

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA - DIMED

Direttore: Prof. Roberto Vettor

UOC DI ENDOCRINOLOGIA

Direttore: Prof.ssa Carla Scaroni

TESI DI LAUREA

## **COMBINAZIONE DI TESTS DINAMICI E IMAGING NELLA DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE DELLA SINDROME DI CUSHING ACTH-DIPENDENTE.**

RELATORE: Prof.ssa Carla Scaroni

CORRELATORE: Dott. Filippo Ceccato

LAUREANDO: Silvia Mieni

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1.INTRODUZIONE</b>	5
1.1 FISILOGIA DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE	5
1.2 SINDROME DI CUSHING ACTH-DIPENDENTE	6
1.2.1 EZIOLOGIA	6
1.2.2 EPIDEMIOLOGIA	9
1.2.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE	10
1.2.4 DIAGNOSI	12
1.2.4.1 TEST DI PRIMA LINEA	13
1.2.4.2 TEST DINAMICI DI SECONDO LIVELLO	20
1.2.4.3 ESAMI RADIOLOGICI	25
1.2.5 TRATTAMENTO	31
1.2.5.1 CHIRURGIA IPOFISARIA	32
1.2.5.2 RADIOTERAPIA	33
1.2.5.3 TERAPIA MEDICA	33
1.2.5.4 SURRENECTOMIA BILATERALE	35
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	37
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	39
3.1 PAZIENTI	39
3.2 METODI	41
3.2.1 VALUTAZIONE CLINICA GENERALE	41
3.2.2 VALUTAZIONE DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE	41
3.2.3 DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	44
3.2.4 FOLLOW UP	45
3.3 ANALISI STATISTICA	46
<b>4. RISULTATI</b>	47
4.1 VALUTAZIONE CLINICA GENERALE	47
4.2 VALUTAZIONE BASALE DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE	48
4.3 VALUTAZIONE DELLA COMBINAZIONE DI TEST DINAMICI E IMAGING	51

4.3.1 CRH TEST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA	51
4.3.2 CRH TEST E TC TOTAL BODY	53
4.3.3 DDAVP TEST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA	54
4.3.4 DDAVP TEST E TC TOTAL BODY	55
4.3.5 HDDST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA	56
4.3.6 HDDST E TC TOTAL BODY	58
4.4 VALUTAZIONE DEI TEST DINAMICI NEI PAZIENTI CON IMAGING POSITIVO	59
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>75</b>

## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio:** la diagnosi differenziale tra la malattia di Cushing e la sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH (EAS) rappresenta una sfida per gli endocrinologi. Visto le complicanze e la mortalità associate, una diagnosi corretta è fondamentale e prevede l'utilizzo di molteplici esami ormonali, della diagnostica per immagini e di procedure radiologiche interventistiche.

La rimozione chirurgica della lesione responsabile dell'ipersecrezione di ACTH, sia essa un adenoma ipofisario o un tumore neuroendocrino, rappresenta il trattamento di prima scelta, essendo il più efficace nell'abbassare gli elevati livelli di cortisolo. Tuttavia la fase diagnostica complessa richiede tempo (nell'ordine di alcune settimane) e lo studio endocrino impedisce l'utilizzo di farmaci volti ad abbassare i livelli di cortisolo, che spesso sono necessari immediatamente in caso di quadri clinici molto severi.

**Scopo dello studio:** valutare se esiste una combinazione tra un esame di secondo livello (HDDST, CRH test, DDAVP test) e una tecnica di imaging (RM ipofisaria, TC total body) dotata di un'adeguata accuratezza diagnostica, con l'obiettivo ultimo di ottenere una strategia diagnostica non invasiva e rapida utile nel differenziare le due forme ACTH-dipendente.

**Materiali e metodi:** in questo studio retrospettivo sono stati analizzati 186 pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente (150 CD e 36 EAS), seguiti presso l'endocrinologia di Padova e di Ancona. La popolazione analizzata comprende 46 maschi e 140 donne (rapporto F:M= 3:1).

I due gruppi sono stati confrontati valutando l'età, il BMI e le risposte ormonali ai test di prima linea.

Sono state analizzate le risposte ai test di stimolo (CRH test e DDAVP test), ai test di soppressione ad alte dosi (HDDST) e alle tecniche di imaging (RM ipofisaria e TC total body). Infine è stata valutata l'accuratezza diagnostica delle combinazioni derivate dall'associazione dei singoli test dinamici con tecniche di imaging, RM

ipofisaria o TC total body, a seconda della popolazione considerata. Abbiamo considerato sensibilità la concordanza di due tests (risposta positiva al test dinamico + RM<sup>ipofisi</sup> positiva) per individuare la forma ipofisaria (CD), mentre abbiamo considerato specificità la concordanza di due tests (risposta negativa al test dinamico + TC<sup>total body</sup> positiva per neoplasia neuroendocrina) per indicare la forma ectopica EAS.

**Risultati:** utilizzando come cutoff per il CRH test un aumento di ACTH >72,4%, per il DDAVP test un aumento di ACTH >32,3% e per l'HDDST una riduzione della cortisolemia >52,5%, la sensibilità ottenuta dal CRH test + RM è 59%, quella del DDAVP test + RM è 60% e quella di HDDST + RM è 64%. La specificità (risposta negativa al test dinamico + TC total body) è rispettivamente del 66%, 30% e 44%. In caso di RM ipofisaria positiva, una risposta positiva al CRH test identifica correttamente il 76% dei casi con CD, mentre l'HDDST il 78%.

In caso di TC total body positiva, la risposta abbinata e concorde negativa al test di stimolo con CRH identifica correttamente l'86% dei pazienti con EAS, mentre il test di soppressione ad alte dosi presenta una specificità del 55%.

**Conclusioni:** L'esecuzione della risonanza magnetica o della TC seguita, in caso di riscontro di una lesione compatibile con un tumore secernente ACTH, dall'esecuzione del CRH test rappresenta un accurato e non invasivo approccio per la diagnosi differenziale tra CD ed EAS.

## ABSTRACT

**Background:** the differential diagnosis between Cushing's disease and Cushing's syndrome due to ectopic ACTH secretion (EAS) presents a challenge for endocrinologists. Given the associated complications and mortality, a correct diagnosis is essential and involves the use of multiple laboratory tests, imaging techniques and interventional radiology procedures.

The surgical removal of the lesion responsible for ACTH hypersecretion, be it a pituitary adenoma or a neuroendocrine tumor, is the first choice treatment, being the most effective in lowering high cortisol levels. However, the complex diagnostic phase takes time (in the order of a few weeks), and the endocrine study prevents the use of drugs to lower cortisol levels, which are often needed immediately in the case of very severe clinical pictures.

**Objective:** evaluate if there is a combination between a second line test (HDDST, CRH test, DDAVP test) and an imaging technique (pituitary MRI, total body CT) with adequate diagnostic accuracy, with the ultimate aim of obtaining a non-invasive and quick diagnostics strategy useful in differentiating the two ACTH-dependent forms.

**Materials and methods:** 186 patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome (150 CD e 36 EAS) have been studied retrospectively, referring to two endocrinology units: Padova and Ancona. The population analyzed includes 46 men and 140 women (F:M= 3:1). The two groups were compared by evaluating age, BMI, and hormonal responses to first line tests.

The responses to stimulus tests (CRH test and DDAVP test), high-dose suppression test (HDDST), and imaging techniques (pituitary MRI and total body CT) have been analyzed.

Finally, the diagnostic accuracy of the combinations derived from the association of the individual dynamic tests with imaging techniques, pituitary MRI or total body CT, was evaluated, depending on the population considered. We considered

sensitivity the agreement of two tests (positive response to the dynamic test + positive RM pituitary) to identify the pituitary form (CD), while we considered specificity the agreement of two tests (negative response to the dynamic test + total body positive for neuroendocrine neoplasm) to indicate the ectopic form EAS.

**Results:** using as cutoff for the CRH test an increase in ACTH  $>72.4\%$ , for the DDAVP test an increase in ACTH  $>32.3\%$ , and for the HDDST a cortisol suppression  $>52.5\%$ , the sensitivity obtained by CRH test + RM is 59%, that of DDAVP test + RM is 60% and that of HDDST + RM is 64%. Specificity (negative response to dynamic test + total body CT) is respectively 66%, 30% and 44%.

In the case of positive pituitary MRI, a positive response to the CRH test correctly identifies 76% of cases with CD, while the HDDST 78%.

In the case of a positive total body CT, the negative matched and concordant response to the stimulus test with CRH correctly identifies 86% of patients with EAS, while the high-dose suppression test has a specificity of 55%.

**Conclusions:** The execution of the MRI or CT followed, in case of finding a lesion compatible with an ACTH-secreting tumor, by the execution of the CRH test represents an accurate and non-invasive approach for the differential diagnosis between CD and EAS.

## 1. INTRODUZIONE

La sindrome di Cushing (CS) è una rara malattia derivante un eccesso cronico di cortisolo in circolo, si parla pertanto di ipercortisolismo.

La causa più comune è iatrogena ed è conseguente un utilizzo prolungato di corticosteroidi esogeni assunti per scopi antiinfiammatori o immunosoppressivi, nel contesto di varie patologie croniche come asma, BPCO, malattie reumatologiche; quasi 1% della popolazione generale ha intrapreso una terapia con glucocorticoidi per un periodo superiore ai tre mesi<sup>1,2</sup>.

La sindrome di Cushing endogena è invece un disordine molto più raro, che deriva da un'eccessiva secrezione di cortisolo da parte delle ghiandole surrenaliche secondo meccanismi ACTH-dipendente o ACTH-indipendente.

### 1.1 FISIOLOGIA DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE

L'ACTH o corticotropina è un ormone polipeptidico che viene prodotto a partire dalla proteolisi della proopiomelanocortina (POMC) a livello dell'adenoipofisi. Agisce a livello del surrene dove ne stimola l'attività e il trofismo; il suo rilascio è regolato principalmente dal CRH (corticotropin-releasing hormone) ipotalamico, il principale fattore di stimolo. Anche l'arginina-vasopressina stimola la secrezione di ACTH, grazie al suo legame con i recettori V3, espressi normalmente nelle cellule corticotrope dell'adenoipofisi.<sup>3,4</sup>

Sotto l'azione della corticotropina, la zona fascicolata del surrene rilascia cortisolo, che agisce a sua volta a livello ipotalamico e ipofisario dove inibisce il rilascio rispettivamente di CRH e ACTH, attraverso un meccanismo a feedback negativo.

<sup>4,5</sup>

In circolo la maggior parte del cortisolo (95%) si lega in modo reversibile a proteine plasmatiche trasportatrici: la globulina legante il cortisolo (CGB) che rappresenta un sistema ad alta specificità e bassa capacità di legame e l'albumina che media invece un legame a bassa affinità ed ad alta capacità.<sup>5</sup> Il cortisolo libero è l'ormone fisiologicamente attivo, il solo che viene filtrato dal glomerulo renale: nelle condizioni di ipersecrezione di cortisolo, come la CS, si assiste ad un aumento del

cortisolo plasmatico libero e di conseguenza anche la quota di cortisolo escreta nelle urine aumenta.<sup>6</sup>

La secrezione di ACTH e cortisolo segue un ritmo circadiano, con valori massimi al mattino, fra le 6.00 e le 8.00, e un nadir tra le 23.00 e le 24.00.<sup>4,5</sup>

Esiste una lunga lista di stimoli esogeni o condizioni che attivano l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene: oltre a situazioni stressanti, picchi di entità minore di cortisolo si possono verificare durante la giornata, per esempio quando l'organismo è esposto ad esercizio fisico, fumo di sigaretta e cibo.<sup>7</sup>

Il cortisolo è in grado di legarsi sia ai recettori intranucleari dei glucocorticoidi che a quelli dei mineralcorticoidi. A differenza dei mineralcorticoidi, il cortisolo è presente in circolo a concentrazioni molto più elevate, tuttavia i suoi effetti mineralcorticoidi vengono modulati dall'enzima 11 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi (11 $\beta$ -HSD) tipo II che è espresso in molti tessuti quali rene, colon, placenta, ma anche ghiandole salivari. Esso converte il cortisolo in cortisone, inattivandolo e garantendo così selettività d'azione ai mineralcorticoidi almeno fin quando il cortisolo è presente in concentrazioni fisiologiche.<sup>5,8</sup>

## **1.2 SINDROME DI CUSHING ACTH-DIPENDENTE**

### **1.2.1 EZIOLOGIA**

Dal punto di vista eziopatogenetico, la sindrome di Cushing si può suddividere in due forme principali: forme ACTH-dipendente (80%) e forme ACTH-indipendente (20%).

Le forme ACTH-indipendente sono conseguenti un'ipersecrezione autonoma di cortisolo da parte di singoli tumori primitivi corticosurrenali, adenomi o carcinomi. Più rari sono i casi mediati da un'iperplasia surrenalica micro o macronodulare bilaterale.<sup>9</sup>

Le forme ACTH-dipendente sono invece conseguenti un'eccessiva produzione di corticotropina.

L'80% delle forme ACTH-dipendente è conseguente la presenza di un adenoma ipofisario secernente ACTH; si parla in questo caso di malattia di Cushing (CD), da Harvey Cushing che nel 1932 descrisse per primo la presenza di adenomi ipofisari

basofili alla base della malattia.<sup>9</sup> Nella malattia di Cushing, l'adenoma ipofisario è resistente all'azione del cortisolo endogeno; di conseguenza la malattia di Cushing è caratterizzata da una secrezione soppressa di CRH ed da elevati livelli di ACTH, in relazione al grado di produzione di ACTH e di cortisolo.<sup>4</sup>

Gli adenomi corticotropi rappresentano il 10-15% degli adenomi ipofisari; nel 90% dei casi si tratta di microadenomi, cioè tumori di diametro inferiore ai 10 mm (spesso <6mm).

Circa il 10% degli adenomi ACTH-secrnenti, responsabili della malattia di Cushing, presenta dimensioni superiori a 1 cm; si parla quindi di macroadenomi, i quali pur essendo definiti come benigni, spesso presentano caratteristiche di invasività nei confronti dei tessuti circostanti ponendo dei problemi nella gestione terapeutica.<sup>10</sup> Ancor più rari sono i carcinomi ipofisari secernenti ACTH, definiti tali dalla presenza di metastasi.<sup>11</sup>

Il restante 20% delle forme ACTH-dipendente è mediato da neoplasie neuro-endocrine secernenti ACTH, in questo caso si parla di secrezione ectopica di ACTH (EAS); talvolta, sebbene molto più raro, vi possono essere tumori ectopici secernenti CRH.<sup>6</sup>

L'elenco dei tumori non ipofisari in grado di secernere ACTH è lungo, ma comprende essenzialmente due categorie di tumori che si sviluppano soprattutto da cellule endocrine presenti a livello bronco-polmonare e/o digestivo. Il primo gruppo comprende tumori maligni scarsamente differenziati o indifferenziati con alto tasso di proliferazione, principalmente il carcinoma polmonare a piccole cellule; tuttavia vi possono essere anche altri tumori aggressivi responsabili della sindrome di Cushing ectopica, come carcinomi neuroendocrini digestivi scarsamente differenziati, a grandi o a piccole cellule. Spesso i pazienti con tale neoplasia sono assistiti nei reparti di oncologia medica o pneumologica e non dall'endocrinologia poiché richiedono prima di tutto un trattamento chemioterapico tempestivo, vista la prognosi molto sfavorevole.<sup>12</sup>

Il secondo gruppo di tumori responsabili della sindrome di Cushing ectopica comprende tumori ben differenziati con bassi tassi di proliferazione, quali carcinoidi bronchiali, tumori neuroendocrini digestivi di grado G1 e G2 e carcinoidi timici. In una revisione del 2007 che riassume le più vaste casistiche pubblicate, il

polmone risulta l'organo più frequentemente imputato, essendosi dimostrato all'origine della secrezione ectopica di ACTH in oltre il 45% dei casi; in tale revisione si è visto inoltre che rispetto al passato c'è stato un cambiamento dell'istotipo polmonare più frequente, con attualmente una maggiore incidenza, come causa di CS, di carcinoidi bronchiali (25%), rispetto al carcinoma polmonare a piccole cellule (circa 20%), che era più frequente in passato. Seguono, come tumori più frequenti responsabili di CS, i carcinoidi timici (11%), i carcinoidi pancreatici (8%), il carcinoma midollare della tiroide (6%) e il feocromocitoma (5%). Solo il 6-8% dei tumori confermati istologicamente deriva da tumori non endocrini non polmonari e comprende tumori ovarici (>2%), carcinoma anorettale (2%), neuroblastoma (1%), carcinoma della cervice uterina, tumore della prostata e pochi altri tipi<sup>13</sup>.

Non sempre è possibile identificare la sede di produzione, infatti il tumore secernente non viene scoperto fino ad un 20% di casi; studi più recenti hanno riportato percentuali inferiori e ciò può essere conseguente l'utilizzo di tecniche di imaging più sofisticate e di intervalli di follow up più lunghi<sup>14</sup>.

Proprio per tale motivo, l'EAS può essere classificato in "overt" quando la sede di produzione di ACTH è facilmente rilevabile dalle iniziali indagini endocrinologiche e radiologiche, in "covert" quando nonostante l'ipercortisolismo evidenziato ai test biochimici iniziali, la sede tumorale si identifica solo durante il follow up, oppure in "occult" quando tutti i test endocrinologici volti a identificare la sede indicano una fonte ectopica, ma tale fonte non viene identificata né alla valutazione iniziale, né durante il follow up.<sup>13</sup>

La produzione di ACTH da parte di un tumore sviluppatosi da un tessuto non fisiologicamente responsabile della sua produzione deve essere distinta dalla produzione di ACTH da parte di adenomi corticotropi posti in sede ectopica, che è una condizione molto rara.<sup>15</sup>

Sia nella malattia di Cushing che nei casi di secrezione ectopica di ACTH, l'ipersecrezione di corticotropina, avendo un effetto trofico a livello delle ghiandole surrenaliche, può indurre delle modifiche in esse. Nelle forme ACTH-dipendente spesso è presente un'iperplasia diffusa semplice corticosurrenale bilaterale. Talora è possibile un'iperplasia multinodulare, caratterizzata dalla presenza di uno o più noduli gialli macroscopici. Sebbene generalmente

l'interessamento è bilaterale, in alcuni casi, l'ACTH può indurre un aumento asimmetrico dei surreni che può portare erroneamente a suggerire la presenza di un adenoma autonomo.<sup>16</sup>

### 1.2.2 EPIDEMIOLOGIA

La sindrome di Cushing iatrogena è la forma più frequente ed è conseguente l'assunzione prolungata di glucocorticoidi esogeni assunti a scopo antiinfiammatorio o immunosoppressivo nel contesto di varie patologie croniche. La sindrome di Cushing endogena invece, nonostante le molteplici cause possibili alla base, è una malattia rara, con incidenza annuale stimata di 2-3 casi/1000000<sup>17</sup>. L'incidenza annuale della malattia di Cushing riportata varia da 1,2 a 2,4 casi per milione di persone.<sup>18</sup>

La malattia di Cushing è un disordine che colpisce maggiormente il sesso femminile, non a caso la prima descrizione di adenoma ACTH-secernete da parte di Harvey Cushing è stata formulato proprio in una donna, Minnie<sup>19</sup>.

Il rapporto donne:uomini varia da 3:1 fino a 10:1 a seconda degli studi<sup>20</sup>. L'età media d'insorgenza della malattia è intorno alla quarta decade ed in particolare nel sesso femminile l'età di insorgenza è più bassa (30.5 anni) rispetto a quella degli uomini (37.1 anni).

La malattia di Cushing è ancora più rara in età pediatrica, con un'incidenza pari al 5% di quella osservata negli adulti; l'età alla diagnosi è intorno ai 13 anni, mentre la comparsa dei sintomi avviene intorno a 10,6 anni. In età prepuberale, a differenza dell'età adulta, vi è una prevalenza di malattia di Cushing nel sesso maschile. Le cause di ciò rimangono poco chiare; mentre non si sono riscontrate variazioni in termini di gravità tra i due sessi in età prepuberale.<sup>4,21,22</sup>

La sindrome da secrezione ectopica di ACTH presenta differenze epidemiologiche rispetto alla malattia di Cushing. F. Beuschlein et al., hanno eseguito una revisione della letteratura e hanno evidenziato che, pur essendo entrambe forme ACTH-dipendente, l'EAS presenta solo una minima predilezione per il sesso femminile con un rapporto uomini:donne pari a 1:1,4; hanno inoltre evidenziato come la sindrome di Cushing da carcinoma polmonare a piccole cellule e da carcinoide

timico compaia maggiormente nel sesso maschile ed in caso di carcinoma polmonare a piccole cellule i pazienti tendano ad essere più anziani, con età media di 56,8 anni alla diagnosi, mentre i pazienti con carcinoma timico rappresentano il gruppo più giovane con età media di insorgenza di 33,3 anni<sup>15</sup>.

### 1.2.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'eccessiva e prolungata esposizione al cortisolo porta a segni e sintomi multisistemici che devono, qualora presenti, far sempre sospettare la CS. Le manifestazioni cliniche comprendono alterazioni a livello cardiovascolare, metabolico, muscolo-scheletrico e psichico (tabella I).<sup>9</sup>

I segni e sintomi sono molto variabili e dipendono dal grado, dalla durata dell'ipercortisolismo e verosimilmente anche dalla sensibilità dei recettori dei glucorticoidi<sup>9,23</sup>; il fenotipo clinico è pertanto estremamente variabile.

SEGNI	SINTOMI
<u>Caratteristiche che meglio identificano la sindrome di Cushing; la maggior parte non ha elevata sensibilità.</u>	
Ecchimosi per traumi lievi	
Pletora al volto	
Miopatia prossimale (o debolezza muscolare prossimale)	
Strie rubre (smagliature rosso-purpureo e larghe >1 cm)	
Nei bambini, aumento di peso con riduzione della velocità di crescita	
<u>Caratteristiche della sindrome di Cushing comuni nella popolazione generale e/o meno discriminatorie</u>	
Accumulo di adipe in sede dorso-cervicale ("gibbo")	stanchezza
Facies "a luna piena"	aumento di peso e cambiamento dell'appetito
Obesità	depressione
Accumulo di adipe in sede sopraclaveare	dolore alla schiena
Cute sottile	difficoltà di concentrazione
Edemi periferici	riduzione della libido
Acne	insonnia
Irsutismo e perdita di capelli nelle donne	perdita di memoria, soprattutto quella a breve termine
Ritardo nella guarigione di ferite	irritabilità
	alterazioni del ciclo mestruale
Nei bambini: bassa statura, pubertà precoce o tardiva, alterato sviluppo dei caratteri sessuali	nei bambini: rallentamento della crescita
I segni e i sintomi sono elencati in maniera casuale.	
La sindrome di Cushing è più probabile se i segni e i sintomi compaiono in giovane età.	

Tabella I. Caratteristiche cliniche della sindrome di Cushing. (adattata da Nieman et al., The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine Society Clinical Practice Guideline.)

Nella maggior parte dei casi, i pazienti vengono valutati per CS sulla base di un sospetto clinico e meno frequentemente per alterazioni ormonali dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, evidenziate durante esami di laboratorio di routine.<sup>24</sup>

Il sospetto di CS insorge in presenza di obesità centrale, che è spesso il sintomo iniziale ed è solitamente associata ad assottigliamento degli arti per ipotrofia muscolare, soprattutto in sede prossimale. Altri segni suggestivi di uno stato di

ipercortisolismo sono l'accumulo di tessuto adiposo al volto che provoca la tipica facies a "luna piena", la pelle assottigliata, la facilità a formare lividi anche per traumi lievi, strie violacee più larghe di 1 cm principalmente a livello addominale e all'estremità prossimali<sup>25</sup> e l'accumulo di grasso a livello delle fosse sovraclavari e a livello dorsale del collo ("gibbo"). Sono frequenti anche i disturbi neuropsicologici, tra cui la depressione, l'irritabilità emotiva, disturbi del sonno e deficit cognitivi. Nei bambini è spesso presente un ritardo della crescita, con rapido aumento di peso.

La CS si può manifestare con molti altri sintomi quali l'ipertensione, alterazioni del metabolismo lipidico e glucidico, irsutismo, osteoporosi e alterazioni del ciclo mestruale; si tratta di sintomi presenti in molte altre patologie, anche più frequenti, come la sindrome metabolica; alcuni soggetti con sindrome metabolica potrebbero quindi richiedere uno screening per CS, soprattutto se giovani e resistenti al trattamento convenzionale.<sup>6</sup>

È molto difficile quindi identificare dalla clinica solo i pazienti potenzialmente affetti da CS, da un lato vi è rischio di sottoporre a screening un numero eccessivo di soggetti con costi elevati<sup>24</sup>, dall'altro lato si rischia di ritardare la diagnosi a causa della varietà di presentazione clinica e del conseguente rinvio dei pazienti a specialisti diversi a seconda dei sintomi dominanti (cioè ginecologici, dermatologici, cardiovascolari, psichiatrici, ecc.).<sup>26</sup>

Non sempre il fenotipo è florido, talvolta il quadro può essere sfumato, come nelle situazioni di ipercortisolismo moderato e in presenza di incrementi episodici o periodi della secrezione di cortisolo, in quest'ultimo caso si parla di Cushing ciclico.<sup>6,9</sup> La sindrome di Cushing ciclico è un caratterizzata da episodi di ipercortisolismo attivo alternati a periodi, di durata variabile, di normale funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene; durante quest'ultima fase i valori di cortisolo salivare notturno o di cortisolo urinario rientrano nella norma.<sup>27</sup> È una condizione, un tempo considerata rara, che se non riconosciuta può portare a ritardi nel trattamento e in ultima analisi impattare sulla qualità di vita del paziente.<sup>28</sup>

Le forme di EAS associate a tumori aggressivi come il carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC), sono in genere caratterizzate da concentrazioni di ACTH e

cortisolo più elevate rispetto a quelle riscontrabili nella malattia di Cushing e ciò favorisce una presentazione clinica più severa e che insorge molto rapidamente; spesso si riscontrano iperpigmentazione cutanea dovuta agli alti livelli di POMC, perdita di peso con marcata amiotrofia ed effetti mineralcorticoidi come l'ipokaliemia; quest'ultimo quadro è conseguente la saturazione dell'enzima 11  $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi di tipo II (11 $\beta$ -HSD2) da parte del cortisolo in eccesso.<sup>29</sup> Al contrario, i casi di secrezione ectopica di ACTH associati a tumori ben differenziati, come i carcinoidi bronchiali, hanno più spesso un esordio graduale e si manifestano con segni e sintomi indistinguibili dalla malattia di Cushing.<sup>14</sup> Ci sono pertanto delle differenze cliniche se si considera l'istotipo responsabile di EAS, mentre le dimensioni della neoplasia, qualunque essa sia, sembrano non essere responsabili di variazioni cliniche; nello studio condotto da Isidori et al., non si sono osservate differenze nella presentazione clinica tra EAS covert e overt, suggerendo quindi che le dimensioni della massa tumorale non predicano necessariamente le caratteristiche secretorie e cliniche della sindrome.<sup>30</sup>

#### **1.2.4 DIAGNOSI**

È importante una diagnosi precoce, per poter iniziare rapidamente il trattamento che è volto a ridurre la progressione dei sintomi, le complicanze e il potenziale exitus.<sup>24</sup> Per tale motivo, è necessaria un'accurata anamnesi, inclusa l'anamnesi farmacologia volta a indentificare l'eventuale assunzione di glucocorticoidi, e un accurato esame obiettivo.<sup>6</sup>

I medici di base possono sospettare la CS e procedere a test di screening biochimici iniziali; mentre i test più specifici e invasivi volti soprattutto a fare diagnosi differenziale tra le varie forme ACTH-dipendente, dovrebbero essere eseguiti in centri di riferimento specializzati.<sup>1</sup>

Sono stati sviluppati diversi test per evidenziare l'ipercortisolismo, tuttavia nessuno di essi si è rilevato completamente capace nel selezionare tutti i casi di CS.<sup>61</sup>

#### **1.2.4.1 Test di prima linea**

Come raccomandato dalle linee guida dell'Endocrine Society, la diagnosi biochimica dell'ipercortisolismo si basa su tre diversi approcci:

- 1- Valutazione dell'escrezione giornaliera di cortisolo, mediante la raccolta urinaria di cortisolo libero nelle 24 ore, da eseguire almeno 2 volte.
- 2- Documentare la perdita della normale variazione diurna della secrezione di cortisolo, attraverso la valutazione del cortisolo salivare notturno; devono essere eseguite almeno due valutazioni.
- 3- Documentare la perdita del feedback negativo esercitato dal cortisolo sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, tramite l'esecuzione del test di soppressione con desametasone a basse dosi.<sup>31</sup>

La malattia di Cushing è una malattia rara e quindi, data la bassa prevalenza, i test di screening devono avere un'alta sensibilità per poter individuare tutti i pazienti con CS, anche quelli con ipercortisolismo moderato<sup>32</sup>; le soglie diagnostiche sono state nel tempo progressivamente abbassate per evitare falsi negativi e questa modifica non ha impattato in maniera significativa sulla specificità dei singoli test<sup>33</sup>, infatti nel 2020, una meta-analisi comprendete 134 studi e una popolazione complessiva di 14140 partecipanti ha riportato una buona accuratezza diagnostica, con simile sensibilità e specificità, dei vari test di screening nel definire un quadro di ipercortisolismo, pertanto la positività di un test di screening aumenta significativamente (e similmente) la probabilità post-test di CS in un singolo paziente.<sup>34</sup>

Le linee guida suggeriscono l'utilizzo di almeno due test di prima linea per la diagnosi di CS; in presenza di risultati nella norma ottenuti con un determinato test, ma alto sospetto clinico (sintomi suggestivi di CS insorti in breve tempo o presenza di sintomi non adeguati per età e/o sesso<sup>35</sup>) deve essere eseguito un altro test di screening; la scelta del test deve essere adeguata alle caratteristiche del singolo paziente per ridurre al minimo la possibilità di falsi positivi e falsi negativi.<sup>1,24</sup> Tra i test di screening non è raccomandata la misurazione del cortisolo sierico mattutino in quanto estremamente variabile nella maggior parte dei pazienti con CS.<sup>9</sup>

*Cortisolo libero urinario delle 24 ore (UFC).*

Già dal 1970 gli esperti sostenevano l'importanza di UFC nel fare diagnosi di CS; il cortisolo libero urinario è indice della secrezione nelle 24 ore del cortisolo biologicamente attivo. Contrariamente al cortisolo plasmatico che è una misura del cortisolo totale, ossia quello legato e quello non legato, il cortisolo urinario, indicando solo quello libero, non risente dei fattori che possono influenzare i livelli delle globuline leganti i corticosteroidi (CBG)<sup>6</sup>; per esempio donne sane che assumono estroprogestinici possono presentare alti livelli di cortisolo sierico dal momento che gli estroprogestinici aumentano le CBG e di conseguenza il cortisolo totale.<sup>31</sup>

Galm et al., hanno riassunto in una meta-analisi l'accuratezza diagnostica dei vari test impiegati per la diagnosi di CS. Da tale meta-analisi è emerso che l'UFC presenta una sensibilità più bassa (93%) rispetto a quella degli altri test di prima linea e una specificità (94%) invece comparabile a quella degli altri.<sup>34</sup>

I valori di cortisolo urinario possono essere estremamente variabili, aspetto che giustifica la minore sensibilità di UFC e al contempo la necessità di eseguire almeno tre raccolte urinarie in caso di evidente sospetto clinico.<sup>36</sup> Solo un valore superiore 4 volte il cut-off può essere considerato indicativo di CS.<sup>6</sup>

L'UFC è aumentato non solo nella CS, ma anche negli stati di pseudo-Cushing, quali depressione, severa obesità e alcolismo; si tratta di condizioni caratterizzate da una clinica simile alla CS, ma in cui non vi è attivazione patologica dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene come invece avviene nella CS; solitamente lo pseudo Cushing si associa a incrementi più lievi di cortisolo urinario.<sup>9</sup>

La determinazione del cortisolo libero nelle urine risente della funzionalità renale: una riduzione del filtrato glomerulare comporta una riduzione dei livelli di cortisolo nelle urine e quindi in caso di insufficienza renale moderata e/o grave vi è rischio di falsi negativi; secondo le recenti linee guida in tali situazioni, l'UFC dovrebbe essere sostituito con il test di soppressione a basse dosi.<sup>36</sup>

È un test il cui risultato dipende anche dalla compliance del paziente; che non deve bere quantità eccessive di liquidi poiché elevati volumi di urine possono ridurre la quota di cortisolo riassorbito e determinare quindi un aumento del cortisolo urinario: un'assunzione giornaliera superiore a 3,5 litri è associata a rischio di falsi

positivi<sup>37</sup>; il soggetto non deve inoltre utilizzare preparati contenenti glucocorticoidi, durante la raccolta urinaria che deve essere eseguita in modo preciso: la raccolta inizia con la vescica vuota e viene protratta fino alla prima urina del giorno seguente.<sup>31</sup> È possibile valutare l'accuratezza della raccolta urinaria tramite la misurazione della creatinina urinaria, la sua escrezione è infatti proporzionale alla massa muscolare e pertanto relativamente costante con variazioni giornaliere solo del 10-15%.<sup>38</sup>

I valori di UFC dipendono anche dai metodi di laboratori utilizzati. La misurazione del cortisolo urinario tramite metodi immunologici (radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), or auto- mated chemiluminescence (ECLIA)) può essere influenzata, per via della cross-reattività degli anticorpi utilizzati, dalla presenza di metaboliti del cortisolo o di alcuni glucocorticoidi sintetici; la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) invece evitano tale problematica. I limiti superiori di norma sono più bassi con quest'ultime due tecniche rispetto a quelli ottenibili con i metodi immunologici. Ad esempio i valori di cortisolo ottenuti mediante HPLC possono arrivare fino al 40% del valore misurato con RIA.<sup>31</sup>

L'HPLC ha una elevata sensibilità e specificità, ma occasionalmente sostanze come la carbamazepina e digossina possono interferire e produrre falsi aumenti di UFC.<sup>31</sup> Anche gli intervalli di riferimento variano tra i singoli laboratori, pertanto i risultati di UFC devono essere interpretati con l'intervallo di riferimento proprio di ciascun saggio.<sup>1,33</sup>

#### *Cortisolo salivare notturno (LNSC)*

Nella CS, la compromissione del ritmo circadiano è un tratto caratteristico, precoce ed è documentabile dalla non riduzione fisiologica notturna dei livelli di cortisolo plasmatico.<sup>26,39,40</sup> Il cortisolo biologicamente attivo nel sangue è in equilibrio con il cortisolo nella saliva e pertanto LNSC, marker surrogato del cortisolo sierico libero, può essere utile nel differenziare i pazienti affetti da CS da quelli sani<sup>27,41</sup>; la velocità di produzione della saliva non influenza la concentrazione di cortisolo salivare, che è stabile a temperatura ambiente per diverse settimane, inoltre il suo dosaggio non richiede prelievo venoso (e quindi

evita anche costose ospedalizzazioni). Proprio per tali motivi, viene considerato un test di screening non invasivo, poco costoso, facile da eseguire ed adatto anche ai pazienti ambulatoriali.<sup>38,40</sup> Rappresenta inoltre una valida alternativa anche per quei soggetti che non sono in grado di raccogliere correttamente le urine, entrambi i test infatti valutano il cortisolo libero.<sup>42</sup>

Tuttavia, come per la raccolta delle urine, diverse condizioni possono determinare false positività e pertanto i pazienti devono essere istruiti sulle modalità di esecuzione del test. L'individuo deve essere innanzitutto rilassato, infatti soggetti sani, ma attivi fisicamente o emotivamente possono presentare valori elevati di cortisolo salivare notturno per attivazione fisiologica dell'asse ipotalamo-ipofisurrene.<sup>38</sup> Inoltre il soggetto deve prestare attenzione all'assunzione di liquirizia e di tabacco da masticare visto che contengono acido glicirrizico, che inibisce l'enzima 11  $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi di tipo II presente a livello delle ghiandole salivari e che è responsabile dell'inattivazione del cortisolo. Anche la contaminazione diretta della salivetta da parte di lozioni contenenti steroidi o gel orali può determinare risultati falsi positivi.<sup>1</sup>

Il fumo è un altro elemento confondente, è stato dimostrato che i pazienti fumatori hanno un cortisolo salivare notturno più elevato rispetto ai non fumatori<sup>43</sup>; bisogna inoltre valutare attentamente anche i risultati ottenuti in caso di soggetti anziani e/o diabetici, infatti l'età avanzata e il diabete sembrano essere correlati ad aumenti di LNSC, aspetto invece non presente se si considera il sesso o il BMI.

L'LNSC potrebbe non essere adatto ad alcune categorie come pazienti che eseguono un lavoro a turni, in cui il ritmo circadiano è attenuato, oppure soggetti che soffrono di depressione<sup>31</sup>, persone con poca salivazione e con malattie orali; mentre è mandatorio in caso di CS ciclico; il test infatti non è invasivo e quindi può essere eseguito periodicamente per poter così monitorare i livelli di cortisolo salivare e quindi eventuali fluttuazioni.<sup>1,44,45,46</sup>

Secondo Galm et al., la sensibilità e la specificità del test sono rispettivamente 95,8% e 93,4%.<sup>34</sup> Ceccato et al., hanno riportato che l'LNSC è molto utile nell'escludere la CS in caso di livelli di cortisolo nella norma, ma è un test debole

in caso di ipercortisolismo subclinico e in tale situazione sono indicati altri test di screening.<sup>47</sup>

I risultati di LNSC sono differenti a seconda dei laboratori considerati; alcune delle possibili spiegazioni includono differenze nei protocolli di raccolta e trasporto dei campioni di saliva, numero e frequenza di campionamento, variazione delle prestazioni dei test dei vari laboratori. Per ridurre al minimo queste variazioni sarebbe opportuno utilizzare lo stesso dispositivo, rivalutare gli intervalli di riferimento in caso di modifica del dispositivo e sviluppare programmi di valutazione esterna.<sup>46</sup>

Il cortisolo salivare, così come UFC, viene dosato tramite test immunologici e/o spettrometria di massa. I vantaggi del test immunologico sono che è poco costoso, facile da eseguire e che richiede piccoli campioni di saliva<sup>48</sup>, tuttavia come limite presenta una ridotta specificità per la possibilità di risposta crociata degli anticorpi utilizzati contro gli steroidi presenti in saliva. Tale problematica può essere evitata con la spettrometria di massa tandem, che garantisce performance analitiche elevate e consente la misurazione simultanea di più di un analita.<sup>8</sup> La sensibilità e la specificità della spettrometria di massa nella pratica clinica sono state valute solo in pochi studi e ci sono pochi confronti diretti di essa con i test immunologici. Ceccato et al., hanno utilizzato la spettrometria di massa per valutare dati inattesi ottenuti con test immunologici e hanno suggerito che tale passaggio aggiuntivo può migliorare l'accuratezza diagnostica complessiva.<sup>46</sup>

Il test può avere un ruolo parziale anche nella diagnosi differenziale delle forme ACTH-dipendente, infatti secondo Ceccato et al., valori molto alti di LNSC potrebbero far sorgere il sospetto di CS ectopico.<sup>40</sup> Il cortisolo salivare notturno è un test di screening molto utile per la prima diagnosi, ma sembra avere un ruolo anche nei casi di recidiva di malattia di Cushing operata.<sup>40</sup>

#### *Test di soppressione con 1 mg di desametasone*

Il test di soppressione con desametasone, potente glucocorticoide a lunga emivita (36-54 ore) è stato introdotto per la prima volta da Liddle nel 1960. Mentre nei soggetti sani, il DST inibisce la secrezione di corticotropina, nei pazienti con CS, la secrezione di ACTH è relativamente o completamente resistente al feedback

negativo esercitato da DST, a seconda della causa eziologica alla base della sindrome di Cushing ACTH-dipendente.<sup>49</sup>

Il test prevede l'assunzione per via orale di 1 mg di desametasone alle ore 23.00-24.00 e la misurazione del cortisolo plasmatico a digiuno il mattino successivo, tra le 08.00-09.00. Inizialmente una concentrazione di cortisolo plasmatico post DST inferiore a 138nmol/L era ritenuta fisiologica e non indicativa di CS, in seguito il cut-off è stato abbassato a 50nmol/L;<sup>1</sup> ciò ha determinato un aumento della sensibilità del test e quindi la conseguente possibilità di identificare anche i pazienti con ipercortisolismo lieve; secondo Galm et al., è il test con sensibilità più elevata pari al 98,6%, e specificità inferiore (90,6%).<sup>34</sup> La specificità potrebbe essere più elevata in caso di innalzamento del cut-off, tuttavia essendo un test utilizzato nel contesto di screening, è preferibile scegliere un cutoff che privilegia una maggiore sensibilità rispetto alla specificità.<sup>9,31</sup>

È un test di facile esecuzione e di basso costo. Non sempre tuttavia la mancata soppressione è indicativa di CS, ci possono essere infatti situazioni diverse alla base della mancata soppressione, quali ridotto assorbimento di DST e quindi ridotta concentrazione in circolo, assunzione concomitante di farmaci (barbiturici, fenitoina, carbamazepina, rifampicina e alcol) che aumentano, tramite l'attivazione dell'enzima CYP3A4, il metabolismo epatico del DST, aumento della concentrazione delle globuline leganti i corticosteroidi (CBG) conseguenti per esempio stati di iperestrogenismo quali gravidanza; ancora la mancata soppressione si può avere negli stati di pseudo-Cushing e in alcuni soggetti sani<sup>6</sup>. Un aumento invece della concentrazione del desametasone può verificarsi in caso di ridotta clearance quindi in caso di insufficienza renale e/o epatica. Alcuni esperti hanno suggerito, per evitare falsi positivi e falsi negativi, la misurazione simultanea della cortisolemia e dei livelli di desametasone per poter così capire se la concentrazione di DST è adeguata e di conseguenza il test affidabile; tuttavia data la disponibilità limitata e il suo costo questo approccio potrebbe non essere fattibile in tutto il mondo.<sup>31</sup>

Visto il suo alto valore predittivo negativo, rappresenta il test di screening raccomandato in caso di Cushing subclinico, condizione caratterizzata da lieve

ipercortisolismo e assenza di segni e sintomi tipici, che però può portare a malattie metaboliche, vascolari e fratture da fragilità proprio come il CS conclamato.<sup>50</sup>

Tale test potrebbe essere utile non solo per identificare l'ipercortisolismo, ma anche per differenziare le forme ACTH-dipendente. È stato documentato infatti che la risposta del cortisolo durante il test di soppressione a basse dosi, negli adulti, può essere uno strumento utile per la diagnosi differenziale tra malattia di Cushing e EAS.<sup>51</sup>

Una volta identificato un quadro di ipercortisolismo tramite i test di screening, è necessario procedere con test di secondo livello ed esami radiologici per poter identificare la causa eziologica responsabile della secrezione patologica di cortisolo, come illustrato nella figura 1.

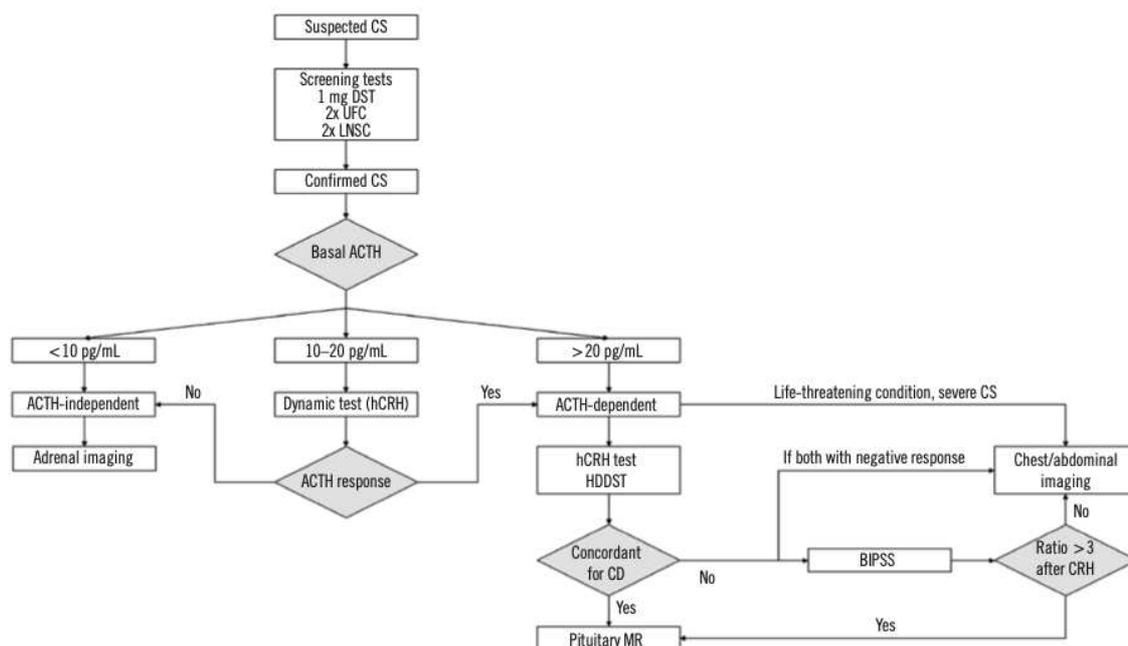


Figura 1. Flowchart relativa alla diagnostica della CS. (da Pinelli et al., Second-line Tests in the Diagnosis of Adrenocorticotrophic Hormone-Dependent Hypercortisolism).

Il cardine della diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente e ACTH-indipendente, è la misurazione dell'ACTH mattutino, che dovrebbe precedere qualsiasi studio radiologico;<sup>52</sup> valori superiori a 20 pg/ml identificano pazienti con CS ACTH-dipendente, mentre valori inferiori a 10 pg/ml si trovano nei casi di CS

ACTH-indipendente dove la secrezione autonoma di cortisolo da parte delle ghiandole surrenaliche sopprime il CRH ipotalamico e le cellule ipofisarie corticotrope. Esiste una zona grigia comprendente i valori tra 10 e 20  $\mu\text{g/ml}$ , in questa situazione si suggerisce l'esecuzione del CRH test per differenziare le due forme.<sup>6</sup>

Il dosaggio di ACTH non è particolarmente utile nel differenziare le forme ACTH-dipendente, infatti nonostante vi sia la tendenza nei pazienti con EAS, ad avere livelli più elevati, vi è una sovrapposizione dei valori di ACTH circolante tra CD ed EAS.

Alcuni soggetti con malattia di Cushing possono presentare livelli di ACTH in range e al contrario, alcuni pazienti con forme surrenaliche presentare livelli di ACTH non completamente soppressi, pertanto per migliorare la sensibilità di questo test, è indicato misurare due volte l'ACTH, prima di eseguire esami dinamici di secondo livello.<sup>1,9</sup>

#### **1.2.4.2 Test dinamici di secondo livello**

È molto importante riconoscere, nonostante la differente prevalenza delle due forme ACTH-dipendente, la causa responsabile di CS; se non si riconosce l'origine ectopica e si tratta il paziente come affetto da CD, lo si sottopone ad un intervento neurochirurgico non necessario ed a complicanze date dall'ipercortisolismo cronico. Inoltre, un ritardo nella corretta diagnosi di EAS può compromettere la possibilità di un trattamento precoce e potenzialmente curativo della neoplasia.<sup>53</sup>

I test di secondo livello sono dei test che mirano a riconoscere la malattia di Cushing, essendo la più frequente.<sup>35</sup>

#### *Test di soppressione con desametasone ad alte dosi (HDDST)*

Nella maggior parte degli adenomi corticotropi (80-90%), la somministrazione di alte dosi di glucocorticoidi sopprime parzialmente la secrezione di corticotropina, mentre i tumori ectopici poco differenziati sono resistenti al feedback negativo esercitato da DST, essendo dotati di maggiore autonomia di secrezione di ACTH<sup>49</sup>; questo è il motivo per cui l'HDDST viene utilizzato per far diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente. Tuttavia alcuni tumori neuroendocrini benigni ben

differenziati (carcinoidi bronchiali, timici e del pancreas) possono essere sensibili al feedback negativo esercitato dal desametasone, mimando così il comportamento degli adenomi ipofisari e rendendo più difficoltosa la diagnosi differenziale. Esistono diverse modalità di esecuzione di tale test: il desametasone può essere somministrato per via orale in singola dose (8mg alle ore 23.00) misurando la cortisolemia il giorno successivo alle ore 08.00, oppure si possono somministrare 2 mg di DST ogni 6 ore per 48 ore e dosare il cortisolo plasmatico, il secondo giorno, sempre alle ore 08.00.<sup>6</sup>

Il test è generalmente considerato indicativo di malattia di Cushing quando i livelli di cortisolo sierico si riducono più del 50%.<sup>52</sup>

È un test molto utilizzato nella pratica clinica perché semplice da eseguire e dotato complessivamente di un'adeguata sensibilità (65-100%) e specificità (60-100%).<sup>54</sup> La sensibilità e la specificità del test dipendono però dal cut-off utilizzato; Vilar et al., hanno descritto che una diminuzione del cortisolo sierico pari o superiore al 50% è indicativa di CD, con un livello di specificità del 71,4% che potrebbe essere ulteriormente migliorato fino al 100%, utilizzando un cut-off di soppressione pari all'80%.<sup>52</sup>

I potenziali limiti del test sono la sindrome di Cushing ciclica (l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene può essere normale il giorno dell'esecuzione del test), l'assorbimento e il metabolismo variabile del desametasone. Alcune classi di farmaci che sono comunemente utilizzati nei pazienti con CS, quali antidepressivi, antipertensivi e ipolipemizzanti possono interferire con l'enzima epatico CYP3A4 che è deputato al metabolismo di DST e determinare falsi risultati.<sup>54</sup> Inoltre il test non può sempre essere eseguito, infatti la somministrazione di elevate quantità di glucocorticoidi in un paziente con ipercortisolismo severo, può portare all'esacerbazione di alcuni tratti della CS, quale diabete, ipertensione, ipokaliemia.<sup>49</sup>

L'utilità di tale test non è stata da tutti sostenuta, alcuni infatti l'hanno ritenuto poco informativo per la diagnosi differenziale e hanno suggerito di sostituirlo<sup>55</sup> con il test di soppressione a basse dosi che è stato indicato come un'alternativa specifica e sensibile, visto anche il fattore sicurezza.<sup>49,51</sup> Una soppressione di cortisolo pari o superiore al 30% ottenuta con il test a basse dosi di DST, predice

quasi certamente una risposta consensuale dell'HDDST, in caso di sua esecuzione.<sup>55</sup>

Studi più recenti hanno di nuovo sostenuto la sua utilità affermando che il suo valore predittivo è solo leggermente inferiore a quello del CRH test e pertanto può essere una valida alternativa, qualora il CRH test non sia disponibile<sup>1</sup>.

Sono stati condotti degli studi per valutare l'accuratezza diagnostica ottenibile dalla combinazione di HDDST con altri test. Liu Z. et al., hanno condotto uno studio dove hanno dimostrato che il valore predittivo positivo ottenuto dalla combinazione del test di soppressione ad alte dosi e la risonanza magnetica è 98,6% per CD, maggiore di quello del BIPSS che è il gold standard per la diagnosi differenziale delle forme ACTH-dipendente.<sup>56</sup> Vilar et al., hanno riscontrato che una risposta positiva ai test di stimolo con CRH o DDAVP, unita ad una soppressione di cortisolo pari o superiore al 50% al HDDST è stata trovata solo nei pazienti con CD; la combinazione presenta una sensibilità pari al 63,3% e specificità del 100%.<sup>52</sup>

#### *Test di stimolo con CRH*

Il test di stimolo con CRH è stato proposto come il migliore test non invasivo per porre diagnosi differenziale tra malattia di Cushing ed EAS; si tratta infatti di un esame con elevata accuratezza diagnostica, facile da eseguire, anche a livello ambulatoriale e virtualmente privo di effetti collaterali.<sup>54</sup>

Il razionale di tale test sta nel fatto che la maggior parte degli adenomi corticotropi ipofisari ben differenziati, responsabili della malattia di Cushing, presenta i recettori per il CRH e i costituenti necessari per rispondere. A differenza dei soggetti con CD, i pazienti con EAS presentano alla base della patologia un tumore non ipofisario e generalmente, non avendo i recettori, non rispondono al CRH. Anche in questo caso come per l'HDDST, non si tratta di una regola assoluta, alcuni tumori ectopici possono rispondere alla somministrazione di CRH e quindi presentare aumenti post stimolo della concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo determinando falsi positivi<sup>4</sup>; in particolare il 10-15% dei pazienti con EAS risponde al CRH test indipendentemente dai cut-off utilizzati per misurare gli aumenti di ACTH e cortisolo.<sup>13</sup>

Soggetti sani mostrano una ridotta o assente risposta al CRH se presentano livelli basali di cortisolo sufficientemente alti, pertanto prima di eseguire tale test è fondamentale dimostrare il quadro di ipercortisolismo tramite i test di screening.<sup>55</sup>

Il test viene eseguito iniettando 1 µg/kg o 100 µg di CRH sintetico ovino o umano per via endovenosa e raccogliendo i campioni di sangue per le misurazioni di ACTH e cortisolo prima (-15 minuti e immediatamente prima) e dopo l'iniezione (solitamente a 15,30,45,60,90 e 120 minuti post iniezione di CRH).<sup>52</sup>

Non c'è ancora oggi un consenso unanime circa i criteri da attuare per valutare i risultati ottenuti e questo riconosce diverse cause; innanzitutto il CRH utilizzato può essere differente, infatti si può somministrare CRH ovino o umano; il CRH umano ha proprietà qualitativamente simili al CRH ovino e può fornire la stessa accuratezza diagnostica per quanto riguarda la risposta dell'ACTH, mentre il CRH ovino è considerato superiore nella valutazione della risposta del cortisolo.<sup>57</sup> Inoltre il test varia in base ai punti temporali considerati e ai parametri biochimici (picco di cortisolo e/o ACTH o aumento percentuale rispetto al basale).<sup>55</sup>

Secondo Barbot et al., l'aumento percentuale di ACTH rappresenta il parametro più affidabile per fare diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente. Essi hanno inoltre notato che i casi di malattia di Cushing determinati da macroadenomi tendono a presentare un aumento minore di ACTH dopo iniezione di CRH rispetto ai pazienti con microadenomi, aspetto evidenziato anche da Woo YS et al., nel loro studio.<sup>54,58</sup>

Ritzel et al., hanno mostrato che il CRH test, applicando il cut-off comunemente usato (aumento del 30% del cortisolo e del 50% dell'ACTH), mostra una sensibilità e specificità del 78% per il cortisolo e una sensibilità e specificità rispettivamente dell'83% e dell'89% per l'ACTH; inoltre sulla base della curva ROC, hanno visto che un aumento di ACTH maggiore o uguale al 43% dopo 15 minuti dall'iniezione di CRH è il più forte predittore di CD, con sensibilità dell'83% e specificità del 94%.<sup>52</sup>

Alcuni studi avevano come obiettivo quello di confrontare l'accuratezza diagnostica derivante la combinazione di vari test con quella dei singoli test: Barbot et al., hanno visto che in caso di risposta positiva netta sia al CRH test che all'HDDST, la probabilità di EAS è molto bassa e di conseguenza la necessità di eseguire il BIPSS, che è il gold standard per la diagnosi differenziale, ma al

contempo un esame invasivo, può essere riconsiderata, anche in caso di risonanza magnetica negativa. Rimane invece l'indicazione a eseguire BIPSS in caso di risultati discordanti per evitare diagnosi errate.<sup>54,59</sup> Concordi sono anche i risultati ottenuti da Ferrante et al., secondo loro, la combinazione delle risposte positive del CRH test e del HDDST ha ottenuto risultati superiori rispetto a quelli dei singoli test, raggiungendo una specificità e PPV del 100%, indipendentemente dalla risonanza magnetica.<sup>60</sup>

#### *Test di stimolo con desmopressina (DDAVP)*

Il test con desmopressina è un ulteriore esame diagnostico volto alla diagnosi differenziale tra malattia di Cushing ed EAS; la desmopressina è un analogo sintetico del neuropeptide endogeno arginina-vasopressina (AVP), un noto secretagogo di ACTH grazie al suo legame con i recettori V3 normalmente espressi a livello ipofisario ed un potenziatore della secrezione di CRH; la desmopressina si lega ai recettori V2 di AVP, mentre presenta bassa affinità per i recettori V3 di AVP, pertanto esercita una funzione nulla o minima sull'escrezione di ACTH nei soggetti sani; nei pazienti con malattia di Cushing la desmopressina invece induce la secrezione di ACTH e del conseguente cortisolo, il meccanismo alla base può essere ricercato nella sovra regolazione di V3 (la desmopressina nonostante la bassa affinità, può mostrare attività se V3 è sovra espresso) e/o nell'espressione aberrante di V2 negli adenomi ipofisari secernenti ACTH; il test, evidenziando questo aspetto, è molto utile se si deve fare diagnosi differenziale tra la sindrome di Cushing ACTH-dipendente e una condizione funzionale di ipercortisolismo, quale lo psuedo-Cushing.<sup>3</sup>

Il test prevede la somministrazione endovenosa di 10 µg di DDAVP e l'esecuzione di prelievi di sangue per la misurazione di ACTH e cortisolo plasmatico prima (a -15 minuti e al tempo 0) e dopo la somministrazione di DDAVP (a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti), come il CRH test. Si ritiene che un incremento >50% di ACTH e >20% di cortisolo rispetto ai livelli basali sia indicativo di malattia di Cushing.<sup>52</sup>

Viene proposto come test di seconda linea per la diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente, ma il suo ruolo in tal senso rimane incerto, infatti diversi tipi di tumori ectopici, specie i carcinoidi ben differenziati come i carcinoidi bronchiali,

rispondo alla DDAVP poiché dotati dei recettori V2 e V3<sup>61,62</sup>; essendo tuttavia un test accessibile viene comunque eseguito nella pratica clinica, la desmopressina è infatti economica, facilmente reperibile e al contempo non provoca effetti avversi significativi.<sup>6</sup>

Secondo Barbot et al., il test di stimolo con desmopressina presenta una sensibilità del 83% e una specificità del 62%. Visti tali limiti, potrebbe essere utilizzato in caso di risultati discordanti tra il HDDST e il CRH test<sup>54</sup>, oppure in combinazione con altri test di secondo livello. Nello studio condotto da Ferrante et al., la combinazione delle risposte positive al CRH test e al DDAVP test raggiunge una specificità e un PPV del 100% per la diagnosi di CD. Il tasso di concordanza tra i due test è però inferiore a quello riscontrato nella combinazione tra CRH test e HDDST.<sup>60</sup>

È stata valutata anche la combinazione HDDST e DDAVP test; secondo Qiao et al., la combinazione può aumentare significativamente la capacità di fare diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente e quindi ridurre la necessità del cateterismo dei seni petrosi. Questi due test, a differenza di BIPSS, sono metodi facili da eseguire, rapidi e molto meno costosi.<sup>63</sup>

Il DDAVP test sembra avere anche un ruolo nell'identificazione dei soggetti operati ad alto rischio di recidiva, che si verifica nel 30% dei soggetti sottoposti ad intervento chirurgico trans-naso-sfenoidale di successo<sup>64</sup>; potrebbe quindi essere utilizzato come test per il follow up.<sup>65</sup> Se la risposta al DDAVP in un paziente con CD è accertata e positiva prima dell'intervento neurochirurgico, il suo mantenimento o scomparsa può essere correlato rispettivamente alla persistenza o completa rimozione dell'adenoma.<sup>52</sup>

#### **1.2.4.3 Esami radiologici**

I test di secondo livello presentano dei limiti; alcuni tumori responsabili della secrezione ectopica di ACTH possono mostrare tutte le caratteristiche del "fenotipo corticotropo" e pertanto rispondere ai test di stimolo o di soppressione proprio come l'adenoma ipofisario; è quindi indicata l'esecuzione di tecniche di imaging per poter identificare la sede responsabile della CS.<sup>66</sup>

### *Risonanza magnetica*

Sebbene non sia specificatamente menzionato nelle linee guida dell'Endocrine Society, è ampiamente accettato che la risonanza magnetica sia il primo imaging da attuare nel percorso diagnostico degli stati di ipercortisolismo ACTH-dipendente.<sup>67</sup>

Nei pazienti con presentazione clinica classica e studi dinamici compatibili con CS ipofisario, la presenza di una lesione focale (>6mm) alla risonanza magnetica può fornire una diagnosi definitiva di CD, senza la necessità di ulteriori accertamenti.<sup>6</sup>

A causa dei loro effetti clinici/biologici, gli adenomi vengono spesso evidenziati quando ancora di piccole dimensioni; dati di ampie serie chirurgiche indicano che oltre il 90% degli adenomi rimossi sono microadenomi (<1cm) con diametro medio di circa 6 mm.<sup>4</sup>

La risonanza magnetica con gadolinio è in grado di rilevare adenomi ipofisari solo nel 60-70% dei pazienti con CD<sup>52</sup>; bisogna inoltre considerare che fino al 10% della popolazione generale presenta lesioni ipofisarie incidentali, la maggior parte di esse di diametro inferiore ai 5 mm<sup>6,68</sup>; pertanto la risonanza magnetica non dovrebbe essere eseguita prima di aver stabilito una diagnosi di ipercortisolismo dal punto di vista clinico e biochimico; ad oggi la percentuale di soggetti con incidentalomi ipofisari è in aumento a causa proprio di un più comune accesso alle tecniche di imaging.<sup>38,69</sup> Gli incidentalomi si possono trovare anche nei pazienti con EAS, fattore che complica ancora di più la diagnosi differenziale.<sup>70</sup> In un ampio studio multicentrico italiano, è stata riscontrata la presenza di un adenoma ipofisario nel 73,2% dei pazienti con CD, ma anche nel 38% di soggetti con EAS.<sup>54</sup> Rimane però molto raro anche se possibile, trovare incidentalomi di dimensioni superiori ai 6 mm in pazienti con EAS.<sup>60</sup>

Fino al 30-50% degli adenomi corticotropi responsabili di CD non è visibile alle scansioni a causa della loro posizione, dimensione e/o caratteristiche contrastografiche<sup>71</sup>; si può quindi fare un parallelismo con i casi EAS occulto; l'esito dopo l'intervento chirurgico per via trans-naso-sfenoidale e il successivo tasso di recidiva nei casi di "CD occulto" è simile ai casi di CD con risonanza magnetica positiva.<sup>52</sup>

La RMN standard comprende sequenze spin-echo SE pesate in T1 sia sul piano sagittale che coronale, ripetute dopo la somministrazione di gadolinio, e una sequenza T2 sul piano coronale. La lesione responsabile della malattia di Cushing appare in genere come una area focale di ridotto enhancement dopo somministrazione del mezzo di contrasto, iper o ipo-intensa in T2 rispetto al parenchima circostante.<sup>71</sup> Nella pratica clinica è comunemente usata la RM 1.5 Tesla, che garantisce una buona risoluzione spaziale, dal momento che acquisisce “fette” sottili (2-3 mm). Negli ultimi anni si sono sviluppati sistemi di RM con maggiore intensità del campo magnetico (3T e più recentemente 7T); essi forniscono un rapporto segnale/rumore più elevato, una riduzione del tempo necessario per l’acquisizione dell’immagini e possibilità di eseguire sessioni di 1.0 mm. Consentono quindi una migliore localizzazione dell’adenoma ed un’eccezionale definizione delle componenti anatomiche, aspetto utile per individuare eventuali invasioni delle strutture circostanti da parte dell’adenoma. La RM 3T con mezzo di contrasto pertanto dovrebbe essere eseguita in quei pazienti con malattia di Cushing, nei quali la RM 1.5T è risultata negativa o poco chiara.<sup>72-74</sup>

Non è sempre possibile definire la natura di una lesione evidenziata alla risonanza specie se molto piccola, nella diagnosi differenziale bisogna infatti considerare un microadenoma ipofisario, ma anche un artefatto o una microcisti della tasca di Rathke<sup>12</sup>, è quindi fondamentale che, nell’esecuzione e nell’analisi della risonanza magnetica il radiologo sia molto competente.<sup>66</sup>

#### *Cateterismo bilaterale dei seni petrosi inferiori (BIPSS)*

Il campionamento bilaterale dei seni petrosi inferiori, BIPSS, è stato introdotto negli anni '80 ed è considerato il gold standard per la diagnosi differenziale tra le forme di Cushing ACTH-dipendente. Gruppi di esperti raccomandano di eseguire tale procedura mininvasiva in caso di test biochimici e radiologici discordanti o non conclusivi.<sup>66</sup> Il cateterismo si basa sul principio che, se la secrezione di ACTH è ipofisaria, la concentrazione di ACTH è maggiore nel sangue delle vene drenanti l’ipofisi rispetto a quella presente nel sangue delle vene periferiche<sup>12</sup>. Lo scopo di tale test è quindi confrontare i livelli di ACTH nei seni petrosi inferiori (IPSS), che

ricevono sangue direttamente dalla ghiandola pituitaria e che non sono contaminati da sangue proveniente da altre fonti con i livelli di corticotropina nei vasi periferici.<sup>75</sup> Un rapporto ACTH centrale/periferico (IPS:P)  $>2$  allo stato basale e/o  $>3$  dopo la somministrazione di CRH è coerente con diagnosi di CD.<sup>52</sup> Rapporti IPS/P più bassi suggeriscono invece la presenza di un tumore ectopico secernente ACTH, sebbene anche pazienti con malattia di Cushing, che è molto più frequente, possono raramente mostrare rapporti simili.<sup>6</sup>

Poiché la secrezione di ACTH da parte dell'adenoma ipofisario è intermittente, un numero significativo di pazienti con CD presenta un gradiente inferiore a 2, per aumentare la sensibilità del test è stata quindi introdotta la somministrazione periferica di CRH.<sup>15</sup> La sensibilità di BIPSS al basale varia dall'85% al 96,4% e quella dopo la stimolazione con CRH varia dall'88% al 97%.<sup>52</sup>

Nonostante l'alta sensibilità e specificità, si possono avere falsi positivi e falsi negativi; i primi per esempio si possono riscontrare in caso di tumori secernenti CRH che inducono un'iperplasia ipofisaria. I falsi negativi, circa il 10%<sup>76</sup>, invece possono essere conseguenti un drenaggio venoso anomalo, errori durante il posizionamento del catetere o bassi valori di picco di ACTH nel seno petroso, come nei casi di ipercortisolismo ciclico o ipercortisolismo lieve. Il BIPSS deve essere effettuato solo in fase attiva di malattia, ossia quando i livelli di cortisolo sono elevati e quindi in grado di inibire l'attività solo delle cellule corticotrope sane residue sensibili al feedback negativo esercitato dal cortisolo.<sup>24,60,77</sup>

Recentemente è stata proposta la misurazione di ACTH normalizzata per i valori di prolattina per verificare il corretto campionamento durante il BIPSS ed evitare falsi negativi<sup>78</sup>; inoltre una venografia dovrebbe essere eseguita prima di completare la procedura per valutare il corretto posizionamento del catetere<sup>38</sup>.

Il test è stato proposto anche per identificare la sede dell'adenoma in caso di CD, un gradiente di ACTH  $>1,4$  in uno dei due lati dell'ipofisi viene utilizzato come predittore della localizzazione del tumore; tale informazione ha però un'accuratezza diagnostica compresa tra il 48% e il 70%.<sup>52</sup> Il cateterismo è quindi meno affidabile rispetto alla risonanza magnetica e alla tomografia computerizzata nel predire la posizione dell'adenoma ipofisario.<sup>75</sup>

La desmopressina è un'interessante alternativa al CRH<sup>79</sup>, infatti a differenza del CRH che ha un elevato costo ed è difficile da reperire, la desmopressina è economica e disponibile. Il BIPSS con DDAVP presenta un'accuratezza diagnostica paragonabile a quella riportata per il BIPSS con CRH.<sup>3</sup>

Il cateterismo dei seni petrosi presenta diversi limiti: la sua disponibilità è limitata in molte aree e paesi, è costosa e richiede l'ospedalizzazione con aumento quindi del tempo necessario per raggiungere una diagnosi certa; inoltre il tasso di cateterizzazione corretto dipende dal livello di esperienza e competenza del team neuroradiologico, pertanto il cateterismo deve essere eseguito in centri specializzati<sup>60,66</sup>.

Wang et al., hanno condotto la prima meta-analisi volta a valutare il potere diagnostico di BIPSS nella diagnosi differenziale. I risultati ottenuti dalla meta-analisi, comprendente 23 studi e 1642 pazienti, hanno suggerito che il BIPSS ha una sensibilità del 94% e specificità del 98%<sup>76</sup>; pur essendo il gold standard, l'accuratezza diagnostica non è quindi del 100%.<sup>60</sup>

Il BIPSS, essendo una tecnica mininvasiva, può causare diversi effetti avversi. Le complicanze minore più comuni sono l'ematoma nel punto di accesso vascolare, reazioni vasovagali e fastidio transitorio all'orecchio<sup>75</sup>, mentre sono rari gli effetti avversi gravi (<1%), tra cui trombosi venosa profonda, embolia polmonare, danno cerebrale e paralisi dei nervi cranici.<sup>6,38</sup> Considerando che i pazienti con CS hanno una notevole fragilità vascolare e una coagulabilità del sangue aumentata e viste le possibili complicanze di tale procedura, l'eparina dovrebbe essere somministrata in prevenzione.<sup>75</sup>

In una review riguardante il ruolo di BIPSS nella diagnosi di CS, Zampetti et al., hanno suggerito che, secondo la loro esperienza, il BIPSS non dovrebbe essere eseguito in pazienti con risposta positiva al CRH test soprattutto se vi è anche risposta positiva al HDDST, indipendente dalla risonanza magnetica. Questa teoria è stata poi sottolineata da Losa et al., che hanno indicato il CRH test come test principale per decidere se considerare o meno il cateterismo.<sup>60</sup> Testa et al., hanno suggerito che una valutazione adeguata dei risultati ottenuti dai vari test di stimolo e di soppressione può aiutare a contenere la quantità di BIPSS nei pazienti con risonanza magnetica negativa senza modifiche in termini di recidiva.<sup>80</sup>

### *Imaging convenzionale (TC e RM)*

Viene raccomandata l'esecuzione di esami radiologici volti a identificare la sede ectopica di produzione di ACTH, solo dopo aver ottenuto un esito negativo al cateterismo dei seni petrosi. Tuttavia tale algoritmo non tiene conto dei progressi tecnologici dell'imaging<sup>66</sup>.

In caso di EAS, la localizzazione della sede è fondamentale perché permette di attuare un trattamento precoce e mirato per la neoplasia in questione, riducendo così la necessità di surrenectomie e migliorando la qualità di vita del soggetto. L'imaging convenzionale ad alta risoluzione è la tecnica preferita per identificare i casi di EAS, avendo la TC e la risonanza magnetica una sensibilità rispettivamente del 98% e 93%.<sup>52</sup>

L'imaging presenta una sensibilità che varia a seconda del tipo di tumore associato ad EAS; il polmone è la sede principale delle neoplasie responsabili della CS: mentre i tumori maligni aggressivi, come il carcinoma polmonare a piccole cellule, sono generalmente diagnosticati rapidamente, la localizzazione dei carcinoidi polmonari, i più frequenti, può essere complessa per via delle loro piccole dimensioni e della loro posizione abituale nel terzo medio del polmone, adiacente alla vascolarizzazione.<sup>14</sup> Anche i tumori del timo-mediastino sono difficili da diagnosticare a differenza invece delle neoplasie pancreatiche per le quali la RM e la PET sembrano essere altamente sensibili.<sup>81</sup> Quest'ultimo gruppo si presenta generalmente di grandi dimensioni e con metastasi già al momento della diagnosi.<sup>13</sup> Non sempre però è possibile scorgere la neoplasia, si parla di EAS occulto e in queste situazioni è utile fare un follow up nel tempo con imaging.<sup>14</sup>

La medicina nucleare può essere utilizzata quando non si riesce ad identificare la sede della CS tramite l'imaging convenzionale: nei pazienti con TC e RM negativa, un risultato positivo all'Octreoscan è stato descritto nel 67% dei casi, mentre un 60% era positivo alla PET con 18F-FDG, quindi quasi il 75% dei casi con imaging convenzionale negativo è stato poi diagnosticato grazie all'imaging nucleare.<sup>52</sup>

La scintigrafia con 111 In-pentetreotide (Octreoscan) viene utilizzata per ricercare la fonte tumorale dal momento che una percentuale significativa di tumori responsabili di CS è dotata di recettori della somatostatina<sup>82</sup>. L'ipercortisolismo può però sopprimere le concentrazioni dei recettori tumorali della somatostatina

di tipo 2, causando potenzialmente risultati falsi negativi: un Octreoscan negativo può diventare positivo dopo il controllo medico dell'ipercortisolismo.<sup>68</sup>

La PET 18F-FDG si rileva invece utile nei tumori carcinoidi G2 o G3 che hanno alto metabolismo e ridotta espressione dei recettori della somatostatina; può essere quindi utilizzata in quei casi con sia imaging convenzionale negativo che Octreoscan negativo<sup>14</sup>, tuttavia è incapace di differenziare in maniera affidabile piccoli tumori da lesioni infettive che si incontrano facilmente ad esempio nella regione polmonare.<sup>83</sup>

Viene impiegata nella ricerca della sede tumorale anche la 68Ga-SSTR PET/CT che utilizza il peptide mirato al recettore della somatostatina coniugato con 68Ga. In un recente studio multicentrico, Wannachalee et al.<sup>84</sup>, hanno riportato che 68Ga-SSTR PET/CT è sensibile nel rilevamento di neoplasie primarie, metastatiche e di tumori occulti alla tecniche di imaging convenzionale, con un impatto significativo nella diagnosi e nella gestione terapeutica della maggior parte dei pazienti. Tuttavia 68Ga-SSTR PET/CT presenta un numero considerevole di falsi positivi.<sup>85</sup> Ilias et al.<sup>86</sup>, sostengono che l'esecuzione di più di una tecnica di imaging possa identificare correttamente la lesione, evitando così falsi positivi che si possono ottenere invece con l'esecuzione di una sola tecnica di imaging<sup>83</sup>.

### **1.2.5 Trattamento**

Data l'elevata mortalità e morbilità dell'ipercortisolismo cronico, è necessario un trattamento tempestivo nei pazienti con CS. Gli obiettivi sono: correggere l'ipersecrezione di cortisolo, ripristinare la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, rimuovere il tumore responsabile della CS e possibilmente preservare le funzioni dell'adenoipofisi in caso di CD.<sup>16</sup>

La terapia dipende dall'eziologia responsabile di CS. Tuttavia la chirurgia rappresenta il trattamento di prima scelta per la maggior parte delle cause di ipercortisolismo.<sup>87</sup>

### **1.2.5.1 Chirurgia ipofisaria**

L'asportazione chirurgica per via trans-naso-sfenoidale (TSS) dell'adenoma ipofisario da parte di un neurochirurgo esperto rappresenta il trattamento definitivo di prima linea per la malattia di Cushing. Tuttavia circa il 15% dei pazienti non raggiunge la remissione dopo l'intervento chirurgico e circa il 2% dei pazienti si ripresenta annualmente dopo aver ottenuto la remissione chirurgica, portando ad un tasso cumulativo di recidiva che si avvicina al 35% nel follow-up a lungo termine.<sup>88</sup> Nella maggior parte dei casi, la malattia di Cushing è conseguente un adenoma, il trattamento indicato è quindi l'adenomectomia selettiva, che permette di risparmiare la restante ipofisi, senza quindi portare a deficit ipofisari aggiuntivi<sup>89</sup>; l'adenomectomia si può associare, per un periodo di durata variabile, ad un quadro di iposurrenalismo e pertanto nel post intervento è necessaria una terapia surrenalica sostitutiva. L'iposurrenalismo che è in genere è reversibile, è conseguente la soppressione delle cellule corticotrope sane residue da parte dell'ipercortisolismo cronico. Nei pazienti in cui non si riesca ad identificare un microadenoma distinto può essere effettuata un'ipofisectomia centrale oppure un'emipofisectomia, anche se sono associati a maggior complicanze e minor tasso di successo.<sup>90</sup> In mani esperte, la chirurgia trans-sfenoidale porta ad una remissione biochimica nel 70-90% dei pazienti con microadenoma e nel 50-60% dei soggetti con macroadenoma.<sup>91</sup> Alcuni fattori prognostici positivi sono: l'identificazione preoperatoria della lesione, la conferma istologica dell'adenoma ACTH secernente, riscontro di bassi livelli di cortisolo postoperatori e insufficienza corticosurrenalica.<sup>90</sup>

La TSS eseguita da neurochirurghi esperti si associa ad una mortalità peri operatoria molto bassa (che varia tra 0 e 1,5%) e bassi tassi di complicanze; quest'ultime comprendono perdita di liquido cerebrospinale, sanguinamento, epistassi, tromboembolismo venoso e infezioni. Può comparire diabete insipido che è in genere transitorio, iponatriemia e ipopituitarismo anteriore.<sup>92</sup>

Nel caso di fallimento o di recidiva, le opzioni di seconda linea includono un secondo intervento che è associato ad esiti meno favorevoli, radioterapia, terapia medica o bisurrenectomia.<sup>93</sup>

### **1.2.5.2 Radioterapia**

La radioterapia mirata all'adenoma residuo responsabile della persistenza dell'ipercortisolismo è un'opzione di trattamento di seconda linea. Poiché gli effetti della radioterapia possono richiedere mesi/anni per manifestarsi, è necessario assicurarsi in primo luogo un trattamento medico efficace che permetta di controllare l'ipercortisolismo. Le principali tecniche utilizzate sono la radioterapia frazionata convenzionale (CRT) e la radiochirurgia stereotassica (SRS). La CRT che prevede l'utilizzo di basse dosi ripetute nel tempo, è indicata in caso di tumori di grandi dimensioni, con estensione extra sellare e in caso di adenomi posti in vicinanza ai nervi ottici o al chiasma ottico;<sup>94</sup> la SRS focalizza un'elevata dose di radiazioni sull'adenoma, tuttavia la somministrazione di una singola dose elevata è più tossica, in particolare per le vie ottiche, pertanto viene utilizzata per piccoli adenomi posti in regione sellare e parasellare.<sup>93</sup> Un vantaggio della radiochirurgia è il fatto che la somministrazione di una singola dose elevata di radiazioni risulti biologicamente più efficace rispetto alla stessa dose frazionata.<sup>93,95</sup>

La complicanza più comune della radioterapia, soprattutto di CRT è l'ipopituitarismo. In una recente meta-analisi, il tasso di remissione di CD dopo CRT è stato visto essere simile a quello ottenuto con SRS (media 67,5 vs 65,85).<sup>94</sup>

### **1.2.5.3 Terapia medica**

La terapia medica si attua nei pazienti con condizioni cliniche precarie in preparazione alla chirurgia ipofisaria, in pazienti non operabili come trattamento di prima linea o in caso di recidiva o fallimento chirurgico come trattamento adiuvante; può essere richiesta anche nel lasso di tempo necessario per ottenere i risultati della radioterapia.<sup>94</sup>

La terapia medica viene utilizzata anche in caso di EAS; quando non si riesce ad identificare la neoplasia responsabile dell'ipercortisolismo, è necessario l'impiego di terapie mediche per trattarlo.

I farmaci attualmente disponibili sono classificati in base al sito d'azione e sono gli inibitori della steroidogenesi, i farmaci ad azione centrale e gli antagonisti dei recettori dei glucocorticoidi.<sup>91</sup>

I primi agendo sulla steroidogenesi impediscono la sintesi di cortisolo a livello surrenalico. Sono molto efficaci nel controllare l'ipercortisolismo, ma non curano la patologia sottostante e possono causare insufficienza surrenalica acuta, pertanto è necessario un attento follow up. Gli inibitori della steroidogenesi approvati dall'EMA per il trattamento di CS, sia CD che EAS, sono il ketoconazolo e il metirapone. Il primo, nato come antifungino, è il farmaco più utilizzato nella pratica clinica; si è dimostrato efficace nel trattamento l'ipercortisolismo associato sia al CD che all'EAS. Presenta però alcuni effetti avversi come epatotossicità, dispepsia, prurito e nel sesso maschile ipogonadismo.<sup>88</sup>

Il metirapone, altro inibitore della steroidogenesi che agisce inibendo l'enzima 11  $\beta$ -idrossilasi, è spesso utilizzato in prima linea per la sua capacità di abbassare prontamente i livelli di cortisolo.<sup>14</sup> Le possibili complicanze associate al farmaco sono acne e irsutismo (si tratta di effetti da iperandrogenismo che si verifica in seguito all'utilizzo del farmaco), ipertensione, edemi, nausea e disturbi gastrointestinali.<sup>87,88</sup> In alternativa si possono utilizzare il mitotane, l'etomidate e LCI699.<sup>96</sup>

Gli antagonisti del recettore dei glucocorticoidi, quale il mifepristone sono un'altra classe di farmaci utilizzata per trattare l'ipercortisolismo. Il mifepristone non permette il legame del cortisolo al suo recettore, ma al contempo non riduce i livelli di cortisolo plasmatico e urinario che possono rimanere stabilmente elevati o addirittura aumentare, pertanto la misurazione dei livelli di cortisolo urinario e/o plasmatico non possono essere utilizzati come elemento per valutare l'efficacia terapeutica.<sup>94</sup> Gli effetti avversi di tale farmaco sono: sintomi da ipocortisolismo, sintomi mineralcorticoidi ed effetti antiprogesterinici.<sup>87</sup>

Il mifepristone ha dimostrato, in piccole serie retrospettive, di essere efficace nel trattare i livelli di cortisolo anche nei pazienti con EAS.<sup>14</sup>

I farmaci ad azione centrale agiscono a livello dell'adenoma con l'obiettivo di ridurre la secrezione di ACTH. Gli agenti attualmente utilizzati includono la carbegolina, agonista selettivo di D2 (prescritta in off-label), il pasireotide e il pasireotide a rilascio prolungato, che sono analoghi della somatostatina.<sup>88</sup>

Il pasireotide lega con alta affinità i recettori della somatostatina di tipo 1,2,3 e 5, in particolare il tipo 5 che è quello più espresso negli adenomi corticotropi<sup>97</sup>; il

trattamento con pasireotide è l'unico trattamento medico disponibile che mira direttamente alla secrezione di ACTH e si è dimostrato efficace nel controllo biochimico dei livelli di cortisolo.<sup>96</sup>

I farmaci ad azione centrale vengono somministrati dal momento che la maggior parte degli adenomi corticotropi presenta i recettori della dopamina e della somatostatina e per il medesimo motivo possono essere utilizzati anche nei pazienti con EAS.<sup>14,88</sup> Gli effetti collaterali della carbegolina più frequenti sono nausea, astenia, vertigini; mentre quelli del pasireotide sono gli stessi presentati dagli altri analoghi della somatostatina con l'aggiunta di un rischio maggiore di iperglicemia.<sup>87,88,94</sup>

Per i pazienti con EAS con malattia non resecabile o disseminata, la terapia è guidata dall'istologia del tumore e dall'idoneità del paziente. Il carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) richiede un approccio aggressivo basato sulla chemioterapia e radioterapia a secondo dello stadio della malattia. Per i carcinoidi esiste una grande variabilità di trattamenti disponibili: analoghi della somatostatina, chemioterapia, PRRT (Peptide Receptor Radionuclide Therapy), everolimus e sunitinib e trattamenti specifici per le metastasi epatiche.<sup>14</sup>

#### **1.2.5.4 Surrenectomia bilaterale**

Si tratta di un trattamento definitivo il cui vantaggio principale è l'impareggiabile capacità di abbassare molto velocemente l'ipercortisolismo ed è usato sia nella CD che in caso di EAS. L'approccio laparoscopico si è affermato come valida alternativa al tradizionale intervento di laparotomia ed è associato ad un rischio di mortalità vicino allo zero, quando eseguito in centri specializzati.<sup>94</sup> Il principale svantaggio della surrenectomia bilaterale è la necessità, a causa dello stato di iposurrenalismo permanente che ne deriva, di una terapia sostitutiva con mineralcorticoidi e glucocorticoidi che se non adeguatamente assunta può portare ad un quadro di insufficienza surrenalica acuta; pertanto è necessario educare adeguatamente il paziente sulla terapia sostitutiva.<sup>94,98</sup> Nella malattia di Cushing la surrenectomia bilaterale può predisporre allo sviluppo della sindrome di Nelson.<sup>99</sup>



## 2. SCOPO DELLO STUDIO

La sindrome di Cushing (CS) è una condizione che deriva dall'esposizione prolungata ad eccessivi livelli di cortisolo circolante; è una patologia rara, ma potenzialmente pericolosa per la vita, specialmente se non tempestivamente diagnosticata e trattata, infatti l'ipercortisolismo cronico è responsabile di manifestazioni multisistemiche e complicanze a livello dell'apparato cardiovascolare, metabolico, muscolo-scheletrico e psichico.

Non si deve trattare solo l'eccesso di cortisolo, ma è fondamentale identificare la causa eziologica alla base, in quanto cause eziologiche diverse richiedono trattamenti differenti che permettono in ultima analisi la risoluzione dell'ipercortisolismo.

Con tale studio sono stati valutati i casi di malattia di Cushing e i casi di secrezione ectopica di ACTH (EAS), seguiti presso l'U.O.C. dell'Endocrinologia di Padova e di Ancona. Sono stati considerati il profilo ormonale alla presentazione, la risposta ai test di secondo livello, il quadro radiologico, il trattamento e l'outcome a lungo termine.

Lo scopo dello studio è quello di valutare se esiste una combinazione costituita da un test dinamico di secondo livello e una tecnica di imaging in grado di guidare la diagnosi differenziale tra le varie forme ACTH-dipendente, con l'obiettivo ultimo di ottenere una strategia diagnostica accurata e non invasiva.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 PAZIENTI

In questo studio retrospettivo abbiamo analizzato una popolazione costituita da 186 individui affetti da sindrome di Cushing ACTH-dipendente e afferente, tra il 1996 e il 2022, al reparto o agli ambulatori di due ospedali di terzo livello presenti in Italia: l'Unità Operativa di Endocrinologia dell'università di Padova (73 pazienti) e quella dell'ospedale Riuniti di Ancona (113 pazienti). Entrambi i centri hanno una notevole esperienza nella diagnosi e nel trattamento della sindrome di Cushing e utilizzano approcci diagnostici e terapeutici simili.

I dati clinici e biochimici dei pazienti, ricavati dai referti ambulatoriali e dalle lettere di dimissione di eventuali ricoveri, corrispondono all'esordio della malattia o sono relativi al follow up per quei pazienti in cui non si è ottenuto fin da subito la diagnosi.

187 pazienti sono stati inclusi nello studio: 140 donne (118 con CD, 22 con EAS) e 46 uomini (32 con CD e 14 con EAS), con rapporto donne: uomini pari a 3:1.

L'età media dei pazienti, al momento della diagnosi, è di 46,2 anni (età massima 83 anni, età minima 6 anni).

I pazienti inclusi nello studio sono pazienti che hanno ottenuto una diagnosi certa di sindrome di Cushing ACTH-dipendente.

La presenza di sintomi e segni clinici ha fatto sorgere il sospetto di un quadro di ipercortisolismo che è poi stato confermato da almeno due test di screening indicati dalle linee guida internazionali: incremento del cortisolo libero urinario delle 24 ore (UFC), mancata soppressione al test con basse dosi di desametasone e perdita del ritmo circadiano del cortisolo, documentato attraverso il dosaggio del cortisolo plasmatico delle ore 23.00 e attraverso la misurazione del cortisolo salivare notturno (LNSC).

La diagnosi di sindrome di Cushing ACTH-dipendente è stata confermata con valori >10ng/ml di ACTH.

La sede responsabile dell'ipersecrezione di ACTH e la conseguente diagnosi differenziale tra malattia di Cushing ed EAS, è stata poi confermata mediante l'esecuzione di tests ormonali dinamici (HDDST, CRH test e DDAVP test) e di esami radiologici, in particolare sono stati eseguiti RM ipofisaria con gadolinio/TC encefalo per valutare la presenza di un adenoma ipofisario, TC/RM collo-torace-addome completo e tecniche di imaging nucleare per identificare i casi di secrezione ectopica di ACTH.

Abbiamo utilizzato le medesime soglie utilizzate da Barbot et al. nel loro studio per valutare le risposte ai test di secondo livello; le risposte utilizzate per indicare un'origine ipofisaria sono state: una soppressione del cortisolo sierico >52,7% al test con 8 mg di desametasone, una risposta di ACTH >72,4% al test di stimolo con CRH e una risposta di ACTH >32,3% al DDAVP test. Il mancato raggiungimento di tali cut-off è stato invece considerato indicativo di secrezione ectopica di ACTH (EAS).<sup>54</sup>

Oltre ai tests dinamici di secondo livello, i pazienti sono stati sottoposti ad una RM ipofisaria con mezzo di contrasto per valutare la presenza di un eventuale adenoma.

A fronte di risultati discordanti tra i tests dinamici non invasivi e l'imaging, 42 pazienti sono stati sottoposti a cateterismo bilaterale dei seni petrosi (BIPSS).

I pazienti con un quadro clinico e biochimico indicativo di EAS sono stati sottoposti a tecniche radiologiche convenzionali e nucleari per evidenziare la sede responsabile della produzione di ACTH.

Sono stati infine raccolti i dati del follow up per valutare la persistenza di remissione o la presenza di recidiva.

Per quanto riguarda i dati clinici-anamnestici, oltre all'età e al sesso, abbiamo considerato il body mass index (BMI).

## **3.2 METODI**

### **3.2.1 VALUTAZIONE CLINICA GENERALE**

I dati clinici considerati, quali età, sesso, BMI sono stati raccolti retrospettivamente dalle lettere di dimissione dei ricoveri e dai referti ambulatoriali al momento della diagnosi o durante il follow up in quei pazienti che hanno richiesto valutazioni serrate per ottenere una diagnosi, soprattutto i casi di EAS.

Come età dei pazienti, è stata considerata quella che presentavano al momento della diagnosi della forma responsabile della sindrome di Cushing.

Il BMI è stato calcolato come rapporto tra il peso espresso in kg e il quadrato dell'altezza in metri: valori di BMI compresi tra 25 e 30 kg/m<sup>2</sup> sono indicativi di sovrappeso, mentre valori superiori a 30 kg/m<sup>2</sup> di obesità.

Il BMI è stato calcolato in 178 pazienti.

### **3.2.2 VALUTAZIONE DELL'ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE**

In tutti i pazienti ad eccezione di 9 soggetti con malattia di Cushing è stato dosato il cortisolo libero urinario delle 24 ore; il cortisolo plasmatico prima e dopo il test di soppressione con basse dosi di DST è stato dosato in 155 pazienti. In 113 soggetti è stato misurato il cortisolo salivare notturno (non è stato misurato in 16 pazienti della casistica di Padova e in 57 pazienti della casistica di Ancona), mentre il cortisolo plasmatico delle ore 23, altro indicatore di alterazione del ritmo circadiano del cortisolo e che richiede l'ospedalizzazione per almeno 48 ore, è stato misurato in 149 pazienti.

Il cortisolo libero urinario delle 24 ore (UFC) è stato dosato in 177 pazienti. Essi sono stati preventivamente e adeguatamente istruiti su come eseguire la raccolta urinaria delle 24 ore; la raccolta inizia a vescica vuota, scartando la prima urina e raccogliendo tutte le urine successive fino all'ultima, ossia la prima del mattino seguente. Inoltre durante la raccolta, il paziente non deve bere quantità eccessive di liquidi.

Il dosaggio del cortisolo urinario è avvenuto secondo metodiche standard.

Il cortisolo libero urinario delle 24 ore è stato poi espresso come rapporto tra il valore misurato e il limite superiore di norma (ULN).

Per valutare la perdita del ritmo circadiano è stato misurato il cortisolo plasmatico alle ore 23.00 e il cortisolo salivare notturno, alle ore 23.00-24.00.

Sia il cortisolo plasmatico che il cortisolo salivare sono stati misurati secondo metodi standard.

Per quanto riguarda il cortisolo salivare notturno, la raccolta della saliva avviene a domicilio in apposite provette (salivette); i campioni possono essere mantenuti in frigorifero a 4°C e portati entro 2-3 giorni al laboratorio.

I pazienti anche in questo caso, così come per la raccolta delle urine delle 24 ore, sono stati informati su come effettuare il test adeguatamente: il tampone deve essere tenuto in bocca per alcuni minuti in modo tale che si imbeva di saliva, passandolo per tutta la cavità buccale, senza però morderlo.

La raccolta deve essere eseguita la sera (23.00-24.00), prima di coricarsi in tranquillità. È bene eseguirla lontano dai pasti, almeno 30 minuti, e prima della pulizia dei denti per evitare la contaminazione del campione con sangue proveniente da abrasioni gengivali procurate dallo spazzolino. Sono inoltre da evitare nella giornata della raccolta l'attività tabagica e l'assunzione di liquirizia.

Per quanto riguarda il test di soppressione con 1 mg di desametasone, la risposta è stata valutata misurando il cortisolo plasmatico prima e dopo la somministrazione di DST. È considerata come risposta fisiologica una riduzione della concentrazione del cortisolo, dopo 1 mg di DST, a valori pari o inferiori a 50 nmol/l.

La misurazione dell'ACTH plasmatico, utile per distinguere le forme ACTH-dipendente da quelle ACTH-indipendente è stata eseguita secondo metodi standard. Poiché l'ACTH viene rapidamente degradato dalle proteasi plasmatiche, i campioni di sangue devono essere raccolti in provette refrigerate contenenti

EDTA, conservate nel ghiaccio e trasportate rapidamente al laboratorio per la centrifugazione.<sup>6</sup>

Per la diagnosi differenziale tra CD ed EAS i pazienti sono stati sottoposti a test dinamici di secondo livello: test di soppressione ad alte dosi di desametasone, test di stimolo con CRH e test di stimolo con DDAVP.

Nel test di stimolo con CRH sono stati misurati l'ACTH e il cortisolo plasmatico al basale e dopo la somministrazione di CRH.

Con misurazione basale si intende la misurazione di ACTH e cortisolo al tempo 0 oppure facendo la media dei due prelievi eseguiti rispettivamente ai minuti -15 e 0. Il paziente, a digiuno e rilassato, deve rimanere in posizione supina per tutta la procedura che prevede, dopo il prelievo basale, l'iniezione in bolo endovenoso di 100 µg di CRH sintetico e l'esecuzione di prelievi serrati per valutare la concentrazione plasmatica di ACTH e cortisolo post CRH, ai minuti 15, 30, 45, 60, 90 e 120.

Per il test di stimolo con DDAVP si esegue lo stesso procedimento: si misurano i livelli plasmatici basali di ACTH e cortisolo ed in seguito ad iniezione e.v. di desmopressina (DDAVP), ai minuti 15, 30, 45, 60, 90 e 120.

Per entrambi i tests di stimolo, è stata considerato come criterio di risposta l'incremento percentuale di ACTH, calcolato come  $(\text{livello di picco dopo stimolazione} - \text{livello basale prima della stimolazione}) / \text{livello basale prima della stimolazione} \times 100$ ; in particolare un incremento di ACTH >72,4% al CRH test e un incremento di ACTH > 32,3% al DDAVP test sono stati considerati indicativi di CD.

Per quanto riguarda il test di soppressione ad alte dosi di desametasone, la risposta è stata valutata attraverso il dosaggio del cortisolo plasmatico prima e dopo la somministrazione di 8 mg di glucocorticoidi e tramite il calcolo della diminuzione percentuale della cortisolemia  $(\text{nadir-concentrazione basale}) / \text{concentrazione basale} \times 100$ .

Il test prevede il dosaggio del cortisolo plasmatico al mattino e la somministrazione per via orale di 8 mg di desametasone alle ore 23.00 del

medesimo giorno; il mattino successivo viene misurata la cortisolemia, alle ore 08.00-09.00 e si comparano così i due valori di cortisolo plasmatico.

Alcuni soggetti con EAS, si sono presentati in condizioni generali molto scadenti e quindi non è stato eseguito nessun test di laboratorio di secondo livello volto alla diagnosi differenziale, ma solo tecniche di imaging per la ricerca, in tempi brevi, della sede del tumore.

Nei casi di valori discordanti ottenuti con i test dinamici di secondo livello e/o risonanza magnetica negativa è stato eseguito il cateterismo dei seni petrosi (BIPSS).

42 soggetti sono stati ricoverati presso il reparto di Endocrinologia dell'ospedale di Padova e dell'ospedale di Ancona, per eseguire il cateterismo dei seni petrosi. La procedura prevede, in anestesia locale, il cateterismo venoso retrogrado di entrambi i seni petrosi inferiori; in seguito, si eseguono prelievi contemporanei dai due seni petrosi e da una vena periferica, prima e dopo stimolo con CRH ovino o umano (1 µg/kg o 100 µg). L'ACTH viene misurato al basale e dopo stimolo ai minuti 3, 5, 10.

Sono stati utilizzati come criteri per evidenziare una forma ipofisaria e quindi escludere EAS, un gradiente di ACTH tra centro e periferia >2 in condizioni basali e un gradiente >3 dopo stimolo con CRH.

### **3.2.3 Diagnostica per immagini**

Tutti i pazienti ad eccezione di 12 pazienti con EAS sono stati sottoposti ad uno studio della regione sellare con risonanza magnetica con mezzo di contrasto. Un solo paziente con CD ha eseguito al posto della risonanza magnetica una TC encefalo per lo studio della regione sellare, mentre per 5 pazienti con CD non è stato possibile recuperare la RM ipofisaria basale.

La RM è stata effettuata presso la Neuroradiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e di Ancona. Fino al 2009 si è utilizzato la RM a 1 tesla, successivamente la RM a 1,5 tesla e a 3 tesla.

Per i pazienti che hanno eseguito la RM in altri sedi, le immagini della RM sono state valutate durante la riunione multidisciplinare da esperti radiologici, neurochirurghi ed endocrinologici. Il team che ha analizzato le immagini era a conoscenza anche dei risultati delle indagini biochimiche eseguite.

Le lesioni con diametro > di 10 mm documentate alla RM sono state definite come macroadenomi, mentre quelle con diametro <10 mm come microadenomi.

La maggior parte dei pazienti con CD ha eseguito inoltre una TC per valutare l'effetto dato dagli alti e persistenti livelli di ACTH a livello delle ghiandole surrenaliche.

La tomografia computerizzata (TC) o la risonanza magnetica (RM) total body sono state eseguite in quei pazienti che presentavano un quadro clinico e di laboratorio suggestivo di EAS, con l'obiettivo di evidenziare la sede di produzione ectopica.

Studi di imaging nucleare complementari sono stati condotti in modo non standardizzato per confermare e caratterizzare i tumori visibili alla TC o per identificare l'EAS in caso di TC negativa. Questi includevano: 111 In-pentetreotide (Octreoscan), PET 18F-FDG e 68Ga-SSTR PET/CT.

#### **3.2.4 FOLLOW UP**

Durante la fase di remissione di malattia, i pazienti hanno eseguito periodicamente esami biochimici (UFC, cortisolo salivare delle ore 23, test di soppressione con 1 mg e test dinamici) per valutare l'assetto ormonale e la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. Le risposte di tali esami sono stati visionate durante le visite ambulatoriali di controllo dove si è valutato anche il quadro clinico con l'obiettivo ultimo di poter individuare e trattare precocemente le eventuali recidiva.

### 3.3 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS); per i dati quantitativi considerati sono state calcolate la media e gli intervalli di riferimento, mentre per le variabili qualitative è stata valutata la frequenza relativa. Per il confronto tra le medie è stato eseguito un t-test.

Abbiamo calcolato la sensibilità e la specificità delle tecniche di imaging e delle combinazioni costituite da test dinamici e da tecniche di imaging.

Nel valutare la sensibilità e la specificità delle combinazioni, abbiamo definito concordi solo una determinata combinazione di risultati ottenuti, differente a seconda della popolazione esaminata e discordi tutte le altre possibili combinazioni.

Nella Malattia di Cushing abbiamo definito concordi i seguenti risultati:

- CRH test e RM ipofisaria: aumento di ACTH  $>72,4\%$  e presenza di un adenoma alla RM.
- DDAVP test e RM ipofisaria: aumento di ACTH  $>32,3\%$  e presenza di un adenoma alla RM.
- HDDST test e RM ipofisaria: soppressione del cortisolo sierico  $>52,7\%$  e presenza di un adenoma alla RM.

Nella secrezione ectopica di ACTH (EAS) abbiamo definito concordi i seguenti risultati:

- CRH test e TC total body: aumento di ACTH  $<72,4\%$  e presenza di una lesione alla TC.
- DDAVP test e TC total body: aumento di ACTH  $<32,3\%$  e presenza di una lesione alla TC.
- HDDST test e TC total body: soppressione del cortisolo  $<52,7\%$  e presenza di una lesione alla TC.

## 4. RISULTATI

### 4.1 VALUTAZIONE CLINICA GENERALE

Le caratteristiche cliniche dei pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente sono riportate nella tabella II.

	<b>Malattia di Cushing</b>	<b>EAS</b>	<b>P value</b>
<b>ETA' (anni)</b>	44 (41,8-46,4)	55,6 (50,6-60,8)	NS
<b>SESSO MASCHIO</b>	21%	39%	0,028
<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29,1 (28-30,1)	26,75 (25,2-28,3)	0,039

Tabella II. Caratteristiche cliniche dei pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente, suddivisi in base all'eziologia. (NS: non significativo)

L'età media al momento della diagnosi è stata 44 anni nei pazienti con CD e 55,6 anni nei pazienti con EAS. Fatta eccezione per l'età, ci sono state differenze significative delle variabili cliniche analizzate tra i due gruppi.

Per quanto riguarda la variabile "sesso maschile", la percentuale di uomini è risultata significativamente maggiore nel gruppo dei pazienti con EAS (39%), rispetto al gruppo dei soggetti con CD (21%).

La media dei valori del BMI di entrambe le forme ACTH-dipendente si è assestata fra 25 e 30 kg/m<sup>2</sup>, ossia la zona indicativa di sovrappeso; in particolare i pazienti con CD hanno presentato un BMI pari a 29,1, mentre i pazienti con EAS un BMI pari a 26,75 (p=0,039).

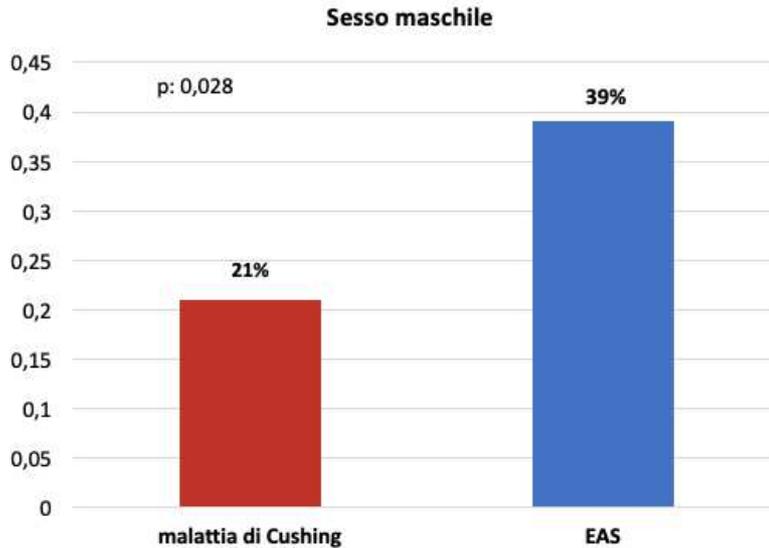


Figura 2. Distribuzione di frequenza della variabile “sesso maschile” fra i pazienti con malattia di Cushing ed EAS.

#### 4.2 VALUTAZIONE BASALE DELL’ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE

I parametri ormonali ottenuti dai test di primo livello utilizzati per evidenziare il quadro di ipercortisolismo tipico della sindrome di Cushing ACTH-dipendente sono riassunti in tabella III.

	Malattia di Cushing	EAS	P value
<b>ULN</b>	5,93 (4,34-8,11)	35,77 (17,59 -57,43)	<0,001
<b>Cortisolo salivare notturno (nmol/L)</b>	34,43 (27,5-43,5)	158,56 (64,5-313,5)	<0,001
<b>Cortisolo sierico notturno (nmol/L)</b>	578,99 (540-621)	1510,60 (1065-1992)	<0,001
<b>Cortisolo sierico post 1 mg DST (nmol/L)</b>	464 (412,6–523,9)	1039 (780,8-1394,5)	<0,001

Tabella III. Valutazione biochimica dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene dei pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente, suddivisi in base all’eziologia.

Il gruppo costituito dai pazienti con sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH ha presentato valori medi superiori ( $P < 0.001$ ) di cortisolo urinario delle 24 ore (espresso come rapporto tra il valore misurato e il valore superiore di norma, ULN), rispetto ai pazienti con CD.

Se si considerano i test volti a valutare il ritmo circadiano, si nota che i valori di cortisolo salivare notturno e di cortisolo sierico delle ore 23.00 sono stati significativamente maggiori nei pazienti con EAS rispetto a quelli riscontrati nei pazienti con malattia di Cushing, come raffigurato nelle figura 3 e 4.

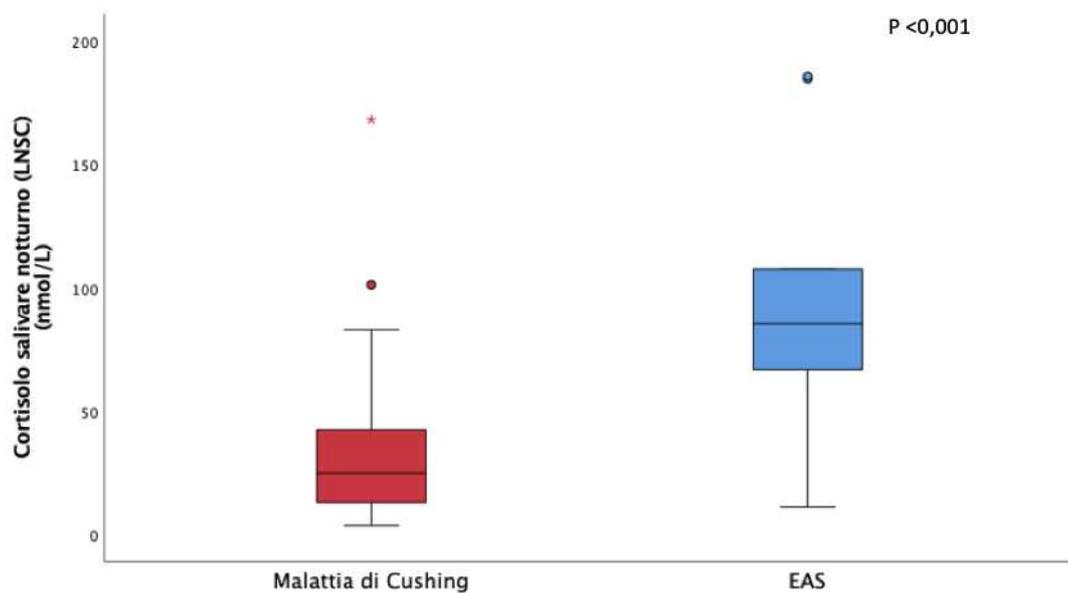


Figura 3. Rappresentazione box-plot della distribuzione dei valori di cortisolo salivare notturno nei due gruppi.

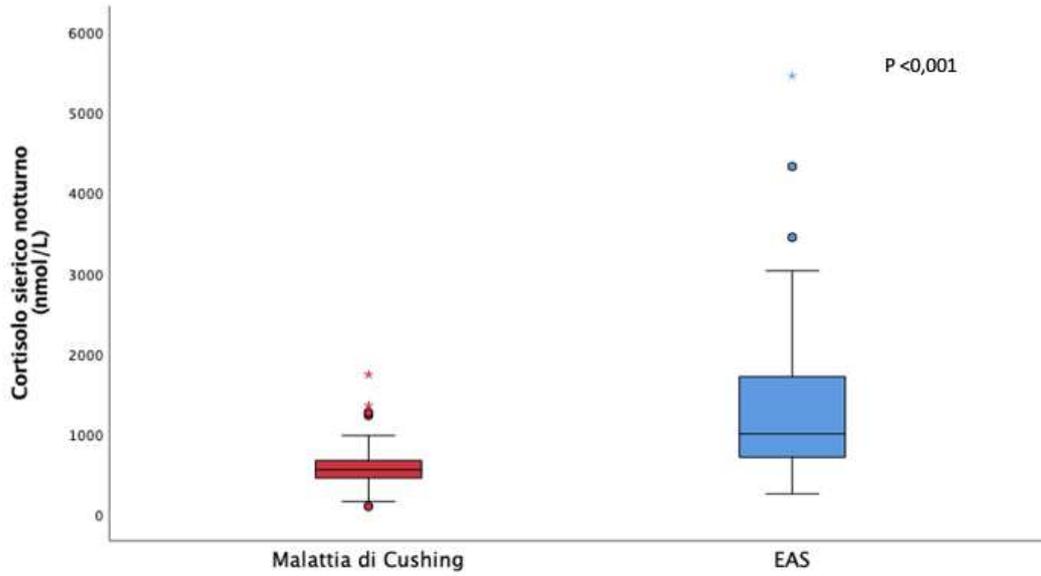


Figura 4. Rappresentazione box-plot della distribuzione dei valori di cortisolo sierico notturno nei due gruppi.

I pazienti con EAS hanno presentato una riduzione significativamente inferiore di cortisolo sierico dopo la somministrazione notturna di 1 mg di desametasone rispetto ai pazienti con malattia di Cushing, come rappresentato in figura 5.

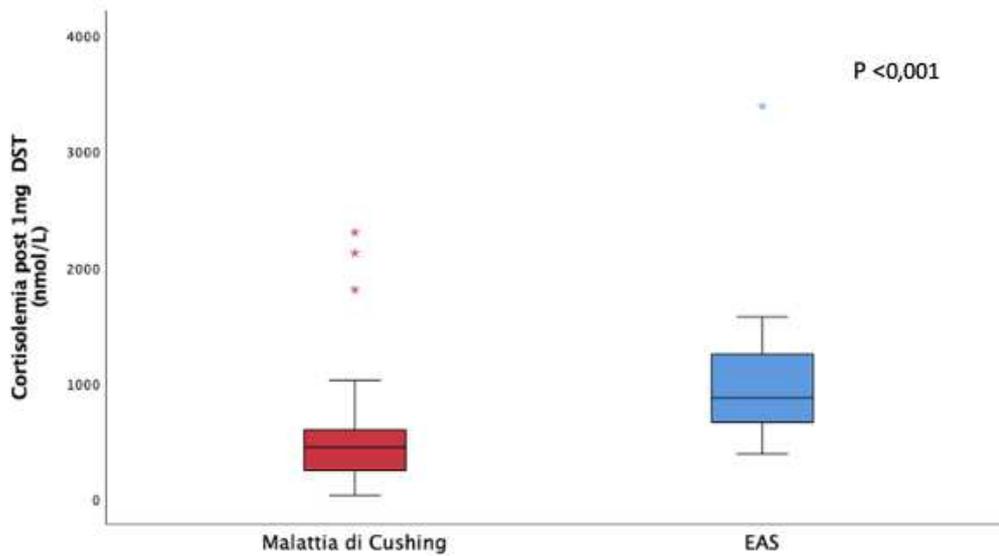


Figura 5. Rappresentazione box-plot della distribuzione dei valori di cortisolo sierico dopo la somministrazione notturna di 1 mg di desametasone nei due gruppi.

## **4.3 VALUTAZIONE DELLA COMBINAZIONE DI TEST DINAMICI E IMAGING**

### **4.3.1 CRH TEST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA**

Una risposta positiva al test di stimolo con CRH (aumento di ACTH >72,4%) combinata alla presenza di una lesione suggestiva di adenoma alla RM ipofisaria ha permesso di identificare correttamente un'origine ipofisaria nel 59% dei pazienti con malattia di Cushing. **(SE:59%)**

10 pazienti con malattia di Cushing non hanno eseguito entrambi i tests, in particolare 5 soggetti non hanno eseguito il test di stimolo con CRH, mentre 5 pazienti non hanno eseguito la risonanza magnetica ipofisaria.

57 pazienti hanno invece ottenuto risultati discordanti: 22 soggetti hanno ottenuto una risposta negativa al CRH test e una risonanza magnetica ipofisaria positiva, 27 soggetti hanno ottenuto risposta positiva al CRH test e una risonanza magnetica ipofisaria negativa, infine 8 pazienti hanno mostrato sia una risposta negativa al CRH test, sia una RM ipofisaria negativa.

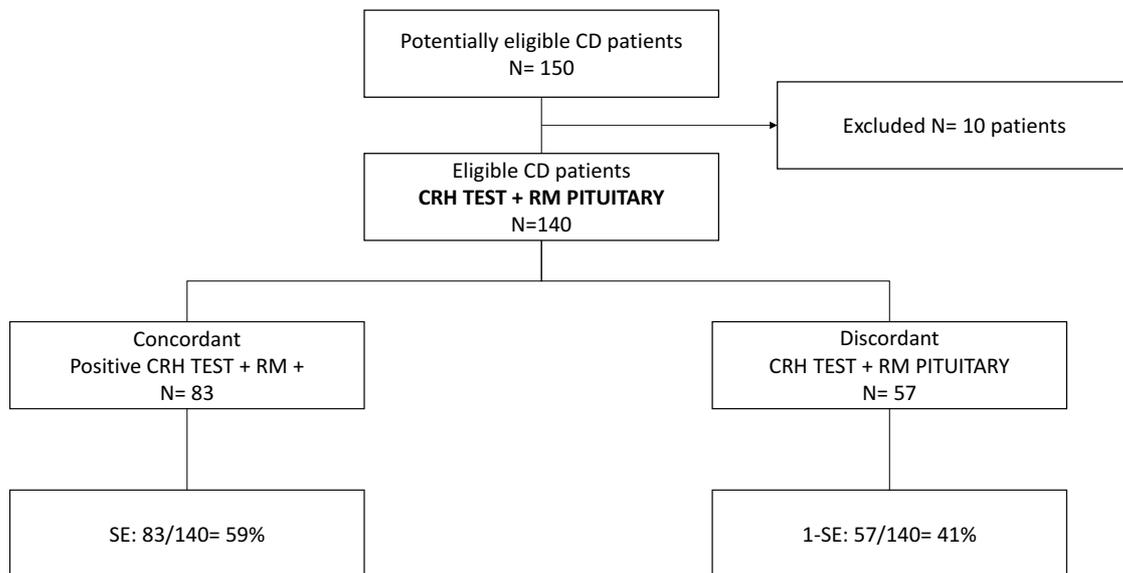


Figura 6. Grafico riguardante la combinazione del CRH test + risonanza magnetica ipofisaria nei pazienti con malattia di Cushing. RM + = presenza di un adenoma alla RM, positive CRH TEST = aumento di ACTH >72,4% al CRH test, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di un adenoma alla RM + aumento di ACTH >72,4% al CRH test.

### 4.3.2 CRH TEST E TC TOTAL BODY

Una risposta negativa al test di stimolo con CRH (aumento di ACTH <72,4%) combinata alla presenza di una lesione, alla TC total body, suggestiva di tumore responsabile della secrezione di ACTH ha permesso di identificare correttamente una secrezione ectopica di ACTH nel 66% dei casi. **(SP:66%)**

7 pazienti non hanno eseguito la combinazione CRH test e TC total body, in particolare 2 pazienti non hanno eseguito la TC total body e 5 pazienti non hanno effettuato il test di stimolo con CRH.

10 pazienti hanno ottenuti risultati discordanti, in particolare 8 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa al CRH test e una TC total body negativa, 1 paziente ha ottenuto una risposta positiva al CRH test e una TC total body positiva, infine 1 paziente ha ottenuto una risposta positiva al CRH test e una TC total body negativa.

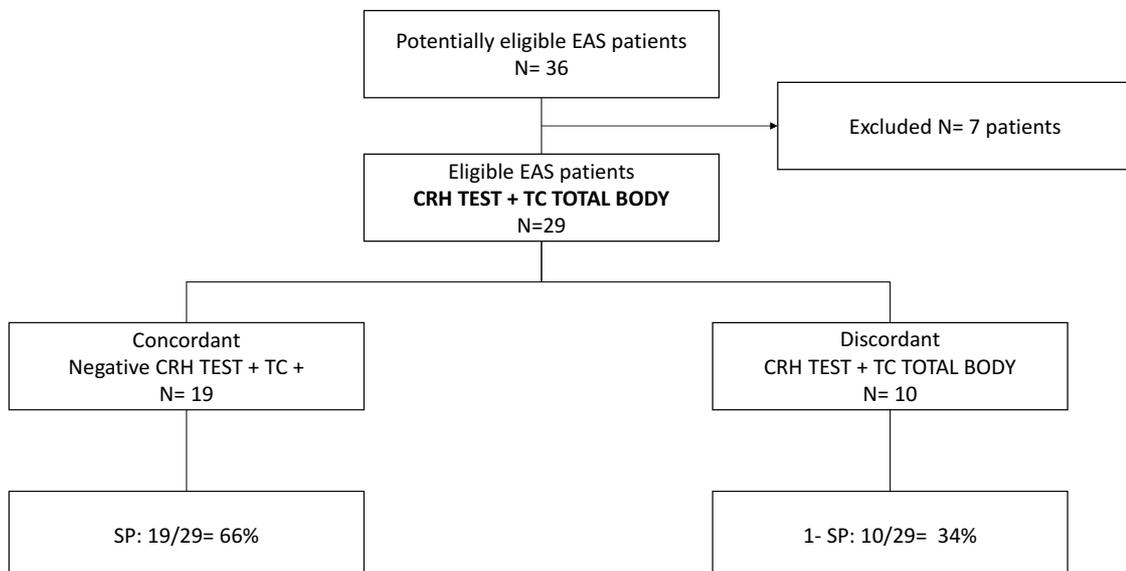


Figura 7. Grafico riguardante la combinazione del CRH test e della TC total body nei pazienti con EAS. TC + = presenza di un tumore ACTH secernente alla TC total body, negative CRH TEST = aumento di ACTH <72,4% al CRH test, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di una lesione alla TC + aumento di ACTH <72,4% al CRH test.

### 4.3.3 DDAVP TEST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA

Una risposta positiva al test di stimolo con desmopressina (aumento di ACTH >32,3%) combinata alla presenza di una lesione suggestiva di adenoma alla RM ipofisaria ha permesso di identificare correttamente un origine ipofisaria nel 60% dei pazienti con malattia di Cushing. **(SE:60%)**

12 pazienti non hanno eseguito entrambi i tests, in particolare 5 pazienti non si sono sottoposti alla RM ipofisaria, mentre 7 soggetti non hanno eseguito il test di stimolo con desmopressina.

55 soggetti hanno ottenuto risultati discordanti: 19 soggetti hanno ottenuto una risposta negativa al DDAVP test e una RM ipofisaria positiva, 30 soggetti hanno presentato una risposta positiva al DDAVP test e una RM ipofisaria negativa, infine 6 soggetti hanno ottenuto una risposta negativa sia al DDAVP test che alla RM ipofisaria.

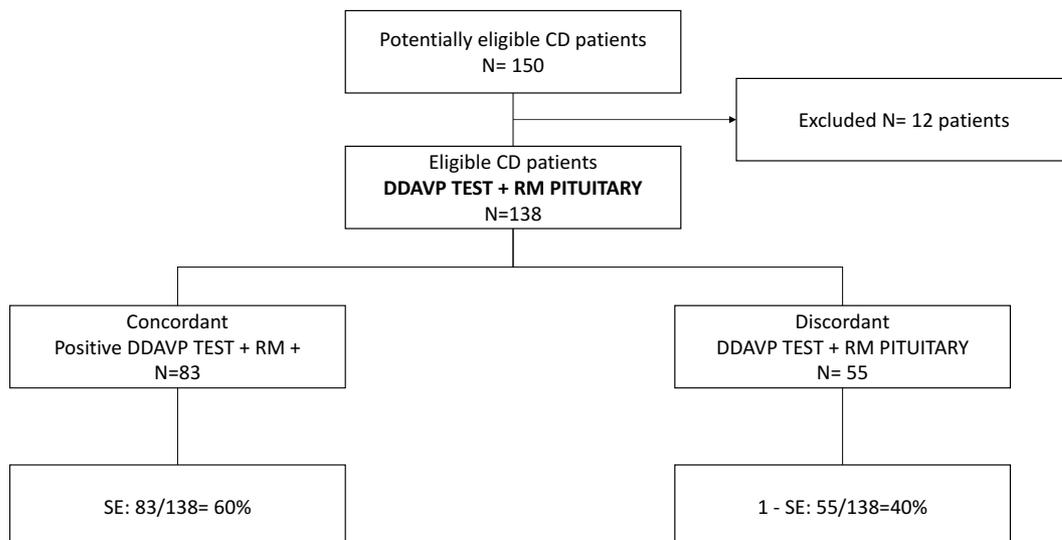


Figura 8. Grafico riguardante la combinazione del DDAVP test e della risonanza magnetica ipofisaria nei pazienti con malattia di Cushing. RM + = presenza di un adenoma alla RM, positive DDAVP TEST = aumento di ACTH >32,3% al DDAVP test, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di un adenoma alla RM + aumento di ACTH > 32,3% al DDAVP test.

#### 4.3.4 DDAVP TEST E TC TOTAL BODY

Una risposta negativa al test di stimolo con desmopressina (aumento di ACTH <32,3%) combinata alla presenza di una lesione, alla TC total body, suggestiva di tumore ectopico secernente ACTH ha permesso di identificare correttamente una secrezione ectopica di ACTH nel 30% dei casi. **(SP:30%)**

13 pazienti non hanno eseguito entrambi i tests, in particolare 11 pazienti non hanno eseguito il test di stimolo con DDAVP, 1 paziente non ha eseguito la TC total body e infine 1 paziente non ha eseguito né il test di stimolo con desmopressina né la TC total body.

16 pazienti hanno ottenuto risultati discordanti: 7 soggetti hanno ottenuto una risposta positiva al DDAVP test e una TC total body positiva, 6 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa al DDAVP test e una TC total body negativa, infine 3 soggetti hanno ottenuto una risposta positiva al DDAVP test e una TC total body negativa.

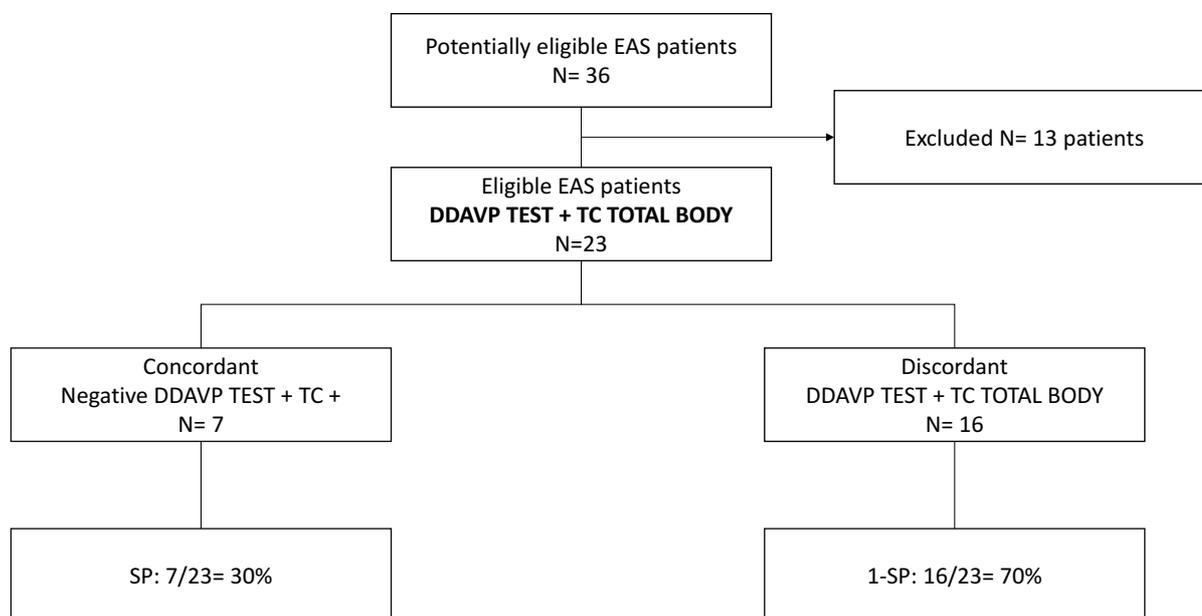


Figura 9. Grafico riguardante la combinazione del DDAVP test e della TC total body nei pazienti con EAS. TC + = presenza di un tumore secernente ACTH alla TC total body, negative DDAVP TEST = aumento di ACTH <32,3% al DDAVP test, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di una lesione alla TC + aumento di ACTH <32,3% al DDAVP test.

#### **4.3.5 HDDST E RISONANZA MAGNETICA IPOFISARIA**

Una risposta positiva al test di soppressione con desametasone ad alte dosi (soppressione del cortisolo sierico >52,7%) combinata alla presenza di una lesione suggestiva di adenoma alla RM ipofisaria ha permesso di identificare correttamente l'origine ipofisaria nel 64% dei pazienti con malattia di Cushing. **(SE: 64%)**

16 pazienti non hanno eseguito entrambi i tests, in particolare 4 pazienti non hanno eseguito la RM ipofisaria, 11 pazienti non hanno effettuato il test di soppressione con desametasone ad alte dosi e 1 paziente non ha eseguito né l'HDDST né la risonanza magnetica ipofisaria.

48 pazienti hanno ottenuto risultati discordanti: 13 soggetti hanno ottenuto una risposta negativa al test di soppressione con DST e una RM ipofisaria positiva, 33 soggetti hanno ottenuto una risposta positiva al test di soppressione e una RM ipofisaria negativa, 2 pazienti hanno presentato sia una risposta negativa al test di soppressione che una RM ipofisaria negativa.

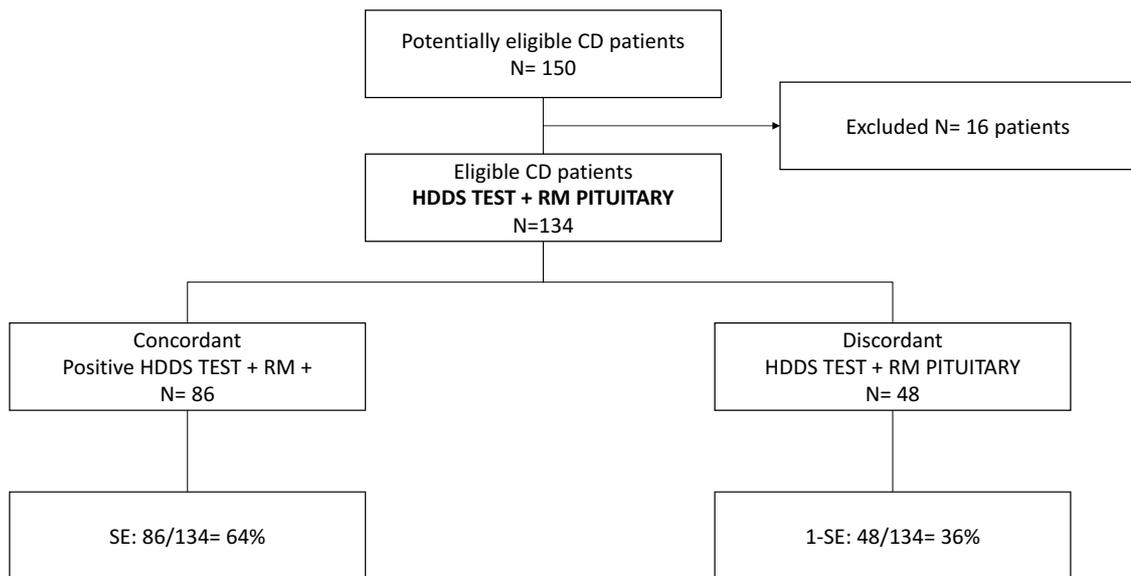


Figura 10. Grafico riguardante la combinazione del HDDST e della risonanza magnetica ipofisaria nei pazienti con malattia di Cushing. RM + = presenza di adenoma alla RM, positive HDDS TEST = soppressione del cortisolo sierico >52,7% all'HDDST, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di un adenoma alla RM + soppressione del cortisolo sierico >52,7% all'HDDST.

#### 4.3.6 HDDST E TC TOTAL BODY

Una risposta negativa al test di soppressione con desametasone ad alte dosi (soppressione del cortisolo sierico  $<52,7\%$ ) combinata alla presenza di una lesione, alla TC total body, suggestiva di tumore responsabile della secrezione di ACTH ha permesso di identificare correttamente una secrezione ectopica di ACTH nel 44% dei casi. **(SP:44%)**

9 pazienti non hanno eseguito entrambi i tests, in particolare 7 pazienti non hanno eseguito il test di soppressione con DST, mentre 2 pazienti non si sono sottoposti alla TC total body.

15 pazienti hanno ottenuto risultati discordanti: 6 soggetti hanno ottenuto una risposta positiva al test di soppressione e una TC total body positiva, mentre 9 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa al test di soppressione e una TC total body negativa.

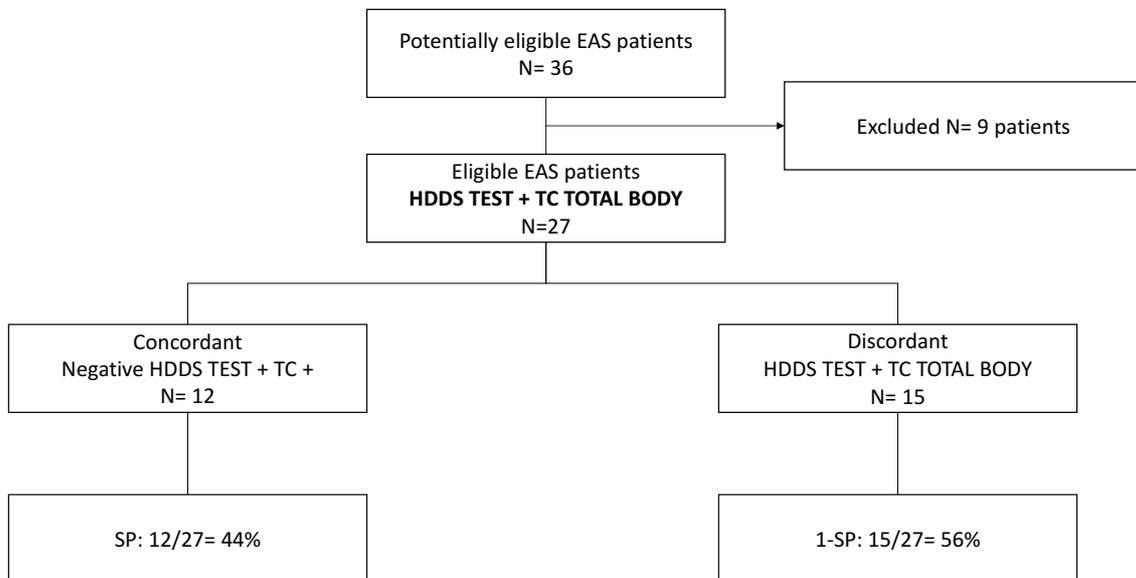


Figura 11. Grafico riguardante la combinazione del HDDST e della TC total body nei pazienti con EAS. TC + = presenza di un tumore secernente ACTH alla TC total body, negative HDDS TEST = soppressione del cortisolo sierico  $<52,7\%$  all'HDDST, Discordant = tutte le combinazioni diverse da presenza di una lesione alla TC + soppressione di cortisolo sierico  $<52,7\%$  all'HDDS test.

## **4.4 VALUTAZIONE DEI TEST DINAMICI NEI PAZIENTI CON IMAGING POSITIVO**

### **Malattia di Cushing**

La sensibilità e la specificità della risonanza magnetica ipofisaria sono rispettivamente 75% e 66%.

In 145 pazienti con malattia di Cushing è stata eseguita una RM con mezzo di contrasto; in 109 pazienti la risonanza magnetica ha riscontrato una lesione compatibile con un adenoma ipofisario (SE:75%).

Tra i 36 pazienti con EAS, 24 soggetti hanno eseguito la risonanza magnetica ipofisaria. In 8 soggetti si è evidenziata la presenza di un adenoma, in tutti si è trattato di un microadenoma.

Nei 109 pazienti con risonanza magnetica positiva, abbiamo valutato le risposte del test di stimolo con CRH e del test di soppressione con desametasone ad alte dosi.

*CRH test*

Dei 109 pazienti con RM ipofisaria positiva, 105 pazienti hanno eseguito il test di stimolo con CRH. Di questi, 83 pazienti hanno ottenuto una risposta positiva (aumento di ACTH >72,4%), mentre 22 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa (aumento di ACTH <72,4%). 4 soggetti non hanno eseguito il CRH test.

Una risposta positiva al CRH test in un paziente con RM ipofisaria positiva ha identificato correttamente il 76% dei pazienti con CD. **(SE: 76%)**

Considerando gli 83 pazienti con risposta positiva al test di stimolo con CRH, 11 soggetti erano di sesso maschile (13%), mentre 72 di sesso femminile (87%).

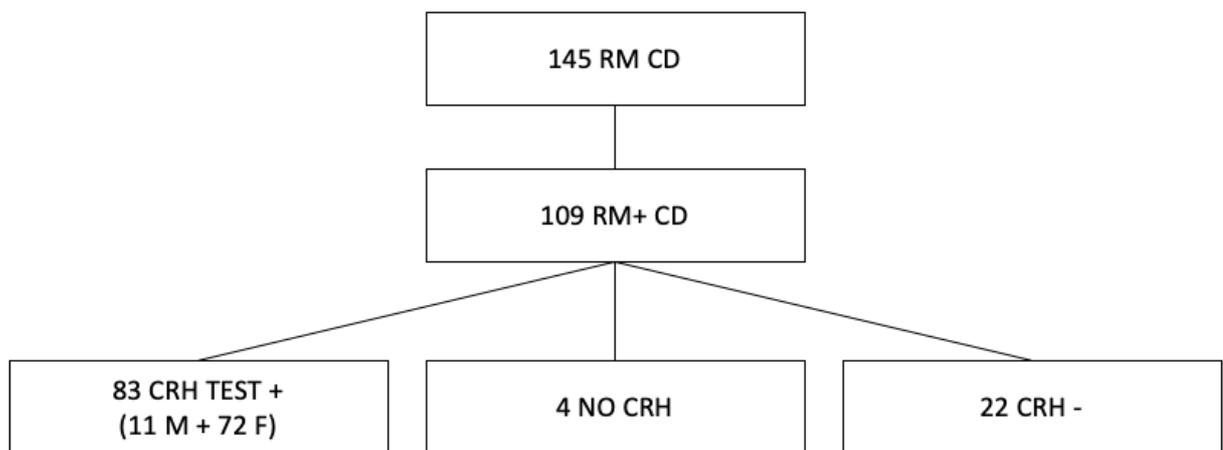


Figura 12. Grafico rappresentante l'esito del CRH test nei pazienti con malattia di Cushing e con risonanza magnetica ipofisaria positiva. Suddivisione per la variabile sesso dei pazienti con risposta positiva al CRH test.

*Test di soppressione con desametasone ad alte dosi.*

Tra i 109 pazienti con RM ipofisaria positiva, 98 individui hanno eseguito il test di soppressione con desametasone ad alte dosi. Di questi, 85 pazienti hanno ottenuto una risposta positiva (soppressione del cortisolo sierico  $>52,7\%$ ), mentre 13 pazienti hanno presentato una risposta negativa (soppressione del cortisolo sierico  $<52,7\%$ ). 11 pazienti con risonanza magnetica positiva non hanno invece eseguito l'HDDST.

Una risposta positiva all'HDDST in un paziente con RM ipofisaria positiva ha identificato correttamente il 78% dei pazienti con CD. **(SE: 78%)**

Tra gli 85 pazienti con risposta positiva al test di soppressione con desametasone ad alte dosi, 10 erano di sesso maschile (12%) mentre 75 di sesso femminile (88%).

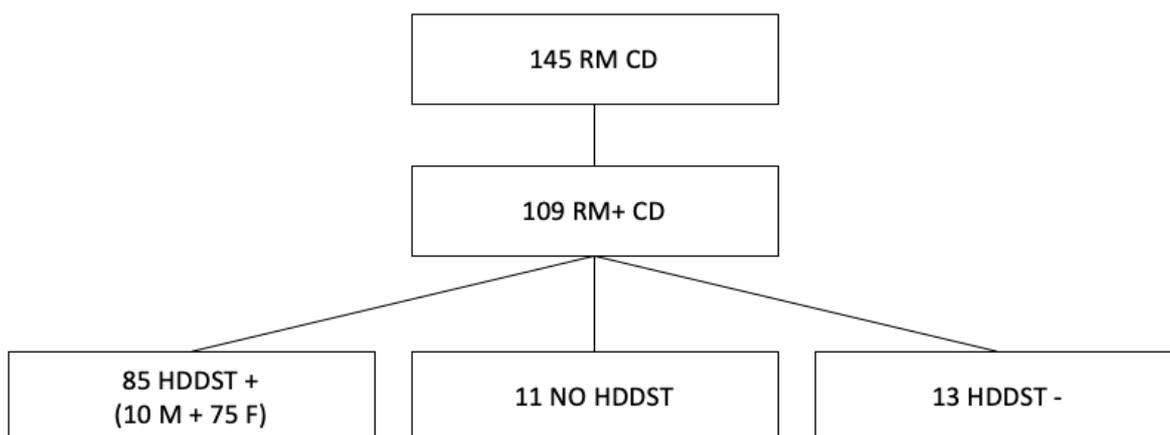


Figura 13. Grafico rappresentante l'esito dell'HDDST nei pazienti con malattia di Cushing e con risonanza magnetica ipofisaria positiva. Suddivisione per la variabile sesso dei pazienti con risposta positiva all'HDDST.

### **Secrezione ectopica di ACTH (EAS)**

La sensibilità e la specificità della TC total body sono rispettivamente 67% e 91%. 33 pazienti con EAS si sono sottoposti alla TC total body; tramite l'imaging convenzionale sono stati identificati (e poi confermati all'imaging nucleare) 17 pazienti al momento della diagnosi, che sono quindi stati definiti EAS overt e 5 soggetti durante il follow up, che sono stati chiamati EAS covert. In 14 soggetti l'imaging convenzionale e nucleare non ha permesso di identificare la sede né alla diagnosi né durante il follow up, si parla in questi casi di EAS occult. Quindi in 22 pazienti la TC total body ha evidenziato la presenza di una lesione compatibile con un tumore ectopico secernente ACTH (SE 67%).

109 pazienti con CD hanno eseguito la TC total body, in 9 pazienti essa ha identificato delle lesioni sospette, in particolare in 2 pazienti è stata riscontrata una lesione sospetta in sede polmonare, in 2 a livello del pancreas e in 1 paziente a livello retroperitoneale; in 2 donne si sono evidenziati dei noduli in sede mammaria, mentre in 1 in sede uterina, infine in 1 paziente si sono riscontrate lesioni sia a livello polmonare che in sede pancreatica (SP:91%).

Nei 22 pazienti con TC positiva, abbiamo valutato l'esito del test di stimolo con CRH e del test di soppressione con desametasone ad alte dosi.

*CRH test*

Dei 22 pazienti con TC total body positiva, 20 soggetti hanno eseguito il test di stimolo con CRH. Di questi, 19 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa (aumento di ACTH <72,4%), mentre 1 pazienti ha ottenuto una risposta positiva.

2 pazienti con TC total body positiva non hanno eseguito il CRH test.

Una risposta negativa al CRH test in un paziente con TC total body positiva ha identificato correttamente l'86% dei pazienti con EAS. **(SP: 86%)**

Tra i pazienti con risposta negativa al CRH test, 6 erano di sesso maschile (32%) mentre 13 erano di sesso femminile (68%).

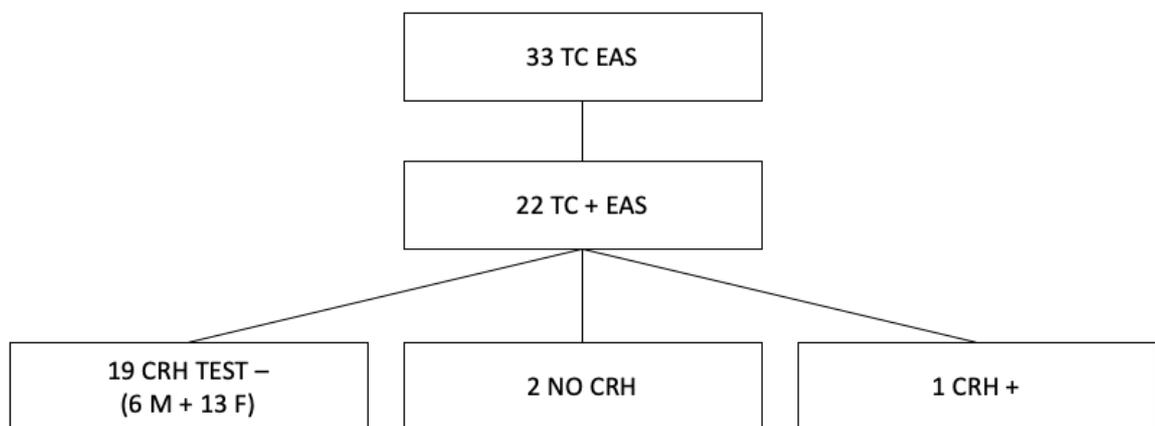


Figura 14. Grafico rappresentante l'esito del CRH test nei pazienti con EAS e TC total body positiva. Suddivisione in base al sesso dei pazienti con risposta negativa al CRH test.

*Test di soppressione con desametasone ad alte dosi*

Dei 22 soggetti con TC positiva, 18 pazienti hanno eseguito il test di soppressione con DST ad alte dosi. Di questi, 12 pazienti hanno ottenuto una risposta negativa (soppressione del cortisolo sierico  $<52,7\%$ ), mentre 6 pazienti hanno ottenuto una risposta positiva. 4 pazienti non hanno invece eseguito l'HDDST.

Una risposta negativa al test di soppressione con DST ad alte dosi in un paziente con TC total body positiva ha identificato correttamente il 55% dei pazienti con EAS. **(SP: 55%)**

Considerando i pazienti con risposta negativa al test con desametasone ad alte dosi, 4 pazienti erano di sesso maschile (33%), mentre 8 di sesso femminile (67%).

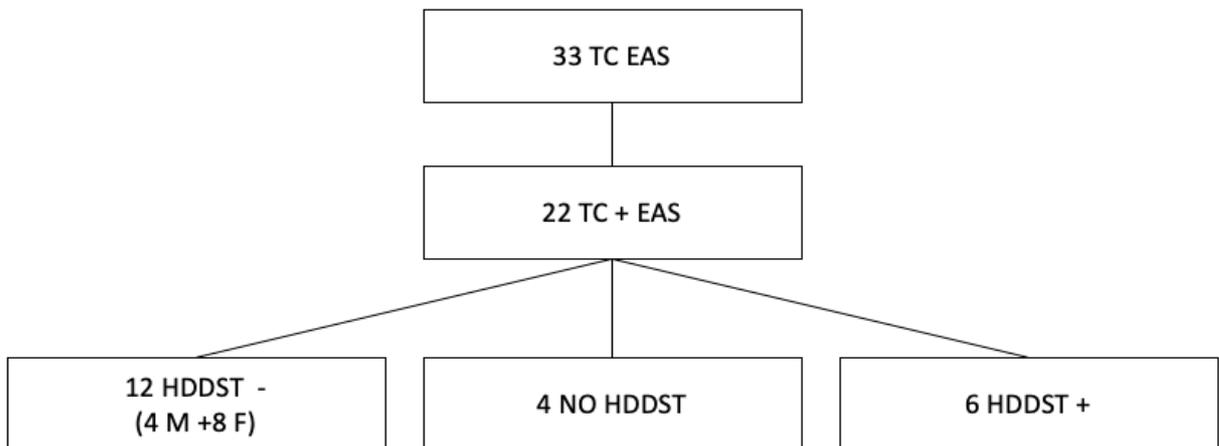


Figura 15. Grafico rappresentante l'esito del HDDST nei pazienti con EAS e TC total body positiva. Suddivisione per la variabile sesso dei pazienti con risposta negativa all'HDDST.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La capacità e la tempestività nell'identificare l'ipercortisolismo tipico della sindrome di Cushing e nel fare diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente è essenziale per poter offrire ai pazienti un trattamento adeguato che permetta di ridurre così la notevole morbilità e mortalità che tale sindrome comporta.

La malattia di Cushing e la sindrome di Cushing conseguente una secrezione ectopica di ACTH presentano un quadro clinico al momento della diagnosi spesso sovrapponibile<sup>54</sup> e per poter differenziarle sono richiesti diversi esami biochimici, tecniche di imaging convenzionale e nucleare e nei casi più complessi, è necessario ricorrere al cateterismo dei seni petrosi, una tecnica radiologica interventistica mininvasiva.

Sebbene l'utilità dei test di stimolo e di soppressione sia ampiamente accettata, il loro ruolo in presenza di un adenoma evidenziato alla risonanza magnetica<sup>60</sup> o di una lesione riscontrata alla TC total body, compatibile con un tumore non ipofisario secernente ACTH, ad oggi, è ancora oggetto di dibattito.

In letteratura sono presenti diverse proposte di algoritmi diagnostici e molte opinioni al riguardo.

Abbiamo valutato con questo studio, condotto su una ampia casistica di pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente, il percorso diagnostico proprio della sindrome, focalizzandoci in particolar modo sugli esami necessari per fare diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente, ossia i test dinamici di secondo livello (HDDST, CRH test, DDAVP test) e le tecniche radiologiche (RM ipofisaria e TC total body).

La malattia di Cushing è la forma ACTH-dipendente più frequente, aspetto riscontrato anche nella nostra casistica, infatti l'80,7% dei casi ha presentato un adenoma ipofisario alla base della sindrome.

I casi di secrezione ectopica di ACTH sono responsabili di una minoranza dei casi di sindrome di Cushing ACTH-dipendente. La percentuale osservata all'interno

della nostra casistica (19,3%) è comparabile a quella presente in letteratura che varia tra il 15% al 30%.<sup>2,45</sup>

Dal punto di vista epidemiologico, il sesso predominante nella nostra casistica è stato il sesso femminile, elemento che non sorprende dal momento che la malattia di Cushing è la forma più frequente e si manifesta con maggior incidenza proprio nel sesso femminile. Considerando il sesso maschile, la percentuale di maschi è risultata significativamente maggiore nel gruppo con EAS rispetto a quello con malattia di Cushing (21% vs 39%), con conseguente riduzione del rapporto femmine:maschi nel caso di EAS; inoltre i pazienti con EAS si sono presentati al momento della diagnosi più vecchi, anche se non significativamente, dei pazienti con CD.

La minor predilezione per il sesso femminile e l'età al momento della diagnosi più elevata sono caratteristiche dei pazienti con EAS descritte anche in letteratura.<sup>14,15</sup>

Il quadro ormonale al momento della diagnosi ha mostrato differenze significative tra i due gruppi; i pazienti con sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH infatti hanno presentato alla diagnosi una malattia più severa, con livelli significativamente più elevati di cortisolo urinario delle 24 ore (espresso come rapporto tra il valore misurato e il valore superiore di norma, ULN), di cortisolo salivare notturno (LNSC) e di cortisolo sierico notturno rispetto ai pazienti con malattia di Cushing; inoltre anche la soppressione del cortisolo sierico dopo la somministrazione notturna di 1 mg di DST è stata significativamente inferiore nei pazienti con EAS rispetto a ai pazienti con CD.

Tuttavia i test di primo livello implicati, nonostante possano orientare verso una specifica eziologia, non sono sufficienti per differenziare i casi di CD dai casi di EAS. Pertanto sono necessari ulteriori test diagnostici, nessuno dei quali però preso singolarmente è in grado di differenziare correttamente tutti i soggetti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente; il gold standard è il cateterismo dei seni petrosi e pertanto si potrebbe pensare di applicarlo in tutti i pazienti, una volta evidenziato il quadro di ipercortisolismo; tuttavia il cateterismo è una procedura radiologica mininvasiva che presenta numerosi limiti, come il costo elevato, la

necessità di ospedalizzazione e che questa avvenga in centri di riferimento dal momento che per un risultato idoneo è richiesto un team radiologico esperto; al contempo essendo una metodica invasiva, vi è rischio di effetti avversi, solitamente si tratta di effetti avversi lievi e raramente (<1%) si possono verificare complicanze gravi<sup>60</sup>.

Inoltre pur rappresentando il gold standard per la diagnosi differenziale, esso può determinare falsi positivi e falsi negativi.<sup>100</sup> Attualmente gli esperti ne indicano l'utilizzo in caso di RM ipofisaria negativa o inconcludente (lesione <6mm) o risultati discordanti tra gli esami di secondo livello.<sup>6,66</sup>

Il processo diagnostico completo è costoso, richiede del tempo e non sempre è sicuro per il paziente: gli esami di secondo livello (CRH test, DDAVP test, HDDST) così come il cateterismo dei seni petrosi necessitano, per essere diagnostici, di una fase di ipercortisolismo attivo; pertanto in quei pazienti aventi un quadro clinico molto severo, la necessità di eseguire i vari esami per la diagnosi differenziale ritarda la possibilità di trattamento.

I test dinamici di secondo livello presentano alcuni limiti, innanzitutto è impossibile stabilire criteri biochimici che forniscono una specificità completa per la differenziazione tra CD ed EAS, infatti alcuni tumori ectopici possono mostrare tutte le caratteristiche del fenotipo corticotropo e rispondere ai test dinamici proprio come un adenoma ipofisario, pertanto per migliorare l'accuratezza diagnostica vi è la necessità di associare ai test biochimici le tecniche di imaging.<sup>66</sup> Inoltre la combinazione di vari esami dinamici di secondo livello non si associa necessariamente ad una maggiore accuratezza diagnostica, infatti la combinazione dell'HDDST e del CRH test ha identificato correttamente un numero inferiore di pazienti con malattia di Cushing rispetto a quelli identificati eseguendo solo il CRH test.<sup>53</sup>

Il nostro studio sostiene che un processo diagnostico basato sull'attuazione di tecniche di imaging, RM ipofisaria e TC total body, seguita dall'esecuzione di un solo esame di secondo livello, il test di stimolo con CRH, rappresenta un approccio

non invasivo, accurato e rapido per ottenere una diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente nella maggior parte dei casi.

Nel nostro studio il cateterismo è stato riservato solo a quei pazienti che hanno ottenuto risposte discordanti ai test dinamici e le tecniche di imaging e ha identificato correttamente tutti i casi.

Le soglie dei test di secondo livello che abbiamo utilizzato per identificare i casi di CD sono paragonabili a quelle utilizzate in altri studi; con l'utilizzo di tali cutoff, i test hanno mostrato una sensibilità e una specificità molto simile a quelle riportate da altri studi.<sup>54</sup>

Considerando una strategia diagnostica che valorizzi non solo la sensibilità, ma anche la specificità e quindi permetta una diagnosi accurata anche di EAS, i nostri risultati illustrano che la combinazione data dal test di stimolo con CRH e una tecnica di imaging presenta complessivamente l'accuratezza diagnostica migliore (SE:59% e SP:66%). Il CRH test è stato indicato da diversi studi come il test di seconda linea migliore nella diagnosi differenziale tra Malattia di Cushing e sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH, divenendo così il più importante indicatore per valutare la necessità di eseguire il cateterismo dei seni petrosi; inoltre è virtualmente privo di effetti avversi.<sup>53,60</sup>

Il razionale dell'utilizzo del test con desmopressina si basa sul fatto che gli adenomi ipofisari presentano un'espressione aberrante dei recettori V2 e/o una sovra-regolazione dei recettori V3 dell'arginina-vasopressina, tuttavia anche tumori ectopici secernenti ACTH possono presentare tali recettori, portando a dei falsi positivi e limitando così il potere diagnostico di tale test.<sup>62,101</sup>

Nella nostra serie, la desmopressina combinata alla RM magnetica si è dimostrata al pari delle altre combinazioni nell'identificare la malattia di Cushing (SE: 60%), aspetto invece che non è emerso considerando la sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH; nel nostro studio è emerso un basso tasso di concordanza tra TC total body e test di stimolo con desmopressina, infatti la combinazione ha permesso di identificare solo il 30% dei pazienti con EAS.

Il test di stimolo con desmopressina pertanto non dovrebbe essere utilizzato come test di prima linea per la diagnosi differenziale, ma in caso di risultati discordanti ottenuti con gli altri test dinamici per evitare il cateterismo dei seni petrosi.<sup>54,102,103</sup>

Potrebbe invece avere un ruolo chiave nella diagnosi differenziale tra pazienti con sindrome di Cushing ACTH-dipendente e pazienti con stati di Psuedocushing, condizione caratterizzata da elevati livelli di cortisolo, ma assenza di un'attivazione patologica dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.<sup>104</sup>

Mentre il suo ruolo nella diagnosi iniziale è incerto, è ben riconosciuta la sua utilità nell'identificare precocemente un eventuale recidiva di CD post chirurgica.<sup>65,105</sup>

L'HDDST combinato all'imaging si è dimostrato meno efficace complessivamente nel fare diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente rispetto alla combinazione data da imaging e CRH test; si tratta di un dato da considerare dal momento che a differenza del CRH test dove la somministrazione di CRH sintetico ovino/bovino è virtualmente priva di effetti collaterali, la somministrazione di 8 mg di desametasone può aggravare, in pazienti con quadro clinico severo, alcuni sintomi dati dall'ipercortisolismo cronico.

L'HDDST presenta inoltre diverse insidie come il CS ciclico dove i livelli di cortisolo possono variare notevolmente durante il giorno del test, oppure la terapia farmacologica che talvolta è difficile sospendere nei pazienti con CS; i farmaci comunemente usati dai pazienti con CS come antiipertensivi, ipolipemizzanti possono alterare, agendo sull'enzima epatico CYP3A4, il metabolismo del DST e quindi l'accuratezza diagnostica del test.<sup>54</sup>

Nonostante la sensibilità per malattia di Cushing simile a quella della combinazione data dalla risonanza magnetica ipofisaria e il CRH test (SE: 64% vs SE:59%), l'HDDST in associazione alla TC total body ha identificato solo il 44% dei pazienti con EAS, contro il 66% evidenziato dalla combinazione CRH test e TC total body.

Con il nostro studio abbiamo considerato come step iniziale una volta evidenziato il quadro di ipercortisolismo attraverso i test di primo livello, l'imaging.

L'imaging presenta una buona accuratezza diagnostica e al contempo non necessita di alti livelli di cortisolo per essere informativo.

L'imaging ha un ruolo chiave nel processo diagnostico dal momento che il trattamento di prima linea per entrambe le forme ACTH-dipendente prevede la rimozione chirurgica della lesione responsabile dell'ipercortisolismo e quindi oltre a categorizzare la lesione, l'imaging è utile per consentire un trattamento chirurgico mirato più efficace.

Nel sospetto clinico e biochimico di sindrome di Cushing ACTH-dipendente, è utile eseguire in prima battuta una risonanza magnetica ipofisaria vista la maggiore incidenza della malattia di Cushing rispetto alla sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH.

Nel nostro studio la risonanza magnetica eseguita con metodologia adeguata, è stata in grado di identificare un'immagine indicativa di adenoma ipofisario nel 75% dei pazienti con malattia di Cushing e specificità 66%.

La sensibilità e la specificità della risonanza magnetica nel nostro studio sono approssimativamente simili a quelle citate da altri studi.<sup>54,66</sup>

Negli anni ci sono stati importanti progressi tecnologici, si è assistito infatti ad un aumento dell'intensità del campo magnetico, passando da RM a 1 tesla a RM con campi magnetici di intensità pari a 1,5 tesla, 3 tesla, fino alla recente RM a 7 tesla. L'aumento dell'intensità del campo magnetico ha permesso di acquisire sessioni sempre più sottili e quindi in ultima analisi una migliore capacità di localizzazione dell'adenoma.

I miglioramenti tecnologici non devono però sostituire la visione accurata dell'immagini radiologiche da parte di radiologi esperti; la visione e la discussione in un team multidisciplinare deve pertanto essere presente per un accurato approccio diagnostico.

La dimostrazione di una lesione strutturale all'imaging da sola non permette di affermare che essa sia la sede responsabile dell'ipercortisolismo, questo perché nella popolazione generale la presenza di incidentalomi ipofisari si trova fino ad un 10% dei casi<sup>106</sup> e si possono osservare anche nei pazienti con EAS<sup>54</sup>;

Nel nostro studio, tra i pazienti con EAS che hanno eseguito la risonanza magnetica ipofisaria, 8 soggetti hanno presentato una lesione compatibile con un adenoma, in tutti i casi si è trattato di un microadenoma.

La maggior parte degli incidentalomi ipofisari nei pazienti con EAS presenta però un diametro inferiore ai 6 mm (SP:96%) e pertanto si può utilizzare tale cutoff come criterio per procedere alla chirurgia trans-naso-sfenoidale nei casi di CD, se i test biochimici supportano una origine ipofisaria, senza necessità di eseguire il BIPSS.<sup>70</sup>

Abbiamo quindi valutato nei soggetti con risonanza magnetica positiva, l'esito di un singolo test di secondo livello, per ottenere un processo diagnostico accurato e sicuro per il paziente.

Nel nostro studio, abbiamo visto che nei pazienti con un quadro di ipercortisolismo documentato ai test di prima linea e in presenza di un adenoma evidenziato alla RM ipofisaria, il test di stimolo con CRH e il test di soppressione con DST ad alte dosi presentano una sensibilità simile, 76% per il CRH test e 78% per l'HDDST; la sensibilità dell'HDDST in presenza di RM positiva è simile a quella ottenuta in altri studi.<sup>56</sup>

Nella nostra serie il numero dei pazienti con EAS rappresenta il 19% della popolazione totale studiata.

Le linee guida affermano di eseguire l'imaging per identificare i casi di secrezione ectopica solo dopo aver eseguito il cateterismo dei seni petrosi e in particolare dopo aver ottenuto un rapporto centro/periferia di ACTH indicativo di EAS, tuttavia esse non tengono conto degli importanti progressi tecnologici in campo radiologico.<sup>66,107</sup>

Una differenza del nostro studio rispetto alle linee guida consiste nell'eseguire la TC total body nelle fasi iniziali del processo diagnostico e non come ultimo step in pazienti selezionati.

L'avvento della TC ad alta risoluzione si associa ad una migliore sensibilità e possibilità di rilevamento di piccoli tumori, come i carcinoidi bronchiali, che sono i tumori nettamente più frequenti responsabili della CS.<sup>66</sup>

Nella nostra serie, la TC total body ha identificato correttamente in 22 pazienti con EAS la sede della lesione, con sensibilità e specificità rispettivamente pari a 67% e 91%.

La sensibilità ottenuta è paragonabile a quella presente in letteratura.<sup>14,81</sup>

In presenza di una lesione compatibile con un tumore responsabile della secrezione ectopica di ACTH, l'esecuzione del CRH test ha identificato correttamente l'86% dei pazienti con EAS, mentre l'HDDST solo il 55%; la capacità, applicando tale processo diagnostico, di identificare un numero elevato di soggetti con EAS è un elemento importante se si considerano le tempistiche necessarie per fare diagnosi; è stato infatti dimostrato che nei pazienti con EAS la gravità dell'eccesso di cortisolo influisce in maniera significativa sulla sopravvivenza globale, pertanto una diagnosi rapida è essenziale in queste situazioni per poter trattare rapidamente gli elevati livelli di cortisolo.<sup>108</sup>

Nei casi di EAS si può ricorrere per individuare la lesione anche a tecniche di imaging nucleare come l'octreoscan. L'octreoscan che trova utilizzo dal momento che diversi tumori ectopici esprimono i recettori della somatostatina, necessita di un controllo dell'ipercortisolismo a differenza dei test di secondo livello e del cateterismo dei seni petrosi; infatti i livelli elevati di cortisolo possono sopprimere l'espressione dei recettori della somatostatina e determinare falsi risultati.

Si tratta di un ulteriore elemento che evidenzia come l'imaging sia utile nel processo diagnostico dal momento che è possibile eseguirlo anche durante il trattamento dell'ipercortisolismo su cui talvolta è necessario agire rapidamente.

## CONCLUSIONI

La diagnosi differenziale tra la malattia di Cushing e la sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH è complessa, ma necessaria per poter garantire un trattamento adeguato dal momento che la CS è associata a morbilità e mortalità importanti.

Il nostro studio, sottolinea l'importanza dell'esecuzione delle tecniche di imaging e del test di stimolo con CRH per la diagnosi differenziale tra le forme ACTH-dipendente, nei pazienti che presentano un quadro di ipercortisolismo ai test di primo livello.

Il test di stimolo con CRH nei pazienti con imaging positivo (RM per forma ipofisaria e TC per forma ectopica) permette un'accurata e non invasiva diagnosi differenziale nella maggior parte dei casi; ciò ha un impatto clinico notevole in quanto per attuare il trattamento di prima linea, è richiesto talvolta il cateterismo dei seni petrosi, un esame invasivo, che quindi potrebbe essere evitato attuando tale approccio diagnostico.



## BIBLIOGRAFIA

1. Barbot M, Zilio M & Scaroni C. Cushing's syndrome: Overview of clinical presentation, diagnostic tools and complications. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 34 (2020).
2. Sharma ST, Nieman LK & Feelders RA. Cushing's syndrome: Epidemiology and developments in disease management. *Clinical Epidemiology* **7**, 281–293 (2015).
3. Vassiliadi DA & Tsagarakis S. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: The role of the desmopressin test in the diagnosis and follow-up of Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* **178**, R201–R214 (2018).
4. Lonser RR, Nieman L & Oldfield EH. Cushing's disease: Pathobiology, diagnosis, and management. *Journal of Neurosurgery* **126**, 404–417 (2017).
5. Raff H & Carroll T. Cushing's syndrome: From physiological principles to diagnosis and clinical care. *Journal of Physiology* vol. 593 493–506 (2015).
6. Arnaldi G *et al.* Diagnosis and Complications of Cushing's Syndrome: A Consensus Statement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 88 5593–5602 (2003).
7. Larsson CA, Gullberg B, Råstam L & Lindblad U. Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse associations with WHR in Swedish women: A cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders* **9**, (2009).
8. Antonelli G, Ceccato F, Artusi C, Marinova M & Plebani M. Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: Validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. *Clin. Chim Acta.* **451**, 247–251 (2015).
9. Boscaro M & Arnaldi G. Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**, 3121–3131 (2009).
10. Guignat, L., Assie, G., Bertagna, X. & Bertherat, J. Adénome corticotrope [Corticotroph adenoma]. *Presse Med.* vol. 38 125–132 (2009).
11. Saeger W *et al.* Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* **156**, 203–216 (2007).

12. Chabre, O. Syndromes de Cushing: Physiopathologie, étiologie et principes thérapeutiques [Cushing syndrome: Physiopathology, etiology and principles of therapy]. *Presse Medicale* vol. 43 376–392 (2014).
13. Isidori AM & Lenzi A. Ectopic ACTH Syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **51**, 1217–1225 (2007).
14. Hayes AR & Grossman AB. The Ectopic Adrenocorticotrophic Hormone Syndrome: Rarely Easy, Always Challenging. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 47 409–425 (2018).
15. Beuschlein F. & Hammer GD. Ectopic pro-opiomelanocortin syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* vol. 31 191–234 (2002).
16. Bertagna X, Guignat L, Groussin L & Bertherat J. Cushing's disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 23 607–623 (2009).
17. Lindholm J *et al.* Incidence and Late Prognosis of Cushing's Syndrome: A Population-Based Study. *J Clin Endocrinol* vol. 86 117–123 (2001).
18. Ragnarsson O *et al.* The incidence of Cushing's disease: a nationwide Swedish study. *Pituitary* **22**, 179–186 (2019).
19. Cushing, H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. *Obes Res* **2**, 486–508 (1994).
20. Pecori Giraldi F, Moro M, Cavagnini F & Study Group on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis of the Italian Society of Endocrinology. Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 1554–1558 (2003).
21. Ferrigno R *et al.* Paediatric Cushing's disease: Epidemiology, pathogenesis, clinical management and outcome. *Rev Endocr Metab Disord.* **22**, 817–835 (2021).
22. Storr HL *et al.* Prepubertal Cushing's disease is more common in males, but there is no increase in severity at diagnosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 3818–3820 (2004).
23. van Rossum EF & Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* vol. 59 333–357 (2004).
24. Nieman LK. Diagnosis of Cushing's Syndrome in the Modern Era. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 47 259–273 (2018).

25. Orth DN. Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. vol. 332 791–803 (1995).
26. Nieman LK. Cushing's syndrome: Update on signs, symptoms and biochemical screening. *European Journal of Endocrinology* vol. 173 M33–M38 (2015).
27. Boscaro M, Barzon L, Fallo F & Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet* **357**, 783–791 (2001).
28. Atkinson B & Mullan KR. What is the best approach to suspected cyclical Cushing syndrome? Strategies for managing Cushing's syndrome with variable laboratory data. *Clinical Endocrinology* **75**, 27–30 (2011).
29. Torpy DJ, Mullen N, Ilias I & Nieman LK. Association of hypertension and hypokalemia with Cushing's syndrome caused by ectopic ACTH secretion: a series of 58 cases. *Ann N Y Acad sci*. **970**, 134–144 (2002).
30. Isidori AM *et al*. The ectopic adrenocorticotropin syndrome: Clinical features, diagnosis, management, and long-term follow-up. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 371–377 (2006).
31. Nieman LK *et al*. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 1526–1540 (2008).
32. Ceccato F *et al*. Screening Tests for Cushing's Syndrome: Urinary Free Cortisol Role Measured by LC-MS/MS. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100**, 3856–3861 (2015).
33. Pecori Giraldi F *et al*. Specificity of first-line tests for the diagnosis of Cushing's syndrome: Assessment in a large series. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**, 4123–4129 (2007).
34. Galm BP, Qiao N, Klibanski A, Biller BMK & Tritos NA. Accuracy of Laboratory Tests for the Diagnosis of Cushing Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. **105**, (2020).
35. Pecori Giraldi F. Recent challenges in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Hormone Research* vol. 71 123–127 (2009).
36. Odeniyi IA & Fasanmade OA. Urinary free cortisol in the diagnosis of cushing's syndrome: How useful?. *Nigerian Journal of Clinical Practice* vol. 16 269–272 (2013).
37. Mericq MV & Cutler GB jr. High fluid intake increases urine free cortisol excretion in normal subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Printed* vol. 83 682–684 (1998).

38. Bansal V, el Asmar N, Selman WR & Arafah BM. Pitfalls in the diagnosis and management of Cushing's syndrome. *Neurosurgical Focus* **38**, (2015).
39. Raff H, Raff JL & Findling JW. Late-Night Salivary Cortisol as a Screening Test for Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* vol. 83 2681–2686 (1998).
40. Ceccato F *et al.* Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency. *European Journal of Endocrinology* **169**, 31–36 (2013).
41. Raff H. Cushing's syndrome: Diagnosis and surveillance using salivary cortisol. *Pituitary* vol. 15 64–70 (2012).
42. Putignano P *et al.* Midnight salivary cortisol versus urinary free and midnight serum cortisol as screening tests for Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 4153–4157 (2003).
43. Badrick E, Kirschbaum C & Kumari M. The relationship between smoking status and cortisol secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**, 819–824 (2007).
44. Graham UM, Hunter SJ, McDonnell M, Mullan KR & Atkinson AB. A comparison of the use of urinary cortisol to creatinine ratios and nocturnal salivary cortisol in the evaluation of cyclicity in patients with Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **98**, E72–E76 (2013).
45. Ceccato F & Boscaro M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention* **23**, 209–215 (2016).
46. Casals G & Hanzu FA. Cortisol measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass spectrometry? *Annals of Laboratory Medicine* **40**, 285–296 (2020).
47. Ceccato F *et al.* The diagnostic accuracy of increased late night salivary cortisol for Cushing's syndrome: a real-life prospective study. *Journal of Endocrinological Investigation* **42**, 327–335 (2019).
48. Raff H. Update on late-night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: methodological considerations. *Endocrine* **44**, 346–349 (2013).
49. Chen K *et al.* An Optimized Pathway for the Differential Diagnosis of ACTH-Dependent Cushing's Syndrome Based on Low-Dose Dexamethasone Suppression Test. *Frontiers in Endocrinology* **12**, (2021).

50. Chiodini I *et al.* Six controversial issues on subclinical Cushing's syndrome. *Endocrine* **56**, 262–266 (2017).
51. Isidori AM *et al.* Discriminatory value of the low-dose dexamethasone suppression test in establishing the diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 5299–5306 (2003).
52. Pinelli S, Barbot M, Scaroni C & Ceccato F. Second-Line Tests in the Diagnosis of Adrenocorticotrophic Hormone-Dependent Hypercortisolism. *Annals of Laboratory Medicine* **41**, 521–531 (2021).
53. Reimondo G *et al.* The corticotrophin-releasing hormone test is the most reliable noninvasive method to differentiate pituitary from ectopic ACTH secretion in Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology* vol. 58 718–724 (2003).
54. Barbot M *et al.* Second-line tests in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Pituitary* **19**, 488–495 (2016).
55. Kola B & Grossman AB. Dynamic testing in Cushing's syndrome. *Pituitary* **11**, 155–162 (2008).
56. Liu Z *et al.* High positive predictive value of the combined pituitary dynamic enhanced MRI and high-dose dexamethasone suppression tests in the diagnosis of Cushing's disease bypassing bilateral inferior petrosal sinus sampling. *Scientific Reports* **10**, 14694–14694 (2020).
57. Pecori Giraldi F, Invitti C, Cavagnini F & Study Group of the Italian Society of Endocrinology on the Pathophysiology of the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone test in the diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome: A reappraisal. *Clin Endocrinol (OXF)* vol. 54 601–607 (2001).
58. Woo YS *et al.* Clinical and biochemical characteristics of adrenocorticotropin-secreting macroadenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**, 4963–4969 (2005).
59. Isidori, A. M. *et al.* Extensive clinical experience - The ectopic adrenocorticotropin syndrome: Clinical features, diagnosis, management, and long-term follow-up. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 371–377 (2006).
60. Ferrante E *et al.* Indication to dynamic and invasive testing in Cushing's disease according to different neuroradiological findings. *Journal of Endocrinological Investigation* **45**, 629–637 (2022).

61. de Keyzer Y *et al.* The pituitary V3 vasopressin receptor and the corticotroph phenotype in ectopic ACTH syndrome. *Journal of Clinical Investigation* **97**, 1311–1318 (1996).
62. Tsagarakis S *et al.* The desmopressin and Combined CRH-Desmopressin tests in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome: constraints imposed by expression of V2 vasopressin receptors in tumors with ectopic ACTH secretion. *J Clin Endocrinol Metab* vol. 87 1646–1653 (2002).
63. Qiao J *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.* vol. 68 839–848 (2021).
64. Ambrogio AG, Andrioli M, de Martin M, Cavagnini F & Pecori Giraldi F. Usefulness of desmopressin testing to predict relapse during long-term follow-up in patients in remission from Cushing's disease. *Endocrine Connections* **6**, 791–799 (2017).
65. Barbot M *et al.* Predicting late recurrence in surgically treated patients with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf.)*. **79**, 394–401 (2013).
66. Frete C *et al.* Non-invasive diagnostic strategy in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **105**, 3273–3284 (2020).
67. Valassi E *et al.* Diagnostic tests for Cushing's syndrome differ from published guidelines: data from ERCUSYN. *European Journal of Endocrinology* vol. 176 613–624 (2017).
68. Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA & Nieman LK. Cushing's syndrome. *The Lancet* vol. 386 913–927 (2015).
69. Scangas GA & Laws ER jr. Pituitary incidentalomas. *Pituitary* vol. 17 486–491 (2014).
70. Yogi-Morren D *et al.* PITUITARY MRI FINDINGS IN PATIENTS WITH PITUITARY AND ECTOPIC ACTH-DEPENDENT CUSHING SYNDROME: DOES A 6-MM PITUITARY TUMOR SIZE CUT-OFF VALUE EXCLUDE ECTOPIC ACTH SYNDROME? *Endocr Pract* **21**, 1098–1103 (2015).
71. Vitale G *et al.* Pituitary magnetic resonance imaging in Cushing's disease. *Endocrine* vol. 55 691–696 (2017).

72. Bashari WA *et al.* Modern imaging of pituitary adenomas. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 33 101278–101278 (2019).
73. Wolfsberger S *et al.* Application of three-tesla magnetic resonance imaging for diagnosis and surgery of sellar lesions. *J Neurosurg.* vol. 100 278–286 (2004).
74. Pinker K *et al.* The value of high-field MRI (3 T) in the assessment of sellar lesions. *European Journal of Radiology* **54**, 327–334 (2005).
75. Colao A *et al.* Inferior petrosal sinus sampling in the differential diagnosis of Cushing's syndrome: results of an Italian multicenter study. *European Journal of Endocrinology* vol. 144 499–507 (2001).
76. Wang H, Ba Y, Xing Q & Cai RC. Differential diagnostic value of bilateral inferior Petrosal sinus sampling (BIPSS) in ACTH-dependent Cushing syndrome: A systematic review and Meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders* vol. 20 143–143 (2020).
77. Zampetti B, Grossrubatscher E, Dalino Ciaramella P, Boccardi E & Loli P. Bilateral inferior petrosal sinus sampling. *Endocrine Connections* vol. 5 R12–R25 (2016).
78. Findling JW, Kehoe ME & Raff H. Identification of patients with Cushing's disease with negative pituitary adrenocorticotropin gradients during inferior petrosal sinus sampling: Prolactin as an index of pituitary venous effluent. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 6005–6009 (2004).
79. Kotwal N, Kumar Y, Upreti V, Singh A & Garg MK. Bilateral inferior petrosal sinus sampling using vasopressin. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **20**, 399–403 (2016).
80. Testa RM *et al.* The usefulness of combined biochemical tests in the diagnosis of Cushing's disease with negative pituitary magnetic resonance imaging. *European Journal of Endocrinology* **156**, 241–248 (2007).
81. Isidori AM *et al.* Conventional and nuclear medicine imaging in Ectopic Cushing's syndrome: A systematic review. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 100 3231–3244 (2015).
82. de Bruin C *et al.* Mifepristone Effects on Tumor Somatostatin Receptor Expression in Two Patients with Cushing's Syndrome due to Ectopic Adrenocorticotropin Secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, 455–462 (2012).

83. Senanayake R *et al.* New types of localization methods for adrenocorticotrophic hormone-dependent Cushing's syndrome. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 35 101513–101513 (2021).
84. Wannachalee T *et al.* The Clinical Impact of [68Ga]-DOTATATE PET/CT for the Diagnosis and Management of Ectopic Adrenocorticotrophic Hormone – Secreting Tumours. *Clinical Endocrinology (Oxf)* **91**, 288–294 (2019).
85. Ceccato F *et al.* The role of 68Ga-DOTA derivatives PET-CT in patients with ectopic ACTH syndrome. *Endocrine Connections* **9**, 337–345 (2020).
86. Ilias I *et al.* Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**, 4955–4962 (2005).
87. Nieman LK *et al.* Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 100 2807–2831 (2015).
88. Tritos NA & Biller BMK. Advances in the Medical Treatment of Cushing Disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 49 401–412 (2020).
89. Buchfelder M & Schlaffer S. Pituitary surgery for Cushing's disease. *Neuroendocrinology* vol. 92 102–106 (2010).
90. Biller BM *et al.* Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 93 2454–2462 (2008).
91. Tritos NA & Biller BM. Medical management of Cushing's disease. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 117 407–414 (2014).
92. Tritos NA & Biller BM. Cushing's disease. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 124 221–234 (Elsevier B.V., 2014).
93. Losa M, Picozzi P, Redaelli MG, Laurenzi A & Mortini P. Pituitary radiotherapy for Cushing's disease. *Neuroendocrinology* vol. 92 107–110 (2010).
94. Ferriere A & Tabarin A. Cushing's syndrome: Treatment and new therapeutic approaches. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 34 101381–101381 (2020).

95. Marks LB. Conventional fractionated radiation therapy vs. radiosurgery for selected benign intracranial lesions (arteriovenous malformations, pituitary adenomas, and acoustic neuromas). *Journal of Neuro-Oncology* vol. 17 223–230 (1993).
96. Ceccato F, Scaroni C & Boscaro M. Clinical use of pasireotide for Cushing's disease in adults. *Therapeutics and Clinical Risk Management* vol. 11 425–434 (2015).
97. Creemers SG, Hofland LG, Lamberts SW & Feelders RA. Cushing's syndrome: An update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* vol. 16 1829–1844 (2015).
98. Pivonello R, de Martino MC, de Leo M, Lombardi G & Colao A. Cushing's Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* vol. 37 135–149 (2008).
99. Barber TM *et al.* Nelson's syndrome. *European Journal of Endocrinology* vol. 163 495–507 (2010).
100. Swearingen B. *et al.* Diagnostic errors after inferior petrosal sinus sampling. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**, 3752–3763 (2004).
101. Suda T, Kageyama K, Nigawara T & Sakihara S. Evaluation of Diagnostic Tests for ACTH-Dependent Cushing's Syndrome. *Endocrine Journal* vol. 56 469–476 (2009).
102. Newell-Price J *et al.* A Combined Test Using Desmopressin and Corticotropin-Releasing Hormone in the Differential Diagnosis of Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* vol. 82 176–181 (1997).
103. Vilar L *et al.* The role of non-invasive dynamic tests in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Endocrinol. Invest.* vol. 31 1008–1013 (2008).
104. Tirabassi G *et al.* Use of the Desmopressin Test in the Differential Diagnosis of Pseudo-Cushing State from Cushing's Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95**, 1115–1122 (2010).
105. Losa M, Bianchi R, Barzaghi R, Giovanelli M & Mortini P. Persistent adrenocorticotropin response to desmopressin in the early postoperative period predicts recurrence of Cushing's disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**, 3322–3328 (2009).
106. Sahdev A, Reznick RH, Evanson J & Grossman AB. Imaging in Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* vol. 51 1319–1328 (2007).

107. Ko JP & Naidich DP. Lung nodule detection and characterization with multislice CT. *Radiologic Clinics of North America* vol. 41 575–597 (2003).
108. Davi' MV *et al.* Prognostic factors in ectopic Cushing's syndrome due to neuroendocrine tumors: A multicenter study. *European Journal of Endocrinology* **176**, 453–461 (2017).