



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina - DIMED

Direttore: Ch.mo Prof. Paolo Simioni

U.O.C. Endocrinologia

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

TESI DI LAUREA

**Caratterizzazione clinica e genetica dell'iperplasia
surrenalica bilaterale**

Relatore: Dott. Filippo Ceccato

Correlatrice: Dott.ssa Irene Tizianel

Laureanda: Irene Verzobio

Anno accademico 2023/2024

Sommario

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Sindrome di Cushing	5
1.1.1 Eziologia ed epidemiologia	5
1.1.2 Presentazione clinica	6
1.1.3 Diagnosi	7
1.1.4 Trattamento	9
1.2 Incidentalomi surrenalici	11
1.2.1 Definizione, epidemiologia ed eziologia	11
1.2.2 Valutazione di malignità	12
1.2.3 Ricerca di eccesso ormonale	13
1.2.4 Trattamento	14
1.2.5 Incidentalomi bilaterali	15
1.3 PBMAH	17
1.3.1 Definizione	17
1.3.2 Epidemiologia	17
1.3.3 Eziologia e genetica	18
1.3.4 Diagnosi	23
1.3.5 Trattamento	25
2. SCOPO DELLO STUDIO	29
3. MATERIALI E METODI	30
3.1 Modello dello studio	30
3.2 Popolazione	30
3.3 Raccolta dati	31
3.3.1 Dati clinici e anamnestici	32
3.3.1 Dati di imaging	33
3.3.2 Dati biochimici e analisi genetica	33
3.4 Analisi statistica	34
4. RISULTATI	35
4.1 Caratteristiche della popolazione	35
4.1.1 Caratteristiche alla prima visita	35
4.1.2 Caratterizzazione genetica	36
4.1.3 Caratteristiche all'ultima visita	38
4.2 Analisi dei fenotipi secretori	40

4.2.1 Comparazione tra fenotipi secretori.....	40
4.2.2 Confronto tra prima e ultima visita per fenotipi di secrezione	42
4.3 Valutazione della PBMAH	48
4.3.1 Confronto tra adenomi bilaterali e PBMAH	48
4.3.2 Confronto tra fenotipi di secrezione di cortisolo nella PBMAH	50
4.3.3 Confronto tra ARMC5 mutati e wild type.....	52
4.4 Famiglie con mutazione di ARMC5	54
4.4.1 Famiglia A.....	54
4.4.2 Famiglia B.....	55
4.4.3 Famiglia C.....	56
4.4.4 Famiglia D.....	57
4.4.5 Famiglia E.....	58
5. DISCUSSIONE.....	59
5.1 Caratteristiche della popolazione	59
5.1.1 Caratteristiche alla prima visita	59
5.1.2 Caratterizzazione genetica.....	61
5.1.3 Caratteristiche all'ultima visita	62
5.2 Analisi dei fenotipi secretori.....	63
5.2.1 Comparazione tra fenotipi secretori.....	63
5.2.2 Confronto tra prima e ultima visita per fenotipi di secrezione	65
5.3 Valutazione della PBMAH	67
5.3.1 Confronto tra adenomi bilaterali e PBMAH	67
5.3.2 Confronto tra fenotipi di secrezione di cortisolo nella PBMAH	69
5.3.3 Confronto tra ARMC5 mutati e wild type.....	69
5.4 Famiglie con mutazione di ARMC5	71
6. CONCLUSIONE	73
BIBLIOGRAFIA.....	75

RIASSUNTO

Background: gli incidentalomi surrenalici bilaterali sono un riscontro sempre più frequente nel corso di imaging effettuato per cause non surrenaliche. Tra questi, l'iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare primitiva (PBMAH), caratterizzata da un ingrandimento globale dei surreni con macronoduli bilaterali, riveste un ruolo sempre più importante e può determinare ipercortisolismo e sindrome di Cushing florida (CS). Nonostante sia una patologia rara, la sua prevalenza sta aumentando con il miglioramento delle tecniche di imaging. Inoltre, la scoperta di mutazioni genetiche alla base della sua patogenesi, tra cui la mutazione di ARMC5, ne supportano un'origine genetica e sembrano correlate a un fenotipo di ipercortisolismo più severo.

Sia negli adenomi surrenalici scoperti incidentalmente, sia nella PBMAH rinvenuta all'imaging o nello screening dei familiari di un paziente affetto, il work-up ormonale evidenzia spesso una secrezione subclinica di cortisolo (MACS), priva dei segni tipici della sindrome di Cushing (CS), ma con comorbidità ipercorticismo-relate. L'identificazione precoce della MACS può consentire di intraprendere un trattamento adeguato a ridurre il rischio cardiovascolare e le complicanze legate all'eccesso di cortisolo.

Scopo dello studio: valutare le differenze in merito a presentazione clinica, secrezione ormonale, e origine genetica dei pazienti con adenomi surrenalici bilaterali e PBMAH, e osservare l'evoluzione clinica e biochimica nel tempo dei pazienti con adenomi non secernenti, MACS e CS.

Materiali e metodi: sono stati esaminati 59 pazienti valutati negli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova tra il 2010 e il 2024, con diagnosi di adenomi surrenalici bilaterali o PBMAH. Dalla loro prima e ultima visita al follow-up endocrinologico, sono stati raccolti i dati riguardanti la loro presentazione clinica e biochimica, il diametro dei noduli surrenalici e la presenza o meno di mutazione del gene ARMC5.

Risultati: I pazienti con adenomi bilaterali sono stati divisi a seconda del fenotipo di secrezione alla prima visita in adenomi non secernenti, MACS e CS. I pazienti

con CS erano più giovani e con un ipercortisolismo biochimico più severo. Nessuno dei tre gruppi ha mostrato cambiamenti rilevanti tra l'inizio e la fine del follow-up. La PBMAH aveva una prevalenza del 27% tra gli adenomi surrenalici bilaterali e il 40% dei pazienti con PBMAH aveva mutazioni patogenetiche di ARMC5. Nessuno dei pazienti senza PBMAH aveva questa mutazione. I soggetti con PBMAH hanno mostrato un fenotipo più severo, con maggior frequenza di CS rispetto agli adenomi bilaterali. Al contrario, non c'erano differenze tra i due gruppi in merito alle comorbidità associate all'ipercortisolismo. Inoltre, tre pazienti con PBMAH non avevano ipercortisolismo.

Tra i pazienti con PBMAH, quelli mutati per ARMC5 avevano un cortisolo dopo 1 mg di desametasone più elevato dei pazienti wild type (wt).

Conclusioni: nonostante si tratti di una patologia rara, la PBMAH sta aumentando la sua prevalenza tra gli adenomi surrenalici bilaterali e le cause di ipercortisolismo endogeno. Dal momento che spesso si presenta con un fenotipo più severo, per la sua diagnosi servono criteri di imaging ben definiti. Nonostante la terapia medica o chirurgica, i casi di PBMAH con fenotipo secretorio più severo possono presentare una recidiva dell'ipercortisolismo nel tempo, pertanto meritano un periodico follow-up.

Le mutazioni di ARMC5 dovrebbero essere ricercate in pazienti con PBMAH e mancata soppressione del cortisolo dopo 1 mg di desametasone. Le comorbidità associate all'ipercortisolismo, invece, nonostante il loro riscontro frequente, non consentono di distinguere una PBMAH da adenomi surrenalici bilaterali, e non è ancora chiaro se siano utili per sospettare una mutazione di ARMC5.

Analisi effettuate su popolazioni più ampie di pazienti con adenomi surrenalici bilaterali, PBMAH e screening genetico per ARMC5, oltre allo studio di famiglie portatrici di alterazioni di questo gene, potranno aiutare a comprendere meglio la patogenesi e l'evoluzione della PBMAH e le caratteristiche del sottogruppo con mutazione di ARMC5.

ABSTRACT

Background: bilateral adrenal incidentalomas are increasingly frequent findings in imaging studies performed for non-adrenal causes. Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH), characterised by global adrenal enlargement with bilateral macronodules, plays an increasingly important role among them, and it may be associated with hypercortisolism and Cushing syndrome (CS). Despite its rarity, its prevalence is growing, thanks to the improvement of imaging techniques. Furthermore, the finding of genetic mutations such as the ARMC5 gene's ones supports a genetic nature for PBMAH and it appears to be associated to a more severe hypercortisolism phenotype.

Both in incidentally discovered adrenal adenomas and in PBMAH found through imaging or genetic screening of family members of a patient with PBMAH, hormonal work-up often shows an autonomous cortisol secretion (MACS) without typical signs of overt Cushing Syndrome, but with cortisol-related comorbidities. MACS precocious identification may allow to begin an appropriate treatment to reduce cardiovascular risk and cortisol-related comorbidities.

Objective of the study: assessment of the differences of hormonal secretion, clinical presentation and genetics between patients with bilateral adrenal adenomas and PBMAH, and observation of clinical and biochemical evolution of patients with non-secreting adenomas, MACS and overt CS during the follow-up period.

Methods: 59 patients evaluated in the outpatient clinics of the Endocrinology Department of the Hospital of Padua between 2010 and 2024 were examined in this study. Their diagnosis was bilateral adrenal adenomas or PBMAH. Data about their clinical and biochemical presentation, the diameter of the adrenal nodules and the presence or absence of a mutation of ARMC5 were collected from the first and last ambulatory medical records of every patient.

Results: depending on the secreting phenotype at the first evaluation, patients with bilateral adenomas were divided into non-secreting adenomas, MACS and overt CS. Patient with overt CS were younger and presenting a more severe biochemical

hypercortisolism. None of the three groups showed relevant changes between the beginning and the end of the follow-up.

PBMAH was found in 27% of adrenal bilateral adenomas and 40% of the patients with PBMAH presented pathogenic ARMC5 mutations. None of the patients without PBMAH was mutated. Patients with PBMAH showed a more severe phenotype, with higher frequency of overt CS compared to adrenal adenomas. On the contrary, there were no differences between the two groups regarding the comorbidities associated to hypercortisolism.

Among the patients with PBMAH, the ARMC5-mutated ones presented higher levels of cortisol after 1 mg overnight dexamethasone suppression test compared to wild type patients.

Conclusions: despite its rarity, PBMAH is increasing its prevalence among adrenal bilateral adenomas and among the causes of endogenous hypercortisolism. Since it often presents with a more severe phenotype, well-defined imaging criteria are needed for its diagnosis. Despite of medical or surgical treatment, PBMAH cases with a more severe hypercortisolism phenotype may show a recurrence of hypercortisolism through the years; for this reason, they require a periodic follow-up.

ARMC5 mutations should be searched for in patients with PBMAH and absent suppression of cortisol levels after 1 mg overnight dexamethasone suppression test. Hypercortisolism associated comorbidities, despite their frequent finding, do not help the distinction between PBMAH and bilateral adrenal adenomas, and it is still unclear if they are useful to suggest an ARMC5 mutation.

Analysing larger populations of patients with bilateral adrenal incidentalomas, PBMAH and ARMC5 genetic screening, in association with the investigation of the families carrying mutated alleles of this gene, may help to better understand the pathogenesis and evolution of PBMAH and the characteristics of the mutated ARMC5 subgroup.

1. INTRODUZIONE

L'iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare primitiva (PBMAH) è una patologia rara che consiste in multipli noduli della corticale di ciascun surrene, di dimensioni che superano 1 cm e con caratteristiche radiologiche di benignità. Dal momento che queste lesioni sono in grado di secernere cortisolo, la PBMAH costituisce una causa di sindrome di Cushing di origine surrenalica. Molto spesso, però, l'ipercortisolismo non dà segni evidenti e la PBMAH viene scoperta tramite un imaging eseguito per altre ragioni: la sua diagnosi deriva sempre più frequentemente dal riscontro di incidentalomi surrenalici bilaterali, il cui iter di approfondimento porta alla fine a inquadrare correttamente questa patologia.

1.1 Sindrome di Cushing

1.1.1 Eziologia ed epidemiologia

La sindrome di Cushing (CS) è una patologia determinata da un'esposizione cronica ad alti livelli di cortisolo, condizione definita come ipercortisolismo. La sua causa più frequente è l'assunzione prolungata di glucocorticoidi esogeni come terapia antiinfiammatoria o immunosoppressiva; più rara è invece la CS endogena, derivata da un'eccessiva secrezione di cortisolo dei surreni (1).

Fisiologicamente, il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo rilascia CRH (*corticotropin-releasing hormone*) secondo un preciso ritmo circadiano per produrre un picco di cortisolo nel primo mattino e un nadir durante la notte, o in caso di stimoli infiammatori o stressogeni. Tramite il sistema portale venoso dell'ipofisi, il CRH raggiunge le cellule corticotrope ipofisarie, dove induce la secrezione di ACTH (*adrenocorticotropic hormone*). A sua volta, l'ACTH avvia nella corticale delle ghiandole surrenaliche la sintesi di cortisolo che, quando arriva in circolo, è in grado di inibire un ulteriore rilascio di CRH e ACTH tramite un meccanismo di feedback negativo. Un eccesso di cortisolo deriva quindi dalla disregolazione di una di queste tappe (2).

La CS endogena ha un'incidenza stimata di 0.2-5 casi per milione l'anno, con una maggiore prevalenza nel sesso femminile (3). I suoi meccanismi patogenetici si possono dividere in ACTH-dipendenti, in cui un'iperproduzione di ACTH stimola il surrene a rilasciare alti livelli di cortisolo, e ACTH-indipendenti, con una secrezione inappropriata di cortisolo primariamente di origine surrenalica. La forma

ACTH-dipendente costituisce l'80% dei casi di CS, con un'incidenza di 1.2-2.4 casi per milione all'anno (1,2), ed è comunemente dovuta a un adenoma ipofisario ACTH-secerne; questa specifica condizione prende il nome di malattia di Cushing. Alternativamente, nel 20% di CS ACTH-dipendente, l'aumentata sintesi di ACTH può avvenire al di fuori dell'ipofisi a causa di tumori ectopici, quali carcinoidi o microcitomi polmonari (4).

Solo il 20% dei pazienti con CS ha un ipercortisolismo di origine surrenalica (4). Nella maggior parte dei casi la causa è un adenoma surrenalico monolaterale (15%, 0.6 nuovi casi per milione all'anno) o, meno frequentemente, un carcinoma (5%, 0.2 nuovi casi per milione all'anno) (5). Più rare invece sono l'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale (BMAH o PBMAH), la malattia surrenalica nodulare primitiva pigmentata (PPNAD) o la sindrome di McCune-Albright.

1.1.2 Presentazione clinica

Nei pazienti con CS l'esposizione prolungata a un eccesso di cortisolo può comportare segni e sintomi particolari che, se presenti, devono far sospettare un sottostante ipercortisolismo. Nonostante questo, le manifestazioni cliniche sono molto variabili e la loro severità differisce ampiamente a seconda del grado e della durata dell'ipercortisolismo (4).

Solitamente il sospetto clinico di CS nasce dalla presenza di obesità centrale associata a un accumulo di grasso nelle fosse sovraclavari e a livello dorsale del collo (il cosiddetto gibbo). Altri segni caratteristici sono la tipica facies "a luna piena", causata da un deposito adiposo a livello del volto, la cute assottigliata e soggetta alla formazione di lividi ed ecchimosi anche per traumi lievi, strie violacee di larghezza superiore a 1 cm prevalentemente a livello addominale e debolezza e ipotrofia dei muscoli prossimali degli arti. In presenza di questa sintomatologia si parla solitamente di Cushing florido, o overt CS, che, a causa delle varie comorbidity associate che aumentano il rischio cardiovascolare, determina una mortalità elevata (3).

D'altra parte questi tipici segni di ipercortisolismo non sempre sono riscontrabili nei pazienti con CS. Al contrario, di frequente la CS si manifesta con ipertensione, alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico, acne, irsutismo, osteoporosi e irregolarità mestruali, decisamente più frequenti nella popolazione generale rispetto alla presentazione classica dell'eccesso di glucocorticoidi. Si osservano spesso

anche disturbi neuropsicologici tra cui depressione, irritabilità, disturbi del sonno e deficit cognitivi (6). Per questo diversi pazienti con CS rimangono misdiagnosticati per lungo tempo e trattati da numerosi specialisti prima di arrivare alla diagnosi corretta (4).

La compresenza di livelli aumentati di cortisolo e sintomi aspecifici di ipercortisolismo senza manifestazioni tipiche di overt CS è stata definita come CS subclinica, *mild hypercortisolism* (mHC) (7) o, più recentemente, *mild autonomous cortisol secretion* (MACS); questa condizione viene individuata soprattutto nelle indagini di approfondimento di incidentalomi surrenalici (1) e comporta un aumentato rischio di morbidità e mortalità (8). Contrariamente alla CS, la MACS è tutt'altro che rara, essendo stata riscontrata in quasi il 2% degli individui sopra i 60 anni e fino al 10% di quelli con ipertensione malcontrollata, diabete o fragilità ossea non spiegabile (7).

Esistono anche altre particolari presentazioni di CS, tra cui la sindrome di Cushing ciclica e la CS *food-dependent* (FDCS). La CS ciclica è caratterizzata da un'alternanza tra periodi con picchi di ipercortisolismo e remissioni con livelli di cortisolo nella norma. Tipicamente è stata descritta in pazienti con CD, ma sono stati riportati rari casi in associazione con adenomi surrenalici o produzione di ACTH ectopico. Queste fluttuazioni, spesso accompagnate da cambiamenti nella clinica del paziente, rendono difficoltosi la diagnosi e il trattamento della patologia (9). La FDCS, invece, mostra un innalzamento del cortisolo in corrispondenza dei pasti, associato a bassi livelli dell'ormone a digiuno: in questi pazienti la misurazione del cortisolo salivare del mattino a digiuno mostra livelli inferiori a quella notturna, mentre l'assunzione di cibo provoca un picco dell'ormone in circolo (10).

1.1.3 Diagnosi

La diagnosi di CS endogena parte da un'anamnesi accurata della storia personale e familiare del paziente e dall'esecuzione di un attento esame obiettivo, mirato a identificare i segni e sintomi della patologia (6).

Dopo aver escluso l'utilizzo di terapie a base di glucocorticoidi, lo screening per CS è raccomandato soprattutto per individui in cui la probabilità di diagnosi di questa patologia è elevata. Si tratta in particolare di pazienti con caratteristiche inusuali per la loro età, come l'ipertensione o l'osteoporosi nei giovani adulti,

individui con comorbidità multiple e progressive suggestive per CS, bambini con rallentamento della crescita e aumento ponderale e pazienti con un incidentaloma surrenalico (11). La valutazione dev'essere eseguita anche nei pazienti con comorbidità inspiegate e severe indipendentemente dall'età (3). Per iniziare lo screening, le linee guida dell'Endocrine Society (11) raccomandano l'esecuzione di un test tra:

- misurazione del cortisolo libero urinario nelle 24 ore (CLU; due misurazioni);
- dosaggio del cortisolo salivare notturno (LNSC; due misurazioni);
- test di soppressione con 1 mg di desametasone (DST);
- test di soppressione a basse dosi di desametasone (2mg/die in 48 ore).

La scelta del test dev'essere fatta in base alle caratteristiche del paziente, dal momento che esistono condizioni, tra cui gravidanza e insufficienza renale, in cui alcune di queste misurazioni potrebbero essere meno affidabili.

Risultati al di fuori dell'intervallo di normalità del primo test richiedono l'esecuzione di uno degli altri esami raccomandati, per confermare la diagnosi di CS endogena. Questa è certa una volta che si ottengono due risultati fuori dall'intervallo di normalità; in caso di discordanza tra i due test o forte sospetto clinico con risultati negativi, è importante invece continuare un follow-up endocrinologico. È quindi utile ripetere lo screening ormonale o monitorare la progressione della sintomatologia con una valutazione endocrinologica successiva, se la probabilità di CS è meno elevata (11).

Una volta ottenuta la diagnosi di CS, è necessario stabilire la causa dell'ipercortisolismo. Dal momento che un eccesso prolungato di cortisolo sopprime la secrezione fisiologica di ACTH, nell'ipercortisolismo di origine surrenalica è possibile riscontrare una concentrazione plasmatica di quest'ormone ridotta (<10 pg/ml), anche se, nel caso in cui l'aumento di cortisolo fosse lieve, la soppressione dell'ACTH potrebbe non essere completa (11). In questi casi un test di stimolazione con CRH, che rileva i livelli di ACTH dopo la somministrazione del suo fattore di rilascio, può aiutare a smascherare una responsività dell'ACTH allo stimolo e identificare una forma di origine ipofisaria (3).

Il passo successivo è l'imaging: se la CS è ACTH-dipendente, è possibile eseguire una RM encefalica per identificare un'eventuale massa a livello ipofisario o una TC o RM di torace e addome per ricercare un tumore ectopico ACTH-secernente. Se

invece la CS è ACTH-indipendente, si effettua una CT addominale per valutare i surreni. In casi particolari, per esempio una lesione sospetta per malignità, si può ricorrere alla PET con ¹⁸Fluorodesossiglucosio o a una RM per una caratterizzazione più approfondita (3).

Per quanto riguarda la diagnosi di MACS, il test fondamentale è la misurazione dei livelli di cortisolo dopo 1 mg DST. Concentrazioni inferiori a 50 nmol/L (1.8 µg/dL) permettono ragionevolmente di escludere un ipercortisolismo (7). Al contrario, livelli di cortisolo sopra questa soglia, in assenza di alterazioni nel CLU e nel LNSC permettono di diagnosticare una MACS (8).

1.1.4 Trattamento

Il trattamento della CS è essenziale per ridurre la mortalità e controllare le comorbidità associate. A questo scopo, le linee guida della Endocrine Society (12) raccomandano di normalizzare i livelli di cortisolo o ridurre la sua azione sui suoi recettori per eliminare segni e sintomi della CS. Sono inoltre essenziali il monitoraggio e il trattamento delle comorbidità associate all'ipercortisolismo ed è raccomandata una valutazione del rischio trombotico, aumentato in situazioni di cortisolo elevato, e l'effettuazione di vaccinazioni appropriate all'età, a causa del maggior rischio di infezioni.

Per quanto riguarda la CD, il trattamento di prima linea consiste nella resezione chirurgica per via transsfenoidale della lesione ipofisaria determinante l'ipercortisolismo. Altre possibilità terapeutiche sono la radioterapia, il trattamento medico con inibitori della steroidogenesi o farmaci con azione a livello ipofisario, o la surrenectomia bilaterale, in caso di CD non controllabile tramite terapia medica. Anche i tumori secernenti ACTH ectopico e quelli surrenalici richiedono rispettivamente la chirurgia della massa e la surrenectomia monolaterale; la surrenectomia bilaterale è inoltre il trattamento di scelta in caso di patologia surrenalica bilaterale con ipercortisolismo severo. Gli inibitori della steroidogenesi sono un'ulteriore opzione terapeutica per i pazienti con ipercortisolismo di origine surrenalica, soprattutto se derivante da un carcinoma. Nei casi di secrezione ectopica di ACTH da lesioni occulte o metastatiche la terapia più appropriata è costituita dagli inibitori della steroidogenesi o da specifiche terapie targeted. La surrenectomia bilaterale rappresenta un approccio di seconda linea se la terapia medica non garantisce un buon controllo dell'ipercortisolismo.

In tutti questi casi è importante valutare i livelli di cortisolo notturno post-operatori o durante la terapia, per stabilire e trattare una condizione di ipocortisolismo o di ricorrenza di CS. Inoltre, in condizioni di persistente CS con alterazioni del metabolismo glucidico dopo chirurgia o quando questa non è possibile, un'ulteriore opzione è costituita dagli antagonisti dei glucocorticoidi (12).

Tutti gli approcci descritti precedentemente sono validi in presenza di CS florida ma, dal momento che l'ipercortisolismo determina un aumento di morbilità e mortalità già nelle sue forme lievi, è fondamentale considerare il suo trattamento anche nei pazienti con MACS. Essendo questa condizione più frequentemente di origine surrenalica, la surrenectomia monolaterale è il trattamento standard in presenza di complicanze dell'ipercortisolismo dovute a una lesione monolaterale (8): ci sono infatti evidenze di miglioramento di ipertensione, diabete di tipo 2 e rischio di frattura nei pazienti sottoposti a questa chirurgia (7).

Nei pazienti in cui la MACS deriva da lesioni bilaterali, come un'iperplasia surrenalica o adenomi bilaterali, è importante scegliere il trattamento in maniera individualizzata per ogni singolo paziente, sulla base di età, sesso, condizioni generali e comorbidità e preferenze del paziente. In generale, però, l'esecuzione di surrenectomia bilaterale in prima linea in caso di MACS è sconsigliata, a causa della necessità di terapia sostitutiva con glucocorticoidi e mineralcorticoidi esogeni a vita (8). Per questo motivo si preferisce un'iniziale surrenectomia monolaterale, seguita da un controllo a lungo termine della funzione e della crescita della ghiandola controlaterale (13).

1.2 Incidentalomi surrenalici

1.2.1 Definizione, epidemiologia ed eziologia

Gli incidentalomi surrenalici sono masse riscontrate nelle ghiandole surrenaliche durante un imaging effettuato per diversi motivi, in assenza di segni e sintomi potenzialmente indicativi di un eccesso di ormoni surrenalici, come quelli dovuti a feocromocitoma, CS o sindrome di Conn (8).

Studi autoptici suggeriscono una prevalenza generale del 2% per le masse surrenaliche, che aumenta con l'età (14) e studi radiologici riportano una prevalenza di circa il 3% nei pazienti sopra i 50 anni, che raggiunge il 10% in pazienti sopra gli 80 (8). Inoltre, il 10-15% delle lesioni surrenaliche è bilaterale (15).

L'eziologia degli incidentalomi è molto variabile e include sia lesioni benigne che maligne, che possono derivare dalla corticale o dalla midollare del surrene o avere un'origine extra-surrenalica. Nonostante questo, dalla tabella sottostante si può notare che l'80-85% di queste lesioni è costituito da adenomi corticosurrenalici e PBMAH.

Eziologia	Prevalenza delle diverse entità tra gli incidentalomi surrenalici
Adenoma corticosurrenale o iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare	80%-85%
▪ Non funzionante	40%-70%
▪ Lieve secrezione autonoma di cortisolo	20%-50%
▪ Aldosteronismo primario	2%-5%
▪ Sindrome di Cushing florida	1%-4%
Altro mielolipoma benigno a massa	3%-6%
▪ Mielolipoma	3%-6%
▪ Cisti e pseudocisti	1%
▪ Ganglioneuroma	1%
▪ Schwannoma	<1%
▪ Emorragia	<1%
Feocromocitoma	1%-5%
Carcinoma corticosurrenale	0.4%-4%
Altre masse maligne (soprattutto metastasi surrenaliche)	3%-7%

Tabella I: Eziologia dei tumori surrenali presentati come incidentalomi surrenali (Adattata da Fasnacht et al., European Society of Endocrinology clinical practice guidelines on the management of adrenal incidentalomas, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors.)

1.2.2 Valutazione di malignità

Secondo le linee guida della European Society of Endocrinology (8), una volta riscontrato un incidentaloma surrenalico all'imaging, è necessario fin da subito stabilirne la natura benigna o maligna. Per fare questo si utilizza la RM o, più spesso, la TC senza mezzo di contrasto: in questo caso solitamente una lesione benigna si presenta come omogenea e a contenuto ricco di lipidi, con una densità inferiore o uguale a 10 unità Hounsfield [HU]. Di fronte a queste caratteristiche non sono necessari altri approfondimenti all'imaging. Una massa omogenea ma con densità tra 11 e 20 HU e dimensioni <4 cm, insieme a un work-up ormonale che non mostra un eccesso rilevante di ormoni, richiede una ripetizione della TC. Se la massa surrenalica ha invece un diametro maggiore o uguale a 4 cm e appare eterogenea o con densità superiore a 20 HU, il rischio di malignità è elevato e il caso, discusso anche in team multidisciplinari, richiede una completa stadiazione che include TC toracica e/o FDG-PET/TC e il trattamento in breve tempo, che può essere costituito dalla chirurgia.

Al contrario, la biopsia surrenalica è sconsigliata: questa procedura invasiva ha un rischio di insembramento di cellule tumorali nei tessuti circostanti, può comportare delle reazioni avverse potenzialmente mortali se eseguita su un feocromocitoma non diagnosticato e l'analisi istologica del campione spesso non permette di distinguere tra un adenoma e un carcinoma corticosurrenalico (16). La sua utilità è ristretta ai casi in cui il paziente abbia una storia nota di tumori maligni extra-surrenalici, per cui il sospetto di una metastasi in sede surrenalica è elevato. La biopsia del surrene dovrebbe dunque essere seguita solo dopo l'esclusione di un feocromocitoma e solo quando il suo risultato è in grado di cambiare radicalmente la gestione della patologia (17).

In pazienti con storia di neoplasie extra-surrenaliche, una lesione che mostra caratteristiche benigne non richiede ulteriori approfondimenti all'imaging, ma solo una valutazione ormonale. Al contrario, se l'incidentaloma ha caratteristiche dubbie, l'esecuzione di una FDG PET/TC può far propendere per una metastasi se la captazione della massa è elevata o, in caso contrario, richiedere una ripetizione della TC senza contrasto. Eventualmente si può ricorrere alla biopsia nei casi già discussi, o alla chirurgia o semplicemente a un monitoraggio nel tempo quando la lesione è già avanzata e la surrenectomia non è possibile (8).

1.2.3 Ricerca di eccesso ormonale

Contemporaneamente alla constatazione della benignità o malignità della massa, è necessario investigare una possibile secrezione ormonale. Per prima cosa ogni paziente con incidentaloma surrenalico dev'essere sottoposto a una dettagliata valutazione anamnestica e clinica, diretta a ricercare segni e sintomi di eccesso ormonale. Se si osservano segni come irsutismo o virilizzazione con comparsa e progressione rapida, o ginecomastia nell'uomo, o se la massa presenta caratteristiche dubbie o maligne all'imaging, si procede con i dosaggi di DHEA-S, androstenedione, 17-idrossiprogesterone e testosterone ed estradiolo, in maniera concordante con la sintomatologia clinica (8). I carcinomi surrenalici, infatti, possono essere in grado di produrre livelli elevati sia di cortisolo, sia di ormoni sessuali, per cui spesso si presentano con un aumento degli steroidi sessuali e dei loro precursori e con le manifestazioni cliniche associate (18).

In tutti i pazienti con incidentaloma surrenalico si effettua poi il dosaggio del cortisolo dopo 1 mg DST, per valutare una secrezione autonoma di cortisolo da parte della massa, che viene esclusa se i livelli riscontrati sono ≤ 50 nmol/L (≤ 1.8 $\mu\text{g/dL}$). In questo caso i pazienti non necessitano di altre valutazioni o follow-up endocrinologici. Se non sono presenti evidenti segni di ipercortisolismo e la secrezione di cortisolo supera questa soglia, viene posta diagnosi di MACS ed è necessario confermare la sua ACTH-indipendenza. Eventualmente è raccomandata anche la ripetizione del test per confermare la presenza di ipercortisolismo e possono risultare utili ulteriori test biochimici per valutarne l'entità. In ogni caso, l'approccio successivo alla patologia dev'essere guidato dalle caratteristiche del paziente e dal grado di severità delle comorbidità associate all'ipercortisolismo: ad esempio, pazienti con MACS ma senza evidenza di comorbidità non dovrebbero essere sottoposti a trattamenti, ma solo di un follow-up per monitorare la comparsa di eventuali disturbi attribuibili all'eccesso di cortisolo, mentre in quelli in cui le comorbidità sono rilevanti andrebbe considerato un trattamento. Proprio a questo scopo è raccomandato nei pazienti con MACS e incidentaloma surrenalico lo screening e il trattamento di ipertensione, diabete mellito di tipo 2 e fratture vertebrali da osteoporosi (8).

È fondamentale inoltre escludere un feocromocitoma: questo si effettua tramite la misurazione delle metanefrine plasmatiche o le metanefrine urinarie frazionate in tutti i pazienti in cui le lesioni surrenaliche si presentano all'imaging con

caratteristiche diverse da quelle tipiche degli adenomi benigni (8,19). Inoltre, nei pazienti con concomitante ipertensione o ipokaliemia inspiegate, è opportuno valutare il rapporto aldosterone/renina per la possibilità di iperaldosteronismo primario (8,20).

1.2.4 Trattamento

Lo standard di trattamento per i tumori surrenalici monolaterali è la surrenectomia monolaterale nei pazienti con eccesso ormonale clinicamente significativo, che può essere considerata anche nei pazienti con MACS e comorbidità rilevanti, a seconda delle caratteristiche e dei fattori di rischio individuali. Al contrario, la chirurgia è sconsigliata nel caso di lesioni unilaterali asintomatiche senza secrezione ormonale, che mostrano caratteristiche benigne all'imaging indipendentemente dalle loro dimensioni; può essere considerata solo per ridurre eventuali sintomi dovuti all'effetto massa nel caso in cui la lesione benigna abbia dimensioni >4 cm. Per le masse benigne causanti eccesso ormonale, inclusa la MACS, è consigliato un approccio chirurgico mini-invasivo, soprattutto se la massa non supera i 6 cm. Questo permette di ridurre i rischi associati a una chirurgia open e migliorare il decorso post-operatorio. La surrenectomia mini-invasiva, se eseguita da chirurghi esperti, si può considerare anche nei casi di masse maligne con diametro inferiore a 6 cm ed evidenza di invasione locale. In assenza di uno di questi requisiti, la lesione maligna va operata in chirurgia open, mentre tutti i casi che non rientrano in questi gruppi vanno discussi individualmente in team multidisciplinare (8).

È raccomandata inoltre una terapia perioperatoria con glucocorticoidi in tutti i pazienti sottoposti a chirurgia in cui il livelli di cortisolo dopo 1 mg DST siano superiori a 50 nmol/L; questi pazienti dovrebbero proseguire il follow-up endocrinologico dopo la chirurgia e la loro terapia con glucocorticoidi dev'essere rivalutata e ricalibrata periodicamente e cessata solo dopo evidenza di un recupero della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (8). Questo perché si è osservato che sia i pazienti con CS florida, sia circa la metà dei pazienti con MACS possono andare incontro a insufficienza surrenalica dopo la rimozione della massa secernente cortisolo: in generale, queste succede tanto più frequentemente quanto più è elevata la concentrazione plasmatica di cortisolo dopo 1 mg DST (21).

Per quanto riguarda i pazienti le cui lesioni hanno caratteristiche dubbie all'imaging ma non vengono sottoposte a chirurgia, un'ulteriore TC senza contrasto o RM

eseguita 6-12 mesi dopo la prima può aiutare a identificare una stabilità o meno della massa, permettendo di effettuare una surrenectomia monolaterale se le dimensioni aumentano di oltre il 20% rispetto a quelle iniziali. Nel caso di pazienti con MACS che non vanno incontro a chirurgia è importante invece una valutazione annuale delle comorbidità associate all'ipercortisolismo, tramite la misurazione di HbA1c, pressione arteriosa, colesterolo totale, LDL, HDL e trigliceridi e peso corporeo (8).

1.2.5 Incidentalomi bilaterali

Le masse bilaterali seguono lo stesso protocollo di imaging e dosaggi ormonali degli incidentalomi monolaterali per la valutazione della benignità o malignità e la ricerca di un'ipersecrezione ormonale. La maggior parte di queste è rappresentata da condizioni benigne, quali adenomi bilaterali o PBMAH, ma non si può escludere la possibilità di metastasi di tumori extra-surrenali, linfomi surrenali e feocromocitomi. Inoltre potrebbe accadere che le lesioni surrenali bilaterali abbiano natura differente: per questo motivo l'approccio più appropriato è quello di valutare le singole masse in maniera separata. In base alle caratteristiche delle masse all'imaging, è possibile suddividere le lesioni bilaterali in quattro gruppi:

1. iperplasia surrenalica (macronodulare) bilaterale;
2. adenomi bilaterali;
3. due masse morfologicamente simili ma con caratteristiche differenti da adenomi;
4. due masse morfologicamente diverse tra loro.

Ciascuno di questi gruppi segue uno specifico work-up diagnostico, basato sulla possibile natura delle lesioni.

	Iperplasia surrenalica bilaterale	Adenomi surrenalici bilaterali	Due masse surrenaliche morfologicamente simili (ma indeterminate all'imaging e all'analisi ormonale)	Due masse surrenaliche morfologicamente differenti
Imaging work-up	Ci sono 2 forme principali di iperplasia, un tipo diffuso senza noduli distinti e un tipo macronodulare, in cui entrambi i surreni tipicamente presentano più di un nodulo (di solito HU <10 senza contrasto) e il resto dei surreni è ingrossato.	Tipicamente, entrambi i surreni presentano un adenoma ben distinto/non ambiguo (HU <10 senza contrasto) e le restanti parti del surrene sono normali o sottili.	Le HU in TC con o senza mezzo di contrasto sono tipicamente simili per le diverse masse (così come il loro aspetto alla RM o alla FDG-PET) e le caratteristiche all'imaging non sono tipiche di un adenoma.	L'aspetto delle masse surrenali è chiaramente differente in TC con o senza contrasto, RM o FDG-PET, ma almeno una di queste ha caratteristiche non tipiche di adenoma.
Work-up ormonale (in aggiunta al work-up diagnostic standard)	Se si sospetta un'iperplasia surrenalica congenita, considerare la misurazione del 17-OH progesterone basale per diagnosticare (o escludere) la CAH, che può essere specialmente importante da considerare in caso di segni, sintomi o biochimica di iperandrogenemia.	In caso di segni, sintomi o biochimica di iperandrogenemia, si dovrebbe considerare un'ulteriore misurazione del 17-OH progesterone basale per escludere la CAH.	Nelle masse infiltrative (es. linfomi, metastasi) o emorragie bilaterali, è richiesta l'esclusione dell'insufficienza surrenalica.	Il work-up ormonale standard è sufficiente.
Conseguenze cliniche	Se la CAH è esclusa, considerare come diagnosi l'iperplasia surrenale macronodulare bilaterale primaria (PBMAH) come diagnosi. In presenza di noduli multipli e MACS ACTH-indipendente, dovrebbe essere offerto il test genetico per varianti patogenetiche germinali di ARMC5. In pazienti con MACS, andrebbe considerata la surrenectomia monolaterale del lato dominante usando un approccio individualizzato che considera età, grado di eccesso di cortisolo, condizioni generali e preferenze del paziente.	In pazienti con MACS, la gestione dovrebbe seguire le raccomandazioni per l'ipercortisolismo subclinico. In pazienti selezionati, la surrenectomia monolaterale della lesione dominante potrebbe essere considerata usando un approccio individualizzato che considera età, grado dell'eccesso di cortisolo, condizioni generali e preferenze del paziente.	Nei feocromocitomi, il test genetico per geni PPGL-associati è obbligatorio. Se si sospettano lesioni maligne, andrebbe considerata una biopsia.	È necessaria un'indagine dell'eziologia sottostante.

Tabella II: Sottodifferenziazione degli incidentalomi surrenalici bilaterali. (Adattata da Fassnacht et al., European Society of Endocrinology clinical practice guidelines on the management of adrenal incidentalomas, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors.)

In particolare, nei pazienti con iperplasia surrenalica bilaterale o adenomi bilaterali e MACS, è opportuna una scelta individualizzata del trattamento sulla base delle caratteristiche, delle comorbidità e delle preferenze del paziente. Ad ogni modo, in assenza di segni clinici di CS florida, la surrenectomia bilaterale è sconsigliata.

1.3 PBMAH

1.3.1 Definizione

L'iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare (BMAH), o iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare primitiva (PBMAH), è una causa rara di CS di origine surrenale. Essa consiste in un ingrandimento delle ghiandole surrenali, che presentano multipli noduli corticali bilaterali di diametro superiore a 1 cm con caratteristiche radiologiche di benignità. Queste lesioni sono in grado di causare un ipercorticismo ACTH-indipendente (22).

Fin dalla sua descrizione iniziale, gli studiosi si sono riferiti a questa patologia con nomi differenti, tra cui il più comune era iperplasia surrenalica macronodulare ACTH-indipendente (AIMAH). Nel 2013 un report ha però evidenziato una possibile secrezione paracrina di ACTH da parte dei surreni dei pazienti affetti (23): da allora si è preferito utilizzare il nome di PBMAH. Anche il termine "iperplasia" non sarebbe del tutto appropriato, dal momento che studi genetici hanno dimostrato una natura clonale o neoplastica dei noduli surrenalici in questa patologia. In questo caso sarebbe più corretto parlare di *bilateral macronodular adrenal cortical disease* (24), ma, essendo questa terminologia ancora poco diffusa, la denominazione di PBMAH rimane ancora quella più usata.

1.3.2 Epidemiologia

La maggior parte dei casi di PBMAH è sporadica, con una leggera prevalenza nel genere femminile, ma non sono rare le presentazioni familiari (22); la diagnosi avviene tipicamente nella quinta o sesta decade di vita (15). La PBMAH si riscontra anche in pazienti con storia familiare o personale di tumori multipli a causa di sindromi genetiche predisponenti a neoplasie. D'altra parte questi casi rappresentano meno del 5% dei pazienti con PBMAH, e allo stesso modo la PBMAH si osserva raramente in queste sindromi genetiche: la maggior parte dei pazienti con PBMAH, infatti, non ha storia clinica o familiare che suggerisca la presenza di una sindrome di questo tipo (25).

Nonostante ad oggi la diagnosi di PBMAH venga fatta sempre più frequentemente grazie ai miglioramenti delle tecniche di imaging, la prevalenza di questa patologia non è ancora ben definita, anche a causa di una distinzione non sempre netta dai semplici adenomi bilaterali (22). Considerando che circa il 15% degli incidentalomi surrenalici sono bilaterali, di cui la PBMAH rappresenta una quota significativa, e

che circa il 4-7% della popolazione ha incidentaloma surrenalico (8), probabilmente la vera frequenza della PBMAH è sottostimata (15,26). Si pensa che si aggiri sul 10-15% (27,28) e possa raggiungere il 50% tra i pazienti con adenomi bilaterali e secrezione autonoma di cortisolo (25).

1.3.3 Eziologia e genetica

I meccanismi alla base della tumorigenesi nella PBMAH non sono ancora interamente chiariti, ma la caratterizzazione genetica di queste lesioni ha mostrato che sono dotate di un profilo molecolare e genomico particolare, che le differenzia dagli adenomi surrenalici cortisolo-secerenti. Questo ha permesso inoltre di identificare nuovi geni associati alla PBMAH e alla CS di origine surrenalica (25). Dal punto di vista dell'ereditarietà e della presentazione familiare, è possibile distinguere due forme di PBMAH, una sindromica e una isolata.

Nelle forme sindromiche, la PBMAH si associa a vari tipi di neoplasie e altre caratteristiche cliniche nel contesto di disordini ad ereditarietà autosomica dominante, in cui nella linea germinale sono presenti mutazioni inattivanti di uno degli alleli di geni oncosoppressori, in particolare MEN1, APC e FH (29).

MEN1 è un gene collocato sul braccio lungo del cromosoma 11 (11q) e codificante per l'oncosoppressore menina 1. Una sua mutazione germinale determina la sindrome *multiple endocrine neoplasia type 1* (MEN1), che predispone all'insorgenza di adenomi ipofisari, iperparatiroidismo primario e tumori endocrini pancreatici. Tra le altre patologie che possono associarsi a questo quadro, l'ingrandimento surrenalico è stato riscontrato nel 20.4% dei casi, di cui alcuni con caratteristiche compatibili con PBMAH (30).

Altra sindrome con tendenza allo sviluppo tumorale è la *familial adenomatous polyposis* (FAP), causata da alterazioni germinali inattivanti del gene APC, oncosoppressore localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5 (5q). Il quadro clinico, caratterizzato da polipi coloretali multipli e aumentato rischio di carcinoma coloretale, si può associare anche a tumori della corticale del surrene, presenti in circa il 10% dei casi, tra cui quelli dovuti a PBMAH. La proporzione di PBMAH nella FAP rimane però difficile da valutare (31). Nonostante questo, mutazioni inattivanti di APC sono state descritte in pazienti con diagnosi di PBMAH, supportando il ruolo patogenetico di APC in questa patologia (25).

Ulteriori mutazioni inattivanti un oncosoppressore sono quelle di FH; alterazioni di questo gene, posizionato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q) e codificante per la fumarato idratasi, enzima coinvolto nel ciclo di Krebs, sono alla base della sindrome HLRCC (*hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer*). Si è osservata un'associazione tra questa sindrome e la presenza di tumori surrenalici, inclusa la PBMAH, e sono state riscontrate mutazioni del gene FH in due casi di PBMAH (25).

Un ultimo gene coinvolto in una presentazione sindromica è GNAS, a livello del braccio lungo del cromosoma 20 (20q). In questo caso però la proteina codificata è la subunità α delle proteine G stimolatorie, che agisce come oncogene: le sue mutazioni iperattivanti in mosaicismo sono associate alla sindrome di McCune-Albright, caratterizzata da displasia fibrosa poliostotica, macchie cutanee caffelatte e pubertà precoce. Si è osservato che questa sindrome può associarsi anche a sviluppo di CS nei bambini (32) e sono state descritte varianti iperattivanti somatiche di GNAS in alcuni pazienti con PBMAH (25).

Per quanto riguarda invece le forme non sindromiche, le mutazioni identificate riguardano molecole coinvolte nella cascata di segnalazione di PKA o, più frequentemente, i geni ARMC5 e KDM1A.

La protein chinasi A (PKA) è un complesso enzimatico in grado di avviare molte attività a livello cellulare tramite un sistema di segnalazione a cascata che coinvolge numerose molecole. Nelle cellule della corticale del surrene, l'ACTH stimola la secrezione ormonale e mantiene il trofismo ghiandolare grazie all'attivazione della via di segnale di PKA (33). Si è osservato che alterazioni genetiche somatiche delle varie subunità di PKA e di altre molecole coinvolte nella sua cascata segnalatoria possono causare CS, ma il loro riscontro nella PBMAH è molto meno comune rispetto a quanto avvenga in altre cause benigne di CS (33).

Varianti patogeniche del gene ARMC5 sono la più frequente causa di PBMAH e compaiono in circa il 20-25% di pazienti con PBMAH, nel 40-50% della porzione di pazienti con PBMAH che richiedono la chirurgia e in circa l'80% dei casi di PBMAH familiare (34). Ulteriori studi hanno confermato che le mutazioni di ARMC5 sono comuni nei pazienti con PBMAH e caratterizzano una vasta maggioranza dei casi familiari, mentre nei casi apparentemente sporadici la frequenza varia in base alle caratteristiche della coorte. Per questo la prevalenza di

alterazioni di ARMC5 è circa 40% (28-55%) in pazienti con CS franca, ma scende all'11% in pazienti con ipercortisolismo lieve (22).

Il ruolo patogenetico delle alterazioni di ARMC5 è stato scoperto nel 2013, analizzando pazienti affetti da PBMAH: in 33 pazienti affetti da PBMAH, 18 avevano una mutazione inattivante di ARMC5 a livello germinale e presentavano un'ulteriore alterazione somatica, spesso diversa e specifica per ogni nodulo analizzato, sul tessuto tumorale (35). Ad oggi sono note 119 varianti patogeniche di ARMC5 associate a PBMAH, che possono interessare qualsiasi punto della sequenza del gene. Il fatto che si tratti soprattutto di mutazioni a meccanismo *frameshift* o *nonsense*, che portano alla mancata sintesi della proteina o alla produzione di una proteina tronca, supportano l'ipotesi del ruolo oncosoppressore di ARMC5 (25).

La funzione di ARMC5 rimane ancora poco compresa, ma la sua collaborazione stretta con il sistema ubiquitina-proteasoma e la deregolazione del ciclo cellulare in caso di sua inattivazione suggeriscono che la perdita di funzionalità di ARMC5 promuova lo sviluppo di macronoduli surrenalici, riducendo la morte cellulare e alterando il ciclo cellulare. La sua assenza di attività sembra inoltre correlata ad alterazioni nella steroidogenesi, che paiono ridurne l'efficienza ma aumentare i livelli circolanti di cortisolo (25,36).

La mutazione del gene KDM1A, collocato sul braccio corto del cromosoma 1 (1p), è invece caratteristica di un sottogruppo di pazienti con FDCS, in cui la secrezione di cortisolo viene stimolata dai pasti (26). Per lungo tempo la causa sottostante a questo fenotipo è rimasta sconosciuta; la prima alterazione molecolare che ha permesso di spiegare la FDCS è stata un'espressione ectopica del recettore del GIP (GIPR) nella corticale del surrene. In questi pazienti, il GIP secreto dal duodeno dopo i pasti attiva, tramite il suo anomalo recettore surrenalico, una cascata di segnale tramite PKA che aumenta la secrezione di cortisolo (26). Analogamente al GIPR, altri recettori accoppiati a una proteina G (GPCR) sono in grado di mediare l'attivazione della PKA e determinare un'ipersecrezione di cortisolo dalle ghiandole surrenaliche affette da PBMAH. Tra questi alcuni sono ectopici, come i recettori β -adrenergici, i recettori V₂ e V₃ per la vasopressina, il recettore 5-HT₇ per la serotonina e probabilmente AT1R per l'angiotensina II e GCGR per il glucagone. Altri invece sono eutopici, ma iperespressi o alterati: tra questi ci sono il recettore

V₁ per la vasopressina, LH/hCGR per l'ormone luteinizzante e la gonadotropina corionica umana, il recettore 5-HT₄ della serotonina e LEPR per la leptina (10).

Nel caso di PBMAH con FDCA ed espressione anomala di GIPR, le mutazioni del gene KDM1A sembrano in grado di spiegare la causa della patologia: nel gruppo di pazienti con PBMAH e FDCA analizzati dallo studio di Vaczlavik (26), tutti i pazienti presentavano elevati livelli di espressione di GIPR e una perdita di espressione di KDM1A.

La proteina codificata da KDM1A è la lisina demetilasi 1A, enzima che, agendo sugli istoni, è in grado di intervenire sulla conformazione del DNA e sulla sua trascrizione. Molte delle mutazioni scoperte si concentrano infatti sui domini necessari alla sua attività demetilasi (25). Come per ARMC5, si tratta frequentemente di alterazioni o delezioni del gene presenti nella linea germinale, che richiedono una perdita di funzione dell'altro allele per causare la malattia. Questo riscontro, in accordo con il modello di Knudson, suggerisce che KDM1A agisca come oncosoppressore (26).

Inoltre, in concomitanza con le alterazioni inattivanti di KDM1A si è riscontrata anche una disregolazione di altri recettori accoppiati a proteine G, tra cui il recettore per LH e gonadotropina corionica umana e il recettore per l'angiotensina II AGT1R (37). È possibile che i diversi profili di espressione di questi recettori, definiti come recettori illegittimi o illeciti, possano influenzare lo sviluppo della patologia e la sua presentazione (25).

È da notare che varianti patogeniche di ARMC5 e KDM1A non sono mai state riscontrate in maniera concomitante e appaiono invece mutualmente esclusive: i portatori di alterazioni di un gene dunque non manifestano mutazioni dell'altro (26).

1.3.3 Clinica

Storicamente considerata una patologia rara e diagnosticata in presenza di chiari segni di CS franca di origine surrenalica (25), oggi la PBMAH si riscontra più frequentemente, soprattutto in pazienti lievemente sintomatici con incidentalomi surrenalici bilaterali, osservati in corso di imaging addominale effettuato per altre ragioni (22). L'ipercortisolismo in questa patologia si sviluppa spesso in maniera poco evidente nel corso degli anni, con un accrescimento molto graduale delle lesioni surrenaliche e un'altrettanto lenta manifestazione dei segni clinici (38). Il

fatto che le manifestazioni di questa patologia nei pazienti con overt CS si abbiano dopo i 40 anni, anche in individui portatori di mutazioni genetiche predisponenti, avvalorata questa ipotesi (15,25).

Per queste ragioni, dunque, la presentazione della PBMAH è molto variegata e va da pazienti del tutto asintomatici o con MACS senza segni specifici di CS, a pazienti con molteplici caratteristiche di overt CS. I segni tipici di ipercortisolismo, come obesità centrale, gibbo, debolezza della muscolatura prossimale, strie violacee o ematomi si trovano in meno del 40% dei pazienti con PBMAH: questa patologia, infatti, rende conto di meno del 2% dei casi di overt CS ACTH-indipendente (13). Inoltre, tra le comorbidità comuni sia nella CS che nella popolazione generale, l'ipertensione si riscontra nel 65-85% dei pazienti con PBMAH, il diabete mellito nel 30-40%, l'osteoporosi nel 15-20% (25,26).

La PBMAH può inoltre presentarsi con FDSC: questa forma di ipercortisolismo, più frequente nelle donne, è stata diagnosticata nel 10-30% di pazienti con PBMAH, con una frequenza maggiore tra i pazienti con overt CS rispetto a quelli con MACS (26). Non sono mai state identificate mutazioni di ARMC5 in pazienti con questo fenotipo (36); al contrario, alterazioni del gene KDM1A sembrano spiegare la maggioranza dei casi di FDSC (26). Quest'ultimo gene sembra correlato anche allo sviluppo di gammopatie monoclonali di significato incerto e mielomi: queste neoplasie sono state riscontrate sia in casi di pazienti con FDSC e mutazioni di KDM1A, sia in familiari di pazienti con FDSC che all'analisi genetica sono risultati portatori di alterazioni di questo gene, pur senza presentare una CS clinica (26,37).

Sempre all'interno dell'ottica di una correlazione tra mutazione genetica e fenotipo clinico, le alterazioni di ARMC5 appaiono associate a una presentazione clinica più severa di quanto accade nella PBMAH con ARMC5 non mutato: in presenza di mutazione, le lesioni surrenaliche raggiungono dimensioni più elevate, con eventualmente un numero maggiore di nodulazioni. In alcuni studi viene inoltre evidenziata una maggior prevalenza di ipercortisolismo e alterato metabolismo del glucosio, in altri livelli più elevati di cortisolo dopo 1 mg DST e dislipidemia (39,40). È possibile anche un'associazione con meningiomi, dal momento che sono stati osservati in casi familiari di alterazione di ARMC5 nei pazienti portatori della mutazione (41).

Mutazioni KDM1A e ARMC5 sono dunque causa di forme apparentemente sporadiche di PBMAH, accompagnate spesso da fenotipi caratteristici di ipercortisolismo. Ciononostante, è possibile identificare casi familiari di PBMAH effettuando uno screening genetico dei parenti dei soggetti con questa diagnosi associata a una mutazione di uno di questi due geni: dal momento che queste alterazioni sono rilevabili nella linea germinale, è possibile che la mutazione, pur ritenuta in un primo momento sporadica, sia invece presente in più membri di una famiglia, predisponendo all'insorgenza della patologia (26,42).

Dal punto di vista biochimico, l'ipercortisolismo, anche subclinico, è estremamente frequente nella PBMAH: in un gruppo di pazienti con PBMAH mutati per ARMC5, il 100% mostrava livelli di cortisolo dopo 1 mg DST ≤ 50 nmol/L e quasi l'80% aveva un ACTH basso o soppresso (25,34). Si è comunque osservato che, nei pazienti con MACS, l'ACTH potrebbe non essere totalmente soppresso o mostrare valori nella norma (22).

Meno frequenti sono livelli aumentati di CLU; in genere si rinvengono più facilmente nei pazienti con PBMAH e CS franca, mentre spesso potrebbero risultare di poco aumentati o nella norma, forse anche in relazione all'inefficienza della steroidogenesi riscontrata in questa patologia (22).

1.3.4 Diagnosi

Dal momento che la presentazione clinica della PBMAH è estremamente varia e non sempre indicativa della patologia sottostante, è necessaria una valutazione accurata sia delle caratteristiche radiologiche delle lesioni, sia della secrezione ormonale, in modo da determinarne l'attività endocrina e le comorbidità (22). Il suo frequente riscontro accidentale fa sì che il suo iter diagnostico segua quello degli incidentalomi surrenalici bilaterali, con l'esecuzione di una TC senza contrasto per la caratterizzazione della benignità o malignità delle lesioni e la ricerca di una possibile iperproduzione ormonale (8).

Per definizione, i noduli bilaterali nella PBMAH hanno dimensioni superiori a 1 cm, ma l'ingrandimento dei surreni può presentarsi in diverse forme, sia come multipli macronoduli bilaterali, sia come una singola lesione per ciascuna ghiandola (22). Alla TC le ghiandole possono apparire globalmente ispessite e caratterizzate da più noduli che possono superare i 3 cm, ma in alcuni casi la diagnosi viene fatta anche in presenza di un unico nodulo di grandi dimensioni attorniato da formazioni

più piccole (25). Inizialmente la presenza di tessuto ghiandolare atrofico tra i noduli era ritenuto un criterio della PBMAH, per differenziarla dall'iperplasia ACTH-dipendente; questo perché una protratta secrezione di ACTH può condurre a un'iperplasia corticosurrenalica con caratteristiche nodulari (43). Ad oggi questo non è più valido, dal momento che sono stati descritti casi di PBMAH in cui la ghiandola inter-nodulare è iperplastica (22). È da notare che non c'è correlazione tra la dimensione dei noduli e la tendenza alla malignità: le lesioni della PBMAH, anche se di diametro notevole, sono sempre benigne, nella maggior parte dei casi ricche di lipidi e con attenuazione inferiore a 10 HU alla TC senza mezzo di contrasto (22).

Dal punto di vista ormonale la PBMAH può non essere asintomatica ma determinare MACS o CS florida, dunque è importante riconoscere un possibile ipercortisolismo e provare la sua origine surrenalica, indipendente da ACTH ipofisario o ectopico. Nei casi di CS florida la valutazione ormonale è analoga a quella applicata per le altre forme di Cushing (11). Nella PBMAH scoperta incidentalmente, invece, si procede con una valutazione ormonale ampia con indagini per feocromocitoma, iperaldosteronismo primario (soprattutto in pazienti con ipertensione) e secrezione autonoma di cortisolo (8).

La ricerca dell'ipercortisolismo si effettua con il test di soppressione con 1 mg di desametasone; livelli di cortisolo post-desametasone inferiori a 50 nmol/L (1.8 µg/dL) escludono una secrezione autonoma, mentre concentrazioni superiori depongono a suo favore. Per stabilire l'entità dell'eccesso di cortisolo si possono poi eseguire test come il cortisolo salivare notturno (LNCS) o il cortisolo libero urinario misurato nelle 24 ore (CLU) che, se elevati, possono rafforzare la diagnosi di CS florida. Al contrario, come già descritto, nei casi di MACS questi valori potrebbero non risultare particolarmente elevati o rimanere addirittura normali.

La misurazione del livello di ACTH permette di escludere che l'ingrossamento surrenalico derivi da una stimolazione ipofisaria persistente. Nei pazienti con PBMAH i livelli di ACTH sono solitamente soppressi o bassi; potrebbero però non essere del tutto soppressi, soprattutto nei pazienti con MACS (22,25,29). Esiste inoltre la possibilità di una produzione ectopica di ACTH da parte delle ghiandole surrenali stesse (23). Il test fondamentale per la diagnosi rimane comunque quello di soppressione con desametasone.

Per escludere la presenza di iperplasia surrenale congenita (CAH), dovuta al deficit dell'enzima 21-idrossilasi e anch'essa determinante noduli surrenali bilaterali, è possibile misurare i livelli basali di 17-OH-progesterone (44). La distinzione tra PBMAH e CAH non è sempre facile, perché livelli aumentati di 17-OH-progesterone, caratteristici della CAH, potrebbero ritrovarsi anche in casi di PBMAH, a causa dell'aumentata produzione di steroidi; in questi casi un ACTH basso o soppresso può essere utile per escludere la CAH (8).

Eventualmente, nell'ottica di un trattamento targeted, è possibile indagare anche la presenza dei GPCR illeciti, espressi in maniera ectopica o eccessiva nel surrene, utilizzando specifici test in cui si valutano i livelli di cortisolo secreti in risposta a un determinato stimolo utilizzato (10). Per la diagnosi di FDCS è possibile dosare il cortisolo dopo un test di stimolazione con pasto, o ricercare un calo dei livelli di cortisolo al mattino a digiuno maggiore del 50% rispetto a quelli notturni (26,37). A tutto questo si deve aggiungere lo screening per le comorbidità più rilevanti e frequenti associate all'ipercortisolismo, quali ipertensione, diabete e osteoporosi. Questo serve sia per garantirne un trattamento appropriato, sia per considerare approcci come la chirurgia se le comorbidità sono troppo elevate (8). Inoltre, è utile eseguirlo anche nei pazienti identificati con lo screening genetico, in cui una possibile PBMAH con MACS non ancora diagnosticata aumenta il rischio cardiovascolare (25).

1.3.5 Trattamento

La gestione della PBMAH dev'essere individualizzata e scelta considerando l'età, il grado di ipercortisolismo, le condizioni generali e le preferenze del paziente (8). Ad oggi essa si basa su un approccio chirurgico, costituito dalla surrenectomia monolaterale o bilaterale, e su terapie mediche.

Dal punto di vista chirurgico, la surrenectomia bilaterale è generalmente considerata il trattamento di scelta, soprattutto per i pazienti con overt CS. Questa procedura porta però a una permanente insufficienza surrenalica: determina il rischio di crisi surrenaliche anche letali e richiede dunque una terapia sostitutiva a vita per gli ormoni prodotti da queste ghiandole. Questa dev'essere inoltre valutata periodicamente e ricalibrata, e un suo sovradosaggio potrebbe causare una CS iatrogena. Per questo la surrenectomia bilaterale va considerata solo nei pazienti con CS franca e rimane sconsigliata per i casi di ipercortisolismo lieve (8,22).

La surrenectomia monolaterale sembra presentare meno complicazioni, anche se le evidenze al momento sono limitate. È stato riportato infatti un miglioramento del profilo clinico e biochimico nella maggior parte dei casi di overt CS dei pazienti e delle comorbidità associate all'ipercortisolismo, come ipertensione, diabete e osteoporosi. Nonostante spesso il cortisolo urinario si normalizzi, questo potrebbe non accadere per il cortisolo dopo 1 mg DST o quello salivare notturno; in genere, però, i loro livelli sono più bassi. Inoltre, nonostante l'insufficienza surrenalica, valutata tramite i segni clinici e i livelli basali di cortisolo, si verifichi in un terzo dei pazienti operati con surrenectomia monolaterale, si tratta in genere di una condizione transitoria (22). Per queste ragioni la surrenectomia monolaterale può essere considerata anche nei pazienti con PBMAH e MACS. Rimane comunque fondamentale il monitoraggio per una possibile ricorrenza di MACS dovuta al surrene controlaterale, in modo da cercare eventualmente terapie alternative se necessario (8,13).

Solitamente viene rimosso il surrene con le lesioni di dimensioni maggiori, in quanto si è osservato che, generalmente, il diametro dei noduli correla con il grado di ipercortisolismo (22,45). Un'ulteriore metodica per individuare la lateralizzazione della secrezione è il cateterismo delle vene surrenaliche, ma si tratta di un'indagine invasiva e poco praticata, per la quale i pochi dati disponibili non consentono ancora una vera e propria raccomandazione (29).

Nonostante i buoni risultati della surrenectomia monolaterale, alcuni pazienti hanno una ricorrenza di ipercortisolismo e necessitano della rimozione anche del surrene controlaterale. Anche se questa percentuale è attorno al 10-15%, l'ipercortisolismo può mostrarsi anche dopo 15 anni dalla prima chirurgia; per questo i pazienti operati con surrenectomia monolaterale richiedono un follow-up post-operatorio molto prolungato. D'altra parte un ipercortisolismo lieve a lenta progressione negli anni successivi all'operazione può essere controllato agevolmente, senza il rischio di crisi surrenaliche derivato dalla surrenectomia bilaterale, che in pazienti con intervento monolaterale adeguatamente seguiti non si verifica (22).

Per quanto riguarda la terapia medica, un'opzione è costituita dagli inibitori della steroidogenesi, usati nelle altre forme di CS. Il trattamento con ketoconazolo infatti, pur non essendo specifico per i meccanismi patogenetici della PBMAH, sembra efficace in casi particolari e in grado di garantire un buon controllo dell'ipercortisolismo e un miglioramento clinico (13). Uno studio del 2017 inoltre

ha suggerito che, con la somministrazione serale di metirapone, un inibitore della 11β -idrossilasi a breve durata d'azione, in pazienti con adenomi surrenalici e MACS, sia possibile abbassare i livelli di cortisolo notturni lasciando inalterati quelli del resto del giorno e ripristinando il normale ritmo circadiano del cortisolo. Nonostante siano richieste ulteriori evidenze, quest'approccio appare promettente, dal momento che sembra ridurre anche IL-6, citochina marcatore di rischio cardiovascolare (46).

In generale, è stato suggerito che in presenza di PBMAH e MACS, specifiche terapie mediche per il controllo dei livelli di cortisolo o un approccio chirurgico dovrebbero essere considerati più sistematicamente che nella MACS dovuta ad altre cause, in associazione con il controllo periodico della funzione surrenalica e delle comorbidità: questo è utile per prevenire le conseguenze della lenta ma prolungata disregolazione del cortisolo a cui predispone la PBMAH (25).

L'identificazione della causa genetica potrebbe avere un ruolo nella scelta della terapia: nei pazienti con FDCCS e varianti patogeniche di *KDM1A* si potrebbe considerare un trattamento con analoghi della somatostatina, mentre la surrenectomia monolaterale o, più frequentemente, bilaterale, viene spesso utilizzata nei pazienti con alterazioni di *ARMC5* (25).

I casi di PBMAH responsivi ai test di stimolazione per recettori GPCR aberranti potrebbero essere inoltre trattati con terapie targeted. Tra queste rientrano octreotide e analoghi della somatostatina per le forme GIP-correlate, agonisti long-acting di GnRH e β -bloccanti rispettivamente nei casi LH/hCG dipendenti e catecolammine-dipendenti e antagonisti del recettore AT-1 della vasopressina quando questo è iperespresso (13,22). In particolare, gli analoghi della somatostatina inibiscono il rilascio postprandiale di GIP, evitando i picchi di cortisolo evidenti nelle forme di FDCCS. La loro attività però non dura a lungo termine, a causa della desensibilizzazione dei recettori della somatostatina sulle cellule duodenali secernenti GIP (10). Anche i β -bloccanti in pazienti con positività al test posturale sono solo parzialmente efficaci, forse per l'impossibilità di usare dosaggi elevati che causerebbero eventi avversi (13,42). In generale, dunque, questi trattamenti hanno un ridotto effetto sostenuto nel tempo per quanto riguarda i parametri biochimici e clinici dei pazienti e la morfologia delle ghiandole surrenaliche; questo suggerisce che ci siano altri meccanismi coinvolti nella patogenesi della PBMAH che potrebbero costituire dei target più efficienti per la terapia (13).

Infine, è fondamentale il trattamento delle comorbidità associate all'ipercortisolismo, per controllare il rischio cardiovascolare che esse determinano.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio si è proposto di valutare le caratteristiche cliniche, biochimiche e genetiche all'interno di una popolazione di pazienti con adenomi surrenalici bilaterali, con particolare attenzione al sottogruppo con diagnosi di PBMAH.

Più nello specifico, è stato effettuato un confronto della presentazione degli adenomi surrenalici bilaterali in questa popolazione, dividendola, in base al fenotipo di secrezione ormonale, in pazienti non secernenti, pazienti affetti da MACS e pazienti con CS florida. A questo scopo sono stati raccolti i dati clinici e di laboratorio di 59 pazienti valutati per incidentalomi surrenalici bilaterali negli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, nel periodo tra gli anni 2010 e 2024.

Un ulteriore obiettivo è stato osservare l'evoluzione nel tempo di ciascuno di questi gruppi divisi per secrezione ormonale, confrontando la loro presentazione iniziale con quella al più recente controllo ambulatoriale disponibile per ogni paziente. La raccolta dei dati ha quindi riguardato visite avvenute tra il 2016 e il 2024.

Ponendo poi l'attenzione sulla PBMAH, ci si è proposto di analizzare le sue differenze cliniche e biochimiche rispetto agli adenomi surrenalici bilaterali. Sono stati inoltre confrontati i vari gruppi divisi per secrezione anche all'interno del gruppo dei pazienti PBMAH.

Infine, è stata effettuata una comparazione della presentazione clinica tra i pazienti con PBMAH e mutazione di ARMC5 e i pazienti con PBMAH wt per questo gene, nell'ottica di valutare una possibile correlazione tra genotipo e fenotipo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello dello studio

Per questo studio, condotto con modalità retrospettiva, è stato applicato un modello osservazionale trasversale per le analisi riguardanti la prima visita, e di coorte per i confronti tra prima e ultima visita.

3.2 Popolazione

In questo studio sono stati considerati 63 pazienti, valutati negli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova tra gennaio 2010 e maggio 2024.

I dati endocrinologici e clinici sono stati raccolti all'interno dello studio osservazionale PITACORA, approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedale-Università di Padova (numero di protocollo AOP3318, registrazione al Comitato Etico 5938-AO-24), e tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato.

Le informazioni raccolte derivano dalle prime e ultime visite di pazienti giunti alla valutazione endocrinologica per riscontro di adenomi surrenalici bilaterali. Più precisamente, le prime visite risalgono all'arco temporale tra il 26/01/2010 e il 05/03/2024; il controllo più recente per ogni paziente seguito al follow-up è stato invece effettuato tra il 26/01/2016 e il 21/05/2024.

In gran parte dei pazienti analizzati le lesioni bilaterali sono state scoperte come incidentalomi, osservati a un precedente imaging eseguito con TC o RM; pochi erano invece i casi di adenomi bilaterali rinvenuti per iniziale sospetto clinico di ipercortisolismo.

I 63 pazienti considerati, che alla prima visita avevano un'età compresa tra i 30 e gli 82 anni, presentavano masse surrenaliche con caratteristiche radiologiche di benignità e avevano già effettuato una valutazione endocrinologica di base tramite misurazione delle metanefrine urinarie, rapporto aldosterone/renina, e 17-idrossiprogesterone, che ha escluso la possibilità di feocromocitoma, masse secernenti aldosterone e iperplasia surrenalica congenita (CAH).

Tra questi sono stati inclusi anche pazienti con storia di noduli surrenalici bilaterali benigni che all'epoca della prima visita erano già stati sottoposti a una surrenectomia monolaterale. In questo caso i dati raccolti riguardano la loro prima visita negli ambulatori, avvenuta dopo la chirurgia.

Nei pazienti con storia di neoplasie pregresse, la possibile natura metastatica delle lesioni surrenaliche è stata esclusa attraverso le caratteristiche benigne all'imaging. L'unico caso considerato di noduli monolaterali multipli è costituito da una diagnosi di PBMAH identificata tramite screening genetico per familiarità, ma non correlata ad altri pazienti dello studio.

Dei 63 pazienti analizzati, 4 sono stati esclusi dallo studio per le seguenti ragioni:

- un caso rientrava nella diagnosi di iperplasia bilaterale micronodulare, non considerata nello studio;
- un caso ha dimostrato un'iperplasia surrenalica ACTH-dipendente;
- due casi sono stati sottoposti a surrenectomia bilaterale prima della prima visita agli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, senza nessun dato clinico o biochimico risalente a prima della chirurgia.

Con questa esclusione, 59 pazienti sono effettivamente stati considerati per l'analisi e di questi 55 sono stati seguiti nel tempo. Due pazienti sono stati persi al follow-up e sono stati raccolti solamente i dati delle loro prime visite; altri due pazienti, uno con prima e ultima visita avvenute a distanza di tre mesi e senza ulteriori dati oltre a quelli della prima visita, e uno con un unico controllo risalente al 2024, sono stati considerati solamente per quanto riguarda la loro presentazione clinica, laboratoristica e genetica iniziale. Per i pazienti seguiti nel tempo, il follow-up è durato da un minimo di 4 mesi a un massimo di 13 anni e 11 mesi, con una mediana di 100 mesi.

3.3 Raccolta dati

La raccolta dati ha riguardato la prima e l'ultima visita di ciascun paziente, permettendo di osservare l'evoluzione della patologia nel tempo.

Nel caso della prima visita sono stati raccolti i dati clinici al primo accesso in ambulatorio che ha definito la diagnosi di masse surrenaliche bilaterali.

Per gli accertamenti di laboratorio sono stati utilizzati i dati riportati alla prima visita o disponibili entro un anno. I diametri delle masse surrenaliche fanno riferimento alla prima TC senza contrasto o RM che ha evidenziato la presenza di noduli surrenalici bilaterali o che ne ha consentito la caratterizzazione dopo un loro iniziale riscontro in ecografia.

Nell'ambito dell'ultima visita si è tenuto conto dei dati clinici e anamnestici rilevati a quest'ultima, mentre i parametri di laboratorio sono stati considerati entro i due anni precedenti, essendo accertamenti che, soprattutto in condizioni di stabilità della patologia, non vengono eseguiti di routine.

3.3.1 Dati clinici e anamnestici

Per quanto riguarda i dati clinici, i parametri valutati sono stati BMI, circonferenza vita e pressione arteriosa, rilevati alla prima e all'ultima visita.

L'ipertensione è stata definita con il riscontro di un valore di pressione sistolica superiore a 140 mmHg o un valore diastolico superiore a 90 mmHg, o sulla base di una terapia anti-ipertensiva già assunta dal paziente che ne normalizzasse i livelli.

Per definire una CS florida sono stati ricercati i segni tipici di CS, quali facies edematosa e arrossata, pelle sottile, facilità agli ematomi, accumulo di grasso sovraclaveare e gibbo, obesità centrale associata a ipotrofia della muscolatura degli arti.

Altri rilievi anamnestici sono la storia di eventi cardiovascolari e neoplasie non correlate alla patologia surrenalica. Gli eventi cardiovascolari considerati sono infarto miocardico, stroke, attacco ischemico transitorio ed embolia polmonare. Sia per gli eventi cardiovascolari che per le neoplasie non legate alla patologia dei surreni, i dati riportati all'ultima visita fanno riferimento solo al periodo intercorso tra questa e la prima valutazione del paziente in ambulatorio, mentre quelli raccolti dalla prima visita sono quelli accaduti precedentemente.

Dal momento che la presenza di meningiomi è di particolare interesse nei pazienti con mutazioni di ARMC5, si è tenuto conto anche del riscontro di questo tipo di tumori benigni, raccolto anamnesticamente o tramite valutazione di un imaging encefalico; i dati riferiti alla prima visita riguardano meningiomi pregressi, quelli all'ultima visita indicano meningiomi riscontrati nel periodo tra il primo e l'ultimo controllo.

Si sono ricercate inoltre condizioni di alterato metabolismo glucidico, dislipidemia e osteoporosi. Le alterazioni del metabolismo glucidico sono state definite sulla base delle raccomandazioni dell'American Diabetes Association (47), dividendo i pazienti tra non diabetici o con lievi alterazioni del glucosio e pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2. Per la valutazione della dislipidemia sono state usate le linee guida ESC/EAS del 2019 (48). Dal punto di vista dell'osteoporosi, i pazienti

sono stati classificati come affetti da osteoporosi quando alla densitometria ossea si è riscontrato un T-score inferiore a -2.5 standard deviation scores (SDS) a livello vertebrale o femorale o con storia di fratture vertebrali (49).

3.3.1 Dati di imaging

Per caratterizzare le masse surrenaliche sono stati considerati i diametri delle lesioni benigne di ciascun surrene, osservati alla prima TC o RM eseguita nell'Azienda Ospedale-Università di Padova o portata in visione dal paziente. Nel caso di più noduli nella stessa ghiandola, si è valutato quello di dimensioni maggiori.

Nei pazienti con surrenectomia monolaterale prima della prima visita, si è tenuto conto solo del diametro delle lesioni del surrene rimanente.

3.3.2 Dati biochimici e analisi genetica

La valutazione dell'ipercortisolismo e del fenotipo ormonale del paziente è stata eseguita tramite la misurazione del cortisolo dopo 1mg di desametasone (1mg DST), dei livelli di cortisolo libero urinario nelle 24 ore (CLU) e della secrezione di cortisolo salivare notturno, alle ore 23 (LNSC).

Il risultato del cortisolo dopo 1mg DST ha consentito di dividere i pazienti in secernenti e non secernenti, escludendo un'ipersecrezione di cortisolo nel caso in cui il livello trovato fosse ≤ 50 nmol/L.

Il LNSC è stato invece considerato entro un range di normalità se compreso tra 0.5 e 2.6 nmol/L.

La concentrazione di CLU è stata divisa in tre classi: CLU in range di normalità, CLU aumentato ma inferiore a due volte il limite superiore di normalità (ULN) e CLU oltre due volte il ULN. Questa distinzione è stata eseguita perché il CLU può risultare lievemente aumentato anche in pazienti con MACS, ma quest'alterazione potrebbe derivare anche da altre condizioni concomitanti e non è veramente significativa (11). Per questo, sulla base degli standard di precisione dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, è stata considerata la soglia di 2 volte il ULN per indicare una concentrazione di CLU francamente alterata.

Con questi parametri, il fenotipo secretorio è stato definito come:

- non secernente, con cortisolo dopo 1 mg DST minore di 50 nmol/L e in assenza di alterazioni di CLU e LNSC e di segni tipici di ipercortisolismo;

- MACS, con cortisolo dopo 1 mg DST ≥ 50 nmol/L e in assenza di alterazioni di LNSC e CLU oltre due volte ULN (*upper limit of normality*) e di segni tipici di ipercortisolismo;
- overt CS, con cortisolo dopo 1mg DST superiore a 50 nmol/L, segni clinici tipici di CS e/o LNSC alterato con UFC due volte sopra il ULN.

È stata inoltre valutata la concentrazione ematica di ACTH al mattino (ore 8), per confermare, soprattutto nei pazienti con overt CS, l'origine surrenalica dell'ipercortisolismo.

Infine, l'analisi genetica per la ricerca di mutazioni di ARMC5 o di altre alterazioni genetiche è stata eseguita su sangue periferico, permettendo di identificare mutazioni presenti nella linea germinale.

3.4 Analisi statistica

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati i programmi SPSS versione 24 ed Excel. Data la distribuzione non normale dei campioni, le variabili quantitative sono state valutate tramite mediana e range interquartile, mentre per le variabili qualitative si sono utilizzate frequenze assolute e percentuali.

I confronti di variabili continue tra i diversi fenotipi di ipercortisolismo e tra adenomi bilaterali e PBMAH sono stati eseguiti con il test di Mann-Whitney, mentre per quelle qualitative si è usato il test chi quadrato, corretto per il test esatto di Fisher quando appropriato. I confronti tra la prima visita e l'ultimo controllo sono invece stati effettuati con il test di Wilcoxon per variabili continue e quello di McNemar per variabili nominali. I valori di p sono stati considerati statisticamente significativi quando minori di 0.05.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione

4.1.1 Caratteristiche alla prima visita

Alla prima visita i pazienti, 24 maschi (41%) e 35 femmine (59%), avevano un'età mediana di 65 anni (range interquartile 56-71). Dal punto di vista della patologia surrenalica, 43 di questi (73%) presentavano adenomi surrenalici bilaterali, mentre 16 hanno avuto una diagnosi di PBMAH (27%).

L'intero campione è stato suddiviso poi a seconda del fenotipo della secrezione di cortisolo in pazienti con adenomi non secernenti, pazienti con MACS e overt CS:

- 19 pazienti avevano adenomi non secernenti (32%);
- 35 sono stati classificati come MACS (59%);
- 5 avevano caratteristiche di overt CS (9%).

Il diametro mediano totale delle lesioni surrenaliche maggiori di ciascuna ghiandola era di 3.7 cm (2.5-5.2).

Solo un paziente era in terapia medica per l'ipercortisolismo (2%), mentre 3 erano stati sottoposti a surrenectomia monolaterale prima della prima visita (5%).

Dal punto di vista biochimico, i valori ormonali mediani erano 71.5 nmol/L (42.5-149.0) per il cortisolo dopo 1 mg DST, 8.8 ng/L (5.0-16.8) per l'ACTH e 2.2 nmol/L (1.4-3.1) per LNCS.

Inoltre, su 57 pazienti, 47 avevano una concentrazione di CLU entro i limiti di normalità (83%), 7 pazienti (12%) avevano un CLU elevato ma non maggiore di due volte il limite superiore di normalità (ULN) e in 3 risultava oltre due volte l'ULN (5%).

Per quanto riguarda le comorbidità associate all'ipercortisolismo:

- l'ipertensione è stata riscontrata in 47/56 (84%);
- il diabete mellito di tipo 2 era presente in 12/54 (22%);
- 38/51 erano dislipidemici (75%);
- 11/58 (19%) avevano caratteristiche densitometriche o fratture indicative di osteoporosi.

La mediana del loro BMI era 28.1 kg/m² (25.0-32.0), quella della circonferenza vita 100.5 cm (90.0-106.8).

Su 58 pazienti, 15 (26%) avevano una storia di neoplasie maligne pregresse, non correlate alle lesioni surrenaliche. È stata ricercata anche la presenza di meningiomi, che sono stati rinvenuti in 4/58 (7%).

4.1.2 Caratterizzazione genetica

Nel corso delle indagini di approfondimento degli adenomi corticosurrenali bilaterali, in 28/59 (48%) è stata eseguita la ricerca specifica per alterazioni genetiche del gene ARMC5; 13 di questi erano classificati come adenomi bilaterali (46%) e 15 come PBMAH (54%). In 6 pazienti (10%), di cui uno rientrante anche nei 28 precedenti, si sono analizzati altri geni correlati allo sviluppo di PBMAH, quali KDM1A, MEN1 e APC.

Facendo riferimento al totale dei 59 pazienti, si è osservato che:

- in 29/59 casi l'analisi non era stata effettuata o il risultato non era disponibile (49%);
- 17/59 pazienti erano wild type (29%);
- 6/59 pazienti avevano una mutazione patogenetica di ARMC5 (10%);
- 1 caso mostrava una variante di ARMC5 il cui significato patogenetico non è ancora noto;
- 6/59 pazienti (10%) erano invece portatori di altre mutazioni associate a PBMAH: in particolare, un paziente era affetto da FAP con mutazione nota del gene APC, in altri due casi era già stata riscontrata un'alterazione di MEN1 determinante l'omonima sindrome ed gli altri tre soggetti erano portatori di mutazioni del gene KDM1A.

Ai fini dell'analisi successiva, la variante di significato incerto, in relazione alla sua presentazione clinica e biochimica non indicativa di ipercortisolismo, è stata considerata come non patogenetica, e dunque wild type. Lo stesso si è fatto per le mutazioni di KDM1A che, come noto dalla letteratura, non sono mai state riscontrate in concomitanza con varianti patogenetiche di ARMC5, e per il paziente con FAP, in cui la ricerca di alterazioni di ARMC5 aveva dato risultato negativo.

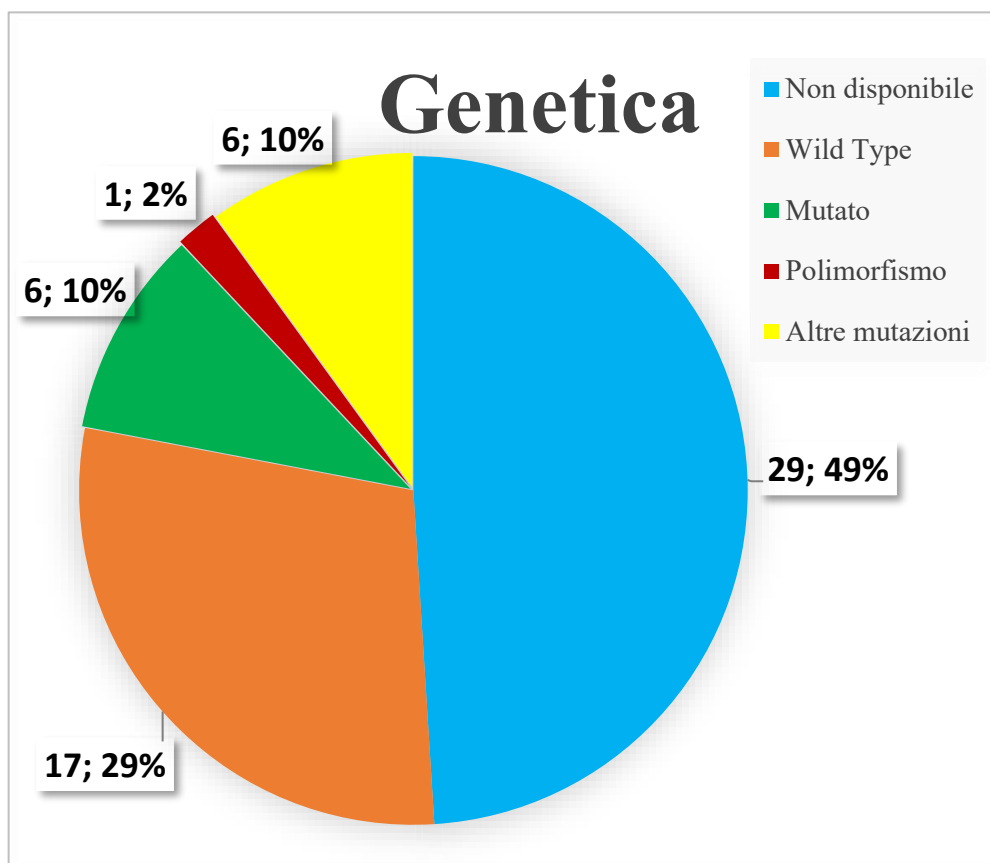


Figura 1: Risultati dell'analisi genetica nell'intera popolazione

Con queste considerazioni si è arrivati a distinguere 22/28 pazienti con genetica nota che erano wild type per ARMC5 (79%) e 6 casi mutati (21%). Nessun paziente con adenomi bilaterali presentava mutazioni patogenetiche di questo gene, che sono invece state riscontrate solamente in pazienti con PBMAH.

4.1.3 Caratteristiche all'ultima visita

Dei 59 pazienti analizzati, 55 sono stati seguiti nel tempo e si è potuta osservare la loro evoluzione. Il loro follow-up mediano è stato di 100 mesi.

Durante il follow-up, 5 pazienti (9.2%) hanno intrapreso una terapia medica per l'ipercortisolismo e altri 5 (9%) sono stati sottoposti a trattamento chirurgico, di cui 2 (4%) a una prima surrenectomia monolaterale e a una seconda di completamento, entrambe avvenute nel periodo tra la prima e l'ultima visita: si trattava di un caso di overt CS e un caso di MACS. Nessuno dei pazienti che avevano già subito una surrenectomia monolaterale prima della prima visita ha fatto una seconda operazione.

Dal punto di vista dell'ipercortisolismo, il fenotipo secretorio rispetto alla prima visita è cambiato in 5 pazienti (9%); più nello specifico si tratta di:

- due casi sottoposti a due surrenectomie monolaterali successive che sono diventati non secernenti;
- un caso di iniziale MACS che all'ultima visita mostrava livelli di cortisolo dopo desametasone nella norma;
- due pazienti con pregressa surrenectomia monolaterale e iniziale remissione dell'ipercortisolismo che nel tempo sono tornati MACS.

Alla luce di questo, dunque, all'ultimo controllo 20 pazienti si presentavano come adenomi non secernenti (36%), 32 come MACS (58%) e 3 come overt CS (6%).

La somma dei diametri dei noduli maggiori per ciascuna ghiandola aveva una mediana di 3.5 (2.8-5.2), valutata nei 52 pazienti in cui la misura era disponibile.

Per quanto riguarda i test biochimici di laboratorio, all'ultima visita il cortisolo dopo 1 mg DST aveva una mediana di 73 nmol/L (44-146), l'ACTH di 9.9 ng/L (5.9-14.4) e il LNSC di 1.6 nmol/L (1.2-2.3). Questi valori sono stati calcolati rispettivamente su 43, 42 e 33 pazienti del totale.

Su 48 pazienti di cui il CLU era disponibile, 46 rientravano nell'intervallo di normalità e 2 avevano un aumento che non superava di due volte il ULN, costituendo rispettivamente il 95.8% e il 4.2%. Nessun paziente mostrava un CLU superiore a due volte il ULN (cut-off che consideriamo clinicamente per escludere una forma florida di ipercortisolismo).

Il BMI mediano, calcolato per 24 pazienti era di 27.1 kg/m² (22.5-32.6), con una circonferenza vita misurata in 12 pazienti di 101.0 cm (87.8-105.8).

Dal punto di vista delle complicanze associate all'ipercortisolismo, all'ultima visita:

- 46 pazienti su 54 mostravano ipertensione (85%);
- 15 pazienti su 52 avevano una diagnosi di diabete (29%);
- 40 pazienti su 51 presentavano dislipidemia (78%);
- 11 pazienti su 54 erano affetti da osteoporosi (20%).

Su 54 pazienti, 6 hanno avuto un evento cardiovascolare (11%) durante il loro periodo di osservazione; nello stesso lasso di tempo 7 su 55 hanno sviluppato nuove neoplasie (12%) e in 2 è stato riscontrato un nuovo meningioma (4%).

4.2 Analisi dei fenotipi secretori

4.2.1 Comparazione tra fenotipi secretori

Come detto precedentemente, i 59 pazienti totali sono stati divisi in 19 pazienti con adenomi non secernenti (32%), 35 con ipercortisolismo lieve, cioè MACS (59%) e 5 con overt CS (9%).

La somma dei diametri delle due lesioni maggiori, una per ogni lato, è stata calcolata in tutti i pazienti. Dal punto di vista dei dosaggi ormonali:

- 54 pazienti hanno effettuato il dosaggio del cortisolo dopo 1 mg DST, in particolare 17 con adenomi non secernenti (32%), 34 MACS (63%) e 3 con overt CS (5%);
- il LNSC è stato misurato in 25 pazienti, di cui 5 con adenomi non secernenti (20%), 16 MACS (64%) e 4 con overt CS (16%);
- l'ACTH è stato rilevato in 54 pazienti, più precisamente 15 con adenomi non secernenti (28%), 34 MACS (63%) e 5 con overt CS (9%).

In 31 pazienti è stato calcolato il BMI; 11 di questi pazienti avevano adenomi non secernenti (35%), 17 erano MACS (55%) e 3 mostravano overt CS (10%).

La circonferenza vita è stata rilevata in 28 casi, ossia 7 non secernenti (25%), 17 MACS (61%) e 4 overt CS (14%).

Non sono infine stati riscontrati eventi cardiovascolari nel gruppo di pazienti non secernenti e nei pazienti con overt CS.

Le caratteristiche ottenute in ogni gruppo sono mostrate dalla Tabella III, riportata a pagina seguente.

Adenomi surrenalici bilaterali			
	Non secernenti (19)	MACS (35)	Overt CS (5)
Età, anni	65 (61-73) ^{b, c}	68 (57-71)	40 (36-57)
Genere, % (n)	M 47% (9/19) F 53% (10/19)	M 40% (14/35) F 60% (21/35)	M 20% (1/5) F 80% (4/5)
PBMAH, % (n)	16% (3/19) ^{b, c}	26% (9/35)	80% (4/5)
Mutazione ARMC5, % (n)	0% (0/4)	21% (4/19)	40% (2/5)
Diametro totale, cm	3 (2.1-4) ^{a, b, c}	4.1 (2.7-5.2)	5.7 (5.25-7.65)
BMI, kg/m ²	29 (26.9-31.4)	27 (23.3-31.15)	32 (26.3-32)
Circonferenza vita, cm	103 (95-114)	99 (83.5-106.5)	97 (90 -115.25)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	37 (25-42) ^{a, c}	113.5 (67.5-160.75)	209.6 (77-209.6)
ACTH, ng/L	19 (10.0-26.0) ^{a, b, c}	8 (5-15)	5 (2.7-5)
LNSC, nmol/L	1.9 (0.9-2.4) ^b	2 (1.3-2.9)	6.2 (2.7-10.3)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	0% (0/18) ^{b, c}	0% (0/34)	60% (3/5)
Ipertensione, % (n)	83% (15/18)	85% (28/33)	80% (4/5)
Diabete mellito, % (n)	18% (3/17)	21% (7/33)	50% (2/4)
Dislipidemia % (n)	83% (15/18)	69% (20/29)	75% (3/4)
Osteoporosi, % (n)	0% (0/19)	29% (10/34)	20% (1/5)
Eventi Cardiovascolari, % (n)	0% (0/19)	12% (4/34)	0% (0/5)
Neoplasie pregresse, % (n)	26% (5/19)	26% (9/34)	7% (1/5)

Tabella III: Caratteristiche alla prima visita divise per fenotipo secretorio
I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio)

^a p<0.05 NS vs MACS

^b p<0.05 MACS vs overt CS

^c p<0.05 NS vs overt CS

Si può osservare che l'età dei pazienti alla prima visita risulta più bassa nei pazienti con overt CS sia rispetto ai pazienti senza secrezione autonoma di cortisolo (p=0.004), sia rispetto ai pazienti con MACS (p=0.006). I pazienti con adenomi non secernenti e i MACS invece non mostrano una diversità evidente in quest'ambito.

Inoltre, la PBMAH è stata diagnosticata con maggior frequenza nei pazienti con fenotipo di overt CS, sia rispetto ai pazienti con MACS ($p=0.031$), sia rispetto ai non secernenti ($p=0.014$).

La mutazione di ARMC5 non è stata riscontrata in nessun paziente senza secrezione autonoma di cortisolo, ma questo non ha costituito una differenza veramente significativa tra i vari gruppi.

Il diametro totale dei noduli maggiori, invece, si è mostrato più elevato sia nei pazienti con MACS rispetto ai non secernenti ($p=0.027$), sia pazienti con overt CS rispetto a quelli con MACS ($p=0.016$); inoltre, il diametro medio dei noduli dei pazienti senza secrezione autonoma di cortisolo era minore rispetto a quello dei pazienti con overt CS ($p=0.002$).

Per quanto riguarda il profilo ormonale:

- il cortisolo dopo 1 mg DST è risultato meno soppresso più elevato nei MACS rispetto ai non secernenti ($p=0.000$) e nei pazienti con overt CS rispetto ai pazienti con adenomi non secernenti ($p=0.007$), senza differenze rilevanti tra MACS e overt CS;
- negli overt CS il LNSC si è dimostrato più elevato rispetto ai MACS ($p=0.026$);
- il CLU era aumentato oltre 2 volte ULN più frequentemente negli overt CS, sia rispetto ai MACS ($p=0.001$), sia rispetto ai non secernenti ($p=0.006$);
- l'ACTH aveva livelli più bassi sia nei MACS rispetto ai non secernenti ($p=0.007$), sia negli overt CS sia rispetto ai pazienti con adenomi non secernenti ($p=0.001$). La sua soppressione era maggiore anche negli overt CS quando confrontati con i pazienti con MACS ($p=0.011$).

4.2.2 Confronto tra prima e ultima visita per fenotipi di secrezione

Dopo aver osservato le differenze o meno tra i fenotipi secretori alla prima visita, si è proceduto per ciascun gruppo a valutare la sua evoluzione nel tempo, comparandone le caratteristiche tra il primo e l'ultimo controllo ambulatoriale.

Pazienti con adenomi non secernenti

I pazienti con adenomi non secernenti alla prima visita erano 19 e tutti hanno avuto un follow-up nel tempo; due di questi avevano subito una surrenectomia

monolaterale precedente alla prima visita, mentre nessuno era già in trattamento farmacologico.

La somma dei diametri dei noduli è stata calcolata in tutti i pazienti alla prima visita e 18 all'ultima; il BMI si è ottenuto inizialmente in 11 pazienti e in 8 all'ultimo controllo, mentre la circonferenza vita è stata valutata in 7 pazienti all'inizio e 3 all'ultima visita.

Per quanto riguarda la secrezione ormonale, 17 pazienti avevano una misurazione di cortisolo dopo 1mg DST alla prima visita e 12 all'ultima. L'ACTH invece è stato valutato in 15 e 12 pazienti rispettivamente all'inizio e alla visita più recente del follow-up, mentre il LNSC aveva 5 misurazioni sia alla prima che all'ultima visita. I risultati ottenuti sono dunque riassunti in Tabella IV.

Adenomi non secernenti (follow-up mediano 104 mesi)		
	Prima visita (19)	Ultima visita (19)
Surrenectomia, % (n)	11% (2/19)	0% (0/19)
Terapia medica, % (n)	0% (0/19)	0% (0/19)
Diametro totale, cm	3 (2.1-4)	3.1 (2.7-3.8)
BMI, kg/m ²	29 (26.9-31.4)	30.35 (22.75-33.5)
Circonferenza vita, cm	103 (95-114)	106 (105-)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	37 (27.0-42.0) ^a	37.5 (26.0-43.3)
ACTH, ng/L	19 (10-26)	12.65 (8.125-20.25)
LNSC, nmol/L	1.9 (0.9-2.4)	1.1 (0.8-1.7)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	0% (0/18)	0% (0/15)
Ipertensione, % (n)	83% (15/18)	83% (15/18)
Diabete mellito, % (n)	19% (3/16)	32% (6/19)
Dislipidemia, % (n)	83% (15/18)	78% (14/18)
Eventi cardiovascolari, % (n)	0.0% (0/19)	5% (1/19)
Osteoporosi, % (n)	0.0% (0/19)	11% (2/19)
Neoplasie, % (n)	26% (5/19)	11% (2/19)

Tabella IV: Caratteristiche degli adenomi non secernenti in prima e ultima visita

I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio).

^a $p < 0.05$ Prima visita vs Ultima visita

L'unica diversità significativa si è osservata nei livelli di cortisolo dopo 1 mg DST, il cui aumento lieve nel corso del follow-up è però rilevante ($p = 0.038$).

Pazienti con MACS

Dei 35 pazienti inizialmente classificati come MACS, 32 sono stati seguiti nel tempo.

Tra questi, 3 sono andati incontro a surrenectomia e 3 a terapia medica per l'ipercortisolismo nel periodo tra il primo e l'ultimo controllo ambulatoriale.

Il diametro dei noduli era disponibile all'ultima visita in 31 pazienti: uno di questi nel tempo ha subito due surrenectomie monolaterali successive.

Il BMI e la circonferenza vita sono stati ottenuti in 17 pazienti alla prima visita e rispettivamente in 14 e 8 all'ultima.

Sul versante ormonale:

- il cortisolo dopo 1 mg DST è stato rilevato in 34 pazienti all'inizio e 30 al follow-up;
- 16 pazienti hanno avuto una misurazione del LNSC alla prima visita e 25 all'ultima;
- l'ACTH disponeva di un dosaggio al primo controllo in 34 pazienti, e in 27 all'ultimo.

Il confronto tra le caratteristiche dei pazienti con MACS è riportato in Tabella V riportata a pagina seguente.

MACS (follow-up mediano di 101 mesi)		
	Prima visita (35)	Ultima visita (32)
Surrenectomia, % (n)	0% (0/35)	9% (3/32)
Terapia medica, % (n)	0% (0/35)	9% (3/32)
Diametro totale, cm	4.1 (2.7-5.2)	4.1 (2.8-5.2)
BMI, kg/m ²	27.4 (23.3-31.2)	26.3 (22.2-31.7)
Circonferenza vita, cm	99 (83.5-106.5)	96.5 (85-103)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	113.5 (67.5-160.8)	79 (64.5-187.5)
ACTH, ng/L	8 (5-15)	9.6 (4.5-14.2)
LNSC, nmol/L	2 (1.4-2.9)	1.6 (1.4-2.5)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	0% (0/34)	0% (0/31)
Ipertensione, % (n)	85% (28/33)	88% (28/32)
Diabete mellito, % (n)	22% (7/32)	24% (7/29)
Dislipidemia, % (n)	69% (20/29)	79% (23/29)
Eventi cardiovascolari, % (n)	12% (4/34)	16% (5/31)
Osteoporosi, % (n)	29% (10/34)	29% (9/31)
Neoplasie, % (n)	27% (9/34)	16% (5/32)

Tabella V: Caratteristiche dei pazienti con MACS in prima e ultima visita
I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio).

In questo caso, è possibile notare che l'analisi non ha mostrato nessun cambiamento veramente rilevante nel corso del tempo nei pazienti con lesioni bilaterali e MACS: le variazioni presenti tra la prima e l'ultima visita non sono infatti statisticamente significative.

Overt CS

5 pazienti erano stati classificati come affetti da overt CS alla prima visita; per 4 di loro (80%) l'osservazione è proseguita nel tempo.

Uno di questi pazienti aveva subito una surrenectomia monolaterale prima della prima visita e altri due pazienti diversi sono stati sottoposti rispettivamente a una

surrenectomia monolaterale e a due surrenectomie monolaterali consecutive nel corso del follow-up. Il diametro totale dei noduli all'ultima visita è dunque stato valutato in 3 pazienti.

Allo stesso modo, un paziente era in trattamento medico per l'ipercortisolismo all'epoca della prima visita, mentre due l'hanno cominciato successivamente. Il soggetto trattato farmacologicamente alla prima visita è lo stesso sottoposto poi a chirurgia monolaterale nel periodo di osservazione.

Il BMI è stato calcolato in 3 pazienti alla prima visita e 2 all'ultima, mentre per la circonferenza vita erano disponibili i dati di 4 pazienti all'inizio e 1 nel corso del follow-up. Per questo motivo il valore riportato in Tabella VI è l'unico presente.

Riguardo ai dosaggi ormonali:

- il cortisolo dopo 1mg DST è stato eseguito in 3 pazienti alla prima visita e solo 1 all'ultima, dunque in questo caso in Tabella VI è riportato l'unico valore disponibile;
- il dato dell'ACTH è stato raccolto inizialmente in 5 pazienti e in 3 all'ultimo controllo;
- il LNSC è stato valutato in 4 pazienti alla prima visita e in 3 all'ultima.

La Tabella VI sottostante riporta i risultati dell'analisi dei pazienti con CS florida, in cui non sono state evidenziate significative differenze nel gruppo dei pazienti al passare del tempo.

Overt CS (follow-up mediano di 21 Mesi)		
	Prima visita (5)	Ultima visita (4)
Surrenectomia, % (n)	20.0% (1/5)	50.0% (2/4)
Terapia medica, % (n)	20.0% (1/5)	50.0% (2/4)
Diametro totale, cm	5.7 (5.25-7.65)	5.6 (5-5.6)
BMI, kg/m ²	32 (26.3-32)	25.5 (22.8-25.5)
Circonferenza vita, cm	97 (90 -115.25)	102
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	209.6 (77-209.6)	171
ACTH, ng/L	5 (2.7-5)	4.3 (3.1-4.3)
LNSC, nmol/L	6.2 (2.75-10.32)	1 (0.8-1)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	60.0% (3/5)	0.0% (0/3)
Ipertensione, % (n)	80.0% (4/5)	75.0% (3/4)
Diabete mellito, % (n)	50.0% (2/4)	50.0% (2/4)
Dislipidemia, % (n)	75.0% (3/4)	75.0% (3/4)
Eventi cardiovascolari, % (n)	0.0% (0/5)	0.0% (0/4)
Osteoporosi. % (n)	20.0% (1/5)	0.0% (0/4)
Neoplasie, % (n)	20.0% (1/5)	0.0% (0/4)

Tabella VI: Caratteristiche dei pazienti con overt CS in prima e ultima visita
I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio).

4.3 Valutazione della PBMAH

4.3.1 Confronto tra adenomi bilaterali e PBMAH

All'interno del campione di 59 pazienti, 43 sono stati classificati come adenomi surrenalici bilaterali e 16 come PBMAH, questi ultimi con diagnosi effettuata in presenza di surreni complessivamente ingranditi e lesioni bilaterali multiple con diametro superiore a 1 cm.

L'analisi genetica specifica per ARMC5 è stata condotta in 28 pazienti, di cui 13 con adenomi bilaterali e 15 con PBMAH.

Tra le caratteristiche cliniche, il BMI è stato calcolato in 21 pazienti con adenomi bilaterali e 10 con PBMAH, per un totale di 31 pazienti (53%), mentre il dato della circonferenza vita era disponibile in 28 casi (47%), di cui 18 adenomi bilaterali e 10 PBMAH.

Il diametro delle lesioni, costituito dalla somma delle due lesioni maggiori, una per ogni lato, è stato invece ricavato in tutti i pazienti.

Per la ricerca biochimica dell'ipercortisolismo, allo scopo di definire anche il fenotipo di secrezione di cortisolo e la soppressione dell'ACTH:

- 54 pazienti su 59 hanno eseguito la misurazione di cortisolo dopo 1 mg DST, 40 con adenomi bilaterali (74%) e 14 con PBMAH (26%). Questo ha permesso la suddivisione tra non secernenti, con valori di DST inferiori a 50 nmol/L, e secernenti (MACS e overt CS);
- in 25 pazienti si è misurato il LNSC, tra cui 17 con adenomi bilaterali (68%) e 8 con PBMAH (32%);
- l'ACTH è stato testato in 54 soggetti, 38 con adenomi bilaterali (70%) e 16 con PBMAH (30%).

La Tabella VII mostra le caratteristiche di ciascuno dei due gruppi e le comparazioni tra i due.

Confronto tra adenomi bilaterali e PBMAH		
	Adenomi bilaterali (43)	PBMAH (16)
Età, anni	66 (63-72)	56.5 (40-69)
Genere, M % (n)	47% (20/43)	25% (4/16)
F % (n)	53% (23/43)	75% (12/16)
Mutazione ARMC5, % (n)	0% (0/13) ^a	40% (6/15)
Fenotipo secretorio non secernente, % (n)	37% (16/43)	19% (3/16)
MACS, % (n)	61% (26/43)	56% (9/16)
Overt CS, % (n)	2. (1/43) ^{b, c}	25% (4/16)
Surrenectomia monolaterale, % (n)	0% (0/43) ^a	19% (3/16)
Terapia medica, % (n)	0% (0/43)	6% (1/16)
Diametro totale, cm	3.5 (2.5-5)	4.8 (2.525-5.7)
BMI, kg/m ²	28.1 (23.85-29.75)	31.2 (26.975-36.6)
Circonferenza vita, cm	98 (84.25-108.75)	102.5 (90.75-108.75)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	61.5 (40.25-115.75) ^a	149 (63-265)
ACTH, ng/L	10.5 (6.5-19)	5.5 (4.25-13.75)
LNSC, nmol/L	1.8 (1.2-2.35) ^a	3.665 (2.825-6.5)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	0.0% (0/41) ^a	18.8% (3/16)
Ipertensione, % (n)	83% (33/40)	88% (14/16)
Diabete mellito, % (n)	20% (8/40)	33% (4/14)
Dislipidemia % (n)	76% (29/38)	69% (9/13)
Osteoporosi, % (n)	17% (7/42)	25% (4/16)
Eventi CV, % (n)	10% (4/42)	0% (0/16)
Neoplasie pregresse, % (n)	28.6% (12/42)	18.8% (3/16)
Meningiomi, % (n)	5% (2/42)	13% (2/16)

Tabella VII: Caratteristiche alla prima visita divise per patologia surrenalica
I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio)

^a p<0.05 Adenomi bilaterali vs PBMAH

^b p<0.05 Adenomi bilaterali vs PBMAH per Non secernenti vs Overt CS

^c p<0.05 Adenomi bilaterali vs PBMAH per MACS vs Overt CS

Come si può notare, l'età mostrata alla prima visita per i pazienti con PBMAH era significativamente più bassa che in coloro che avevano adenomi bilaterali (p=0.024).

La prevalenza della mutazione di ARMC5 ha mostrato una differenza significativa tra adenomi bilaterali e PBMAH, con maggiore riscontro di alterazioni genetiche in

quest'ultima patologia ($p=0.018$). La stessa situazione si osserva per l'esecuzione di una surrenectomia monolaterale, che è stata eseguita più frequentemente nei casi di PBMAH ($p=0.017$) e livelli di CLU oltre due volte il limite superiore di normalità (ULN) ($p=0.019$). Anche il cortisolo dopo 1 mg DST e il LNSC sono risultati più elevati nella PBMAH (rispettivamente, $p=0.011$ e $p=0.004$).

Altra differenza, già osservata precedentemente, si è mostrata nel fenotipo di secrezione di cortisolo: nei pazienti con PBMAH la frequenza di overt CS è risultata significativamente più elevata rispetto alla sua prevalenza negli adenomi bilaterali, sia quando confrontata con la MACS nelle due patologie ($p=0.031$), sia quando comparata con il fenotipo non secernente ($p=0.014$).

4.3.2 Confronto tra fenotipi di secrezione di cortisolo nella PBMAH

I 16 pazienti con PBMAH sono stati poi divisi a seconda del fenotipo di secrezione del cortisolo in 3 pazienti con PBMAH non secernente (19%), 9 MACS (56%) e 4 overt CS (25%).

Si è osservato che 2 pazienti su 3 identificati come PBMAH non secernente alla prima visita avevano subito una pregressa surrenectomia monolaterale.

Gli eventi cardiovascolari invece non sono stati valutati, in quanto assenti nel gruppo di pazienti affetti da PBMAH.

Per quanto riguarda la valutazione della secrezione ormonale:

- la misurazione del cortisolo dopo 1 mg DST è stata eseguita in 14 pazienti, in particolare in tutti i soggetti con PBMAH non secernente e i MACS e in 2 pazienti con overt CS;
- l'ACTH è stato valutato in tutti i pazienti con PBMAH;
- Il LNSC non era disponibile in nessun paziente senza secrezione autonoma di cortisolo, mentre la misurazione è stata eseguita in 5 pazienti con MACS e 3 con overt CS.

Il BMI è stato calcolato in 2 pazienti con PBMAH non secernente, 6 con MACS e 2 con overt CS. Per quanto riguarda la circonferenza vita, la sua misura è stata raccolta solo in 1 paziente con PBMAH non secernente, 6 pazienti con MACS e 2 con overt CS.

PBMAH			
	Non secernenti (3)	MACS (9)	Overt CS (4)
Età, anni	61 (41-61) ^b	65 (48-69.5)	39 (35-50.5)
Genere M, % (n)	0% (0/3)	33% (3/9)	25% (1/4)
F, % (n)	100% (3/3)	67% (6/9)	75.0% (3/4)
Mutazione ARMC5, % (n)	0.0% (0/3)	44% (4/9)	50% (2/4)
Terapia medica, % (n)	0% (0/3)	0% (0/9)	25% (1/4)
Pregressa surrenectomia, % (n)	67% (2/3) ^a	0% (0/9)	25% (1/4)
Diametro totale, cm	1.9 (1.4-1.9)	4.6 (2.65-5.55)	6.25 (5.175-8.075)
BMI, kg/m ²	28.8 (27.2-28.8)	34.45 (26.45-39.45)	29.15 (26.3-29.15)
Circonferenza vita, cm	105	103.5 (95.5-123.0)	90.0 (90.0-90.0)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	38 (28-38) ^a	149 (107-290)	366.8 (209.6-306.8)
ACTH, ng/L	20.0 (9.0-20) ^c	6.0 (3.85-12.5)	5.0 (2.675-5)
LNSC, nmol/L	- ^b	3.2 (1.7-3.665)	6.8 (5.6-6.8)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	0% (0/3) ^b	0% (0/9)	75% (3/4)
Iperensione, % (n)	100% (3/3)	89% (8/9)	75% (3/4)
Diabete mellito, % (n)	0% (0/3)	38% (3/8)	33% (1/3)
Dislipidemia % (n)	100% (3/3)	57% (4/7)	67% (2/3)
Osteoporosi, % (n)	0.0% (0/3)	33% (3/9)	25% (1/4)
Neoplasie pregresse, % (n)	0% (0/3)	22% (2/9)	25% (1/4)

Tabella VIII: Caratteristiche alla prima visita divise per fenotipo secretorio

I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio)

^a p<0.05 NS vs MACS

^b p<0.05 MACS vs overt CS

^c p<0.05 NS vs overt CS

La Tabella VIII mostra che alla prima visita i pazienti con PBMAH e overt CS risultavano più giovani rispetto ai PBMAH con MACS (p=0.037).

La storia di pregressa surrenectomia monolaterale appare inoltre più comune nei pazienti con PBMAH che alla prima visita non presentavano ipersecrezione di cortisolo rispetto a quelli classificati come MACS (66.7% vs 0.0%, p=0.045).

La somma dei diametri delle lesioni maggiori è risultata più elevata nei pazienti con PBMAH e overt CS rispetto a coloro che avevano PBMAH senza ipersecrezione di cortisolo ($p=0.034$).

Infine, nell'ambito della secrezione ormonale:

- il cortisolo dopo 1 mg DST era più alto nei PBMAH MACS rispetto ai PBMAH non secernenti ($p=0.012$);
- i pazienti PBMAH con overt CS presentavano una concentrazione di LNSC superiore ai PBMAH MACS ($p=0.028$);
- livelli di CLU sopra le due volte ULN sono stati riscontrati più frequentemente nei pazienti con PBMAH e overt CS rispetto ai PBMAH con MACS ($p=0.014$);
- l'ACTH ha mostrato valori più elevati nei pazienti con PBMAH e overt CS rispetto ai PBMAH non secernenti ($p=0.028$).

4.3.3 Confronto tra ARMC5 mutati e wild type

Dei 16 pazienti con PBMAH, 15 avevano eseguito l'analisi genetica per la ricerca di mutazioni di ARMC5; 9 (60%) sono risultati privi di una mutazione patogenetica e sono stati definiti wild type, 6 (40%) hanno mostrato invece un'alterazione di questo gene associata con lo sviluppo di PBMAH.

Dal punto di vista ormonale, la misura del cortisolo dopo 1 mg DST era disponibile in 13 pazienti, di cui 8 wild type (62%) e 5 con mutazione patogenetica di ARMC5 (38%). Il LNSC invece è stato eseguito in 8 pazienti in totale (53.3%), di cui 3 senza mutazione (38%) e 5 mutati (62%).

Inoltre, la rilevazione e il calcolo di circonferenza vita e BMI sono stati eseguiti in 9 pazienti (60%), più precisamente 6 wild type (67%) e 3 mutati (33%).

La Tabella IX seguente riporta i risultati ottenuti.

Mutazioni di ARMC5 in PBMAH		
	ARMC5 Wild type (9)	ARMC5 Mut (6)
Età, anni	57 (40.5-67)	47 (37.5-69.75)
Genere, M % (n)	22% (2/9)	33% (2/6)
F % (n)	78% (7/9)	67% (4/6)
Fenotipo secretorio non secernente, % (n)	22% (2/9)	0% (0/6)
MACS, % (n)	56% (5/9)	67% (4/6)
Overt CS, % (n)	22% (2/9)	33% (2/6)
Pregressa surrenectomia, % (n)	22% (2/9)	17% (1/6)
Terapia medica, % (n)	0% (0/9)	17% (1/6)
Diametro totale, cm	5.2 (2.15-6.35)	4.8 (3.375-5.7)
BMI, kg/m ²	31.65 (27.05-36.6)	32 (23.9-32)
Circonferenza vita, cm	96.5 (90-108.75)	104 (97-104)
Cortisolo dopo 1 mg DST, nmol/L	107 (53-170) ^a	340 (194-475)
ACTH, ng/L	10.0 (5.0-24.5) ^a	4.35 (2.5-5.5)
LNSC, nmol/L	4.02 (0.7- 4.02)	3.29 (2.95-8.55)
CLU oltre 2 volte ULN, % (n)	22.2% (2/9)	16.7% (1/6)
Ipertensione, % (n)	89% (8/9)	83% (5/6)
Diabete mellito, % (n)	13% (1/8)	60% (2/5)
Dislipidemia % (n)	63% (5/8)	75% (3/4)
Osteoporosi, % (n)	22% (2/9)	33% (2/6)
Neoplasie pregresse, % (n)	22% (2/9)	17% (1/6)
Meningiomi, % (n)	11% (1/9)	17% (1/6)

Tabella IX: Caratteristiche dei pazienti con PBMAH divisi per mutazione di ARMC5
I valori sono espressi in mediana (range interquartile) o percentuali (numero di pazienti/totale pazienti con quel fenotipo secretorio). Dove i pazienti analizzati erano <4, è stata riportata solo la mediana con il primo quartile.

^a p<0.05 Wild type vs Mutati

È possibile notare che le differenze più rilevanti si riscontrano nei livelli di cortisolo dopo 1 mg di desametasone e in quelli di ACTH: il cortisolo dopo 1 mg di

desametasone è decisamente più elevato nei pazienti con mutazione rispetto ai wild type ($p=0.010$) e l'ACTH mostra una soppressione maggiore in presenza di un'alterazione patogenetica di ARMC5 ($p=0.024$).

4.4 Famiglie con mutazione di ARMC5

Le mutazioni patogenetiche germinali di ARMC5, pur essendo riscontrate in casi di PBMAH sporadica al di fuori di presentazioni sindromiche, sono frequenti anche in gruppi familiari: accade spesso che, dopo aver trovato la mutazione in un primo paziente con PBMAH apparentemente sporadica, effettuando l'analisi genetica e lo screening per l'ipercortisolismo nei familiari si possano diagnosticare altri casi di PBMAH, spesso subclinica o senza secrezione autonoma di cortisolo, all'interno del cluster familiare.

Tramite i controlli endocrinologici ambulatoriali presso l'Azienda Ospedale-Università di Padova, sono state recentemente identificate cinque famiglie con queste caratteristiche, che sono al momento in corso di studio dal punto di vista clinico, radiologico, genetico e biochimico.

4.4.1 Famiglia A

Nella famiglia A, il primo individuo studiato, affetto da PBMAH e con nota mutazione di ARMC5, ha subito una surrenectomia bilaterale alla fine degli anni '90. Delle sue due figlie, una è wild type per alterazioni di ARMC5 e gli accertamenti biochimici eseguiti per valutare una possibile secrezione autonoma di cortisolo sono risultati negativi. Nella seconda, invece, è stata rinvenuta la stessa mutazione germinale del padre, che lei a sua volta ha trasmesso alla figlia. La madre soffre inoltre di osteoporosi. Per entrambe le donne sono in corso le indagini per la ricerca di ipercortisolismo di origine surrenalica.

La Figura 2, a pagina seguente, mostra le caratteristiche di questa famiglia.

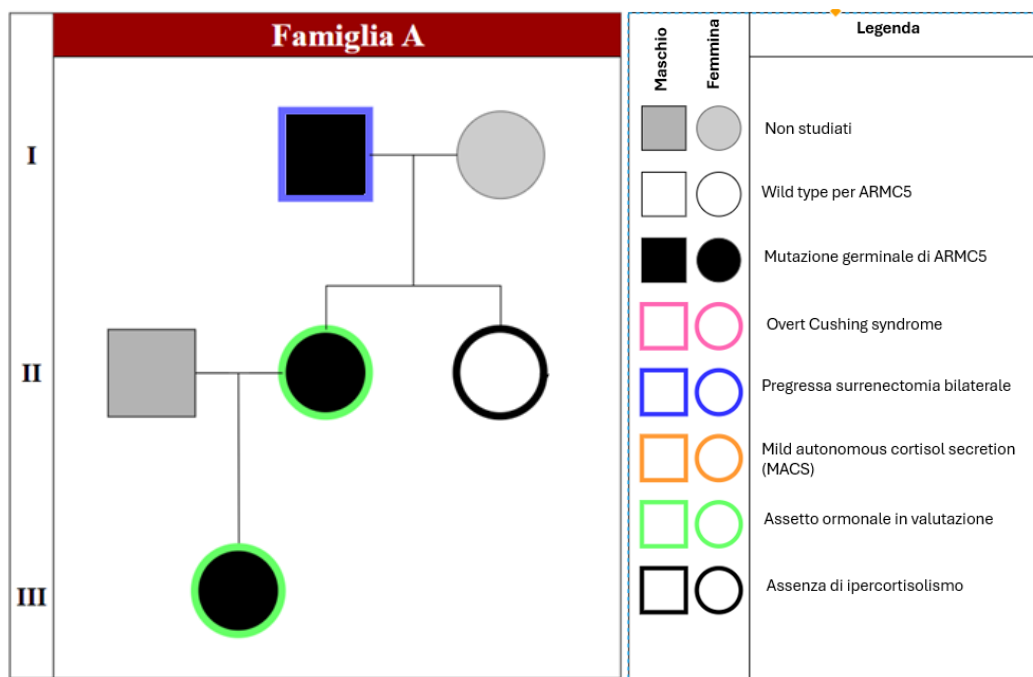


Figura 2: Caratteristiche cliniche e genetiche della famiglia A.

4.4.2 Famiglia B

Il primo membro studiato della famiglia B è stata la donna della seconda generazione, che presentava overt CS. Una volta che le sue analisi genetiche hanno mostrato la mutazione germinale di ARMC5, l'indagine è stata allargata al fratello, il cui assetto ormonale è ancora in valutazione, e ai due figli della signora, che sono tutti risultati mutati. Di questi ultimi, uno presenta MACS e ha eseguito una TC addominale che ha evidenziato un ingrandimento del surrene destro. Nell'altro, invece, le analisi biochimiche non hanno mostrato evidenza di ipercortisolismo. Le caratteristiche della famiglia B sono schematicamente riassunte in Figura 3.

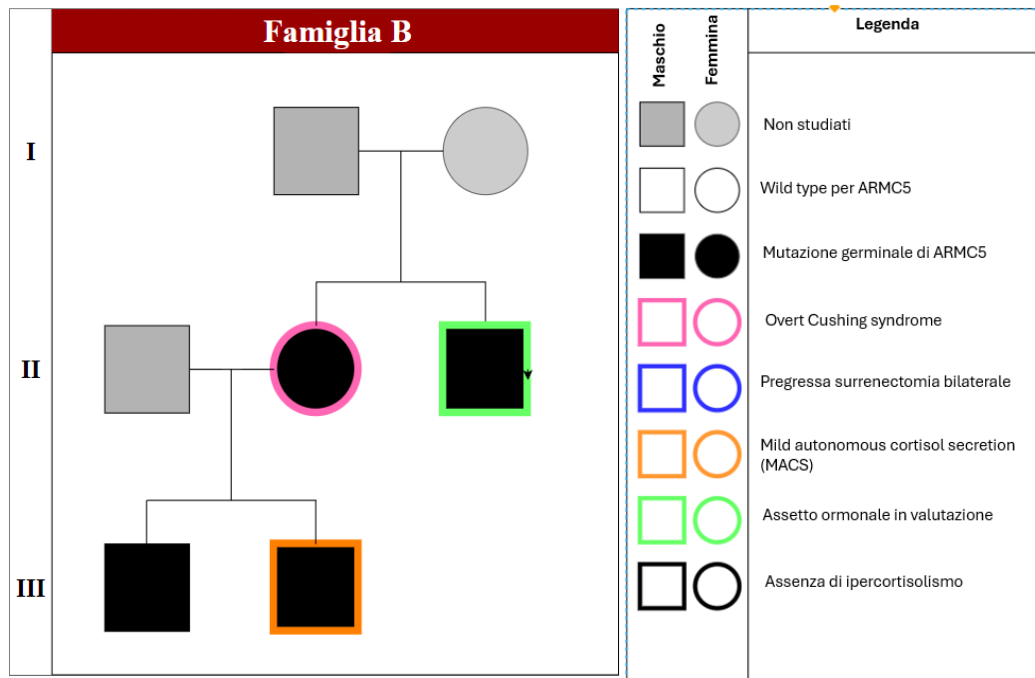


Figura 3: Caratteristiche cliniche e genetiche della famiglia B.

4.4.3 Famiglia C

In questa famiglia sono stati analizzati i due fratelli della seconda generazione. La donna è stata la prima ad arrivare al controllo endocrinologico, e presenta un ipercortisolismo subclinico associato alla mutazione patogenetica di ARMC5. Il fratello, anche lui mutato, è in fase di studio per la ricerca di una secrezione autonoma di cortisolo. La famiglia è mostrata in Figura 4.

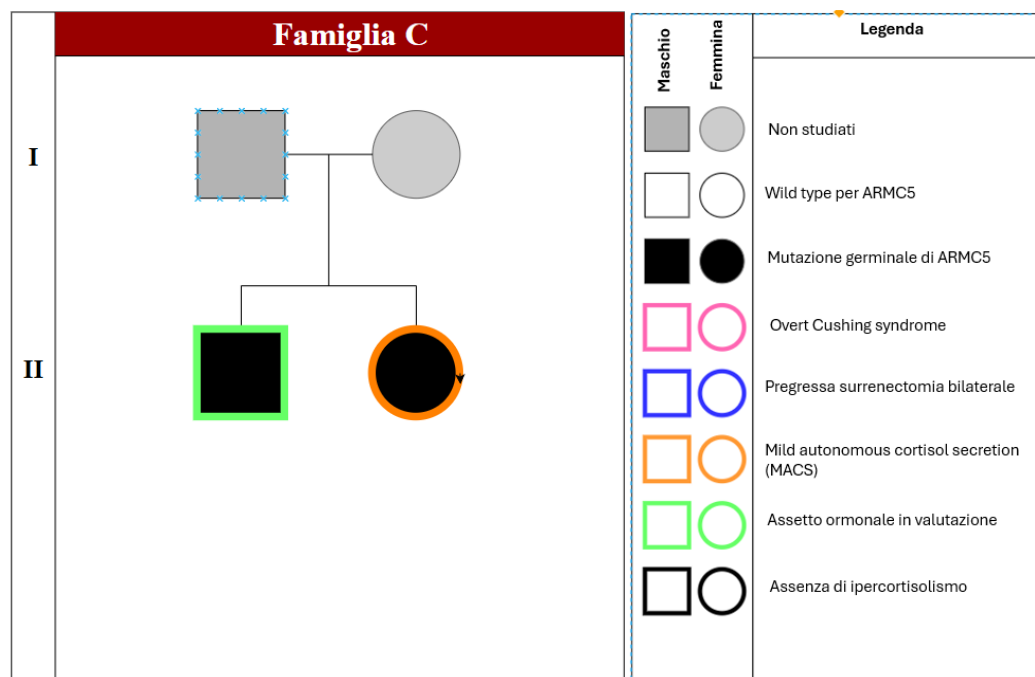


Figura 4: Caratteristiche cliniche e genetiche della famiglia C.

4.4.4 Famiglia D

In questa famiglia, il paziente della seconda generazione con mutazione di ARMC5 è arrivato all'osservazione endocrinologica per overt CS. La scoperta della sua mutazione germinale ha dato il via allo screening nella sorella e nel figlio, entrambi portatori dello stesso difetto genetico. Per entrambi, la ricerca di un possibile ipercortisolismo è ancora in corso.

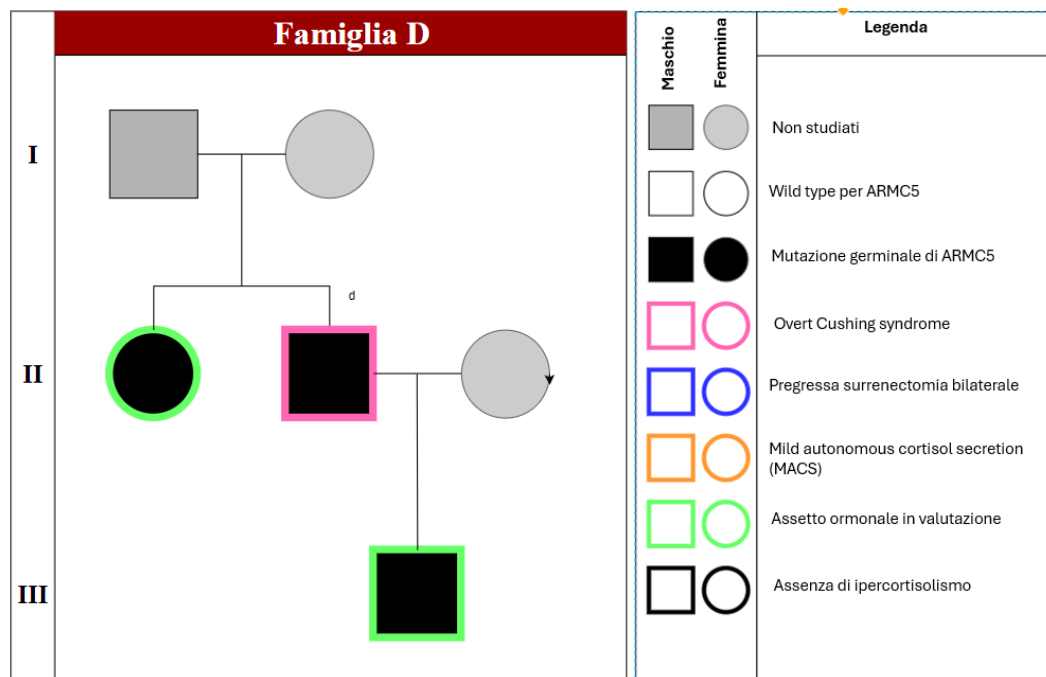


Figura 5: Caratteristiche cliniche e genetiche della famiglia D.

4.4.5 Famiglia E

In questo caso si tratta di due sorelle, osservabili in Figura 5 nella seconda generazione. Nella prima sorella sono stati riscontrati degli incidentalomi surrenalici bilaterali nel corso di una TC eseguita per diverticolosi. Alle indagini di approfondimento per l'ipercortisolismo non ha mostrato una secrezione autonoma di cortisolo. Anche l'altra sorella è risultata portatrice della stessa alterazione genetica e il suo assetto ormonale è in fase di valutazione.

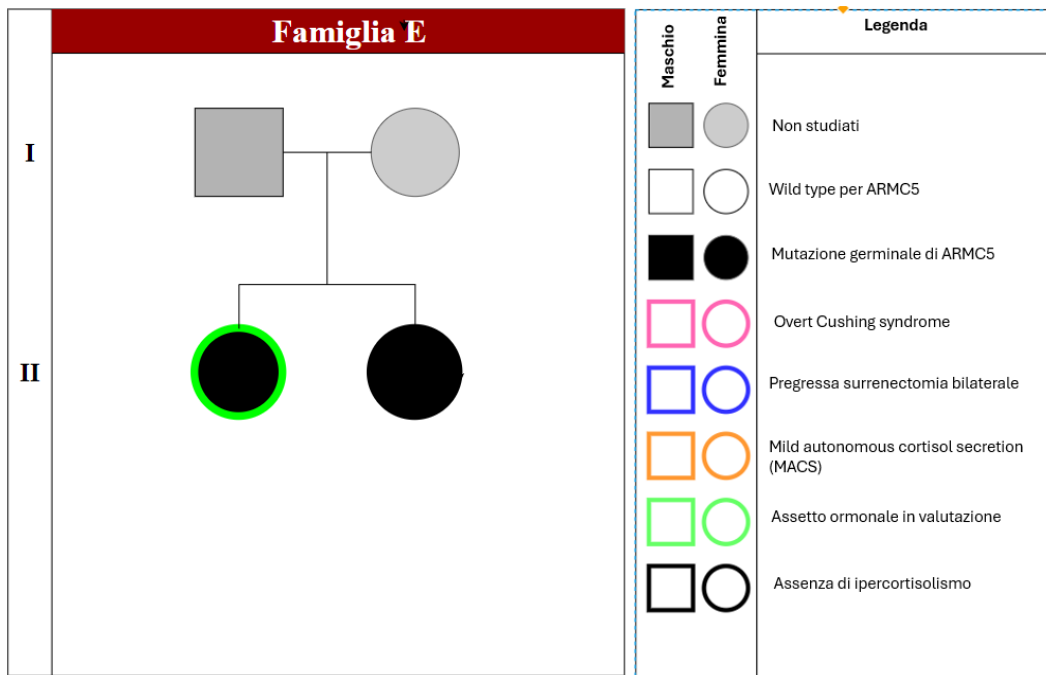


Figura 6: Caratteristiche cliniche e genetiche della famiglia E.

5. DISCUSSIONE

In questo studio è stata esaminata una popolazione di pazienti con adenomi surrenalici bilaterali, che includeva anche casi di PBMAH. Dividendo la popolazione in tre gruppi in base al fenotipo di secrezione ormonale, sono state valutate le differenze cliniche, biochimiche e genetiche tra i vari fenotipi, e l'evoluzione di questi nel corso del tempo. Si è poi studiato il sottogruppo dei pazienti con PBMAH, confrontandone le caratteristiche con quelle degli adenomi surrenalici bilaterali, valutando le diversità tra i fenotipi di secrezione e analizzando la presentazione dei pazienti con mutazione di ARMC5.

5.1 Caratteristiche della popolazione

5.1.1 Caratteristiche alla prima visita

Al primo accesso in ambulatorio la popolazione aveva un'età mediana di 65 anni ed era costituita dal 41% di maschi e dal 59% di femmine. Queste caratteristiche rispecchiano quelle di altre popolazioni con adenomi surrenalici bilaterali (27,28,39,50).

In questo studio la PBMAH, diagnosticata basandosi sul criterio di surreni globalmente ingranditi con noduli bilaterali superiori a 1 cm di diametro (22), è stata identificata in 16 pazienti, il 27% nella popolazione considerata. I criteri di diagnosi della PBMAH non sono ancora stati definiti in maniera rigorosa; talvolta, ad esempio, viene inclusa la necessità di una secrezione autonoma di cortisolo. Per questo motivo la sua effettiva prevalenza tra gli adenomi bilaterali non è ancora ben nota (22). In due precedenti lavori la frequenza di PBMAH negli adenomi bilaterali era dell'11% e 15% (27,28); si tratta però di diagnosi basate sull'istologia delle ghiandole surrenaliche asportate in pazienti surrenectomizzati. Una valutazione accurata all'imaging potrebbe quindi permettere di identificare una percentuale maggiore di pazienti affetti da PBMAH, considerando anche coloro che non vanno incontro a chirurgia o biopsia che permettano analisi istologiche.

Dal punto di vista della secrezione ormonale, il 32% dei pazienti alla prima visita è stato classificato come affetto da adenoma non secernente, il 59% come MACS, il 9% come overt CS. La definizione attuale di MACS, basata sulla mancata soppressione del cortisolo dopo 1 mg DST in assenza di segni clinici e biochimici francamente suggestivi per CS, è stata perfezionata solo di recente (8): per questo

motivo è difficile fare una comparazione della sua prevalenza con quella rilevata da altri studi. Morelli et al., nel 2023, usando il cut-off di 50 nmol/L, hanno riscontrato una la presenza di MACS del 67% in una popolazione di incidentalomi surrenalici bilaterali (39); in un ulteriore gruppo di pazienti con adenomi bilaterali, la percentuale di pazienti con mancata soppressione del cortisolo dopo 1 mg DST ammontava al 50% (50). L'analisi di questo studio mostra dunque una prevalenza di MACS in linea con i precedenti riscontri.

D'altra parte, nella popolazione di incidentalomi bilaterali esaminata da Morelli et al. non erano presenti pazienti con overt CS (39); al contrario, il 24% del gruppo con adenomi bilaterali descritto da Mariani et al. mostrava segni caratteristici di CS (50). È possibile dunque che questo dato dipenda dalla numerosità della popolazione e dai suoi criteri di selezione, con una frequenza di overt CS più ridotta in quelle composte da incidentalomi surrenalici, in cui spesso non c'erano sospetti preesistenti di ipercortisolismo.

Il diametro totale mediano delle lesioni maggiori che è stato riscontrato nella popolazione era di 3.7 cm (2.5-5.2), in linea con quanto già osservato in letteratura; lo stesso si può dire per il livello di cortisolo dopo 1 mg DST, con una mediana dei 71,5 nmol/L, e per il CLU, che era lievemente aumentato nel 12% della popolazione e maggiore di due volte ULN nel 5% (39,50). L'ACTH, con una mediana di 8,8 ng/L, è risultato lievemente più soppresso rispetto ad altri studi (28,39). Nella nostra coorte erano inclusi pazienti con overt CS, non sempre presenti negli altri studi, che avevano una maggior soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene: è possibile che questo abbia influito sui livelli di ACTH, indicando una sua maggiore soppressione (28,39).

Tra le complicanze associate all'ipercortisolismo, l'ipertensione, il diabete mellito, la dislipidemia e l'osteoporosi caratterizzavano rispettivamente l'84%, il 22%, il 75% e il 19% della popolazione. Ipertensione e diabete si sono mostrati in linea con i dati rilevati in altri studi (28,39); rispetto al lavoro di Morelli et al., la dislipidemia è stata rilevata con una frequenza maggiore (75% contro 51%), mentre l'osteoporosi ha avuto un riscontro nettamente inferiore nella popolazione qui esaminata (19% contro 62%) (39). Il BMI mediano osservato nel nostro studio era invece di 28.1 kg/m², comparabile con quello di 29.5 rilevato da Vassiliadi et al. (28).

Infine, il 26% dei pazienti della popolazione in esame aveva una storia di neoplasie pregresse, dato compatibile con quanto già osservato in letteratura (39).

5.1.2 Caratterizzazione genetica

Dalle analisi genetiche per l'identificazione di mutazioni germinali di ARMC5, è emerso che il 21% dei soggetti con adenomi surrenalici bilaterali che erano stati testati presentava una mutazione patogenetica del gene ARMC5. Anche Morelli et al. avevano osservato una prevalenza di alterazioni patogenetiche del 18,8%, a sua volta vicina a quella di un'ampia coorte di pazienti non selezionati con incidentalomi surrenalici (34,39).

Altri tre pazienti, ossia il 10% dell'intera popolazione, mostravano un'alterazione germinale del gene KDM1A; questi rappresentavano il 19% dei casi di PBMAH e mostravano tutti una FDCS. La scoperta recente dell'associazione tra alterazioni di KDM1A e la PBMAH fa sì che non siano ancora disponibili dati riguardo alla sua prevalenza negli adenomi surrenalici bilaterali, e pochi riguardo alla sua frequenza nella PBMAH; ciò che è noto, invece, è la sua stretta correlazione con la FDCS, come osservato anche in questo studio (26,37).

Nella popolazione esaminata, inoltre, sono state rinvenute mutazioni di altri geni determinanti sindromi caratterizzate da multiple neoplasie: in particolare, un paziente presentava un'alterazione dell'oncosoppressore APC e in due risultava mutato l'oncosoppressore MEN1; in tutti questi pazienti erano presenti altre manifestazioni delle rispettive sindromi. Esistono pochi dati riguardanti la frequenza di queste mutazioni negli adenomi surrenalici bilaterali. Sono stati riportati vasi casi di lesioni surrenaliche correlate alla FAP, e tra questi esistono degli individui con PBMAH. Non è invece frequente il riscontro di mutazioni di APC in tumori surrenalici al di fuori della FAP (31). Anche nella nostra casistica, il soggetto con mutazione di APC mostrava un'alterazione a livello germinale all'interno della presentazione tipica della sindrome. Analogamente, anche l'alterazione di MEN1 negli adenomi surrenalici è più frequente quando si trovano nel contesto dell'omonima sindrome, rispetto a quelli sporadici. Le lesioni surrenaliche fanno parte a pieno titolo dei tumori associati a questa sindrome, e quasi il 13% di questi è bilaterale (30). In accordo con questo, entrambi i pazienti mutati per MEN1 nella nostra popolazione mostravano altri tumori tipici della sindrome MEN1.

5.1.3 Caratteristiche all'ultima visita

Dei 59 pazienti inclusi inizialmente nello studio, 55 sono stati seguiti con un follow-up protratto nel tempo.

Tra questi, il 9% ha cominciato una terapia farmacologica per l'ipercortisolismo e un altro 9% è stato sottoposto a chirurgia. Due casi hanno richiesto sia una prima surrenectomia monolaterale, sia una seconda di completamento; nello specifico, si trattava di un paziente con overt CS e uno con ipercortisolismo subclinico, che mostrava masse surrenaliche di oltre 4 cm, osteoporosi ed elevato rischio cardiovascolare, culminato in un infarto NSTEMI nel 2023 nonostante la precedente asportazione totale dei surreni. Gli altri 3 pazienti sottoposti a surrenectomia hanno avuto invece una chirurgia monolaterale.

Tra il primo e l'ultimo controllo ambulatoriale, cinque pazienti hanno mostrato un cambiamento del fenotipo secretorio. I due pazienti che hanno subito due surrenectomie monolaterali consecutive sono passati da una secrezione tipica di overt CS e di ipercortisolismo subclinico a un iposurrenalismo iatrogeno. Inoltre, due dei tre pazienti sottoposti a surrenectomia monolaterale prima della prima visita, ossia il 67% di questi, sono tornati allo stato di MACS: il ritorno a un'ipersecrezione anche subclinica di cortisolo dopo una surrenectomia monolaterale è un'evenienza già nota in letteratura, soprattutto nei casi di PBMAH, ma, come osservato nella popolazione in esame, solitamente richiede anni per manifestarsi (22).

Grazie all'esecuzione dell'operazione chirurgica in alcuni soggetti, il diametro mediano complessivo delle lesioni surrenaliche maggiori è lievemente diminuito nel corso del tempo, passando da una mediana di 3.7 a 3.5. Tra gli esami biochimici per valutare la secrezione ormonale, il cortisolo dopo 1 mg DST è aumentato di appena 2.1 nmol/L, l'ACTH è risalito a 9,9 ng/L, pur rimanendo sempre soppresso, il LNSC è passato da 2.2 nmol/L a 1.6 nmol/L e nessun paziente mostrava un CLU oltre due volte ULN. Complessivamente, dunque, la terapia medica e la chirurgia hanno comportato un leggero miglioramento nelle caratteristiche biochimiche di secrezione ormonale della popolazione.

Sul versante delle comorbidità associate all'ipercortisolismo, il BMI mediano è sceso da 28.1 a 27.1 kg/m², mentre la circonferenza vita è rimasta costante. Invece, mentre ipertensione e osteoporosi sono rimaste sostanzialmente invariate come

prevalenza, il diabete ha mostrato un aumento dal 22 al 29%, rappresentato da tre nuovi casi diagnosticati durante il follow-up, e due nuove diagnosi di dislipidemia hanno aumentato la sua prevalenza dal 75 al 78%.

Inoltre, nel periodo del follow-up, il 12% dei pazienti ha sviluppato nuove neoplasie e il 4% un nuovo meningioma.

5.2 Analisi dei fenotipi secretori

5.2.1 Comparazione tra fenotipi secretori

Comparando la popolazione a seconda del fenotipo secretorio presentato dai pazienti alla prima visita, ossia i pazienti con adenomi surrenalici non secernenti, quelli con MACS e quelli con overt CS, sono emerse alcune differenze rilevanti.

I pazienti con overt CS hanno effettuato il primo controllo endocrinologico attorno ai 40 anni, almeno 15 anni prima rispetto ai pazienti con adenomi non secernenti ($p=0.004$) e 18 anni prima rispetto ai pazienti con MACS (0.006). È ragionevole che i pazienti con overt CS giungano a diagnosi più precocemente, dal momento che i segni tipici e il più elevato grado di comorbidità associate all'ipercortisolismo può indirizzarli più rapidamente alla valutazione specialistica. La differenza d'età tra soggetti con adenomi non secernenti e soggetti con MACS, invece, non è veramente rilevante: la presentazione clinica subdola o assente della MACS fa sì che, solitamente, questi pazienti arrivino a diagnosi di adenoma surrenalico bilaterale solo per riscontro accidentale delle masse all'imaging, in maniera analoga a quanto avviene per gli adenomi non secernenti.

La diversa proporzione di maschi e femmine per ogni gruppo, nettamente sbilanciata verso il genere femminile negli overt CS (il 20% di maschi contro l'80% di femmine) e più bilanciata in pazienti con adenomi non secernenti e MACS, non ha mostrato significatività, forse anche a causa delle dimensioni ridotte del campione e dei pochi casi di overt CS.

La PBMAH è stata diagnosticata più frequentemente nei pazienti con overt CS, sia rispetto ai pazienti con lesioni non secernenti ($p=0,014$), sia rispetto ai pazienti con MACS ($p=0,031$). Questo depone a favore di una correlazione tra la presenza di PBMAH e un fenotipo secretorio più severo. Si può comunque notare che anche tre pazienti senza secrezione autonoma di cortisolo mostravano all'imaging caratteristiche tipiche di PBMAH: questo si pone in contrasto con le definizioni di

PBMAH che richiedono un ipercortisolismo almeno subclinico tra i criteri diagnostici (22).

La prevalenza di mutazioni patogenetiche di ARMC5 tra i vari fenotipi secretori non ha mostrato differenze rilevanti; in ogni caso, queste alterazioni sono state rilevate nel 21% dei pazienti con MACS e nel 40% dei pazienti con overt CS. In particolare, nessun paziente con adenomi non secernenti aveva mutazioni di questo gene. Nella letteratura i casi di alterazioni patogenetiche di ARMC5 in adenomi surrenalici bilaterali, ma al di fuori della PBMAH, sono estremamente rari (50): la loro assenza in questo studio dunque è in linea con questi dati.

I noduli surrenalici avevano dimensioni progressivamente più elevate nelle tre categorie, con un aumento del diametro sia tra adenomi non secernenti e MACS (3 cm contro 4.1 cm, $p=0.027$), sia tra MACS e overt CS (4.1 cm contro 5.7 cm, $p=0.016$), sia tra adenomi non secernenti e overt CS ($p=0.002$). Sotto il profilo biochimico, il cortisolo dopo 1 mg DST aveva livelli molto più bassi in caso di adenomi non secernenti, sia rispetto ai pazienti con MACS ($p=0,000$), sia rispetto ai pazienti con overt CS ($p=0,007$). Anche nei pazienti con overt CS si è verificata una soppressione del cortisolo dopo DST minore che nei MACS, ma non in maniera rilevante: ciò che ha permesso la diagnosi di overt CS non era l'entità della soppressione del cortisolo dopo DST, ma la presenza di altre alterazioni biochimiche, segni tipici e comorbidità associate. Per questo le due mediane sono comunque comparabili.

L'ACTH si è dimostrato ampiamente soppresso nei pazienti con overt CS ($p=0.011$ rispetto al gruppo con secrezione subclinica, $p=0.001$ rispetto al gruppo con adenomi non secernenti), e più ridotto anche in caso di MACS rispetto agli adenomi non secernenti ($p=0.007$). Inoltre, concentrazioni di $CLU > 2$ volte ULN erano presenti solo in pazienti con overt CS ($p=0.001$ con MACS, $p=0.006$ rispetto ad adenomi non secernenti), e il LNSC risultava nettamente più alto nei pazienti con overt CS rispetto a quelli con secrezione subclinica ($p=0.026$). Come atteso, dunque, la presentazione biochimica dei pazienti con diagnosi di Cushing florido negli adenomi surrenalici bilaterali è decisamente più severa rispetto a quella dei soggetti con MACS o adenomi bilaterali non secernenti, e la rilevazione di questi parametri laboratoristici è utile nel distinguere l'entità dell'ipercortisolismo (8,22). Tra le comorbidità associate all'ipercortisolismo, invece, non si sono osservate differenze eclatanti: ipertensione e dislipidemia avevano una prevalenza abbastanza

omogenea tra i vari gruppi, contrariamente a quanto osservato in altri studi (39); il diabete era leggermente più frequente nei pazienti con CS florida, mentre l'osteoporosi è risultata assente nei pazienti con adenomi non secernenti e attorno al 20-30% negli altri due gruppi. Gli eventi cardiovascolari hanno riguardato solo i soggetti con MACS: la loro frequenza leggermente più elevata in questa categoria rispetto ai pazienti con overt CS potrebbe dipendere dal fatto che la MACS viene trattata meno frequentemente con terapia medica o chirurgica, rispetto a quanto accade nei casi di CS florida. In questo modo, l'ipercortisolismo nella MACS non viene controllato ed è in grado di causare una quota maggiore di eventi cardiovascolari.

Anche BMI e circonferenza vita si sono dimostrati poco differenti nei tre gruppi. L'assenza di diversità rilevanti in queste comorbidità potrebbe derivare dalla numerosità ridotta del campione. È però interessante notare che condizioni come ipertensione e dislipidemia, strettamente associate all'ipercortisolismo e in particolare al fenotipo di CS florida, se riscontrate in pazienti con sospetta secrezione autonoma di cortisolo non sono di per sé sufficienti a fare diagnosi, e necessitano di essere associate a ulteriori segni clinici e accertamenti biochimici.

5.2.2 Confronto tra prima e ultima visita per fenotipi di secrezione

Pazienti con adenomi bilaterali non secernenti

Valutando i pazienti con adenomi bilaterali non secernenti nel tempo, si è osservato che nessuno di loro ha avuto necessità di surrenectomia durante il follow-up. Si tratta di un dato interessante, dal momento che tra i soggetti senza secrezione autonoma di cortisolo sono inclusi due pazienti con pregressa surrenectomia monolaterale. Questi due pazienti, entrambi con PBMAH, nel corso del tempo sono tornati a un fenotipo di MACS, che però non ha richiesto né terapia medica, né intervento chirurgico: questo avvalorava l'ipotesi che la progressione della PBMAH sia lenta e poco evidente, e per questo forse anche più gestibile dopo una prima surrenectomia monolaterale, anche se difficilmente evitabile (22,38).

Solo il cortisolo dopo 1 mg DST ha mostrato un rilevante ma minimo aumento ($p=0.038$); per il resto non si sono riscontrate grandi variazioni nel periodo di follow-up dei pazienti con adenomi bilaterali non secernenti.

Infatti, il diametro della somma delle lesioni maggiori è rimasto invariato, così come dati clinici quali BMI e circonferenza vita. Sul versante biochimico, l'ACTH

è sceso leggermente verso il limite inferiore di normalità (10 ng/L), ma senza risultare francamente soppresso; il LNSC è di poco diminuito e nessun paziente aveva livelli di CLU > 2 volte ULN.

Ipertensione e dislipidemia non hanno mostrato cambiamenti sostanziali, mentre il diabete mellito ha aumentato la sua frequenza grazie a tre nuovi pazienti individuati durante il follow-up. Uno dei pazienti nel corso del tempo ha avuto un evento cardiovascolare, e due una diagnosi di osteoporosi. Si tratta in ogni caso di comorbidità la cui prevalenza aumenta con l'avanzare dell'età, per cui queste piccole variazioni potrebbero essere imputabili anche all'invecchiamento della popolazione osservata.

Pazienti con MACS

Dei pazienti con MACS, tre pazienti (9%) sono andati incontro a surrenectomia monolaterale nel corso del follow-up, e altri tre hanno intrapreso una terapia medica per l'ipercortisolismo.

A fronte della chirurgia, il diametro totale delle lesioni non è cambiato nel tempo, forse compensato dall'accrescimento dei noduli controlaterali o da quelli di altri pazienti. Quanto ai parametri laboratoristici, il cortisolo dopo 1mg DST è lievemente calato, così come il LNSC e l'ACTH soppresso si è avvicinato al range di normalità.

Ipertensione, diabete, eventi cardiovascolari e osteoporosi non hanno mostrato differenze tra la prima e l'ultima visita nei pazienti con MACS; anche BMI e circonferenza vita hanno avuto variazioni minime. Solo la dislipidemia ha aumentato la propria prevalenza dal 69 al 79%, grazie a tre nuove diagnosi.

Complessivamente questi dati indicano una ridotta evolutività nel tempo dei pazienti con MACS: questo è concorde con le evidenze di una scarsa tendenza della MACS a progredire a overt CS (7,8).

Overt CS

Il gruppo di pazienti con overt CS alla prima visita, formato inizialmente da 5 soggetti, contava 4 individui all'ultimo controllo ambulatoriale. La ridotta numerosità, unita alla scarsità di dati per alcuni parametri, non ha reso possibile ottenere dei risultati significativi.

All'epoca dell'ultima visita, il 50% dei pazienti (2/4) ha intrapreso una terapia farmacologica per l'ipercortisolismo, e un altro 50% è stato sottoposto a chirurgia. Probabilmente, grazie a questi trattamenti si è osservata una stabilità o un lieve miglioramento dei parametri di laboratorio.

Anche BMI, ipertensione e osteoporosi sono migliorati leggermente, mentre diabete ed eventi cardiovascolari non hanno subito variazioni.

Complessivamente, dunque, nonostante la mancanza di significatività delle osservazioni in questo gruppo, si può notare come chirurgia e terapia medica abbiano determinato un certo margine di beneficio nei pazienti con overt CS, stabilizzando l'evoluzione della malattia.

5.3 Valutazione della PBMAH

5.3.1 Confronto tra adenomi bilaterali e PBMAH

Tra i 59 pazienti con adenomi surrenalici bilaterali, il 27% ha avuto una diagnosi di PBMAH: è stato quindi possibile comparare la presentazione clinica, biochimica e genetica di questi con quella dei pazienti con adenomi bilaterali ben definiti senza iperplasia del resto della ghiandola.

Nella popolazione esaminata da questo studio, l'età alla prima visita nei pazienti con PBMAH era di 56,5 anni, inferiore di 10 anni rispetto a quella dei pazienti con soli adenomi bilaterali ($p=0.024$). In vari lavori, l'età tipica alla diagnosi dei soggetti con PBMAH si aggira tra i 43 e i 53 anni, dunque inferiore rispetto a quella notata nella nostra casistica (36–38,51). D'altra parte, alcuni dei pazienti con PBMAH nella nostra popolazione avevano ricevuto la diagnosi in altri centri prima di arrivare agli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. Si è potuto quindi considerare solo la data della prima visita, che in alcuni casi potrebbe essere successiva di qualche anno rispetto alla diagnosi: questo potrebbe aver spostato l'età mediana dei pazienti verso valori maggiori.

In questa popolazione, la PBMAH è risultata più frequente nel genere femminile (75% dei casi di PBMAH); questa ripartizione differente per sesso, seppure non significativa, è stata osservata in altri gruppi di pazienti affetti da PBMAH (35–38,51).

Il 40% dei pazienti con PBMAH era inoltre portatore di mutazioni patogenetiche di ARMC5, mentre negli adenomi bilaterali non sono stati riscontrate varianti di questo gene associate a presentazioni patologiche ($p=0.018$). Come già notato, la

mutazione di ARMC5 appare quasi esclusiva della PBMAH, e probabilmente in grado di spiegarne la patogenesi in un'ampia quota di casi (25,35). La frequenza di mutazioni patogenetiche osservata in questo studio è risultata più elevata di quella riportata in letteratura, che ammonta al 20-25% dei casi di PBMAH (36,51). Si pensa però che, considerando i pazienti con ipercortisolismo, questa percentuale possa arrivare al 50%, dato compatibile con quello osservato nella nostra popolazione (25).

Come già rilevato, la prevalenza di overt CS era nettamente superiore nei pazienti con PBMAH rispetto a quelli con adenomi surrenalici bilaterali, sia quando confrontata con la frequenza di MACS ($p=0.031$), sia quando comparata ai pazienti con lesioni non secernenti ($p=0.014$). Al contrario, la frequenza di MACS e lesioni non secernenti non ha mostrato grande differenza di distribuzione tra gli adenomi bilaterali senza iperplasia e la PBMAH. Tutto ciò indica che le lesioni surrenaliche da PBMAH, pur mostrando comunque un'elevata prevalenza di casi subclinici e un discreto numero di lesioni non secernenti, sono più frequentemente associate a overt CS di quanto non accada degli adenomi bilaterali. Questo dato è avvalorato dal fatto che, nella popolazione esaminata in questo studio, il 19% dei pazienti con PBMAH ha richiesto una surrenectomia monolaterale prima della prima visita, contrariamente ai pazienti con adenomi bilaterali, che non ne hanno necessitato ($p=0.017$).

Anche l'assetto biochimico ha mostrato una maggiore propensione a un fenotipo più severo nei pazienti con PBMAH, con un cortisolo dopo 1 mg DST generalmente meno soppresso ($p=0.011$), un LNSC più elevato ($p=0.004$) e un CLU > 2 volte ULN rilevato solo in presenza di PBMAH ($p=0.019$). Anche l'ACTH si è mostrato generalmente più soppresso nella PBMAH. Questa alterazione nella secrezione ormonale è stata osservata anche in un'analisi effettuata su un gruppo di 16 pazienti con PBMAH (38).

Al contrario, le comorbidità associate all'ipercortisolismo non hanno mostrato differenze rilevanti tra adenomi surrenalici bilaterali e PBMAH: questo suggerisce che non sia possibile sospettare una PBMAH a partire da una presentazione clinica suggestiva per ipercortisolismo subclinico o florido.

5.3.2 Confronto tra fenotipi di secrezione di cortisolo nella PBMAH

Dal confronto tra fenotipi di secrezione differenti nei pazienti con PBMAH è emerso che i pazienti con overt CS avevano un'età alla prima visita di circa 39 anni, nettamente inferiore rispetto a quella degli altri due gruppi, che si aggirava tra i 61 e i 61 anni ($p=0.037$ rispetto ai pazienti con MACS). Mutazioni patogenetiche di ARMC5 non hanno mostrato una vera differenza nei tre gruppi, ma nei pazienti con PBMAH non secernente non ne è stata riscontrata nessuna. Anche il diametro totale mediano delle lesioni maggiori aveva un andamento progressivamente crescente a partire dai pazienti con PBMAH non secernente fino ai soggetti con overt CS.

La surrenectomia monolaterale è stata eseguita più frequentemente nei pazienti senza secrezione autonoma di cortisolo alla prima visita rispetto a quelli con MACS ($p=0.045$), senza differenze invece con i pazienti con overt CS: questo evidenzia dunque come la chirurgia abbia migliorato il fenotipo di secrezione di cortisolo, portandolo a un'assenza di ipersecrezione.

Dal punto di vista biochimico, il cortisolo dopo 1 mg DST era molto più elevato nei pazienti con MACS rispetto a quelli con PBMAH non secernente ($p=0.012$), e mostrava un aumento anche nei pazienti con overt CS rispetto ai pazienti con MACS, anche se non significativo. $CLU > 2$ volte ULN e LNSC sono risultati più frequentemente alterati nel gruppo con overt CS rispetto a quello con MACS (rispettivamente, $p=0.014$ e $p=0.028$) e l'ACTH aveva valori nel range di normalità nei pazienti senza secrezione autonoma di cortisolo ($p=0.028$ con overt CS). Complessivamente, dunque, si può dire che l'assetto biochimico sia progressivamente più alterato a partire dai pazienti con PBMAH non secernente fino a quelli con overt CS.

Non ci sono invece differenze rilevanti nelle comorbidità associate all'ipercortisolismo tra i tre fenotipi di secrezione, forse dovute alla ridotta numerosità del gruppo dei pazienti con PBMAH e al fatto che si tratti di condizioni frequenti anche nella popolazione generale con assenza di ipercortisolismo.

5.3.3 Confronto tra ARMC5 mutati e wild type

Dal confronto tra i 6 pazienti con PBMAH mutati per ARMC5 e i 9 con assenza di mutazione o varianti benigne di questo gene sono emerse poche differenze significative, ma varie osservazioni interessanti.

L'età mediana alla prima visita era di 47 anni per i mutati, di 10 anni più bassa rispetto a quella dei wild type e simile a quella osservata in altri lavori (26,34–36). Inoltre, tra i pazienti con ARMC5 mutato c'era una maggior prevalenza del genere femminile, ma leggermente meno preponderante rispetto al gruppo con PBMAH wild type. In altri studi si è infatti riscontrata una ripartizione un po' più bilanciata tra maschi e femmine nei pazienti con mutazione di ARMC5 rispetto ai pazienti wild type con PBMAH, in cui sono le donne a prevalere (26,34,36,51). In questo può anche entrare in gioco il fatto che, tra i pazienti non mutati, fossero presenti tre donne con mutazione di KDM1A: in questa popolazione la mutazione di KDM1A era presente solo in soggetti di genere femminile con FDCS, ed è noto dalla letteratura che la prevalenza di alterazioni patogenetiche di KDM1A è maggiore nelle donne (26,37). Questo, dunque, potrebbe spiegare una ripartizione leggermente più omogenea nei generi in caso di mutazione di ARMC5 rispetto ai wild type.

Tutti i pazienti mutati presentavano ipercortisolismo, sia in forma di MACS, sia come overt CS, contrariamente ai wild type, in cui due pazienti non avevano secrezione autonoma di cortisolo. Questo risultato è concorde con le osservazioni in altre popolazioni di pazienti affetti da PBMAH, in cui in presenza di mutazioni di ARMC5 si riscontrava più frequentemente un fenotipo più severo (26,34,51).

Due pazienti hanno richiesto una surrenectomia monolaterale prima della prima visita tra i wild type, e uno tra i mutati; inoltre, solo un paziente era in trattamento per l'ipercortisolismo, e rientrava nei mutati. Questi dati sembrerebbero non evidenziare differenze sostanziali per i due gruppi di PBMAH riguardo alla necessità di trattamento, contrariamente a quanto riscontrato in altre analisi (26,34,36). Questa scarsa rilevanza nella popolazione in esame potrebbe derivare dalla sua ridotta numerosità.

Dal punto di vista biochimico, i pazienti con mutazioni patogenetiche di ARMC5 presentavano un cortisolo dopo 1 mg DST nettamente più elevato ($p=0.010$) e un ACTH più soppresso ($p=0.024$). Non c'era invece grande diversità tra i valori di CLU e LNSC tra i due gruppi. In accordo con questi dati, altri studi hanno mostrato livelli di cortisolo dopo 1 mg DST e ACTH maggiormente alterati in caso di mutazione di ARMC5, tanto da proporre lo screening genetico per la ricerca di sue mutazioni in pazienti con questi parametri particolarmente alterati, ritenendo invece

CLU e LNSC meno predittivi della presenza di alterazioni patogenetiche, anche se possibilmente elevati (26,34,36,39,51).

La somma dei diametri delle lesioni surrenaliche maggiori in questo studio non ha mostrato differenza tra i pazienti mutati e wild type: probabilmente a causa del ridotto numero di pazienti valutati, questo dato non concorda con la letteratura, in cui è comprovata una maggiore dimensione delle lesioni nei pazienti con alterazioni patogenetiche di ARMC5 (26,34,36,39).

Riguardo alle complicanze correlate all'ipercortisolismo, BMI e circonferenza vita si sono dimostrati comparabili nei due gruppi; anche ipertensione, dislipidemia, osteoporosi e neoplasie pregresse avevano una prevalenza abbastanza simile tra pazienti wild type e pazienti mutati. Il diabete ha invece avuto un riscontro più frequente fra i soggetti con alterazioni patogenetiche di ARMC5, ma poco rilevante, dal momento che si trattava di due soggetti diabetici su cinque tra i mutati per ARMC5 e uno su otto tra i pazienti wild type. In letteratura, una maggiore frequenza di ipertensione nei mutati è stata osservata in due studi, mentre uno studio ha mostrato una prevalenza più elevata di dislipidemia e un altro ha evidenziato lo stesso per il diabete (34,36,39). È dunque difficile trovare un'associazione evidente e ben dimostrata tra alterazioni di ARMC5 e una maggior frequenza di queste comorbidità, che dunque non sembrano predittive per la presenza della mutazione, dato anche il loro elevato riscontro nella popolazione generale.

5.4 Famiglie con mutazione di ARMC5

Le mutazioni patogenetiche germinali di ARMC5 sono presenti nel 20-25% dei casi apparentemente sporadici di PBMAH. Nonostante questo, il fatto che un'alterazione di questo gene si trovi nella linea germinale evidenzia la possibilità di una sua trasmissione ereditaria e una sua diffusione all'interno di cluster familiari, analogamente a quanto avviene con geni quali APC o MEN1.

Nel corso del follow-up dei pazienti con mutazione di ARMC5 seguiti dagli ambulatori di Endocrinologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, è stata consigliata l'esecuzione di una la ricerca di mutazioni patogenetiche di ARMC5 anche nei familiari dei soggetti mutati. In questo modo sono state recentemente identificate cinque famiglie con soggetti mutati. Nell'ottica di studiare le caratteristiche di questi cluster, i familiari del paziente in cui è stata primariamente identificata l'alterazione genetica vengono sottoposti a una TC addominale senza

mezzo di contrasto per ricercare lesioni surrenaliche e vanno incontro ad analisi genetica e work-up ormonale per la ricerca di un eventuale ipercortisolismo.

Famiglie con mutazioni germinali di ARMC5 presenti in più membri e in diverse generazioni sono già note in letteratura (41,42). Un loro studio approfondito può permettere sia di individuare precocemente i pazienti con MACS e ridurre l'impatto delle comorbidità associate all'ipercortisolismo, sia di osservare l'evoluzione delle lesioni surrenaliche associate ad ARMC5, aiutando a caratterizzare con più precisione la PBMAH fin dalle sue fasi più precoci.

6. CONCLUSIONE

In questo studio è stata esaminata una popolazione di 59 pazienti con adenomi surrenalici bilaterali, compresi 16 casi di PBMAH, i cui dati clinici e biochimici sono stati raccolti alla prima visita e al più recente controllo disponibile del loro follow-up. In 28 di questi è stata eseguita una ricerca genetica per mutazioni del gene ARMC5, e in 6 pazienti sono state riscontrate mutazioni di altri geni con nota associazione con la PBMAH.

Negli adenomi bilaterali, confrontando i tre fenotipi di adenomi non secernenti, MACS e overt CS, è emerso che i pazienti con overt CS giungevano alla prima visita più precocemente degli altri gruppi, mostravano una prevalenza maggiore di PBMAH e avevano un diametro complessivo dei noduli più elevato, associato ad alterazioni biochimiche più severe.

La valutazione separata di ciascuno di questi gruppi nel corso del follow-up ha evidenziato che complessivamente nessuno di questi fenotipi ha una rilevante propensione a cambiare nel tempo.

La prevalenza della PBMAH non è stata ancora ben indagata, forse a causa del fatto che i suoi criteri diagnostici non sono ancora stati determinati in maniera rigorosa. I pazienti con questa patologia sono arrivati all'osservazione specialistica più precocemente rispetto a quelli con adenomi bilaterali, mostrando un fenotipo clinico e biochimico più severo, con una maggior prevalenza di overt CS rispetto agli adenomi bilaterali, ma senza una differenza importante tra le comorbidità ipercortisolismo-relate. A causa della presentazione clinica più severa, è importante che questi pazienti siano correttamente identificati e monitorati nel tempo tramite follow-up.

Infine, mutazioni patogenetiche del gene ARMC5 sono state rinvenute solamente in pazienti con PBMAH e MACS o overt CS. La ridotta numerosità del campione non ha consentito osservazioni particolarmente rilevanti, ma si è comunque notata una presentazione più precoce e severa, almeno dal punto di vista biochimico, nei pazienti mutati. È dunque ragionevole procedere alla ricerca di mutazioni di questo gene in pazienti che mostrano livelli di cortisolo dopo 1 mg DST non soppressi e un fenotipo più tendente a CS florida.

In tutte queste analisi non sono state riscontrate evidenti differenze di prevalenza nelle comorbidità associate all'ipercortisolismo tra i vari gruppi esaminati. Per

questa ragione, non è possibile fare diagnosi di MACS o CS e neppure sospettare una sottostante PBMAH o una mutazione del gene ARMC5 con il solo riscontro di condizioni come ipertensione, diabete, dislipidemia e osteoporosi, nonostante siano strettamente associate all'ipercortisolismo.

I limiti di questo studio sono stati la numerosità ridotta della popolazione e la natura retrospettiva della raccolta dei dati, che spesso risultavano incompleti o difficili da reperire. Un ampliamento del numero dei soggetti analizzati e uno studio approfondito dei nuovi cluster familiari identificati potrebbero portare a risultati più significativi e una caratterizzazione più accurata dell'evoluzione della PBMAH nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbot M, Zilio M, Scaroni C. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications. Vol. 34, Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. Bailliere Tindall Ltd; 2020.
2. Lonsler RR, Nieman L, Oldfield EH. Cushing's disease: Pathobiology, diagnosis, and management. Vol. 126, Journal of Neurosurgery. American Association of Neurological Surgeons; 2017. p. 404–17.
3. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. Vol. 386, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2015. p. 913–27.
4. Boscaro M, Arnaldi G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2009;94(9):3121–31.
5. Lindholm J, Juul S, L Jørgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-rasmussen U, et al. Incidence and Late Prognosis of Cushing's Syndrome: A Population-Based Study* [Internet]. 2001. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/86/1/117/2841121>
6. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. In: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2003. p. 5593–602.
7. Favero V, Cremaschi A, Falchetti A, Gaudio A, Gennari L, Scillitani A, et al. Management and medical therapy of mild hypercortisolism. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021.
8. Fassnacht M, Tsagarakis S, Terzolo M, Tabarin A, Sahdev A, Newell-Price J, et al. European Society of Endocrinology clinical practice guidelines on the management of adrenal incidentalomas, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. Eur J Endocrinol. 2023 Jul 1;189(1):G1–42.
9. Alexandraki KI, Kaltsas GA, Isidori AM, Akker SA, Drake WM, Chew SL, et al. The prevalence and characteristic features of cyclicality and variability in Cushing's disease. Eur J Endocrinol. 2009;160(6):1011–8.
10. Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. Vol. 73, Clinical Endocrinology. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 1–15.
11. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2008;93(5):1526–40.

12. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Murad MH, Newell-Price J, Savage MO, et al. Treatment of Cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. Vol. 100, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Endocrine Society; 2015. p. 2807–31.
13. Albiger NM, Ceccato F, Zilio M, Barbot M, Occhi G, Rizzati S, et al. An analysis of different therapeutic options in patients with Cushing's syndrome due to bilateral macronodular adrenal hyperplasia: A single-centre experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 Jun 1;82(6):808–15.
14. Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palù G, Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. Vol. 149, *European Journal of Endocrinology*. 2003. p. 273–85.
15. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Vol. 23, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009. p. 245–59.
16. Sherlock M, Scarsbrook A, Abbas A, Fraser S, Limumpornpetch P, Dineen R, et al. Adrenal incidentaloma. Vol. 41, *Endocrine Reviews*. Endocrine Society; 2020.
17. Bancos I, Tamhane S, Shah M, Delivanis DA, Alahdab F, Arlt W, et al. Diagnosis of endocrine disease: The diagnostic performance of adrenal biopsy: A systematic review and meta-analysis. Vol. 175, *European Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd.; 2016. p. R65–80.
18. Libè R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: Pathophysiology and clinical management. Vol. 14, *Endocrine-Related Cancer*. 2007. p. 13–28.
19. Lenders JWM, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SKG, Murad MH, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: An endocrine society clinical practice guideline. Vol. 99, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Endocrine Society; 2014. p. 1915–42.
20. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al. The management of primary aldosteronism: Case detection, diagnosis, and treatment: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016 May 1;101(5):1889–916.
21. Di Dalmazi G, Berr CM, Fassnacht M, Beuschlein F, Reincke M. Adrenal function after adrenalectomy for subclinical hypercortisolism and Cushing's syndrome: A systematic review of the literature. Vol. 99, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Endocrine Society; 2014. p. 2637–45.
22. Vassiliadi DA, Tsagarakis S. Diagnosis and management of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *Endocr Relat Cancer*. 2019;26(10):R567–81.
23. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal Corticotropin in Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia. *New England Journal of Medicine*. 2013 Nov 28;369(22):2115–25.

24. Mete O, Erickson LA, Juhlin CC, de Krijger RR, Sasano H, Volante M, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Adrenal Cortical Tumors. Vol. 33, *Endocrine Pathology*. Springer; 2022. p. 155–96.
25. Cavalcante IP, Berthon A, Fragoso MC, Reincke M, Stratakis CA, Ragazzon B, et al. Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: definitely a genetic disease. Vol. 18, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Research; 2022. p. 699–711.
26. Vaczlavik A, Bouys L, Violon F, Giannone G, Jouinot A, Armignacco R, et al. KDM1A inactivation causes hereditary food-dependent Cushing syndrome. *Genetics in Medicine*. 2022 Feb 1;24(2):374–83.
27. Emms H, Tsirou I, Cranston T, Tsagarakis S, Grossman AB. Do patients with incidentally discovered bilateral adrenal nodules represent an early form of ARMC5-mediated bilateral macronodular hyperplasia? *Endocrine*. 2016 Sep 1;53(3):801–8.
28. Vassiliadi DA, Ntali G, Vicha E, Tsagarakis S. High prevalence of subclinical hypercortisolism in patients with bilateral adrenal incidentalomas: A challenge to management. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Apr;74(4):438–44.
29. Bouys L, Chiodini I, Arlt W, Reincke M, Bertherat J. Update on primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH). Vol. 71, *Endocrine*. Springer; 2021. p. 595–603.
30. Gatta-Cherifi B, Chabre O, Murat A, Niccoli P, Cardot-Bauters C, Rohmer V, et al. Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines database. *Eur J Endocrinol*. 2012 Feb;166(2):269–79.
31. Gaujoux S, Pinson S, Gimenez-Roqueplo AP, Amar L, Ragazzon B, Launay P, et al. Inactivation of the APC gene is constant in adrenocortical tumors from patients with familial adenomatous polyposis but not frequent in sporadic adrenocortical cancers. *Clinical Cancer Research*. 2010 Nov 1;16(21):5133–41.
32. Carney JA, Young WF, Stratakis CA. Primary bimorphic adrenocortical disease: Cause of hypercortisolism in McCune-Albright syndrome. *American Journal of Surgical Pathology*. 2011 Sep;35(9):1311–26.
33. Pitsava G, Stratakis CA. Genetic Alterations in Benign Adrenal Tumors. Vol. 10, *Biomedicines*. MDPI; 2022.
34. Bouys L, Vaczlavik A, Jouinot A, Vaduva P, Espiard S, Assié G, et al. Identification of predictive criteria for pathogenic variants of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH) gene ARMC5 in 352 unselected patients. *Eur J Endocrinol*. 2022 Jul 1;187(1):123–34.
35. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 Mutations in Macronodular Adrenal Hyperplasia with Cushing's

- Syndrome . *New England Journal of Medicine*. 2013 Nov 28;369(22):2105–14.
36. Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemonoine K, Guignat L, et al. ARMC5 mutations in a large cohort of primary macronodular adrenal hyperplasia: Clinical and functional consequences. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Jun 1;100(6):E926–35.
 37. Chasseloup F, Bourdeau I, Tabarin A, Regazzo D, Dumontet C, Ladurelle N, et al. Loss of KDM1A in GIP-dependent primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia with Cushing’s syndrome: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021 Dec 1;9(12):813–24.
 38. Hsiao HP, Kirschner LS, Bourdeau I, Keil MF, Boikos SA, Verma S, et al. Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009;94(8):2930–7.
 39. Morelli V, Elli FM, Frigerio S, Vena W, Palmieri S, Lucca C, et al. Prevalence and clinical features of armadillo repeat-containing 5 mutations carriers in a single center cohort of patients with bilateral adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*. 2023;189(2):242–51.
 40. Albiger NM, Regazzo D, Rubin B, Ferrara AM, Rizzati S, Taschin E, et al. A multicenter experience on the prevalence of ARMC5 mutations in patients with primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: from genetic characterization to clinical phenotype. *Endocrine*. 2017 Mar 1;55(3):959–68.
 41. Elbelt U, Trovato A, Kloth M, Gentz E, Finke R, Spranger J, et al. Molecular and clinical evidence for an ARMC5 tumor syndrome: Concurrent inactivating germline and somatic mutations are associated with both primary macronodular adrenal hyperplasia and meningioma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Jan 1;100(1):E119–28.
 42. Bourdeau I, Oble S, Magne F, Lévesque I, Cáceres-Gorriti KY, Nolet S, et al. ARMC5 mutations in a large French-Canadian family with cortisol-secreting β -adrenergic/vasopressin responsive bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2016 Jan 1;174(1):85–96.
 43. Sohaib1 SA, Newell-Price2 JAJ 0 C, Trainer2 PJ, Monson2 JR, Grossman2 AB, Besser2 GM, et al. CT Appearance of the Adrenal Glands in Adrenocorticotrophic Hormone-Dependent Cushing’s Syndrome [Internet]. *AJR*. 1999. Available from: www.ajronline.org
 44. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. Vol. 30, *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. Elsevier USA; 2017. p. 520–34.
 45. Debillon E, Velayoudom-Cephise FL, Salenave S, Caron P, Chaffanjon P, Wagner T, et al. Unilateral adrenalectomy as a first-line treatment of cushing’s syndrome in patients with primary bilateral macronodular adrenal

- hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Dec 1;100(12):4417–24.
46. Debono M, Harrison RF, Chadarevian R, Gueroult C, Abitbol JL, Newell-Price J. Resetting the abnormal circadian cortisol rhythm in adrenal incidentaloma patients with mild autonomous cortisol secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017 Sep 1;102(9):3461–9.
 47. Elsayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*. 2023 Jan 1;46:S19–40.
 48. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L et al. ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020 Jan 1;41(1):111-188.49. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1994;9(8):1137–41.
 50. Mariani BM de P, Nishi MY, Wanichi IQ, Brondani VB, Lacombe AMF, Charchar H, et al. Allelic Variants of ARMC5 in Patients With Adrenal Incidentalomas and in Patients With Cushing’s Syndrome Associated With Bilateral Adrenal Nodules. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Feb 7;11.
 51. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, et al. Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) Gene: A clinical and genetic investigation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(6).