides no tecido adiposo vão promover a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e assim diminuir a lipogénese. O cortisol aumenta a lipoproteína lipase no tecido adiposo e promove a lipólise que vai libertar ácidos gordos na circulação, esse aumento vai resultar numa acumulação de lípidos hepáticos que reduz a absorção de glicose no fígado e posteriormente a ativação de várias quinases que vão diminuir a sinalização de insulina (Giorgio Arnaldi et al., 2010).

2.Síndrome de Cushing

2.1Definição

A síndrome de Cushing (SC) é definida como um conjunto de sinais e sintomas provocados por níveis elevados de glucocorticoides circulantes durante um longo período. Esta síndrome é classificada quanto à sua causa como: exógena (iatrogénica) ou endógena. A maior incidência da síndrome ocorre através de fonte exógena e a sua principal causa está nos medicamentos prescritos, como é o caso da maioria dos cremes dermatológicos. Quanto à síndrome de Cushing endógena é diagnosticada por um aumento da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) seja através de um adenoma hipofisário (doença de Cushing) ou por fonte ectópica (tumor extra-hipofisário) (Yorke, Atiase, Akpalu, & Sarfo-Kantanka, 2017) .

A doença de Cushing foi descrita pela primeira vez pelo Dr. Harvey Cushing em 1912 e representa a causa mais frequente da SC endógena (figura 9). A causa da doença de Cushing é a presença de um adenoma na hipófise que vai produzir em excesso a hormona adrenocorticotrópica (ACTH). É uma doença rara com um fenótipo muito característico devido ao hipercortisolismo que tem origem na secreção excessiva de hormona ACTH e com níveis altos de morbidade e mortalidade quando não tratada (Kairys N, Schwell A, 2017).



Figura 9- Fotografia do neurocirurgião americano Harvey Cushing em 1938 (adaptada de <https://wellcomeimages.org/indexplus/image/V0027585.html>)

2.2 Classificação

A síndrome de Cushing endógena pode ser dividida em dois grupos mediante se é dependente de hormona adrenocorticotrófica ACTH ou se é independente de ACTH (tabela 1). As causas da SC dependente de ACTH são as responsáveis por 80-85% de todos os casos da síndrome com causa endógena. Destas cerca de 75-80% são derivados de adenomas hipofisários (doença de Cushing), 15-20% devido a tumores não hipofisários que produzem ACTH (síndrome de ACTH-ectópica) e com uma percentagem quase inexistente (0-1%) a causa provém de tumores produtores da hormona libertadora de corticotrofina (CRH) (Ilias et al., 2005).

A síndrome de Cushing ACTH-independente representa cerca de 15 a 20% da síndrome de Cushing endógena. Na síndrome de Cushing ACTH-independente a causa com maior percentagem é a de tumores suprarrenais unilaterais (90%). Em relação aos tumores suprarrenais cerca de 80% dos casos são adenomas e os restantes 20% são carcinomas suprarrenais. (Ilias et al., 2005). Apesar de rara existe ainda síndrome de Cushing Independente de ACTH com origem em hiperplasia suprarrenal macronodular, doença suprarrenal nodular pigmentada primária (síndrome de Carney) e em síndrome McCune-Albright (caracterizada por pigmentação café-com-leite, displasia das fibras ósseas e múltiplas anormalidades endócrinas) (Bista & Beck, 2014).

A síndrome Pseudo Cushing é uma condição médica caracterizada por hipercortisolismo tal acontece na síndrome de Cushing. A principal diferença entre ambas é o facto do hipercortisolismo na síndrome de Pseudo Cushing resultar da estimulação anormal do eixo HPS por um conjunto de distúrbios como alcoolismo crónico, depressão, stress, diabetes *mellitus* mal controlada e obesidade. Estes distúrbios que vão estimular no hipotálamo a produção e secreção de CRH para a hipófise, onde vai ser produzida a ACTH. A ACTH vai posteriormente estimular de forma anormal as glândulas suprarrenais à produção de cortisol que vai resultar em hipercortisolismo. Os pacientes com síndrome Pseudo Cushing podem apresentar os mesmos sinais, sintomas e níveis hormonais anormais presentes na síndrome de Cushing (Papanicolaou et al., 2009).

Tabela 1 - Classificação das causas de síndrome de Cushing. (Adaptada a partir de WILLIAMS Tratado de Endocrinologia 11 edition , 2010)

Dependentes de ACTH
Síndrome de Cushing (dependente da hipófise)
Síndrome de ACTH ectópica
Síndrome de CRH ectópica
Hiperplasia suprarrenal macronodular
Iatrogénica (tratamento com ACTH)
Independentes de ACTH
Adenoma e carcinoma suprarrenal
Hiperplasia suprarrenal nodular pigmentada primária e Síndrome de Carney
Síndrome de McCune-Albright
Expressão abundante de recetores (polipéptido inibidor gástrico, interleucina 1 (beta))
Síndrome Pseudo Cushing
Alcoolismo
Depressão
Obesidade

2.3 Fisiologia

A síntese de glucocorticoides (cortisol) tem origem na zona fasciculada do córtex das glândulas suprarrenais e é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. Os neurónios da porção parvocelular que pertencem ao núcleo paraventricular do hipotálamo produzem CRH (Figura 10) esta hormona vai atuar sobre os corticotropos da hipófise anterior onde vai induzir a síntese e libertação de ACTH, através da ativação da transcrição e tradução de genes da molécula precursora proopiomelanocortina (POMC) (Figura 11). A pro-opiomelanocortina (POMC) é uma proteína de grandes dimensões que é produzida por transcrição e tradução do gene POMC. A ACTH é sintetizada e libertada na circulação sanguínea, onde vai exercer ação direta sobre o córtex suprarrenal onde vai estimular a produção de cortisol na zona fasciculada, testosterona na zona reticular e aldosterona na zona glomerular. O cortisol quando é libertado na corrente sanguínea vai exercer um efeito de retroalimentação negativa no hipotálamo e na hipófise. Este processo de retroalimentação negativa vai atuar no eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal e permitir a regulação das concentrações hormonais na circulação sanguínea (Raff et al., 2014).

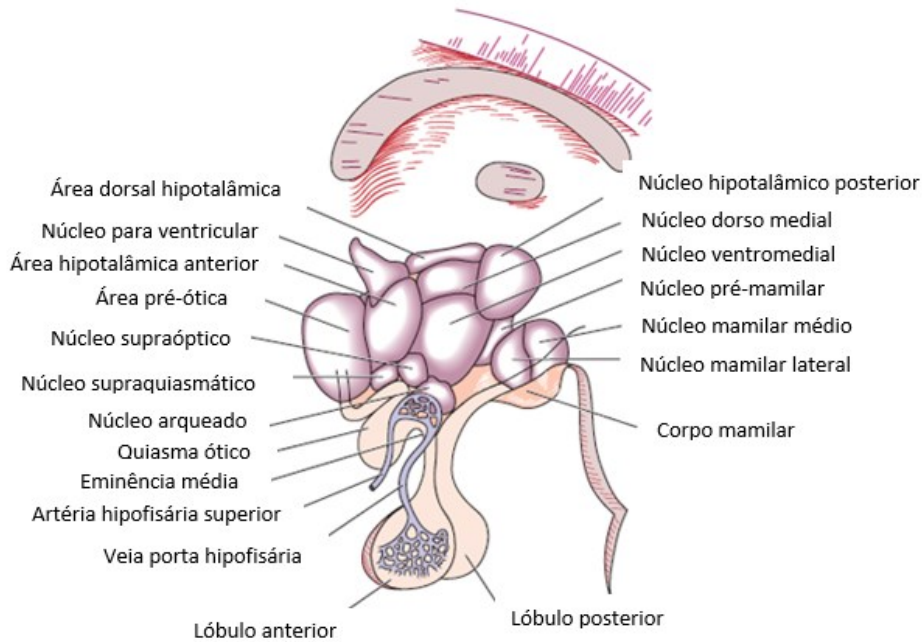


Figura 10- Ilustração do hipotálamo e da hipófise (Adaptada a partir de Greenspan Endocrinologia básica y clínica 9 edición , 2012).

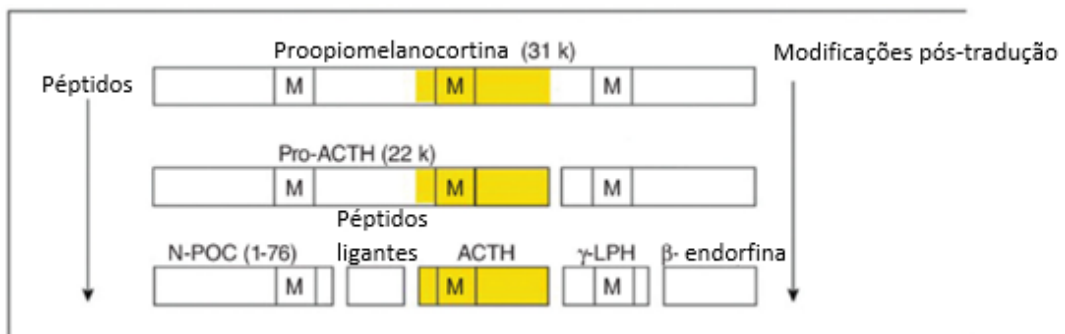


Figura 11-A ACTH é produzida através do processo de pós transdução da POMC, entre outros produtos (beta e gamma-lipotrópica hormona (LPH), N-terminal POMC fragmento (N-POC) e a hormona melanócito estimuladora (Raff et al., 2014)

Na síndrome de Cushing com origem em adenomas hipofisários ocorre uma produção e secreção em excesso de ACTH (hormona adrenocorticotrópica). A ACTH em excesso no sangue vai estimular de forma contínua as glândulas suprarrenais e estas vão sofrer alterações na sua conformação para uma forma de hiperplasia. A hiperplasia acontece devido ao aumento da sua função, ou seja, produção e secreção em excesso de cortisol. O cortisol produzido e libertado na corrente sanguínea vai posteriormente inibir

a libertação de CRH (hormona libertadora de corticotrofina) no hipotálamo e a produção de ACTH pelas células hipofisárias (Cardoso & Palma, 2009; Carlos, 2010).

No caso da síndrome de Cushing estar associada a um tumor ectópico (ACTH é produzida num local diferente que não a hipófise), a neoplasia vai libertar ACTH em grandes quantidades, que vai consequentemente estimular a síntese de cortisol e levar a hiperplasia suprarrenal. Posteriormente à síntese e libertação de cortisol na corrente sanguínea vai resultar numa diminuição da produção de CRH e de ACTH por parte do hipotálamo e hipófise, respetivamente. Existem relatos de casos raros em que existe produção em excesso de CRH em vez de ACTH por parte das células tumorais, o que provoca a estimulação direta da hipófise (Cardoso & Palma, 2009; Carlos, 2010).

Na síndrome de Cushing ACTH-independente há uma produção autónoma de cortisol por parte das glândulas suprarrenais, tendo como resultado uma diminuição acentuada na síntese de CRH e ACTH a nível do eixo HHS (Carlos, 2010).

2.4 Epidemiologia

A síndrome de Cushing tem uma incidência anual de 0.7-2.4 por milhão/ ano. A SC endógena divide-se em ACTH dependente (80-85%). A causa mais frequente de síndrome Cushing endógena ACTH dependente são tumores hipofisários (DC) com uma frequência 5 a 6 vezes superior à produção ectópica de ACTH (Sharma, Nieman, & Feelders, 2015).

A SC independente de ACTH (20%-25) onde cerca de 10% deve-se a adenomas suprarrenais e 8% carcinomas suprarrenais. A SC independente de ACTH pode ocorrer também devido ao complexo de Carneys, síndrome de McCune-Albright e hiperplasia suprarrenal macronodular. A hiperplasia suprarrenal micronodular bilateral e a hiperplasia suprarrenal macronodular são raras (Lahera Vargas & da Costa, 2009).

A mulher apresenta uma incidência superior do que o homem (3:1) para a SC (ver tabela 2) (Lacroix, Feelders, Stratakis, & Nieman, 2015). Não existe uma idade exata para a realização dos testes de diagnóstico da síndrome de Cushing, o seu aparecimento varia consoante a etiologia (Lahera Vargas & da Costa, 2009).

Em relação à síndrome de Cushing exógena ou iatrogénica não existem dados epidemiológicos concretos, apenas que é mais comum que a síndrome de Cushing endógena (Hellhammer, Wüst, & Kudielka, 2009).

Tabela 2-Proporção das causas de síndrome de Cushing Adaptada a partir de (WILLIAMS Tratado de Endocrinologia 11 edition, 2010).

	Proporção	Feminino: Masculino
ACTH dependente		
Doença de Cushing	70%	3,5:1
Síndrome ACTH ectópica	10%	1:1
Causa desconhecida de ACTH	5%	5:1
ACTH independente		
Adenoma suprarrenal	10%	4:1
Carcinoma suprarrenal	5%	1:1
Macronodular hiperplasia	<2%	1:1
Doença primária pigmentada nodular suprarrenal	<2%	1:1
Síndrome McCune-Albright	<2%	1:1

2.5 Manifestações Clínicas

A síndrome de Cushing apresenta características clínicas muito variáveis que são influenciadas pela idade, sexo, severidade e duração a que o indivíduo está exposto aos glucocorticoides. Algumas das características são bem conhecidas, apesar de nenhuma ser patognomónica (característica específica) os pacientes normalmente apresentam obesidade centrípeta, cara de lua cheia, hirsutismo, gordura acumulada na zona dorso-cervical e supra claviclar e pele fina com estrias purpuras (Figura 12) (Nieman, Feelders, & Kennedy, 2015).

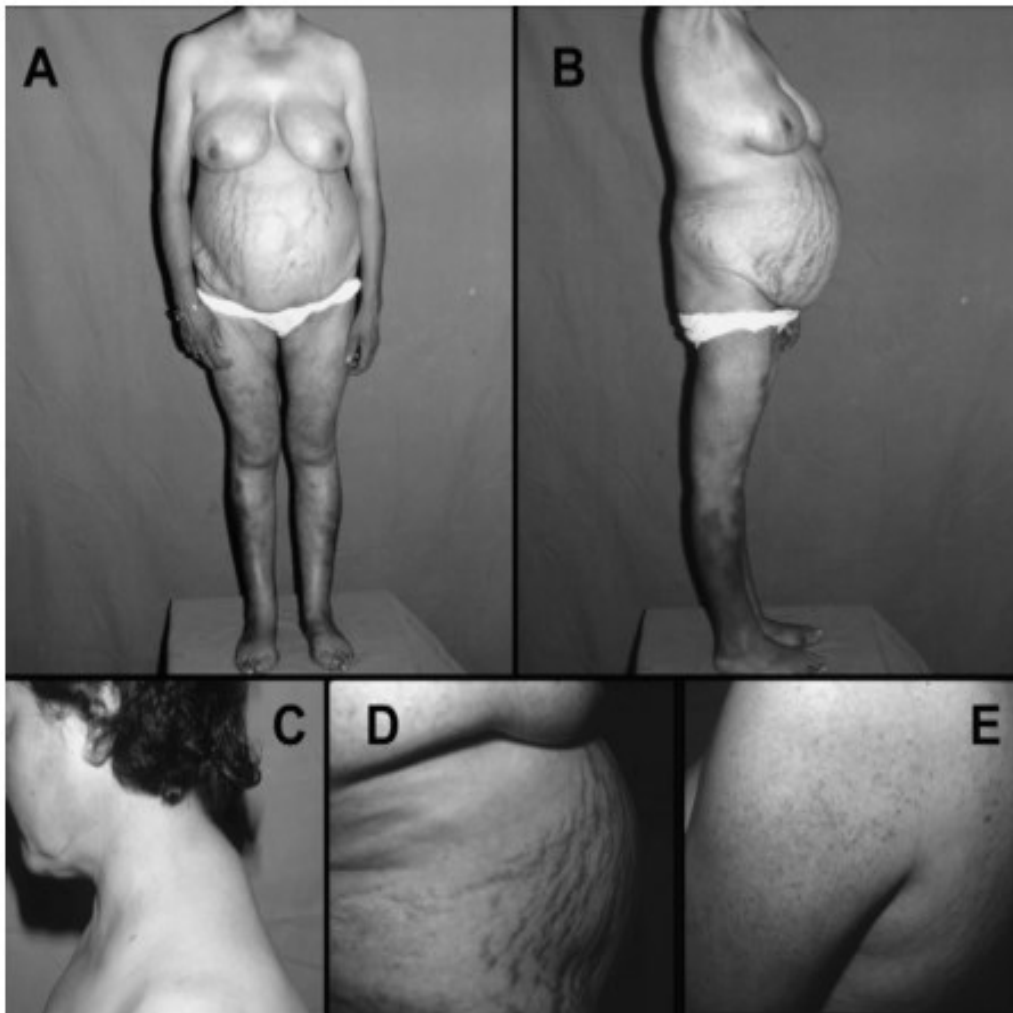


Figura 12-Paciente com síndrome de Cushing. Nas fotografias A e B é possível verificar atrofia muscular, na imagem C verifica-se a corcunda de búfalo e na D e E a presença de estrias abdominais e foliculitis cutânea (Lahera Vargas & da Costa, 2009)

A obesidade central é a uma acumulação de gordura na zona do tronco, supra clavicular, na região dorso cervical onde normalmente se dá o nome de “corcunda de búfalo” e ainda na zona da face (cara de lua cheia). A obesidade central é considerada a característica mais comum da SC (Conlin, Mciver, Alexander, Cunney, & Dluhy, 2002).

A nível dermatológico ocorre normalmente um aumento de friabilidade da pele, por perda de gordura subcutânea. A perda de tecido colagénio subcutâneo dá origem ao aparecimento de múltiplas estrias vermelhas-purpuras com uma largura superior a 1 centímetro. Verificam-se principalmente na zona do abdómen e existe a possibilidade de aparecerem noutras regiões do corpo, como por exemplo nos membros superiores e inferiores, onde existe uma expansão rápida da pele (Conlin et al., 2002). Aparecem com alguma facilidade feridas que têm muitas dificuldades no processo cicatrização. No caso de síndrome de Cushing ACTH dependente é frequente o aparecimento de hiperpigmentação (Carlos, 2010).

Nos músculos podemos verificar a presença de miopatias e contusões que são duas das características da síndrome de Cushing. A miopatia afeta principalmente os músculos proximais, ocorre por causa do efeito catabólico dos glucocorticoides no músculo esquelético e verifica-se uma diminuição do volume muscular (Wagner-Bartak et al., 2017).

A nível ósseo observa-se normalmente osteoporose, diminuição de altura devido ao colapso vertebral osteoporótica e podem acontecer fraturas espontâneas após traumatismos menores. Isto deve-se a uma diminuição da absorção de cálcio por parte do intestino e dos rins que vai originar uma diminuição do processo de osteogénese. Na presença de síndrome de Cushing podem ocorrer fraturas por compressão das vertebrae e necrose avascular das cabeças femorais (Figura 13) (Lahera Vargas & da Costa, 2009; Wagner-Bartak et al., 2017).

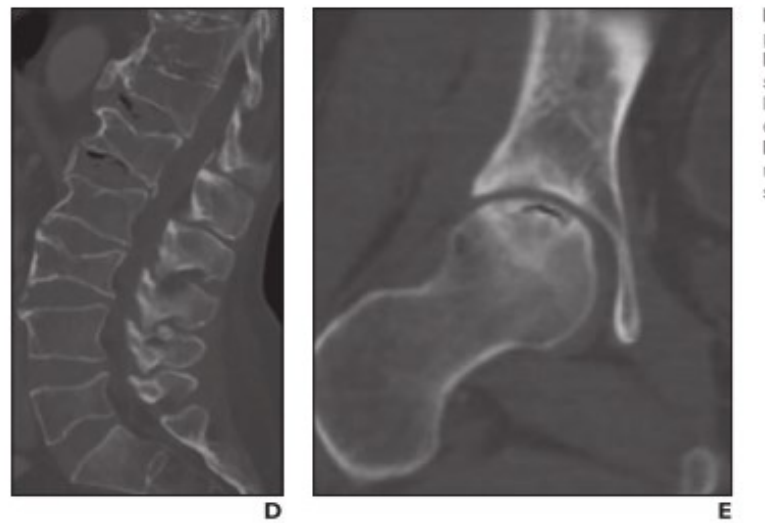


Figura 13-Fotografia de TC em pacientes com síndrome de Cushing. (D) depressões da coluna vertebral numa paciente feminina com 24 anos e na imagem (E) fratura na cabeça e fêmur num paciente com 54 anos. (Wagner-Bartak et al., 2017)

A doença cardiovascular está associada à maior causa de morte em pacientes com síndrome de Cushing. Os pacientes com síndrome de Cushing apresentam um risco superior de sofrer uma doença cardiovascular e quando o sujeito apresenta obesidade e/ou diabetes aumentam as probabilidades de acontecer um acidente vascular cerebral ou enfarte do miocárdio. Depois da eliminada a síndrome de Cushing persiste o risco de doença cardiovascular (Pivonello, De Leo, Cozzolino, & Colao, 2015).

No sistema reprodutor feminino ocorrem anomalias menstruais e presença de amenorreia. Ocorre diminuição da libido e um aumento da disfunção sexual em pacientes do sexo masculino que pode mesmo levar a infertilidade (Wagner-Bartak et al., 2017).

A maioria dos pacientes com síndrome de Cushing apresentam alterações psicológicas. As alterações psicológicas mais frequentes são a depressão, instabilidade emocional, ansiedade, insónias, falhas de memória e ainda mudanças cognitivas. A depressão é a principal alteração do foro psicológico e afeta cerca de 2/3 dos pacientes com síndrome de Cushing. Se o nível de concentração de cortisol normalizar pode levar a uma rápida melhoria no estado psiquiátrico (Lahera Vargas & da Costa, 2009).

Por último verifica-se alterações no sistema imunitário que fica debilitado e que tem como resultado infeções recorrentes. Em muitos casos as infeções são assintomáticas e ocorrem devido a uma inibição da resposta anti-inflamatória normal (Wagner-Bartak et al., 2017).

Tabela 3-Frequência das características clínicas da SC. Adaptada a partir de (Carlos, 2010).

Característica clínica	Frequência (%)
Obesidade	95
Face de "lua cheia"	90
Diminuição de líbido	90
Estrias purpuras	90
Perda de espessura da pele	85
Irregularidade menstrual	80
Hipertensão arterial	75
Hirsutismo , acne	75
Depressão / estabilidade emocional	70
Fragilidade cutânea	65
Corcunda de "búfalo"	65
Intolerância à glucose	60
Debilidade	60
Osteoporose ou fraturas	50
Nefrolitíases	50
Hipocaliemia	50
Infeções	50

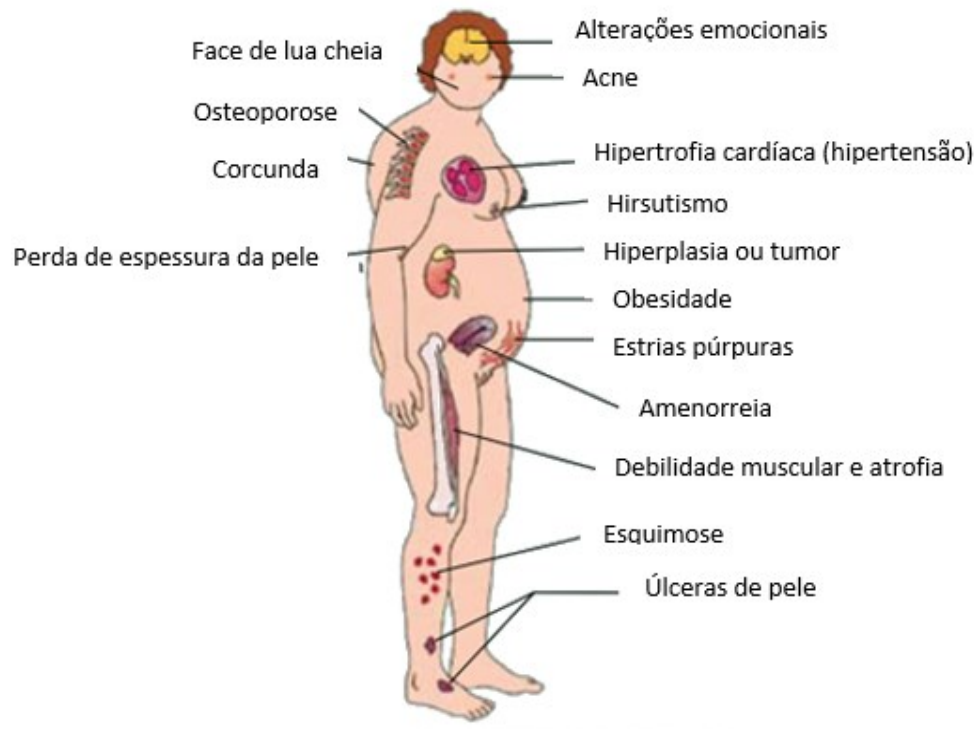


Figura 14-Representação das características clínicas. Adaptada a partir de (Carlos, 2010).

2.5.1. Síndrome de Cushing em crianças

Em crianças a síndrome de Cushing é pouco frequente, o seu diagnóstico e tratamento constitui um grande desafio para os médicos pediatras dedicados à endocrinologia. Há uma incidência superior por parte do sexo masculino em período de pré-adolescência e existe uma incidência semelhante entre o sexo feminino e masculino durante adolescência. A partir da idade adulta existe uma maior incidência do sexo feminino (Storr et al., 2004).

A maior causa da síndrome de Cushing em crianças é a administração de glucocorticoides (SC exógena). No entanto a causa mais comum da SC endógena é a produção em excesso de ACTH através de adenomas hipofisários (75%). As fontes ectópicas de ACTH em crianças são tumores carcinoides nos brônquios, pâncreas ou timo e carcinoma das células pequenas dos pulmões (Lodish, 2016).

Quando ocorre uma exposição excessiva a glucocorticoides, os sinais clínicos que as crianças apresentam frequentemente são atraso no crescimento e o aumento de peso (Tabela 3) (Goñi Iriarte, 2009).

Tabela 4-Frequência de sintomas da presença síndrome de Cushing em crianças. Adaptada a partir de (Goñi Iriarte, 2009).

Muito frequentes (>75%)	Frequentes (25-75%)	Pouco frequentes (<25%)
Aumento de peso Atraso no crescimento Alterações menstruais (amenorreia primária ou secundária) Hirsutismo Obesidade (IMC>percentil 85)	Estrias Acne Hipertensão arterial Astenia ou debilidade Desenvolvimento sexual secundário precoce	Alterações mentais Hiperpigmentação Debilidade muscular Acantosis nigricans Idade óssea atrasada ou adiantada Transtornos de sono Hipercalcémica, alcalose Hipopotassemia

2.5.2 Síndrome de Cushing durante a gravidez

Durante a gravidez não é habitual encontrar pacientes com síndrome de Cushing. Cerca de metade dos casos estudados apresentam síndrome de Cushing independente de ACTH (42 % adenomas e 10% carcinoma) e os restantes ocorreram devido a hiperplasia suprarrenal bilateral. As complicações mais frequentes são a hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e as menos frequentes são a osteoporose, fraturas e doenças do foro psicológico (Goñi Iriarte, 2009). A Figura 15 demonstra o algoritmo a usar num caso de suspeita de síndrome de Cushing durante a gravidez (Goñi Iriarte, 2009).

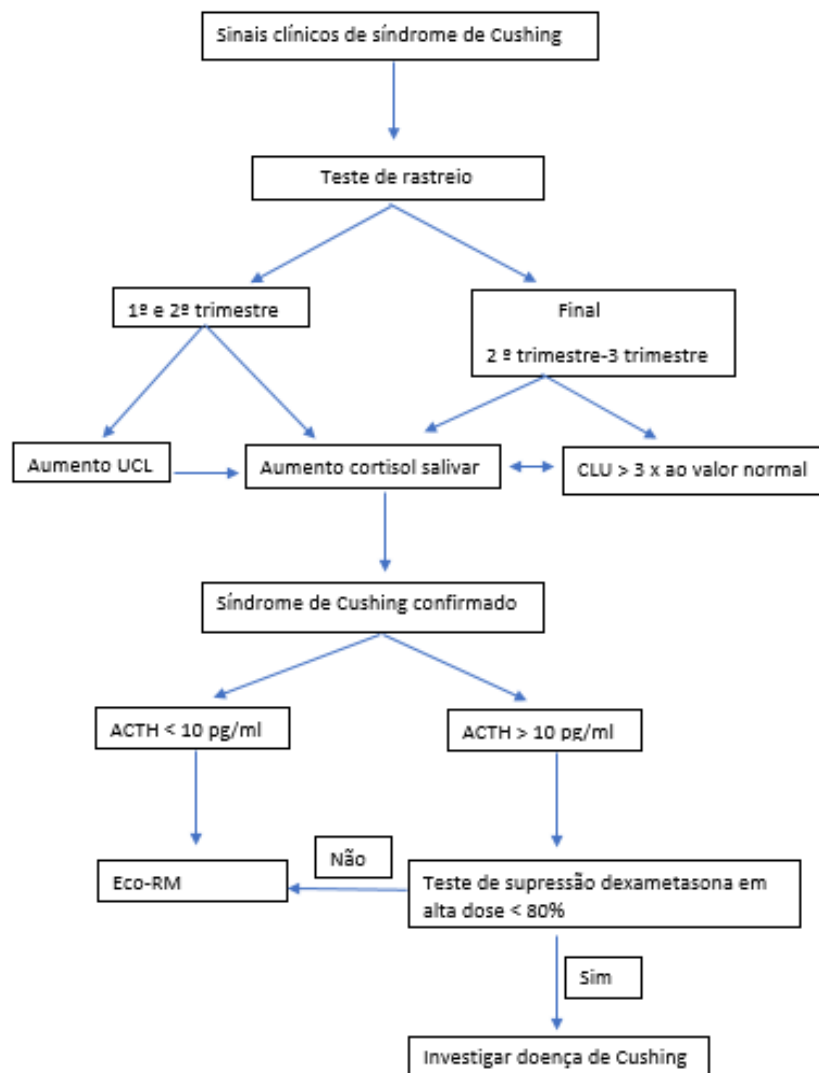


Figura 15-Algoritmo de suspeita de síndrome de Cushing durante a gravidez. Adaptada a partir de (Goñi Iriarte, 2009)

2.6 Diagnóstico

A síndrome de Cushing é rara e provoca consequências adversas quando não é diagnosticada de forma correta e atempada. Como tal são necessários testes que apresentem elevada sensibilidade e especificidade para detetar numa fase inicial do diagnóstico, o hipercortisolismo. A síndrome de Cushing tem menos incidência que outras doenças resultantes da presença de níveis elevados de cortisol, como são o caso da síndrome de ovário policístico, depressão, alcoolismo, síndrome metabólica e obesidade (Friedman et al., 2010).

Numa primeira fase deve-se diagnosticar e confirmar a presença de hipercortisolismo e a sua etiologia antes de partir para um diagnóstico diferencial. Posteriormente deve-se verificar a sua fonte se exógena (iatrogénica) ou endógena. No caso de síndrome de Cushing endógena deve-se perceber se é independente de ACTH ou dependente de ACTH. A síndrome de Cushing ACTH dependente é a mais frequente (70% a 80%) e a principal causa deve-se a adenomas hipofisários secretores de ACTH (doença de Cushing) enquanto que os restantes 10% a 20% tem origem em fontes ectópicas (Vilar et al., 2008).

Para um bom diagnóstico da síndrome de Cushing devemos ter conhecimento das suas características bioquímicas, regulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HHS), distúrbios do ritmo circadiano normal e da secreção de cortisol (Newell-price et al., 1998).

Há que ter em consideração que nenhum teste utilizado apresenta uma sensibilidade e especificidade de 100% e que cada um dos testes normalmente utilizados apresentam especificidades e sensibilidades diferentes. Previamente à realização do processo de diagnóstico deve-se verificar a existência de alguma doença aguda, como é o caso da doença cardíaca que pode facilmente resultar em falsos positivos. São três os testes bioquímicos de primeira linha para o diagnóstico de síndrome de Cushing : Medição de cortisol livre urinário de 24 horas ,teste de supressão de dexametasona de baixa dose e avaliação do cortisol salivar durante a noite (Newell-Price, Bertagna, Grossman, & Nieman, 2006). Algoritmo proposto a realizar no diagnóstico de SC (Figura 16) (Castro & Moreira, 2007).

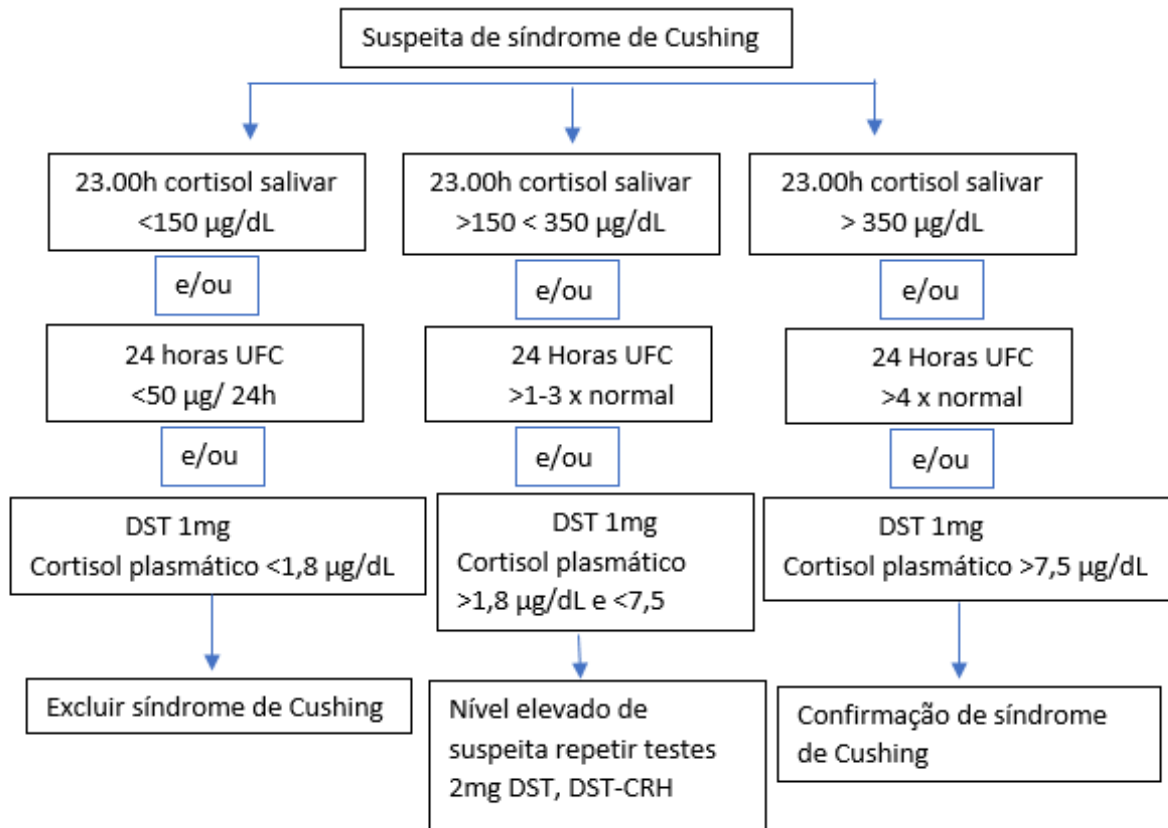


Figura 16- Algoritmo para estabelecer o diagnóstico de síndrome de Cushing (Castro & Moreira, 2007)

2.6.1 Medição de cortisol livre urinário (CLU)

O teste de medição do cortisol livre urinário (CLU) é um teste não invasivo que é amplamente utilizado no diagnóstico da síndrome de Cushing. Cerca de 8-10% do cortisol plasmático encontra-se na forma livre (não ligado) que é fisiologicamente ativo. O cortisol na sua forma livre é filtrado pelo rim e a maior parte vai ser posteriormente reabsorvida pelos túbulos, o restante vai ser excretado na sua forma inalterada. A recolha de cortisol livre urinário (CLU) durante 24 horas vai traduzir-se numa amostra de cortisol plasmático e que vai permitir avaliar as variações de cortisol durante o dia e a noite. Num estudo realizado recentemente, onde foram avaliados 146 pacientes com síndrome de Cushing, a medição de cortisol livre urinário (CLU) mostrou uma sensibilidade de cerca 95% no diagnóstico. É um teste que nos permite conhecer a quantidade de cortisol livre presente na circulação e biologicamente ativo sem que este seja afetado por fatores que possam influenciar os níveis de globulina de ligação a corticosteroides (CBG) (Ifedayo & Olufemi, 2013).

Ao contrário do que acontece com os testes que medem os níveis plasmáticos de cortisol (porção ativa e inativa). Devem ser realizadas três recolhas de urina num período de 24 horas. No caso de as três medições apresentarem resultados considerados normais de cortisol pode concluir-se que é altamente improvável a presença da síndrome de Cushing, tendo em conta que a função renal está normalizada (Kola & Grossman, 2008).

A medição de cortisol urinário através de imunoensaios (RIA) e ELISA a amostra pode ser influenciada por vários metabolitos de cortisol e ainda alguns glucocorticóides sintéticos, enquanto que as medições feitas através de HPLC (*High-performance liquid chromatography*) permitem a separação dos vários glucocorticóides urinários e metabolitos. O HPLC tem alta sensibilidade e especificidade como tal é utilizado quando algumas recolhas apresentam substâncias que interferem com os resultados, como a carbamazepina, digoxina que podem ligar-se ao cortisol e produzir falsas elevações de CLU. A espectrometria de massa combinada com cromatografia gasosa e HPLC permitem superar estes problemas, mas em contrapartida são testes muito dispendiosos o que faz com que não estejam presentes em muitas clínicas ou laboratórios de investigação (Nieman et al., 2008).

Os pacientes com síndrome de Cushing apresentam valores de CLU que podem variar ao longo de 24 horas. Como tal estes valores devem ser considerados importantes no diagnóstico para esta condição. No entanto a verificação de valores ligeiramente mais baixos de cortisol urinário, mas ainda assim valores elevados em comparação com o normal, podem ser encontrados sem que estejamos na presença de síndrome de Cushing, como é o caso de: ansiedade crónica, depressão, alcoolismo (Pseudo-Cushing) e em mulheres grávidas. O teste ao cortisol livre urinário por si só não permite identificar/diferenciar a síndrome Cushing, de síndrome PseudoCushing ou síndrome de Cushing-subclínica como tal deve ser complementado com outro(s) testes (G. Arnaldi et al., 2003).

2.6.2. Teste de supressão do cortisol pela dexametasona em baixas doses (TSD)

O teste de supressão do cortisol pela dexametasona em baixas doses (TSD) é um dos testes de primeira linha utilizado no diagnóstico da SC. O TSD em baixas doses consiste na toma por via oral de 1mg de dexametasona entre as 23.00h e as 24.00h e posteriormente na recolha de uma amostra do plasma sanguíneo em jejum num período de tempo entre as 08.00 e as 09.00h da manhã seguinte. Em seguida realiza-se a respetiva medição de cortisol presente na amostra. Defendia-se até há pouco tempo que o nível normal do TSD compreendia valores de cortisol plasmático inferiores a 5µg/dl(138nmol/litro) no entanto esse valor viria a sofrer alterações. Atualmente considera-se que o nível normal de cortisol plasmático, ou seja, em que se pode excluir a presença de síndrome de Cushing na presença de valores inferiores a 1,8 µg/dl (50nmol/litro). Com esta alteração aumentou-se a sensibilidade do TSD, especialmente em pacientes que apresentavam hipercortisolismo considerado leve, ou seja, com valores de cortisol inferiores 1,8 µg/dl (50nmol/litro) afasta por completo a hipótese de estar na presença de síndrome de Cushing (G. Arnaldi et al., 2003).

Normalmente, os pacientes saudáveis não conseguem suprimir cortisol plasmático a esse nível. Como vantagens o TSD de 1 mg apresenta facilidade no processo de execução e um baixo custo. Existe ainda o TSD clássico que se torna mais “pesado” que dura dois dias (48 horas) e é ingerido 2mg por dia (0.5mg de 6 em 6 horas) o que acaba por tornar o teste mais específico mas também mais dispendioso (Yorke et al., 2017).

Existem várias situações que podem interferir no TSD, como por exemplo a diminuição da absorção de dexametasona, medicamentos que alterem o metabolismo hepático da dexametasona, a indução de enzimas relacionadas com o citocromo P450 (bar-bituratos, fenitoina, carbamazepina, rifampicina, meprobamato, aminoglutetimida, metaqualona), aumento da concentração de CBG (tratamento com estrogénio ou em caso de gravidez) e estados de Pseudo-Cushing (Castro & Moreira, 2007).

O TSD apresenta uma elevada taxa de falsos positivos cerca de 30% e acontece devido a várias condições de interferência e à variabilidade significativa do comportamento biológico dos adenomas, como tal nenhum teste TSD(uma noite ou de 48

horas) é capaz por si só de realizar um diagnóstico mas sim complementar o diagnóstico da síndrome de Cushing (Castro & Moreira, 2007).

2.6.3 Teste de Cortisol salivar (TCS)

O teste de cortisol salivar durante a noite é amplamente aceite como a melhor abordagem a utilizar no diagnóstico em pacientes com suspeita de síndrome de Cushing. O cortisol é um esteróide importante na regulação da resposta ao stress e existe sob a forma livre (forma ativa), ligado a proteínas na corrente sanguínea. Na saliva apenas existe na sua forma livre (Tateishi et al., 2012).

O cortisol livre (não ligado) que se vai difundir através das células acinares das glândulas salivares. Como vantagens este teste é considerado o mais simples, que não provoca stress no paciente, não é invasivo e é confiável no que toca a avaliar o ritmo circadiano do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal. Como já foi referido anteriormente o TCS é um teste fácil de realizar e que não demonstra qualquer impedimento de a recolha poder ser realizada em casa ou em meio hospitalar. Na recolha de saliva pode ser utilizado um *pledget* de algodão na boca, mastiga-se durante 1-2 minutos e depois coloca-se dentro de um tubo de plástico. A amostra depois de recolhida pode ser conservada à temperatura ambiente durante 7 dias ou num frigorífico (temperatura reduzida) durante várias semanas, isto caso haja necessidade de se aguardar até poder ser enviada para um laboratório ou centro de investigação de referência (Alexandraki & Grossman, 2010).

No dia da recolha deve se ter em atenção a alguns cuidados: evitar lavar os dentes 30 minutos antes da recolha, evitar comer, beber, fumar ou realizar atividade física até 2 horas antes para não alterar os níveis de cortisol da amostra.(Alwani et al., 2014).

Depois de realizada a recolha de saliva existem várias opções para medir e quantificar o cortisol, pode ser usado radioimunoensaios (RIA) enzimoimunoanalises (ELISA), electroquimioluminiscencia automatizada (ECQLIA) e cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC/TMC). Essencialmente as vantagens dos imunoensaios são o custo reduzido e o pequeno volume necessário de amostra para a obtenção de resultados (Maidana et al., 2013). Contudo os imunoensaios apresentam também uma desvantagem que é o potencial de reatividade cruzada com esteroides sintéticos como a

prednisona e a cortisona que originam cortisol através da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (Nieman, 2015).

No caso em específico da cromatografia líquida /espectrometria de massa os equipamentos utilizados no teste já tem um valor mais elevado (Maidana et al., 2013).

A maioria dos autores sugerem que um valor de cortisol na saliva superior a 145 μ g/dl (4nmol/L;0,144 μ g/ dL) sugere um diagnóstico da síndrome de Cushing com uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 95% (Carlos, 2010).

Na Figura 17 é possível comparar a variação da concentração do cortisol salivar durante 24 horas entre indivíduos com síndrome de Cushing severa (linha castanha) e ligeira (linha verde) com indivíduos considerados normais (linha encarnada). Distingue-se os diferentes comportamentos relacionados com a síndrome de Cushing severa em que apresenta valores elevados durante as 24 horas sem grandes alterações, temos em seguida a síndrome de Cushing leve/subclínica em que apresenta valores superiores ao normal com o pico máximo a acontecer por volta das 8h-9h da manhã e os valores normais no gráfico presente a vermelho (Carlos, 2010).

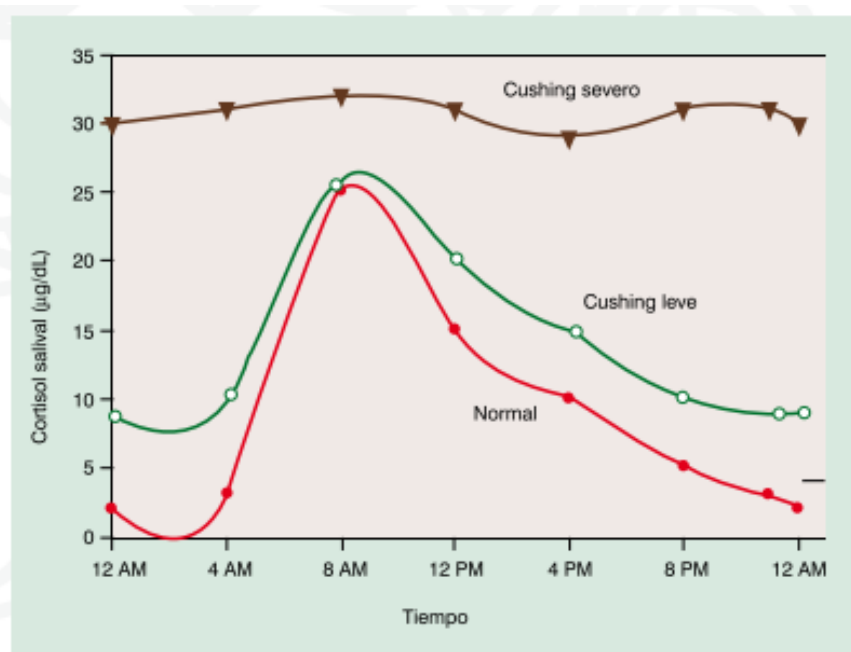


Figura 17-Gráfico de relação entre cortisol salivar e tempo durante 24 horas (Carlos, 2010)

2.6.4 Teste secundário: TSD-CRH

Após a realização de um dos três primeiros testes de diagnóstico devemos realizar o TSD-CRH (teste de supressão de dexametasona e administração da hormona libertadora de adrenocorticotrópica). Inicia-se o teste com a administração de uma dose de 0,5 mg de dexametasona a cada 6 horas, ou seja, 8 vezes durante 2 dias (começando as 12 horas do primeiro dia). Após a administração da última dose de dexametasona é realizado um teste de estimulação de CRH. Onde é administrado no paciente CRH (1µg/kg) e faz-se a medição de cortisol plasmático 15 minutos após a estimulação/administração de CRH. Caso exista uma concentração plasmática de cortisol superior a 1,4µg / dL, é definitivo que se esteja na presença de síndrome de Cushing (Conlin et al., 2002).

2.7. Diagnóstico diferencial

Uma vez realizado e confirmado o diagnóstico positivo de síndrome de Cushing é importante dar início ao diagnóstico diferencial. O objectivo principal do diagnóstico diferencial é determinar se ACTH é detetada no plasma/corrente sanguínea. Em caso de uma ausência contínua de ACTH no plasma podemos determinar que estamos perante síndrome de Cushing independente de ACTH e nesse caso o próximo passo será a realização de um exame imagiológico às glândulas suprarrenais (Newell-price et al., 1998). Para realizar a medição de ACTH é utilizado anticorpos e através da técnica de *sandwich* (técnica em que se usam dois anticorpos diferentes para identificar os epítomos de ACTH) (Pappachan, Hariman, Edavalath, Waldron, & Hanna, 2017).

Um nível de ACTH plasmático inferior a 2,2 pmol/ l com a presença de hipercortisolismo indica que estamos na presença de síndrome de Cushing independente de ACTH. Caso a medição indique níveis superiores a 4,4 pmol/l de ACTH no plasma sugere a presença de síndrome de Cushing dependente de ACTH, que na maioria das vezes tem origem numa doença extra-suprarrenal nomeadamente uma patologia que afete diretamente a hipófise. Valores que se encontrem num intervalo entre 2,2 e 4,4 pmol/l exigem uma avaliação adicional com um teste de estimulação de CRH (Pappachan et al., 2017).

2.7.1 Síndrome de Cushing independente ACTH

Cerca de 20 a 30 % dos casos de síndrome de Cushing resultam de uma patologia suprarrenal em que normalmente afeta apenas uma das glândulas. Os adenomas suprarrenais unilaterais e menos frequente os carcinomas são responsáveis pela maioria dos casos de síndrome de Cushing com causa patológica suprarrenal (Pappachan et al., 2017). Para a confirmação da existência de uma lesão suprarrenal é necessário recorrer a TC (tomografia computadorizada) onde é possível observar tumores neuro endócrinos e as glândulas suprarrenais com hiperplasia (Figura 18) (Newell-Price, 2009).

A não deteção de qualquer lesão nas glândulas suprarrenais (tomografia computadorizada) deixa em aberto a possibilidade de PPNAD (hiperplasia suprarrenal nodular pigmentada primária) que está na origem da síndrome de Cushing ACTH independente e que pode não ser detetado através da TC (Newell-Price, 2009).



Figura 18-TC realizado na zona abdominal onde é possível ver a vermelho 5 tumores neuro endócrinos e a azul as glândulas suprarrenais com hiperplasia. (Newell-Price, 2009)

2.7.2 Síndrome de Cushing dependente ACTH

Na síndrome de Cushing dependente de ACTH estabelecer a sua origem torna-se mais difícil do que na síndrome de Cushing independente de ACTH. Os exames de imagiológicos combinados com teste de CRH são o método mais apropriado a fazer num diagnóstico diferencial. Por exemplo num caso em que se observe no exame imagiológico um adenoma com o tamanho superior a 6mm e com uma resposta ao teste de TSD-CRH positiva, pode-se concluir que o paciente possui uma fonte hipofisária de excesso de ACTH (doença de Cushing) (Newell-Price, 2009)

No entanto os exames bioquímicos e imagiológicos nem sempre são conclusivos e o diagnóstico diferencial pode tornar-se ainda mais desafiador. Em alguns casos a utilização de ressonância magnética hipofisária pode mostrar a presença de um adenoma muito pequeno, mas essa prova não chega para concluir que estamos perante uma fonte hipofisária de ACTH. É necessário por vezes recorrer a avaliação adicional com o BIPSS (avaliação da amostra de sinus petrosal bilateral inferior) que pode ser usada para distinguir uma fonte hipofisária e uma fonte ectópica de hipersecreção de ACTH. O BIPSS é um teste que requer uma técnica cuidadosa da colocação de cateter e venografia que será necessária para a confirmação da posição dos seios petrosais (Figura 19). Cerca de 40% dos pacientes com síndrome de Cushing podem apresentar um exame de ressonância magnética normal, portanto o BIPSS pode ser vantajoso no diagnóstico. Nenhum dos testes não invasivos atingem a precisão desejável de 100% contudo o BIPSS com estimulação de CRH é o teste mais preciso e confiável que se pode realizar no diagnóstico diferencial (L.-Y. Lin et al., 2007).

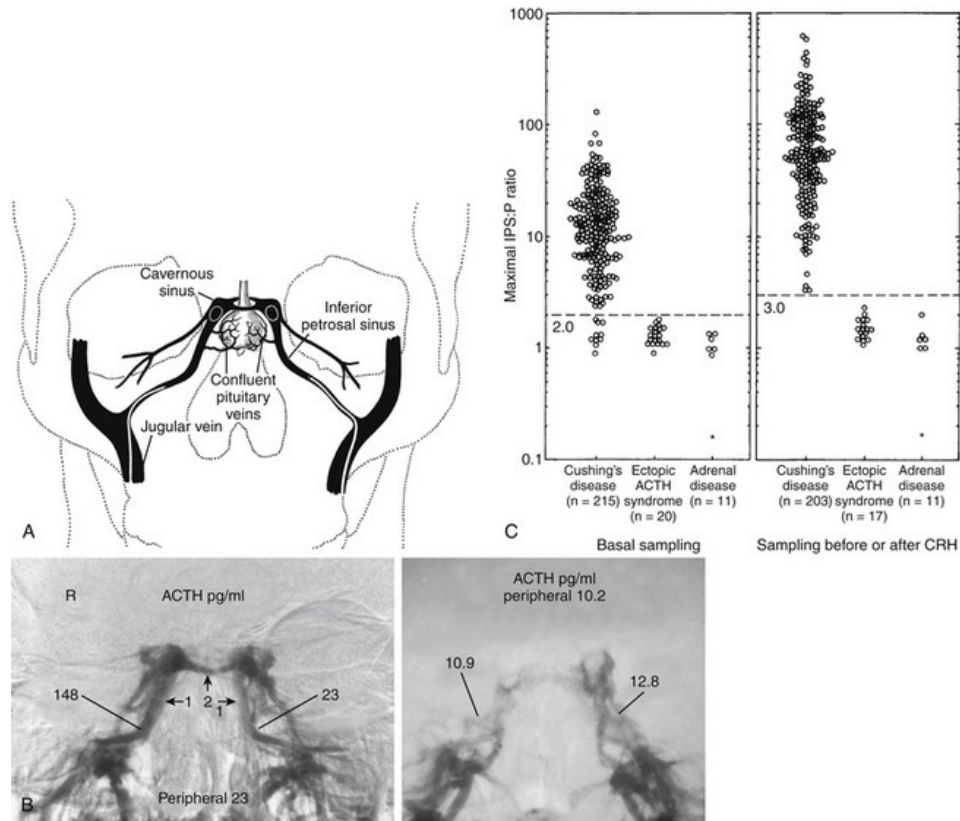


Figura 19- Anatomia, colocação do cateter e venografia do BIPSS (<https://clinicalgate.com/cushings-disease/>)

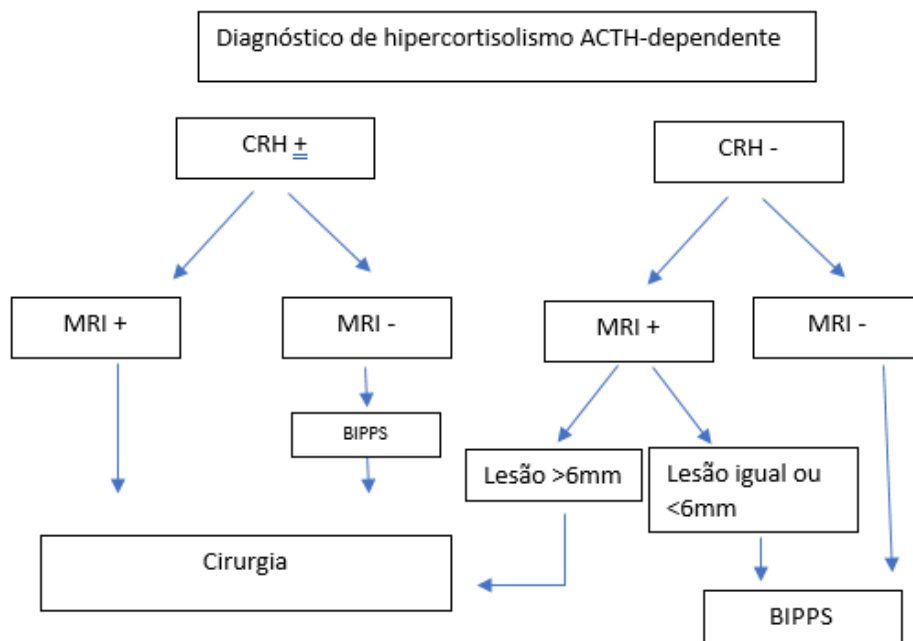


Figura 20- Algoritmo de realização de BIPSS no diagnóstico de síndrome de Cushing ACTH dependente. Adaptado a partir de (Zampetti, Grossrubatscher, Dalino Ciamarella, Boccardi, & Loli, 2016)

2.8 Tratamento da síndrome de Cushing

A primeira opção de tratamento da síndrome de Cushing é a cirurgia (Paiva, Ribeiro, Paiva, & Ribeiro, 2005). No entanto após a remoção cirúrgica do tumor (adenoma, carcinoma, tumor ectópico produtor de ACTH) torna-se necessário repor o nível de glucocorticoides para recuperar a função de eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, através de medicação. A presença de tumores ocultos ou metastáticos também requerem terapia medicamentosa ou suprarrenalectomia (Sharma et al., 2015).

Nos casos que envolvem as glândulas suprarrenais as primeiras opções passam pela laparoscopia unilateral ou suprarrenalectomia bilateral que apresentam excelente prognóstico em casos benignos. No caso da opção terapêutica ser suprarrenalectomia bilateral, o paciente terá de tomar glucocorticoides e mineralcorticoides durante o resto da sua vida (Newell-Price et al., 2006).

Quando não é possível fazer a excisão completa do tumor hipofisário por estar infiltrado no seio cavernoso, envolvido com a artéria carótida interna, perto do quiasma óptico ou se o paciente recusar fazer a cirurgia é possível a cura através de radioterapia hipofisária (Wagner-Bartak et al., 2017). A existência de hipercortisolismo após a cirurgia pode ser tratado também com radioterapia hipofisária. Com radioterapia convencional também é possível, no entanto demora mais tempo na obtenção de resultados (Newell-Price et al., 2006).

Através de terapia medicamentosa é possível apenas controlar o hipercortisolismo (reduzir os níveis de cortisol na corrente sanguínea) e não eliminar a fonte de secreção. Normalmente é utilizada quando o paciente está à espera de cirurgia, a cirurgia está contraindicada, cirurgia sem sucesso ou quando o paciente espera o efeito da radioterapia. Existem três tipos de fármacos que são utilizados na síndrome de Cushing, são eles: neuromoduladores, inibidores de síntese de cortisol e antagonista dos recetores de glucocorticoides (Paiva et al., 2005).

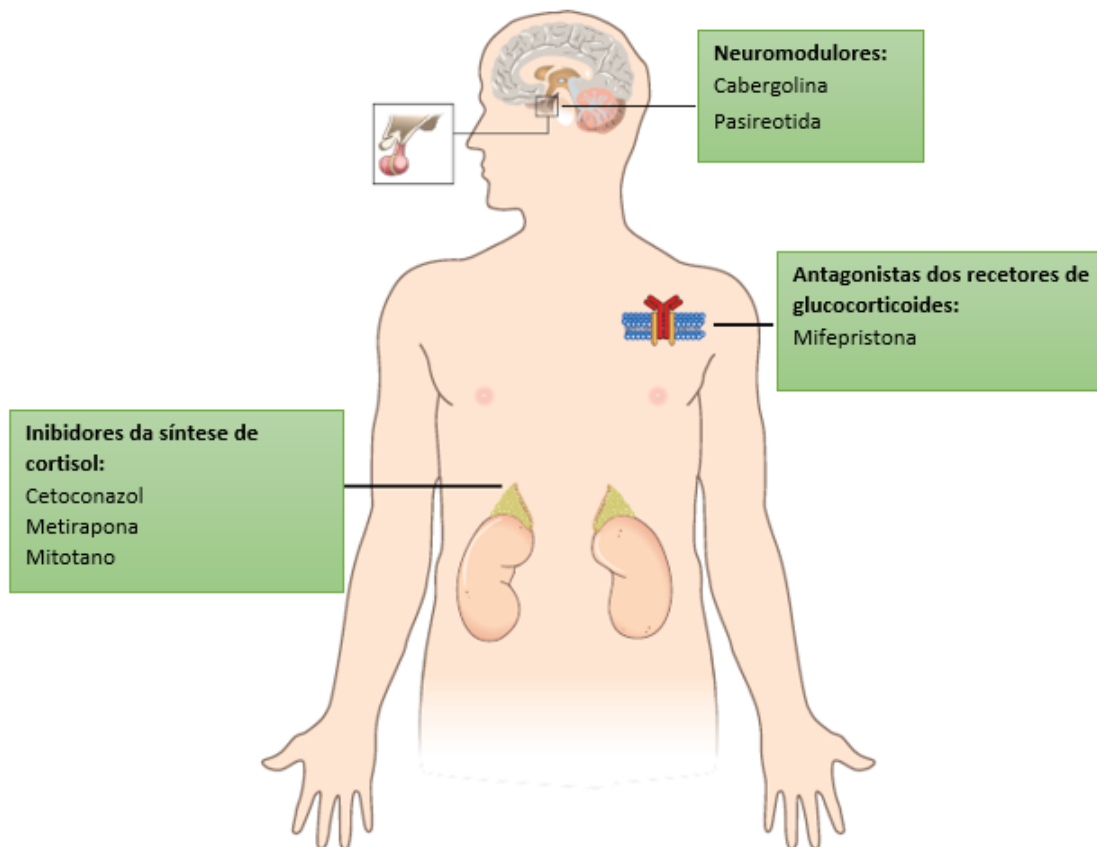


Figura 21- Representação dos fármacos utilizados na síndrome de Cushing. Adaptada de (Pivonello et al., 2015).

Os neuromoduladores atuam na redução de secreção de ACTH através de agonistas de somatostatina e dopamina que são por exemplo: Pasireotida (análogo dasomatostatina) e cabergolina (agonista da dopamina) (Paiva et al., 2005).

Os inibidores da síntese de cortisol vão atuar ao nível da esteroidegênese e são os fármacos mais eficazes para tratar as situações de hipercortisolismo. Os fármacos utilizados são: Metirapona (inibe a 11β -hidroxilase e 17α -hidroxilase), Cetoconazole (inibe a CYP11A1 e CYP11B1), Mitotano (inibe CYP11A1 e CYP11B1) e Etomidato (inibe CYP11A1 e CYP11B1) (Paiva et al., 2005).

Os antagonistas dos recetores de glucocorticoides vão bloquear de forma reversível os recetores de glucocorticoides e assim inibir a síntese de cortisol, exemplo: Mifepristona (RU 486) (Paiva et al., 2005).

3. Saliva

A saliva humana é um fluido biológico incolor que se encontra na cavidade oral e em condições normais apresenta um valor de pH entre 6,0 e 7,0. É um fluido fundamental para a preservação e manutenção da saúde oral e normalmente recebe pouca atenção até que a sua quantidade ou qualidade seja diminuída. Nos últimos anos a saliva tem sido alvo de vários estudos, relacionando-a com várias doenças ou sob efeito de algum medicamento. A sua utilização permite uma amostra não invasiva que pode ser útil no diagnóstico médico e pesquisa de doenças, contudo é importante ter algum conhecimento da sua origem, fluxo e função salivar (Humphrey & Williamson, 2001).

3.1 Glândulas salivares

A sua produção origina-se nas células acinares das glândulas salivares e posteriormente é libertada para a cavidade oral. Existem dois grupos de glândulas salivares, são as glândulas major e as minor (Figura 22). Cada glândula é inervada de forma autónoma, sujeitas a estimulação simpática e parassimpática e são consideradas exócrinas em relação a sua função. Existem três glândulas major que são a glândula parótida (ácinos constituídos por células serosas), glândula submandibular (considerada mista onde a sua maioria dos ácinos são constituídos por células serosas) e a glândula sublingual (quase totalidade dos ácinos apresentam células mucosas). As glândulas minor apresentam ácinos constituídos por células mucosas e serosas e encontram se essencialmente nos lábios, língua e no palato (Puy, 2006; Yoshizawa et al., 2013).

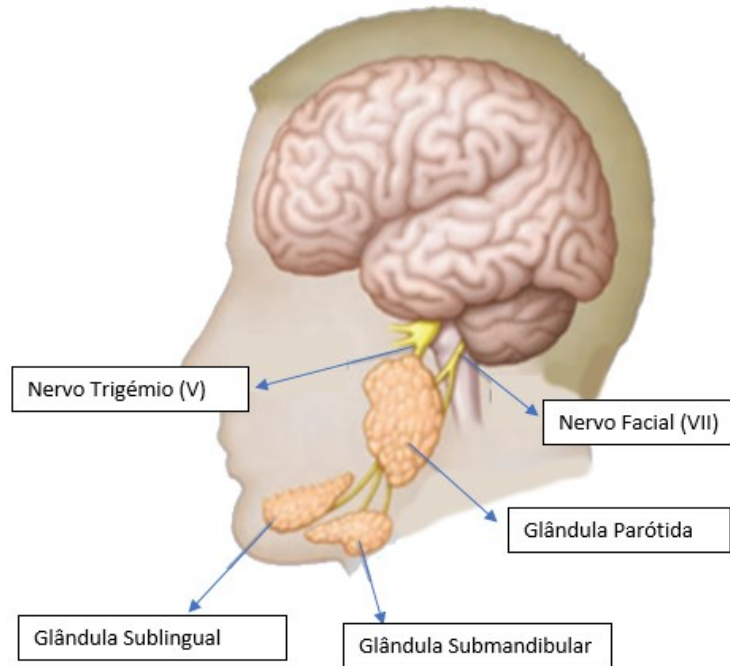


Figura 22- Representação de as 3 glândulas salivares major. Adaptada a partir de (Wong, 2010)

O facto de as glândulas serem unidades permeáveis e de se encontrarem muito próximas de estruturas do sistema cardiovascular, nomeadamente de capilares, permite que ocorram trocas de moléculas e que se verifique muitas vezes a presença de moléculas derivadas do sangue nas glândulas salivares (células acinares). Estas trocas podem ocorrer por via intracelular através de difusão passiva ou transporte ativo enquanto a nível extracelular o mecanismo mais conhecido é a ultrafiltração que ocorre em espaços entre células (Figura 23) (Yoshizawa et al., 2013).

A velocidade das transferências que ocorrem entre a corrente sanguínea e o fluído salivar de moléculas hormonais é controlada através da difusão de camadas lipídicas dos capilares e as células epiteliais das glândulas. As moléculas lipofílicas como as hormonas esteroides passam estas barreiras com uma velocidade muito superior que as moléculas hidrofílicas, como é o caso dos péptidos. Estas transferências ocorrem principalmente por difusão passiva (a favor do gradiente de concentração) entre a parede do capilar e as células acinares (M. Gröschl, 2009).

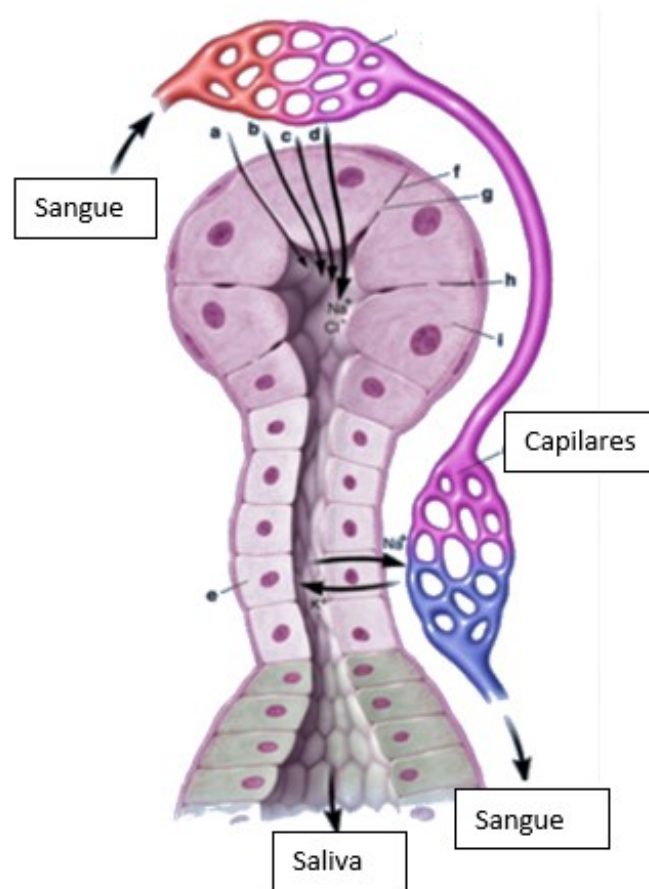


Figura 23-Ilustração do mecanismo molecular realizado entre capilar sanguíneo e as glândulas salivares. Adaptada a partir de (Yoshizawa et al., 2013)

3.2 Secreção

A secreção salivar normal diária pode variar entre 500 a 700ml e o seu volume médio em boca é cerca de 1,1ml. A sua produção é controlada pelo sistema nervoso autónomo (SNA) e a sua secreção em repouso pode oscilar entre os 0,25 ml/mm e os 0,35 ml/mm. A secreção acontece maioritariamente pelas glândulas submandibular e glândulas sublingual. Existe um aumento do volume salivar antes, durante e após as refeições, com o seu pico máximo a ocorrer ao nível das 12.00 h (meio-dia) e a diminuir de forma considerável durante o sono (Puy, 2006)

3.3. Composição

A saliva é composta principalmente por água com uma taxa que varia entre 95% e 99,4% a restante percentagem (inferior a 5%) envolve vários minerais, eletrólitos, hormonas, enzimas, imunoglobulinas, citocinas e outros componentes cuja quantidade é variável consoante a glândula secretora. Os capilares que passam nas glândulas salivares facilitam, como já tinha sido afirmado anteriormente, uma entrada de hormonas bem como outras células da circulação sistémica para a saliva. No caso do cortisol quando ligado à globulina de ligação a corticosteroides (CBG) e albumina, proteína de grandes proporções dificulta o processo de difusão através das membranas celulares. Isto explica o fato de apenas o cortisol na sua forma livre e biologicamente ativo ser encontrado na saliva (Farnaud, Kostı, Getting, & Renshaw, 2010).

3.4 Biomarcadores salivares

Existem várias definições de biomarcadores, em 1998, o *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiu biomarcadores como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos, processos patogénicos ou respostas a uma intervenção terapêutica”. No entanto existe ainda outra definição proposta pela *International Programme on Chemical Safety, led by the World Health Organization (WHO)* que em coordenação com a *United Nations and the International Labor Organization* definiram biomarcador como “qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido no corpo ou nos seus produtos que possa influenciar ou prever a incidência de resultados ou doença” (Strimbu & Tavel, 2011).

Uma definição mais recente e também mais ampla tem em consideração não só apenas a incidência e desfecho da doença, mas também os efeitos de tratamentos, intervenções e mesmo a exposição ambiental ou intencional, como produtos químicos ou nutrientes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou como a verdadeira definição de biomarcador “qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um potencial perigo, que pode ser químico, físico ou biológico. A resposta

medida pode ser funcional, fisiológica, bioquímica a nível celular ou uma interação molecular.” Exemplos de biomarcadores podem ir desde a pulsação, pressão sanguínea através de testes químicos básicos, testes mais complexos laboratoriais de sangue e a outros tecidos. Os sinais médicos têm uma longa história de uso na prática clínica, tão antiga quanto a prática médica em si. Os biomarcadores são os sinais médicos mais objetivos e quantificáveis que a ciência moderna de laboratório permitem medir de uma forma mais fidedigna e reprodutiva (Strimbu & Tavel, 2011).

A descoberta de biomarcadores microvasculares, imunológicos e moleculares baseados na saliva permitem oportunidades únicas de utilizar fluidos orais para avaliar a condição de indivíduos saudáveis e doentes (M. Gröschl, 2009).

O uso de saliva como amostra biológica tem sido uma alternativa não invasiva e não traumática em comparação com amostras recolhidas de sangue, de onde se recolhem o plasma/soro que vão permitir a recolha de biomarcadores endócrinos, como hormonas esteroides, aminas e péptidos. Há sensivelmente quarenta anos que os investigadores usam a saliva como amostra biológica (M. Gröschl, 2009). A tabela 5 relaciona os biomarcadores encontrados na saliva com várias patologias referenciadas em estudos pelos devidos autores.

3.5 Saliva vs Sangue

O sangue é um fluido corporal complexo que contém uma grande variedade de componentes moleculares como enzimas, hormonas, anticorpos e fatores de crescimento. É a fonte de biomarcadores mais utilizada comparativamente com recolha de tecidos, fezes, saliva, etc. As recolhas salivares apesar de conterem a maioria dos constituintes presentes no sangue, apresenta-os em menor concentração (Lee & Wong, 2009). No entanto a saliva apresenta várias vantagens em relação à recolha de sangue, tais como: A recolha de saliva ser pouco exigente e poder ser realizada por qualquer pessoa ou até mesmo a própria, enquanto que a recolha sanguínea requer pessoas especializadas; A recolha salivar não é invasiva nem dolorosa para os pacientes; As amostras são mais seguras, permitindo uma redução do risco de infeção com HIV; São mais fáceis de armazenar, enviar e requerem menos manipulação que as amostras de sangue. (Yoshizawa et al., 2013)

Tudo isto são razões convincentes para utilizar a saliva como ferramenta de diagnóstico (Lee & Wong, 2009).

Tabela 5-Tabela que relaciona marcadores salivares com várias doenças. Adaptada a partir de (Marti-Alamo, Mancheno-Franch, Marzal-Gamarra, & Carlos-Fabuel, 2012)

Patologia	Autor (ano)	Marcador salivar
Infeções		
-Infeção viral por CMV	Correia-Silva (2007)	CMV
-Bactérias: infecção por H.pylori	Medina (2009) Morales- Espinosa (2009)	H.pylori
Doenças autoimunes		
Síndrome de Sjörger	Ryu (2006) Baldini (2008) Fleissig (2009) Hu (2011)	Albumina, actina, alfa-actina-1, Ig gama-1 chain região C, B2-microglobulina, Ig receptor polimérico amílase salivar, lisozima C, anidrase carbónica VI, cistatina C, Ig recetor polimérico, proteína prolactina, cistatina SN, calgranulina A e B, proteína transportadora de ácidos gordos, anti-transglutaminase, anti-histona, anti-SSA e anti-SSB
Doença celíaca	Pastore (2008) Bonamico (2008 ,2011)	Tecido anti-transglutaminase (TTG) anticorpos
Endocrinopatias		
Síndrome de Cushing	Chiappin(2007) Raff(2009) Boscaro(2009)	Cortisol
Oncologia		
Cancro da mama	Alpha-Hossein (2009)	Glicoproteína CA 15-3
Cancro do pulmão	Xiao (2011)	HP, AZGP1, calproteína
Cancro gástrico	Xu (2009)	Proteínas 6556.81 Da e 7081.17 Da
OSCC	Balicki (2005)	Fator de crescimento epiderme
	Rhodus (2005)	IL-1, IL6, IL 8, TNF- α
	Mager (2005)	Bactéria
	Pickering (2007)	ET-1
	SahebJamee (2008)	TNF- α , IL-1 α e IL 8
	Wu (2010)	-CD44, IL1 β , IL 8 e proteína cálcio S100 -Anticorpos contra o gene p53 -Promotor hipermetilação do gene p 16 -DNA polimorfismo de IL-1b, IL 6, IL8 , TNF- α , VEGF
Outros		
Stress:	Bosch(2003) Nater(2006,2009) Strahler (2010) Filaire (2010)	α amílase salivar

III. Conclusão

A síndrome de Cushing é ainda hoje vista como um desafio para a comunidade científica porque apesar de uma baixa incidência apresenta ainda valores elevados de morbidade e mortalidade.

O seu diagnóstico deve ser realizado o mais breve possível, evitando que os pacientes quando se dirigem às instituições médicas, a doença não se encontre num estado muito avançado.

Como tal para a realização de um bom diagnóstico é necessário ter conhecimento da síndrome de Cushing e do funcionamento do organismo. É importante numa primeira fase ter conhecimento das suas características clínicas mais específicas como o caso de obesidade centrípeta (um maior volume na zona do tronco), acumulação de gordura na zona supra claviclar (corcunda de búfalo), estrias de cor púrpura com largura superior a 1 cm e cara em forma de lua cheia.

Apesar de se saber que a síndrome de Cushing tem origem num contacto supra fisiológico com glucocorticoides, nomeadamente o cortisol, existem fatores importantes para a sua ocorrência que podem ser por uma causa endógena ou por uma causa exógena.

A síndrome de Cushing de causa exógena é a maior causa de síndrome e ocorre maioritariamente pela toma de glucocorticoides medicamente prescritos.

No entanto o facto de se encontrar cortisol em quantidades superiores ao normal na saliva pode indicar que estamos na presença de síndrome de Cushing, o que faz com que o cortisol seja considerado um biomarcador salivar da síndrome de Cushing.

É necessário perceber que a presença de cortisol em quantidades superiores ao normal na saliva ou na corrente sanguínea não prova que se esteja com 100% de certeza perante um paciente com síndrome de Cushing, pois existem outras doenças como por exemplo o alcoolismo, obesidade, depressão e até mesmo um aumento do stress que pode resultar num aumento pontual de cortisol.

A saliva é um fluido biológico que para além de ter as suas funções na cavidade oral como exemplo: proteção da mucosa, início da digestão contém biomarcadores que se tornam importantíssimos para a realização do diagnóstico de SC.

A utilização de saliva na recolha de biomarcadores resulta de vários anos de investigação e de evolução ao nível de diagnóstico. Permite um método de recolha menos invasivo e um estudo igualmente rico quando comparada com a recolha sanguínea, não apenas para a síndrome de Cushing mas para outras doenças.

Para além dos efeitos adversos de um excesso de cortisol é necessário perceber também que o cortisol é a hormona mais importante da cadeia dos glucocorticoides para o ser humano. Tem uma função muito importante na resposta ao stress que permite ao corpo estabelecer um equilíbrio durante o seu dia-a-dia e na ação anti-inflamatória inibindo a síntese de algumas células pró-inflamatórias.

Com o objetivo de um enriquecimento pessoal e profissional e ainda como forma de poder ajudar numa primeira fase de encaminhamento e de comunicação com o Médico generalista ou especialista, é importante que o Médico dentista, enquanto profissional de saúde se deva manter informado e atualizado em relação ao avanço biotecnológico não só da Medicina Dentária, mas também de outras áreas da saúde.

Um Médico dentista durante a consulta de medicina dentária não observa só a cavidade oral do paciente, observa o paciente como um todo.

IV-Bibliografía

- Adina F. Turcu, R. J. A. (2016). Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinology and Metabolism*, 34(5), 352–359.
<https://doi.org/10.1177/0963721414541462>.Self-Control
- Aguilar Cordero, M. J., Sánchez López, A. M., Mur Villar, N., García García, I., Rodríguez López, M. A., Ortegón Piñero, A., & Cortes Castell, E. (2014). Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico en niños y adultos; revisión sistemática. *Nutricion Hospitalaria*, 29(5), 960–968.
<https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.5.7273>
- Alexandraki, K. I., & Grossman, A. B. (2010). Novel insights in the diagnosis of Cushing’s syndrome. *Neuroendocrinology*, 92(SUPPL. 1), 35–43.
<https://doi.org/10.1159/000314295>
- Alwani, R. A., Jongbloed, L. W. S., De Jong, F. H., Van Der Lely, A. J., De Herder, W. W., & Feelders, R. A. (2014). Differentiating between Cushing’s disease and pseudo-Cushing’s syndrome: Comparison of four tests. *European Journal of Endocrinology*, 170(4), 477–486. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0702>
- Arnaldi, G., Angeli, A., Atkinson, A. B., Bertagna, X., Cavagnini, F., Chrousos, G. P., ... Boscaro, M. (2003). Diagnosis and Complications of Cushing’s Syndrome: A Consensus Statement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(12), 5593–5602. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030871>
- Arnaldi, G., Scandali, V. M., Trementino, L., Cardinaletti, M., Appolloni, G., & Boscaro, M. (2010). Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing’s syndrome. *Neuroendocrinology*, 92(SUPPL. 1), 86–90. <https://doi.org/10.1159/000314213>
- Bamberger, C. M., Schulte, H. M., & Chrousos, G. P. (2008). Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 17(3), 245–261. Retrieved from <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/edrv-17-3-245>
- Bertagna, X., Guignat, L., Groussin, L., Bertherat, J., Bertagna, X., Guignat, L., ... Fava, G. (2009). Cushing’s disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23(5), 607–623.

- <https://doi.org/10.1016/j.beem.2009.06.001>
- Bista, B., & Beck, N. (2014). Cushing syndrome. *Indian Journal of Pediatrics*, *81*(2), 158–164. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1203-8>
- Cardoso, R., & Palma, I. (2009). Cortex Supra-Renal: Anatomia, Embriologia e Fisiologia. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, *1*, 71–76.
- Carlos, F. C. J. (2010). Síndrome De Cushing. *Revista de Actualización Clínica*, 565–568. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)71408-1](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)71408-1)
- Castro, M., & Moreira, A. C. (2007). Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, *51*(8), 1191–1198. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.02.001>
- Ciechanover, A., & Ciechanover, A. (2006). Intracellular Protein Degradation: From a Vague Idea thru the Lysosome and the Ubiquitin-Proteosome System and onto Human Diseases and Drug Targeting. *ASH Education Book 2006*, *1*, 1–12. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.1>
- Cizza, G., & Rother, K. I. (2012). Cortisol binding globulin: More than just a carrier? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(1), 77–80. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3090>
- Coates, J. M., Gurnell, M., & Sarnyai, Z. (2010). From molecule to market: steroid hormones and financial risk-taking. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *365*(1538), 331–343. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0193>
- Conlin, P. R., Mciver, B., Alexander, E. K., Cunney, M. B., & Dluhy, R. G. (2002). PUBLISHING STAFF Cushing ' s Syndrome Series Editors : Contributors :, *4*, 1–11.
- de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, *60*(4), 604–617. <https://doi.org/10.1042/bj0600604>
- Drougat, L., Espiard, S., & Bertherat, J. (2015). Genetics of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: A model for early diagnosis of Cushing's

- syndrome? *European Journal of Endocrinology*, 173(4), M121–M131.
<https://doi.org/10.1530/EJE-15-0532>
- Farnaud, S. J. C., Kosti, O., Getting, S. J., & Renshaw, D. (2010). Saliva: Physiology and Diagnostic Potential in Health and Disease. *The Scientific World JOURNAL*, 10, 434–456. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.38>
- Friedman, T. C., Ghods, D. E., Shahinian, H. K., Zachery, L., Shayesteh, N., Seasholtz, S., ... McCutcheon, I. E. (2010). High prevalence of normal tests assessing hypercortisolism in subjects with mild and episodic cushing's syndrome suggests that the paradigm for diagnosis and exclusion of cushing's syndrome requires multiple testing. *Hormone and Metabolic Research*, 42(12), 874–881.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1263128>
- Garabedian, M. J., Harris, C. A., & Jeanneteau, F. (2017). Glucocorticoid receptor action in metabolic and neuronal function [version 1; referees: 3 approved], 6(0), 1–11. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11375.1>
- Gardill, B. R., Vogl, M. R., Lin, H. Y., Hammond, G. L., & Muller, Y. A. (2012). Corticosteroid-Binding Globulin: Structure-Function Implications from Species Differences. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052759>
- Goñi Iriarte, M. J. (2009). Síndrome de Cushing: situaciones especiales. *Endocrinología Y Nutrición*, 56(5), 251–261. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)71408-1](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)71408-1)
- Hammond, G. L., Smith, C. L., Goping, I. S., Underhill, D. A., Harley, M. J., Reventos, J., ... Bardin, C. W. (1987). Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5153–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5153>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2017). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
- Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1), 163–171.
[https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)71408-1](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)71408-1)

- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169.
<https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Ifedayo, A. O., & Olufemi, A. F. (2013). Urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing ' s syndrome : How useful ?, 16(3), 269–272.
- Ilias, I., Torpy, D. J., Pacak, K., Mullen, N., Wesley, R. A., & Nieman, L. K. (2005). Cushing's Syndrome Due to Ectopic Corticotropin Secretion: Twenty Years' Experience at the National Institutes of Health. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(8), 4955–4962. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2527>
- Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-1>
- Kola, B., & Grossman, A. B. (2008). Dynamic testing in Cushing's syndrome. *Pituitary*, 11(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/s11102-007-0079-x>
- Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A., & Nieman, L. K. (2015). Cushing ' s syndrome, 913–927. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61375-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61375-1)
- Lahera Vargas, M., & da Costa, C. V. (2009). Prevalencia, etiología y cuadro clínico del síndrome de Cushing. *Endocrinología Y Nutrición*, 56(1), 32–39.
[https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)70191-3](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70191-3)
- Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., & Zechner, R. (2011). Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 14–27.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.004>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>
- Lin, H. Y., Muller, Y. A., & Hammond, G. L. (2010). Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(1), 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.06.015>

- Lin, L.-Y., Teng, M. M.-H., Huang, C.-I., Ma, W.-Y., Wang, K.-L., Lin, H.-D., & Won, J. G. S. (2007). Assessment of bilateral inferior petrosal sinus sampling (BIPSS) in the diagnosis of Cushing's disease. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 70(1), 4–10. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70293-X](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70293-X)
- Lodish, M. (2016). Cushing's syndrome in childhood: update on genetics, treatment, and outcomes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 1–14. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000127.Cushing>
- M. Gröschl. (2009). Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire. *Annales de Biologie Clinique*, 67(5), 493–504.
- Maidana, P., Bruno, O. D., & Mesch, V. (2013). [A critical analysis of cortisol measurements: an update]. *Medicina*, 73, 579–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356273>
- Nader, N., Chrousos, G. P., & Kino, T. (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(5), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.011>
- Newell-Price, J. (2009). 2 Diagnosis/differential diagnosis of Cushing's syndrome: a review of best practice. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 23(SUPPL. 1), S5–S14. [https://doi.org/10.1016/S1521-690X\(09\)70003-X](https://doi.org/10.1016/S1521-690X(09)70003-X)
- Newell-Price, J., Bertagna, X., Grossman, A. B., & Nieman, L. K. (2006). Cushing's syndrome. *The Lancet*, 367(9522), 1605–1617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68699-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68699-6)
- Newell-price, J., Trainer, P., Besser, M., & Grossman, A. (1998). The Diagnosis and Differential Diagnosis of Cushing ' s Syndrome and Pseudo-Cushing ' s States. *Endocrine Reviews*, 19(5), 647–672.
- Nicolaidis, N. C., Charmandari, E., Kino, T., & Chrousos, G. P. (2017). Stress-related and circadian secretion and target tissue actions of glucocorticoids: Impact on health. *Frontiers in Endocrinology*, 8(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00070>
- Nieman, L. K. (2015). Cushing's syndrome: Update on signs, symptoms and

- biochemical screening. *European Journal of Endocrinology*, 173(4), M33–M38.
<https://doi.org/10.1530/EJE-15-0464>
- Nieman, L. K., Biller, B. M. K., Findling, J. W., Newell-Price, J., Savage, M. O., Stewart, P. M., ... Edwards, H. (2008). The diagnosis of Cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(5), 1526–1540. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0125>
- Nieman, L. K., Feelders, R. A., & Kennedy, E. (2015). Cushing ' s syndrome : epidemiology and developments in disease management, 281–293.
- Paiva, I., Ribeiro, C., Paiva, I., & Ribeiro, C. (2005). Terapêutica farmacológica da doença de cushing. *Acta Medica Portuguesa*.
- Palmieri, S., Morelli, V., Polledri, E., Fustinoni, S., Mercadante, R., Olgiati, L., ... Chiodini, I. (2013). The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism. *European Journal of Endocrinology*, 168(3), 289–296.
<https://doi.org/10.1530/EJE-12-0803>
- Papanicolaou, D. A., Yanovski, J. A., Cutler, G. B., Chrousos, G. P., & Nieman, L. K. (2009). Distinguishes Cushing ' s Syndrome from Pseudo-Cushing. *Endocrinology And Metabolism*, 83(4), 1163–1167. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.4.4733>
- Pappachan, J. M., Hariman, C., Edavalath, M., Waldron, J., & Hanna, F. W. (2017). Cushing's syndrome: a practical approach to diagnosis and differential diagnoses. *Journal of Clinical Pathology*, 70(4), 350–359. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203933>
- Pivonello, R., De Leo, M., Cozzolino, A., & Colao, A. (2015). The treatment of cushing's disease. *Endocrine Reviews*, 36(4), 385–486.
<https://doi.org/10.1210/er.2013-1048>
- Pivonello, R., Isidori, A. M., De Martino, M. C., Newell-Price, J., Biller, B. M. K., & Colao, A. (2016). Complications of Cushing's syndrome: State of the art. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 4(7), 611–629.
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)00086-3)
- Puy, C. L. (2006). La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el

- diagnóstico de algunas patologías. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, E449–55.
- Raff, H. (2013). Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: Methodological considerations. *Endocrine*, 44(2), 346–349.
<https://doi.org/10.1007/s12020-013-0013-0>
- Raff, H., & Carroll, T. (2015). Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care. *The Journal of Physiology*, 593(3), 493–506.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.282871>
- Raff, H., Sharma, S. T., & Nieman, L. K. (2014). Physiological basis for the etiology, diagnosis, and treatment of adrenal disorders: Cushing's syndrome, adrenal insufficiency, and congenital adrenal hyperplasia. *Comprehensive Physiology*, 4(2), 739–769. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130035>
- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Sakihara, S., Kageyama, K., Oki, Y., Doi, M., Iwasaki, Y., Takayasu, S., ... Suda, T. (2010). Evaluation of plasma, salivary, and urinary cortisol levels for diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrine Journal*, 57(4), 331–337.
<https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-340>
- Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 94(1), 3–21.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl051>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, a. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocrine Reviews*, 21(April), 55–89. <https://doi.org/10.1210/er.21.1.55>
- Schakman, O., Gilson, H., & Thissen, J. P. (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *Journal of Endocrinology*, 197(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0606>
- Sharma, S. T., Nieman, L. K., & Feelders, R. A. (2015). Cushing's syndrome: Epidemiology and developments in disease management. *Clinical Epidemiology*, 7, 281–293. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44336>
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal

- axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–395. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.222>
- Stachowicz, M., & Lebidzińska, A. (2016). The effect of diet components on the level of cortisol. *European Food Research and Technology*, 242(12), 2001–2009. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2772-3>
- Steffensen, C., Bak, A. M., Zøylner Rubeck, K., & Jørgensen, J. O. L. (2010). Epidemiology of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*, 92(SUPPL. 1), 1–5. <https://doi.org/10.1159/000314297>
- Storr, H. L., Isidori, A. M., Monson, J. P., Besser, G. M., Grossman, A. B., & Savage, M. O. (2004). Prepubertal Cushing's disease is more common in males, but there is no increase in severity at diagnosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8), 3818–3820. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031531>
- Strimbu, K., & Tavel, J. a. (2011). What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>. What
- Suh, S., & Park, M. K. (2017). Glucocorticoid-Induced Diabetes Mellitus: An Important but Overlooked Problem. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, 32(2), 180–189. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.2.180>
- Tata, J. R. (2005). One hundred years of hormones. *EMBO Reports*, 6(6), 490–496. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400444>
- Tateishi, Y., Kouyama, R., Mihara, M., Doi, M., Yoshimoto, T., & Hirata, Y. (2012). Evaluation of salivary cortisol measurements for the diagnosis of subclinical Cushing's syndrome. *Endocrine Journal*, 59(4), 283–289. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ11-0204>
- Vilar, L., Freitas, M. C., Naves, L. A., Canadas, V., Albuquerque, J. L., Botelho, C. A., ... Casulari, L. A. (2008). The role of non-invasive dynamic tests in the diagnosis of Cushing ' s syndrome, 1008–1013.
- Wagner-Bartak, N. A., Baiomy, A., Habra, M. A., Mukhi, S. V., Morani, A. C., Korivi, B. R., ... Elsayes, K. M. (2017). Cushing Syndrome: Diagnostic Workup and Imaging Features, With Clinical and Pathologic Correlation. *American Journal of Roentgenology*, 209(1), 19–32. <https://doi.org/10.2214/AJR.16.17290>

- Walker, B. R. (2007). Glucocorticoids and cardiovascular disease. *European Journal of Endocrinology*, *157*(5), 545–559. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0455>
- Wang, M. (2005). The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutrition & Metabolism*, *2*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-3>
- Wang, X. L., Bassett, M., Zhang, Y., Yin, S., Clyne, C., White, P. C., & Rainey, W. E. (2000). Transcriptional regulation of human 11beta-hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology*, *141*(10), 3587–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014212>
- Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica*, *35*(2), 109–125. <https://doi.org/10.1586/eem.10.1>
- Whitnall, M. H., Smyth, D., & Gainer, H. (1987). Vasopressin Coexists in Half of the Corticotropin-Releasing Factor Axons Present in the External Zone of the Median Eminence in Normal Rats. *Neuroendocrinology*, *45*(5), 420–424. <https://doi.org/10.1159/000124768>
- Yip, J., Geng, X., Shen, J., & Ding, Y. (2017). Cerebral gluconeogenesis and diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00521>
- Yorke, E., Atiase, Y., Akpalu, J., & Sarfo-Kantanka, O. (2017). Screening for Cushing Syndrome at the Primary Care Level: What Every General Practitioner Must Know. *International Journal of Endocrinology*, *2017*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/1547358>
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. W. (2013). Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>