



# **UNIVERSITÀ DI PADOVA**

## **SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA**

### **Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia**

**Dipartimento di Medicina**

**Direttore: Prof. Paolo Simioni**

**U.O.C. di Endocrinologia**

**Direttore: Prof.ssa Caterina Mian**

### **TESI DI LAUREA**

#### **Presentazione clinica iniziale e diagnosi di Malattia di Cushing: studio retrospettivo di coorte**

**Relatore:** Prof. Filippo Ceccato

**Correlatore:** Dott. Alessandro Mondin

**Laureanda:** Beatrice Ros

**Matricola:** 2020668

**ANNO ACCADEMICO 2025/2026**



# INDICE

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>RIASSUNTO .....</b>                                 | <b>3</b>  |
| <b>1. INTRODUZIONE .....</b>                           | <b>5</b>  |
| <b>1.1 Sindrome di Cushing.....</b>                    | <b>5</b>  |
| 1.1.1 Definizione.....                                 | 5         |
| 1.1.2 Classificazione .....                            | 5         |
| 1.1.3 Epidemiologia.....                               | 6         |
| 1.1.4 Presentazione Clinica.....                       | 7         |
| 1.1.5 Esami Ematochimici .....                         | 11        |
| 1.1.6 Diagnosi .....                                   | 11        |
| 1.1.7 Comorbidità .....                                | 17        |
| 1.1.8. Terapia .....                                   | 21        |
| <b>1.2 L’approccio Cushingomic.....</b>                | <b>28</b> |
| <b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO .....</b>                 | <b>31</b> |
| <b>2.1 Obiettivo primario.....</b>                     | <b>31</b> |
| <b>2.2. Obiettivi secondari .....</b>                  | <b>31</b> |
| <b>3. MATERIALI E METODI.....</b>                      | <b>33</b> |
| <b>3.1 Pazienti .....</b>                              | <b>33</b> |
| <b>3.2 Valutazione biochimica .....</b>                | <b>33</b> |
| <b>3.3 Valutazione clinica .....</b>                   | <b>35</b> |
| <b>3.4 Analisi statistica.....</b>                     | <b>36</b> |
| <b>4. RISULTATI.....</b>                               | <b>39</b> |
| <b>4.1 Ipertensione Arteriosa .....</b>                | <b>39</b> |
| 4.1.1 Peggioramento del controllo pressorio .....      | 42        |
| <b>4.2 Fenotipo iperandrogenico .....</b>              | <b>44</b> |
| <b>4.3 Fenotipo PMOS .....</b>                         | <b>47</b> |
| <b>4.4 Dislipidemia .....</b>                          | <b>50</b> |
| <b>4.5 Alterazione del metabolismo glucidico .....</b> | <b>52</b> |
| 4.5.1 Peggioramento del controllo del diabete .....    | 55        |
| <b>4.6 Fenotipo Cushingoide.....</b>                   | <b>57</b> |

|                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.6.1 Stratificazione in base al grado di espressione fenotipica di ipercortisolismo .....                           | 57         |
| <b>4.7 Dimensioni dell'adenoma ipofisario .....</b>                                                                  | <b>61</b>  |
| <b>4.8 Altre variabili .....</b>                                                                                     | <b>63</b>  |
| <b>4.9 Influenza dei livelli basali di ACTH e cortisolo sulla risposta ai test dinamici di secondo livello .....</b> | <b>64</b>  |
| <b>4.10 Analisi della variabilità intra-personale .....</b>                                                          | <b>66</b>  |
| <b>5. DISCUSSIONE.....</b>                                                                                           | <b>73</b>  |
| <b>5.1 Ipertensione arteriosa.....</b>                                                                               | <b>73</b>  |
| 5.1.1 Peggioramento del controllo pressorio.....                                                                     | 76         |
| <b>5.2 Iperandrogenismo .....</b>                                                                                    | <b>77</b>  |
| <b>5.3 Fenotipo PMOS.....</b>                                                                                        | <b>79</b>  |
| <b>5.4 Dislipidemia .....</b>                                                                                        | <b>81</b>  |
| <b>5.5 Alterazione del metabolismo glucidico .....</b>                                                               | <b>82</b>  |
| <b>5.5.1 Peggioramento del controllo del diabete.....</b>                                                            | <b>85</b>  |
| <b>5.6 Fenotipo clinico .....</b>                                                                                    | <b>86</b>  |
| 5.6.1 Stratificazione in base al grado di espressione fenotipica di ipercortisolismo .....                           | 87         |
| <b>5.7 Dimensioni dell'adenoma ipofisario .....</b>                                                                  | <b>88</b>  |
| <b>5.8 Altre variabili .....</b>                                                                                     | <b>90</b>  |
| <b>5.9 Influenza dei livelli basali di ACTH e cortisolo sulla risposta ai test dinamici di secondo livello .....</b> | <b>93</b>  |
| <b>5.10 Analisi della variabilità intra-personale .....</b>                                                          | <b>95</b>  |
| <b>6. CONCLUSIONE .....</b>                                                                                          | <b>97</b>  |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                                                            | <b>100</b> |

## ABSTRACT

**Background.** Cushing's syndrome is a complex and rare clinical entity, characterised by chronic and inappropriate exposure to elevated glucocorticoid levels. Its diagnosis is often delayed by years because of the marked non-specificity of its clinical presentation. Indeed, many of its signs and symptoms (such as visceral obesity, arterial hypertension, impaired glucose metabolism and dyslipidaemia) overlap with disorders commonly encountered in the general population. This clinical overlap may mislead the physician and fragment the management pathway, leading to the isolated treatment of individual comorbidities. Understanding whether and how the different initial clinical presentations and the “phenotypic burdens” correlate with the biochemical abnormalities of first- and second-line tests is of fundamental importance in optimising the diagnostic work-up.

**Aim.** To analyse the impact and correlation of the initial clinical presentation with the first- and second-line biochemical profiles used in the diagnostic algorithm for Cushing's syndrome; to assess the influence of pituitary adenoma size on the response patterns to first- and second-line diagnostic tests; and to evaluate the correlation between baseline hormone levels and the magnitude of the secretory responses to the second-line dynamic tests (CRH and desmopressin), as well as to estimate the intra-individual variability of the main biomarkers.

**Methods.** Single-centre retrospective study of 96 patients with endogenous hypercortisolism (2012–2026): 65 with Cushing's disease (CD) and 31 with adrenal CS (ACS); mean age 44 years. First-line tests (UFC and LNSC by mass spectrometry, LDDST) and ACTH were analysed and, in the CD cohort, the second-line dynamic tests (CRH, desmopressin, high-dose dexamethasone) as the incremental delta of ACTH and cortisol. Comorbidities were classified according to international criteria and the specific phenotypic signs (striae rubrae, facies lunaris, buffalo hump, proximal myopathy, ecchymoses) were stratified by overall burden (0; 1–2;  $\geq 3$  signs). Pituitary adenomas were classified as microadenomas when measuring  $<10$  mm in maximum diameter and as macroadenomas when measuring  $\geq 10$  mm. Intra-individual variability was expressed as the coefficient of variation (CV%). The analysis employed non-parametric tests and Spearman's correlation ( $p < 0.05$ ).

**Results.** Hypertension class differed only for UFC ( $p = 0.009$ ), unexpectedly lower in resistant hypertension; dyslipidaemia showed a similar trend (lower UFC,  $p = 0.019$ ). The hyperandrogenic phenotype (UFC  $p = 0.014$ ; ACTH  $p = 0.012$ ) and the PMOS-like phenotype (UFC  $p = 0.004$ ; ACTH  $p = 0.007$ ) were confirmed as expressions of more severe hypercortisolism. Among the first-line tests, only UFC increased with phenotypic burden ( $\geq 3$  signs vs none,  $p = 0.033$ ). The post-stimulation incremental deltas, in particular the post-DDAVP and post-HDDST deltas, were significantly lower in patients with resistant hypertension and in patients with diabetes mellitus. Adenoma size correlated exclusively with higher ACTH values ( $p = 0.026$ ). A strong negative correlation emerged between pre-stimulation cortisol and the percentage response to the dynamic tests (CRH and DDAVP,  $p < 0.001$  for both). Intra-individual variability was wide, with a median UFC CV of 31.4%.

**Conclusions.** The initial clinical expression and the metabolic comorbidities of patients with hypercortisolism do not correlate in a linear and uniform manner with point biochemical levels. Cardiometabolic comorbidities are paradoxically associated with lower UFC levels or with less pronounced responses to the stimulation and suppression tests; accordingly, urinary cortisol alone is not sufficient for screening and its results must be integrated with the other first-line tests. Conversely, the hyperandrogenic and PMOS phenotypes indicate more active forms of disease, with higher UFC and ACTH in the pituitary forms and higher LDDST in the adrenal forms. Moreover, the choice of first-line tests should not be influenced by adenoma size. The data call for extreme caution in using the deltas of the second-line tests (CRH and DDAVP) as isolated diagnostic criteria in patients with marked hypercortisolism, since high pre-stimulation values physiologically and arithmetically compress the dynamic response. Finally, the high intra-individual variability observed (median UFC CV of 31.4%) reaffirms the need for multiple, repeated collections in order to avoid false negatives and misinterpretation, supporting an integrated and personalised diagnostic approach.

## RIASSUNTO

**Background.** La Sindrome di Cushing è un'entità clinica complessa e rara, caratterizzata da un'esposizione cronica e inappropriata a livelli elevati di glucocorticoidi. La diagnosi è spesso ritardata di anni a causa della marcata aspecificità della sua presentazione clinica. Molti dei suoi segni e sintomi (come l'obesità viscerale, l'ipertensione arteriosa, le alterazioni del metabolismo glucidico e la dislipidemia) si sovrappongono infatti a patologie di comune riscontro nella popolazione generale. Questa sovrapposizione clinica rischia di confondere il medico e di frammentare il percorso terapeutico trattando le singole comorbidità in modo isolato. Comprendere se e in che modo le differenti presentazioni cliniche iniziali e i "carichi fenotipici" correlino con le alterazioni biochimiche dei test di primo e secondo livello è di fondamentale importanza per ottimizzare l'iter diagnostico.

**Scopo.** Analizzare l'impatto e la correlazione della presentazione clinica iniziale con i profili biochimici di primo e secondo livello utilizzati nell'algoritmo diagnostico della Sindrome di Cushing. Valutare l'influenza delle dimensioni dell'adenoma ipofisario sui pattern di risposta ai test diagnostici di primo e secondo livello. Valutare la correlazione tra livelli ormonali basali e magnitudo delle risposte secretorie ai test dinamici di secondo livello (CRH e desmopressina) e stimare la variabilità intra-personale dei principali biomarcatori.

**Metodi.** Studio retrospettivo monocentrico su 96 pazienti con ipercortisolismo endogeno (2012–2026): 65 con Malattia di Cushing (CD) e 31 con CS surrenalica (ACS); età media 44 anni. Sono stati analizzati i test di primo livello (UFC e LNSC mediante spettrometria di massa, LDDST) ACTH e, nella coorte CD, i test dinamici di secondo livello (CRH, desmopressina, desametasone ad alte dosi) come delta incrementale di ACTH e cortisolo. Le comorbidità sono state classificate secondo criteri internazionali e i segni fenotipici specifici (striae rubrae, facies lunaris, gibbo, miopatia prossimale, ecchimosi) stratificati per carico complessivo (0; 1–2;  $\geq 3$  segni). È stato considerato microadenoma un tumore con diametro inferiore a 10 mm, mentre macroadenoma un tumore con diametro  $\geq 10$  mm. La variabilità intra-personale è stata espressa come coefficiente di variazione (CV%). L'analisi ha impiegato test non parametrici e la correlazione di Spearman ( $p < 0.05$ ).

**Risultati.** La classe di ipertensione differiva solo per l'UFC ( $p=0.009$ ), inatteso più basso nell'ipertensione resistente; la dislipidemia mostrava trend simile (UFC inferiore,  $p=0.019$ ). Il fenotipo iperandrogenico (UFC  $p=0.014$ ; ACTH  $p=0.012$ ) e quello simil-PMOS (UFC  $p=0.004$ ; ACTH  $p=0.007$ ) si confermavano espressione di un ipercortisolismo più severo. Tra i test di primo livello, solo l'UFC è aumentato con il carico fenotipico ( $\geq 3$  segni vs assenza,  $p=0.033$ ). I delta di incremento post-stimolo, in particolare i delta post-DDAVP e post-HDDST sono risultati significativamente inferiori nei pazienti con ipertensione resistente e nei pazienti affetti da diabete mellito. Le dimensioni dell'adenoma correlano esclusivamente con valori di ACTH più elevati ( $p=0.026$ ). È emersa una forte correlazione negativa tra cortisolo pre-stimolo e risposta percentuale ai test dinamici (CRH e DDAVP,  $p < 0.001$  in entrambi). La variabilità intra-personale è risultata ampia, con CV mediano dell'UFC del 31,4%.

**Conclusioni.** L'espressione clinica iniziale e le comorbidità metaboliche dei pazienti con ipercortisolismo non correlano in modo lineare e uniforme con i livelli biochimici puntuali. Le comorbidità cardiometaboliche si associano paradossalmente a minori livelli di UFC o a risposte meno brillanti ai test di stimolo e soppressione, indi per cui la sola cortisoloria non è sufficiente per lo screening e i suoi risultati vanno integrati con gli altri test di primo livello. Al contrario, i fenotipi iperandrogenico e PMOS indicano forme più attive di malattia, con UFC e ACTH più elevati nelle forme ipofisarie e LDDST più elevato in quelle surrenaliche. La scelta dei test di primo livello, inoltre, non deve essere influenzata dalle dimensioni dell'adenoma. I dati invitano a estrema cautela nell'utilizzo dei delta dei test di secondo livello (CRH e DDAVP) come criteri diagnostici isolati nei pazienti con ipercortisolismo marcato, poiché elevati valori pre-stimolo comprimono fisiologicamente e aritmeticamente la risposta dinamica. L'elevata variabilità intra-personale riscontrata (CV mediano dell'UFC del 31,4%) ribadisce infine la necessità di raccolte multiple e ripetute per evitare falsi negativi e interpretazioni errate, a sostegno di un approccio diagnostico integrato e personalizzato.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Sindrome di Cushing

### 1.1.1 Definizione

La sindrome di Cushing si definisce come l'insieme di segni e sintomi derivanti da un'esposizione prolungata e inappropriatamente elevata ai glucocorticoidi, sia di origine esogena che endogena. Le forme esogene, o iatrogene, sono le più frequenti, e sono legate alla somministrazione cronica di glucocorticoidi a fini terapeutici. Le forme endogene, invece, sono determinate da un eccesso di secrezione ormonale che porta in maniera diretta o indiretta a uno stato di ipercortisolismo. Una forma esogena deve essere sempre esclusa prima di avviare l'iter diagnostico per le forme endogene (1,2).

### 1.1.2 Classificazione

La sindrome di Cushing rappresenta un'entità clinica complessa, la cui classificazione si basa su criteri fisiopatologici che permettono di distinguere diverse forme in base all'origine dell'eccesso di glucocorticoidi. La prima grande suddivisione è quella tra sindrome di Cushing esogena ed endogena.

All'interno della sindrome di Cushing endogena, il criterio classificativo fondamentale è rappresentato dalla dipendenza o indipendenza dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH).

Le forme ACTH-dipendenti costituiscono la maggioranza dei casi, rappresentando circa il 70-85% di tutte le forme endogene, e in questo caso, l'ipercortisolismo è sostenuto da una produzione incontrollata di ACTH da parte di un adenoma ipofisario o da un tumore in sede extrasellare (ectopica). La forma più comune di sindrome di Cushing ACTH-dipendente è la malattia di Cushing (Cushing disease, CD) causata da adenomi ipofisari corticotropi, che generalmente si presentano come microadenomi, ossia lesioni di diametro inferiore a 10 mm. La seconda forma ACTH-dipendente è la sindrome di Cushing ectopica. In questa variante, la secrezione di ACTH proviene da tumori neuroendocrini non ipofisari, di cui il polmone rappresenta la sede più frequente di origine.

Le forme ACTH-indipendenti costituiscono il 15-30% dei casi di sindrome di Cushing endogena e sono caratterizzate da livelli plasmatici di ACTH soppressi

(<10 pg/mL), poiché la produzione autonoma di cortisolo da parte del surrene esercita un feedback negativo sull'ipofisi. La forma più comune di sindrome di Cushing ACTH-indipendente è l'adenoma surrenalico unilaterale cortisolo-secrente, una neoplasia benigna che origina dalla zona fascicolata della corteccia surrenalica. Secondo per frequenza è poi il carcinoma surrenalico, una neoplasia maligna a rapida crescita. Tra le altre forme più rare di sindrome di Cushing ACTH-indipendente si annoverano le iperplasie surrenaliche bilaterali, che comprendono due entità distinte: l'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria (PBMAH) e l'iperplasia surrenalica micronodulare, tra cui figura la malattia adrenocorticale nodulare pigmentata primaria (PPNAD) (1,3,4).

Focalizzandosi invece sull'origine dello stimolo patologico all'ipersecrezione ormonale si distingueranno le seguenti forme di ipercortisolismo endogeno:

- Forma primaria: l'ipersecrezione origina direttamente dalla corteccia surrenalica, che produce cortisolo in modo autonomo, indipendentemente dalla stimolazione da parte dell'ACTH;
- Forma secondaria: l'ipercortisolismo è sostenuto da un'ipersecrezione di ACTH da parte di un adenoma ipofisario che stimola in modo eccessivo le ghiandole surrenali;
- Forma terziaria: estremamente rara, è determinata da un'ipersecrezione di CRH (corticotropin-releasing hormone) a livello ipotalamico che stimola cronicamente le cellule corticotrope ipofisarie, causando iperplasia corticotropa, ipersecrezione di ACTH e conseguente ipercortisolismo (1,3,4).

### **1.1.3 Epidemiologia**

L'incidenza della sindrome di Cushing endogena resta di difficile definizione, in quanto la patologia è ritenuta significativamente sottodiagnosticata a causa dell'aspecificità dei suoi sintomi. I dati più recenti indicano un'incidenza annuale stimata in circa 1,8–4,5 casi per milione di individui mentre la prevalenza globale è di circa 39-79 casi per milione, con un rapporto donne: uomini di 4:1 per tutte le cause considerate. La sindrome di Cushing ectopica presenta invece una distribuzione tra i sessi sostanzialmente paritaria (1,3). L'età mediana alla diagnosi è di 41,4 anni, con un range che va dai 5 ai 75 anni (5).

Studi di screening in popolazioni selezionate hanno rivelato una prevalenza di ipercortisolismo endogeno molto superiore a quella attesa nella popolazione generale, configurando il concetto di "hidden hypercortisolism". In queste popolazioni l'ipercortisolismo endogeno risulta clinicamente "mascherato", per cui non si manifesta con il fenotipo classico della sindrome di Cushing, ma si presenta esclusivamente attraverso comorbidità metaboliche, ossee o cardiovascolari che vengono erroneamente attribuite ad altre cause. L'ipercortisolismo nascosto, analogamente alla sindrome di Cushing conclamata, si associa a un aumento significativo del rischio di fratture, malattia cardiovascolare e mortalità, per cui è di fondamentale importanza riuscire a identificarlo per poter impostare una terapia mirata (6). Il position statement della Società Italiana di Endocrinologia ha formulato raccomandazioni specifiche su "chi" e "come" sottoporre a screening per la sindrome di Cushing in 8 popolazioni cliniche distinte, tra cui pazienti con DM2/obesità, ipertensione, osteoporosi, iperandrogenismo, disturbi dell'umore, incidentalomi surrenalici/ipofisari, infezioni atipiche ed eventi trombotici (7).

#### **1.1.4 Presentazione Clinica**

La presentazione clinica della Sindrome di Cushing è caratterizzata da significativa variabilità, passando da quadri modesti, insidiosi per la diagnosi, fino a scenari severi a rapida evoluzione. Non vi sono sintomi o segni univoci per l'ipercortisolismo, tant'è che nella forma mild la clinica può sovrapporsi ad altre patologie più comuni, quali la Sindrome Metabolica o la Sindrome Ovarica Poliendocrino-Metabolica (PMOS) (3). In un paziente affetto è quindi possibile riscontrare:

- **Obesità centrale:** uno dei segni rilevati più frequentemente, documentato da un patologico aumento del BMI (il 33-48% dei pazienti risulta sovrappeso, il 25-100% risulta obeso). L'eccesso di grasso associato all'ipercortisolismo ha preferenzialmente sede viscerale piuttosto che sottocutanea, con aumento del diametro di vita, tronco e faccia (8). Invece ne sono risparmiati gli arti, che anzi risultano sottili anche in conseguenza dell'ipercatabolismo proteico conseguente all'eccesso di cortisolo;
- **Ipertensione arteriosa:** segno comune, riscontrato nel 50-75% dei pazienti. La sensibilità dell'ipertensione nell'indicare una CS è del 78%. Assieme a

dislipidemia, diabete e ipercoagulabilità contribuisce all'aumento del rischio cardiovascolare in questi pazienti (3,9);

- Diabete mellito di tipo 2 (T2DM): presente in circa il 30% dei pazienti al momento della diagnosi. Nella maggior parte dei casi, ma non in tutti, il T2DM si risolve dopo la remissione (10);
- Aumentata suscettibilità alle infezioni, specialmente opportunistiche, dovuta all'effetto inibitorio dei glucocorticoidi su entrambi il sistema immunitario innato e adattativo. Questo può poi portare ad un effetto rebound dopo la remissione, responsabile dello sviluppo o della slatentizzazione di patologie autoimmuni (8);
- Disturbi neuropsichiatrici: soprattutto depressione maggiore (prevalenza 50-81%) e ansia (prevalenza 66%), ma anche disturbi del ritmo sonno-veglia. Tra le comorbidità cortisolo-correlate ha la più alta specificità (9);
- Eventi tromboembolici (TVE): l'odds ratio è 18 volte più alto rispetto alla popolazione sana. A questa manifestazione si accompagna paradossalmente una maggior tendenza al sanguinamento data da fragilità capillare e atrofia cutanea;
- Calo della libido e ipogonadismo negli uomini, irregolarità mestruali e oligo/amenorrea nelle donne. Nelle pazienti il quadro può imitare una PMOS con irsutismo, acne, oligoamenorrea, insulino resistenza e aumento di peso. L'irsutismo si riscontra nell'80% delle donne affette per via dello stimolo alla secrezione di androgeni surrenalici a partire dall'eccesso di ACTH. La sede più frequente è quella facciale. La diagnosi differenziale è quindi difficile, in quanto anche nella PMOS l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene può essere alterato, con aumento del cortisolo urinario o del cortisolo salivare notturno. Inoltre, il trattamento con metirapone o osilodrostat nelle donne aumenta ulteriormente le concentrazioni di androgeni, peggiorando acne e irsutismo (8).

Questo corteo sintomatologico risulta quindi comune a diverse patologie, rendendo difficoltosa la diagnosi. Ciò nonostante, altri segni si distinguono per la loro più elevata specificità, risultando quindi di maggiore aiuto nello smascherare un eccesso di cortisolo (3):

- **Striae Rubrae:** presenti nel 50% dei casi si distinguono dalle comuni smagliature o striae distensae per la larghezza ( $>1\text{cm}$ ) e il colorito rosso intenso-violaceo. Si localizzano tipicamente su addome, fianchi, cosce, mammelle e ascelle, colpendo maggiormente pazienti di sesso maschile. Con la terapia tendono a regredire e diventare più pallide ma a differenza degli altri segni non guariscono completamente (8);
- **Facili ecchimosi:** presenti nel 35–65% dei casi, compaiono in seguito a traumi minimi o apparentemente spontanei e si localizzano tipicamente sugli arti e nelle aree esposte a microtraumi quotidiani. A differenza delle ecchimosi comuni, tendono ad essere più estese, più frequenti e sproporzionate rispetto all'entità del trauma. Non sono state riscontrate differenze significative di prevalenza tra i due sessi (8);
- **Facies Lunar e pletora facciale:** ispessimento del grasso facciale che arrotonda i contorni del volto, spesso accompagnato da pletora facciale (colorito rosso-violaceo) dovuta a teleangectasie (4). Le manifestazioni dermatologiche sono comuni nella sindrome di Cushing, con prevalenza del 60-90%. Sono secondarie all'effetto dei glucocorticoidi sulla proliferazione dei cheratinociti e dei fibroblasti dermici, nonché la sintesi e il turnover di collagene e mucopolisaccaridi, portando quindi ad atrofia cutanea e fragilità vascolare;
- **Gibbo di bufalo:** si manifesta come un cuscinetto adiposo ingrandito nella parte posteriore del collo, a livello della giunzione cervico-toracica. Questo accumulo di grasso fa parte del pattern di ridistribuzione adiposa tipico dell'ipercortisolismo, che include anche deposizione di grasso nelle aree temporali, sopraclavicolari e viscerali (11);

- Fragilità scheletrica: fratture vertebrali si verificano nel 30–50% dei pazienti. La densitometria (DXA) della colonna lombare può mostrare una bassa densità minerale ossea (BMD), ma eventuali fratture si possono riscontrare anche in pazienti con BMD nei limiti della norma o nel range dell'osteopenia (10);
- Debolezza muscolare prossimale: altro segno frequente, con range di prevalenza tra 42% e 83%, maggiore nel sesso maschile. Tende a colpire gli arti inferiori nella loro parte prossimale (8) per cui si manifesta tipicamente con: difficoltà ad alzarsi da una sedia senza l'aiuto delle braccia, a salire le scale, o a sollevare oggetti sopra la testa (4). Ha eziologia multifattoriale e vi contribuiscono: incremento ponderale, catabolismo proteico delle estremità e ipokaliemia (secondaria ad un effetto mineralcorticoide-like del cortisolo a dosi eccessive).

La sindrome di Cushing nel bambino presenta caratteristiche cliniche distintive rispetto all'adulto. Il segno più caratteristico e frequente è l'aumento ponderale associato a rallentamento della crescita staturale, presente rispettivamente nel 90% e nell'83% dei pazienti pediatrici (12).

#### **1.1.4.1 Clinica nella malattia di Cushing**

Nel caso della malattia di Cushing, oltre alle manifestazioni dell'eccesso di cortisolo, possono coesistere in alcuni casi manifestazioni legate all'effetto massa. Queste sono relativamente poco frequenti poiché circa il 90% degli adenomi corticotropi sono microadenomi (<10 mm) e solo il 10% circa sono macroadenomi (1). Tuttavia, quando si ha il coinvolgimento di strutture anatomiche parasellari, le manifestazioni compressive possono essere clinicamente significative:

- Difetti del campo visivo per compressione del chiasma ottico da parte dell'estensione soprasellare dell'adenoma, di cui il pattern tipico è l'emianopsia bitemporale, dovuta alla compressione delle fibre nasali che decussano nel chiasma (13);

- Cefalea da aumento della pressione intrasellare;
- Ipopituitarismo da compressione dei vasi portali ipofisari con interruzione del trasporto degli ormoni ipotalamici all'adenoipofisi e iperprolattinemia da disconnessione (14).

### **1.1.5 Esami Ematochimici**

Oltre ai test specifici per l'ipercortisolismo, i pazienti con sindrome di Cushing presentano frequentemente le seguenti alterazioni di laboratorio:

- Alterazioni dell'emocromo, con effetti diversi in base al sesso: nelle donne si osserva tipicamente un aumento dell'ematocrito e dell'emoglobina, mentre negli uomini si verifica paradossalmente una riduzione di questi parametri (15);
- Leucocitosi neutrofila con linfopenia, eosinopenia, monocitopenia e basopenia;
- Alterazioni dei parametri coagulativi: riduzione del tempo di tromboplastina parziale attivata; fibrinogeno, fattore di von Willebrand e fattore VIII aumentati, nonché una fibrinolisi compromessa mediata da livelli elevati di inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 (PAI-1) e di antiplasmina (10);
- Alterazioni metaboliche: iperglicemia e iperinsulinemia, ipokaliemia, ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia (HDL variabile);
- Alterazioni del metabolismo osseo: ipercalciuria (più raramente ipocalcemia), ipofosfatemia e riduzione di osteocalcina e fosfatasi alcalina ossea (1).

### **1.1.6 Diagnosi**

Il decorso insidioso e progressivo della sindrome di Cushing fa sì che la diagnosi sia spesso ritardata di anni, considerando anche che molte delle manifestazioni cliniche si sovrappongono ad altre patologie di maggior riscontro nella popolazione generale, come la già citata Sindrome Metabolica. Altro fattore che ritarda l'avvio di una terapia mirata è la tendenza a trattare le varie manifestazioni singolarmente, non riuscendo a collocarle nel quadro sindromico scatenante.

La diagnosi richiede la conferma biochimica dell'ipercortisolismo. Il primo passo fondamentale è escludere l'uso di glucocorticoidi esogeni, che rappresenta la causa

più comune di sindrome di Cushing. Una volta dimostrata la presenza di ipercortisolismo, anche al fine di un planning terapeutico efficace, bisogna identificarne la fonte (5,9).

#### **1.1.6.1 Diagnosi di ipercortisolismo**

Al giorno d'oggi i test diagnostici per la sindrome di Cushing vanno a valutare:

- alterazione del ritmo circadiano con cortisolo salivare notturno (LNSC);
- compromissione del feedback dei glucocorticoidi con il test di soppressione con desametasone da 1 mg overnight (LDDST);
- aumento del cortisolo biodisponibile con il cortisolo libero urinario delle 24 ore (UFC);

La sensibilità dei 3 test combinati risulta superiore al 90%, mentre la specificità è complessivamente inferiore, più alta per LNSC e LDDST, più bassa per UFC (10).

La sindrome di Cushing non è abbastanza frequente nella popolazione generale per giustificare screening routinari per l'ipercortisolismo endogeno nelle categorie a rischio. Lo screening indiscriminato (ad esempio in tutti i pazienti diabetici) non è raccomandato e porterebbe a un numero elevato di falsi positivi. Pertanto, nella pratica clinica è ampiamente adottato un approccio di individuazione dei casi (case-finding) che parte dalla presentazione clinica, per poi adoperare i test di screening di primo livello solo nei casi con adeguata probabilità pre-test (9,10).

Le linee guida suggeriscono delle categorie di pazienti da sottoporre a screening:

- Pazienti con sintomi inusuali per l'età (ad esempio osteoporosi in donne in premenopausa e uomini <65 anni);
- Pazienti con sintomi multipli e progressivi, in particolare quando sono presenti segni e sintomi più specifici per la sindrome di Cushing;
- Pazienti con incidentaloma surrenalico, anche se asintomatici;
- Bambini con aumento ponderale e ritardo di crescita staturale (1,3).

Il test del cortisolo salivare notturno (LNSC) si basa sull'assunto che i pazienti con CS perdano il normale nadir circadiano della secrezione di cortisolo. La Pituitary Society raccomanda di cominciare con questo test quando disponibile, vista la sua facilità di esecuzione. Ne sono raccomandate almeno due misurazioni distinte, da effettuare la sera poco prima di coricarsi. Per evitare falsi positivi, la raccolta

dovrebbe idealmente avvenire all'orario abituale di coricamento piuttosto che alla mezzanotte, poiché il nadir del cortisolo è strettamente legato all'inizio del sonno. Popolazioni in cui LNSC può essere falsamente alterato sono: anziani, diabetici, ipertesi e soggetti con shift nel ritmo sonno veglia (es. turnisti notturni). A loro volta, fattori come il fumo, l'assunzione di liquirizia e il sanguinamento gengivale possono falsare il risultato (4,11).

Il test di soppressione con desametasone 1 mg overnight (LDDST) prevede la somministrazione di 1 mg di desametasone tra le 23:00 e mezzanotte, con misurazione del cortisolo plasmatico alle 8-9 del mattino successivo. Negli individui sani, una dose sovralfisiologica di desametasone inibisce la secrezione di vasopressina e ACTH, riducendo così i livelli di cortisolo. Pertanto, un valore di cortisolo sierico  $< 1,8 \mu\text{g/dL}$  ( $50 \text{ nmol/L}$ ) alle 08:00 del mattino è considerato una risposta normale. A cut-off più elevati, ad esempio  $5 \mu\text{g/dL}$  ( $138 \text{ nmol/L}$ ), la sensibilità del test al desametasone (LDDST) si riduce.

Questo secondo test viene preferito per pazienti con adenoma surrenalico, lavoratori notturni o disturbi del ritmo circadiano. Risultati falsamente positivi possono verificarsi in caso di malassorbimento del desametasone dovuto ad aumentato transito intestinale, diarrea cronica o malattia celiaca, terapia concomitante con induttori del CYP3A4 (ad esempio fenobarbital) e aumento della globulina legante i corticosteroidi (CBG) dovuto a estrogeni orali o gravidanza. Per individuare questi casi risulta utile la misurazione concomitante della desametasonemia (10,18).

L'esame del cortisolo libero urinario delle 24 ore (UFC) richiede 2-3 raccolte per ogni paziente a causa della variabilità fino al 50% dei campioni consecutivi. Infatti, come il LNSC, anche l'UFC dipende da una raccolta accurata da parte del paziente. Sesso, indice di massa corporea (BMI), età, volumi urinari molto elevati o molto bassi e l'apporto sodico possono influenzarne i livelli e devono essere considerati nell'interpretazione (1,10).

Per pazienti con alta probabilità clinica, due test differenti con livelli elevati di cortisolo possono confermare la diagnosi di ipercortisolismo.

Vi sono, tuttavia, una serie di condizioni in cui si verifica un'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene che produce un ipercortisolismo lieve, clinicamente e biochimicamente sovrapponibile alla vera sindrome di Cushing, ma senza una causa neoplastica sottostante. Questi quadri vengono raggruppati sotto il nome di

“pseudo-Cushing” e possono essere ricondotti a: disturbi psichiatrici, alcolismo, obesità, diabete mellito scarsamente controllato, PMOS, anoressia nervosa, esercizio fisico eccessivo, grave stress fisico e gravidanza. Nello pseudo-Cushing, l'ipercortisolismo è tipicamente lieve: il cortisolo libero urinario (UFC) è quasi sempre entro 3 volte il limite superiore della norma e il LNSC evidenzia la conservazione del ritmo circadiano di secrezione del cortisolo. In casi dubbi si può ricorrere al test combinato desametasone-CRH (Dex-CRH): si basa sul principio che solo i pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente mostreranno una risposta del cortisolo al CRH dopo soppressione con desametasone. Alcuni studi suggeriscono anche il test alla desmopressina (DDAVP): la desmopressina stimola la secrezione di ACTH nei pazienti con malattia di Cushing (gli adenomi corticotropi esprimono recettori V1b della vasopressina), ma non stimola significativamente l'ACTH nei soggetti sani o nello pseudo-Cushing. Ha alta specificità per la malattia di Cushing ed è meno complesso e costoso del test Dex-CRH.

La storia clinica, la durata dei sintomi e un esame obiettivo mirato restano comunque un fondamentale punto di partenza per escludere un ipercortisolismo neoplastico (10,19).

#### **1.1.6.2 Identificazione della sorgente dell'ipercortisolismo**

Una volta confermato l'ipercortisolismo endogeno, la misurazione dell'ACTH plasmatico mattutino (8-9 del mattino) aiuta a distinguere tra forme ACTH-dipendenti e ACTH-indipendenti:

- ACTH soppresso ( $<10$  ng/L) in almeno 2 test eseguiti in giorni diversi indica sindrome di Cushing surrenalica ACTH-indipendente (adenomi surrenalici, iperplasia surrenalica bilaterale primaria, carcinoma surrenalico).
- ACTH normale o elevato ( $\geq 10$  ng/L) indica malattia di Cushing ACTH-dipendente o sindrome di Cushing ectopica. Livelli estremamente elevati ( $>250$  ng/L) sono più comuni nella sindrome ectopica, ma c'è sovrapposizione sostanziale. In realtà un livello di ACTH tra 10-20 pg/mL è indeterminato e può anche indicare una produzione surrenalica inadeguata a sopprimere completamente l'ACTH. In questo caso risulta quindi utile ripetere il test (10).

Una volta individuata una forma ACTH-indipendente si procede con l'imaging surrenalico con TC o RMN. La TC surrenalica con protocollo dedicato (adrenal protocol CT) è l'esame di prima scelta e consente di orientare la diagnosi verso una delle quattro principali entità: adenoma corticosurrenalico, carcinoma corticosurrenalico, iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare primaria (PBMAH) e malattia adrenocorticale nodulare micronodulare (inclusa la PPNAD). Il parametro chiave è la densità in unità Hounsfield (HU) alla fase basale senza contrasto:

- $\leq 10$  HU: virtualmente sempre benigno (specificità 98% per adenoma); non necessario ulteriore imaging.
- 0-20 HU: zona grigia;  $> 90\%$  benigni; controllo a 6-12 mesi o RM chemical shift.
- $> 20$  HU: sensibilità del 97% per malignità; richiede valutazione multidisciplinare e considerazione di [18F]FDG-PET/TC (1,3,20).

La seconda linea per le forme indeterminata è data dalla RM con chemical shift, che rileva il grasso intracitoplasmatico tipico degli adenomi tramite la caduta di segnale nelle immagini in opposizione di fase (21).

Va però ricordato che la presenza di una lesione surrenalica non è sufficiente per la diagnosi di sede; infatti solo il 10% degli incidentalomi surrenalici sono secernenti cortisolo e non si può escludere la presenza di masse surrenaliche non secernenti (più frequenti) o secernenti ormoni diversi dal cortisolo, in concomitanza con una forma di sindrome di Cushing ACTH-indipendente (22).

Nel caso di una forma ACTH-dipendente, si apre una diagnosi differenziale complessa per l'individuazione della sede, che può essere ipofisaria o ectopica, poiché nessun esame è in grado di stabilirne con certezza l'origine. Il primo passo è eseguire una risonanza magnetica ipofisaria ad alta risoluzione (1,5T o 3,0T) con gadolinio. Tuttavia, poiché la maggior parte delle lesioni è molto piccola, utilizzando la risonanza magnetica standard da 1,5T, solo circa il 50% dei microadenomi viene chiaramente visualizzato, mentre una risoluzione più elevata con magneti da 3T o 7T può aumentare il rischio di individuare incidentalomi potenzialmente non correlati al disturbo, la cui frequenza raggiunge circa il 10% nella popolazione generale. Indi per cui, nel momento in cui si individuasse una lesione con diametro  $\geq 10\text{mm}$ , la probabilità che sia essa stessa la fonte

dell'ipercortisolismo è giustificatamente elevata da non richiedere ulteriori esami di approfondimento. Qualora il diametro fosse invece inferiore ai 6-9mm il consensus prevede di procedere con ulteriori esami da combinare all'imaging: il test da stimolo con CRH e con desmopressina seguito da una TC total body. Nel caso in cui i requisiti per porre diagnosi non fossero ancora rispettati (imaging negativo e/o test discordanti) si procede con il sampling bilaterale dei seni petrosi inferiori (BIPSS).

Il test di stimolo con CRH si basa sul fatto che gli adenomi ipofisari secernenti ACTH rispondono alla stimolazione con CRH aumentando la produzione di ACTH e cortisolo, mentre i tumori ectopici secernenti ACTH non rispondono alla stimolazione con CRH. Si vanno a somministrare 100 µg di CRH umano in bolo endovenoso e a misurare i valori di ACTH e cortisolo plasmatici a intervalli regolari (tipicamente a -15, 0, 15, 30, 45, 60 minuti). Si raccolgono i valori di picco (peakACTH e peakcortisol) e si calcola l'incremento percentuale ( $\Delta\%$ ACTH e  $\Delta\%$ cortisol) (1,10,23). Il test alla desmopressina (DDAVP) si basa sull'espressione differenziale dei recettori della vasopressina (V2 e V1b/V3): gli adenomi ipofisari ACTH-secernenti sovraesprimono questi recettori e rispondono alla desmopressina aumentando la produzione di ACTH e cortisolo, mentre i tumori ectopici generalmente non esprimono questi recettori e non mostrano risposta significativa. Si somministrano 10 µg di desmopressina per via endovenosa e si misurano ACTH e cortisolo plasmatici a intervalli regolari dopo la somministrazione, andando a calcolarne l'aumento percentuale. Il test CRH mostra accuratezza leggermente superiore rispetto alla desmopressina, ma a prescindere da ciò, nessun test dinamico ha specificità del 100% e risultati discordanti si verificano in circa un terzo dei pazienti.

Al giorno d'oggi il campionamento dei seni petrosi inferiori (IPSS) rimane quindi il gold standard quando i test biochimici e l'imaging sono inconclusivi. L'interpretazione si basa sul rapporto tra ACTH nel seno petroso inferiore e ACTH periferico: un rapporto  $\geq 2$  al basale o  $\geq 3$  dopo stimolazione con CRH è indicativo di malattia di Cushing, mentre valori inferiori suggeriscono una fonte ectopica. Per migliorare l'accuratezza diagnostica, si è aggiunta la misurazione della prolattina nei prelievi, confermando l'adeguato drenaggio venoso e permettendo la normalizzazione del rapporto ACTH. Infine, seppur il suo utilizzo a questo scopo

sia limitato, il gradiente inter-sinusale (rapporto tra ACTH nel seno petroso destro e sinistro) può suggerire la localizzazione dell'adenoma ipofisario (3,10,24).

Nei rari casi in cui il CRH non sia disponibile o il BIPSS non sia accessibile, come alternativa non invasiva, può essere effettuato il test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDST, 8 mg). Questo test può essere utile soprattutto in combinazione con altri test dinamici: la combinazione dell'HDDST con il test alla desmopressina ha mostrato una sensibilità del 95,5% e un valore predittivo positivo del 98,4% per la malattia di Cushing (25). Il test si basa sul fatto che nella malattia di Cushing, i recettori per i glucocorticoidi dell'adenoma mantengono una parziale capacità di risposta al feedback negativo. Pertanto, dosi elevate di desametasone (8 mg) sono in grado di sopprimere parzialmente la secrezione di ACTH e, di conseguenza, di cortisolo. Al contrario, la maggior parte dei tumori ectopici secernenti ACTH non esprime recettori funzionali per i glucocorticoidi e quindi non risponde alla soppressione con desametasone ad alte dosi (10,11).

### **1.1.7 Comorbidità**

Per migliorare la gestione a lungo termine del paziente con Sindrome di Cushing bisogna considerare in che modo le comorbidità e le complicanze associate possano compromettere la qualità di vita. In molti casi bisognerebbe trattare le comorbidità contemporaneamente, se non prima, di intraprendere il trattamento specifico per la sindrome di Cushing atto a ridurre l'ipercortisolismo.

La sindrome di Cushing è ancora oggi associata a una mortalità circa tre volte superiore alla popolazione generale, dovuta principalmente a malattie cardiovascolari o infettive e alle loro conseguenze sistemiche, in particolare infarto miocardico, ictus e sepsi. Anche dopo la normalizzazione dei livelli di cortisolo il rischio sembrerebbe restare superiore a quello della popolazione generale (26).

- Comorbidità cardiovascolari e metaboliche:

La sindrome di Cushing si caratterizza per una forma specifica di sindrome metabolica presente in almeno due terzi dei pazienti, che include:

- Ipertensione arteriosa: associata alla durata e gravità dell'ipercortisolismo. Dopo la remissione, l'ipertensione persiste nel 25-36% dei casi;
- Diabete mellito: presente nel 21-47% dei pazienti. Dopo la remissione, il diabete si risolve nel 56% dei pazienti;
- Dislipidemia: presente nel 40-70% dei pazienti, persiste nel 75% dopo la remissione;
- Obesità viscerale: tre quarti dei pazienti rimangono sovrappeso o obesi a 5 anni dalla remissione (3,8,27).

L'insulino-resistenza è una delle complicanze metaboliche cardinali della sindrome di Cushing, presente nel 27–87% dei pazienti, e rappresenta il meccanismo fisiopatologico centrale che collega l'ipercortisolismo al diabete mellito, alla dislipidemia e all'aumentato rischio cardiovascolare. L'ipercortisolismo cronico induce insulino-resistenza attraverso azioni simultanee su quattro tessuti bersaglio:

- Fegato: stimolazione della gluconeogenesi tramite induzione trascrizionale di enzimi come la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK) e la glucosio-6-fosfatasi (G6Pase), riduzione della fosforilazione del recettore insulinico e conseguente perdita dell'effetto soppressivo dell'insulina sulla gluconeogenesi;
- Muscolo scheletrico: ridotta traslocazione di GLUT4 con ridotto uptake muscolare del glucosio, inibizione della sintesi di glicogeno e atrofia muscolare;
- Tessuto adiposo: ruolo cruciale dell'11 $\beta$ -HSD1, che catalizza la conversione intracellulare del cortisone inattivo in cortisolo attivo, amplificando l'azione glucocorticoide locale nel grasso viscerale. Il cortisolo in eccesso nel tessuto adiposo attiva anche la via JNK che blocca il segnale insulinico e richiama macrofagi nel grasso viscerale, alimentando lo stato infiammatorio sistemico. Infine, il cortisolo stimola la lipolisi aggravando ulteriormente il quadro;

- Pancreas: effetto inibitorio diretto sulle cellule  $\beta$ , compromettendo sia la secrezione insulinica basale sia quella stimolata dal glucosio, e alterando la pulsatilità del rilascio insulinico ad alta frequenza. Questa inadeguata compensazione  $\beta$ -cellulare determina la progressione dall'iperinsulinemia compensata all'intolleranza glucidica e, infine, al diabete mellito conclamato (8,28–30).

L'ipercortisolismo costituisce inoltre un fattore di rischio per la genesi di modificazioni strutturali e funzionali del cuore che contribuiscono alla mortalità di questi pazienti. Rispetto a controlli matchati per età, sesso e valori di pressione arteriosa, si trovano con maggior frequenza e gravità rimodellamento concentrico ed ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro. Questo rimodellamento cardiaco è almeno parzialmente indipendente dall'elevazione della pressione arteriosa ed è causato dall'effetto diretto del cortisolo sul miocardio, tanto che è stato coniato il termine "cardiomiopatia da sindrome di Cushing". Dopo la remissione si è visto che le alterazioni strutturali del cuore non sono del tutto reversibili, ma in genere si ha comunque un miglioramento con riduzione della massa cardiaca in eccesso. Inoltre, le funzioni sistolica e diastolica generalmente si normalizzano (3,8,27).

L'infiammazione cronica di basso grado, l'iperinsulinemia, la dislipidemia e l'ipertensione contribuiscono all'aumento dello spessore intima-media e all'aterosclerosi accelerata, presente in circa il 30% dei pazienti (8).

- Disordini immunologici:  
Durante la fase attiva della malattia l'eccesso di glucocorticoidi porta all'instaurarsi di un quadro immunologico complesso che combina immunosoppressione selettiva e infiammazione cronica di basso grado (31). Dopo la remissione invece si può assistere a un rebound immunitario, responsabile dello sviluppo o della riacutizzazione di malattie autoimmuni.
- Comorbidità muscolo-scheletriche:  
Il coinvolgimento scheletrico nella sindrome di Cushing è quasi universale: un'alterazione dello stato osseo (osteopenia, osteoporosi) è stata descritta nel 64-100% dei pazienti. Le fratture scheletriche, che rappresentano l'esito clinico più temibile, si verificano nell'11-76% dei pazienti, con fratture

vertebrali presenti in oltre il 50% dei pazienti con sindrome di Cushing attiva. È importante sottolineare che le fratture possono essere la prima manifestazione clinica della sindrome, portando alla diagnosi (8,32).

La miopatia nella sindrome di Cushing è causata dall'eccesso di glucocorticoidi che induce atrofia delle fibre muscolari di tipo 2 attraverso meccanismi sia anti-anabolici che catabolici. In particolare, la debolezza muscolare prossimale è uno dei segni più caratteristici e specifici della sindrome, presente nel 60-82% dei pazienti. Il recupero muscolare è particolarmente problematico: la miopatia può richiedere mesi o anni per risolversi, e in molti casi non si risolve completamente. I predittori di disfunzione muscolare a lungo termine identificati in analisi multivariata includono l'età, il rapporto vita-fianchi, l'emoglobina glicata al basale e le concentrazioni di IGF-1 nel post-operatorio (8,33).

- Comorbidità neuro-psichiatriche:

La depressione maggiore è la complicanza psichiatrica più frequente, con prevalenza del 50–81%. L'esposizione cronica del cervello all'eccesso di cortisolo causa alterazioni strutturali e funzionali profonde nell'ippocampo, nell'amigdala e nella corteccia prefrontale. Dopo la remissione, la depressione si risolve solo nel 52% dei pazienti. Disturbi d'ansia e disturbi del sonno coinvolgono rispettivamente il 66% e il 60% dei pazienti in fase attiva e contribuiscono significativamente alla riduzione della qualità della vita (8,34).

- Comorbidità endocrine:

L'ipercortisolismo cronico compromette simultaneamente l'asse gonadico, tiroideo e somatotropo attraverso meccanismi prevalentemente centrali, ma anche periferici, determinando un quadro di ipopituitarismo funzionale multiassiale. Per quanto riguarda l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi l'inibizione avviene a più livelli: inibizione del GnRH ipotalamico, riduzione delle gonadotropine e effetti diretti sulle gonadi. Negli uomini, l'ipogonadismo è presente nell'82% dei casi alla diagnosi; dopo la chirurgia curativa, persiste nel 26% a 12 mesi. Nelle donne, l'oligo-amenorrea si verifica nel 70–80% dei casi, con aspetto ovarico variabile da policistico a ipotrofico. Nella sindrome di Cushing ACTH-dipendente, l'ACTH stimola cronicamente la zona reticolare del surrene, aumentando la produzione di

androgeni surrenalici. Le manifestazioni cliniche più rilevanti si hanno nelle donne e includono: irsutismo, acne, alopecia e oligo-amenorrea (8,35). Questo spettro sintomatologico viene condiviso anche dalla Sindrome Ovarica Poliendocrino-Metabolica (PMOS) e rientra a far parte dei criteri di Rotterdam, configurandosi come un ulteriore dilemma diagnostico per questa patologia. La distinzione tra le due condizioni ha importanti ricadute terapeutiche: da un lato il trattamento della CS con inibitori della steroidogenesi surrenalica come metirapone o osilodrostat può paradossalmente aumentare i livelli di androgeni, peggiorando acne e irsutismo, dall'altro la terapia estroprogestinica, cardine del trattamento della PMOS, non è generalmente raccomandata durante la fase attiva della CS per l'elevato rischio tromboembolico (8).

### **1.1.8 Terapia**

Gli obiettivi della terapia della sindrome di Cushing (SC) sono gerarchicamente organizzati:

1. Eliminare la causa primaria dell'ipercortisolismo e raggiungere la remissione biochimica (eucortisolismo);
2. Trattare le comorbidità associate e i fattori di rischio cardiovascolari;
3. Prevenire le recidive. (36)

#### **1.1.8.1 Trattamento della Malattia di Cushing (CS)**

##### **1.1.8.1.1 Prima linea: terapia chirurgica**

La chirurgia trans-naso-sfenoidale con adenomectomia selettiva è il trattamento di prima linea della malattia di Cushing.

La valutazione preoperatoria deve includere un'analisi sistematica delle comorbidità indotte dall'ipercortisolismo, che aumentano significativamente il rischio chirurgico. Obiettivi in questa fase sono l'ottimizzazione di pressione arteriosa, cortisolemia, elettroliti, glicemia, stato nutrizionale e capacità fisica (29). Particolare attenzione va posta al rischio di tromboembolismo venoso (TEV) che in questi pazienti risulta oltre 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale, con un OR di 17,82 rispetto ai pazienti con adenomi ipofisari non funzionanti (10). La tromboprofilassi deve essere considerata al momento della diagnosi di SC attiva e continuata per 3 mesi dopo la remissione biochimica.

La terapia medica preoperatoria è indicata in situazioni specifiche come pazienti gravemente malati con complicanze potenzialmente letali dell'ipercortisolismo o nei casi di ipercortisolismo grave con necessità di rapido controllo del cortisolo. I farmaci più utilizzati nel preoperatorio sono gli inibitori della steroidogenesi (ketoconazolo o metirapone) (10).

La remissione, tipicamente definita come concentrazioni sieriche di cortisolo postoperatorio inferiori a 55 nmol/L ( $<2 \mu\text{g/dL}$ ), si osserva in circa l'80% dei pazienti con microadenomi e nel 60% di quelli con macroadenomi. Le complicanze postoperatorie (ipopituitarismo anteriore, diabete insipido, fistola liquorale) si verificano in meno del 20% dei pazienti. L'insufficienza surrenalica centrale si sviluppa in tutti i pazienti in remissione e persiste frequentemente per oltre un anno, richiedendo dosi sovrafisiologiche di glucocorticoidi seguite da un lento tapering. Il follow-up clinico e biochimico a vita è raccomandato per la diagnosi precoce di recidiva, che si verifica in circa il 13% dei pazienti a 10 anni (1,10). Il rischio di recidiva può essere stimato in base a una serie di parametri biochimici, in particolare:

- Cortisolo nadir postoperatorio: un nadir  $<2 \mu\text{g/dL}$  nelle prime 24–48 ore è il miglior predittore di remissione a lungo termine (37);
- Durata della terapia sostitutiva con glucocorticoidi: una durata più lunga è un fattore protettivo contro la recidiva, poiché riflette una soppressione più profonda dell'asse HPA e quindi una resezione più completa (38);
- Test alla desmopressina (DDAVP) post-operatorio: la persistenza della risposta alla desmopressina dopo la chirurgia, definita da un picco di cortisolo  $>100 \text{ nmol/L}$  ( $3,6 \mu\text{g/dL}$ ), suggerisce la presenza di tessuto adenomatoso residuo ed è associata a un rischio aumentato di recidiva (39).
- Caratteristiche tumorali:
  - Dimensioni del tumore: i macroadenomi hanno tassi di recidiva significativamente più elevati rispetto ai microadenomi;
  - Invasione (grado di Knosp): un grado di Knosp 0 è protettivo contro la recidiva (40);

Il cortisolo salivare notturno (LNSC) è il test più sensibile per la diagnosi precoce di recidiva e deve essere eseguito annualmente dopo il recupero dell'asse HPA (41). Nel caso di una recidiva, la via del reintervento resta generalmente percorribile e

viene proposta nel caso in cui vi sia un residuo visibile alla RMN, tenendo conto però di un minor tasso di remissione (40/70%) rispetto al primo intervento (42).

#### **1.1.8.1.2 Seconda linea: terapia medica**

La terapia medica è indicata quando la chirurgia non è fattibile, è fallita, o in attesa degli effetti della radioterapia. Gli inibitori della steroidogenesi surrenalica sono generalmente utilizzati come prima scelta farmacologica per la loro efficacia e rapida azione. Non agiscono sull'adenoma ipofisario né ripristinano il ritmo circadiano dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, ma bloccano direttamente uno o più enzimi della catena biosintetica del cortisolo nella corteccia surrenalica:

- Osilodrostat: agisce selettivamente su CYP11B1 e CYP11B2, rappresentando l'inibitore più potente nel ridurre il cortisolo, con risposta entro ore. In quasi la metà dei pazienti causa insufficienza surrenalica, per cui richiede titolazione lenta e monitoraggio stretto (43);
- Metirapone: inibitore selettivo della 11 $\beta$ -idrossilasi, con risposta entro ore. Tuttavia, devia la sintesi steroidea verso gli altri composti e comporta un rebound dell'ACTH per la perdita del feedback negativo del cortisolo. L'incremento di sintesi degli androgeni surrenalici può esitare in irsutismo ed acne nella donna, mentre l'aumento dei mineralcorticoidi può causare IPA ed ipokaliemia;
- Ketoconazolo: antifungino che inibisce reversibilmente vari enzimi della steroidogenesi, in primis 11 $\beta$ -idrossilasi e 17,20 liasi. Per il rischio di epatotossicità il monitoraggio enzimi epatici è obbligatorio. Può dare ipogonadismo con ginecomastia, disfunzione erettile e calo della libido negli uomini, ma risulta utile nelle donne con iperandrogenismo (44);
- Etomidate: è riservato ai casi gravi in cui il paziente non può assumere farmaci orali, in ambiente di terapia intensiva. Sussiste il rischio di una crisi addisoniana iatrogena, per cui richiede stretto monitoraggio;
- Mitotane: adrenolitico con azione lenta, raramente utilizzato nella malattia di Cushing, ma farmaco di scelta per il carcinoma surrenalico.

Nei pazienti con malattia di Cushing che presentano ipercortisolismo persistente o recidivante possono essere preferiti i farmaci ipofisari diretti, in quanto sono gli unici che non si limitano a contrastare gli effetti periferici dell'eccesso di cortisolo,

ma agiscono sull'adenoma direttamente, con potenziale stabilizzazione o riduzione delle sue dimensioni:

- Pasireotide: analogo della somatostatina. Ha come principale effetto collaterale l'iperglicemia, riscontrata fino nell'80% dei pazienti, per inibizione delle incretine e dell'insulina;
- Cabergolina (usata off-label): agonista dopaminergico D2. Può essere preferita in donne giovani che desiderano una gravidanza.

Per il trattamento dell'iperglicemia in pazienti con sindrome di Cushing endogena e diabete o intolleranza glucidica si predilige il Mifepristone, antagonista competitivo del recettore dei glucocorticoidi. Questo farmaco, tuttavia, agisce a livello recettoriale senza ridurre la secrezione di cortisolo, con rischio di progressione tumorale (1,10).

#### **1.1.8.1.3 Radioterapia**

La radioterapia è utilizzata come trattamento adiuvante di seconda linea nei pazienti con malattia persistente o recidivante dopo chirurgia transfenoidale, o come terapia primaria nei pazienti non candidabili alla chirurgia. La modalità preferita, quando fattibile, è la radiochirurgia stereotassica (Gamma Knife, LINAC, protoni), purchè vi sia una distanza di almeno 3–5 mm tra il tumore e il chiasma ottico. Questa tecnica consiste nella somministrazione di una dose singola elevata di circa 20–25 Gy al margine tumorale. Data la lunga latenza (2-5 anni per raggiungere il controllo ormonale nei casi di remissione), è necessaria una terapia medica adiuvante con inibitori della steroidogenesi per controllare l'ipercortisolismo nel periodo di attesa, con valutazione periodica del cortisolo off-medication ogni 6–12 mesi.

La complicanza più frequente e clinicamente rilevante è l'ipopituitarismo, osservato nel 25-50% dei pazienti, con incidenza che aumenta nel tempo (10).

### **1.1.8.2 Trattamento della Sindrome di Cushing surrenalica**

#### **1.1.8.2.1 Prima linea: terapia chirurgica**

La scelta dell'approccio chirurgico dipende dalla causa surrenalica:

- Adenoma corticosurrenalico unilaterale: la surrenectomia laparoscopica unilaterale è il gold standard, con tasso di guarigione prossimo al 100% e mortalità di circa 0,5%. È necessaria la terapia sostitutiva con steroidi a dosi da stress (metilprednisolone o idrocortisone) nel peri e post-operatorio fino al recupero dell'asse HPA (36);
- Carcinoma corticosurrenalico (ACC): è indicata la surrenectomia open con linfadenectomia locoregionale, con l'obiettivo di ottenere una resezione R0 senza violazione della capsula tumorale. Il mitotane adiuvante è raccomandato nei casi ad alto rischio di recidiva;
- Iperplasia macronodulare bilaterale primaria (PBMAH/BMAD): la surrenectomia bilaterale laparoscopica è il gold standard. In casi selezionati con asimmetria, la surrenectomia unilaterale del surrene dominante può essere considerata per evitare l'insufficienza surrenalica permanente (45);
- Malattia nodulare pigmentata primaria (PPNAD): anche in questo caso la surrenectomia bilaterale è generalmente indicata, con possibilità di surrenectomia unilaterale in casi selezionati (1,5).

Dopo l'intervento, la terapia sostitutiva con glucocorticoidi va proseguita fino al recupero dell'asse HPA, che può richiedere mesi o anni (45).

#### **1.1.8.2.2 Seconda linea: terapia medica**

La terapia farmacologica viene proposta in scenari clinici ben definiti in cui la chirurgia non è praticabile, non è stata curativa, o è necessario un controllo rapido dell'ipercortisolismo. I farmaci si dividono in diverse categorie in base al meccanismo d'azione:

- Inibitori della steroidogenesi surrenalica: osilodrostat, ketoconazolo, metirapone, etomidate, mitotane.

Tra questi il mitotane è l'unico farmaco con una duplice azione: inibisce la steroidogenesi e distrugge selettivamente le cellule corticosurrenali. È quindi il farmaco di scelta nel carcinoma corticosurrenalico, dove è utilizzato sia come terapia adiuvante dopo resezione chirurgica sia nel

trattamento della malattia avanzata/metastatica. La terapia sostitutiva con idrocortisone e/o fludrocortisone è generalmente necessaria per tutta la durata del trattamento e spesso a vita, data la distruzione del tessuto surrenalico (1,10,44);

- Antagonista del recettore glucocorticoide: mifepristone. Si tratta di un approccio farmacologico concettualmente diverso rispetto agli inibitori della steroidogenesi. Anziché ridurre la produzione di cortisolo, il mifepristone agisce come antagonista competitivo del recettore glucocorticoide (GR-II) a livello dei tessuti periferici, impedendo il legame col cortisolo e l'attivazione della trascrizione genica mediata dai glucocorticoidi. Il razionale del suo impiego nella CS surrenalica risiede nella capacità di bloccare gli effetti metabolici dell'ipercortisolismo, in particolare l'iperglicemia e l'insulino-resistenza, indipendentemente dalla causa e dal livello di cortisolo circolante (10).

Molti pazienti con CS surrenalica, in particolare quelli con carcinoma corticosurrenalico, richiedono una terapia combinata con più inibitori della steroidogenesi somministrati simultaneamente. Si fa quindi affidamento sull'effetto sinergico ottenuto bloccando la via steroidogenica a più livelli enzimatici, consentendo un controllo più rapido e completo dell'ipercortisolismo con dosi potenzialmente inferiori di ciascun singolo farmaco, riducendo così gli effetti avversi dose-dipendenti. In particolare, nell'ipercortisolismo severo e potenzialmente letale, un regime ad alte dosi combinando mitotane, metirapone e ketoconazolo ha dimostrato di ridurre il cortisolo libero urinario a livelli quasi normali entro 24-48 ore, con miglioramento drammatico delle condizioni cliniche (1,36).

#### **1.1.8.3 Surrenectomia bilaterale**

La surrenectomia bilaterale (BADx) è il trattamento definitivo per ottenere un controllo rapido e completo dell'ipercortisolismo quando tutte le altre terapie hanno fallito o non sono praticabili. Garantisce la risoluzione immediata dell'eccesso di cortisolo, ma comporta la necessità di terapia sostitutiva permanente con glucocorticoidi e mineralcorticoidi e il rischio di progressione del tumore corticotropo (sindrome di Nelson) nei pazienti con malattia di Cushing. Raramente viene applicata primariamente, soltanto in casi estremamente gravi (in genere da

secrezione ectopica di ACTH) in cui è richiesta immediata normalizzazione della cortisolemia. In donne in età fertile e con desiderio riproduttivo non ancora soddisfatto, può venire preferita alla radioterapia col fine di evitare un ipogonadismo ipogonadotropo che interferirebbe con la fertilità. Il tasso di crisi surrenaliche è di circa 9,3 episodi per 100 pazienti-anno, dato che sottolinea l'importanza dell'educazione del paziente e della gestione delle situazioni di stress. Il follow-up risulta quindi fondamentale e consiste nell'esecuzione di una RM ipofisaria a 3 mesi dalla BADx, poi ogni 12 mesi per i primi 3 anni, successivamente ogni 2-4 anni in base ai livelli di ACTH e ai parametri clinici; si affianca il dosaggio dell'ACTH plasmatico regolare ed eventuale trattamento della progressione tumorale (1,36,46,47).

## 1.2 L'approccio Cushingomic

Il termine "Cushingomic" descrive un approccio integrato alla diagnosi dell'ipercortisolismo endogeno che combina dati clinici (segni, sintomi, comorbidità), test biochimici di screening e tecniche computazionali avanzate (analisi delle componenti principali, clustering K-means, reti neurali) in un unico modello predittivo.

Questo paradigma si inserisce in un contesto più ampio di medicina di precisione applicata alla sindrome di Cushing (CS), che include la metabolomica steroidea, la trascrittomica, la genomica tumorale e l'intelligenza artificiale, con l'obiettivo di superare i limiti dei test diagnostici tradizionali e personalizzare il trattamento.

Il problema clinico affrontato è la sovrapposizione tra la presentazione della sindrome di Cushing e condizioni molto comuni nella popolazione generale (obesità, diabete, ipertensione, sindrome metabolica) che portano un elevato numero di pazienti a sottoporsi a screening biochimici con risultati di difficile interpretazione. Si è ipotizzato quindi che un'analisi integrata e computazionale di dati biochimici e clinici potesse migliorare la capacità discriminativa rispetto ai singoli test (DST, UFC, LNSC), superandone i limiti intrinseci di sensibilità e specificità che variano in base alla popolazione studiata e al metodo di dosaggio.

Lo studio fondante dell'approccio Cushingomic ha analizzato 655 pazienti (615 senza SC e 40 con SC confermata), integrando test di screening biochimici con dati clinici mediante tecniche di data science:

- Analisi delle componenti principali (PCA): da questa tecnica è emerso che i vettori delle comorbidità metaboliche (diabete, ipertensione, obesità) non erano allineati con i vettori dei test di screening biochimico (DST, UFC, LNSC). Ciò ha dimostrato che le comorbidità cortisolo-correlate erano più comuni nei pazienti senza CS, con scarsa correlazione con i test di screening. Questo dato cruciale evidenzia come la presenza di un fenotipo metabolico (il cosiddetto "fenotipo cushingoide") non debba essere interpretata come conferma di CS, né debba influenzare l'interpretazione dei test biochimici.
- Clustering K-means: ha identificato tre fenotipi distinti tra i pazienti senza SC:

- Cluster 1: pazienti anziani con osteoporosi e test di screening alterati. Questo cluster è particolarmente insidioso perché i test biochimici possono risultare falsamente positivi, probabilmente a causa dell'attivazione dell'asse HPA legata all'età, allo stress cronico o alla secrezione autonoma lieve di cortisolo (MACS) da incidentalomi surrenalici;
- Cluster 2: fenotipo ipertensivo-metabolico. Questo cluster rappresenta la popolazione che più frequentemente viene inviata allo screening per SC a causa della sovrapposizione fenotipica, ma che ha la più bassa probabilità di CS vera;
- Cluster 3: giovani con bassa probabilità di CS conclamata. In questo gruppo, un test di screening positivo ha un valore predittivo positivo particolarmente basso e richiede conferma rigorosa.
- Rete neurale: combinando test di screening e presentazione clinica come input per predire la diagnosi di CS, ha raggiunto una precisione del 99% e un'accuratezza dell'86% nella coorte di validazione.

Un risultato chiave è che il cutoff del LDDST dovrebbe essere adattato alla popolazione: negli incidentalomi surrenalici con secrezione autonoma lieve di cortisolo (MACS), il cutoff per differenziare la SC conclamata dovrebbe essere aumentato a 196 nmol/L (rispetto ai tradizionali 50 nmol/L).

La sfida futura è tradurre questo modello in uno strumento clinico validato e accessibile (9).



## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

### **2.1 Obiettivo primario**

Analizzare la correlazione tra i pattern di risposta ai test diagnostici di primo livello (cortisolo libero urinario delle 24 ore - UFC, cortisolo salivare notturno - LNSC, test di soppressione con desametasone a basse dosi - LDDST) e di secondo livello (test al CRH, test alla desmopressina, test al desametasone ad alte dosi, limitatamente alle forme di origine ipofisaria) e il fenotipo clinico e le comorbidità dei pazienti affetti da sindrome di Cushing, al fine di valutare se specifiche caratteristiche cliniche possano guidare il percorso diagnostico e orientare l'interpretazione dei risultati diagnostici.

### **2.2 Obiettivi secondari**

Valutare l'influenza delle dimensioni dell'adenoma ipofisario sui pattern di risposta ai test diagnostici di primo e secondo livello nei pazienti affetti da malattia di Cushing, con particolare riferimento alla distinzione tra microadenomi e macroadenomi, al fine di determinare se il volume tumorale condizioni l'entità della risposta ai test dinamici.

Analizzare la correlazione tra i livelli basali di ACTH e cortisolo sierico e l'entità della risposta ai test dinamici di secondo livello (test al CRH e test alla desmopressina), espressa come delta incrementale rispetto al basale, al fine di stabilire se i valori pre-stimolo possano predire la magnitudine della risposta secretoria e, di conseguenza, influenzare l'interpretazione diagnostica dei test di conferma.

Valutare la variabilità intra-personale di alcuni dei principali marcatori biochimici utilizzati nella diagnosi della sindrome di Cushing (cortisolo libero urinario (UFC), cortisolo salivare notturno (LNSC), cortisolo sierico basale e ACTH) in una coorte di pazienti de novo alla diagnosi, quantificandola tramite il coefficiente di variazione (CV) su misurazioni ripetute effettuate in giorni diversi durante la fase di inquadramento diagnostico.



### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Pazienti**

Abbiamo analizzato una coorte retrospettiva di pazienti con Sindrome di Cushing (CS) seguiti presso il nostro centro tra il 2012 e il 2026. I casi eleggibili dovevano presentare diagnosi di CS stabilita sulla base di esami di laboratorio (cortisolo libero urinario delle 24 ore, cortisolo salivare notturno, LDDST). La diagnosi di sede è stata stabilita attraverso: valori di ACTH sierico, dati di imaging e, per le forme ACTH-dipendenti, test dinamici (test alla corticotropina, test di soppressione con desametasone a basse e alte dosi e/o test alla desmopressina) ed eventualmente cateterismo dei seni petrosi. La diagnosi è stata confermata dai reperti istologici e/o dalla presenza di ipocortisolismo postoperatorio o dal cateterismo dei seni petrosi, quest'ultimo per quanto riguarda la sola malattia di Cushing. I pazienti considerati inoltre dovevano presentare misurazioni di UFC e/o LNSC con spettrometria di massa (vedi sotto). Sono stati esclusi eventuali pazienti in caso di dati mancanti o di scarsa aderenza al percorso diagnostico. Al fine di ridurre potenziali distorsioni e bias legati a fenotipi clinici particolarmente severi o di natura oncologica, sono inoltre stati esclusi i pazienti con sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH e quelli con carcinoma della corteccia surrenalica.

#### **3.2 Valutazione biochimica**

Gli esami di laboratorio analizzati comprendevano innanzitutto UFC e LNSC. Entrambi sono stati misurati tramite spettrometria di massa (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) (48,49). Se disponibili, i valori di UFC e LNSC sono stati valutati come media di più misurazioni in giorni diversi, per tenere conto della loro nota variabilità. La severità dell'ipercortisolismo è stata definita in base all'UFC ("mild" per valori sotto 2 volte il limite superiore di norma, "moderate" se valori tra 2 e 5 volte il limite superiore di norma, "severe" se valori oltre 5 volte il limite superiore di norma). ACTH e cortisolo sono stati analizzati mediante dosaggio immunometrico. Abbiamo considerato come valori basali più valori non trattati di ACTH e cortisolo registrati nel periodo precedente all'inizio della terapia, andando poi a ricavarne la media assieme ai valori basali ottenuti dal test alla corticotropina (CRH) e alla desmopressina (DDAVP). Per entrambi i test, i valori basali sono stati calcolati come media delle determinazioni ai tempi -15 e 0 minuti. Per la valutazione della soppressibilità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene è stato

impiegato il test di soppressione con desametasone a basse dosi (1 mg overnight). Ove disponibile, contestualmente al prelievo del cortisolo post-soppressione, è stato dosato il desametasone sierico al fine di verificare l'adeguato assorbimento del farmaco. Solamente per la coorte con Malattia di Cushing sono stati presi in considerazione nell'analisi statistica i delta del cortisolo post-HDDST, CRH e DDAVP e i delta dell'ACTH post-CRH e DDAVP, calcolati come rapporto tra differenza picco - media basale e la media basale.

Abbiamo valutato le comorbidità metaboliche associate alla CD. Il diabete mellito e il prediabete sono stati definiti in accordo con i criteri diagnostici dell'American Diabetes Association (ADA). La diagnosi si è basata sulla glicemia a digiuno, sull'emoglobina glicata (HbA1c) e, ove disponibile, sul test orale di tolleranza al glucosio (OGTT). In particolare, sono stati classificati come prediabete i soggetti che presentavano almeno uno dei seguenti criteri: glicemia a digiuno compresa tra 100 e 125 mg/dL e/o HbA1c compresa tra 42 e 47 mmol/mol (5,7-6,4%) e/o, in presenza di OGTT, glicemia a 2 ore compresa tra 140 e 199 mg/dL. Sono stati classificati come affetti da diabete mellito i soggetti che presentavano almeno uno dei seguenti criteri: glicemia a digiuno  $\geq 126$  mg/dL e/o HbA1c  $\geq 48$  mmol/mol ( $\geq 6,5\%$ ) e/o, in presenza di OGTT, glicemia a 2 ore  $\geq 200$  mg/dL, oppure terapia antidiabetica in corso. La dislipidemia è stata definita sulla base di trigliceridi elevati ( $>200$  mg/dL), ridotti livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL; inferiori a 50 mg/dL nelle donne e a 40 mg/dL negli uomini), colesterolo totale elevato ( $>200$  mg/dL), oppure in presenza di terapia ipolipemizzante in corso.

Abbiamo effettuato una valutazione della variabilità intra-personale in più misurazioni alla diagnosi per UFC, LNSC, cortisolo basale e ACTH (quest'ultimo solo per soggetti con CD). Le misurazioni considerate dovevano essere svolte in fase di inquadramento diagnostico presso la nostra struttura, in giorni diversi. Nel caso di misurazioni basali pre-test di stimolo (CRH test e test alla desmopressina) il basale considerato è stato la media tra i tempi -15' e 0' per l'analita in oggetto. Per ogni analita abbiamo selezionato il sottogruppo di pazienti che presentava almeno due misurazioni distinte. La variabilità intra-personale è stata visualizzata attraverso spaghetti plot e quantificata attraverso il coefficiente di variazione (CV).

Il CV è stato calcolato come segue:

$$SD = \sqrt{\sum \frac{(Xi - media)^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{SD}{media} \times 100$$

*SD: deviazione standard delle misurazioni svolte; Xi: misurazione singola per il paziente; CV: coefficiente di variazione dell'analita per lo specifico paziente espresso in percentuale.*

### 3.3 Valutazione clinica

Abbiamo valutato la presentazione clinica iniziale, le comorbidità metaboliche, cardiovascolari, muscoloscheletriche e psichiatriche associate alla CS. Per la caratterizzazione del fenotipo clinico sono state valutate le manifestazioni somatiche tipiche dell'ipercortisolismo cronico. In particolare, sono stati considerati i seguenti segni clinici ad elevata specificità per la sindrome di Cushing: striae rubrae, gibbo dorsale, facies lunaris, miopatia prossimale e facilità alle ecchimosi. Sovrappeso e obesità sono stati definiti e valutati tramite peso corporeo e indice di massa corporea (BMI); sono stati inoltre registrati la circonferenza vita (WC) e la circonferenza fianchi (HC). L'ipertensione arteriosa è stata definita sulla base dei valori di pressione arteriosa sistolica e diastolica (PAS  $\geq 140$  mmHg e/o PAD  $\geq 90$  mmHg) rilevati durante visite ambulatoriali oppure in presenza di terapia antipertensiva in corso; secondo la pratica clinica, i valori elevati venivano confermati dopo un periodo di riposo. L'ipertensione resistente è stata definita, in accordo secondo le linee guida ESC/ESH, come una pressione arteriosa  $\geq 130/80$  mmHg nonostante una strategia terapeutica che includa appropriate modifiche dello stile di vita, e almeno 3 principi attivi per il controllo pressorio. Per la caratterizzazione del fenotipo iperandrogenico sono state valutate le principali manifestazioni cliniche di eccesso androgenico. In particolare, sono stati considerati i seguenti segni e sintomi: irsutismo, acne, alopecia androgenica e, nelle pazienti in età fertile, irregolarità del ciclo mestruale (oligomenorrea o amenorrea). Poiché la coorte in studio comprendeva anche pazienti in post-menopausa o in preadolescenza, nelle quali il criterio dell'irregolarità mestruale non è applicabile, si è scelto di adottare una valutazione complessiva dell'iperandrogenismo clinico piuttosto che riferirsi ai criteri diagnostici della Sindrome Ovarica Poliendocrino-Metabolica (PMOS), che sono validati esclusivamente per donne in età riproduttiva.

In una seconda analisi, è stato selezionato il sottogruppo di pazienti di età compresa tra 12 e 55 anni (tenendo conto dell'atteso inizio pre-diagnosi della sintomatologia), al fine di valutare specificamente il fenotipo PMOS. In questa sottopopolazione sono stati applicati i medesimi criteri clinici sopra descritti, in accordo con parte dei criteri diagnostici di Rotterdam. Le complicanze psichiatriche sono state valutate in base a quanto riferito amnesticamente dai pazienti. In particolare, sono stati indagati i seguenti sintomi: insonnia, ansia e depressione, nonché l'eventuale assunzione di terapie psicofarmacologiche specifiche (ansiolitici, antidepressivi, ipnoinducenti). Il danno scheletrico cortisolo-dipendente è stato valutato mediante la ricerca di fratture vertebrali. Le fratture vertebrali sono state identificate sulla base dell'imaging disponibile (radiografia del rachide e/o risonanza magnetica e/o TC) e della storia clinica dei pazienti. Gli adenomi ipofisari sono stati considerati microadenomi se presentavano diametro inferiore a 10 mm, macroadenomi se il diametro era  $\geq 10$  mm.

### **3.4 Analisi statistica**

Le analisi statistiche sono state condotte mediante il software SPSS versione 24. Le variabili biochimiche di ipercortisolismo sono state considerate come variabili dipendenti continue e includevano: i test di primo livello (cortisolo libero urinario, cortisolo salivare notturno, cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1 mg di desametasone), l'ACTH plasmatico e, nei pazienti con malattia di Cushing, i delta di cortisolo e ACTH ai test di secondo livello (test al CRH, test di soppressione con desametasone ad alte dosi e/o test alla desmopressina). Tali variabili sono state analizzate in relazione alle seguenti variabili indipendenti categoriali, raggruppate per dominio clinico: fenotipo cushingoide (presenza dei segni clinici sopra citati), classe di ipertensione arteriosa (normotensione, ipertensione, ipertensione resistente), recente insorgenza/peggioramento del controllo pressorio rispetto al basale (<12 mesi), classe di indice di massa corporea (BMI), incremento ponderale rapido (<12 mesi), dislipidemia, disturbi psichiatrici (insonnia, ansia, depressione), fenotipo iperandrogenico e fenotipo PMOS (nelle pazienti di sesso femminile), classe di alterazione glicemica (normoglicemia, prediabete, diabete mellito), peggioramento del controllo glicemico recente (<12 mesi) e fratture vertebrali. Nei pazienti con malattia di Cushing ACTH-dipendente di origine ipofisaria è stata inoltre valutata la dimensione dell'adenoma ipofisario, classificata in microadenoma (<10 mm) e macroadenoma ( $\geq 10$  mm). Sono stati utilizzati test non

parametrici alla luce della ridotta numerosità della coorte in studio (non possibile assumere distribuzione normale delle variabili). Il confronto tra due gruppi è stato effettuato mediante test U di Mann-Whitney, mentre il confronto tra più gruppi è stato effettuato mediante test di Kruskal-Wallis. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. È stata applicata la correzione di Bonferroni nei confronti con multiple variabili (il valore di “p” visualizzato nei risultati è da intendersi come un valore aggiustato, già moltiplicato per il numero di confronti svolto). In caso di differenze statisticamente significative al test di Kruskal-Wallis, sono stati eseguiti confronti post-hoc a coppie per identificare tra quali gruppi si collocassero le differenze osservate.

La correlazione tra i livelli basali di ACTH e cortisolo sierico (ai tempi -15' e 0') e l'entità della risposta ai test dinamici di secondo livello (test al CRH e test alla desmopressina), espressa come delta incrementale rispetto ai valori pre-stimolo, è stata valutata mediante il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman ( $\rho$ ). I coefficienti di correlazione sono stati interpretati secondo le soglie convenzionali:  $|\rho| < 0,30$  correlazione debole,  $0,30 \leq |\rho| < 0,70$  correlazione moderata,  $|\rho| \geq 0,70$  correlazione forte. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi è stata condotta separatamente per ciascun test dinamico e per ciascun parametro basale, al fine di identificare eventuali associazioni specifiche tra i livelli pre-stimolo e la magnitudine della risposta secretoria.

L'analisi della variabilità intra-personale è stata effettuata con R (R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2022) ed R studio (Posit team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>. 2024). La variabilità è stata visualizzata attraverso grafici tipo spaghetti plot ed è stata quantificata con il coefficiente di variazione (CV) come descritto sopra. L'analisi di differenze nel CV in diversi sottogruppi è stata effettuata con tests non parametrici (Mann-Whitney per 2 gruppi o Kruskal-Wallis per 3 o più gruppi) con soglia di significatività a  $p = 0.05$ .



## 4. RISULTATI

Sulla base dei criteri di inclusione sono stati arruolati 96 pazienti con CS. Di questi 65 pazienti con Malattia di Cushing (47 donne e 18 uomini) di età compresa tra i 12 e i 70 anni al momento della diagnosi e 31 pazienti con Sindrome di Cushing surrenalica (28 donne e 3 uomini) di età compresa tra i 7 e i 75 anni al momento della diagnosi. L'età media globale alla diagnosi è di 44 anni.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a iter diagnostico e hanno ricevuto diagnosi di sindrome di Cushing presso il nostro centro.

### 4.1 Ipertensione Arteriosa

Nella coorte totale, i valori mediani di UFC sono risultati pari a 650.0 nmol/die nei pazienti senza ipertensione, 540.0 nmol/die nei pazienti con ipertensione e 345.0 nmol/die nei pazienti con ipertensione resistente ( $p=0.009$ ) (Figura 1). In particolare, pazienti con ipertensione resistente presentavano cortisoloria minore rispetto ai pazienti normotesi ( $p=0.003$ ) e agli ipertesi ( $p=0.016$ ). I valori di LNSC, LDDST e ACTH sono risultati invece sovrapponibili tra le diverse classi di ipertensione arteriosa (Tabella Ia).

Ciò viene confermato nella sottocoorte con malattia di Cushing (CD), dove i valori mediani di UFC sono risultati pari a 627.3 nmol/die nei pazienti senza ipertensione, 555.3 nmol/die nei pazienti con ipertensione e 345.0 nmol/die nei pazienti con ipertensione resistente, con una differenza ai limiti della significatività statistica ( $p=0.054$ ). Tuttavia, il confronto a coppie ha confermato che i pazienti con ipertensione resistente presentavano valori di UFC inferiori rispetto sia ai normotesi ( $p=0.029$ ) sia agli ipertesi non resistenti ( $p=0.032$ ). I valori di LNSC, LDDST e ACTH sono risultati invece sovrapponibili tra le diverse classi di ipertensione arteriosa (Tabella Ia).

Nella sottocoorte con sindrome di Cushing surrenalica (ACS), nessuno tra test di primo livello e ACTH ha dimostrato differenze in base alla classe di ipertensione arteriosa (Tabella Ia).

Per quanto riguarda i test dinamici riportati in Tabella Ib, il delta cortisolo post-HDDST ha mostrato un trend ai limiti della significatività statistica tra le tre classi pressorie ( $p=0.067$ ); ai confronti a coppie, il delta è risultato maggiore nei pazienti normotesi rispetto ai pazienti con ipertensione resistente ( $p=0.021$ ).

Il delta ACTH post CRH ha mostrato valori progressivamente inferiori all'aumentare della severità dell'ipertensione ( $p=0.021$ ). Ai confronti a coppie, i pazienti normotesi presentavano un delta maggiore rispetto ai pazienti con ipertensione resistente ( $p=0.009$ ) e agli ipertesi ( $p=0.034$ ). Il delta ACTH post DDAVP era differente nei tre gruppi ( $p=0.009$ ). Ai confronti a coppie, i pazienti con ipertensione resistente presentavano un delta inferiore rispetto ai normotesi ( $p<0.001$ ) e agli ipertesi ( $p=0.037$ ). Il delta cortisolo post DDAVP ha mostrato un trend ai limiti della significatività statistica ( $p=0.066$ ); ai confronti a coppie, il delta è risultato maggiore nei pazienti normotesi rispetto ai pazienti con ipertensione resistente ( $p=0.014$ ).

Il delta cortisolo post CRH non ha mostrato differenze significative tra i gruppi.

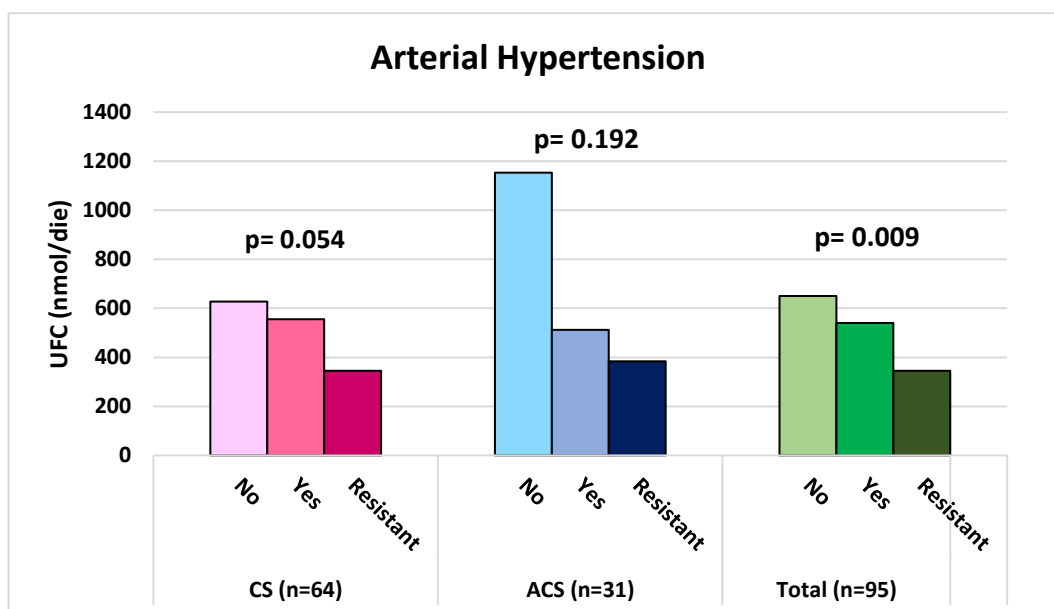


**Figura 1:** confronto tra valori mediani di UFC (nmol/die) nelle varie coorti in base alla classe di ipertensione arteriosa.

| A                     |       |           | UFC<br>(nmol/die)        | N  | p      | LDDST<br>(nmol/L)        | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)    | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)      | N  | p     |
|-----------------------|-------|-----------|--------------------------|----|--------|--------------------------|----|-------|---------------------|----|-------|---------------------|----|-------|
| Arterial Hypertension | CD    | No        | 627.3<br>[376.4;1080]    | 21 | 0.054# | 356.0<br>[136.0;456.0]   | 18 | 0.263 | 10.5<br>[4.8;15.9]  | 18 | 0.406 | 52.3<br>[31.2;66.6] | 21 | 0.523 |
|                       |       | Yes       | 555.3<br>[367.1;894.3]   | 30 |        | 289.0<br>[94.5;445.75]   | 28 |       | 8.8<br>[6.6;20.0]   | 29 |       | 45.7<br>[35.9;66.5] | 31 |       |
|                       |       | Resistant | 345.0<br>[191.1;755.0]   | 13 |        | 411.0<br>[260.5;534.0]   | 13 |       | 17.4<br>[6.5;32.8]  | 12 |       | 56.3<br>[37;146.1]  | 13 |       |
|                       | ACS   | No        | 1153.0<br>[406.2;2930.5] | 10 | 0.192  | 465.0<br>[379.5;706.0]   | 8  | 0.368 | 19.7<br>[9.1;38.7]  | 9  | 0.160 | 4.8<br>[1.7;5.0]    | 9  | 0.948 |
|                       |       | Yes       | 512.0<br>[268.5;1614.0]  | 15 |        | 545.0<br>[442.25;619.25] | 14 |       | 7.5<br>[6.0;16.2]   | 8  |       | 3.6<br>[2.1;5.0]    | 15 |       |
|                       |       | Resistant | 383.67<br>[254.4;662.0]  | 6  |        | 378.0<br>[297.5;519.5]   | 5  |       | 16.5<br>[10.6;34.5] | 5  |       | 5.0<br>[1.6;5.0]    | 5  |       |
|                       | Total | No        | 650.0<br>[383.7;1370.0]  | 31 | 0.009* | 411.0<br>[229.0;492.0]   | 26 | 0.795 | 13.2<br>[6.1;22.3]  | 27 | 0.296 | 32.3<br>[5.0;60.9]  | 20 | 0.695 |
|                       |       | Yes       | 540.0<br>[358.0;1134.2]  | 45 |        | 395.0<br>[102.2;522.5]   | 42 |       | 8.8<br>[6.4;17.7]   | 27 |       | 36.5<br>[5.0;55.1]  | 46 |       |
|                       |       | Resistant | 345.0<br>[197.5;472.0]   | 19 |        | 394.5<br>[276.75;530.5]  | 18 |       | 16.5<br>[6.8;31.3]  | 17 |       | 40.2<br>[5.0;80.4]  | 18 |       |

**Tabella Ia.** Correlazione tra Ipertensione Arteriosa e test di primo livello

| B    |           | Delta<br>cortisol post<br>HDDST | N  | p      | Delta ACTH<br>post CRH | N  | p      | Delta<br>cortisol post<br>CRH | N  | p     | Delta ACTH<br>post DDAVP | N  | p      | Delta<br>cortisol post<br>DDAVP | N  | p      |
|------|-----------|---------------------------------|----|--------|------------------------|----|--------|-------------------------------|----|-------|--------------------------|----|--------|---------------------------------|----|--------|
| A.H. | No        | 0.861<br>[0.813;0.902]          | 19 | 0.067# | 2.339<br>[1.090;3.420] | 21 | 0.021* | 0.796<br>[0.466;1.071]        | 21 | 0.245 | 1.380<br>[1.046;3.906]   | 21 | 0.009* | 0.558<br>[0.384;1.113]          | 21 | 0.066# |
|      | Yes       | 0.853<br>[0.709;0.893]          | 25 |        | 1.603<br>[0.562;2.551] | 31 |        | 0.514<br>[0.215;1.012]        | 31 |       | 1.808<br>[0.384;3.985]   | 30 |        | 0.421<br>[0.198;0.763]          | 30 |        |
|      | Resistant | 0.787<br>[344;0.859]            | 11 |        | 1.168<br>[0.652;1.728] | 13 |        | 0.663<br>[0.301;0.881]        | 13 |       | 0.778<br>[0.404;1.040]   | 13 |        | 0.336<br>[0.233;743]            | 12 |        |

**Tabella Ib.** Correlazione tra classe di Ipertensione Arteriosa e test dinamici nella coorte CD

#### **4.1.1 Peggioramento del controllo pressorio**

Né nella coorte totale, né nelle sottocoorti, sono emerse differenze rilevanti nei test di primo livello (UFC, LDDST, LNSC) e nei livelli di ACTH tra i pazienti con e senza rapido peggioramento del controllo pressorio (Tabella Ic). Nella coorte totale, l'UFC ha mostrato un trend ai limiti della significatività statistica ( $p=0.084$ ), con valori tendenzialmente inferiori nei pazienti con rapido peggioramento; questa tendenza è riscontrabile anche osservando le mediane dei valori di UFC nelle sottocoorti CD e ACS, tuttavia, senza raggiungimento della significatività statistica.

Per quanto riguarda i test dinamici riportati in Tabella Id, il delta cortisolo post-HDDST è risultato inferiore nei pazienti con rapido peggioramento del controllo pressorio rispetto a quelli senza peggioramento ( $p=0.034$ ). I restanti test dinamici non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi: delta ACTH post CRH ( $p=0.145$ ), delta cortisolo post CRH ( $p=0.334$ ), delta ACTH post DDAVP ( $p=0.956$ ) e delta cortisolo post DDAVP ( $p=0.332$ ). In sintesi, il rapido peggioramento del controllo pressorio si associava a una minore soppressibilità del cortisolo all'HDDST, mentre i parametri di risposta ai test con CRH e desmopressina erano simili.

.

| C                                            |       |    | UFC<br>(nmol/die)        | N  | p      | LDDST<br>(nmol/L)      | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)    | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)        | N  | p     |
|----------------------------------------------|-------|----|--------------------------|----|--------|------------------------|----|-------|---------------------|----|-------|-----------------------|----|-------|
| Rapid Worsening of<br>Blood Pressure Control | CD    | No | 552.5<br>[363.0;983.2]   | 33 | 0.192  | 375.0<br>[103.0;519.0] | 31 | 0.539 | 7.95<br>[4.7;17.2]  | 29 | 0.150 | 46.17<br>[35.5;62.0]  | 34 | 0.759 |
|                                              |       | Si | 394.0<br>[279.7;720.5]   | 25 |        | 278.0<br>[100.2;431.7] | 22 |       | 10.55<br>[7.0;23.2] | 25 |       | 49.87<br>[34.32;76.5] | 25 |       |
|                                              | ACS   | No | 1153.0<br>[292.6;2600.7] | 14 | 0.165  | 467.5<br>[379.5;706.0] | 12 | 0.770 | 15.7<br>[6.1;29.2]  | 11 | 0.974 | 3.8<br>[1.7;5.0]      | 13 | 1.000 |
|                                              |       | Si | 464.5<br>[266.5;1134.2]  | 17 |        | 494.0<br>[378.0;604.0] | 15 |       | 13.5<br>[8.0;17.0]  | 11 |       | 4.8<br>[1.8;5.0]      | 16 |       |
|                                              | Total | No | 627.3<br>[357.0;1370.0]  | 47 | 0.084# | 416.0<br>[147.0;527.0] | 43 | 0.873 | 9.6<br>[5.7;21.7]   | 40 | 0.188 | 38.7<br>[6.0;59.5]    | 47 | 0.449 |
|                                              |       | Si | 437.5<br>[268.9;832.5]   | 42 |        | 392.0<br>[260.5;517.0] | 37 |       | 11.9<br>[7.1;21.3]  | 36 |       | 31.9<br>[5.0;58.1]    | 41 |       |

*Tabella Ic. Correlazione tra peggioramento del controllo pressorio e test di primo livello*

| D                                      |    | Delta<br>cortisol<br>post<br>HDDST | N  | p      | Delta<br>ACTH post<br>CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>ACTH post<br>DDAVP | N  | P     | Delta<br>cortisol<br>post<br>DDAVP | N  | p     |
|----------------------------------------|----|------------------------------------|----|--------|---------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|------------------------------------|----|-------|
| Rapid<br>Worsening<br>of BP<br>control | No | 0.863<br>[0.829;0.903]             | 30 | 0.034* | 1.942<br>[0.825;2.942]    | 34 | 0.145 | 0.746<br>[0.353;1.014]        | 34 | 0.334 | 1.183<br>[0.749;3.282]      | 34 | 0.956 | 0.462<br>[0.323;1.071]             | 33 | 0.332 |
|                                        | Si | 0.811<br>[0.661;0.862]             | 21 |        | 1.569<br>[0.691;2.111]    | 25 |       | 0.604<br>[0.231;0.898]        | 25 |       | 1.706<br>[0.579;3.847]      | 24 |       | 0.430<br>[0.224;0.811]             | 24 |       |

*Tabella Id. Correlazione tra peggioramento del controllo pressorio e test dinamici nella coorte CD*

## 4.2 Fenotipo iperandrogenico

Abbiamo riscontrato che la presenza di fenotipo iperandrogenico si associa a valori più elevati di UFC (576.0 vs 413.7 nmol/die;  $p=0.014$ ) (Figura 2) e di ACTH (39.8 vs 21.9 ng/L;  $p=0.012$ ) (Figura 3), mentre non influenza né i livelli di LDDST né di LNSC. Ciò è confermato nella sottocoorte di pazienti affetti da malattia di Cushing (CD), in cui la presenza del fenotipo iperandrogenico si associa a valori più elevati di cortisolemia delle 24 ore (UFC: 570.7 vs 381.2;  $p = 0.009$ ) e di ACTH (50.0 vs 35.65;  $p = 0.005$ ). Nella sottocoorte ACS, nessun confronto ha raggiunto la significatività statistica (Tabella IIa).

Analizzando i risultati dei test dinamici della sottocoorte CD, riportati in Tabella IIb, la presenza del fenotipo iperandrogenico si associa a un trend verso valori più elevati di Delta Cortisolo post-HDDST, sebbene non abbia raggiunto la significatività statistica (0.861 vs 0.834;  $p = 0.086$ ). Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda gli altri parametri.

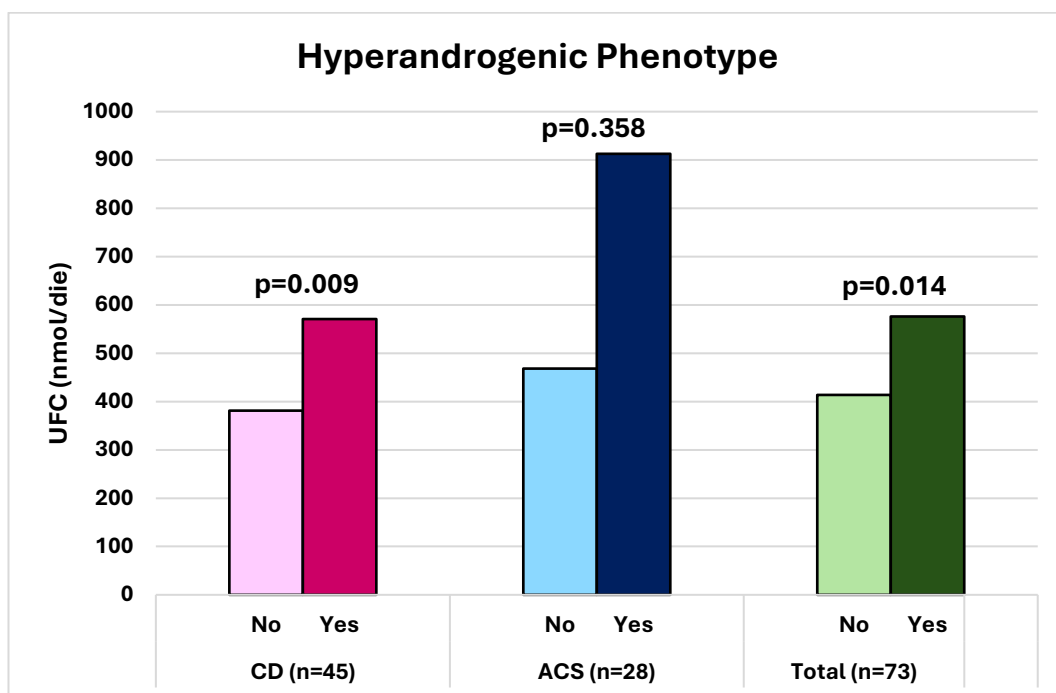


**Figura 2:** confronto tra valori mediاني di UFC (nmol/die) nelle varie coorti, il trend è coerente ma raggiunge significatività statistica solo per la coorte CD ( $p=0.009$ ) e Total ( $p=0.014$ ).

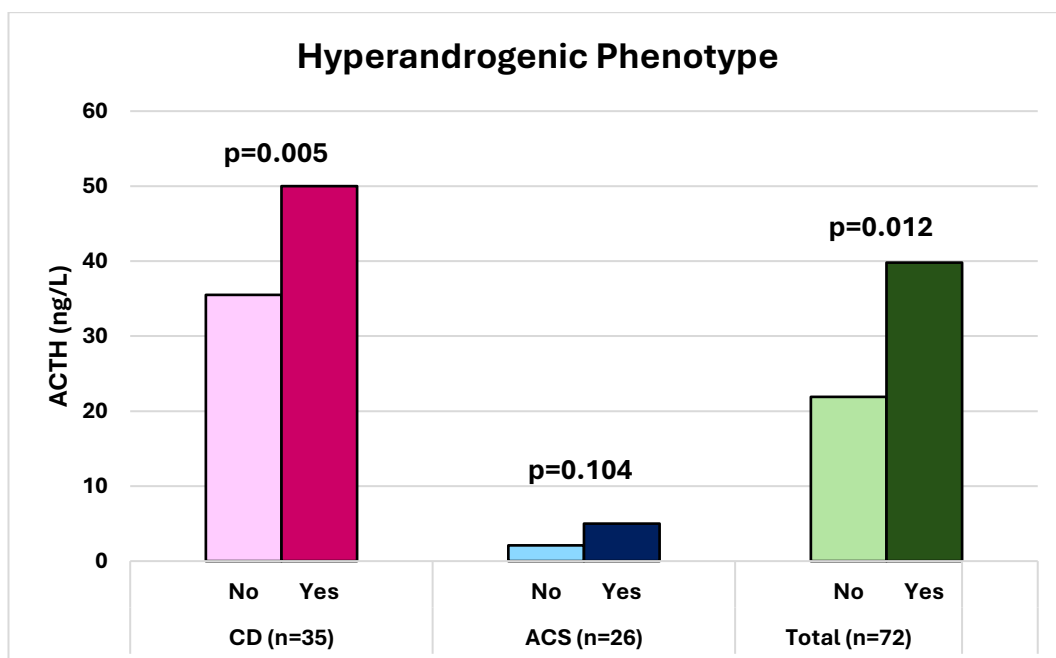


**Figura 3:** confronto tra valori mediاني di ACTH (ng/L) nelle varie coorti, nella coorte ACS, in coerenza con la fisiopatologia dell'ACS, i livelli di ACTH sono soppressi. La differenza è invece statisticamente significativa nella coorte CD ( $p=0.005$ ), vista l'iperattivazione dell'intero asse HPA e nella coorte total ( $p=0.012$ ).

| A                         |       |     | UFC<br>(nmol/die)       | N  | p      | LDDST<br>(nmol/L)      | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)    | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)       | N  | p      |
|---------------------------|-------|-----|-------------------------|----|--------|------------------------|----|-------|---------------------|----|-------|----------------------|----|--------|
| Hyperandrogenic Phenotype | CD    | No  | 381.2<br>[279.1;542.5]  | 18 | 0.009* | 320.0<br>[180;434.5]   | 17 | 0.575 | 7.85<br>[6.5;15.1]  | 17 | 0.939 | 35.65<br>[30.0;44.2] | 14 | 0.005* |
|                           |       | Yes | 570.7<br>[383.7;1196.5] | 27 |        | 312.0<br>[96.0;416.0]  | 23 |       | 8.9<br>[4.7;15.1]   | 25 |       | 50.0<br>[39.0;73.9]  | 21 |        |
|                           | ACS   | No  | 468.2<br>[292.6;1321.0] | 14 | 0.358  | 460.0<br>[334.0;529.0] | 13 | 0.103 | 16.1<br>[9.4;26.8]  | 10 | 0.940 | 2.1<br>[1.6;5.0]     | 13 | 0.104  |
|                           |       | Yes | 912.7<br>[350.4;2600.7] | 14 |        | 601.0<br>[397.7;706.0] | 12 |       | 15.27<br>[7.4;31.9] | 10 |       | 5.0<br>[2.6;5.45]    | 13 |        |
|                           | Total | No  | 413.7<br>[297.9;648.4]  | 32 | 0.014* | 409.5<br>[264.7;498.7] | 30 | 0.990 | 10.4<br>[6.3;17.0]  | 27 | 0.691 | 21.9<br>[4.6;36.5]   | 31 | 0.012* |
|                           |       | Yes | 576.0<br>[381.4;1502.3] | 41 |        | 386.0<br>[193.0;538.0] | 35 |       | 9.4<br>[5.6;16.2]   | 35 |       | 39.8<br>[5.4;60.6]   | 41 |        |

**Tabella IIa.** Correlazione tra fenotipo iperandrogenico e test di primo livello

| B                                |     | Delta<br>cortisol<br>post<br>HDDST | N      | p          | Delta<br>ACTH post<br>CRH  | N      | p         | Delta<br>cortisol<br>post CRH | N      | p         | Delta<br>ACTH post<br>DDAVP | N      | p         | Delta<br>cortisol<br>post<br>DDAVP | N      | p         |
|----------------------------------|-----|------------------------------------|--------|------------|----------------------------|--------|-----------|-------------------------------|--------|-----------|-----------------------------|--------|-----------|------------------------------------|--------|-----------|
| Hyperandrogeni<br>c<br>Phenotype | No  | 0.834<br>[0.771;0.866<br>]         | 1<br>5 | 0.086<br># | 1.959<br>[1.134;2.971<br>] | 1<br>8 | 0.36<br>8 | 0.736<br>[0.487;0.992<br>]    | 1<br>8 | 0.17<br>7 | 1.032<br>[0.730;2.203<br>]  | 1<br>8 | 0.14<br>3 | 0.433<br>[0.306;0.728<br>]         | 1<br>8 | 0.50<br>0 |
|                                  | Yes | 0.861<br>[0.821;0.908<br>]         | 2<br>5 |            | 1.550<br>[0.719;2.738<br>] | 2<br>8 |           | 0.551<br>[0.177;0.968<br>]    | 2<br>8 |           | 2.054<br>[0.804;3.755<br>]  | 2<br>8 |           | 0.510<br>[0.344;0.830<br>]         | 2<br>8 |           |

**Tabella IIb.** Correlazione tra fenotipo iperandrogenico e test dinamici nella coorte CD

### 4.3 Fenotipo PMOS

Restringendo l'analisi alle pazienti in età compresa tra 12 e 55 anni al fine di soddisfare i criteri di applicabilità della diagnosi di PMOS, nella coorte totale è stato riscontrato che la presenza del fenotipo PMOS si associa a valori più elevati di cortisoloria delle 24 ore (UFC: 627.3 vs 369.0 nmol/die;  $p=0.004$ ) (Figura 4) e di ACTH (44.4 vs 23.4 ng/L;  $p=0.007$ ) (Figura 5), mentre non influenza gli altri test di primo livello.

Risultati simili sono stati ottenuti nella sottocoorte CD con cortisoloria delle 24 ore superiore nelle donne con il fenotipo PMOS (UFC: 573.2 vs 363.2 nmol/die;  $p=0.011$ ) e livelli ACTH anch'essi superiori (56.0 vs 35.3 ng/L;  $p=0.008$ ). Anche in questa coorte gli altri test non sono risultati significativi.

Nella coorte ACS, la presenza del fenotipo PMOS si associa a valori più elevati di LDDST (617.0 vs 455.0 nmol/L;  $p=0.007$ ) (Figura 6) e di ACTH (5.0 vs 2.6 ng/L;  $p=0.040$ ), mentre i valori di UFC, pur risultando più elevati nelle pazienti con fenotipo PMOS, non raggiungono la significatività statistica ( $p=0.053$ ). I livelli di LNSC non mostrano differenze significative (Tabella IIIa).

La risposta dei test dinamici era simile nei pazienti con e senza fenotipo PMOS (Tabella IIIb).

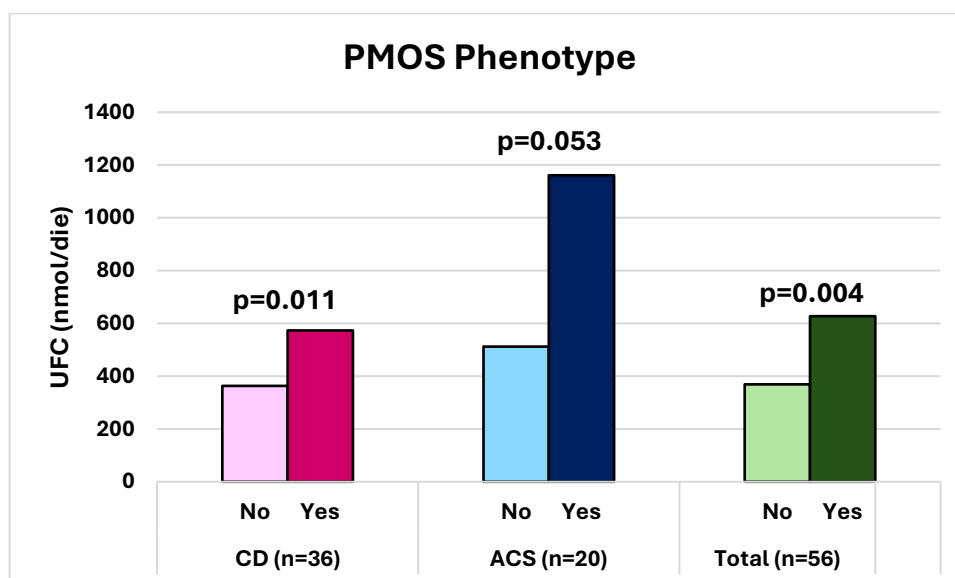


**Figura 4:** confronto tra valori mediاني di UFC (nmol/die) in base alla presenza del fenotipo PMOS nelle coorti CD, ACS e total. La significatività statistica è raggiunta nella coorte CD ( $p=0.011$ ) e nella coorte combinata ( $p=0.004$ ), ma non nella coorte ACS ( $p=0.053$ ) dove si evidenzia comunque un trend.

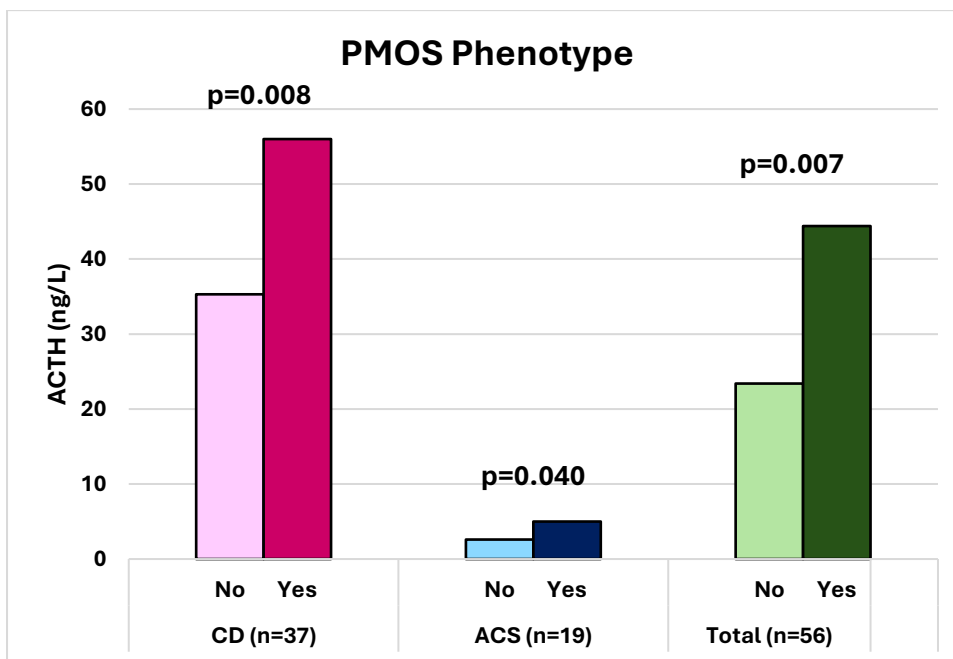


**Figura 5:** confronto dei valori mediani di ACTH (ng/L) in base alla presenza del fenotipo PMOS nelle coorti CD, ACS e Total. La significatività statistica è raggiunta in tutte le coorti (CD  $p=0.008$ ; ACS  $p=0.040$ ; Total  $p=0.007$ ).

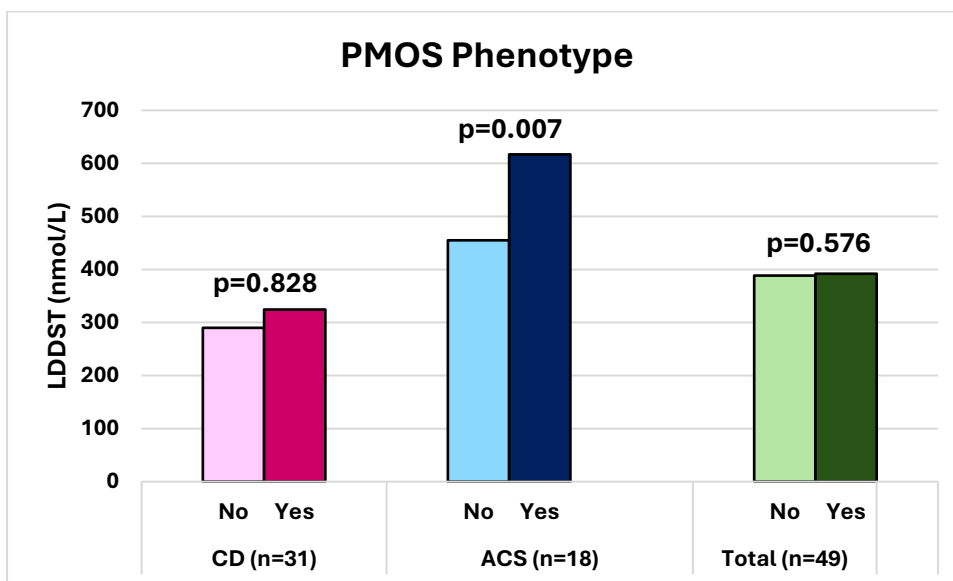


**Figura 6:** confronto tra valori mediani di cortisolo post-LDDST (nmol/L) in base alla presenza del fenotipo PMOS nelle coorti CD, ACS e Total. La differenza è statisticamente significativa solo nella coorte ACS ( $p=0.007$ ).

| A              |       |     | UFC<br>(nmol/die)        | N  | p      | LDDST<br>(nmol/L)      | N  | p      | LNSC<br>(nmol/L)   | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)      | N  | p      |
|----------------|-------|-----|--------------------------|----|--------|------------------------|----|--------|--------------------|----|-------|---------------------|----|--------|
| PMOS Phenotype | CD    | No  | 363.2<br>[320.1;457.1]   | 10 | 0.011* | 290.0<br>[260.5;434.5] | 9  | 0.828  | 7.4<br>[5.1;11.5]  | 10 | 0.508 | 35.3<br>[30.3;37.8] | 10 | 0.008* |
|                |       | Yes | 573.3<br>[385.2;1239.9]  | 26 |        | 324.5<br>[95.5;432.7]  | 22 |        | 9.2<br>[4.5;15.4]  | 24 |       | 56.0<br>[38.7;75.3] | 27 |        |
|                | ACS   | No  | 512.0<br>[260.7;1145.0]  | 9  | 0.053# | 455.0<br>[300.0;486.5] | 9  | 0.007* | 10.4<br>[5.7;17.7] | 5  | 0.188 | 2.6<br>[1.7;4.9]    | 8  | 0.040* |
|                |       | Yes | 1161.0<br>[454.3;2659.0] | 11 |        | 617.0<br>[536.5;807.0] | 9  |        | 19.0<br>[7.9;37.4] | 8  |       | 5.0<br>[3.8;5.9]    | 11 |        |
|                | Total | No  | 369.0<br>[296.2;643.5]   | 19 | 0.004* | 388.5<br>[262.2;457.7] | 18 | 0.576  | 7.8<br>[5.6;14.5]  | 15 | 0.367 | 23.4<br>[2.85;36.1] | 18 | 0.007* |
|                |       | Yes | 627.3<br>[390.7;1890.2]  | 37 |        | 392.0<br>[147.0;598.0] | 31 |        | 9.9<br>[5.6;16.1]  | 32 |       | 44.4<br>[6.0;62.0]  | 38 |        |

**Tabella IIIa.** Correlazione tra fenotipo PMOS (range di età 12-55 anni) e test di primo livello

| B                 |     | Delta<br>cortisol post<br>HDDST | N  | p     | Delta ACTH<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol post<br>CRH | N  | p     | Delta ACTH<br>post DDAVP | N  | p     | Delta<br>cortisol post<br>DDAVP | N  | p     |
|-------------------|-----|---------------------------------|----|-------|------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|--------------------------|----|-------|---------------------------------|----|-------|
| PMOS<br>Phenotype | No  | 0.843<br>[0.787;0.875]          | 8  | 0.408 | 1.866<br>[1.195;3.409] | 10 | 0.452 | 0.736<br>[0.588;1.055]        | 10 | 0.356 | 1.107<br>[0.944;2.404]   | 10 | 0.374 | 0.507<br>[0.385;0.728]          | 10 | 0.945 |
|                   | Yes | 0.859<br>[0.817;0.909]          | 24 |       | 1.759<br>[0.723;2.759] | 27 |       | 0.604<br>[0.232;0.986]        | 27 |       | 1.812<br>[0.784;3.913]   | 27 |       | 0.462<br>[0.343;0.839]          | 27 |       |

**Tabella IIIb.** Correlazione tra fenotipo PMOS (range di età 12-55 anni) e test dinamici nella coorte CD

#### 4.4 Dislipidemia

Considerando la coorte totale, la presenza di dislipidemia si associa a valori più bassi di cortisoluria delle 24 ore (UFC: 451.3 vs 795.0;  $p=0.041$ ), mentre non influenza in modo rilevante gli altri test di primo livello né i livelli di ACTH.

Tale risultato emerge principalmente nella sottocoorte di pazienti affetti da malattia di Cushing (CD), nella quale si osserva un andamento del tutto sovrapponibile: la dislipidemia si associa a valori più bassi di UFC (394.8 vs 789.3;  $p=0.032$ ) (Figura 7), in assenza di differenze significative per LDDST, LNSC e ACTH, come riportato in Tabella IVa.

Nella sottocoorte di pazienti con ipercortisolismo surrenalico (ACS), diversamente da quanto osservato nella coorte totale e nella CD, la presenza di dislipidemia non si associa a differenze significative in nessuno dei parametri valutati, inclusa la UFC ( $p=0.403$ ), il LDDST ( $p=0.247$ ), il LNSC ( $p=0.647$ ) e l'ACTH ( $p=0.201$ ).

Per quanto riguarda i test dinamici nella sottocoorte CD, la presenza di dislipidemia non determina differenze significative in nessuno dei parametri valutati, come riportato in Tabella IVb.

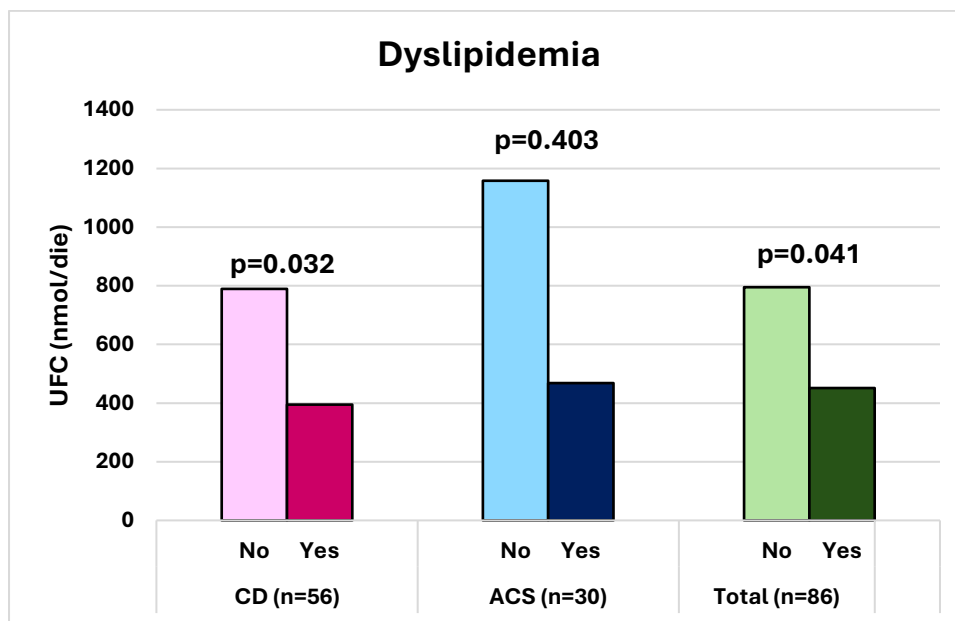


**Figura 7:** confronto tra i valori medi di UFC (nmol/die) in base alla presenza di dislipidemia nelle coorti CD, ACS e Total. La significatività statistica è raggiunta nelle coorti CD ( $p=0.032$ ) e Total ( $p=0.041$ ).

| A            |       |     | UFC<br>(nmol/die)        | N  | p      | LDDST<br>(nmo/L)       | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)   | N  | p      | ACTH<br>(ng/L)      | N  | p     |
|--------------|-------|-----|--------------------------|----|--------|------------------------|----|-------|--------------------|----|--------|---------------------|----|-------|
| Dyslipidemia | CD    | No  | 789.3<br>[396.2;2021.7]  | 16 | 0.032* | 406.0<br>[77.0;808.2]  | 15 | 0.609 | 14.5<br>[7.8;25.0] | 15 | 0.067# | 49.6<br>[36.0;75.7] | 16 | 0.394 |
|              |       | Yes | 394.8<br>[300.2;627.25]  | 40 |        | 265.0<br>[103.0;429.0] | 39 |       | 8.3<br>[5.8;17.8]  | 36 |        | 45.7<br>[32.0;60.4] | 41 |       |
|              | ACS   | No  | 1158.0<br>[261.3;2930.5] | 10 | 0.403  | 513.0<br>[454.0;758.5] | 9  | 0.247 | 19.7<br>[5.9;48.3] | 7  | 0.647  | 2.2<br>[1.7;5.0]    | 10 | 0.201 |
|              |       | Yes | 468.2<br>[279.8;1147.6]  | 20 |        | 471.0<br>[334.0;601.0] | 17 |       | 13.5<br>[7.8;17.0] | 15 |        | 4.9<br>[2.1;5.0]    | 18 |       |
|              | Total | No  | 795.0<br>[353.2;2243.2]  | 26 | 0.041* | 454.0<br>[256.2;525.0] | 24 | 0.169 | 14.5<br>[7.8;25.3] | 22 | 0.088  | 35.2<br>[2.9;60.6]  | 26 | 0.710 |
|              |       | Yes | 451.3<br>[300.2;649.2]   | 60 |        | 345.0<br>[158.5;489.2] | 56 |       | 8.8<br>[6.4;17.0]  | 51 |        | 32.5<br>[5.0;56.0]  | 59 |       |

**Tabella IVa.** Correlazione tra dislipidemia e test di primo livello

| B            |    | Delta<br>cortisol<br>post<br>HDDST | N  | p     | Delta<br>ACTH post<br>CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>ACTH post<br>DDAVP | N  | P     | Delta cortisol<br>post DDAVP | N  | p     |
|--------------|----|------------------------------------|----|-------|---------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|------------------------------|----|-------|
| Dyslipidemia | No | 0.787<br>[0.31;0.86]               | 15 | 0.129 | 1.825<br>[0.63;2.55]      | 16 | 0.749 | 0.679<br>[0.22;1.19]          | 16 | 0.696 | 3.037<br>[0.68;4.69]        | 16 | 0.263 | 0.735<br>[0.360;1.009]       | 16 | 0.204 |
|              | Si | 0.851<br>[0.78;0.88]               | 34 |       | 1.253<br>[0.72;2.47]      | 41 |       | 0.618<br>[0.35;0.98]          | 41 |       | 1.183<br>[0.55;2.71]        | 41 |       | 0.386<br>[0.28;0.73]         | 40 |       |

**Tabella IVb.** Correlazione tra dislipidemia e test dinamici nella coorte CD

#### 4.5 Alterazione del metabolismo glucidico

Considerando la coorte totale, la presenza di alterazione del metabolismo glucidico non influenza in modo significativo nessuno dei parametri biochimici di ipercortisolismo: UFC ( $p = 0.291$ ), LDDST ( $p = 0.242$ ), LNSC ( $p = 0.904$ ) e ACTH ( $p = 0.099$ ), come riportato in Tabella Va. Un andamento del tutto sovrapponibile si osserva nelle due sottocoorti.

Diversamente dai parametri biochimici basali, l'analisi dei test dinamici nella coorte CD evidenzia un impatto rilevante della classe di alterazione glicemica su alcuni parametri. In particolare, si osservano differenze nel delta cortisolo post-HDDST (0.860 vs 0.834 vs 0.791;  $p = 0.033$ ), nel delta ACTH post-DDAVP (1.989 vs 0.512 vs 1.093;  $p = 0.030$ ) e nel delta cortisolo post-DDAVP (0.558 vs 0.221 vs 0.364;  $p=0.022$ ), come riportato in Tabella Vb.

Nello specifico, i pazienti con normoglicemia presentavano valori di delta cortisolo post-HDDST maggiori rispetto ai pazienti con diabete mellito ( $p=0.026$ ); per quanto riguarda il test al DDAVP, i pazienti con normoglicemia mostravano valori di delta ACTH post-DDAVP più elevati rispetto ai pazienti con diabete mellito ( $p=0.031$ ) (Figura 8) e valori di delta cortisolo post-DDAVP maggiori rispetto ai pazienti in prediabete ( $p=0.019$ ) (Figura 9). Al contrario, il delta ACTH post-CRH e il delta cortisolo post-CRH sono simili in pazienti con o senza alterazioni glucidiche.

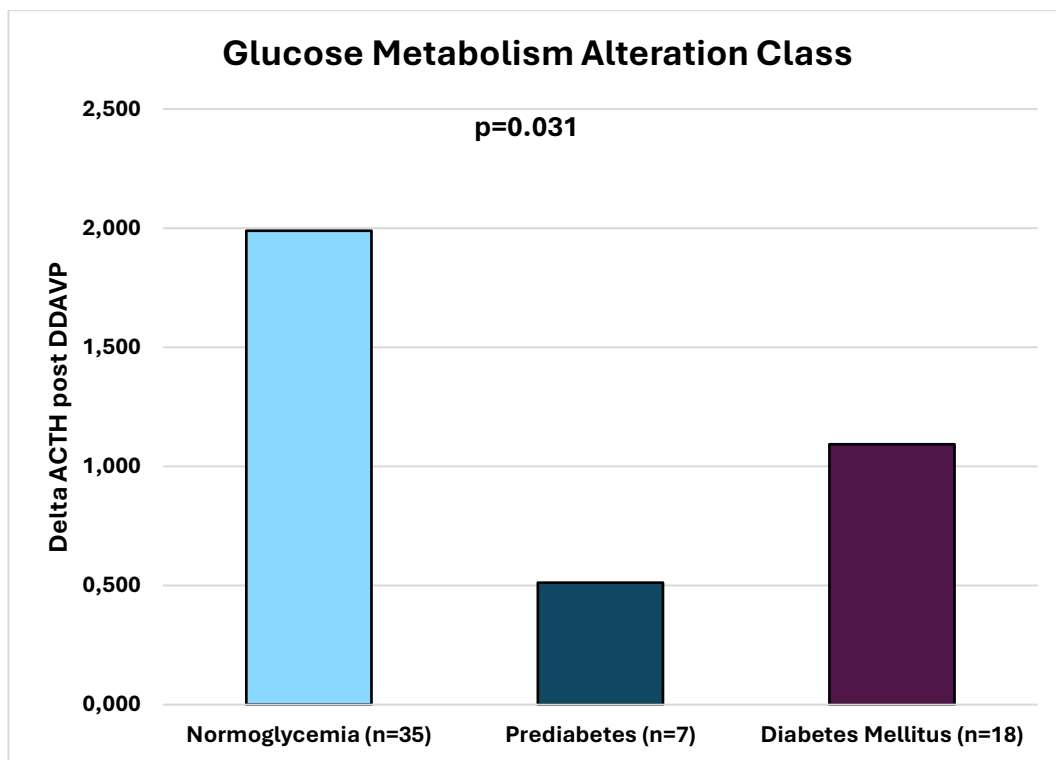


*Figura 8: confronto tra delta ACTH post DDAVP mediani in base all'alterazione del metabolismo glucidico nella coorte CD*

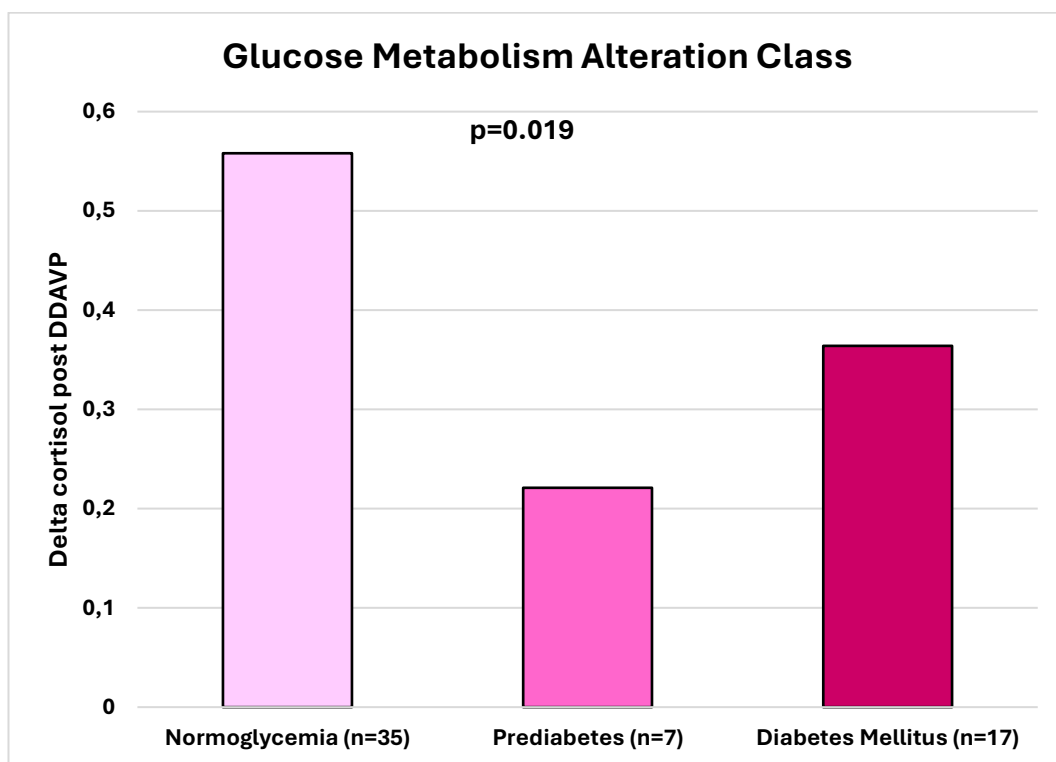


*Figura 9: confronto tra delta cortisol post DDAVP mediani in base all'alterazione del metabolismo glucidico nella coorte CD*

| A                                   |       |               | UFC<br>(nmol/die)        | N  | p     | LDDST<br>(nmo/L)       | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)   | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)       | N  | p     |
|-------------------------------------|-------|---------------|--------------------------|----|-------|------------------------|----|-------|--------------------|----|-------|----------------------|----|-------|
| Glucose Metabolism Alteration Class | CD    | Normoglycemia | 552.83<br>[361.1;907.0]  | 36 | 0.505 | 356.0<br>[194.0;449.2] | 32 | 0.819 | 10.5<br>[6.5;16.4] | 32 | 0.903 | 48.3<br>[36.0;63.1]  | 29 | 0.219 |
|                                     |       | Prediabetes   | 312.25<br>[227.7;1061.0] | 7  |       | 260.0<br>[92.0;516.0]  | 7  |       | 8.8<br>[6.3;25.0]  | 7  |       | 75.5<br>[54.3;118.5] | 6  |       |
|                                     |       | DM            | 540.0<br>[389.2;692.2]   | 17 |       | 316.0<br>[97.7;525.0]  | 16 |       | 8.8<br>[6.4;30.3]  | 17 |       | 43.7<br>[31.7;76.2]  | 14 |       |
|                                     | ACS   | Normoglycemia | 702.0<br>[308.2;2065.8]  | 25 | 0.279 | 519.5<br>[439.2;627.2] | 22 | 0.122 | 16.1<br>[7.6;31.9] | 18 | 0.576 | 4.3<br>[1.9;5.0]     | 24 | 0.489 |
|                                     |       | Prediabetes   | 464.5                    | 3  |       | 471.0                  | 3  |       | 9.45               | 2  |       | 1.7                  | 3  |       |
|                                     |       | DM            | 264.5                    | 3  |       | 215.0                  | 2  |       | 12.9               | 2  |       | 4.8                  | 2  |       |
|                                     | Total | Normoglycemia | 570.7<br>[358.0;1283.2]  | 61 | 0.291 | 425.5<br>[263.2;531.5] | 54 | 0.242 | 11.7<br>[6.8;21.8] | 50 | 0.904 | 32.2<br>[5.0;55.5]   | 60 | 0.099 |
|                                     |       | Prediabetes   | 380.6<br>[250.1;1103.7]  | 10 |       | 346.5<br>[98.0;513.7]  | 10 |       | 8.8<br>[6.3;22.6]  | 9  |       | 55.3<br>[4.1;87.9]   | 10 |       |
|                                     |       | DM            | 527.2<br>[294.6;648.4]   | 20 |       | 316.0<br>[95.5;521.0]  | 18 |       | 8.8<br>[6.9;26.3]  | 19 |       | 40.2<br>[24.8;68.7]  | 20 |       |

*Tabella Va. Correlazione tra alterazioni del metabolismo glucidico e test di primo livello*

| B                                            |       | Delta cortisol<br>post HDDST | N  | p      | Delta ACTH<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol<br>post CRH | N  | p     | Delta ACTH<br>post DDAVP | N  | p      | Delta<br>cortisol<br>post DDAVP | N  | p      |
|----------------------------------------------|-------|------------------------------|----|--------|------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|--------------------------|----|--------|---------------------------------|----|--------|
| Glucose<br>Metabolism<br>Alteration<br>class | Norm. | 0.860<br>[0.787;0.897]       | 32 | 0.033* | 1.386<br>[0.718;2.321] | 36 | 0.482 | 0.652<br>[0.220;0.958]        | 36 | 0.201 | 1.989<br>[0.917;4.760]   | 35 | 0.030* | 0.558<br>[0.365;1.083]          | 35 | 0.022* |
|                                              | Pre.  | 0.834<br>[0.310;0.859]       | 7  |        | 1.947<br>[0.716;3.707] | 7  |       | 0.604<br>[0.247;0.995]        | 7  |       | 0.512<br>[0.264;3.201]   | 7  |        | 0.221<br>[-.039;0.639]          | 7  |        |
|                                              | DM    | 0.791<br>[0.386;0.851]       | 12 |        | 2.255<br>[0.897;2.796] | 18 |       | 0.875<br>[0.510;1.263]        | 18 |       | 1.093<br>[0.411;1.778]   | 18 |        | 0.364<br>[0.254;0.777]          | 17 |        |

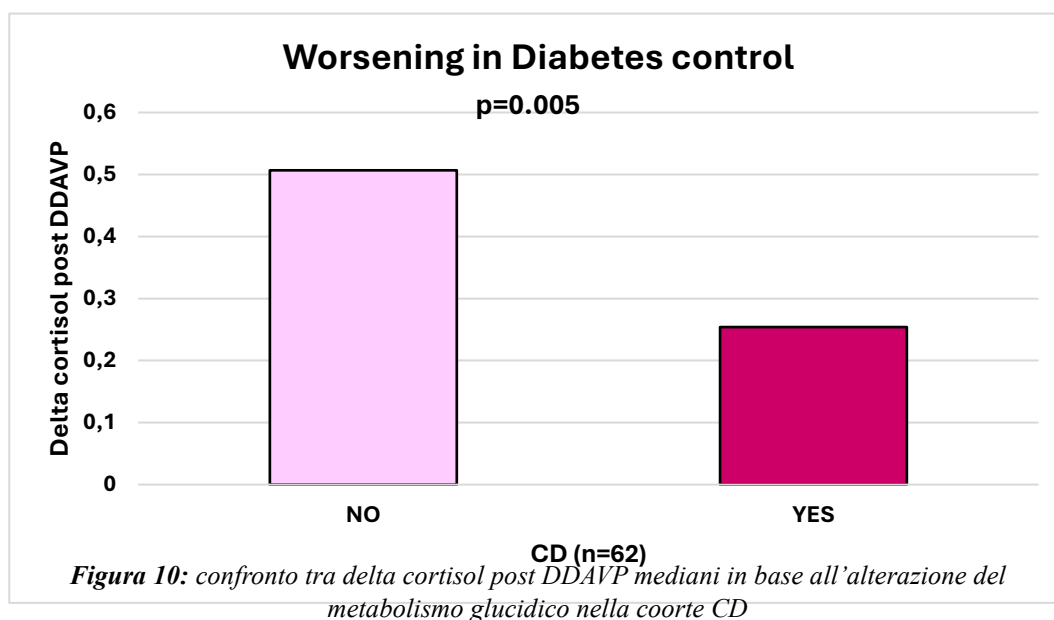
*Tabella Vb. Confronto tra alterazioni del metabolismo glucidico e test dinamici nella coorte CD*

#### 4.5.1 Peggioramento del controllo del diabete

Nella coorte totale il peggioramento del controllo glicemico non influenza nessuno dei parametri biochimici di ipercortisolismo: UFC ( $p = 0.188$ ), LDDST ( $p = 0.580$ ), LNSC ( $p = 0.587$ ) e ACTH ( $p = 0.650$ ).

Un andamento coerente si osserva nelle due sottocoorti per quanto riguarda i parametri basali, sebbene si segnali un trend verso la significatività statistica per il LDDST ( $p = 0.070$ ) nella sottocoorte surrenalica, come riportato in tabella Vc.

Diversamente dai parametri basali, l'analisi dei test dinamici nella sottocoorte CD evidenzia un impatto significativo del peggioramento del controllo glicemico sul delta cortisolo post-DDAVP (0.507 vs 0.254;  $p = 0.005$ ), con valori più bassi nei pazienti con peggior controllo diabetico. Non si osservano invece differenze per il delta cortisolo post-HDDST, il delta ACTH post-CRH, né il delta cortisolo post-CRH. Si segnala inoltre un trend verso la significatività statistica per il delta ACTH post-DDAVP ( $p = 0.053$ ), come riportato in Tabella Vd, suggerendo un possibile effetto del controllo glicemico sulla risposta complessiva al DDAVP.



| C                                      |       |     | UFC<br>(nmol/die)       | N  | p     | LDDST<br>(nmo/L)        | N  | p      | LNSC<br>(nmol/L)    | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)      | N  | p     |
|----------------------------------------|-------|-----|-------------------------|----|-------|-------------------------|----|--------|---------------------|----|-------|---------------------|----|-------|
| Worsening<br>of<br>Diabetes<br>Control | CD    | No  | 522.12<br>[357.1;907.0] | 52 | 0.556 | 328.5<br>[103.0;449.25] | 48 | 0.564  | 10.45<br>[5.8;21.0] | 49 | 0.262 | 54.3<br>[35.9;72.2] | 42 | 0.539 |
|                                        |       | Yes | 514.3<br>[290.5;627.0]  | 11 |       | 325.5<br>[133.75;530.5] | 10 |        | 9.12<br>[7.7;36.4]  | 10 |       | 45.2<br>[34.0;60.0] | 9  |       |
|                                        | ACS   | No  | 702.0<br>[308.2;2065.8] | 25 | 0.147 | 519.5<br>[439.2;627.2]  | 22 | 0.070# | 16.1<br>[7.6;31.9]  | 18 | 0.395 | 4.3<br>[1.9;5.0]    | 24 | 0.616 |
|                                        |       | Yes | 364.5<br>[250.6;790.6]  | 6  |       | 378.0<br>[167.0;492.0]  | 5  |        | 10.6<br>[7.0;15.9]  | 4  |       | 4.6<br>[1.65;5.0]   | 5  |       |
|                                        | Total | No  | 535.0<br>[351.9;1134.2] | 77 | 0.188 | 407.0<br>[233.0;519.5]  | 70 | 0.580  | 11.3<br>[6.3;22.3]  | 67 | 0.587 | 36.5<br>[5.0;61.0]  | 77 | 0.650 |
|                                        |       | Yes | 464.5<br>[261.9;645.2]  | 17 |       | 339.0<br>[147.0;513.0]  | 15 |        | 9.1<br>[7.7;22.3]   | 14 |       | 34.7<br>[5.0;53.6]  | 16 |       |

**Tabella Vc.** Correlazione tra peggioramento del controllo pressorio e test di primo livello

| D                                      |    | Delta<br>cortisol<br>post HDDST | N  | p     | Delta ACTH<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol post<br>CRH | N  | p     | Delta ACTH<br>post DDAVP | N  | P      | Delta<br>cortisol<br>post DDAVP | N  | p      |
|----------------------------------------|----|---------------------------------|----|-------|------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|--------------------------|----|--------|---------------------------------|----|--------|
| Worsening<br>of<br>diabetes<br>control | No | 0.853<br>[0.716;0.891]          | 47 | 0.146 | 1.569<br>[0.754;2.671] | 53 | 0.341 | 0.663<br>[0.303;0.999]        | 53 | 0.505 | 1.225<br>[0.779;3.756]   | 52 | 0.053# | 0.507<br>[0.337;0.859]          | 52 | 0.005* |
|                                        | Si | 0.811<br>[0.512;0.848]          | 7  |       | 0.914<br>[0.456;2.551] | 11 |       | 0.514<br>[0.276;0.877]        | 11 |       | 0.589<br>[0.071;1.422]   | 11 |        | 0.254<br>[0.115;0.369]          | 10 |        |

**Tabella Vd.** Correlazione tra peggioramento del controllo pressorio e test dinamici nella coorte CD

## 4.6 Fenotipo Cushingoide

È stata dapprima condotta un'analisi univariata delle singole caratteristiche fenotipiche in relazione ai test di primo livello, ACTH e test di secondo livello, stratificando per coorte. Si riportano di seguito i risultati statisticamente significativi, consultabili nella tabella VI.

Per quanto riguarda la presenza di *Facies Lunar*, nella coorte CD, i livelli di ACTH risultano più elevati nei pazienti con questo segno clinico rispetto a quelli senza (57.0 vs 38.7 ng/L;  $p = 0.020$ ).

Considerando la presenza di *Striae Rubrae*, nella coorte totale i livelli di UFC risultano più elevati nei pazienti con striae rispetto a quelli senza (913.3 vs 464.5 nmol/die;  $p = 0.014$ ). Questo dato è concorde con il trend osservato nella sottocoorte CD, ove i livelli di UFC mostrano una tendenza verso valori più elevati nei pazienti con il segno ( $p = 0.057$ ), senza però raggiungere la significatività statistica.

Non sono invece emerse differenze significative nelle diverse coorti per i parametri considerati in relazione alla presenza di gibbo, miopatia prossimale e facilità alle ecchimosi (dati non mostrati).

### 4.6.1 Stratificazione in base al grado di espressione fenotipica di ipercortisolismo

Successivamente, la totalità dei pazienti è stata stratificata in tre sottogruppi in base al numero di segni clinici di ipercortisolismo presentati: assenza di segni, presenza di 1-2 segni e presenza di 3 o più segni. I segni di ipercortisolismo considerati sono quelli riportati in precedenza. Tale suddivisione è stata effettuata al fine di valutare l'eventuale correlazione tra il grado complessivo di espressione fenotipica e i risultati dei test di primo livello.

L'UFC ha mostrato un trend verso la significatività statistica ( $p=0.086$ ), mostrando andamento crescente all'aumentare dei segni clinici riscontrati. Il trend è stato successivamente approfondito con il confronto diretto tra pazienti senza segni e pazienti con tre o più segni, evidenziando un UFC maggiore nei pazienti con più segni clinici ( $p=0.033$ ), come evidente nella figura 11. Il LDDST e il LNSC erano simili (Tabella VII).

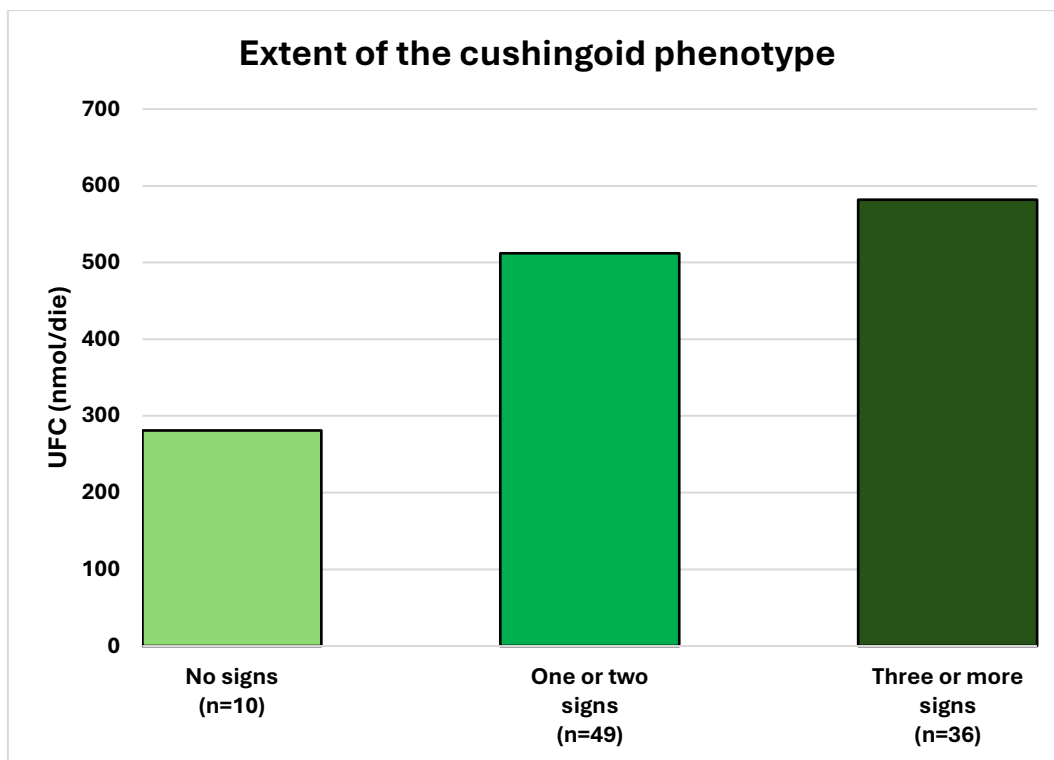


**Figura 11:** confronto tra valori mediani di UFC (nmol/die) nella coorte totale (CD+ACS) suddivisa in base all'entità del fenotipo clinico

|                   |       |     | UFC<br>(nmol/die)       | N  | p      | LDDST<br>(nmo/L)       | N  | p      | LNSC<br>(nmol/L)    | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)       | N  | p      |
|-------------------|-------|-----|-------------------------|----|--------|------------------------|----|--------|---------------------|----|-------|----------------------|----|--------|
| Facies<br>Lunaris | CD    | No  | 393.5<br>[227.75;913.3] | 19 | 0.255  | 265.0<br>[96.0;408.5]  | 17 | 0.209  | 8.32<br>[6.3;15.7]  | 18 | 0.336 | 38.7<br>[32.5;55.75] | 15 | 0.020* |
|                   |       | Yes | 540.0<br>[363.7;970.5]  | 45 |        | 363.0<br>[181.5;501.0] | 42 |        | 10.45<br>[6.3;24.7] | 41 |       | 57.0<br>[39.1;77.8]  | 37 |        |
|                   | ACS   | No  | 462.8<br>[293.2;1855.8] | 10 | 0.826  | 477.0<br>[344.4;615.5] | 10 | 0.752  | 16.7<br>[13.2;31.3] | 6  | 0.461 | 3.0<br>[1.7;5.0]     | 8  | 0.698  |
|                   |       | Yes | 672.7<br>[296.1;1797.5] | 20 |        | 473.0<br>[41.7;623.7]  | 16 |        | 11.4<br>[7.2;26.8]  | 16 |       | 4.7<br>[1.8;5.0]     | 20 |        |
|                   | Total | No  | 433.5<br>[261.1;1283.2] | 29 | 0.257  | 355.0<br>[116.0;494.0] | 27 | 0.456  | 11.9<br>[6.4;16.9]  | 24 | 0.594 | 34.7<br>[5.0;44.8]   | 27 | 0.169  |
|                   |       | Yes | 552.5<br>[363.7;1099.0] | 65 |        | 419.0<br>[254.0;521.7] | 58 |        | 10.4<br>[6.7;24.7]  | 57 |       | 40.6<br>[5.0;66.7]   | 66 |        |
| Striae<br>Rubrae  | CD    | No  | 438.0<br>[345.0;734.5]  | 47 | 0.057# | 312<br>[103.0;447.0]   | 43 | 0.283  | 8.8<br>[5.7;19.8]   | 44 | 0.262 | 45.4<br>[34.1;67.1]  | 37 | 0.156  |
|                   |       | Si  | 646.7<br>[377.8;2335.0] | 17 |        | 401.4<br>[111.7;533.7] | 16 |        | 11.3<br>[7.9;24.5]  | 15 |       | 56.0<br>[44.0;91.0]  | 15 |        |
|                   | ACS   | No  | 462.8<br>[293.2;1855.8] | 24 | 0.120  | 477.0<br>[344.5;615.5] | 21 | 0.064# | 16.7<br>[13.2;31.3] | 18 | 1.000 | 3.0<br>[1.7;5.0]     | 22 | 0.909  |
|                   |       | Si  | 672.7<br>[296.1;1797.5] | 6  |        | 473.0<br>[411.7;623.7] | 5  |        | 11.4<br>[7.2;26.8]  | 4  |       | 4.7<br>[1.8;5.0]     | 6  |        |
|                   | Total | No  | 464.5<br>[312.2;870.0]  | 71 | 0.014* | 265.0<br>[209.0;488.2] | 64 | 0.124  | 10.4<br>[6.4;19.8]  | 62 | 0.400 | 35.0<br>[5.0;59.6]   | 70 | 0.212  |
|                   |       | Si  | 913.3<br>[385.6;2431.0] | 23 |        | 475.0<br>[206.5;593.0] | 21 |        | 11.3<br>[7.9;24.5]  | 19 |       | 46.7<br>[5.0;64.0]   | 23 |        |

**Tabella VI.** Correlazione tra Facies Lunaris e Striae Rubrae e test di primo livello

|                         |                        | UFC<br>(nmol/die)       | N  | p      | LDDST<br>(nmo/L)       | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)   | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)      | N  | p     |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|----|--------|------------------------|----|-------|--------------------|----|-------|---------------------|----|-------|
| Cushingoid<br>Phenotype | No signs               | 281.0<br>[197.4;817.9]  | 10 | 0.086# | 290.0<br>[96.0;453.0]  | 9  | 0.413 | 7.1<br>[5.5;15.1]  | 9  | 0.243 | 35.6<br>[19.9;56.7] | 10 | 0.461 |
|                         | One or two<br>signs    | 512.0<br>[357.2;1076.0] | 49 |        | 413.5<br>[254.0;529.7] | 42 |       | 10.4<br>[6.5;22.0] | 41 |       | 35.9<br>[5.0;55.6]  | 48 |       |
|                         | Three or more<br>signs | 581.8<br>[363.6;1534.0] | 36 |        | 398.0<br>[197.0;524.0] | 35 |       | 14.6<br>[7.9;26.9] | 31 |       | 42.7<br>[5.0;75.4]  | 36 |       |

*Tabella VII. Correlazione tra il grado complessivo di espressione fenotipica e test di primo livello nella coorte complessiva (CD+ACS)*

## 4.7 Dimensioni dell'adenoma ipofisario

Nella coorte con malattia di Cushing, è stata analizzata la correlazione tra le dimensioni dell'adenoma (micro vs macroadenoma) e i risultati dei test di primo livello e dei test dinamici.

UFC ( $p = 0.806$ ), LDDST ( $p = 0.522$ ) e LNSC ( $p = 0.986$ ) sono risultati simili tra micro- e macro-adenomi. Al contrario, come esposto in Figura 12, i livelli di ACTH sono risultati maggiori nei macroadenomi ( $p = 0.026$ ) (Tabella VIII).

I due gruppi hanno mostrato risposte comparabili ai test dinamici. Il delta cortisolo post HDDST è risultato sovrapponibile tra micro e macroadenomi ( $p=0.424$ ), così come il delta ACTH post CRH ( $p=0.327$ ), il delta cortisolo post CRH ( $p=0.732$ ), il delta ACTH post DDAVP ( $p=0.559$ ) e il delta cortisolo post DDAVP ( $p=0.895$ ). In sintesi, le dimensioni dell'adenoma ipofisario non hanno influenzato la risposta ormonale ai test di stimolo e soppressione valutati (Tabella IX).

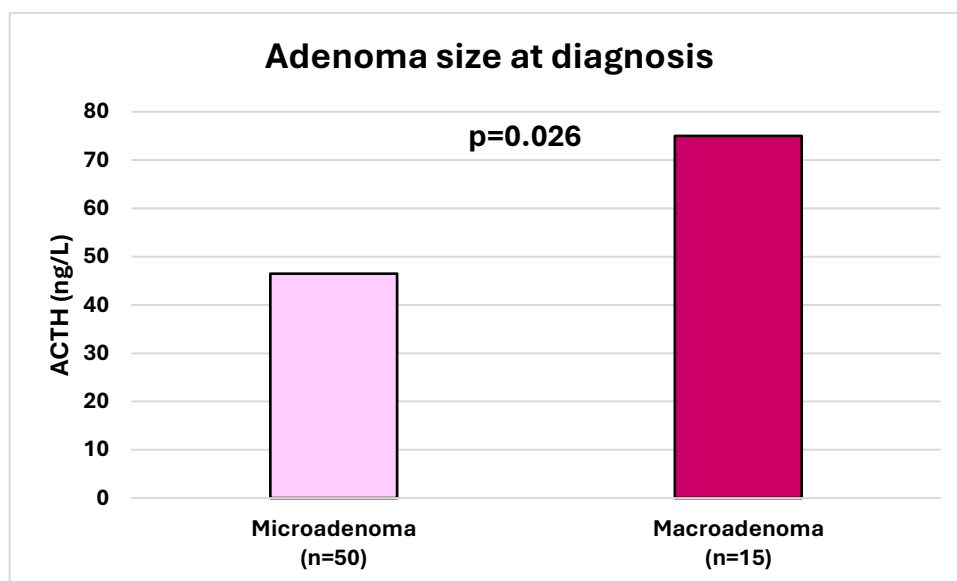


*Figura 12: confronto tra valori mediani di ACTH (ng/L) e dimensioni dell'adenoma ipofisario nella coorte CD*

|                  |       | UFC<br>(nmol/die)       | N  | p     | LDDST<br>(nmo/L)       | N  | p     | LNSC<br>(nmol/L)   | N  | p     | ACTH<br>(ng/L)       | N  | p      |
|------------------|-------|-------------------------|----|-------|------------------------|----|-------|--------------------|----|-------|----------------------|----|--------|
| Pituitary<br>MRI | Micro | 535.0<br>[357.2;897.0]  | 49 | 0.806 | 324.5<br>[99.0;450.5]  | 46 | 0.522 | 8.8<br>[6.3;24.6]  | 45 | 0.986 | 46.5<br>[30.6;68.4]  | 50 | 0.026* |
|                  | Macro | 449.0<br>[328.0;1370.0] | 15 |       | 392.0<br>[260.5;489.5] | 13 |       | 11.9<br>[6.7;17.5] | 14 |       | 75.0<br>[44.6;100.8] | 15 |        |

**Tabella VIII.** Correlazione tra dimensioni dell'adenoma e test di primo livello nella coorte CD

|                  |       | Delta<br>cortisol<br>post HDDST | N  | p     | Delta ACTH<br>post CRH | N  | p     | Delta<br>cortisol<br>post CRH | N  | p     | Delta ACTH<br>post<br>DDAVP | N  | P     | Delta<br>cortisol<br>post<br>DDAVP | N  | p     |
|------------------|-------|---------------------------------|----|-------|------------------------|----|-------|-------------------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|------------------------------------|----|-------|
| Pituitary<br>MRI | Micro | 0.851<br>[0.77;0.89]            | 44 | 0.424 | 1.533<br>[0.75;2.79]   | 50 | 0.327 | 0.657<br>[0.33;0.97]          | 50 | 0.732 | 1.140<br>[0.57;3.28]        | 50 | 0.559 | 0.462<br>[0.29;0.78]               | 49 | 0.895 |
|                  | Macro | 0.837<br>[0.51;0.86]            | 11 |       | 1.569<br>[0.60;2.20]   | 15 |       | 0.649<br>[0.11;1.01]          | 15 |       | 1.535<br>[0.72;4.30]        | 14 |       | 0.425<br>[0.29;0.92]               | 14 |       |

**Tabella IX.** Correlazione tra dimensioni dell'adenoma e test dinamici nella coorte CD

#### **4.8 Altre variabili**

Per le variabili BMI, rapido aumento di peso, disturbi dell'umore e fratture vertebrali non è stata riscontrata alcuna associazione statisticamente significativa né ai test di primo livello nelle coorti CD, ACS e totale, né ai test dinamici nella coorte CD. Anche la circonferenza vita, analizzata come misura alternativa al BMI per la valutazione dell'adiposità viscerale, non ha raggiunto la significatività statistica in nessuna delle coorti esaminate.

#### 4.9 Influenza dei livelli basali di ACTH e cortisolo sulla risposta ai test dinamici di secondo livello

- ACTH basale (CRH test) vs. Delta ACTH post-CRH
  - Coefficiente di correlazione ( $\rho$ ):  $-0,167$
  - Significatività ( $p$ , a due code):  $0.190$
  - N: 63
- ACTH basale (DDAVP test) vs. Delta ACTH post-DDAVP
  - Coefficiente di correlazione ( $\rho$ ):  $-0,276$
  - Significatività ( $p$ , a due code):  $0.028^*$
  - N: 64
- Cortisolo basale (CRH test) vs. Delta cortisolo post-CRH
  - Coefficiente di correlazione ( $\rho$ ):  $-0,462$
  - Significatività ( $p$ , a due code):  $<0.001^*$
  - N: 63
- Cortisolo basale (DDAVP test) vs. Delta cortisolo post-DDAVP
  - Coefficiente di correlazione ( $\rho$ ):  $-0,517$
  - Significatività ( $p$ , a due code):  $0.000^*$
  - N: 63

La correlazione tra ACTH basale e delta ACTH post-CRH non ha raggiunto la significatività statistica ( $p=0.190$ ), al contrario la correlazione tra ACTH basale e delta ACTH post-DDAVP è rilevante, ( $p=0.028$ ), come anche la correlazione tra cortisolo basale e delta cortisolo post-CRH ( $p<0.001$ ), Figura 13, e la correlazione tra cortisolo basale e delta cortisolo post-DDAVP ( $p<0.001$ ), Figura 14.

Tutte le correlazioni significative presentano segno negativo.

| Coppia di variabili                       | $\rho$   | $p$       | Forza        | N  |
|-------------------------------------------|----------|-----------|--------------|----|
| ACTH vs % Delta ACTH post-CRH             | $-0,167$ | $0.190$   | Trascurabile | 63 |
| ACTH vs % Delta ACTH post-DDAVP           | $-0,276$ | $0.028^*$ | Debole       | 64 |
| Cortisolo vs % Delta Cortisolo post-CRH   | $-0,462$ | $0.001^*$ | Moderata     | 63 |
| Cortisolo vs % Delta Cortisolo post-DDAVP | $-0,517$ | $0.001^*$ | Moderata     | 63 |

**Tabella X.** Correlazione (Rho di Spearman) tra valori basali di ACTH e cortisolo e risposta percentuale ai test di stimolo con CRH e desmopressina

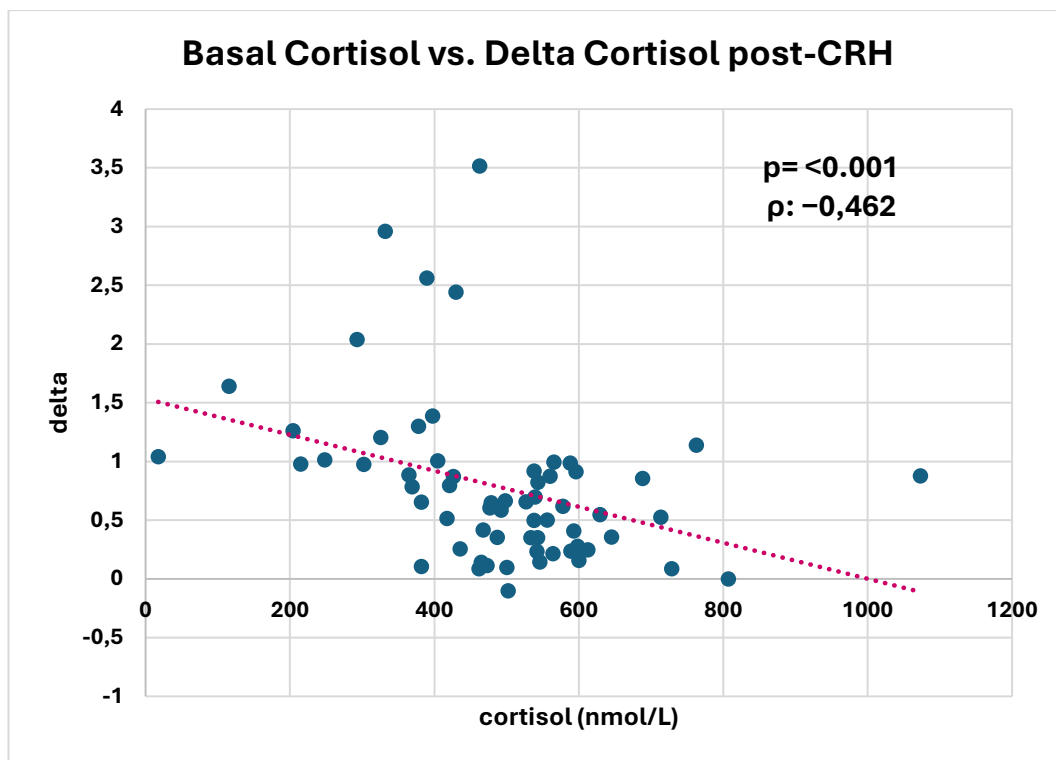


*Figura 13: grafico a dispersione raffigurante correlazione tra cortisolo basale e delta cortisolo post-CRH*

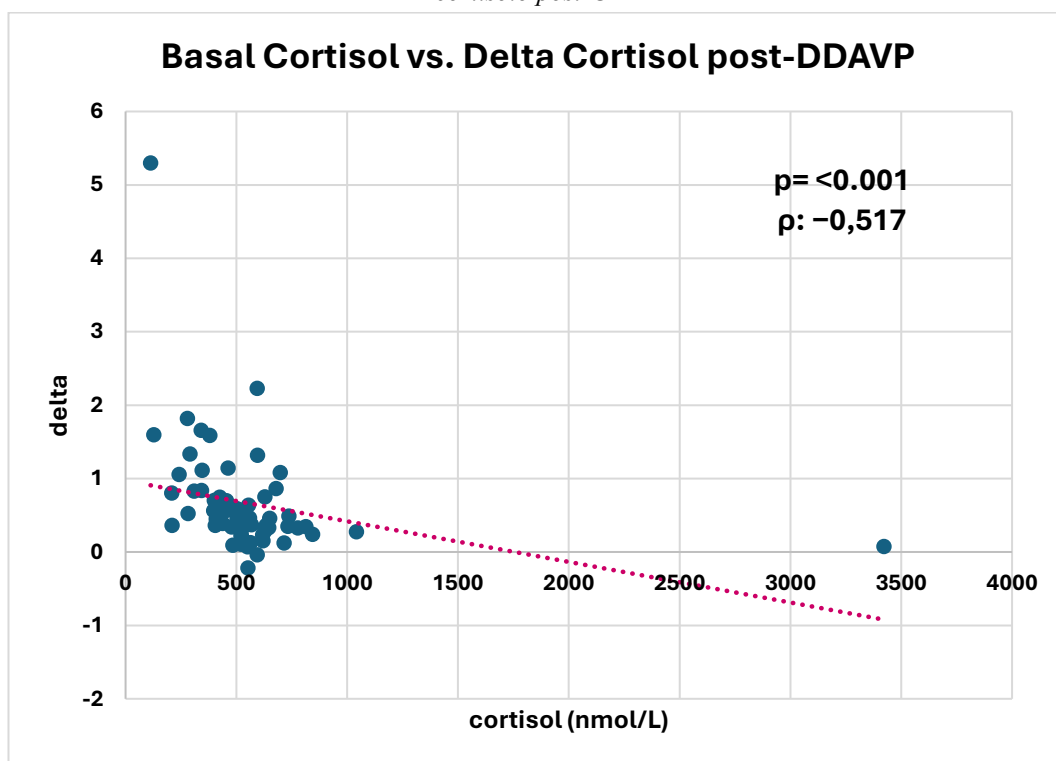


*Figura 14: grafico a dispersione raffigurante correlazione tra cortisolo basale e delta cortisolo post-DDAVP*

#### **4.10 Analisi della variabilità intra-personale**

In relazione a UFC, 70 pazienti presentavano almeno due misurazioni. La distribuzione dei valori è rappresentata in Figura 15. Il CV mediano è risultato del 31.4%. Non sono state individuate differenze significative nel CV in base a tipo di sindrome di Cushing (CD vs ACS), numero di misurazioni effettuate e severità dell'ipercortisolismo (Tabella XI).

Sessantaquattro pazienti presentavano almeno due misurazioni del LNSC. La distribuzione dei valori è rappresentata in Figura 16. Il CV mediano è risultato del 36%. I pazienti con CD presentavano CV superiore ai pazienti con ACS ( $p=0.047$ ). Il CV non si modificava in base al numero di misurazioni effettuate e alla severità dell'ipercortisolismo (Tabella XII).

In relazione al cortisolo sierico del mattino, 70 pazienti presentavano multiple valutazioni al momento dell'inquadramento diagnostico (Figura 17). Il CV mediano è risultato del 18.3%, senza differenze tra i sottogruppi (Tabella XIII).

La variabilità dell'ACTH del mattino è stata valutata solo nei pazienti con CD (Figura 18), poiché il dato di ACTH era tendenzialmente soppresso dall'ipercortisolismo negli ACS. I soggetti con CD hanno presentato CV mediano di 21.1%, senza differenze in base al numero di misurazioni o alla severità dell'ipercortisolismo (Tabella XIV).

| Gruppo        | N  | CV medio | CV mediano | CV minimo | CV massimo | CV Q1 | CV Q3 | p     |
|---------------|----|----------|------------|-----------|------------|-------|-------|-------|
| All           | 70 | 30,4     | 31,4       | 1         | 71,5       | 19,5  | 39,3  | /     |
| CD            | 48 | 29,5     | 29,1       | 1         | 63,5       | 20,2  | 39,5  | 0,787 |
| ACS           | 22 | 32,4     | 33,5       | 2,41      | 71,5       | 17,1  | 38,1  |       |
| 2 misurazioni | 32 | 28,2     | 31,6       | 1         | 59,9       | 20,1  | 36,8  | 0,11  |
| 3 misurazioni | 24 | 28,2     | 22,5       | 2,62      | 70,6       | 15,6  | 38,7  |       |
| 4 misurazioni | 14 | 39,3     | 37,9       | 14,5      | 71,5       | 24,2  | 50,1  |       |
| Mild          | 19 | 30,9     | 32,4       | 2,41      | 63,3       | 16,9  | 40,1  | 0,853 |
| Moderate      | 34 | 28,5     | 29,1       | 2,77      | 58,2       | 20,9  | 36,9  |       |
| Severe        | 17 | 33,6     | 34,9       | 1         | 71,5       | 17    | 53    |       |

**Tabella XI.** Coefficiente di variazione (espresso in %) per UFC (urinary free cortisol) nella coorte completa e in base al sottogruppo.

| Gruppo        | N  | CV medio | CV mediano | CV minimo | CV massimo | CV Q1 | CV Q3 | p      |
|---------------|----|----------|------------|-----------|------------|-------|-------|--------|
| All           | 64 | 40       | 36         | 1,24      | 129        | 17,5  | 58,5  | /      |
| CD            | 47 | 44,5     | 37,2       | 1,7       | 129        | 18,5  | 63,5  | 0,047* |
| ACS           | 17 | 27,5     | 22,3       | 1,24      | 58,7       | 9,98  | 47,7  |        |
| 2 misurazioni | 41 | 37,1     | 31,2       | 1,24      | 97,6       | 9,98  | 59,2  | 0,399  |
| 3 misurazioni | 13 | 52,2     | 36,7       | 17,7      | 129        | 33,3  | 54,4  |        |
| 4 misurazioni | 10 | 36,3     | 36,6       | 4,83      | 58,7       | 35,1  | 40,3  |        |
| Mild          | 17 | 40,2     | 35,9       | 1,24      | 119        | 17,7  | 58,5  | 0,846  |
| moderate      | 28 | 41,1     | 37         | 1,7       | 129        | 21,3  | 51,9  |        |
| Severe        | 19 | 38,3     | 35,4       | 4,27      | 97,6       | 9,19  | 64,5  |        |

**Tabella XII.** Coefficiente di variazione (espresso in %) per LNSC (late-night salivary cortisol) nella coorte completa e in base al sottogruppo.

| Gruppo        | N  | CV medio | CV mediano | CV minimo | CV massimo | CV Q1 | CV Q3 | p     |
|---------------|----|----------|------------|-----------|------------|-------|-------|-------|
| All           | 70 | 26,7     | 18,3       | 0,791     | 134        | 8,37  | 33,7  | /     |
| CD            | 64 | 26,1     | 18,3       | 0,791     | 134        | 8,26  | 33,3  | 0,607 |
| ACS           | 6  | 33       | 24,1       | 4,24      | 87,7       | 9,5   | 46,1  |       |
| 2 misurazioni | 30 | 25,4     | 15,3       | 0,791     | 134        | 8,71  | 33,3  | 0,693 |
| 3 misurazioni | 40 | 27,8     | 19,9       | 0,934     | 110        | 6,28  | 34,2  |       |
| mild          | 15 | 26,8     | 20,4       | 0,934     | 110        | 6,95  | 33,2  | 0,634 |
| moderate      | 35 | 27,1     | 21         | 3,01      | 134        | 9,9   | 37,2  |       |
| severe        | 20 | 25,9     | 25,9       | 0,791     | 95,5       | 6     | 33,5  |       |

**Tabella XIII.** Coefficiente di variazione (espresso in %) per il cortisolo sierico del mattino nella coorte completa e in base al sottogruppo.

| Gruppo        | N  | CV medio | CV mediano | CV minimo | CV massimo | CV Q1 | CV Q3 | p     |
|---------------|----|----------|------------|-----------|------------|-------|-------|-------|
| CD            | 65 | 26,9     | 21,1       | 0,283     | 85,5       | 11,9  | 35,1  | /     |
| 2 misurazioni | 16 | 21,1     | 20,1       | 0,283     | 50         | 11,6  | 29,3  | 0,402 |
| 3 misurazioni | 49 | 28,8     | 21,8       | 0,623     | 85,5       | 13,2  | 40,2  |       |
| mild          | 15 | 26,7     | 19,7       | 0,283     | 74,3       | 11,3  | 34,1  | 0,444 |
| moderate      | 32 | 29,1     | 23,4       | 0,623     | 85,5       | 15,5  | 36,4  |       |
| severe        | 18 | 23,2     | 19,2       | 3,25      | 63,1       | 11,3  | 30,1  |       |

**Tabella XIV.** Coefficiente di variazione (espresso in %) per ACTH nei pazienti con Malattia di Cushing (CD), anche in base al sottogruppo (Cushing surrenalici esclusi per valori di ACTH soppressi dalla malattia di base).

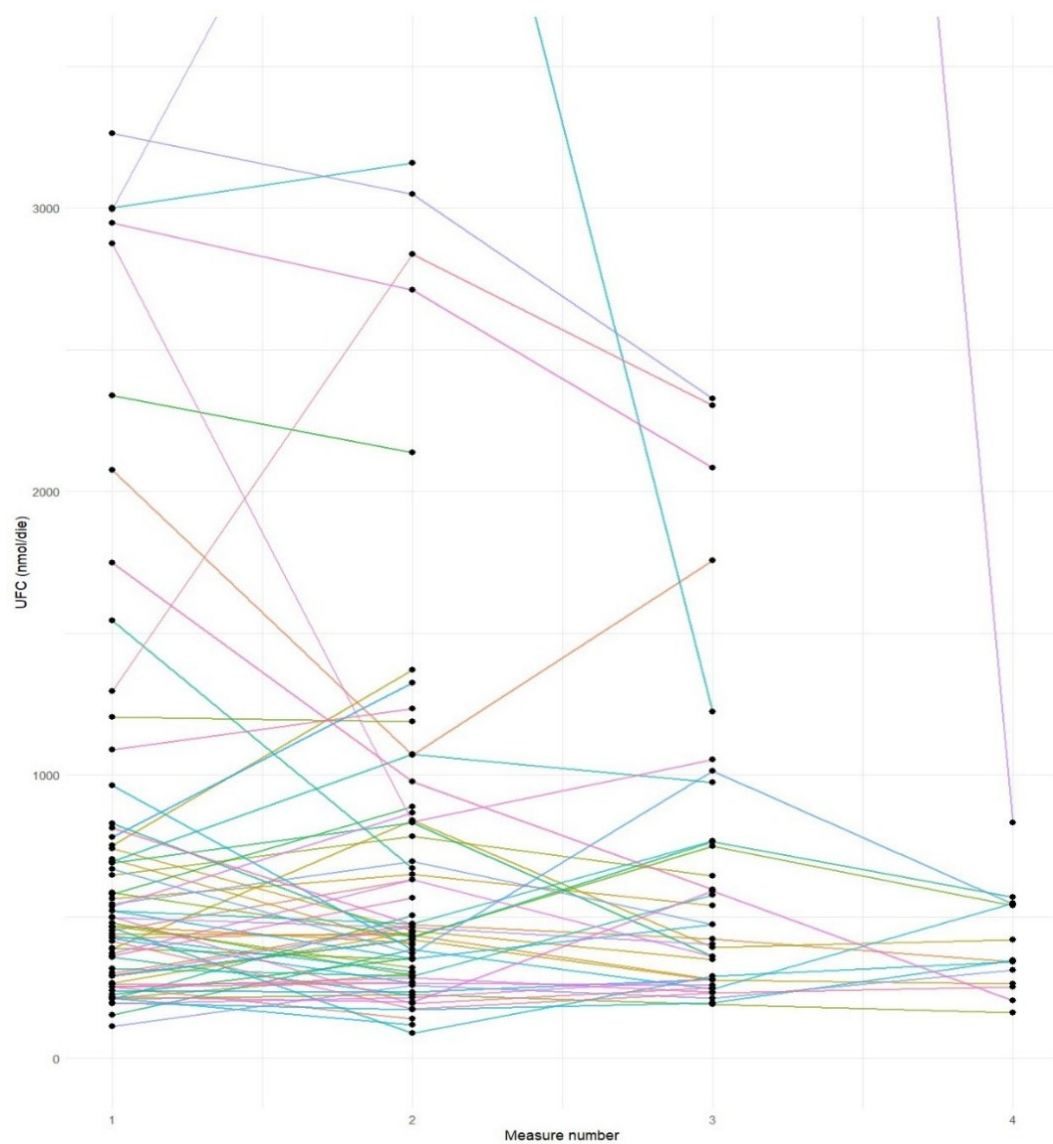


**Figura 15.** Spaghetti plot con i valori di UFC (urinary free cortisol) in diverse misurazioni nella coorte. La visualizzazione è stata censurata a 3500 nmol/die nell'asse y per la presenza di importanti outlier.

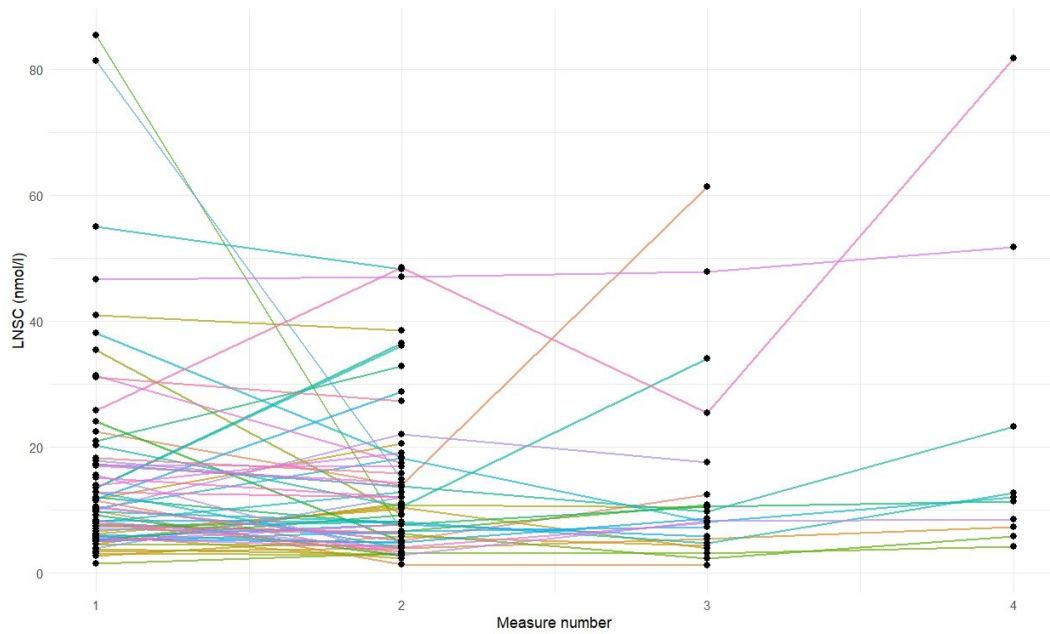


**Figura 16.** Spaghetti plot con i valori di LNSC (late-night salivary cortisol) in diverse misurazioni nella coorte.

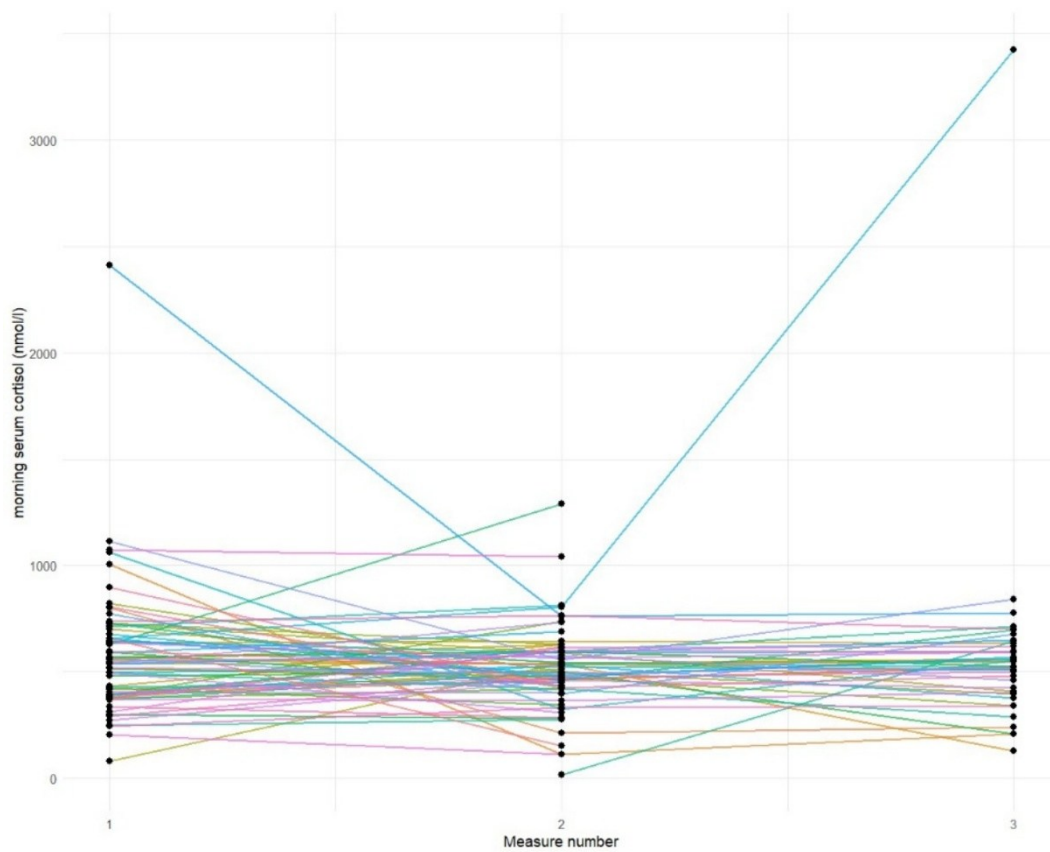


**Figura 17.** Spaghetti plot con i valori di cortisolo sierico del mattino in diverse misurazioni nella coorte.

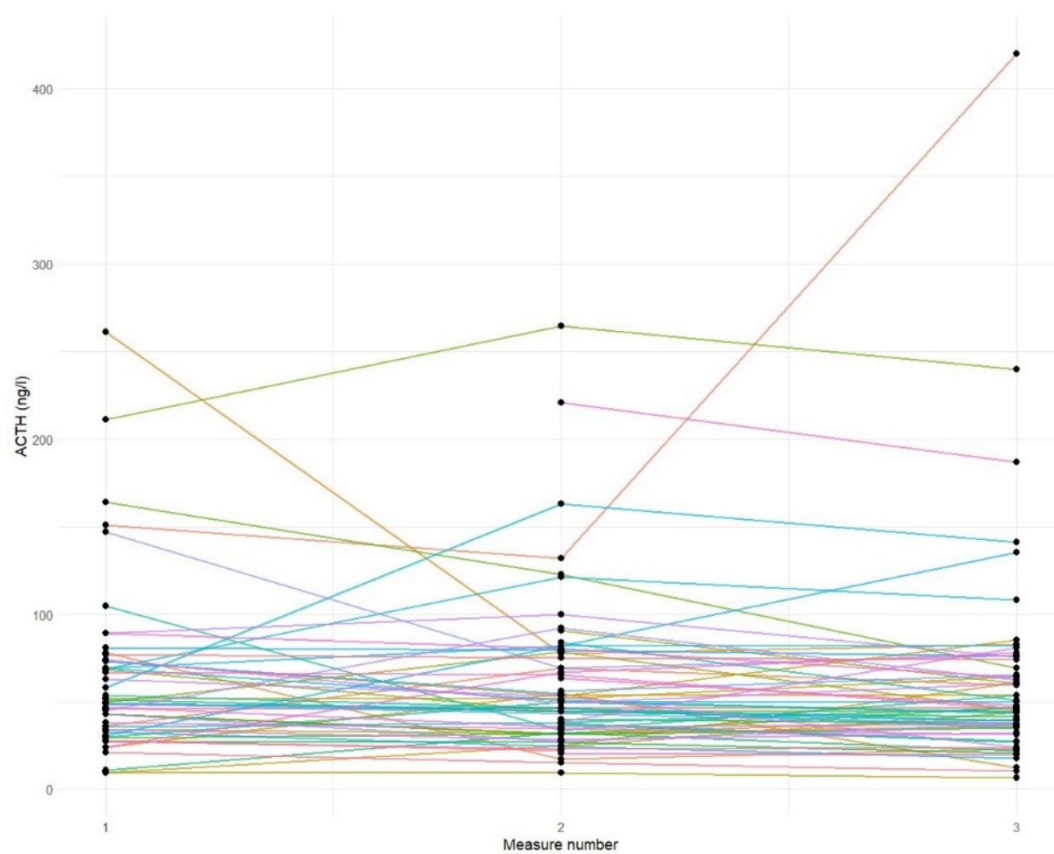


**Figura 18.** Spaghetti plot con i valori di ACTH in diverse misurazioni nei pazienti con Malattia di Cushing (CD).



## 5. DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio evidenziano come determinati aspetti della presentazione clinica iniziale dei pazienti con sospetto ipercortisolismo siano talvolta associati a differenti profili di risposta agli esami ematochimici di primo e secondo livello impiegati nella diagnosi della Sindrome di Cushing. I dati ottenuti sono stati raggruppati in base alle diverse presentazioni cliniche e non in base ai diversi test che compongono l'algoritmo diagnostico della CS, con l'obiettivo di fornire uno strumento pratico non tanto allo specialista endocrinologo, quanto piuttosto al medico di medicina generale e ad altri specialisti che, nella pratica clinica quotidiana, possono trovarsi di fronte a manifestazioni (quali ipertensione resistente, rapido aumento di peso, alterazioni del metabolismo glucidico o del profilo lipidico) che nella diagnosi differenziale annoverano anche la sindrome di Cushing tra le possibili cause.

### 5.1 Ipertensione arteriosa

L'analisi della relazione tra classi di ipertensione arteriosa (assente, presente, resistente), test di primo livello e ACTH ha prodotto risultati che meritano un'attenta interpretazione, in quanto rivelano un pattern apparentemente controintuitivo ma coerente con evidenze emergenti nella letteratura. Nella coorte combinata, la presenza di ipertensione arteriosa si associava a differenti livelli di cortisolo libero urinario (UFC,  $p=0.009$ ). Nello specifico, si osservava un gradiente decrescente dei livelli di cortisoloria in funzione della severità dell'ipertensione. I confronti post-hoc hanno evidenziato che i pazienti con ipertensione resistente presentavano livelli di UFC inferiori rispetto sia ai normotesi ( $p=0.003$ ) che agli ipertesi semplici ( $p=0.016$ ). Un comportamento simile è stato poi riscontrato nella coorte di pazienti con malattia di Cushing, dove l'analisi a tre gruppi ha evidenziato una tendenza alla significatività statistica per la cortisoloria delle 24 ore ( $p=0.054$ ), senza raggiungere la soglia convenzionale di  $p<0.05$ . Tuttavia, anche in questo caso, il confronto a coppie ha rivelato differenze statisticamente significative: i pazienti con ipertensione resistente presentavano valori di UFC inferiori rispetto sia ai normotesi ( $p=0.029$ ) sia agli ipertesi non resistenti ( $p=0.032$ ). La mancata significatività nell'analisi globale a tre gruppi è, quindi, verosimilmente attribuibile alla ridotta potenza statistica legata alla numerosità campionaria e alla dispersione dei dati, che maschera l'associazione emergente nei confronti a coppie. Allo stesso modo, la

ridotta numerosità campionaria ( $n=31$ ) nella coorte di pazienti con Cushing surrenalico, con sottogruppi particolarmente esigui, ha ulteriormente limitato la potenza statistica. In questa sottocoorte, nessuno dei parametri biochimici di primo livello presenta differenze statisticamente significative tra le tre classi di ipertensione arteriosa. Osservando tuttavia il trend delle mediane dei valori di UFC nelle varie classi di ipertensione, si può notare come questo ricalchi marcatamente quanto emerso nella coorte totale e nella malattia di Cushing.

Il dato più rilevante e apparentemente controintuitivo, coerente tra le varie coorti, è la direzione dell'associazione: i pazienti con ipertensione resistente presentano valori mediani di UFC paradossalmente più bassi rispetto sia ai normotesi sia agli ipertesi. Questo pattern contrasta con l'assunto tradizionale secondo cui la severità dell'ipertensione nella sindrome di Cushing è direttamente proporzionale all'intensità dell'ipercortisolismo. Tuttavia, tale osservazione trova riscontro in diversi studi della letteratura ed è ulteriormente avvalorata dall'esclusione, operata a priori nel disegno dello studio, dei pazienti con sindrome di Cushing ectopica e carcinoma surrenalico, forme frequentemente caratterizzate da ipercortisolismo massivo con spiccato effetto mineralcorticoide, che avrebbero potuto introdurre un bias verso un'associazione diretta tra livelli di cortisolo e severità dell'ipertensione.

Particolarmente rilevante è il contributo dello studio "Cushingomic" di Ceccato et al., che ha analizzato l'accuratezza diagnostica dei test di screening in 615 pazienti senza sindrome di Cushing e 40 con sindrome di Cushing confermata. Gli autori hanno dimostrato che comorbidità quali diabete, ipertensione e obesità erano paradossalmente più comuni nei pazienti senza sindrome di Cushing, e che la direzione dei vettori di queste comorbidità non era allineata con quella dei test di screening, con una correlazione scarsa tra loro presenza e livelli di cortisolo (50). Questo è di fondamentale importanza per l'interpretazione dei risultati della presente coorte: la presenza e la severità dell'ipertensione nella CD non sono linearmente determinate dall'intensità dell'ipercortisolismo al momento della diagnosi, ma riflettono piuttosto l'interazione complessa tra durata dell'esposizione al cortisolo, suscettibilità individuale e fattori di rischio cardiovascolare concomitanti.

Possiamo quindi dedurre una prima implicazione clinica, che riguarda la strategia di screening per la sindrome di Cushing nei pazienti che si presentano con

ipertensione arteriosa come manifestazione clinica predominante. In questi pazienti l'utilizzo della sola cortisoluria delle 24 ore come test di screening potrebbe risultare insufficiente, poiché i valori di UFC possono essere paradossalmente più bassi rispetto a quelli attesi. Il Position Statement SIE, sottolinea la necessità di utilizzare multipli test di primo livello per lo screening dell'ipercortisolismo nei pazienti ipertesi (7).

I risultati sopra descritti suggeriscono un'ulteriore chiave interpretativa di rilevante interesse clinico: l'ipertensione resistente nella sindrome di Cushing potrebbe rappresentare un marcatore surrogato di una storia di ipercortisolismo più prolungata nel tempo. A supporto di questa ipotesi, Scherthaner-Reiter et al., in uno studio su 118 pazienti con sindrome di Cushing in remissione, hanno dimostrato che valori basali più bassi di UFC si associavano negativamente al tempo di esposizione all'eccesso di glucocorticoidi e, paradossalmente, a un numero maggiore di comorbidità a lungo termine (51).

Da quanto appena riportato ne possiamo trarre una seconda implicazione, rilevante dal punto di vista della sanità pubblica. La malattia di Cushing ipofisaria presenta un ritardo diagnostico medio di 38 mesi dalla comparsa dei primi sintomi (52). Questo ritardo è attribuibile al decorso insidioso della malattia e alla sovrapposizione dei sintomi con condizioni comuni. In questo contesto, è possibile ipotizzare due scenari clinici distinti: da un lato, un paziente con esposizione recente all'ipercortisolismo può presentarsi con valori elevati di UFC e ipertensione di nuova insorgenza, configurando un quadro biochemicalmente più "florido" ma potenzialmente transitorio; dall'altro, un paziente con esposizione prolungata può presentare un fenotipo biochimico paradossalmente più sfumato ma un quadro clinico più severo, con ipertensione resistente e comorbidità consolidate. Quest'ultimo scenario è particolarmente insidioso, poiché il fenotipo biochimico attenuato può indurre il clinico a non sospettare una sindrome di Cushing, soprattutto in un contesto di medicina generale dove la patologia è rara e non sempre considerata nella diagnosi differenziale dell'ipertensione resistente. È inoltre plausibile che i pazienti con ipertensione resistente alla diagnosi (in quanto espressione di un'esposizione più prolungata) presentino tempi di recupero più lunghi e una maggiore probabilità di persistenza delle comorbidità cardiovascolari dopo la remissione, richiedendo un follow-up più intensivo e prolungato. Il

riconoscimento di pattern clinici “red-flag” è quindi essenziale per ridurre la latenza diagnostica nelle popolazioni ad alto rischio.

Nella sottocoorte con malattia di Cushing ipofisaria è stata inoltre valutata l'influenza della classe di ipertensione arteriosa sulle variazioni (delta) dei parametri biochimici ottenuti dai test dinamici di secondo livello. L'analisi evidenzia che la presenza e l'entità dell'ipertensione arteriosa determinavano differenze statisticamente significative nei delta di ACTH post-CRH e ACTH post-DDAVP, ove si denota che i pazienti normotesi mostravano la risposta più vigorosa ai test, significativamente superiore rispetto ai pazienti con ipertensione resistente e agli ipertesi semplici. Emergevano invece dei trend coerenti per il delta cortisolo post-HDDST e il delta cortisolo post-DDAVP. Per entrambi il confronto a coppie ha poi rivelato differenze statisticamente significative: in particolare, nei normotesi si osserva una risposta maggiore rispetto ai pazienti con ipertensione resistente.

Dal punto di vista clinico, questi risultati suggeriscono che l'ipertensione resistente nella malattia di Cushing ipofisaria si associa a un fenotipo biochimico caratterizzato da una ridotta reattività corticotropa ai test di stimolo e soppressione, il che potrebbe avere implicazioni sia nella stratificazione prognostica sia nell'interpretazione diagnostica dei test di secondo livello. In pazienti con ipertensione resistente, una risposta attenuata dell'ACTH al CRH o alla DDAVP non dovrebbe essere interpretata come elemento a sfavore della diagnosi di origine ipofisaria, ma piuttosto come espressione di un ipercortisolismo più severo e cronicizzato. In altre parole, un'esposizione prolungata all'ipercortisolismo potrebbe associarsi, nel tempo, a una riduzione dell'attività secretoria dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, configurando un quadro biochimico apparentemente più sfumato nonostante la presenza di complicanze cardiovascolari consolidate.

### **5.1.1 Peggioramento del controllo pressorio**

Nella coorte di pazienti affetti da malattia di Cushing, la stratificazione in base al rapido deterioramento del controllo pressorio ha evidenziato differenze limitatamente alla risposta al test di soppressione con desametasone ad alte dosi ( $p=0.034$ ), senza coinvolgere i restanti test di primo e secondo livello. I pazienti con rapido peggioramento pressorio presentano un delta cortisolo post-HDDST inferiore rispetto ai pazienti senza peggioramento. Tale riscontro è clinicamente rilevante poiché una minore soppressibilità al HDDST è tradizionalmente associata

a forme di ipercortisolismo più aggressivo o, in contesti differenti, alla secrezione ectopica di ACTH (10). Ne deriva che l'HDDST ha un'accuratezza diagnostica complessivamente bassa nella diagnosi differenziale tra malattia di Cushing e ACTH ectopico. Come evidenziato dalla meta-analisi di Ceccato et al., l'accuratezza diagnostica dell'HDDST è complessivamente inferiore rispetto al test con CRH, e i risultati possono essere discordanti fino a un terzo dei pazienti (53).

## 5.2 Iperandrogenismo

Il fenotipo iperandrogenico è stato definito sulla base della presenza di segni clinici di eccesso androgenico, quali irsutismo (anche quello post-menopausale), acne, amenorrea o irregolarità mestruali. Si è scelto di non adottare la definizione di fenotipo PMOS in senso stretto, in quanto la coorte complessiva include pazienti in età pre-adolescenziale e post-menopausale, nelle quali i criteri diagnostici per la PMOS non sono applicabili. Il termine è stato pertanto utilizzato in un'accezione più ampia, per identificare le pazienti con manifestazioni cliniche suggestive di eccesso androgenico indipendentemente dall'età e dallo stato mestruale.

Nella coorte complessiva, la presenza dei segni e sintomi di iperandrogenismo si è associata a valori più elevati di cortisolemia delle 24 ore ( $p=0.014$ ) e di ACTH ( $p=0.012$ ), mentre non ha influenzato gli altri test di primo livello. Questi risultati sono condivisi dalla sottocoorte con malattia di Cushing in cui l'iperandrogenismo si associava a valori più elevati di UFC ( $p=0.009$ ) e di ACTH ( $p=0.005$ ). Nella sottocoorte ACS non sono emersi risultati rilevanti, pur considerando che anche in questo caso i valori mediani di UFC sono risultati più elevati nelle pazienti con fenotipo iperandrogenico, per cui l'assenza di significatività è verosimilmente attribuibile alla ridotta numerosità campionaria.

Alla luce dei dati ottenuti risulta obbligatorio fare delle considerazioni. Poiché la coorte complessiva include sia pazienti con CD sia pazienti con ACS, il valore mediano di ACTH nel gruppo con fenotipo iperandrogenico (39,8 ng/L) suggerisce che il fenotipo sia prevalentemente rappresentato tra le pazienti con CD piuttosto che con ACS. Tale osservazione è biologicamente plausibile: nella CS surrenalica, l'ACTH è tipicamente soppresso dal feedback negativo esercitato dall'ipercortisolismo autonomo, e la stimolazione ACTH-mediata della corteccia surrenalica, responsabile dell'eccesso di androgeni surrenalici (DHEAS, androstenedione) che contribuisce al fenotipo, è assente. In questo caso, il fenotipo,

quando presente, è sostenuto prevalentemente da meccanismi indiretti (insulino-resistenza, riduzione dell'SHBG) che non si traducono in un'amplificazione misurabile dei parametri biochimici di ipercortisolismo (54,55).

Quanto presentato per la malattia di Cushing trova solido supporto nella letteratura scientifica. L'associazione tra iperandrogenismo e livelli più elevati di UFC e ACTH nella CD è coerente con il meccanismo fisiopatologico ACTH-dipendente della produzione androgenica surrenalica. Secondo le linee guida della Society for Endocrinology, l'iperandrogenismo è presente fino al 50% dei casi di sindrome di Cushing, ed è prevalentemente guidato dall'eccesso di ACTH che stimola la produzione surrenalica di cortisolo e androgeni (35). In sintesi, l'incremento parallelo di UFC e ACTH nelle pazienti con fenotipo iperandrogenico è coerente con un'iperattivazione dell'intero asse HPA.

Emergono inoltre dati clinicamente rassicuranti: la presenza di segni iperandrogenici non compromette l'accuratezza diagnostica di LDDST e LNSC, che mantengono la loro validità nello screening dell'ipercortisolismo anche in questa popolazione. UFC e ACTH, d'altra parte, emergono come marcatori più sensibili nel cogliere differenze di severità dell'ipercortisolismo all'interno della CD, identificando potenzialmente un sottogruppo di pazienti (per quanto riguarda l'iperandrogenismo) con malattia più attiva e meritevole di un monitoraggio più stretto.

È stato poi valutato l'impatto del fenotipo iperandrogenico sui test dinamici di secondo livello, impiegati nella diagnosi differenziale della sindrome di Cushing ACTH-dipendente. I risultati della presente coorte mostrano che la presenza dell'iperandrogenismo clinico non determina differenze significative in alcuno dei parametri valutati. Come dedotto precedentemente, questi risultati suggeriscono che i test dinamici possono essere interpretati con fiducia anche in presenza di fenotipo iperandrogenico concomitante.

### 5.3 Fenotipo PMOS

La relazione tra Sindrome Ovarica Poliendocrino-Metabolica (PMOS) e ipercortisolismo endogeno rappresenta un ambito di crescente interesse nella letteratura endocrinologica, in ragione della significativa sovrapposizione clinica e biochimica tra le due condizioni. Per questa analisi si è scelto di restringere il campo di osservazione rispetto alla precedente valutazione del fenotipo iperandrogenico, includendo esclusivamente le donne di età compresa tra 12 e 55 anni. Il limite superiore è stato fissato a 55 anni in considerazione del fatto che l'esordio dei sintomi precedeva anche di anni il momento della diagnosi, rendendo plausibile che il fenotipo fosse già presente in epoca pre-menopausale. Questa selezione ha consentito di applicare in modo più appropriato la definizione di fenotipo PMOS, superando i limiti della precedente analisi.

Nella coorte combinata, il fenotipo PMOS si associava a UFC più elevato ( $p=0.004$ ) e ACTH più elevato ( $p=0.007$ ). Questo risultato riflette prevalentemente il peso della coorte CD, ma conferma che il fenotipo PMOS identifica un sottogruppo con ipercortisolismo biochimicamente più severo, figurando come una "red flag" indipendentemente dall'eziologia. Parallelamente, nella sottocoorte CD, le pazienti con fenotipo PMOS presentano UFC più elevato ( $p=0.011$ ) e ACTH maggiore ( $p=0.008$ ). Nella sottocoorte ACS emerge invece un profilo parzialmente diverso: UFC non raggiunge la significatività statistica ( $p=0.053$ , borderline) nonostante presenti la differenza mediana tra i due gruppi più ampia tra tutte le coorti, verosimilmente per la ridotta numerosità campionaria ( $n=20$ ); risultano invece significativi il LDDST ( $p=0.007$ ) e l'ACTH ( $p=0.040$ ),

Quanto emerso per la malattia di Cushing è coerente con quanto riportato in letteratura: la PMOS figura tra le condizioni di "ipercortisolismo non neoplastico" in grado di attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e determinare risultati positivi ai test di screening (7). UFC è un test quantitativo che riflette la produzione totale di cortisolo nelle 24 ore e quindi è il più sensibile nel catturare differenze di entità dell'ipercortisolismo tra gruppi. Il fatto che risulti significativamente più elevato conferma che le pazienti CD con fenotipo PMOS hanno un ipercortisolismo quantitativamente più severo.

Allo stesso tempo, livelli più alti di ACTH si traducono in una maggiore stimolazione della zona reticolare, con conseguente eccesso androgenico

cl clinicamente manifesto (acne, irsutismo, irregolarità mestruali). Cela et al. (2025) hanno sottolineato che la CD è caratterizzata da un incremento più marcato di DHEAS e androstenedione rispetto alla PMOS, proprio per l'effetto stimolatorio dell'ACTH elevato sulla corteccia surrenalica, e che il profilo gonadotropinico differisce tra le due condizioni (LH/FSH elevato nella PMOS vs ridotto nella CD) (54). L'ACTH non è raccomandato come test di screening iniziale dall'Endocrine Society, ma piuttosto come test di classificazione eziologica (ACTH-dipendente vs indipendente); tuttavia, in questo contesto, il suo valore quantitativo aggiunge informazione sulla severità della malattia (11). Pertanto, la valutazione combinata di ACTH, profilo androgenico surrenalico e gonadotropine potrebbe migliorare la discriminazione tra le due condizioni, un aspetto che il Position Statement SIE riconosce raccomandando un approccio diagnostico integrato (7).

Per quanto riguarda la coorte ACS, è particolarmente interessante che sia proprio il LDDST a cogliere la differenza tra pazienti con e senza fenotipo PMOS ( $p=0.007$ ). Il DST è infatti il test di screening raccomandato come prima scelta nella patologia surrenalica, sia dalla review JAMA di Reincke e Fleseriu sia dal Consensus Lancet Diabetes & Endocrinology, che ne sottolineano la superiorità rispetto al LNSC, il quale presenta una specificità inferiore in questi pazienti (1,10). Il LDDST misura il grado di autonomia dell'adenoma surrenalico: il desametasone sopprime l'ACTH ipofisario, ma un surrene autonomo continua a secernere cortisolo indipendentemente dal feedback. In questo senso, il LDDST non dovrebbe essere interpretato come un semplice test dicotomico (positivo/negativo), ma come un parametro continuo di rischio. Pertanto, il fatto che le pazienti ACS con fenotipo PMOS mostrino valori di cortisolo post-DST meno soppressi potrebbe indicare che queste pazienti si collocano in una posizione più avanzata lungo il continuum dell'autonomia dell'asse, con implicazioni dirette sul rischio cardiometabolico (56). Ne possiamo trarre due implicazioni pratiche dirette: queste pazienti necessitano di uno screening metabolico completo e il grado di autonomia più elevato potrebbe influenzare la decisione terapeutica (57).

Valutando poi quanto emerso dallo studio di correlazione coi test dinamici nella coorte CD è stato riconfermato che nessuno di essi mostra differenze significative tra pazienti con e senza fenotipo PMOS (tutti  $p > 0.35$ ). Ciò è rassicurante: i protocolli diagnostici standard mantengono la loro validità indipendentemente dalla

presentazione clinica iperandrogenica, non rendendo necessario modificare i cut-off o l'interpretazione dei test in base alla presenza di fenotipo PMOS.

## 5.4 Dislipidemia

Siamo andati a valutare se e in che modo la presenza di dislipidemia correlasse con il grado di ipercortisolismo biochimico. Nella coorte combinata di 96 pazienti con sindrome di Cushing endogena, 60 pazienti su 86 valutabili, pari a circa il 70%, presentavano dislipidemia, un dato coerente con le stime della letteratura che riportano una prevalenza del 38-71% nella CS attiva, collocando la dislipidemia tra le manifestazioni frequenti e non specifiche della sindrome di Cushing (1). L'analisi ha evidenziato che un assetto dislipidemico determinava differenze significative esclusivamente sui livelli di cortisolemia delle 24 ore (UFC), mentre non emergevano differenze statisticamente significative per gli altri test di primo livello e l'ACTH. In particolare, i pazienti dislipidemici presentavano livelli mediani di UFC inferiori rispetto ai pazienti non dislipidemici ( $p=0.041$ ). Questo dato è stato riscontrato anche nella sottocoorte CD ( $p=0.032$ ). Nella sottocoorte surrenalica, a differenza di quanto osservato finora, nessun parametro biochimico ha raggiunto la significatività statistica. È tuttavia degno di nota che anche nella coorte surrenalica si osserva la medesima tendenza numerica, con valori mediani di UFC più elevati nel gruppo non dislipidemico, senza raggiungere la significatività statistica verosimilmente a causa della ridotta numerosità campionaria.

Quanto emerso sembra contraddire l'attesa di una relazione diretta tra grado di ipercortisolismo e severità delle complicanze metaboliche. Tuttavia, la linea guida dell'Endocrine Society sottolinea che la severità della dislipidemia è influenzata non solo dal grado di ipercortisolismo, ma anche dalla durata dell'esposizione al cortisolo, dalla presenza di diabete e dal grado di obesità viscerale (58). Anche l'assenza di differenze significative per LDDST, LNSC e ACTH è coerente con il concetto che la soppressibilità dell'asse, il nadir notturno del cortisolo salivare e i livelli di ACTH nella sindrome di Cushing non correlano necessariamente con le complicanze metaboliche, che dipendono maggiormente dall'esposizione tissutale cumulativa al cortisolo e da una complessa interazione multifattoriale che trascende il semplice livello di cortisolo circolante (59).

I risultati trovano un riscontro particolarmente significativo nel già citato lavoro di Ceccato et al. (2025), che ha introdotto l'approccio "Cushingomic" per la diagnosi

dell'ipercortisolismo endogeno. In questo studio, l'analisi delle componenti principali (PCA) ha dimostrato che le comorbidità metaboliche (diabete, ipertensione e obesità) erano paradossalmente più comuni nei pazienti senza sindrome di Cushing, e che la direzione dei loro vettori nella PCA non era allineata con quella dei test di screening biochimico, con una correlazione tra comorbidità e test di screening definita "poor" (scarsa) (9).

Da quanto emerso possiamo trarre implicazioni rilevanti sia per la diagnosi sia per l'inquadramento clinico del paziente: da un lato, si rafforza la necessità di non sottovalutare forme di ipercortisolismo biochimicamente meno marcate, che potrebbero sottendere un'esposizione cronica con un carico cumulativo di danno metabolico significativo; dall'altro, come raccomandato dal Position Statement della SIE e dalla linea guida dell'Endocrine Society, si sottolinea l'importanza di uno screening metabolico completo e di un trattamento aggressivo dei fattori di rischio cardiovascolare in tutti i pazienti con sindrome di Cushing, indipendentemente dall'entità dell'ipercortisolismo al momento della diagnosi (58).

Nella coorte di pazienti con malattia di Cushing, infine, la risposta ai test dinamici (HDDST, CRH, DDAVP) non ha mostrato differenze significative tra i due gruppi. Questo dato conferma che la performance diagnostica dei test dinamici non è compromessa dalla coesistenza di un fenotipo dislipidemico.

## **5.5 Alterazione del metabolismo glucidico**

L'ipercortisolismo cronico, attraverso meccanismi pleiotropici che includono la stimolazione della gluconeogenesi epatica, l'induzione di insulino-resistenza periferica, la compromissione della secrezione insulinica beta-cellulare e la promozione della lipotossicità viscerale, determina un progressivo deterioramento del metabolismo glucidico che si manifesta lungo uno spettro che va dalla normoglicemia al prediabete fino al diabete mellito conclamato (8). Proseguendo nell'analisi dell'impatto delle complicanze metaboliche sull'ipercortisolismo biochimico siamo andati a valutare se e in che modo la presenza e entità dell'alterazione del metabolismo glucidico correlasse con i test di primo livello e l'ACTH.

In nessuna delle tre coorti analizzate (coorte totale, coorte CD e coorte ACS) la presenza di differenti gradi di alterazione del metabolismo glucidico

(normoglicemia, prediabete e diabete mellito) ha determinato differenze rilevanti nei test di primo livello (UFC, LDDST, LNSC) e ACTH. Questi dati indicano che il grado di ipercortisolismo basale, misurato attraverso i test di screening, è sostanzialmente comparabile tra i tre gruppi metabolici e che i test di primo livello per la diagnosi di CS mantengono la loro affidabilità diagnostica indipendentemente dallo stato metabolico glucidico del paziente. L'indipendenza dei test di screening dallo stato metabolico del paziente rappresenta un fenomeno trasversale alle diverse eziologie dell'ipercortisolismo endogeno ed è coerente con il concetto, ormai ribadito, che le complicanze cardiometaboliche della sindrome di Cushing dipendono da una complessa interazione multifattoriale che trascende il semplice livello di cortisolo circolante, includendo la durata dell'esposizione al cortisolo, la sensibilità tissutale individuale e la presenza di fattori di rischio preesistenti (59). Come già discusso per la dislipidemia, anche per le alterazioni del metabolismo glucidico si conferma la necessità di uno screening metabolico sistematico in tutti i pazienti con sindrome di Cushing, indipendentemente dal grado di ipercortisolismo biochimico.

Per quanto riguarda i test dinamici, il delta cortisolo post-HDDST risulta diverso tra i tre gruppi ( $p=0.033$ ), con i pazienti normoglicemici che mostrano un delta maggiore rispetto ai pazienti con diabete mellito ( $p=0.026$  al confronto diretto). Ciò indica una minore capacità di soppressione del cortisolo nei pazienti con alterazioni del metabolismo glucidico. Il delta ACTH post-DDAVP mostra anch'esso differenze significative tra i gruppi ( $p=0.030$ ), con i pazienti normoglicemici che presentano una risposta ACTH nettamente superiore rispetto ai pazienti con diabete mellito ( $p=0.031$  al confronto diretto). Analogamente, il delta cortisolo post-DDAVP raggiunge la significatività statistica ( $p=0.022$ ), con i normoglicemici che mostrano un delta maggiore rispetto ai prediabetici ( $p=0.019$ ). Al contrario, le risposte al test al CRH, sia per il delta ACTH post-CRH sia per il delta cortisolo post-CRH, non raggiungono la significatività statistica tra i tre gruppi.

Questi dati suggeriscono che i pazienti con malattia di Cushing e comorbidità metaboliche più gravi, in questo caso particolare il diabete mellito, tendono a presentare risposte più attenuate ai test di soppressione (HDDST) e di stimolazione (DDAVP). Tale osservazione è coerente con il concetto, secondo cui un paziente con tante comorbidità rischia di avere risposte più blande: la presenza di alterazioni metaboliche avanzate potrebbe riflettere un grado di ipercortisolismo più severo e/o

più prolungato, con conseguente desensibilizzazione dei meccanismi recettoriali coinvolti nella risposta ai test dinamici (60). È quindi fondamentale che il clinico non interpreti valori biochimici più bassi o risposte dinamiche attenuate come indicatori di una malattia meno severa o di un minor carico di complicanze: al contrario, risultati più blandi, possono testimoniare un'esposizione cumulativa al cortisolo sufficientemente prolungata da compromettere sia l'omeostasi glucidica sia la reattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Un altro aspetto clinicamente rilevante riguarda le implicazioni per la diagnosi differenziale tra malattia di Cushing e sindrome da ACTH ectopico. I test dinamici di secondo livello (HDDST, CRH e DDAVP) sono utilizzati proprio per differenziare la malattia di Cushing dalla secrezione ectopica di ACTH: nella malattia di Cushing, gli adenomi corticotropi ipofisari mantengono tipicamente la sensibilità alla stimolazione con CRH e desmopressina e la capacità di soppressione con desametasone ad alte dosi, mentre i tumori ectopici generalmente non esprimono i recettori per CRH, vasopressina V1b e glucocorticoidi (10). Tuttavia, i dati dimostrano che nei pazienti con malattia di Cushing e diabete mellito le risposte ai test HDDST e DDAVP risultano significativamente attenuate rispetto ai pazienti normoglicemici. Sebbene tali risposte rimangano nell'ambito del pattern tipico della malattia di Cushing, la loro attenuazione potrebbe avvicinare i valori alle soglie di cut-off diagnostico, aumentando il rischio di risultati dubbi o falsi negativi e rendendo la diagnosi differenziale con la secrezione ectopica di ACTH potenzialmente più complessa nei pazienti con comorbidità metaboliche avanzate.

### 5.5.1 Peggioramento del controllo del diabete

In nessuna delle tre coorti analizzate il peggioramento del controllo del diabete si associa a differenze nei marcatori di primo livello e ACTH. Questo dato, apparentemente controintuitivo, è in realtà coerente con quanto riportato in letteratura. Scaroni et al. hanno sottolineato come la relazione tra grado di ipercortisolismo e severità delle complicanze metaboliche non sia lineare, poiché la suscettibilità individuale al danno glucocorticoide-mediato dipende da fattori genetici (polimorfismi del recettore dei glucocorticoidi), dalla durata dell'esposizione, dalla sensibilità tissutale locale e dalla riserva funzionale beta-cellulare (61). I test di primo livello si confermano pertanto marcatori affidabili per la diagnosi di ipercortisolismo anche in quei pazienti che giungono all'attenzione del clinico per un rapido deterioramento del compenso glicometabolico.

L'analisi dei test dinamici rivela un quadro più sfumato e clinicamente rilevante. Mentre i delta di cortisolo post-HDDST, ACTH post-CRH e cortisolo post-CRH non raggiungono la significatività statistica convenzionale, il delta cortisolo post-DDAVP risulta inferiore nei pazienti con peggioramento del diabete rispetto a quelli senza ( $p=0.005$ ). Il delta ACTH post-DDAVP mostra una tendenza analoga ( $p=0.053$ ).

Il test alla desmopressina, tradizionalmente impiegato nella diagnosi differenziale della sindrome di Cushing ACTH-dipendente e nel follow-up post-chirurgico come predittore di recidiva, potrebbe dunque acquisire un ulteriore valore come marcatore indiretto della severità delle complicanze metaboliche, sebbene questa ipotesi necessiti di conferma in studi prospettici su coorti più ampie. Allo stesso tempo, se il test alla desmopressina venisse utilizzato come unico criterio nella diagnosi differenziale CD vs EAS, un delta cortisolo ridotto potrebbe effettivamente orientare erroneamente verso una forma ectopica. Questo rischio è particolarmente rilevante nei pazienti con microadenomi non visualizzabili alla RM, dove la diagnosi differenziale è più critica. Queste considerazioni confermano quanto già ampiamente documentato in letteratura riguardo alla superiorità diagnostica del test al CRH rispetto al test alla desmopressina nella diagnosi differenziale tra malattia di Cushing e sindrome da ACTH ectopico. La meta-analisi di Ceccato et al. (2023), condotta su 62 studi, ha dimostrato che il test al CRH possiede la più elevata accuratezza diagnostica tra i test dinamici, con una

sensibilità dell'86,9% e una specificità del 93,9% per la risposta ACTH, significativamente superiori a quelle del test alla desmopressina e dell'HDDST (53). La presente analisi aggiunge a queste evidenze un elemento originale: il test al CRH, a differenza del test alla desmopressina, mantiene la propria affidabilità diagnostica indipendentemente dallo stato metabolico glucidico del paziente.

In ogni caso, le linee guida del consenso Fleseriu et al. (2021) sottolineano che nessun test dinamico ha specificità del 100% e che i risultati possono essere discordanti fino a un terzo dei pazienti; l'uso combinato di più test dinamici migliora l'accuratezza clinica. Il BIPSS (bilateral inferior petrosal sinus sampling) rimane il gold standard per escludere definitivamente una produzione ectopica di ACTH (10).

## 5.6 Fenotipo clinico

La sindrome di Cushing si manifesta con un ampio spettro di segni e sintomi clinici, la cui presenza e severità variano considerevolmente tra i pazienti. Segni quali la facies lunaris, le striae rubrae, il gibbo dorsocervicale, la miopatia prossimale e la facilità alle ecchimosi sono tradizionalmente considerati espressione dell'effetto dell'ipercortisolismo cronico sui tessuti bersaglio e rappresentano elementi cardine del sospetto diagnostico. Si è quindi voluto indagare se tali segni clinici correlino con l'entità dell'ipercortisolismo basale e con la reattività dinamica dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, o se invece riflettano variabili individuali (età, sesso, durata della malattia, predisposizione genetica) non catturate dai test.

Tra i cinque segni clinici analizzati, la maggior parte non ha mostrato associazioni rilevanti con i parametri biochimici di primo e secondo livello, tranne per la facies lunaris nella coorte con malattia di Cushing, ove il segno clinico si associa a valori più elevati di ACTH plasmatico ( $p=0.020$ ), senza differenze per gli altri esami analizzati. L'UFC risultava invece più elevato nei pazienti con striae ( $p=0.014$ ) nella coorte generale. Nessuno tra gli altri esami mostrava differenze significative.

Dall'analisi deduciamo che la clinica non correla con i livelli biochimici puntuali di ipercortisolismo. I test biochimici di primo livello catturano dimensioni diverse dell'ipercortisolismo (esposizione cumulativa, ritmo circadiano, feedback dell'asse), e i dati suggeriscono che segni clinici diversi possano essere più sensibili a dimensioni diverse.

### 5.6.1 Stratificazione in base al grado di espressione fenotipica di ipercortisolismo

Al fine di valutare più accuratamente la relazione tra l'espressione clinica dell'ipercortisolismo, parametri biochimici di primo livello e ACTH, i pazienti della coorte totale sono stati suddivisi in tre gruppi in base all'entità del fenotipo cushingoide. Il primo gruppo comprendeva i pazienti privi di segni clinici di ipercortisolismo, il secondo quelli con uno o due segni, e il terzo quelli con tre o più segni. Questa stratificazione ha permesso di analizzare in modo graduato la correlazione tra il "carico fenotipico" complessivo e i parametri biochimici, con l'obiettivo di verificare se un fenotipo clinicamente più ricco si associasse a valori più marcati nell'intera popolazione in studio, indipendentemente dall'eziologia.

I dati della coorte mostrano un dato clinicamente rilevante: tra i test di primo livello, solo l'UFC presenta un trend crescente in relazione al numero di segni cushingoidi, con significatività statistica nel confronto tra pazienti senza segni e quelli con  $\geq 3$  segni ( $p=0.033$ ). Al contrario, LDDST, LNSC e ACTH non mostrano differenze tra i gruppi.

Il dato sull'UFC è coerente con il suo ruolo fisiologico: l'UFC fornisce una misura integrata della secrezione di cortisolo nelle 24 ore, riflettendo la quota di cortisolo libero non legato alla CBG filtrato dal rene. Questo lo rende teoricamente il test più adatto a catturare l'esposizione cumulativa al cortisolo, che è il determinante principale dello sviluppo del fenotipo clinico. Tuttavia, è importante sottolineare che uno studio multicentrico italiano (Guarnotta et al., 2017) ha dimostrato che il grado di ipercortisoluria non correla in modo lineare con la severità del fenotipo e delle comorbidità della sindrome di Cushing (62). L'espressione fenotipica dell'ipercortisolismo è quindi determinata da molteplici fattori oltre al grado di ipercortisoluria, tra cui la sensibilità individuale ai glucocorticoidi, la durata dell'esposizione, il polimorfismo del recettore dei glucocorticoidi e la composizione corporea.

È inoltre fondamentale ricordare che i segni classici del fenotipo cushingoide sono segni specifici ma poco sensibili: la loro presenza rafforza il sospetto clinico, ma la loro assenza non lo esclude. Forme lievi, subcliniche o di recente insorgenza possono presentarsi senza il fenotipo florido, rendendo indispensabile lo screening biochimico nelle popolazioni a rischio anche in assenza di segni clinici evidenti.

Nonostante nella coorte in esame solo l'UFC mostri una correlazione con l'entità del fenotipo, ciò non riduce il valore diagnostico degli altri test di primo livello. LDDST e LNSC esplorano aspetti fisiopatologici complementari, rispettivamente la sopprimibilità dell'asse e la perdita del ritmo circadiano, e mantengono una sensibilità diagnostica superiore al 90-95% (1,11). Come raccomandato dalle linee guida dell'Endocrine Society e dal consensus di Fleseriu et al., l'approccio diagnostico ottimale prevede l'utilizzo di almeno due test di primo livello concordanti, poiché nessun singolo test raggiunge un'accuratezza sufficiente da solo e fino al 50% dei pazienti può presentare variabilità significativa tra campioni consecutivi (10).

Riassumendo, la presenza di segni clinici di ipercortisolismo può contribuire a stimare la probabilità clinica pre-test, orientando la decisione di procedere allo screening biochimico, ma, come dimostrato dai dati presentati, non dovrebbe essere utilizzata come surrogato dell'entità biochimica della malattia, né viceversa: fenotipo e biochimica forniscono informazioni complementari ma non intercambiabili.

Infine, va comunque considerato che l'oggettivazione e la raccolta dei segni clinici nella sindrome di Cushing presentano limiti intrinseci. La valutazione è soggetta a variabilità inter-osservatore e alla soggettività del paziente nel riferire i sintomi. L'assenza di criteri standardizzati e validati per la quantificazione di questi segni rappresenta un fattore confondente che, unitamente alla dimensione campionaria relativamente contenuta, può aver contribuito alla mancata significatività statistica per la maggior parte delle associazioni analizzate.

## **5.7 Dimensioni dell'adenoma ipofisario**

Dalla nostra ricerca è emerso che nella malattia di Cushing, le dimensioni dell'adenoma ipofisario influenzano selettivamente la secrezione di ACTH ma non il grado di ipercortisolismo misurato dai test di primo livello. Nella coorte in esame, l'ACTH mediano è maggiore nei macroadenomi (75.0 vs 46.5 ng/L,  $p=0.026$ ), mentre UFC, LDDST e LNSC non differiscono tra i due gruppi. I risultati replicano fedelmente quanto riportato da Akirov et al. (2022) in uno studio su 105 pazienti con revisione sistematica: i macroadenomi presentavano livelli di ACTH più elevati rispetto ai microadenomi ( $p=0.01$ ), mentre UFC e cortisolo post-LDDST, pur tendenzialmente più alti nei macroadenomi, non raggiungevano la significatività

statistica (63). Questo implica che la misurazione del valore di ACTH possa avere un ruolo aggiuntivo come indicatore indiretto della massa tumorale e di conseguenza, aumentare il sospetto di macroadenoma orientando verso un imaging ipofisario ad alta risoluzione. Dall'altro lato la dissociazione tra ACTH elevato e cortisolo non proporzionalmente aumentato nei macroadenomi riflette probabilmente una ridotta efficienza secretoria per unità di tessuto tumorale. Machado et al. (2016), in una coorte di 317 pazienti, dimostrarono una correlazione negativa tra dimensioni tumorali e rapporti cortisolo/ACTH (Fs/ACTH, cortisolo salivare notturno/ACTH, UFC/ACTH), suggerendo che i macroadenomi contengano una maggiore proporzione di tessuto non funzionante o producano precursori dell'ACTH con ridotta bioattività (proopiomelanocortina non processata). Come sottolineato dal consensus di Fleseriu et al. (2021), "la dimensione del tumore non correla necessariamente con il grado di ipercortisolismo" (10,64). Da questa indagine si può quindi affermare che i test di primo livello (UFC, LDDST, LNSC) mantengono la loro validità diagnostica indipendentemente dalle dimensioni tumorali: la loro sensibilità non è compromessa nei microadenomi né potenziata nei macroadenomi, confermando che sono strumenti robusti per la diagnosi di ipercortisolismo a prescindere dal volume della lesione.

Valutando la risposta ai test dinamici di secondo livello emerge, invece, come l'entità dell'adenoma sia indipendente dalle sue dimensioni, confermando che la reattività recettoriale del tessuto corticotropo è una proprietà intrinseca del tumore, non una funzione del suo volume. Nella pratica clinica, di conseguenza, la scelta dei test dinamici non deve essere influenzata dalle dimensioni dell'adenoma alla RM. Come sottolineato dal consensus di Fleseriu et al. (2021), la concordanza tra test non invasivi (CRH + HDDST o CRH + desmopressina) raggiunge un valore predittivo positivo del 100% per la diagnosi di malattia di Cushing, indipendentemente dal reperto neuroradiologico (10).

## 5.8 Altre variabili

**BMI e circonferenza vita.** L'assenza di significatività del BMI come variabile di raggruppamento può essere spiegata dalla peculiare distribuzione del grasso corporeo nella sindrome di Cushing, che si caratterizza per un'obesità prevalentemente viscerale e centripeta piuttosto che generalizzata. Il BMI, essendo un rapporto tra peso totale e altezza, include la massa degli arti (che nella sindrome di Cushing può essere paradossalmente ridotta per l'effetto catabolico dei glucocorticoidi sulla muscolatura scheletrica) e non discrimina tra tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo. Per questa ragione è stata analizzata anche la circonferenza vita, riconosciuta come marcatore più specifico dell'adiposità viscerale rispetto al BMI. Tuttavia, anche la circonferenza vita non ha raggiunto la significatività statistica. Questo dato è in linea con quanto riportato da Giordano et al., che pur riscontrando una circonferenza vita maggiore nei pazienti con sindrome di Cushing rispetto ai controlli appaiati per BMI, non hanno trovato correlazione tra circonferenza vita e cortisolo libero urinario né con la durata di malattia. È possibile che in coorti di dimensioni limitate, la variabilità interindividuale nella distribuzione del grasso e la mancanza di una valutazione volumetrica diretta del tessuto adiposo viscerale (ad esempio tramite bioimpedenziometria o densitometria a raggi X) riducano la sensibilità di queste misure antropometriche nel discriminare i pazienti (8,65,66).

**Rapido aumento di peso.** L'aumento ponderale progressivo è il sintomo più comune della sindrome di Cushing, presente nel 70–95% dei pazienti. Tuttavia, la mancata significatività di questa variabile nel nostro studio potrebbe riflettere la difficoltà di quantificare oggettivamente il "rapido aumento di peso" in un contesto retrospettivo o trasversale, dove la velocità dell'incremento ponderale dipende dalla percezione soggettiva del paziente e dalla disponibilità di dati antropometrici seriati. Inoltre, l'aumento di peso nella sindrome di Cushing è un segno frequente ma aspecifico, condiviso con numerose altre condizioni endocrine e metaboliche, il che ne limita il potere discriminante come variabile di raggruppamento (1). Studi futuri potrebbero includere un gruppo di controllo costituito da pazienti con rapido aumento di peso di altra eziologia (obesità semplice, sindrome metabolica, pseudo-Cushing) ma senza sindrome di Cushing confermata biochimicamente. Questo disegno caso-controllo permetterebbe di valutare il reale potere discriminante dell'incremento ponderale rapido.

**Disturbi dell'umore.** I disturbi psichiatrici rappresentano una comorbidità frequente e clinicamente rilevante nella sindrome di Cushing. Tuttavia, nel nostro studio la classificazione dei disturbi dell'umore si basava sull'anamnesi e sulla farmacoterapia in atto, un approccio che presenta limiti intrinseci. La relazione tra ipercortisolismo e disturbi dell'umore non è lineare e la semplice raccolta anamnestica, senza l'impiego di strumenti psicometrici validati, può sottostimare o classificare in modo impreciso la reale prevalenza e gravità dei disturbi dell'umore nella popolazione in studio (67,68).

**Fratture vertebrali.** La scelta delle fratture vertebrali come outcome clinico, piuttosto che degli score densitometrici ottenuti dalla DXA, è stata motivata da diverse considerazioni fisiopatologiche e metodologiche. In primo luogo, il danno osseo da ipercortisolismo è prevalentemente di natura qualitativa e proteica: i glucocorticoidi sopprimono profondamente la funzione osteoblastica, riducono la sintesi di collagene di tipo I e la produzione di matrice ossea disponibile per la mineralizzazione, con un effetto predominante sull'osso trabecolare (32). Questo spiega perché le fratture vertebrali (sede a elevato contenuto trabecolare) rappresentino la complicanza scheletrica più frequente nella sindrome di Cushing, con una prevalenza del 30–50%, e possano verificarsi anche in pazienti con BMD in range normale o osteopenico (69).

La DXA, misurando esclusivamente il contenuto minerale per unità di superficie, può sottostimare significativamente il rischio fratturativo in questi pazienti. In secondo luogo, la popolazione in studio comprendeva pazienti giovani, per i quali le linee guida ISCD raccomandano l'utilizzo dello Z-score anziché del T-score; lo Z-score, pur essendo l'indicatore appropriato, è meno utilizzato nella pratica clinica e meno standardizzato nella stratificazione del rischio fratturativo (70). In terzo luogo, il turnover osseo nella sindrome di Cushing segue un andamento bifasico durante la malattia attiva: nella fase iniziale si osserva un aumento del riassorbimento osseo mediato dall'incremento dell'osteoclastogenesi RANKL-dipendente, mentre con il protrarsi dell'esposizione ai glucocorticoidi il riassorbimento tende a ridursi fino a livelli sub-fisiologici, e il meccanismo predominante di perdita ossea diventa la profonda soppressione della neoformazione (32). Studi hanno confermato che l'effetto dei glucocorticoidi su formazione e riassorbimento dipende dall'entità e dalla durata dell'ipercortisolismo, e che i marker di riassorbimento nella malattia attiva sono stati riportati come

aumentati, normali o persino diminuiti a seconda degli studi, riflettendo probabilmente la fase della malattia in cui i pazienti vengono valutati (71). Per tutte queste ragioni, le fratture vertebrali sono state considerate l'outcome clinico più robusto e clinicamente rilevante. Ciononostante, la mancata significatività statistica nel nostro studio potrebbe essere attribuibile alla bassa prevalenza di fratture vertebrali documentate nella coorte, alla possibile sottodiagnosi di fratture vertebrali asintomatiche (che rappresentano una quota rilevante delle fratture da Cushing), e alle dimensioni campionarie limitate.

## 5.9 Influenza dei livelli basali di ACTH e cortisolo sulla risposta ai test dinamici di secondo livello

Si è voluto inoltre analizzare la correlazione tra i livelli basali di ACTH e cortisolo sierico e l'entità della risposta ai test dinamici di secondo livello (test al CRH e test alla desmopressina), espressa come delta incrementale rispetto al basale, al fine di stabilire se i valori pre-stimolo possano predire la magnitudine della risposta secretoria e, di conseguenza, influenzare l'interpretazione diagnostica dei test di conferma. L'analisi di correlazione non parametrica (Rho di Spearman) ha evidenziato un pattern differenziato tra le quattro coppie di variabili esaminate:

- ACTH basale vs. Delta ACTH post-CRH: correlazione negativa debole e non significativa, indicando che i livelli pre-stimolo di ACTH non condizionano in modo apprezzabile l'entità della risposta corticotropa al CRH;
- ACTH basale vs. Delta ACTH post-DDAVP: correlazione negativa debole-moderata e statisticamente significativa, suggerendo che valori basali più elevati di ACTH si associano a un incremento percentuale post-desmopressina relativamente più contenuto.
- Cortisolo basale vs. Delta cortisolo post-CRH: correlazione negativa moderata e altamente significativa, indicando che livelli basali più elevati di cortisolo si associano a un delta percentuale post-CRH significativamente ridotto.
- Cortisolo basale vs. Delta cortisolo post-DDAVP: correlazione negativa moderata e altamente significativa, con un'entità superiore rispetto a quella osservata per il test al CRH.

I risultati ottenuti mostrano che, tra le variabili esaminate, è il cortisolo sierico pre-stimolo a esercitare l'influenza più rilevante sull'entità della risposta ai test dinamici, mentre i livelli basali di ACTH hanno un ruolo più marginale.

Le correlazioni relative al cortisolo trovano un solido riscontro nella letteratura. Pecori Giraldi et al. dimostrarono che i livelli basali di cortisolo esercitano un'influenza negativa significativa sia sulla risposta dell'ACTH sia, soprattutto, sulla risposta del cortisolo al CRH (72). Si possono formulare varie ipotesi per spiegare questo fenomeno: livelli basali elevati di cortisolo esercitano un feedback negativo ultrabreve e rapido sulla secrezione di ACTH, limitando la capacità di

ulteriore incremento dopo stimolazione. Inoltre, livelli basali già elevati di cortisolo possono riflettere una stimolazione surrenalica già massimale o quasi massimale, riducendo il margine di ulteriore incremento assoluto e, a maggior ragione, percentuale.

Bisogna comunque considerare l'interferenza di un artefatto matematico: l'espressione della risposta come variazione rispetto al basale ( $\text{delta} = [\text{picco} - \text{basale}] / \text{basale}$ ) introduce un'intrinseca dipendenza matematica dal denominatore. La relazione tra variazione percentuale e valore basale è perciò soggetta a risultati spuri, poiché un denominatore più elevato comprime aritmeticamente il delta anche a parità di incremento assoluto. Quanto emerso suggerisce cautela nell'interpretazione del delta come criterio diagnostico isolato, specialmente in pazienti con ipercortisolismo marcato. L'integrazione di parametri assoluti (valori di picco) e relativi (delta), come proposto da diversi autori, potrebbe mitigare il rischio di errori classificativi legati all'influenza dei livelli basali sulla risposta stimolata (23).

Studi futuri potrebbero pertanto esplorare la possibilità di stratificare i cutoff diagnostici dei test dinamici in base ai livelli basali di cortisolo, ad esempio definendo soglie differenziate per fasce di cortisolemia basale (lieve, moderata, severa).

### **5.10 Analisi della variabilità intra-personale**

In ultima istanza è stata studiata la variabilità intra-individuale dei principali marcatori biochimici utilizzati nella diagnosi della sindrome di Cushing, misurata tramite il coefficiente di variazione (CV).

I nostri dati confermano la nota variabilità intraindividuale sia dell'UFC sia del LNSC. La variabilità osservata era comparabile tra 2, 3 e 4 raccolte, a conferma che due determinazioni risultano adeguate alla pratica clinica, in linea con le raccomandazioni delle linee guida vigenti.

Un aspetto di particolare interesse del presente studio risiede nella composizione della coorte: a differenza della maggior parte dei lavori disponibili in letteratura, la nostra analisi si è concentrata esclusivamente su pazienti de novo, escludendo i casi di recidiva o persistenza dopo precedenti trattamenti, nei quali la diagnosi di sindrome di Cushing era già accertata. Questo approccio elimina un potenziale bias di selezione, poiché nei pazienti con malattia recidivante il pattern biochimico può essere influenzato da pregressi interventi chirurgici, radioterapia o terapia medica, rendendo la variabilità dei test meno rappresentativa del comportamento della malattia alla presentazione iniziale.

Un dato inedito del nostro studio riguarda la variabilità di UFC e LNSC nelle forme surrenaliche (ACS), poiché le coorti precedentemente studiate erano prevalentemente di origine ipofisaria. In particolare, nel sottogruppo ACS si è osservata una minore variabilità del LNSC rispetto all'UFC. Questo riscontro potrebbe riflettere la natura più costante e tonica della secrezione cortisolica autonoma surrenalica, che determina una perdita stabile del nadir circadiano notturno con conseguente minore fluttuazione tra campioni consecutivi. Al contrario, l'UFC, che integra la produzione cortisolica sull'arco delle 24 ore, potrebbe essere maggiormente influenzato da variabili preanalitiche (completezza della raccolta, volume urinario, filtrazione glomerulare) che ne amplificano la variabilità intraindividuale, specialmente nell'ipercortisolismo lieve tipico dell'ACS.

Per quanto riguarda il cortisolo sierico e l'ACTH, le determinazioni ripetute hanno confermato la loro costante alterazione nei pazienti con sindrome di Cushing, ma con una rilevanza clinica inferiore rispetto ai parametri precedentemente discussi. I

nostri dati non sono tuttavia sufficienti a raccomandarne la ripetizione sistematica, salvo nei casi con valori borderline di ACTH (nell'intervallo 10–20 pg/mL), dove la ripetizione è giustificata per la diagnosi differenziale tra forme ACTH-dipendenti e ACTH-indipendenti. È peraltro interessante notare che l'esecuzione dei test dinamici di secondo livello (test al CRH e alla desmopressina) nella malattia di Cushing comporta di per sé valutazioni multiple di cortisolo e ACTH ai diversi tempi di prelievo, fornendo implicitamente una conferma della riproducibilità dei valori basali senza necessità di determinazioni aggiuntive dedicate.

## 6. CONCLUSIONE

La relazione tra il quadro clinico e il profilo biochimico della sindrome di Cushing rappresenta un territorio ancora largamente inesplorato nella letteratura endocrinologica. Il presente studio, attraverso un'analisi esplorativa condotta su una coorte monocentrica di pazienti de novo, si propone di colmare in parte questa lacuna, offrendo spunti e direzioni per una più accurata caratterizzazione di tale rapporto, con potenziali ricadute sia sul piano diagnostico sia su quello prognostico. L'originalità dell'approccio risiede nel raggruppamento dei dati per presentazione clinica anziché per test diagnostico, offrendo una prospettiva orientata al clinico non specialista che, nella pratica quotidiana, si confronta con manifestazioni aspecifiche quali ipertensione resistente, dislipidemia o alterazioni glicemiche.

Tra i risultati più rilevanti emerge il paradosso per cui le complicanze cardiometaboliche più severe non si associano a livelli più elevati di ipercortisolismo. I pazienti con ipertensione resistente e dislipidemia presentano infatti livelli di UFC più bassi, suggerendo che valori biochimici relativamente contenuti possono configurarsi come marcatori surrogati di una storia di malattia più lunga e nascondere un danno d'organo già significativo al momento della diagnosi. L'utilizzo della sola cortisoloria come test di screening risulta quindi insufficiente, suggerendo l'impiego di multipli test di primo livello. Il riconoscimento del pattern "comorbidità consolidate con biochimica sfumata" da parte del clinico è essenziale per ridurre la latenza diagnostica e identificare pazienti che potrebbero necessitare di un follow-up post-remissione più intensivo.

Al contrario, il fenotipo iperandrogenico e il fenotipo PMOS identificavano un sottogruppo di pazienti con ipercortisolismo più severo. Nella malattia di Cushing tali fenotipi si associavano a valori più elevati di UFC e ACTH, mentre nelle forme surrenaliche il LDDST si confermava il parametro più sensibile nel cogliere questa maggiore attività biologica. Il fenotipo iperandrogenico emerge quindi come una rilevante "red flag" clinica, indicativa di una malattia endocrina più attiva.

Per quanto riguarda la presenza di segni clinici di ipercortisolismo, questa può contribuire a stimare la probabilità clinica pre-test, orientando la decisione di procedere allo screening biochimico, ma, non dovrebbe essere utilizzata come surrogato dell'entità biochimica della malattia, né viceversa.

Nella malattia di Cushing, ipertensione resistente e diabete mellito si associavano inoltre a risposte attenuate ai test dinamici. Questo suggerisce che una ridotta responsività non debba essere automaticamente interpretata come indicativa di secrezione ectopica di ACTH, ma possa rappresentare l'espressione di un ipercortisolismo cronico. In questo contesto, il test al CRH si è dimostrato più robusto rispetto al test alla desmopressina, mantenendo la propria affidabilità indipendentemente dallo stato metabolico. In modo simile, valori basali più elevati di cortisolo si associavano a risposte ridotte ai test dinamici, per cui si suggerisce l'importanza di interpretare i risultati alla luce dei livelli ormonali di partenza e di considerare cut-off differenziati, anche in base alla fenotipizzazione del paziente.

Infine, i macroadenomi ipofisari risultavano associati a livelli di ACTH più elevati, senza un corrispondente incremento del cortisolo, confermando la validità dei test diagnostici indipendentemente dalle dimensioni tumorali.

L'analisi della variabilità intra-individuale ha inoltre confermato che due determinazioni di UFC e LNSC sono generalmente sufficienti nella pratica clinica.

Il disegno retrospettivo e monocentrico, la numerosità campionaria contenuta e l'assenza di un gruppo di controllo impongono cautela nella generalizzazione dei risultati. Studi futuri, idealmente prospettici e multicentrici, potrebbero: validare l'ipotesi che una biochimica meno florida associata a comorbidità cardiometaboliche avanzate possa essere interpretata come un indicatore indiretto di una più prolungata esposizione al cortisolo, correlando i dati con misure dirette della durata di malattia e con gli outcome post-remissione; esplorare la stratificazione dei cut-off dei test dinamici in base al profilo metabolico e ai livelli basali di cortisolo; approfondire il ruolo del fenotipo PMOS come indicatore di severità nelle diverse eziologie; includere gruppi di controllo con le medesime comorbidità ma senza sindrome di Cushing confermata.

In conclusione, il presente studio evidenzia come la relazione tra presentazione clinica e profilo biochimico nella sindrome di Cushing sia complessa, non lineare e spesso controintuitiva. Fenotipo clinico e biochimica forniscono informazioni complementari ma non intercambiabili. Il riconoscimento di questa dissociazione è fondamentale per evitare errori diagnostici, ridurre la latenza diagnostica e ottimizzare la gestione clinica dei pazienti con sindrome di Cushing.



## BIBLIOGRAFIA

1. Reincke M, Fleseriu M. Cushing Syndrome: A Review. *JAMA*. 11 luglio 2023;330(2):170. doi:10.1001/jama.2023.11305
2. Lk N, F C, J NP, E V, J D, Y T, et al. Cushing syndrome. *Nature reviews Disease primers*. 23 gennaio 2025;11(1). doi:10.1038/s41572-024-00588-w PubMed PMID: 39848955.
3. Gadelha M, Gatto F, Wildemberg LE, Fleseriu M. Cushing's syndrome. *The Lancet*. dicembre 2023;402(10418):2237–52. doi:10.1016/S0140-6736(23)01961-X
4. Orth DN. Cushing's Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 23 marzo 1995;332(12):791–803. doi:10.1056/NEJM199503233321207
5. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 29 agosto 2015;386(9996):913–27. doi:10.1016/S0140-6736(14)61375-1 PubMed PMID: 26004339.
6. Giovanelli L, Aresta C, Favero V, Bonomi M, Cangiano B, Eller-Vainicher C, et al. Hidden hypercortisolism: a too frequently neglected clinical condition. *J Endocrinol Invest*. agosto 2021;44(8):1581–96. doi:10.1007/s40618-020-01484-2 PubMed PMID: 33394454.
7. Ceccato F, Terzolo M, Gatto F, Cannavò S, Bianchi A, Isidori AM, et al. Who and how to screen for Cushing's syndrome: the position statement of the Italian Society of Endocrinology. *J Endocrinol Invest*. marzo 2026;49(3):461–81. doi:10.1007/s40618-025-02758-3 PubMed PMID: 41364328.
8. Pivonello R, Isidori AM, Martino MCD, Newell-Price J, Biller BMK, Colao A. Complications of Cushing's syndrome: state of the art. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 1 luglio 2016;4(7):611–29. doi:10.1016/S2213-8587(16)00086-3
9. Ceccato F, Bavaresco A, Ragazzi E, Barbot M, Boscaro M, Basso D, et al. Clinical and Biochemical Data for the Diagnosis of Endogenous Hypercortisolism: The “Cushingomic” Approach. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 21 gennaio 2025;110(2):396–405. doi:10.1210/clinem/dgae517
10. Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz NR, et al. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 1 dicembre 2021;9(12):847–75. doi:10.1016/S2213-8587(21)00235-7 PubMed PMID: 34687601.
11. Molitch ME. Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA*. 7 febbraio 2017;317(5):516–24. doi:10.1001/jama.2016.19699
12. Magiakou MA, Mastorakos G, Oldfield EH, Gomez MT, Doppman JL, Cutler GB, et al. Cushing's Syndrome in Children and Adolescents – Presentation, Diagnosis, and Therapy. *New England Journal of Medicine*. 8 settembre 1994;331(10):629–36. doi:10.1056/NEJM199409083311002
13. Chiu EK, Nichols JW. Sellar lesions and visual loss: key concepts in neuro-ophthalmology. *Expert Rev Anticancer Ther*. settembre 2006;6 Suppl 9:S23-28. doi:10.1586/14737140.6.9s.S23 PubMed PMID: 17004853.
14. Arafah BM, Prunty D, Ybarra J, Hlavin ML, Selman WR. The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia,

and headaches in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* maggio 2000;85(5):1789–93. doi:10.1210/jcem.85.5.6611 PubMed PMID: 10843153.

15. Detomas M, Deutschbein T, Tamburello M, Chifu I, Kimpel O, Sbiera S, et al. Erythropoiesis in Cushing syndrome: sex-related and subtype-specific differences. Results from a monocentric study. *J Endocrinol Invest.* 2024;47(1):101–13. doi:10.1007/s40618-023-02128-x PubMed PMID: 37314685; PubMed Central PMCID: PMC10776705.

16. Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, Ben-Shlomo A, Bertherat J, Biermasz NR, et al. Consensus on Diagnosis and Management of Cushing’s Disease: A Guideline Update. *Lancet Diabetes Endocrinol.* dicembre 2021;9(12):847–75. doi:10.1016/S2213-8587(21)00235-7 PubMed PMID: 34687601; PubMed Central PMCID: PMC8743006.

17. Kannankeril J, Carroll T, Findling JW, Javorsky B, Gunsolus IL, Phillips J, et al. Prospective Evaluation of Late-Night Salivary Cortisol and Cortisone by EIA and LC-MS/MS in Suspected Cushing Syndrome. *J Endocr Soc.* 1 ottobre 2020;4(10):bvaa107. doi:10.1210/jendso/bvaa107

18. Galm BP, Qiao N, Klibanski A, Biller BMK, Tritos NA. Accuracy of Laboratory Tests for the Diagnosis of Cushing Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 giugno 2020;105(6):2081–94. doi:10.1210/clinem/dgaa105

19. Findling JW, Raff H. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Differentiation of pathologic/neoplastic hypercortisolism (Cushing’s syndrome) from physiologic/non-neoplastic hypercortisolism (formerly known as pseudo-Cushing’s syndrome). *Eur J Endocrinol.* maggio 2017;176(5):R205–16. doi:10.1530/EJE-16-0946 PubMed PMID: 28179447.

20. Pacak K, Blake MA, Sweeney AT, Jha A, Imperiale A, Zaidi H, et al. Adrenal tumour imaging: clinical, molecular, and radiomics perspectives. *Lancet Diabetes Endocrinol.* gennaio 2026;14(1):62–81. doi:10.1016/S2213-8587(25)00300-6 PubMed PMID: 41265468.

21. Platzek I, Sieron D, Plodeck V, Borkowetz A, Laniado M, Hoffmann RT. Chemical shift imaging for evaluation of adrenal masses: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol.* febbraio 2019;29(2):806–17. doi:10.1007/s00330-018-5626-5 PubMed PMID: 30014203.

22. Sconfienza E, Tetti M, Forestiero V, Veglio F, Mulatero P, Monticone S. Prevalence of Functioning Adrenal Incidentalomas: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 16 giugno 2023;108(7):1813–23. doi:10.1210/clinem/dgad044 PubMed PMID: 36718682.

23. Ceccato F, Tizianel I, Vedolin CK, Boscaro M, Barbot M, Scaroni C. Human Corticotropin-Releasing Hormone Tests: 10 Years of Real-Life Experience in Pituitary and Adrenal Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 novembre 2020;105(11):dgaa564. doi:10.1210/clinem/dgaa564 PubMed PMID: 32818260.

24. Detomas M, Ritzel K, Nasi-Kordhishti I, Schernthaner-Reiter MH, Losa M, Tröger V, et al. Bilateral inferior petrosal sinus sampling with human CRH stimulation in ACTH-dependent Cushing’s syndrome: results from a retrospective multicenter study. *Eur J Endocrinol.* 18 maggio 2023;lvad050. doi:10.1093/ejendo/lvad050 PubMed PMID: 37200460.

25. Qiao J, Li J, Zhang W, Wang C, Li J, Jiang S, et al. The usefulness of the combined high-dose dexamethasone suppression test and desmopressin stimulation test in

establishing the source of ACTH secretion in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J.* 28 luglio 2021;68(7):839–48. doi:10.1507/endocrj.EJ20-0837 PubMed PMID: 33790062.

26. Limumpornpetch P, Morgan AW, Tiganescu A, Baxter PD, Nyawira Nyaga V, Pujades-Rodriguez M, et al. The Effect of Endogenous Cushing Syndrome on All-cause and Cause-specific Mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 14 luglio 2022;107(8):2377–88. doi:10.1210/clinem/dgac265 PubMed PMID: 35486378; PubMed Central PMCID: PMC9282270.

27. Limumpornpetch P, Morgan AW, Tiganescu A, Baxter PD, Nyawira Nyaga V, Pujades-Rodriguez M, et al. The Effect of Endogenous Cushing Syndrome on All-cause and Cause-specific Mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 14 luglio 2022;107(8):2377–88. doi:10.1210/clinem/dgac265 PubMed PMID: 35486378; PubMed Central PMCID: PMC9282270.

28. Chapman K, Holmes M, Seckl J.  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev.* luglio 2013;93(3):1139–206. doi:10.1152/physrev.00020.2012 PubMed PMID: 23899562; PubMed Central PMCID: PMC3962546.

29. Miller BS, Auchus RJ. Evaluation and Treatment of Patients With Hypercortisolism: A Review. *JAMA Surg.* 1 dicembre 2020;155(12):1152–9. doi:10.1001/jamasurg.2020.3280

30. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest.* ottobre 1993;92(4):2065–72. doi:10.1172/JCI116803 PubMed PMID: 7691892; PubMed Central PMCID: PMC288376.

31. Hasenmajer V, Sbardella E, Sciarra F, Minnetti M, Isidori AM, Venneri MA. The Immune System in Cushing's Syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* settembre 2020;31(9):655–69. doi:10.1016/j.tem.2020.04.004 PubMed PMID: 32387195.

32. Hofbauer LC, Compston JE, Saag KG, Rauner M, Tsourdi E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: novel concepts and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* novembre 2025;13(11):964–79. doi:10.1016/S2213-8587(25)00251-7 PubMed PMID: 41022095.

33. Vogel F, Braun LT, Rubinstein G, Zopp S, Künzel H, Strasding F, et al. Persisting Muscle Dysfunction in Cushing's Syndrome Despite Biochemical Remission. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 dicembre 2020;105(12):e4490-4498. doi:10.1210/clinem/dgaa625 PubMed PMID: 32882010; PubMed Central PMCID: PMC7538105.

34. Piasecka M, Papakokkinou E, Valassi E, Santos A, Webb SM, de Vries F, et al. Psychiatric and neurocognitive consequences of endogenous hypercortisolism. *J Intern Med.* agosto 2020;288(2):168–82. doi:10.1111/joim.13056 PubMed PMID: 32181937.

35. Elhassan YS, Hawley JM, Cussen L, Abbara A, Clarke SA, Kempegowda P, et al. Society for Endocrinology Clinical Practice Guideline for the Evaluation of Androgen Excess in Women. *Clin Endocrinol (Oxf).* ottobre 2025;103(4):540–66. doi:10.1111/cen.15265 PubMed PMID: 40364581; PubMed Central PMCID: PMC12413683.

36. 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 agosto 2015;100(8):2807–31. doi:10.1210/jc.2015-1818
37. Catalino MP, Moore DT, Ironside N, Munoz AR, Coley J, Jonas R, et al. Postoperative Serum Cortisol and Cushing Disease Recurrence in Patients With Corticotroph Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 17 novembre 2023;108(12):3287–94. doi:10.1210/clinem/dgad347 PubMed PMID: 37290036.
38. Lamback E, Kasuki L, Miranda RL, de Figueiredo CS, Wildemberg LE, Gadelha MR. The prevalence and predictors of Cushing disease recurrence: a 10-year experience of a pituitary tumor center of excellence. *Endocrine.* luglio 2025;89(1):283–90. doi:10.1007/s12020-025-04234-7 PubMed PMID: 40257708.
39. Vassiliadi DA, Balomenaki M, Asimakopoulou A, Botoula E, Tzanela M, Tsagarakis S. The Desmopressin Test Predicts Better Than Basal Cortisol the Long-Term Surgical Outcome of Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* dicembre 2016;101(12):4878–85. doi:10.1210/jc.2016-2799 PubMed PMID: 27662440.
40. Findlay MC, Tenhoeve S, Alt J, Rennert RC, Couldwell WT, Evans J, et al. Predictors of Durable Remission After Successful Surgery for Cushing Disease: Results From the Multicenter RAPID Registry. *Neurosurgery.* 1 ottobre 2024;95(4):761–9. doi:10.1227/neu.0000000000003042 PubMed PMID: 39293794.
41. Balomenaki M, Vassiliadi DA, Tsagarakis S. Cushing's disease: risk of recurrence following trans-sphenoidal surgery, timing and methods for evaluation. *Pituitary.* ottobre 2022;25(5):718–21. doi:10.1007/s11102-022-01226-y PubMed PMID: 35579775.
42. Pivonello R, De Leo M, Cozzolino A, Colao A. The Treatment of Cushing's Disease. *Endocr Rev.* agosto 2015;36(4):385–486. doi:10.1210/er.2013-1048 PubMed PMID: 26067718; PubMed Central PMCID: PMC4523083.
43. Research C for DE and. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations | Orange Book. FDA [Internet]. 5 agosto 2026 [citato 15 maggio 2026]. Disponibile su: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/approved-drug-products-therapeutic-equivalence-evaluations-orange-book>
44. Araujo-Castro M, Lamas C, Nowak E, Newell-Price J, Reincke M, Castinetti F. Update and Practical Recommendations for the Use of Medical Treatment of Cushing Syndrome. *Endocr Rev.* 13 maggio 2026;47(3):301–28. doi:10.1210/endrev/bnaf042 PubMed PMID: 41489578; PubMed Central PMCID: PMC13167195.
45. Yip L, Duh QY, Wachtel H, Jimenez C, Sturgeon C, Lee C, et al. American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for Adrenalectomy: Executive Summary. *JAMA Surg.* 1 ottobre 2022;157(10):870–7. doi:10.1001/jamasurg.2022.3544 PubMed PMID: 35976622; PubMed Central PMCID: PMC9386598.
46. Ritzel K, Beuschlein F, Mickisch A, Osswald A, Schneider HJ, Schopohl J, et al. Clinical review: Outcome of bilateral adrenalectomy in Cushing's syndrome: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab.* ottobre 2013;98(10):3939–48. doi:10.1210/jc.2013-1470 PubMed PMID: 23956347.
47. Reincke M, Albani A, Assie G, Bancos I, Brue T, Buchfelder M, et al. Corticotroph tumor progression after bilateral adrenalectomy (Nelson's syndrome): systematic review and expert consensus recommendations. *Eur J Endocrinol.* marzo 2021;184(3):P1–16.

doi:10.1530/EJE-20-1088 PubMed PMID: 33444221; PubMed Central PMCID: PMC8060870.

48. Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, Sen K, et al. High variability in baseline urinary free cortisol values in patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. febbraio 2014;80(2):261–9. doi:10.1111/cen.12259 PubMed PMID: 23746264; PubMed Central PMCID: PMC4231220.

49. Sandouk Z, Johnston P, Bunch D, Wang S, Bena J, Hamrahian A, et al. Variability of Late-Night Salivary Cortisol in Cushing Disease: A Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 marzo 2018;103(3):983–90. doi:10.1210/je.2017-02020 PubMed PMID: 29329418.

50. Ceccato F, Bavaresco A, Ragazzi E, Barbot M, Boscaro M, Basso D, et al. Clinical and Biochemical Data for the Diagnosis of Endogenous Hypercortisolism: The «Cushingomic» Approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 21 gennaio 2025;110(2):396–405. doi:10.1210/clinem/dgae517 PubMed PMID: 39056252.

51. Scherthaner-Reiter MH, Siess C, Gessl A, Scheuba C, Wolfsberger S, Riss P, et al. Factors predicting long-term comorbidities in patients with Cushing's syndrome in remission. *Endocrine*. aprile 2019;64(1):157–68. doi:10.1007/s12020-018-1819-6 PubMed PMID: 30467627; PubMed Central PMCID: PMC6453862.

52. Rubinstein G, Osswald A, Hoster E, Losa M, Elenkova A, Zacharieva S, et al. Time to Diagnosis in Cushing's Syndrome: A Meta-Analysis Based on 5367 Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 marzo 2020;105(3):dgz136. doi:10.1210/clinem/dgz136 PubMed PMID: 31665382.

53. Ceccato F, Barbot M, Mondin A, Boscaro M, Fleseriu M, Scaroni C. Dynamic Testing for Differential Diagnosis of ACTH-Dependent Cushing Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 13 aprile 2023;108(5):e178–88. doi:10.1210/clinem/dgac686 PubMed PMID: 36453141.

54. Cela E, De Alcubierre D, Sbardella E. Polycystic Ovary Syndrome in the Context of Pituitary Adenomas: Prevalence, Pathophysiology and Clinical Management. *Clinical Endocrinology*. 2025;102(4):462–81. doi:10.1111/cen.15182

55. Nowotny HF, Braun L, Reisch N. The Landscape of Androgens in Cushing's Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. dicembre 2024;132(12):670–7. doi:10.1055/a-2333-1907 PubMed PMID: 38788777.

56. Bleier J, Shlomain G, Fishman B, Dotan Z, Rosenzweig B, Tirosh A. The Quantitative Relationship Between Autonomous Cortisol Secretion, Dysglycemia and the Metabolic Syndrome. *Endocr Pract*. settembre 2020;26(9):974–82. doi:10.4158/EP-2020-0111 PubMed PMID: 33471702.

57. Bleier J, Shlomain G, Fishman B, Dotan Z, Rosenzweig B, Tirosh A. The Quantitative Relationship Between Autonomous Cortisol Secretion, Dysglycemia and the Metabolic Syndrome. *Endocr Pract*. settembre 2020;26(9):974–82. doi:10.4158/EP-2020-0111 PubMed PMID: 33471702.

58. Newman CB, Blaha MJ, Boord JB, Cariou B, Chait A, Fein HG, et al. Lipid Management in Patients with Endocrine Disorders: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 dicembre 2020;105(12):3613–82. doi:10.1210/clinem/dgaa674

59. González Fernández L, García Centeno R. Cardiometabolic comorbidities in overt Cushing's syndrome. *Vitam Horm.* 2026;132:317–44. doi:10.1016/bs.vh.2026.02.006 PubMed PMID: 42236013.
60. Gong Z, Qin Y, Wang Y, Liu X, Jiang L, Cui D, et al.  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity contributions on incident diabetes in patients with endogenous Cushing's syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* agosto 2022;190:109994. doi:10.1016/j.diabres.2022.109994 PubMed PMID: 35843312.
61. Scaroni C, Zilio M, Foti M, Boscaro M. Glucose Metabolism Abnormalities in Cushing Syndrome: From Molecular Basis to Clinical Management. *Endocr Rev.* 1 giugno 2017;38(3):189–219. doi:10.1210/er.2016-1105 PubMed PMID: 28368467.
62. Guarnotta V, Amato MC, Pivonello R, Arnaldi G, Ciresi A, Trementino L, et al. The degree of urinary hypercortisolism is not correlated with the severity of Cushing's syndrome. *Endocrine.* febbraio 2017;55(2):564–72. doi:10.1007/s12020-016-0914-9 PubMed PMID: 26965912.
63. Akirov A, Shimon I, Fleseriu M, Dotan I, Manisterski Y, Aviran-Barak N, et al. Clinical Study and Systematic Review of Pituitary Microadenomas vs. Macroadenomas in Cushing's Disease: Does Size Matter? *J Clin Med.* 11 marzo 2022;11(6):1558. doi:10.3390/jcm11061558 PubMed PMID: 35329884; PubMed Central PMCID: PMC8953359.
64. Machado MC, Alcantara AEE, Pereira ACL, Cescato V a. S, Castro Musolino NR, de Mendonça BB, et al. Negative correlation between tumour size and cortisol/ACTH ratios in patients with Cushing's disease harbouring microadenomas or macroadenomas. *J Endocrinol Invest.* dicembre 2016;39(12):1401–9. doi:10.1007/s40618-016-0504-y PubMed PMID: 27363699.
65. Giordano R, Picu A, Marinazzo E, D'Angelo V, Berardelli R, Karamouzis I, et al. Metabolic and cardiovascular outcomes in patients with Cushing's syndrome of different aetiologies during active disease and 1 year after remission. *Clinical Endocrinology.* 2011;75(3):354–60. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04055.x
66. Wang D, Morton JJ, Salim A, Magliano DJ, Shaw JE. Comparison of DXA, BIA, and anthropometry for assessing subcutaneous, visceral, liver, and pancreas fat measured by MRI. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2026;28(4):2795–805. doi:10.1111/dom.70456
67. A T, Ec T, Ma B, As R, M S, Ma C, et al. Prospective Assessment of Mood and Quality of Life in Cushing Syndrome Before and After Biochemical Control. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 22 aprile 2026;111(5). doi:10.1210/clinem/dgaf598 PubMed PMID: 41168092.
68. A S, E R, Jc P, I C, Sm W. Psychiatric Symptoms in Patients with Cushing's Syndrome: Prevalence, Diagnosis and Management. *Drugs.* maggio 2017;77(8). doi:10.1007/s40265-017-0735-z PubMed PMID: 28393326.
69. Herath M, Langdahl B, Ebeling PR, Milat F. Challenges in the diagnosis and management of glucocorticoid-induced osteoporosis in younger and older adults. *Clinical Endocrinology.* 2022;96(4):460–74. doi:10.1111/cen.14637
70. Trabecular bone score and bone mineral density as indices of skeletal fragility in endogenous Cushing's syndrome - Boro - 2023 - *Clinical Endocrinology* - Wiley Online

Library [Internet]. [citato 14 giugno 2026]. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cen.14944>

71. Tóth M, Grossman A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: lessons from Cushing's syndrome [Internet]. doi:10.1111/cen.12189

72. Giraldi FP, Invitti C, Cavagnini F, Axis the SG of the IS of E on the P of the HP. The corticotropin-releasing hormone test in the diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome: A reappraisal. *Clinical Endocrinology*. 2001;54(5):601–7. doi:10.1046/j.1365-2265.2001.01258.x