

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE: BASI  
MOLECOLARI DELL'AZIONE ORMONALE XXV CICLO

Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Specialistica

Direttore: Prof. F. Purrello

---

**Dott. Giuseppe Fedè**

IL SURRENE NELLA CIRROSI EPATICA:

LA SINDROME EPATO-SURRENALICA

—————  
TESI DI SPECIALIZZAZIONE  
—————

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. F. Purrello**

---

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

## **ABSTRACT**

L'Insufficienza surrenalica (IS), definita da deficit di sintesi o di azione dei glucocorticoidi, dovuto ad un danno strutturale del surrene (IS primitiva) oppure ad un'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisario (IS secondaria), è stata riscontrata con frequenza sempre maggiore in pazienti con epatopatie acute e croniche, ed alcuni autori hanno proposto il termine "sindrome epato-surrene". La prevalenza di IS nei pazienti con malattia epatica varia a seconda della popolazione studiata: pazienti con eventi acuti (33% -92%), cirrosi stabile (31% -60%), o cirrosi scompensata, come il sanguinamento da varici esofagee (30% - 48%) e ascite (26% -64%). Tuttavia non c'è consenso corrente sui criteri diagnostici per definire l'IS nei pazienti con malattia epatica, e non è ancora chiarita la sua rilevanza nella prognosi dei pazienti con cirrosi stabile.

## **ABSTRACT**

Adrenal Insufficiency (AI), defined as deficient production or action of glucocorticoids resulting from either a structural damage of adrenal glands (primary adrenal insufficiency) or an impairment of the hypothalamic-pituitary axis (secondary adrenal disease), is being reported with increasing frequency in patients with liver disease, and some authors proposed the term "hepato-adrenal syndrome". The

prevalence of AI in patients with liver disease varies widely according to the study population: critically ill patients (33%-92%), stable cirrhosis (31%-60%), or decompensated cirrhosis, such as variceal bleeding (30%-48%) and ascites (26%-64%). However there is no current consensus about diagnostic criteria to define AI in patients with liver disease, and its prognostic relevance in stable cirrhosis is still unclear.

**KEYWORDS:**

Adrenal, insufficiency, cirrhosis, cortisol

## **ABBREVIAZIONI**

Insufficienza Surrenalica (IS), Critical Illness-related Corticosteroid Insufficiency (CIRCI), Short Synacthen Test (SST), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), Low Dose Short Synacthen Test (LDSST), CRH (Corticotropin-releasing hormone), Receiving Operating Curve (ROC), Cortisol Binding Globulin (CBG), Free Cortisol Index (FCI), Long Synacthen Test (LST).

## INDICE

Introduzione.....	pag. 3
Insufficienza Surrenalica nei pazienti con malattie epatiche acute..	pag. 4
Funzione surrenalica nella cirrosi stabile.....	pag. 6
Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis.....	pag. 7
Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review...	pag. 11
Critical illness-related corticosteroid insufficiency in patients with cirrhosis and variceal bleeding .....	pag. 12
Comparison of Total Cortisol, Free Cortisol, and Surrogate Markers of Free Cortisol in Diagnosis of Adrenal Insufficiency in Patients with Stable Cirrhosis.....	pag. 13
Approccio multistep per lo studio della funzione surrenalica nella cirrosi.....	pag. 18
Tabelle.....	pag. 22
Bibliografia.....	pag. 26

## **Introduzione**

L'Insufficienza Surrenalica (IS) è definita da un deficit di sintesi o di azione dei glucocorticoidi, dovuto ad un danno strutturale del surrene (IS primitiva) oppure ad un'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisario (IS secondaria). E' una patologia rara nella popolazione generale, con una prevalenza di 35–140 casi per milione di abitanti (1). Tuttavia l'IS è stata riportata con una prevalenza sempre maggiore in pazienti critici ricoverati in terapia intensiva (in corso di sepsi e shock, polmoniti severe, traumi gravi, ustioni, pancreatiti, dopo interventi cardiocirurgici) (2). In questi pazienti la disfunzione surrenalica è stata descritta più recentemente in termini di “Critical Illness-related Corticosteroid Insufficiency” (CIRCI), ovvero inadeguata azione cellulare dei corticosteroidi in relazione alla gravità della malattia, dovuta a ridotta produzione surrenalica di glucocorticoidi oppure ad aumento della resistenza periferica (2).

Il progetto di ricerca svolto durante il periodo di dottorato è stato incentrato sullo studio della funzione surrenalica nella cirrosi stabile. Infatti in questo campo i dati a nostra disposizione fino a pochi anni addietro erano scarsi e parzialmente conclusivi. Non era chiaro se l'IS riscontrata in pazienti epatopatici con malattie acute (sepsi/shock) fosse correlata all'evento acuto oppure risultasse alterata già nelle prime fasi

della malattia epatica, fino a diventare essa stessa cofattore nella patogenesi di alcune complicanze dell'insufficienza epatica.

Durante questi anni il nostro gruppo di ricerca ha collaborato con il Professore Andrew Burroughs presso il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra, dove per altro è stato svolto una parte del dottorato. Questa collaborazione ha permesso di fare degli importanti studi che hanno permesso di chiarire la rilevanza clinica dell'IS nei pazienti cirrotici. Nella sezione "Allegati" riportiamo gli articoli pubblicati durante il dottorato di ricerca.

### **Insufficienza Surrenalica nei pazienti con malattie epatiche acute**

Negli ultimi anni diversi studi hanno messo in evidenza che l'IS è frequente in pazienti con insufficienza epatica acuta o pazienti con epatopatia cronica in corso di eventi acuti, quali shock o sepsi, ed è associata ad una maggiore mortalità (Tabella 1).

Harry et al (3) hanno studiato la funzione surrenalica in 45 pazienti con insufficienza epatica acuta ricoverati in terapia intensiva, utilizzando il test di stimolo con 250 µg di corticotropina o Short Synacthen Test (SST). L'IS, riscontrata nel 62% dei pazienti studiati, correlava con la gravità dell'insufficienza epatica, ed è stata associata ad una maggiore instabilità emodinamica e ad una prognosi peggiore.

Marik et al (2) hanno studiato retrospettivamente la funzione surrenalica in 340 pazienti ricoverati presso la terapia intensiva del centro trapianti di fegato dell'Università di Pittsburgh, utilizzando il test di stimolo con 1 µg di ACTH o Low Dose Short Synacthen Test (LDSST). L'IS è stata riscontrata nel 33% dei pazienti con epatite acuta fulminante, nel 66% dei pazienti con epatopatia cronica, nel 61% dei pazienti con pregresso trapianto di fegato e nel 92% dei pazienti che avevano recentemente subito un trapianto di fegato e non avevano praticato terapia immunosoppressiva steroidea. Gli stessi autori coniarono il termine di "Sindrome epato-surrenalica" per descrivere l'IS in corso di epatopatie acute e croniche, ritenendo che la disfunzione surrenalica era causata dalla malattia epatica di base e non dall'evento acuto (sepsis e shock).

In un altro studio (4) condotto su 101 pazienti cirrotici con sepsi sottoposti allo SST, è stata riscontrata un'elevata prevalenza di IS (52%). L'IS è risultata associata ad instabilità emodinamica, insufficienza renale e aumentata mortalità.

In fine nello studio di Fernández et al. (5) che includeva 25 pazienti cirrotici con sepsi, è stata riportata una prevalenza di IS del 68%. Inoltre l'IS era più frequente nei pazienti con malattia epatica più grave (Child-Pugh C 76% vs. Child-Pugh B 25%; p: 0.08).



## **Funzione surrenalica nella cirrosi stabile**

I dati di letteratura sin qui riportati confermano che i pazienti cirrotici hanno un'elevata prevalenza di disfunzione surrenalica in corso di eventi acuti. Tuttavia, i dati riguardanti i cirrotici stabili senza eventi acuti sono scarsi e parzialmente conclusivi.

J.A. McDonald et al (6) hanno studiato 38 cirrotici in fase avanzata di malattia epatica ed in attesa di trapianto epatico urgente, utilizzando il test all'ipoglicemia insulino-indotta allo scopo di studiare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, e li hanno confrontati con un gruppo di controllo sano. Un sottogruppo di pazienti sono stati sottoposti anche al test di stimolo all'ACTH. In questa casistica è stata evidenziata una riduzione del picco massimo di cortisolo plasmatico nel 64% dei pazienti sottoposti al test all'ipoglicemia e nel 31% dei pazienti sottoposti al test all'ACTH. Tali autori concludono che nella cirrosi epatica in fase avanzata esiste uno stato di insufficienza funzionale del surrene dovuto ad un difetto centrale nella regolazione ipotalamo-ipofisaria.

Questi dati trovano conferma in uno studio successivo (7) effettuato su 52 cirrotici di sesso maschile, in cui è stato studiato l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. In questi pazienti è stato dosato l'ACTH e il cortisolo, in condizioni basali e dopo stimolo con CRH (Corticotropin-releasing hormone). I livelli di ACTH basali e dopo stimolo sono risultati sovrapponibili nei cirrotici e nei controlli, anche se nei cirrotici in classe

C di Child sono stati rilevati valori lievemente inferiori dopo stimolo. Anche i livelli di cortisolo basale sono risultati sovrapponibili nelle tre classi di Child, mentre i valori di cortisolo dopo stimolo risultavano più bassi nelle classi B e C di Child.

**Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis (Fede G et al. J Hepatol. 2011 – Allegato 1)**

Il nostro primo studio (8) è stato condotto in collaborazione con il professore Andrew Burroughs presso il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra. L'obiettivo è stato di valutare la riserva funzionale del surrene in pazienti con cirrosi epatica non complicata da sepsi o instabilità emodinamica, per stabilire se la funzione surrenalica negli epatopatici cronici fosse alterata già nelle prime fasi della malattia e se tale alterazione diventasse più grave con l'avanzare della malattia epatica, fino a diventare essa stessa cofattore nella patogenesi di alcune complicanze dell'insufficienza epatica.

***Pazienti e metodi***

Per questo studio sono stati arruolati prospetticamente 101 pazienti cirrotici consecutivi, presso il nostro dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale "Garibaldi" di Catania ed il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra. I pazienti con segni di infezioni o sepsi, peritonite batterica spontanea o segni di instabilità emodinamica,

(pressione arteriosa media  $\leq$  60 mmHg o necessità di utilizzo di vasopressori), sono stati esclusi dallo studio. Sono stati inoltre esclusi dallo studio i pazienti con precedente diagnosi di disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, e i pazienti che avevano assunto terapia corticosteroidea negli ultimi sei mesi. La riserva surrenalica è stata studiata entro 24 ore dal ricovero, utilizzando il LDSST. L'insufficienza surrenalica è stata definita da un cortisolo inferiore a 18  $\mu$ g/dl (494 nmol/L) dopo 20 o 30 minuti dall'infusione endovenosa di corticotropina (9).

### ***Risultati***

Le caratteristiche cliniche dei pazienti studiati sono riportati nella Tabella 2. L'IS è stata riscontrata in 38/101 (38%) pazienti, con prevalenza maggiore all'aumentare della gravità della malattia epatica (Chil-Pugh score:  $p < 0.0001$ , MELD score:  $p < 0.0001$ ), e al peggiorare degli indici di funzionalità epatica (presenza di ascite  $p < 0.01$ , INR  $p < 0.0001$ , bilirubina totale  $p < 0.05$ ) (Tabella 2).

La ROC curve ha evidenziato che un cortisolo basale  $< 354$  nmol/L discriminava pazienti con e senza insufficienza surrenalica con buona accuratezza diagnostica (sensibilità: 90%, specificità: 62%, c-value: 0.79). All'analisi multivariata con la regressione logistica, il cortisolo basale è risultato fattore di rischio indipendente per la presenza di insufficienza surrenalica ( $p < 0.001$ ), indipendentemente dal Child-Pugh

score, dal MELD score, dalla presenza di ascite, dall'albumina, dall'INR, dalla bilirubina totale.

### ***Conclusioni***

I nostri dati documentano che nella cirrosi epatica, anche in assenza di infezioni gravi o instabilità emodinamica, vi è un'alta prevalenza di insufficienza surrenalica diagnosticata con il LDSST, e che tale prevalenza aumenta con il progredire della gravità della malattia epatica. Questi dati sono in linea con studi precedentemente condotti in pazienti con epatopatie acute o croniche complicate da eventi acuti (3-7, 10). Tuttavia, contrariamente agli altri dati presenti in letteratura, in cui la funzione surrenalica è stata studiata in pazienti con insufficienza epatica acuta o in pazienti con epatopatia cronica complicata da eventi acuti, il nostro studio valuta un'ampia casistica di pazienti con cirrosi epatica stabile, e i nostri risultati suggeriscono quindi che la cirrosi epatica di per sé si associa ad una ridotta riserva funzionale surrenalica. Tale condizione, che da alcuni autori è stata designata con il termine di "Sindrome Epato-Surrenalica" (10), non si manifesta con segni o sintomi di ipo-surrenalismo, ma esiste come condizione sub-clinica sottostante alla malattia epatica di base. In occasione di eventi scatenanti, come infezioni gravi o gravi turbe emodinamiche (eventi assai comuni nei pazienti cirrotici), questa condizione sub-clinica potrebbe manifestarsi

come incapacità del surrene a secernere adeguate quantità di cortisolo rispetto alle aumentate esigenze dell'organismo.

Nell'analisi multivariata il cortisolo basale è risultato l'unico fattore di rischio indipendente per la presenza di insufficienza surrenalica. Inoltre utilizzando la curva ROC un cortisolo basale  $< 354$  nmol/L è risultato un valore soglia dotato di buona accuratezza diagnostica. Alla luce di questi risultati il dosaggio di cortisolo basale nei pazienti cirrotici si potrebbe utilizzare come metodo di screening per individuare i pazienti ad alto rischio per ridotta riserva funzionale surrenalica, e suscettibili di ulteriori indagini diagnostiche (come il test di stimolo all'ACTH).

Riteniamo che questo studio abbia mostrato chiaramente che l'insufficienza surrenalica rappresenti una nuova problematica correlata alla cirrosi epatica che necessita di ulteriori approfondimenti. Servono ulteriori studi per chiarire quale importanza rivesta la presenza di disfunzione surrenalica nell'out-come dei pazienti cirrotici, e se sia plausibile praticare terapia suppletiva con corticosteroidi nei pazienti cirrotici con insufficienza surrenalica che abbiano un evento acuto intercorrente.

**Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review  
(Fede G et al. Hepatology 2012 – Allegato 2)**

Nel corso dei nostri studi sulla funzione surrenalica nella cirrosi epatica abbiamo pubblicato una review sistematica sulla disfunzione surrenalica nei pazienti con malattie epatiche (11). La ricerca bibliografica, effettuata utilizzando MEDLINE, Cochrane Controlled trial Register (CENTRAL), EMBASE and Science Citation Index, ha incluso tutti gli studi pubblicati fino ad Aprile 2011. Su un totale di 12.696 studi inizialmente individuati, ne sono stati selezionati 23 (16 full text, 5 abstracts, 2 case reports). Quattro studi (3-5, 10), con in totale 511 pazienti, pubblicati dal 2002 al 2006, sono stati condotti su pazienti con insufficienza epatica acuta o epatopatie croniche in corso di eventi acuti (sepsi e shock) (Tabella 1). La prevalenza di IS in questi studi è stata del 33% - 92%. Tale variabilità è dovuta a differenti criteri nella definizione di IS, evidenziando una carenza di standardizzazione in questo campo.

In undici studi pubblicati (6-8, 12-19), con un totale di 1013 pazienti, la funzione surrenalica è stata studiata in pazienti con cirrosi stabile o decompensata (ascite o sanguinamento da varici esofagee), con una prevalenza di IS del 9% - 64%. Anche in questo caso la variabilità nella prevalenza di IS rimarca la differenza nei criteri usati per la sua definizione diagnostica e le diverse metodiche diagnostiche utilizzate (cortisolo totale, cortisolo libero, cortisolo salivare) (Tabella 3).

Quattro studi (5, 10, 20, 21), con 216 pazienti in totale, riportano dati sul trattamento con corticosteroidi nei pazienti epatopatici (Tabella 4). I primi tre studi mostrano dati incoraggianti, evidenziando benefici in termini di stabilità emodinamica e sopravvivenza associati all'uso di corticosteroidi. Tuttavia l'unico studio randomizzato controllato, condotto da Arabi et al (20), non ha confermato i benefici sulla prognosi della terapia corticosteroidea, anzi quest'ultima è stata associata ad una maggiore incidenza di sanguinamenti gastrici e recidiva di shock dopo la sospensione del trattamento.

I dati pubblicati in letteratura sono contrastanti e suggeriscono la necessità di ulteriori studi randomizzati per approfondire il problema della rilevanza clinica della IS nei pazienti con malattia epatica, e l'eventuale beneficio di terapia corticosteroidea.

**Critical illness-related corticosteroid insufficiency in patients with cirrhosis and variceal bleeding (Triantos CK, Marzigie M, Fede G et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 – Allegato 3)**

Durante il nostro periodo di collaborazione con il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra, abbiamo partecipato ad uno studio condotto su pazienti con cirrosi epatica e sanguinamento da varici esofagee (19). Sono stati valutati 20 pazienti con cirrosi ricoverati per un episodio di sanguinamento da varici esofagee, e 74 controlli (14 controlli

sani, e 60 pazienti cirrotici stabili). La funzione surrenalica è stata studiata utilizzando sia il LDSST che lo SST.

Utilizzando lo SST la prevalenza di IS è risultata simile nei pazienti con e senza emorragia, ma quando è stato praticato il più sensibile LDSST l'IS è risultata nettamente prevalente nei pazienti che avevano avuto l'episodio di sanguinamento da varici esofagee (60% vs. 48%; p: 0.01). Inoltre i pazienti con sanguinamento avevano elevati valori di cortisolo basale e cortisolo dopo stimolo, mentre il delta (differenza tra cortisolo basale e cortisolo dopo stimolo) era sovrapponibile ai pazienti con cirrosi stabile, dimostrando inadeguata risposta surrenalica all'evento stressogeno ("Critical Illness-related Corticosteroid Insufficiency"). Questo studio non ha evidenziato differenze prognostiche correlabili alla presenza di IS.

**Comparison of Total Cortisol, Free Cortisol, and Surrogate Markers of Free Cortisol in Diagnosis of Adrenal Insufficiency in Patients with Stable Cirrhosis (Fede et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013 – Allegato 4)**

Nel corso degli ultimi anni l'IS surrenalica è stata descritta in corso di malattie epatiche con prevalenza differente (11): nei pazienti con malattie acute (33%-92%) (3-5, 10, 20), nella cirrosi stabile (31%-60%) (6-8, 14, 17, 22) o complicata da ascite (26%-64%) (16) o da



sanguinamento da varici esofagee (30%-48%) (15, 19). Un problema rilevante nello studio della funzione surrenalica nei pazienti cirrotici è il rapporto fra cortisolo totale e cortisolo libero. Infatti, il 70% di cortisolo circolante è normalmente legato alla cortisol binding globulin (CBG), il 20% è legato all'albumina, mentre il restante 10% è in forma libera. Solo il cortisolo libero è la parte biologicamente attiva responsabile di tutti gli effetti cellulari (23). Nei pazienti cirrotici, che notoriamente sono affetti da ipoproteinemia, è stato evidenziato che il dosaggio del cortisolo totale sovrastima la prevalenza di IS rispetto al dosaggio del cortisolo libero (17, 18, 22), e del cortisolo salivare (14), che è un marker surrogato del cortisolo libero. Questo ha portato alcuni autori a mettere in dubbio la rilevanza clinica dell'IS nei pazienti con cirrosi epatica (24).

Questo importante problema diagnostico è stato l'oggetto di un nostro studio recentemente pubblicato (25), che è stato condotto in collaborazione con il professore Andrew Burroughs presso il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra, ed ha rappresentato una parte rilevante del progetto di ricerca svolto durante questi quattro anni di dottorato. L'obiettivo dello studio è stato valutare la funzione surrenalica nella cirrosi epatica utilizzando il dosaggio del cortisolo totale e del cortisolo libero dopo test di stimolo a basse dosi di ACTH (LDSST). L'obiettivo secondario era quello di valutare l'utilità clinica dei surrogati del cortisolo libero, cioè il cortisolo libero calcolato e il free cortisol

index (FCI) (cioè il rapporto fra il cortisolo totale e la concentrazione di CBG).

### ***Pazienti e metodi***

Lo studio ha coinvolto 79 pazienti con cirrosi epatica arruolati consecutivamente presso il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra. I criteri di esclusione dello studio erano: sepsi o instabilità emodinamica (pressione arteriosa media <60 mmHg o necessità di vasopressori), precedente storia di malattia dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, recente (entro i 3 mesi precedenti) terapia con corticosteroidi o altri farmaci che interferiscono con l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, età minore di 18 anni, gravidanza. La funzione surrenalica è stata studiata con il test di stimolo a basse dosi (1 µg) di ACTH (LDSST). L'IS è stata definita da un cortisolo totale dopo stimolo < 494 nmol/L a 20 o 30 minuti dopo l'infusione endovenosa di ACTH (23, 26). Inoltre una sottoanalisi è stata condotta utilizzando altri due criteri di IS: cortisolo basale < 138 nmol/L e un delta < 250 nmol/L (27). L'inadeguata risposta del cortisolo libero al LDSST è stata definita da un cortisolo libero dopo stimolo < 33 nmol/L (23, 28). Inoltre una sottoanalisi è stata condotta utilizzando il cutt-off di 25 nmol/L per cortisolo libero dopo stimolo (29). I markers surrogati di cortisolo libero che abbiamo utilizzato sono stati il FCI (cutt-off di 12) (23, 30), e il cortisolo libero calcolato con la formula di Coolens (23).

## ***Risultati***

La prevalenza di IS è stata del 34% utilizzando il cortisolo totale, e del 29% utilizzando il cortisolo libero. C'è stata concordanza tra i due metodi diagnostici nel 22% dei pazienti, nel 13% la disfunzione surrenalica è stata diagnosticata solo sulla base del cortisolo totale, e nel 6% solo sulla base del cortisolo libero ( $\kappa$ -coefficiente 0,56,  $p < 0.01$ ). Basse concentrazioni di CBG (21 vs 54 ug / ml,  $p < 0.01$ ) hanno portato ad una sovrastima della disfunzione surrenalica basata sulla misurazione del cortisolo totale. Il cortisolo libero calcolato con la formula di Coolens ha sovrastimato il cortisolo libero misurato, con variazioni fino all'87%. L'IS, definita dal FCI  $< 12$ , è stata rilevata nel 30% dei pazienti, tra i quali il 23% aveva anche bassi livelli di cortisolo libero ( $\kappa$ -coefficiente, 0.70,  $p < 0.001$ ). Non è stata trovata una associazione statisticamente significativa tra la funzionalità surrenalica e la prognosi valutata come out composito (mortalità o trapianto di fegato).

## ***Conclusioni***

Questo studio ha confermato l'alta prevalenza di IS nella cirrosi epatica, anche prendendo in considerazione il dosaggio del cortisolo libero, rimarcando ancora una volta la rilevanza clinica di questa condizione patologica. I nostri risultati hanno confermato una discordanza tra il cortisolo totale e il cortisolo libero nei pazienti cirrotici, e hanno evidenziato che gran parte di questa discordanza è spiegata da basse

concentrazioni di CBG, mentre altri fattori come i valori di albumina e gli indici di funzionalità epatica (Child-Pugh score) sembrano essere meno rilevanti.

Un altro importante risultato del nostro studio riguarda il FCI, il quale si è dimostrato un valido surrogato del cortisolo libero nella diagnosi di IS, aprendo la strada ad interessanti applicazioni cliniche qualora questi risultati venissero confermati da altri studi. Invece il cortisolo libero calcolato con la formula di Coolens si è dimostrato un marker inaffidabile, in quanto sovrastima eccessivamente il cortisolo libero misurato, confermando precedenti dati di letteratura (17).

Nel nostro studio non abbiamo dimostrato un'associazione tra funzionalità surrenalica e prognosi. Tuttavia questo studio non era stato disegnato come studio prognostico, e questi risultati devono essere interpretati con cautela. Sono necessari ulteriori studi per valutare l'associazione tra la funzione surrenalica e la prognosi nei pazienti con cirrosi. Questi studi, con un lungo follow-up, devono valutare l'incidenza di disfunzione surrenalica nella cirrosi e la sua correlazione non solo con la sopravvivenza, ma anche con altre complicanze, come insorgenza di ascite, encefalopatia, emorragie, infezioni/sepsi e shock. Infatti, nella cirrosi stabile l'IS potrebbe essere una condizione subclinica, che in presenza di eventi scatenanti quali infezioni o altre malattie acute, può portare ad una prognosi peggiore (8).

## **Approccio multistep per lo studio della funzione surrenalica nella cirrosi (Inviato per la pubblicazione)**

Il meccanismo che porta alla disfunzione surrenalica nella cirrosi epatica non è nota. Non è noto inoltre se nei pazienti cirrotici ci sia una alterazione strutturale dei surreni (IS primitiva) oppure una alterazione secondaria dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (IS secondaria). Nel nostro ultimo studio abbiamo affrontato questo problema utilizzando un approccio multistep per la diagnosi dell'IS nella cirrosi, in cui il primo test è stato il tradizionale LDSST. Il secondo test, somministrato ai pazienti che erano risultati positivi al primo test, è stato il Long Synacthen Test (LST) con 1 mg di Synacthen depot.

### ***Pazienti e metodi***

Per questo studio prospettico osservazionale sono stati arruolati pazienti cirrotici consecutivamente ammessi presso il nostro dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale "Garibaldi" di Catania ed il Royal Free Sheila Sherlock Liver Centre di Londra. I criteri di esclusione dallo studio sono stati: infezioni o sepsi, peritonite batterica spontanea o segni di instabilità emodinamica, (pressione arteriosa media  $\leq 60$  mmHg o necessità di utilizzo di vasopressori), precedente diagnosi di disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, precedente terapia corticosteroidea negli ultimi sei mesi. La riserva surrenalica è stata studiata entro 24 ore dal ricovero, utilizzando il LDSST, ed il dosaggio basale di ACTH e

CBG. I pazienti con diagnosi di disfunzione surrenalica ai test di base sono stati sottoposti al LST.

***Low Dose Short Synacthen Test:*** è stato praticato tra le 8 e le 9 del mattino a digiuno. I prelievi per il dosaggio del cortisolo sono stati effettuati in basale e dopo 20 minuti e 30 minuti dall'infusione ev di 1 µg di Synacthen. L'insufficienza surrenalica è stata definita da un cortisolo dopo stimolo inferiore a 494 nmol/L (23, 26). Inoltre in un sottogruppo di pazienti è stato dosato il cortisolo libero. Valori di cortisolo libero dopo stimolo inferiori a < 33 nmol/L sono stati definiti anormali (23, 28).

***Long Synacthen Test:*** Il test è stato somministrato almeno a distanza di 24 ore dal LDSST. I prelievi per il dosaggio del cortisolo sono stati effettuati in condizioni basali (tra le 8 e le 9 del mattino a digiuno) e a 30 minuti, 1 ora, 4 ore, 8 ore e 24 ore dalla somministrazione intramuscolare di 1 mg di Synacthen depot.

Nei soggetti normali il cortisolo raggiunge un valore superiore a 900 nmol/L nelle prime 4 ore dopo la somministrazione di ACTH depot, con successivi modesti incrementi. Nei pazienti con insufficienza surrenalica secondaria, in cui vi è un deficit di ACTH endogeno, si registra una risposta surrenalica ritardata, con picco del cortisolo ritardato alle successive 24 dopo il test. Nei soggetti con insufficienza surrenalica primaria, in cui vi è una alterazione strutturale del surrene, non si ha una

risposta adeguata in termini di cortisolemia, con valori costantemente inferiori a 900 nmol/L (31, 32).

### ***Risultati***

Un totale di 121 pazienti sono stati sottoposti al LDSST: la prevalenza di IS è stata del 38% (46/121 pazienti).

**Long Synacthen Test:** Il LST è stato praticato in 29 pazienti consecutive in cui il LDSST era risultato anormale. Fra questi pazienti, 12/29 (41%) hanno evidenziato una normale risposta (Cortisolo > 900 nmol/L entro 4 ore) (Gruppo 1), 16/29 (55%) hanno evidenziato una risposta surrenalica ritardata (Cortisolo < 900 nmol/L a 4 ore ma superiore a > 900 nmol/L entro 24 ore) (Gruppo 2) e solo 1 (4%) paziente ha evidenziato una risposta anormale (Cortisolo < 900 nmol/L entro 24 ore). Solo il cortisolo basale è stato significamente differente fra i 2 gruppi di pazienti. I valori basali di ACTH non sono risultati significativamente differenti fra i gruppi, e nessuno dei pazienti ha evidenziato un valore di ACTH > 100 pmol/L, che è indicativo di IS primaria (33). La ROC curve ha evidenziato che un cortisolo basale < 254 nmol/L è in grado di discriminare i pazienti con risposta surrenalica ritardata al LST (AUC 0.78, p. 0.001) con buona accuratezza diagnostica (Sensibilità 67%, Specificità 81%).

**Dosaggio del cortisolo libero:** Il cortisolo libero è stato dosato in 12 pazienti: 7 (58%) pazienti hanno evidenziato una risposta anormale al

LDSST (cortisolo libero dopo stimolo  $< 33$  nmol/L); questi ultimi hanno evidenziato anche una ridotta risposta al LST dopo 24 ore (1326 vs 1750 nmol/L,  $p = 0.04$ ). Inoltre il cortisolo libero dopo stimolo è risultato direttamente correlato alla risposta surrenalica dopo 24 ore dal LST ( $R: 0.70, p = 0.01$ ).

### ***Conclusioni***

Una percentuale rilevante (55%) dei pazienti studiati ha evidenziato una risposta surrenalica ritardata dopo LST, escludendo una IS primaria (31, 32). Inoltre una IS primaria è caratterizzata da elevati valori di ACTH basali (valori  $> 100$  pg/ml) (33). Nessuno dei pazienti studiati ha evidenziato valori di ACTH  $> 100$  pg/ml. Questi dati suggeriscono che nei pazienti cirrotici c'è un'alterazione secondaria dell'asse ipofisi-ipotalamo-surrene che potrebbe essere la causa prevalente dell'insufficienza surrenalica in questi pazienti. Ulteriori studi sono necessari per approfondire la eziopatogenesi della insufficienza surrenalica nella cirrosi.



**Table 1. Studi che riportano dati sull'Insufficienza surrenalica in pazienti con insufficienza epatica acuta o pazienti con epatopatia cronica in corso di eventi acuti**

Authors	N. of patients and type of liver disease	Type of test performed and definition of AI	AI%
<b>Harry 2002</b>	Acute Liver Failure: 45	SST: baseline cortisol <250 nmol/L, delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/L, or peak cortisol <sup>≠</sup> <500 nmol/L	62%
<b>Marik 2005</b>	Fulminant hepatitis: 24 Chronic liver disease: 146 Recent LT: 119 History LT: 51	LDSST: random cortisol level < 552 nmol/l in stressed patients (patients with hypoxemic respiratory failure, with systolic blood pressure < 90 mm Hg, or requiring vasopressor agents), or random cortisol level < 414 nmol/l or peak cortisol <sup>≠</sup> < 552 nmol/l in non-stressed patients	33% 66% 92% 61%
<b>Tsai 2006</b>	Cirrhosis+Sepsis: 101	SST: baseline cortisol < 414 nmol/l, or delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l if baseline value between 414 and 918 nmol/l	51%
<b>Fernandez 2006</b>	Cirrhosis + Sepsis: 25	SST: baseline cortisol < 414 nmol/l, or delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l if baseline value between 414 and 918 nmol/l	63%

# Delta cortisol: difference between peak and basal total cortisol; <sup>≠</sup> peak cortisol: cortisol concentration 60 minutes after corticotropin stimulation;

AI: adrenal insufficiency, SST: short synacthen test; LDSST: low-dose short synacthen test, MELD: model end-stage liver disease, HDL: high density lipoprotein, OSF: organ system failure; SOFA, sequential organ failure assessment; APACHE: acute physiology age chronic health evaluation; MAP: mean arterial pressure.

**Table 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti studiati e dei due gruppi con e senza Insufficienza surrenalica**

	Tutti i pazienti (n=101)	Insuf. Surrenale (n=40)	Funz. Surrenale Normale (n=61)	Valore della P
Età	59 ± 1.9	57 ± 2.1	60 ± 1.6	NS
Sesso (M/F)	60/41	23/15	37/26	NS
<b>Eziologia</b>				
Virale (%)	47 (47)	20 (50)	27 (44)	NS
Alcolica (%)	25 (25)	12 (30)	13 (21)	NS
Altra eziologia (%)	29 (29)	6 (15)	23 (38)	NS
Child-Pugh Score	8 ± 0.2	10 ± 0.3	8 ± 0.3	< 0.0001
MELD Score	15 ± 0.5	18 ± 0.8	13 ± 0.6	< 0.0001
P, A. Media (mmHg)	85 ± 1.6	84 ± 2.2	85 ± 2	NS
Encefalopatia (%)	20 (20)	11 (28)	5 (13)	NS
Ascite (%)	49 (49)	26 (65)	23 (34)	<0.01
Albumina (g/L)	31 ± 0.6	28 ± 0.8	33 ± 0.7	< 0.0001
INR	1.4 ± 0.04	1.7 ± 0.07	1.3 ± 0.3	< 0.0001
Bil Tot. (µmol/L)	57 ± 59.2	71 ± 8.3	49 ± 6.5	< 0.05
Creatinina (µmol/L)	85 ± 3.5	78 ± 3.9	98 ± 6.9	NS
Sodio (mEq/L)	136 ± 0.5	136 ± 0.7	136 ± 0.9	NS
Potassio	4.1 ± 0.06	4.2 ± 0.08	4.1 ± 0.08	NS
Cortisolo Bas(nmol/L)	362±21.2	217±12.8	454±27.9	<0.001

I dati sono presentati come Media ± E.S.

**Table 3. Studi che riportano dati sull'Insufficienza surrenalica in pazienti con cirrosi epatica stabile o decompensata**

Authors	N. of patients with cirrhosis and aetiology	Type of test performed and definition of AI	AI%
<b>McDonald 1993</b>	38 non-alcoholic liver disease 40 healthy controls	IIT: reduction in maximal increments of plasma cortisol SST: reduction in maximal increments of plasma cortisol	64% 31%
<b>Ziets 2003</b>	52 (ALD: 36, VIR: 16)	CRH a) rise of plasma ACTH <twice the baseline b) peak cortisol value <550 nmol/l or an increase < 250 nmol/l	42% 58%
<b>Galbois 2010</b>	88 (ALD: 63, VIR: 63, ALD+VIR: 8, other: 4)	SST a) basal serum total cortisol <250 nmol/l or/and peak total cortisol <sup>‡</sup> <494 nmol/l or/and delta cortisol <sup>#</sup> < 250 nmol/l b) basal salivary cortisol <1.8 ng/ml or/and post-stimulation values <12.7 ng/ml or/and increase values <3 ng/ml	33% 9%
<b>Tan 2010</b>	43 (ALD: 10, VIR: 11, ALD + HCV: 8, PBC: 3, PSC: 4, NASH: 4, Other: 3), 10 healthy volunteers	SST a) peak total cortisol <sup>‡</sup> <500 nmol/l b) delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l c) peak plasma free cortisol <33 nmol/l	39% 47% 12%
<b>Fede 2011</b>	101 (ALD: 29, VIR: 47, other: 29)	LDSST a) peak serum cortisol <sup>‡</sup> <494 nmol/l b) peak serum cortisol <sup>‡</sup> <442 nmol/l c) delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l	38% 29% 60%
<b>Thevenot 2011</b>	125 "consecutive", 95 non-septic, 30 septic patients	SST peak cortisol <sup>‡</sup> <510 nmol/l	7.2%
<b>Acevedo 2010*</b>	10 with compensated cirrhosis compared to 188 with cirrhosis associated with SBP, non SBP infections, non infected ascites, hepatic encephalopathy, gastrointestinal bleeding, hepatorenal syndrome, and shock	Criterion 1: basal cortisol <414 nmol/l and/or delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l; Criterion 2: delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l	64% 27%
<b>Acevedo 2011*</b>	166 with advanced cirrhosis	RAI: delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l after SST	26%
<b>Risso 2011*</b>	85 with ascites (without sepsis or shock)	AI: delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l and/or peak cortisol <sup>‡</sup> <494 nmol/l after SST	39%
<b>Graupera 2010*</b>	37 with severe acute bleeding	RAI: basal cortisol < 414 nmol/l or delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l after SST	38%
<b>Triantos 2011</b>	20 with variceal bleeding, compared to 60 with stable cirrhosis and 14 healthy volunteers	a) SST: - peak serum cortisol <sup>‡</sup> <494 nmol/l in stable cirrhosis - delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l or a total basal cortisol <276 nmol/l in variceal bleeding b) LDSST: peak serum cortisol <sup>‡</sup> <494 nmol/l in stable cirrhosis or delta cortisol <sup>#</sup> <250 nmol/l or a peak cortisol <sup>‡</sup> <690 nmol/l in variceal bleeding	30% 30% 48%

# Delta cortisol: difference between peak and basal total cortisol; ‡ peak cortisol: cortisol concentration 60 minutes after corticotropin stimulation; \* Meeting abstract;

HCV: Hepatitis C Virus; HBV: Hepatitis B Virus; PBC: Primary Biliary Cirrhosis; PSC: Primary Sclerosing Cholangitis; NASH: Nonalcoholic Steatohepatitis; AI: Adrenal Insufficiency; IIT: insulin-induced hypoglycaemia test; ACTH: Adreno Cortico Tropic Hormone; SST: short synacthen test; LDSST: low-dose short synacthen test; HDL: High Density Lipoprotein; MELD: Model End-Stage Liver Disease; INR: International Normalized Ratio; SBP: Spontaneous Bacterial Peritonitis; RAI: Relative Adrenal Insufficiency.

**Table 4. Studi che riportano dati sulla terapia corticosteroidica nei pazienti con epatopatie acute e croniche**

<b>Authors</b>	<b>N. of treated patients and type of liver disease</b>	<b>Steroid dose</b>	<b>Outcomes associated with steroids treatment</b>
<b>Harry 2003</b>	20 vasopressor-dependent patients with acute liver failure or acute on chronic liver failure	Hydrocortisone: 300 mg/day	Reduction in vasopressor doses but no survival benefit. Higher incidence of infection
<b>Marik 2005</b>	140 vasopressor-dependent patients with acute or chronic liver disease	Hydrocortisone: 100 mg/ 8 hours	Reduction in the dose of norepinephrine at 24 hours in adrenal insufficiency group (p= 0.02) but not in non adrenal insufficiency group (p= 0.62). In adrenal insufficiency group treatment with hydrocortisone was associated with a lower mortality rate (26% vs. 46%, p=0.002)
<b>Fernandez 2006</b>	17 consecutive cirrhotics with septic shock and RAI	Hydrocortisone: 50 mg/6 hours	Resolution of septic shock (96% vs. 58%, p=0.001), survival in the intensive care unit (68% vs. 38%, p=0.03), and hospital survival (64% vs. 32%, p=0.003)
<b>Arabi 2010*</b>	39 patients with cirrhosis and septic shock	Hydrocortisone: 50 mg/ 6 hours	Reduction in vasopressors doses and higher rate of shock reversal (RR 1.5, 95%CI 0.98-2.55; p=0.05). No benefit in 28-day mortality. Increase in shock relapse (RR 2.58, 95%CI 1.04-6.45; p=0.03) and gastrointestinal bleeding (RR 3, 95%CI 1.08-8.36; p=0.02).

\* Randomized Controlled Trial

## **Bibliografia**

(1) Aron DC et al. Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Gardner D.G. SD, editor. Greenspan's: Basic & Clinical Endocrinology, 8 th ed. New York: 2007. p. 356-363.

(2) Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. Crit Care Med 2008 Jun;36(6):1937-1949.

(3) Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. Hepatology 2002 Aug;36(2):395-402.

(4) Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Liu NJ, Ho YP, Fang JT, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. Hepatology 2006 Apr;43(4):673-681.

(5) Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, Felipe V, Navasa M, Mas A, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: Effect of treatment with hydrocortisone on survival. Hepatology 2006 Nov;44(5):1288-1295.

(6) McDonald JA, Handelsman DJ, Dilworth P, Conway AJ, McCaughan GW. Hypothalamic-pituitary adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease. J Gastroenterol Hepatol 1993 May;8(3):247-253.

(7) Zietz B, Lock G, Plach B, Drobnik W, Grossmann J, Scholmerich J, et al. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-glandular axes and relation to Child-Pugh classification in male patients with alcoholic and virus-related cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003 May;15(5):495-501.

(8) Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Piro S, Rabuazzo AM, et al. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2011 Feb;54(2):243-250.

(9) Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004 Apr 15;350(16):1629-1638.

(10) Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005 Jun;33(6):1254-1259.

(11) Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Germani G, Tsochatzis E, et al. Adrenocortical dysfunction in liver disease: a systematic review. *Hepatology* 2012 Apr;55(4):1282-1291.

(12) Acevedo J, Fernandez J, et al. Impact of relative adrenal insufficiency on circulatory function and mortality in advanced cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2011;54:S61-S208.

(13) Acevedo J, et al. Prognostic value of relative adrenal insufficiency in decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2010;52:S59-S182.

(14) Galbois A, Rudler M, Massard J, Fulla Y, Bennani A, Bonnefont-Rousselot D, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010 Jun;52(6):839-845.

(15) Graupera I, Hernandez-Gea V, Rodriguez J, Colomo A, Poca M, Llao J, et al. Incidence and prognostic significance of relative adrenal insufficiency in cirrhotic patients with severe variceal bleeding. *Hepatology* 2010;52:267A.

(16) Risso A, Alessandria C, Elia C et al. Adrenal dysfunction in nonseptic cirrhotic patients with ascites: Impact on survival. *Digest Liver Dis* 2011;43(Suppl 2):S74-S75.

(17) Tan T, Chang L, Woodward A, McWhinney B, Galligan J, Macdonald GA, et al. Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *J Hepatol* 2010 Nov;53(5):841-848.

(18) Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver Int* 2011 Mar;31(3):425-433.

(19) Triantos C, Marzigie M, Fede G. et al. Critical illness related corticosteroid insufficiency (CIRCI) in patients with cirrhosis and variceal bleeding. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2011;9:595-601.

(20) Arabi YM, Aljumah A, Dabbagh O, Tamim HM, Rishu AH, Al-Abdulkareem A, et al. Low-dose hydrocortisone in patients with cirrhosis and septic shock: a randomized controlled trial. *CMAJ* 2010 Dec 14;182(18):1971-1977.

(21) Harry R, Auzinger G, Wendon J. The effects of supraphysiological doses of corticosteroids in hypotensive liver failure. *Liver Int* 2003 Apr;23(2):71-77.

(22) Thevenot T, Dorin R, Monnet E, Qualls CR, Sapin R, Grandclement E, et al. High Serum Levels of Free Cortisol Indicate Severity of Cirrhosis in Hemodynamically Stable Patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012 May 31;27(10):1596-1601.

(23) Coolens JL, Van BH, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987 Feb;26(2):197-202.

(24) Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Penfornis A, Di M, V, et al. Assessing adrenal function in cirrhotic patients: is there a reliable test? *Gastroenterol Clin Biol* 2009 Jun;33(6-7):584-588.

(25) Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Scicali R, Vasianopoulou P, et al. Comparison of Total Cortisol, Free Cortisol, and Surrogate Markers of Free Cortisol in Diagnosis of Adrenal Insufficiency in Patients with Stable Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013 Aug 23.

(26) Wiest R, Moleda L, Zietz B, Hellerbrand C, Scholmerich J, Straub R. Uncoupling of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 Dec;23(12):1901-1908.

(27) Kazlauskaite R, Evans AT, Villabona CV, Abdu TA, Ambrosi B, Atkinson AB, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary- adrenal insufficiency: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Nov;93(11):4245-4253.

(28) Vogeser M, Briegel J, Zachoval R. Dialyzable free cortisol after stimulation with Synacthen. *Clin Biochem* 2002 Oct;35(7):539-543.

(29) Limor R, Tordjman K, Marcus Y, Greenman Y, Osher E, Sofer Y, et al. Serum free cortisol as an ancillary tool in the interpretation of the low-dose 1-mug ACTH test. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011 Sep;75(3):294-300.

(30) Vincent RP, Etogo-Asse FE, Dew T, Bernal W, et al. Serum total cortisol and free cortisol index give different information regarding the hypothalamus-pituitary-adrenal axis reserve in patients with liver impairment. *Ann Clin Biochem* 2009 Nov;46(Pt 6):505-507.

(31) Galvao-Teles A, Burke CW, Fraser TR. Adrenal function tested with tetracosactrin depot. *Lancet* 1971 Mar 20;1(7699):557-560.

(32) Jenkins RC, Ross RJM. Protocols for common endocrine tests. In: Grossman A, editor. *Clinical Endocrinology*, 2nd ed. Oxford: 1998. p. 1117-1134.



(33) Oelkers W. Adrenal insufficiency. N Engl J Med  
1996;335:1206-1212.