

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE
XXIII CICLO



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Complicanze dell'ipercortisolismo subclinico:
rischio di insorgenza di fratture vertebrali e possibile
ruolo dell'ormone della crescita**

Settore scientifico disciplinare: MED 13

Tesi di Dottorato della:

Dott.ssa **Valentina Morelli**

Matricola: R07472

Tutor: Prof. Paolo Beck Peccoz

Coordinatore: Prof.ssa Marcella Motta

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

INTRODUZIONE

<i>1- Incidentaloma surrenalico</i>	Pag.2
Definizione.....	Pag.2
Epidemiologia.....	Pag.2
Eziopatogenesi.....	Pag.3
Classificazione.....	Pag.5
Percorso diagnostico.....	Pag.8
Terapia.....	Pag.11
<i>2- Ipercortisolismo subclinico</i>	Pag.13
Definizione.....	Pag.13
Diagnosi.....	Pag.15
Prevalenza.....	Pag.23
Complicanze croniche.....	Pag.25
Terapia dell'ipercortisolismo subclinico.....	Pag.34

STUDIO.....Pag.36

<i>1- Scopo dello studio</i>	Pag.36
<i>2- Pazienti, Metodi e Analisi statistica</i>	Pag.36
<i>3- Risultati</i>	Pag.42

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....Pag.51

BIBLIOGRAFIA.....Pag.54

INTRODUZIONE

1. Incidentaloma surrenalico

Definizione

Con il termine “incidentaloma surrenalico” (AI), si definisce una massa surrenalica con diametro maggiore di 1 cm, scoperta nel corso di accertamenti radiologici eseguiti per altra causa [1]. Il riscontro occasionale di masse surrenaliche è divenuto negli ultimi anni un problema clinico molto frequente a causa della diffusione di tecniche radiologiche sempre più sofisticate. L'introduzione di apparecchiature diagnostiche come gli ultrasuoni (US) la tomografia assiale computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN) hanno incrementato, a partire dagli inizi degli anni '80, la frequenza di tale riscontro [2,3], provocando una vera e propria epidemia endocrina provocatoriamente definita come nuovo “A-I-D-S”, acronimo inglese di Adrenal Incidentaloma Discovered Serendipitously, dal momento che entrambe le condizioni sono asintomatiche nelle fasi iniziali ed implicano notevoli costi economici e sociali [3].

Epidemiologia

Secondo i primi studi autoptici, la prevalenza di masse surrenaliche misconosciute in vita variava dall'1.0 all' 8.7% [4-16] senza differenze significative tra uomini e donne. Dati simili emergevano successivamente dagli studi di imaging. In una meta-analisi pubblicata tra il 1982 e il 1994 comprendente 82.483 scansioni TC, Barzon et al [17] riportavano una prevalenza variabile tra lo 0.35 e l'1.9%, mentre in studi più recenti raggiunge il 4% circa [18]. È interessante notare che la prevalenza di queste masse è molto bassa prima dei 30 anni (0.2%) ed aumenta con l'età, raggiungendo il 7% in

soggetti sopra i 70 anni [17-20]. Anche nei pazienti con una pregressa diagnosi di neoplasia è stimata intorno al 4.4% [21].

Eziopatogenesi

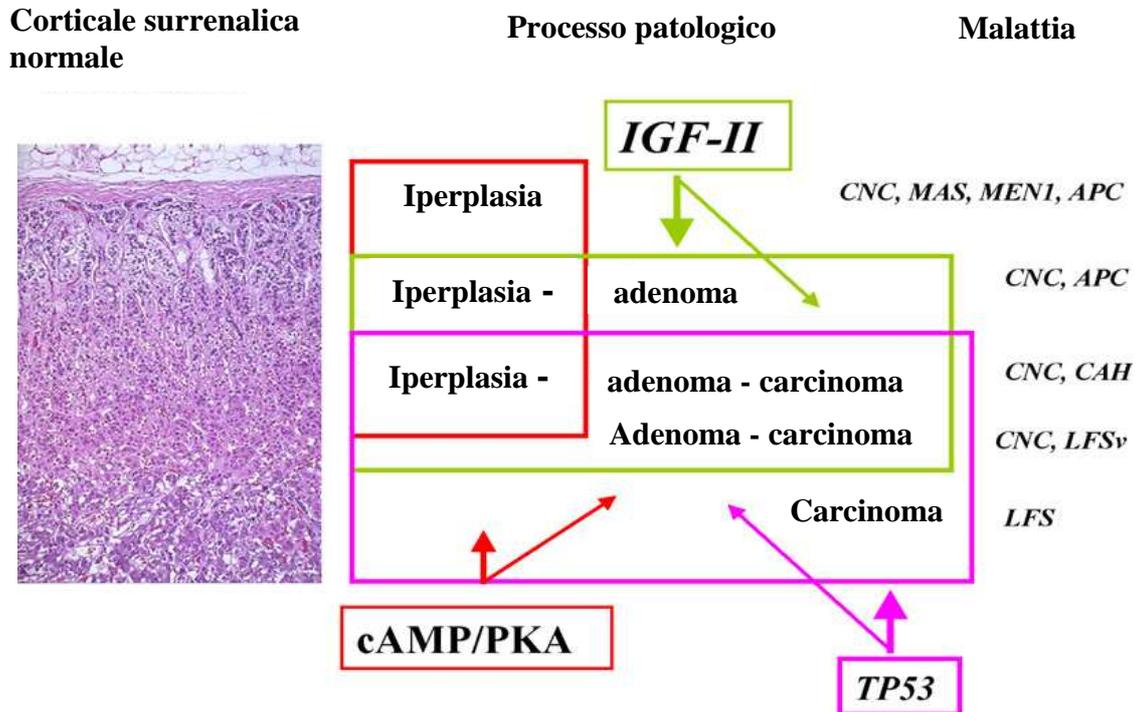
Da un punto di vista eziopatogenetico sono state fatte nel corso degli anni varie ipotesi. Si è supposto che i tumori surrenalici potessero essere una “risposta” proliferativa adattativa dell’organo alla perdita di tessuto ischemico corticale, in seguito ad arteriopatia capsulare legata al processo d’invecchiamento [22]. Tuttavia, dato che la maggior parte dei tumori surrenalici sono monoclonali, quindi risultato di una mutazione oncogenica somatica e non iperplasie policlonali, tale ipotesi non è stata confermata [23].

Anche l’ipotesi che un’alterazione genetica, causa di deficit di 21-idrossilasi e iperplasia surrenalica congenita potesse essere correlata ad un rischio aumentato di sviluppare adenomi surrenalici [24] (supportata dal riscontro di incrementati livelli di 17 α -idrossiprogesterone in più del 70% dei pazienti con AI [25]), è stata poi smentita dai risultati di successivi studi. Dall’osservazione di un incrementato rapporto tra 11-desossicortisolo e cortisolo e tra 11-desossicorticosterone e corticosterone dopo stimolo con ACTH (250 μ g e.v.), si è potuto accertare che gli aumentati livelli dei precursori dei mineralcorticoidi e dei glucocorticoidi non sono attribuibili al solo deficit di 21-idrossilasi, e anzi parrebbero più frequentemente associati ad alterata attività di 11 β -idrossilasi [26]. A favore di ciò si è poi dimostrato che la mutazione del gene della 21-idrossilasi è rara negli adenomi e che è la neoplasia stessa a determinare ipersecrezione di 17 α -idrossiprogesterone per alterata attività dell’11-idrossilasi in risposta all’ACTH [27].

Progressi significativi sono stati fatti invece a livello di genetica molecolare. Sembrerebbe infatti che l'ipersecrezione di neuropeptidi, neurotrasmettitori, fattori di crescita e citochine che normalmente partecipano alla regolazione paracrina della funzione corticosurrenalica, costituisca uno stimolo inappropriato alla crescita di masse neoplastiche [28]. Secondo quanto riportato da Stratakis e da altri autori [29-32] la tumorigenesi della corticale del surrene, come in altri tessuti endocrine (es. ipofisi) e non endocrini (es. colon) sarebbe costituita da un processo a fasi, sebbene non tutte le fasi siano sempre riscontrabili nè necessariamente presenti in tutti i tipi cellulari. Secondo questa teoria sia l'adenoma che il carcinoma possono formarsi senza prima passare rispettivamente attraverso la trasformazione in iperplasia ed adenomatosi. La via metabolica mediata dall' cAMP-signaling sembra portare all'iperplasia; l'iperpressione dell' IGF-II (e quella di altri fattori di crescita) si assocerebbe invece alla formazione di adenoma e carcinoma; il difetto di geni di controllo del ciclo cellulare (*TP53*, *CHEK2*) è stato descritto infine sia nei carcinomi sporadici che familiari, anche se molti adenomi benigni possono presentare mutazioni somatiche di *TP53*. E' stato inoltre ipotizzato che se il primo danno è a livello di *TP53*, come nel caso della Sindrome di Li-Fraumeni, il tumore si forma senza nessuno step precedente; se viceversa, il primo difetto è in un gene della via metabolica dell'cAMP-signaling (come nel Carney complex e nella Sindrome di McCune-Albright), più facilmente si avranno iperplasia ed adenoma, che solo raramente progredisce verso un carcinoma. A supporto di questa teoria sono state riportate anomalie somatiche della via metabolica del *Wnt*-signaling in adenomi insorti nel contesto di iperplasia; e mutazioni somatiche della *PRKARIA* (subunità regolatoria di tipo 1 della PKA) in adenomi sporadici che si comportano come quelle del Carney complex. In ultimo nei tumori della corticale

surrenalica sono comuni anomalie cromosomiche e la loro complessità aumenta con la gravità della patologia. [29-32] (figura 1).

Figura 1



Processo di tumorigenesi surrenalica tratto da Stratakis et al. e modificato. APC = Poliposi familiare del colon; CNC = Carney complex; CAH= iperplasia corticosurrenalica congenita; LFS = Sindrome di Li-Fraumeni; LFSv = LFS varianti (mutazioni TP53CHEK2 “mild”); MAS =Sindrome di McCune-Albright; MEN 1 = Neoplasie Endocrine Multiple di tipo 1; PKA = protein kinasi A [29].

Classificazione

L'incidentaloma surrenalico comprende per definizione differenti condizioni patologiche, come la Sindrome di Cushing, il feocromocitoma, il Conn, il carcinoma, le metastasi, il mielolipoma e gli adenomi non secernenti. Secondo una classificazione operata dall'Adrenal Incidentaloma Study Group of the Italian Endocrinology Society (AI-SIE), comprendente più di 1000 casi, l'85% di queste lesioni sono costituite da adenomi della corticale non ipersecernenti, il 9.2% è associato a S. Cushing, il 4.2% a feocromocitoma e l'1.6% ad aldosteronoma. Dopo l'asportazione della lesione surrenalica, effettuata in 380 pazienti, gli autori riportano una prevalenza del 52% di casi di adenoma, l'11% di feocromocitoma, il 10% di mielolipoma, il 10% di carcinoma, il 6% di cisti, il 4% di ganglioneuroma, ed il 3% di altre lesioni.

Tuttavia in letteratura l' adenocarcinoma surrenalico risulta meno frequente, con un'incidenza approssimativa di 1-2/1.000.000 per anno [33-36].

Il riscontro di masse surrenaliche incidentali può coinvolgere anche entrambi i surreni. Due studi, condotti rispettivamente su 887 e 202 pazienti con AI, hanno mostrato la presenza di masse bilaterali nel 10 - 15% dei casi [37,38]. Inoltre uno studio di Kasperlik-Zaluska [39] ha evidenziato come su 208 incidentalomi surrenalici, 19 rappresentavano secondarismi di cui 10 si presentavano come forma bilaterale. In questa particolare situazione è importante valutare la funzionalità surrenalica in quanto i processi infiltrativi che coinvolgono entrambe le ghiandole possono causare un'insufficienza surrenalica.

E' infine necessario ricordare alcune forme d'iperplasia surrenalica bilaterale, sebbene si tratti di forme diagnosticate con minore frequenza rispetto ai più comuni adenomi corticosurrenalici:

Iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare

L'iperplasia surrenalica bilaterale macronodulare ACTH-indipendente è una rara causa d'ipersecrezione endogena di cortisolo, rappresentando meno dell'1% dei casi di sindrome di Cushing [40].

E' stata descritta in letteratura [41] utilizzando diversi acronimi, tra i quali AIMAH (ACTH-Indipendent Macronodular Adrenal Hyperplasia), MMAD (Massive Macronodular Adrenal Disease), AMAH (Autonomous Macronodular Adrenal Hyperplasia), AIMBAD (ACTH-Indipendent Massive Bilateral Adrenal Disease).

E' importante dal punto di vista diagnostico-terapeutico differenziare tale forma dall'iperplasia surrenalica bilaterale diffusa o macronodulare secondaria alla stimolazione cronica da parte dell'ACTH tipica della malattia di Cushing o delle forme da ipersecrezione ectopica di ACTH. In tale caso i livelli di ACTH inappropriatamente normali o elevati orientano nella diagnosi.

Una rara variante d'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale ACTH-indipendente può essere associata alla sindrome di McCune-Albright, caratterizzata da pubertà precoce, displasia fibrosa poliostotica, pigmentazione cutanea e iperplasia di ghiandole endocrine. Questa sindrome è dovuta a mutazioni somatiche del gene che codifica la subunità alfa della proteina Gs regolatoria (GNAS) dell'attività adenilato-ciclasica, che intervengono precocemente durante l'embriogenesi.

Noduli surrenalici bilaterali sono stati descritti anche in alcuni casi di MEN1, neoplasia endocrina ereditaria, causata da delezione di un gene regolatorio codificante per una proteina con attività di oncosoppressore denominata "menina".

In una serie di 33 pazienti con MEN1, è stata riscontrata iperplasia bilaterale macronodulare nel 21% dei casi; inoltre, in più della metà dei rimanenti casi è stata riscontrata un'iperplasia surrenalica unilaterale [42].

Iperplasia surrenalica bilaterale micronodulare

Tale forma si manifesta classicamente nella prima infanzia.

Le lesioni, bilaterali, associate al deposito di lipofuscine nella zona fascicolata, sono tipicamente nodulari e appaiono macroscopicamente di colore marrone o nero e di dimensioni non aumentate.

Istologicamente i noduli risultano costituiti da cellule con citoplasma eosinofilo contenente pigmento marrone (da cui il termine “malattia micronodulare surrenalica pigmentata”), circondati da tessuto normale o atrofico.

Questa condizione clinica fa spesso parte del “complesso di Carney”, quando è associata a mixomi cardiaci, della cute, del petto, a lesioni pigmentate della pelle, a tumori endocrini e a schwannomi. In questo caso si tratta di una patologia autosomica dominante, causata ad una mutazione inattivante la PRKAR1A, AMP ciclico-dipendente [32, 41].

Nella maggior parte dei pazienti studiati l’esame TAC dimostra ghiandole surrenaliche di normali dimensioni ma occupate da numerosi piccoli noduli diffusi, contenenti il caratteristico pigmento nero-bruno, circondati da tessuto corticale atrofico; più raramente si possono riscontrare noduli singoli di maggiori dimensioni, da non confondere con forme tumorali unilaterali [43].

Percorso diagnostico

La scoperta di un incidentaloma surrenalico solleva due importanti questioni: definirne la natura e valutare l’eventuale eccesso di produzione ormonale [44].

Gli strumenti diagnostici utilizzabili per differenziare e caratterizzare tale lesione sono diversi:

- l'anamnesi, in grado di fornire informazioni sulla familiarità per determinate neoplasie, o sulla presenza concomitante di altre lesioni tali da indirizzare il medico verso un secondarismo o una sindrome più complessa;

- l'esame obiettivo, volto ad escludere la presenza di segni o sintomi caratteristici di un tumore ipersecernente;

- la valutazione di specifici parametri dell'imaging: nel caso di scansioni TC, considerata il gold standard per la valutazione delle masse surrenaliche, i criteri più affidabili sono, in ordine di importanza, i valori densitometrici valutati mediante scala Hounsfield (un metodo semiquantitativo per misurare l'attenuazione dei raggi X), le dimensioni e le caratteristiche di enhancement del mezzo di contrasto (figura 2);

- la valutazione della funzione ormonale basale e dinamica;

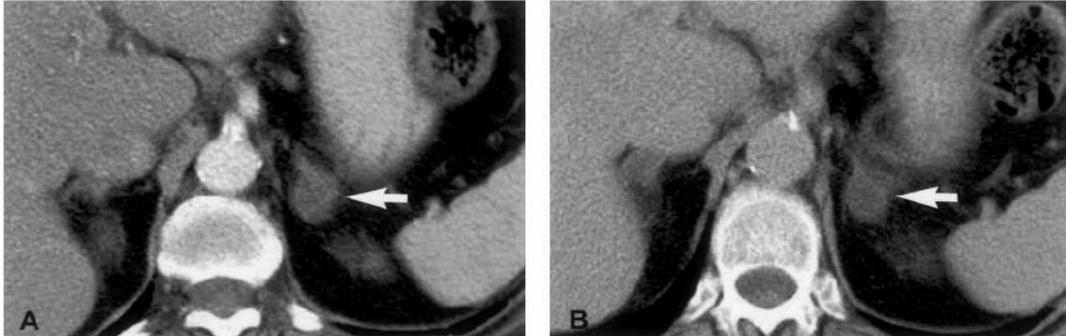
- l'esecuzione di scintigrafia surrenalica con Iodio-Colesterolo (figura 3): con questa tecnica è possibile, infatti, evidenziare l'autonomia delle lesioni surrenaliche e l'inibizione funzionale del surrene controlaterale; tale indagine può anche essere d'aiuto nella diagnosi differenziale tra forme benigne e maligne. Generalmente la presenza d'ipercaptazione della lesione ne esclude la malignità, anche se in un numero esiguo di carcinomi surrenalici ipersecernenti è possibile riscontrare un aumentato uptake del tracciato [45];

- recentemente sono state introdotte nuove indagini radiologiche come la scintigrafia surrenalica con immagini integrate SPECT-TC [46] in grado di fornire informazioni più accurate da un punto di vista anatomico e forse anche funzionale (figura 4), e la FDG- TC/PET, dotata di buona sensibilità (89%) e specificità (94%) nel distinguere la natura benigna o maligna di una lesione surrenalica [47];

- l'esecuzione di agobiopsia sotto guida TAC o ecografica [48]: questa procedura, tuttavia, non essendo scevra da rischi e non permettendo la diagnosi differenziale tra

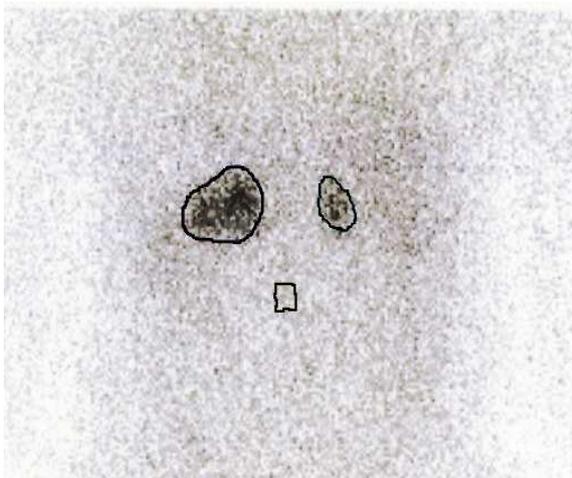
adenoma e carcinoma primitivo del surrene, si riserva solamente nei casi in cui sia fortemente sospetta la natura secondaria della lesione surrenalica.

Figura 2



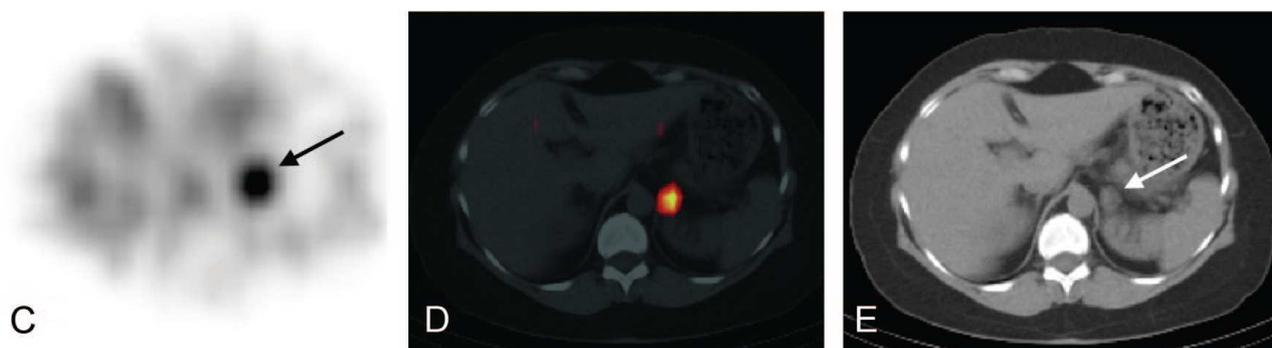
Immagini TC di adenoma corticosurrenalico sinistro. L'immagine A mostra una massa surrenalica di 1,5 cm di diametro, con valori di attenuazione medi di 32 HU. L'immagine B, acquisita 12 minuti dopo l'iniezione del contrasto, mostra valori di attenuazione notevolmente ridotti (12.9 UH), dimostrando il rapido wash-out caratteristico delle masse benigne.

Figura 3



Adenoma corticosurrenalico destro. L'immagine scintigrafica mostra una ipercaptazione dell'adenoma surrenalico destro e la posizione del ROI (region of interest) per l'analisi quantitativa della captazione surrenalica (immagine tratta da lavoro di Donadio et al [130]).

Figura 4



Adenoma surrenalico sinistro cortisolo secernente di 1.5 cm. Immagini SPECT (C), SPECT-TC (D), e TC (E)

Terapia

La terapia dell' incidentaloma surrenalico si avvale in gran parte della chirurgia, soprattutto in presenza di masse più grandi di 6 cm di diametro (rischio di malignità superiore al 25% vs il 2% per lesioni più piccole di 4 cm), di lesioni che dimostrano caratteristiche sospette all'imaging (rapida percentuale di crescita, eterogeneità, forma irregolare, calcificazioni, necrosi, invasione di strutture adiacenti, elevata densità, lenta dismissione del mezzo di contrasto) e di ipersecrezione ormonale [21,44,49,50,51]. Altri autori consigliano come limite per l'intervento chirurgico una soglia di 5 cm di diametro [33,36,52,53]. In realtà deve essere sottolineato che il parametro "dimensione" determinato mediante scansioni TAC dovrebbe essere valutato con attenzione dato che esso risulta spesso sottostimato [51,54,55].

In caso di lesioni surrenaliche che presentino un valore di attenuazione > 10 HU alla TC senza mdc ed un wash-out a 10 minuti dalla TC con mdc minore del 50%, quindi fortemente sospette per malignità, dovrebbe essere considerata la surrenectomia [21,49,56,57]. Altri autori suggeriscono una soglia di wash out del 60% a 15 minuti

[50]. Tuttavia per masse comprese tra i 4 cm e i 6 cm sono considerate come possibili strategie sia uno stretto follow-up che l'intervento chirurgico [21,44].

La surrenectomia è inoltre consigliata in casi di masse evidenziate mediante scansioni TAC e non visualizzabili alla scintigrafia [58,59].

In presenza di un secondarismo di origini conosciute o sconosciute, non ci sono dati certi a favore della surrenectomia [21,45]. Ciò nonostante, studi riportano una sopravvivenza maggiore in pazienti portatori di metastasi singole sottoposti a resezione precoce delle stesse [60-62].

La valutazione del paziente con incidentaloma surrenalico nel tempo, prevede una sequenza temporale di esecuzione di TC dell'addome a distanza di tre o sei mesi dal riscontro iniziale e ancora ad un anno. E' stato osservato come le dimensioni della massa surrenalica possono aumentare nel corso del follow-up nel 5-20% dei casi a seconda dei vari studi, ma nella maggior parte dei casi non presentano una trasformazione maligna, non ci sono dati quindi che supportino un follow-up così prolungato [63-69].

Spesso, tuttavia, è lo scenario clinico e l'età del paziente a guidare le decisioni su pazienti con incidentaloma surrenalico intorno ai 4 cm di diametro. Si preferisce ad esempio la surrenectomia in pazienti in giovane età ma il follow-up nel tempo nei soggetti anziani.

Allo stesso modo un'opzione terapeutica diversa dalla surrenectomia deve essere valutata anche in caso di feocromocitoma o aldosteronoma in pazienti non candidabili all'intervento. Nonostante non ci sia una cura alternativa alla surrenectomia, questi pazienti possono essere trattati farmacologicamente nel tentativo di normalizzare o quantomeno ridurre la pressione arteriosa e la sintomatologia specifica.

Infine, bisogna rilevare come l'utilità e il reale beneficio apportato in termini di prevenzione da queste indagini è stato messo in dubbio da alcuni autori [70, 71].

2. Ipercortisolismo Subclinico

Definizione

Le patologie endocrine subcliniche, caratterizzate dalla presenza di alterazioni biochimiche non accompagnate dai rispettivi segni clinici, sono state messe in rilievo nelle ultime decadi, a causa del miglioramento dell'accuratezza delle analisi ormonali e delle tecniche diagnostiche.

La disfunzione tiroidea subclinica nella forma di ipotiroidismo o ipertiroidismo fu la prima ad essere descritta ed indagata estensivamente. L'ipercortisolismo subclinico fu riportato per la prima volta da Charbonnel e coautori nel 1981 [72], in pazienti studiati per masse surrenaliche incidentali.

I termini sindrome pre-Cushing, sindrome di Cushing non Cushingoide, sindrome di Cushing pre-clinica sono stati utilizzati nel corso degli anni per descrivere pazienti la cui valutazione endocrina e/o la scintigrafia surrenalica era consistente con autonomia surrenalica malgrado mancassero le caratteristiche stimate dell'ipercortisolismo. Oggi viene correntemente utilizzato il termine ipercortisolismo subclinico (SH) anche per evitare una definizione fuorviante in quanto la progressione verso la sindrome di Cushing anche se non conosciuta con certezza, sembrerebbe molto bassa [17,73,74,75-81]. Generalmente le anomalie più frequentemente osservate sono: a) aumento della secrezione di cortisolo libero urinario, b) alterazioni del ritmo del cortisolo, c) incompleta soppressione del cortisolo dopo test di soppressione con 1mg di

desametasone (Nugent o 1-mgDST), d) livelli di ACTH ridotti o soppressi, e) mancata responsività al CRH test.

In particolare, i criteri diagnostici suggeriti dal Gruppo di Studio Italiano sui Tumori Surrenali per la diagnosi di ipercortisolismo subclinico [33], si basano sulla presenza di almeno due delle alterazioni sopra elencate, considerando 5 µg/dl (138.8 nmol/l) come cut-off per il cortisolo sierico alle h.8.00 dopo test di Nugent.

Tuttavia vi è una grande eterogeneità nei diversi lavori pubblicati sui criteri utilizzati per identificare questa condizione (figura 5).

E' da sottolineare l'importanza di valutare l'SH, oltre che nei pazienti con incidentaloma surrenalico, anche in altre situazioni cliniche.

Chiodini et al, ad esempio, in uno studio di screening su più di 200 pazienti valutati per osteoporosi, hanno rilevato una prevalenza di ipercortisolismo subclinico del 10.8% nei pazienti che presentavano osteoporosi complicata da frattura vertebrale [82].

Analogamente tre studi hanno dimostrato un' aumentata prevalenza di SH in pazienti con diabete mellito [83-85].

Inoltre sta diventando sempre più evidente che anche pazienti con insufficienza surrenalica primaria o secondaria potrebbero rappresentare una situazione clinica di SH iatrogeno. Infatti diversi studi indicano che le dosi tradizionalmente raccomandate di glucocorticoidi potrebbero essere sovra-fisiologiche [86-87].

Diagnosi

Al fine di stabilire la presenza di ipercortisolismo nella pratica clinica si eseguono i seguenti esami:

Test di soppressione notturna con 1 mg di desametasone (test di Nugent o 1-mgDST)

E' uno dei principali test, molti autori [77,88,89] utilizzano l' 1 mg perché è un test semplice che non richiede l'ospedalizzazione. Il livello di cut-off è, però, oggetto di controversie: il tradizionale cut-off di 5 µg/dl proposto dal NIH consensus statement [90] fu elaborato negli anni sessanta. E' basato sul saggio fluorimetrico Mattingly che sovrastimava la concentrazione di cortisolo sierico se confrontato con l'attuale saggio immunologico [91], per questo potrebbe sottostimare la frequenza di lieve eccesso di glucocorticoidi in pazienti con incidentaloma surrenalico. Conseguentemente, alcuni esperti proposero di usare un livello di cut-off più basso in modo di aumentare la sensibilità del metodo. Comunque quando viene impiegato un livello di cut-off più basso, il test dimostra un numero di falsi positivi più elevato anche nei soggetti sani [92] e perciò una più bassa specificità.

Due studi [93,94] hanno valutato l'accuratezza del test di soppressione notturna con 1-mgDST confrontando due punti di cut-off per il cortisolo sierico (3 µg/dl vs 1.8 µg/dl) con la scintigrafia surrenalica in pazienti con incidentaloma surrenalico. La sensibilità stimata per la soglia di 3 µg/dl risultava solo del 58% con una specificità del 100%. Con un più basso cut-off di 1.8 µg/dl la sensibilità migliorava fino al 100% nello studio di Valli et al [93] e del 75% in quello di Barzon et al [94], ma la specificità si riduceva all'85% e al 72% rispettivamente.

Per questo la principale indicazione per l'1-mgDST potrebbe essere eliminare i pazienti che non necessitano di ulteriori valutazioni utilizzando la soglia di 1.8 µg/dl.

Test di soppressione con desametasone a basse dosi (test di Liddle)

La somministrazione di 0.5 mg di desametasone ogni 6 ore per 8 dosi (2 mg al giorno per 2 giorni) in soggetti sani inibisce completamente la secrezione di ACTH e cortisolo. L'effetto soppressore si rileva misurando in seconda giornata l'escrezione del cortisolo

urinario (v.n.<10 µg/24h) ed in terza giornata al mattino la secrezione di cortisolo (cortisolo plasmatico <1.8 µg/dl).

Il test di soppressione con desametasone a basse dosi (LDDST) è stato a lungo utilizzato nella diagnosi di sindrome di Cushing avendo sia un'alta sensibilità che specificità (97-100%,98-100%) [91,95]. Finora è stato valutato solo in pochi studi in pazienti con incidentaloma surrenalico [96-99].

Sebbene soggetti normali abbiano una concentrazione non dosabile di cortisolo post LDDST, in pazienti con incidentaloma surrenalico si osserva un range di concentrazioni dosabile fino a 5 µg/dl [96]. Ciò potrebbe suggerire la possibilità che esso sia una misura del grado di autonomia residua (non ACTH dipendente) di secrezione di glucocorticoidi. E' da considerare che un appropriato cut-off per questo test in pazienti con incidentaloma surrenalico condizionante ipercortisolismo subclinico resta ancora in discussione. Differenti cut-off per i livelli di cortisolo sono stati proposti variando da 2.5 a 5 µg/dl [74,97,99].

Secondo Tsagarakis et al [81] una concentrazione di cortisolo di 2.5 µg/dl, sebbene arbitraria, correla bene con l'autonomia funzionale delle masse surrenaliche, mostrando inoltre che la valutazione di eccesso di cortisolo secondo questi criteri è clinicamente rilevante almeno per quanto riguarda la soppressione di ACTH, l'aumento dell'MSC, la dislipidemia e il metabolismo osseo [98,100].

Cortisolo libero urinario delle 24 ore (CLU)

Nella sindrome di Cushing questo test è poco sensibile con una percentuale di falsi negativi tra il 5% e l'11% [95,101]. Deve essere eseguito su raccolte multiple [102] e, inoltre, in pazienti con concomitanti disturbi psichiatrici [103] o condizioni associate con la sindrome metabolica come pazienti obesi con ovaio policistico [104], possono essere osservati falsi positivi.

Nei pazienti con AI e SH la produzione di cortisolo giornaliero non è sufficientemente aumentata per riflettersi in un rialzo del CLU [105] e perciò è l'alterazione meno riscontrata, 0.8% al 22% dei casi, ed è l'ultima in ordine di comparsa, che si osserva nei pazienti con SH [106].

Cortisolo sierico a mezzanotte (MSC)

Un elevato livello di cortisolo a mezzanotte e la perdita del ritmo circadiano sono tra le più frequenti alterazioni osservate nei pazienti con AI [106,107,77,79,108]. Dato che, nei pazienti con sindrome di Cushing, l'MSC è stato suggerito come marker più precoce e sensibile di eccesso di glucocorticoidi [109,110], si è pensato potesse essere applicato anche all'ipercortisolismo subclinico. Nonostante a riguardo ci siano solo pochi studi, sembra che l'MSC sia un marker abbastanza sensibile nell'identificare gli effetti metabolici dell'SH. Infatti, è stata riportata una correlazione tra l'insulino-resistenza, la glicemia dopo OGTT [107] e la presenza di alcune caratteristiche del cluster della sindrome metabolica nei pazienti con un MSC elevato [111]. Recentemente Terzolo et al [112] suggeriscono un cut-off di 5,4 µg/dl per definire l'SH nei pazienti con AI riportando in questo gruppo un'alta prevalenza di fattori di rischio cardiovascolari.

Cortisolo salivare

E' un ottimo indice per rilevare il cortisolo libero biologicamente attivo e ne riflette la concentrazione ematica. Può essere utile per differenziare soggetti con ipercortisolismo da soggetti normali o con pseudo-Cushing (condizioni che possono presentarsi con lo stesso fenotipo "cushingoide", come sindromi depressive o nei casi di alcolismo cronico). Valori ripetuti di cortisolo $>0.22 \mu\text{g/dl}$ (6 nmol/L) sono stati proposti come indice di ipercortisolismo; valori tra 0.11 e $0.22 \mu\text{g/dl}$ sono meno specifici e richiedono ulteriori indagini [113]. E' stato tuttavia segnalata in letteratura la necessità di creare tuttavia dei cut-off presso ogni centro di riferimento poiché tale esame risulta molto variabile a seconda della metodica utilizzata (DELPHIA, RIA, ELISA, LC-MS/MS). Nella valutazione dell'ipercortisolismo subclinico, dai pochi dati disponibili, non sembra essere un marker adeguato [114,115].

CRH test

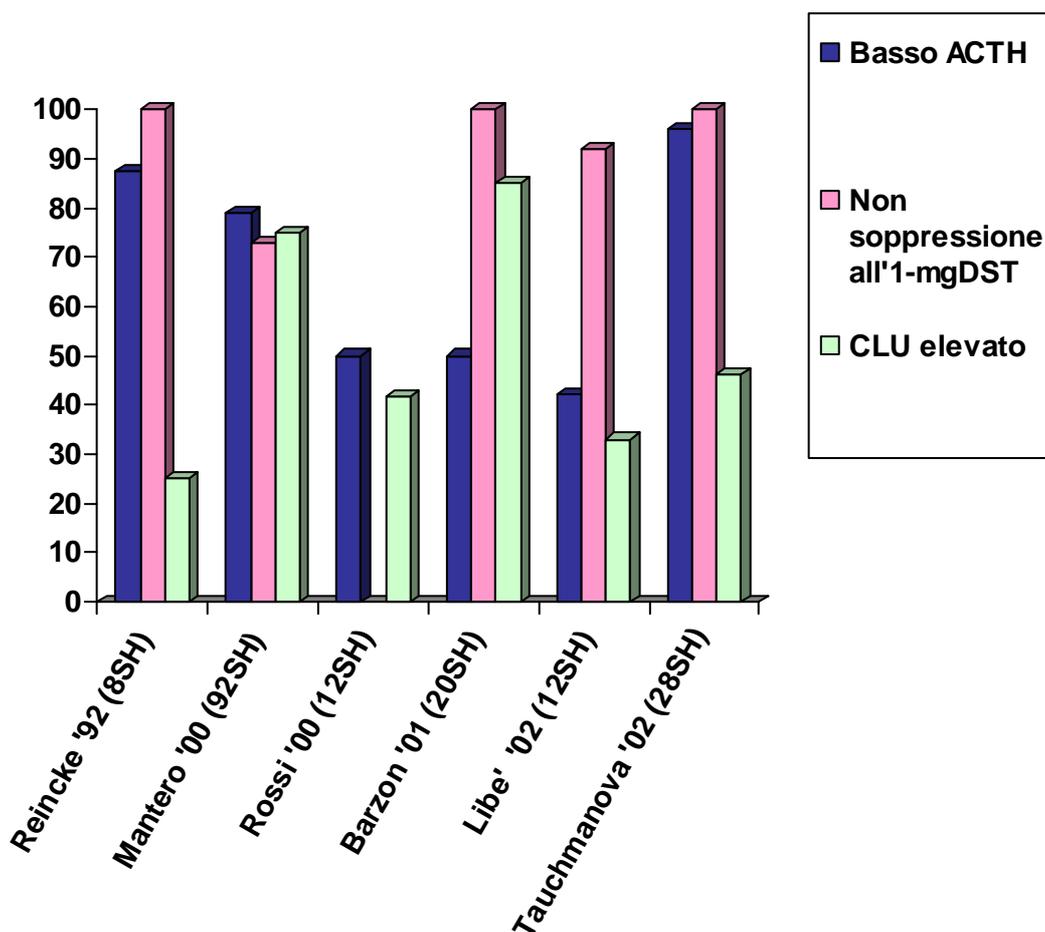
È stato valutato come strumento per determinare l'autonomia surrenalica. In numerosi studi una proporzione variabile di pazienti con AI (7.5-62%) sembra presentare una risposta attutita [33,39,77,97,116,117]. I primi studi avevano inoltre suggerito che questa blanda risposta potesse essere un indicatore sensibile per lo sviluppo di insufficienza surrenalica post-chirurgica [106], ma ultimamente la sua utilità è stata messa in dubbio. Basandoci su dati recenti, sembra che il CRH test non aggiunga informazioni significative ai livelli di ACTH basali [107,77,79,97]. Inoltre Mantero et al [33] mostrano come la sensibilità stimata del CRH test nell' identificare gli SH (definito dalla presenza di almeno due anomalie dell'asse HPA) sia solo del 55% con un potere predittivo positivo (PPV) del 42%.

Altri markers ormonali

Un livello di ACTH basso è stato riscontrato nel 10-30% degli incidentalomi surrenalici e alcuni esperti considerano i livelli di ACTH soppresso come un'indicazione alla chirurgia [118]. In realtà si dovrebbe prestar attenzione al fatto che i saggi utilizzabili commercialmente, specialmente i RIA (saggi radio-immunologici), non sono affidabili nello stimare una bassa concentrazione di ACTH e che, anche nei pazienti con sindrome di Cushing ACTH indipendente, la concentrazione di ACTH plasmatico è risultata dosabile o nel range di norma rispettivamente nel 58% e nel 28% dei soggetti [102].

Ciò che si riscontra anche con notevole frequenza (30-87%), nei pazienti con AI, è un basso livello di DHEAS. Se ciò rifletta la soppressione della secrezione di ACTH dovuta alla produzione autonoma di cortisolo o se sia imputabile ad alcune disregolazioni di enzimi intratumorali non è ancora stato ancora del tutto chiarito. Tsagarakis et al [98], mostrano che il DHEAS sierico correla in maniera significativamente inversa con i livelli di cortisolo post Nugent e in modo diretto con i livelli di ACTH, supportando l'ipotesi che la produzione di cortisolo autonomo e la risultante inibizione dell'asse HPA ne siano, almeno parzialmente, responsabili. Di contro, però, va sottolineato come, considerata anche l'età media dei pazienti con incidentaloma surrenalico, i livelli di DHEAS sono lontani dall'essere un marker di attività ormonale negli AI in quanto normalmente diminuiscono con l'aumentare dell'età [99].

Figura 5



Prevalenza di ridotto ACTH, mancata soppressione al test di soppressione con 1mg di desametasone alle ore 23.00 e alterato CLU in differenti casistiche [106, 33, 74, 94, 67, 119].

Scintigrafia surrenalica con I-Col

Storicamente la scintigrafia surrenalica è stata lo strumento diagnostico che conduceva all'identificazione dell'SH tra i pazienti con incidentaloma [72,120]. Recentemente tuttavia è stata usata solo in alcuni studi come test per determinare l'autonomia funzionale [93, 121, 122]. Infatti, sebbene l'imaging con radionuclidi fornisca

un'informazione morfofunzionale, esposizione il paziente ad alte dosi di radiazioni e pertanto il suo utilizzo è consigliato soltanto in casi selezionati. Molti studi hanno documentato una relazione tra il pattern scintigrafico e la valutazione ormonale della secrezione di cortisolo nei pazienti con AI [38,122-125]. Usando la scintigrafia con radiocolesterololo tre pattern scintigrafici possono essere osservati:

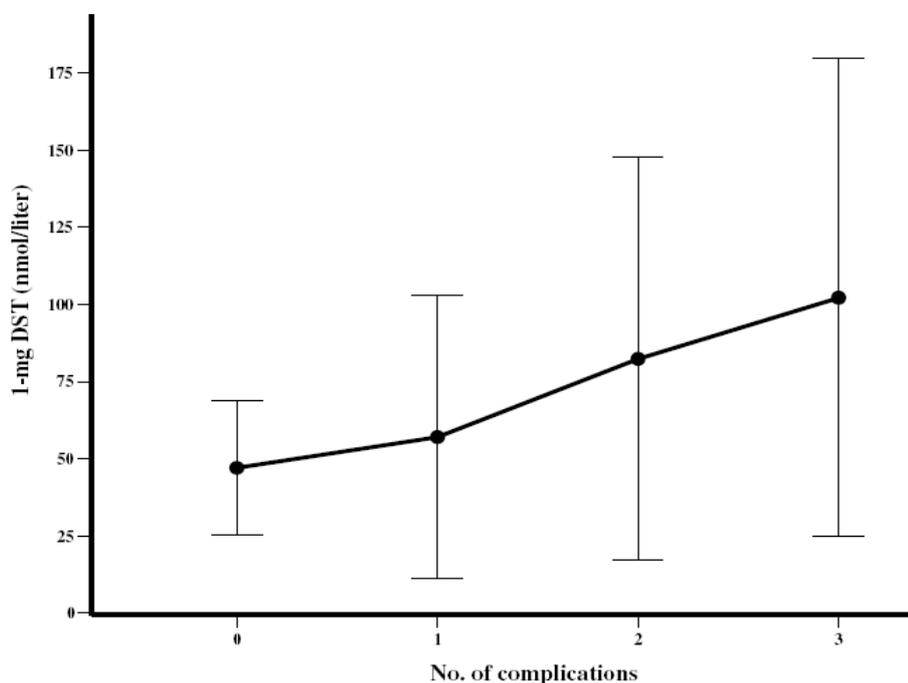
- 1) un pattern discordante: può esserci un'assenza, un decremento o un distorto uptake da parte della massa presentato dall'imaging morfologico; questo pattern è consistente con la presenza di uno spazio occupante o una lesione distruttiva;
- 2) un pattern non lateralizzato: indica un normale uptake surrenalico simmetrico;
- 3) un pattern concordante: rivela un incrementato uptake del tracciante nel sito della massa.

Questo ultimo pattern è considerato indicativo di autonomia funzionale. In realtà se la scintigrafia fosse utilizzata come unico criterio [93, 121], più della metà dei pazienti avrebbero l'SH. Perciò, l'utilità della lateralizzazione dell'uptake rimane discutibile, come la specificità della procedura, dato che la concordanza della captazione potrebbe esserci nonostante la normalità biochimica. Una risposta alla presenza di falsi positivi è stata proposta da Osella et al [77] dimostrando che l'uptake dell'NP-59 è proporzionale al diametro della ghiandola surrenalica e non necessariamente rappresenta il suo stato funzionale. Mentre Donadio et al [122] in uno studio retrospettivo riportano come, valori superiori al 75% di delta di captazione percentuale (differenza percentuale tra la captazione della ghiandola affetta e quella controlaterale nei diversi giorni espressi come media) siano in grado di individuare con una sensibilità e una specificità rispettivamente dell'81.5% e 86.7% la presenza d' ipercortisolismo subclinico.

Validazione dei criteri diagnostici su parametri clinici:

Partendo dal presupposto che l'ipercortisolismo subclinico, nonostante l'assenza di segni clinici specifici, è stato associato ad un'aumentata prevalenza di diabete mellito, ipertensione arteriosa e di osteoporosi, uno studio recente ha valutato in 231 pazienti con incidentaloma surrenalico la correlazione tra diversi parametri di funzione cortico-surrenalica (diverse combinazioni tra ACTH ridotto, CLU elevato e cortisolo dopo 1-mgDST a diversi cut-off di 1.8, 3 e 5 µg/dL) e la presenza contemporanea di queste possibili complicanze croniche, indice indiretto di patologia [126]. Gli autori hanno riscontrato che il criterio caratterizzato dalla presenza di almeno 2 criteri tra livelli di cortisolo libero urinario aumentati (CLU) > 70 µg/24h; cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1-mg di desametasone (1-mgDST) > 3.0 µg/dL e bassi livelli di ACTH (< 10 pg/mL) era quello che mostrava il miglior compromesso tra sensibilità (61.9%) e specificità (77.1%) e una buona accuratezza (75.8%) nel predire l'insorgenza di complicanze croniche, e che quindi poteva essere suggerito come valido come criterio diagnostico. Gli autori inoltre hanno osservato una correlazione diretta tra i livelli di cortisolo dopo test di soppressione con 1-mgDST e il numero di complicanze associate (figura 6).

Figura 6



Correlazione tra i livelli di cortisolo dopo test di inibizione con 1-mg di desametasone ed il numero di complicanze croniche associate (Figura tratta da Morelli et al. 2010).

Prevalenza

In letteratura vi è un'ampia variabilità nella prevalenza riportata di SH tra i pazienti con AI. Questa, è principalmente imputabile ai criteri applicati per la definizione di SH che differiscono tra i diversi studi (Tabella 1). Utilizzando solamente il test di Nugent, la prevalenza riportata di SH va dall'1 al 25%, a seconda dei diversi cut-off di normalità considerati, quando due o più anomalie sono richieste la prevalenza varia dal 5.7 al 30%. È inoltre da segnalare la discordanza esistente anche negli studi che utilizzano gli stessi criteri. Ciò potrebbe esser spiegato dalle differenze nei criteri di inclusione e dai bias nella selezione dei pazienti.

Perciò negli studi che includono solo pazienti con adenoma, presumibilmente benigni, la prevalenza riportata di SH è più alta rispetto a quelli che includono anche masse producenti catecolamine o aldosterone [26,98,127,128]. In aggiunta, dato che il sospetto di malignità è il principale criterio per l'intervento, gli studi chirurgici riportano una bassa percentuale di SH dato che la loro popolazione studiata include una frequenza relativamente più alta di adenocarcinoma o di secondarismi [129,130]. Fino a che non venga ottenuto un criterio condiviso per la definizione di SH, la vera prevalenza di produzione di cortisolo autonoma da parte di masse surrenaliche di riscontro incidentale rimarrà sconosciuta. Complessivamente è evidente che una leggera anormalità isolata dell'asse HPA esiste in una proporzione sostanziale di pazienti con incidentaloma surrenalico. Malgrado studi riportanti un follow-up a lungo termine di pazienti con incidentaloma surrenalico, il rischio di trasformazione maligna, l'aumento dimensionale e lo sviluppo di un'iperfunzione ormonale nel tempo rimane ancora da valutare con certezza.

Questo è principalmente dovuto al fatto che i principali studi hanno un numero piccolo di pazienti e una durata breve di follow-up (in media 3 anni, range 1-7 anni). Sono necessari studi prospettici con un lungo tempo di osservazione. Dato che gli adenomi benigni restano stabili o progrediscono molto lentamente, potrebbe passare anche un periodo di 10 anni prima che l'ipersecrezione diventi clinicamente evidente.

Negli studi esistenti, la percentuale di pazienti che sviluppano un'iperfunzione durante il follow-up va dallo 0 all'11% [17,25,66,76-78,81]. Questi risultati sono altamente dipendenti dai criteri utilizzati e in assenza di criteri ampiamente accettati è impossibile trarre conclusioni.

Tabella 1- Prevalenza di SH in casistiche con almeno 50 pazienti con incidentaloma surrenalico.

Studio	N	Criteri di SH	% SH
Reincke, 1992 [106]	68	1-mgDST>3µg/dl	12
Kasperlik-Zeluska, 1997 [39]	208	LDDST>2mg/24h +HDDST	2.9
Tsagarakis, 1998 [96]	61	LDDST>2.5µg/dl	25
Rossi, 2000 [74]	65	LDDST>3µg/dl+1 tra CRH, CCR, ACTH, CLU	18.5
Mantero, 2000 [33]	1004	2 tra 1-mgDST>5µg/dl, CRH, CCR, ACTH, CLU	9.2
Favia, 2000 [130]	158	1-mgDST>5µg	5.1
Grossrubatscher, 2001 [66]	53	1-mgDST>5µg	5.7
Bulow, 2002 [128]	381	1-mgDST>5µg	1
Libè, 2002 [67]	64	2 tra 1-mgDST>5µg/dl, CRH, CCR, ACTH, CLU	18.8
Chiodini 2004 [131]	70	2 tra 1-mgDST>3µg/dl, ACTH, CLU	30
Masserini, 2009 [114]	103	2 tra 1-mgDST>3µg/dl, ACTH, CLU	21.4

Complicanze croniche

La secrezione di cortisolo da parte di un incidentaloma surrenalico può variare secondo un ampio spettro di intensità. Inoltre, la presenza di fattori di rischio acquisiti o geneticamente determinati, associati con la differente sensibilità individuale dei vari organi ai glucocorticoidi, possono dar luogo ad un quadro di alterazioni metaboliche molto vario.

Attualmente in letteratura vi è un ampio dibattito sui possibili effetti negativi di una lieve ipersecrezione di cortisolo. Mantero et al [33], ad esempio, in uno studio retrospettivo su 1004 soggetti con SH non osservarono una prevalenza significativa di ipertensione, diabete e obesità rispetto alla popolazione generale (Tabella 2).

Tabella 2- Prevalenza di ipertensione, diabete, obesità in pazienti con SH vs popolazione generale.

	PAZIENTI CON SH (%)	POPOLAZIONE GENERALE (%)
IPERTENSIONE	41	MASCHI 33
		FEMMINE 31
DIABETE	10	MASCHI 9
		FEMMINE 6
OBESITA'	28	MASCHI 18
		FEMMINE 22

In un altro studio [107] si è cercato di determinare l'azione predisponente o determinante dell'SH sulla comparsa di tali patologie in pazienti normoglicemici e non obesi. E' emersa un'alta prevalenza di ridotta tolleranza al glucosio (36%) e di diabete mellito non precedentemente diagnosticato (5%) rispetto ai controlli. La ridotta tolleranza al glucosio osservata nello studio è associata a ridotta sensibilità insulinica, valutata calcolando l'Indice di Sensibilità Insulinica (ISI) dopo test da carico con glucosio come descritto dallo studio di Matsuda e De Fronzo [132]. L'indice di sensibilità insulinica è risultato correlato in maniera inversa con i livelli di cortisolo sierico a mezzanotte.

I risultati di questo studio confermano ed estendono quelli precedentemente ottenuti da Fernandez-Real nel 1998 [133] e da Garrapa nel 2001 [134]. Dal primo studio [133], condotto su 64 pazienti con incidentaloma surrenalico, è emersa una prevalenza di IGT

(27%) e diabete mellito franco (34%) significativamente maggiore rispetto alla popolazione generale. Mentre Garrapa et al [134] hanno invece messo a confronto alcuni parametri antropometrici, ormonali e metabolici di 22 donne con incidentaloma surrenalico con quelli di 15 donne con sindrome di Cushing e con un gruppo di controllo normale; i tre gruppi di pazienti sono stati inoltre sottoposti a TC total body per la valutazione del grasso sottocutaneo e per la misura della quantità di grasso viscerale a livello di L4-L5; la percentuale di grasso viscerale nelle donne con incidentaloma è risultata inferiore rispetto al gruppo con sindrome di Cushing, ma superiore rispetto ai controlli; confrontando anche la prevalenza di ipertensione e intolleranza al glucosio, il grado di alterazioni riscontrate nelle donne con AI risultava intermedio tra il gruppo di controllo normale e il gruppo affetto da sindrome di Cushing, suggerendo l'ipotesi che la lieve ipersecrezione di cortisolo, secondaria a parziale autonomia funzionale della massa surrenalica, possa essere responsabile delle alterazioni metaboliche e antropometriche riscontrate.

Anche gli aumentati livelli di trigliceridi e LDL [135] ed i ridotti livelli di HDL evidenziati nei pazienti con SH, possono essere ricondotti alla ridotta sensibilità insulinica. I dati ottenuti hanno permesso di supportare l'ipotesi che l'eccesso di cortisolo sia in grado di influenzare i livelli di insulina indipendentemente dall'obesità, contribuendo di per sé all'iperinsulinemia.

I livelli di fibrinogeno risultano spesso aumentati, determinando ipercoagulabilità, come si evince dalla valutazione dei markers fibrinolitici ed emostatici (fibrinogeno, PAI-1, t-PA, vWF-Ag) in pazienti con s. di Cushing (almeno un parametro alterato nel 55% dei soggetti) e con incidentaloma surrenalico (almeno un parametro alterato nel 42% dei soggetti). Queste alterazioni costituiscono un ulteriore fattore di rischio per eventi cardiovascolari e tromboembolici [136].

La pressione arteriosa, sia sistolica che diastolica, si è rivelata significativamente aumentata nei soggetti con incidentaloma surrenalico rispetto ai controlli, ma non è ancora chiaro il meccanismo fisiopatologico che può correlare tale riscontro con l'insulino-resistenza e la risultante iperinsulinemia.

Nel tentativo di quantificare gli effetti delle alterazioni biochimico-metaboliche sopracitate in termini di aumentata mortalità cardiovascolare sono stati condotti numerosi studi. Tauchmanova et al [119], ad esempio, hanno valutato 28 soggetti con incidentaloma surrenalico condizionante SH riscontrando una prevalenza elevata di alcune complicanze della sindrome metabolica e un'alterazione dei parametri della coagulazione. L'impatto di tali alterazioni sul sistema cardiovascolare è stato documentato da significative modifiche dell'intima e della media carotidea con aumento di tessuto adiposo viscerale, evidenziate mediante eco-doppler dei vasi carotidei.

Inoltre, recentemente, diversi studi [137-139] hanno dimostrato un aumento del rischio cardiovascolare anche in pazienti con adenoma surrenalico non funzionante, a riprova del fatto che gli attuali criteri per la diagnosi di ipercortisolismo subclinico potrebbero non essere adeguati per predire le eventuali complicanze a lungo termine derivanti da questa patologia.

Il lieve ipercortisolismo dovuto all'autonomia funzionale di un adenoma surrenalico si può ripercuotere non solo sul sistema cardiovascolare, ma anche su quello scheletrico [140].

I dati della letteratura finora pubblicati a riguardo sono contrastanti e derivano prevalentemente da studi trasversali. Un primo lavoro su 32 donne con incidentaloma surrenalico dimostrava che le pazienti con ipercortisolismo subclinico, definito sulla base di livelli elevati di cortisolo libero urinario, avevano una densità minerale ossea inferiore a quella delle pazienti senza evidenza di ipercortisolismo in tutte le sedi

studiate [141]. Tale dato è stato confermato anche in uno studio effettuato su 38 maschi eugonadici con ipercortisolismo subclinico e incidentaloma surrenalico [142], e in altri 2 studi su pazienti di entrambi i sessi con sindrome di Cushing clinica e subclinica [143, 144]. Al contrario, altri autori non hanno riscontrato effetti negativi dell'ipercortisolismo subclinico sulla massa ossea [74,145]. Hadjiadakis et al [100], studiando una popolazione di 42 donne con incidentaloma surrenalico tutte in post-menopausa hanno dimostrato che una lieve riduzione della massa ossea nelle pazienti con ipercortisolismo subclinico era presente solo in alcune sedi femorali, ma non al rachide lombare. Chiodini et al [146], al contrario, in uno studio longitudinale, documenta una maggior perdita di massa ossea in 24 donne con ipercortisolismo subclinico anche a livello del rachide lombare, indipendentemente dallo stato gonadico. Dal momento che la massa ossea viene considerata negli ultimi anni soltanto come uno tra i fattori determinanti di rischio di frattura vertebrale e di femore, recentemente sono emersi diversi studi volti ad analizzare la prevalenza di tali fratture nei pazienti con adenomi corticosurrenalici con o senza evidenza biochimica di ipercortisolismo subclinico. Alcuni autori hanno persino dimostrato che nei pazienti con SH la prevalenza di fratture vertebrali era aumentata indipendentemente dalla densità minerale ossea [131, 147] e che buona parte di questi pazienti andavano incontro a fratture nonostante una normale o soltanto osteopenia BMD [147], suggerendo che anche un eccesso lieve di cortisolo può portare a una riduzione della qualità ossea come avviene nelle forme conclamate [148]. Sfortunatamente la microarchitettura ossea può essere valutata direttamente soltanto mediante istomorfometria su biopsia ossea, metodica invasiva, o mediante microTC [149, 150]. Tuttavia lo spinal deformity index (SDI), un parametro che integra sia il numero che la severità delle fratture vertebrali sommando il grado di deformazione delle vertebre lungo la colonna da T4 a L4 [151,152], è stato

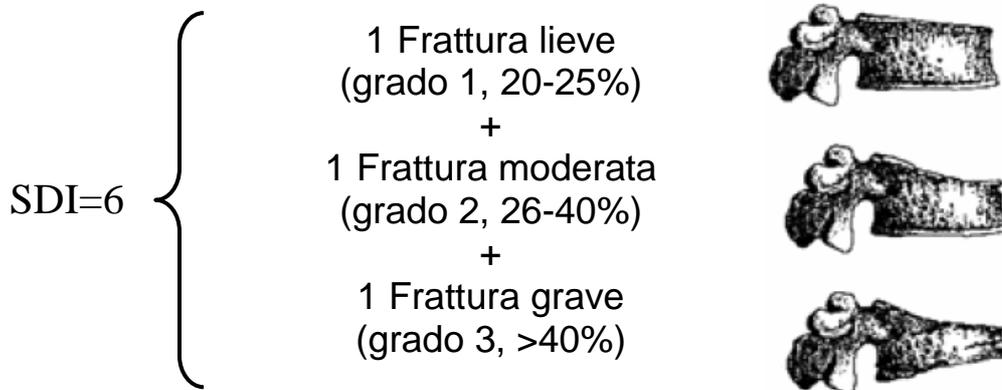
proposto come surrogato della qualità dell'osso e del rischio di frattura stesso [153-155], (figura 7). Uno studio recente ha dimostrato in un ampio gruppo di pazienti che l'SH è associato ad una ridotta densità ossea, ad una aumentata prevalenza di fratture vertebrali e ad un peggior SDI e che l'SH, indipendentemente dall'età e dalla massa ossea, predice il peggioramento dello SDI e l'aumentata prevalenza di fratture [156].

Questi fenomeni sono dovuti al fatto che i glucocorticoidi esercitano sull'osso diversi effetti di cui alcuni diretti come la riduzione dell'osteoblastogenesi, l'aumento dell'apoptosi degli osteociti e forse un'attivazione degli osteoclasti (figura 8), ed altri indiretti come un'inibizione dell'assorbimento intestinale di calcio, attraverso meccanismi che ostacolano l'azione della vitamina D, e un'inibizione del riassorbimento tubulare renale di calcio e ad un possibile sviluppo di iperparatiroidismo secondario. Anche gli studi isto-morfometrici hanno dimostrato inoltre in presenza di glucocorticoidi una riduzione del turnover osseo [148]. Riguardo ai markers biochimici di rimaneggiamento osseo, gli studi finora pubblicati concordano nel riportare una lieve ma significativa riduzione di quelli di apposizione, mentre risultati contrastanti sono stati riportati per i markers di riassorbimento [140,157-159]. (Tabella 3). Infine l'effetto dei glucocorticoidi si esplica anche attraverso una riduzione della forza muscolare e allo sviluppo di alterazioni del SNC che si riflettono in una maggior tendenza alla caduta e quindi in un aumento del rischio di frattura.

E' quindi probabile, che la presenza di un adenoma corticosurrenalico condizionante ipercortisolismo subclinico porti a perdita di massa ossea e ad aumento del rischio di fratture. La variabilità dei risultati ottenuti è probabilmente da imputare a differenze nella selezione della casistica, a differenze nel disegno dello studio, ma soprattutto alle relativamente ridotte dimensioni degli studi stessi. Inoltre, non vi sono sufficienti dati

relativi agli effetti su massa e turnover osseo indotti dalla rimozione chirurgica dell'adenoma né sull'incidenza di nuove fratture nei pazienti con SH.

Figura 7



Esempio di calcolo dello SDI derivato dalla somma di tre fratture vertebrali rispettivamente di grado 1, 2 e 3, secondo metodo proposto da Genant et al.

Figura 8

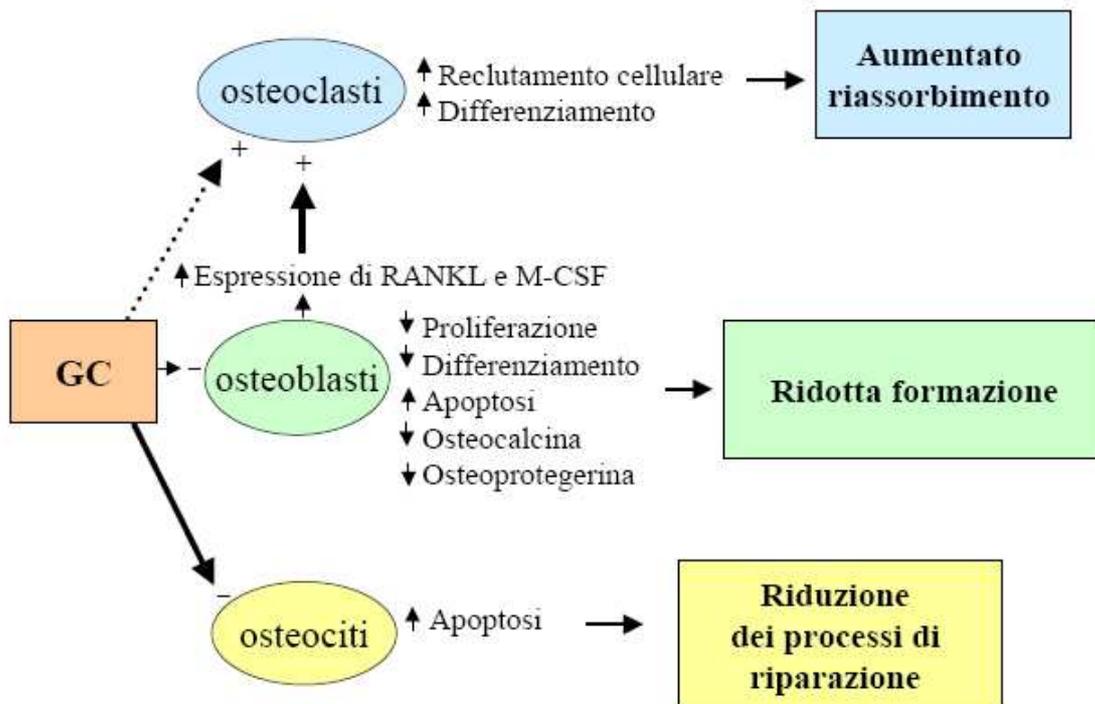


Diagramma degli effetti diretti dei glucocorticoidi sulle cellule ossee tratto da Mazziotti et al. e modificato [148].

Tabella 3 -Interessamento osseo in pazienti con incidentaloma surrenalico con e senza ipercortisolismo subclinico

Studio	Disegno	No (F/M)	SH-/SH+	Eug/Ipog	Marker Apposizione		Marker Riassorbimento		Massa ossea				
					BGP	ALP	ICTP	DPyr	LS QCT	LS DXA	FN DXA	FGT DXA	QUS
Osella, 1997	Cross-sectional controlled	22 (13/9)	-	-	↓	-	↑	-	-	-	-	-	-
Sartorio, 1998	Cross-sectional controlled	41 (27/14)	35/6	-	↓	-	↓	-	-	-	-	-	-
Torlontano, 1999	Cross-sectional controlled	32 (32/0)	24/8	8/24	↓	N	N	N	-	↓	↓	-	-
Rossi, 2000	Cross-sectional	(18)	6/12	-	-	-	-	-	-	N*	N*	-	-
Osella, 2001	Cross-sectional controlled	27 (18/9)	19/8	-	-	-	-	-	-	N	N	-	-
Chiodini, 2001	Longitudinal	24 (24/0)	17/7	8/16	N	-	-	N	↓	↓	N	-	-
Tauchmanová, 2001	Cross-sectional controlled	19 (11/8)	0/19	19/0	-	N	-	-	-	↓	↓	-	↓
Francucci, 2002	Cross-sectional controlled	23	21/2	5/18	↓	N	-	N	-	N	N	-	-
Chiodini, 2002	Cross-sectional controlled	38 (0/38)	25/13	38/0	N	-	-	N	-	↓	N	-	-
Bardet, 2002	Cross-sectional	35 (22/13)	21/14	13/22	N	-	-	N	-	↓	↓	-	-
Hadjidakis, 2003	Cross-sectional	42 (42/0)	24/18	0/42	↓	-	-	-	-	N	↓	↓	-
Chiodini, 2004	Cross-sectional controlled	70 (70/0)	49/21	21/49	-	-	-	-	↓**	-	-	-	-
Chiodini, 2009	Cross-sectional controlled	88 (0/88)	66/22	88/00	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-
Chiodini, 2009	Cross-sectional controlled	287 (176/111)	202/85	184/103	-	-	-	-	-	↓	↓	-	-

Tabella tratta da Chiodini et al 2008 e modificata [160].

Nel tentativo di comprendere quale sia il link tra la presenza di un lieve eccesso di cortisolo e lo sviluppo così eterogeneo di queste complicanze sono stati identificati due fattori importanti:

1) Polimorfismi recettoriali

Recentemente sono stati identificati alcuni polimorfismi del recettore dei glucocorticoidi tra cui BclI e N363s che porterebbero ad una maggiore sensibilità all'azione del cortisolo sia esogeno che endogeno e che quindi sarebbero più

frequentemente associati allo sviluppo di patologie quali l'obesità viscerale, la sindrome metabolica, il diabete, l'ipertensione e la riduzione della massa ossea. In particolare, in uno studio condotto su 100 pazienti con incidentaloma surrenalico, e quindi con un potenziale eccesso di cortisolo, è stata osservata un'associazione tra la contemporanea espressione del polimorfismo di N363S in eterozigosi e di BclI in omozigosi e la presenza di ipertensione arteriosa e fratture vertebrali [161,162].

2) Deficit di GH

E' noto come l'ipercortisolismo conclamato, sia di natura endogena (sindrome di Cushing) che esogena (terapia con glucocorticoidi) determini una riduzione della secrezione di ormone della crescita (GH) probabilmente a causa di un aumento del tono somatostatinergico e/o di una riduzione del rilascio di GHRH [163-165]. Un altro possibile meccanismo ipotizzato vedrebbe un effetto inibitorio diretto dei glucocorticoidi sulle cellule somatotrope [166]. Questo deficit di GH è stato coinvolto nella patogenesi di alcune complicanze croniche correlate all'ipercortisolismo, come l'obesità viscerale, la riduzione della forza muscolare e l'osteoporosi. Negli adulti, infatti, il deficit completo o parziale di GH è correlato ad un'anomala distribuzione del grasso corporeo, ad un peggioramento della qualità della vita, all'aumentata prevalenza di eventi cardiovascolari ed alla riduzione della massa ossea [167-168]. Quest'ultima in particolar modo sembra essere correlata alla riduzione del rimodellamento osseo e dell'attività osteoblastica, provocando quindi un indebolimento dell'osso ed un incremento delle fratture. Inoltre, il grado dell'alterazione della massa ossea sembra essere direttamente correlato alla severità del deficit di GH. Tuttavia l'esatto impatto del deficit di GH sul metabolismo osseo non è chiaro per la presenza di diversi fattori confondenti. Molti dei pazienti studiati infatti hanno altri deficit ipofisari associati come l'iposurrenalismo e ricevono quindi terapie come i corticosteroidi che possono a loro

volta influire negativamente sulla massa ossea o presentano un ipogonadismo il quale può contribuire alla riduzione della BMD. D'altra parte, nonostante questi fattori confondenti, il deficit di GH sembra avere un ruolo chiave nello sviluppo di osteopenia e fratture dato che i pazienti con deficit di GH isolato hanno modificazioni ossee simili ai pazienti con deficit ormonali multipli [169].

Analogamente a quanto riportato nei pazienti con ipercortisolismo conclamato, anche nei soggetti con ipercortisolismo subclinico si potrebbe verificare un deficit della secrezione di GH che potrebbe contribuire, nel tempo, alla patogenesi di alcune complicanze croniche associate a questa condizione.

Per valutare la secrezione di GH in pazienti con ipercortisolismo subclinico, sino ad oggi è stato condotto un solo studio non controllato su una piccola casistica comprendente sia pazienti con sindrome di Cushing che soggetti con incidentaloma surrenalico normofunzionante o condizionante ipercortisolismo subclinico [170]. Tale studio ha confermato la presenza di deficit di GH nel gruppo di soggetti con sindrome di Cushing ma non nel piccolo gruppo di pazienti con ipercortisolismo subclinico. Tuttavia i limiti di questo studio sono legati alla ridotta numerosità e dalla mancanza di un gruppo di controllo di soggetti sani o con incidentaloma surrenalico senza ipercortisolismo subclinico. Infine, non vi sono dati sulla modificazione eventuale della secrezione di GH in pazienti sottoposti ad asportazione dell'adenoma surrenalico condizionante ipercortisolismo subclinico.

Terapia dell'ipercortisolismo subclinico

Considerevoli controversie sono nate nell'ambito di un'appropriata gestione di pazienti con incidentaloma surrenalico condizionante ipercortisolismo subclinico.

Sia la surrenectomia che un'attenta osservazione nel tempo sono entrambe strategie attuabili. Al momento in letteratura non sono disponibili dati chiaramente a favore o contro una delle due opzioni.

Negli ultimi anni alcuni studi d'intervento, hanno suggerito come la terapia chirurgica in pazienti con incidentaloma surrenalico ed ipercortisolismo subclinico possa determinare un miglioramento delle eventuali complicanze croniche associate a tale condizione, soprattutto in termini di riduzione della pressione arteriosa, della glicemia e del peso corporeo, mentre un approccio osservazionale porterebbe ad un loro peggioramento [73,107,118,171,173,174]. Tali complicanze, tuttavia, sembrano migliorare dopo surrenectomia anche in alcuni pazienti senza SH, suggerendo che i criteri attualmente utilizzati per la diagnosi non sono in realtà sufficientemente sensibili per identificare i pazienti che potrebbero trarre beneficio dall'intervento [175].

Questi studi sono stati condotti con il duplice intento di 1) valutare l'effetto del trattamento chirurgico sulle complicanze croniche confrontando gruppi di pazienti affetti operati con gruppi di pazienti con la stessa diagnosi ma seguiti nel tempo con un approccio di tipo conservativo; 2) definire l'appropriatezza della diagnosi e quindi l'utilità clinica, confrontando gruppi di pazienti con adenoma surrenalico operati con SH con gruppi di pazienti operati in base ai soli criteri dimensionali.

Uno studio ideale dovrebbe contemplare l'analisi di entrambi questi punti, e quindi essere condotto con un disegno di tipo prospettico-randomizzato prevedendo la presenza di 4 gruppi omogenei di pazienti con adenoma surrenalico: un primo gruppo di soggetti con affetti da SH operati, un secondo gruppo di pazienti affetti seguiti con approccio conservativo, un terzo gruppo di pazienti non affetti operati ed un quarto gruppo non affetti seguiti in follow-up.

STUDIO

1. Scopo dello studio

Scopo dello studio è valutare in un gruppo eterogeneo di pazienti con incidentaloma surrenalico con e senza SH le variazioni della massa ossea, l'incidenza delle fratture vertebrali e le modificazioni dello SDI in 2 anni di follow-up.

Valutare inoltre i livelli di IGFI e la riserva secretoria e GH in un sottogruppo di pazienti affetti da incidentaloma surrenalico, con e senza SH, prima e dopo surrenectomia.

2. pazienti, metodi e analisi statistica

Pazienti

Questo studio longitudinale è stato condotto in 4 Unità di Endocrinologia Italiane: l'Ospedale "San Giuseppe-Multimedica" ed il "Policlinico San Donato IRCCS" di Milano e "Università Cattolica del Sacro Cuore" di Roma e la "Fondazione IRCCS Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico" di Milano presso la quale sono stati raccolti ed analizzati i dati.

Dopo aver arruolato, tra gennaio 2005 e dicembre 2007, 104 pazienti consecutivi affetti da incidentaloma surrenalico ne abbiamo raccolto i dati al baseline, e li abbiamo rivalutati dopo 12 e dopo 24 mesi di follow-up.

Il criterio di inclusione era il riscontro di una massa unilaterale del surrene durante indagini radiologiche non invasive dell'addome effettuate per patologie non correlate in assenza di segni o sintomi specifici per eccesso di cortisolo (facies lunare, striae rubrae, cute sottile, gibbo). Nessun paziente aveva evidenza di metastasi. Alle immagini

tomografiche tutte le masse surrenaliche apparivano omogenee, ipodense a margini regolari, caratteristiche suggestive per adenoma del corticosurrene. Sono stati esclusi i pazienti con storia passata o presente di ipogonadismo (negli uomini livelli di testosterone <3.0 ng/ml, 9.4 nmol/L, nelle donne pre-menopausa meno di 6 cicli mestruali/anno) e di altre patologie note per provocare alterazioni del metabolismo osseo (ad esempio tireotossicosi, patologie intestinali, insufficienza renale o epatopatia cronica, depressione, alcolismo, disturbi del comportamento alimentare, malattie reumatologiche o ematologiche) o in terapia con farmaci noti per danneggiare l'osso o potenzialmente interferenti con il metabolismo e con la secrezione del cortisolo e del desametasone. In tutti i pazienti la diagnosi di aldosteronoma o feocromocitoma è stata esclusa mediante valutazioni ormonali adeguate (catecolamine e metanefrine urinarie Ur-4h, rapporto aldosterone-attività reninica). La valutazione clinica comprendeva valutazione di peso, e altezza. I parametri di funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e del metabolismo calcio-fosforico sono stati valutati all'arruolamento e dopo 12 e 24 mesi.

La diagnosi di ipercortisolismo subclinico è stata posta in presenza di almeno 2 dei 3 parametri alterati tra i seguenti, in almeno 2 delle tre rivalutazioni:

- 1) livelli di cortisolo libero urinario aumentati (CLU) >70 µg/24h (193 nmol/L);
- 2) cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1-mg di desametasone (1-mgDST) >3.0 µg/dL, (83 nmol/L);
- 3) bassi livelli di ACTH (<10 pg/mL, 2.2 pmol/L).

Abbiamo scelto questi criteri perché precedentemente suffragati da dati clinici [74, 119, 126,175].

Sulla base di questi criteri al baseline rispettivamente 84 e 20 pazienti sono stati definiti come non affetti (SH-) e affetti (SH+) da ipercortisolismo subclinico. Dopo uno e due

anni di follow-up in 7 pazienti, definiti SH- al baseline, è stata posta nuova diagnosi di ipercortisolismo subclinico. In tutti i pazienti SH+ all'inizio del follow-up la diagnosi è stata confermata nei successivi controlli.

Durante il follow-up a tutti i pazienti sono stati somministrati 1 g di calcio al giorno e 880 IU al giorno e 300.000 IU ogni 6 mesi di colecalciferolo per bocca per evitare le possibili alterazioni sul metabolismo osseo indotte da una carenza di vitamina D.

Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato prima di entrare nello studio, che è stato approvato dal comitato etico locale in accordo con la II Dichiarazione di Helsinki.

Metodi

Tutti i campioni di siero, plasma e di urina sono stati raccolti e conservati a -20C fino al momento del dosaggio e sono stati determinati mediante la medesima metodica.

In ogni paziente i livelli di ACTH (media di 3 determinazioni ad intervalli di 20 minuti) sono stati dosati mediante metodica IRMA (BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin, Germany), il cortisolo sierico ed urinario (dopo estrazione con diclorometano) è stato determinato immuno-florimetricamente mediante metodica TDX-FLX Abbott, GmbH, Diagnostika kits (Wiesbaden-Delkenheim, Germany), all'inizio dello studio e durante il follow-up. I coefficienti di variazione intra ed inter-essay sono <15% per l'ACTH e <10% per gli altri dosaggi.

Per quanto riguarda il metabolismo osseo in tutti i pazienti sono stati valutati al baseline e al follow-up i livelli di: calcio sierico totale, albumina, fosfatasi alcalina, PTH, 25OHvitD, e calciuria nelle urine delle 24h. Il calcio sierico totale, l'albumina e il calcio urinario nelle urine 24h, sono stati dosati con tecniche standard. L'intervallo di riferimento per la fosfatasi alcalina considerato varia tra 36-104 U/l. Il calcio totale è

stato corretto per i livelli di albumina sierica (Caalb adj) in accordo con la formula: $\text{Caalb adj (mg/dl)} = \text{calcio totale} + (4.4 - \text{albumina mg/dl}) \times 0.8$ (Up to date-calculator 2010). I livelli sierici di PTH intatto sono stati dosati con metodo a chemiluminescenza (Nichols Institute Diagnostic, San Juan Capistrano, CA, USA), con un CV intra- ed inter-assay CVs tra il 5.1% e l' 8.2%, rispettivamente (intervallo di riferimento 10–65 pg/ml), e 25OHvitD3 (intervallo di riferimento 40-150 ng/ml) con metodo radioimmunologico (RIA; DiaSorin). Questi intervalli di riferimento derivano da una popolazione normale reclutata presso il nostro laboratorio.

Allo stesso modo all'arruolamento e dopo un periodo di 24 mesi è stata valutata la massa ossea mediante BMD Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (Hologic Discovery, Watham MA, USA) a livello della colonna (LS, precisione *in vivo* 1.0%) e del collo del femore (FN, precisione *in vivo* 1.8%). I valori di BMD sono stati espressi come unità di SD (Z-score) in rapporto alla nostra popolazione di riferimento [176]. Le vertebre fratturate sono state escluse dalla misurazione della BMD.

In tutti i pazienti inoltre al basale e al follow-up è stata effettuata una radiografia del rachide (T4-L4) in posizione laterale ed anteroposteriore mediante tecnica standardizzata. Due radiologi esperti, all'oscuro dei dati biochimici e dei valori di BMD, hanno quindi valutato tali radiografie, discutendo i casi dubbi per ottenere una diagnosi finale comune, con un buon grado di concordanza dei referti ($k = 0.82$). Le fratture vertebrali sono state diagnosticate mediante analisi visiva utilizzando un metodo semi-quantitativo (SQ), precedentemente descritto da Genant et al [152]. In accordo con questa tecnica, le fratture vertebrali sono state diagnosticate in presenza alla radiografia del rachide in proiezione laterale di una riduzione dell'altezza della limitante vertebrale anteriore, media o posteriore, maggiore del 20%.

Con questa metodica visiva ogni vertebra è stata quindi classificata come intatta (SQ grado 0) o come affetta da deformazione lieve (20-25%), moderata (25-40%), o severa (>40%) deformity (rispettivamente SQ di grado 1, 2 e 3). Successivamente, per ogni soggetto è stato calcolato lo spinal deformity index (SDI) sommando il grado SQ di ognuna delle 13 vertebre tra T4 e L4 ($SDI = SQT4 + \dots + SQT12 + SQL1 + \dots + SQL4$) [154]. In caso di comparsa di una nuova frattura o di aggravamento di una frattura preesistente lo SDI è stato considerato peggiorato.

In fine, in un sottogruppo di 23 pazienti con incidentaloma surrenalico oltre ai parametri dell'asse HPA sono stati valutati i parametri della composizione corporea e della secrezione di GH: Body Mass Index (peso kg/altezza m²), circonferenza vita, analisi della massa grassa (FM) mediante bioimpedenziometria (BIA®); livelli basali di GH, IGFI, glicemia, insulina, calcolo Homa Index: $[(\text{glicemia mg/dl} / 18) * \text{insulina mmol/L}] / 22.5$; prelievi seriati per GH dopo test di stimolo con Arginina + GHRH (Arg+GHRH) (GHRH 1–29; GEREFF, Serono: 1 µg/kg iv al tempo 0; arginina cloridrato, 0.5 g/kg iv in 30 min dal tempo 0 al tempo 30 min fino ad un massimo di 30 g). I campioni ematici per la valutazione del GH sono stati prelevati al tempo 0, 15, 30, 45, 60, 90, e 120min. In accordo con i dati più recenti, si definisce deficit complete di GH in presenza di un picco di GH < 11.5 µg/L se BMI < 25 kg/m², oppure di picco di GH < 8.0 µg/L se BMI tra 25 e 30 kg/m², e picco di GH < 4.2 µg/L se BMI > 30 kg/m² [177]. Si definisce deficit parziale di GH in presenza di un picco di GH compreso tra i rispettivi limiti per deficit completo e 16.5 µg/L [178]. I livelli sierici di GH sono stati dosati con metodo immunofluorimetrico per la determinazione dell'isoforma di GH umano di 22 kDa (AutoDelfia kit; Wallac, Inc. OY, Turku, Finland), con una sensibilità di 0.01 µg/L e un coefficiente di variabilità intra- e inter-assay di 2 e 1.7%, rispettivamente. I valori di IGF-I sono stati valutati con metodo immunometrico a

chemiluminescenza a fase solida (Immulite 2000 IGF-I; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) un coefficiente di variabilità intra- e inter-assay di 2.9 e 7.4%, rispettivamente. I valori di IGF-I sono espressi come SD. I valori di glicemia e insulina sierica sono stati determinati con tecniche standard.

In sei pazienti sottoposti a surrenectomia tali test sono stati rivalutati post intervento con le stesse modalità.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante software statistico SPSS versione 12.0 (SPSS Inc, Chicago,IL). I risultati sono espressi come media \pm S.D.

Il confronto delle variabili continue al baseline è stato effettuato mediante modello di regressione logistica lineare generalizzato per minimizzare l'errore dovuto alla diversa prevalenza di maschi e femmine tra i due gruppi. Le variabili categoriche sono state confrontate con χ^2 test. Il confronto delle variabili continue tra i due gruppi al follow-up è stato eseguito con test ad una via ANOVA. L'analisi di regressione logistica è stata utilizzata per valutare l'associazione tra la presenza di nuove fratture, in termini di peggioramento dello SDI (variabile dipendente, espressa come variabile categorica) e le seguenti variabili indipendenti: età, BMI, sesso, LSBMD, SDI basale, anni dalla menopausa, presenza di SH. Il confronto tra la secrezione di GH pre e post intervento è stata effettuato mediante T- test per dati appaiati.

Valori di P minori di 0.05 sono stati considerati significativi.

3. Risultati

Le caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti con e senza SH all'arruolamento sono riportate in tabella 4.

In considerazione della diversa prevalenza di maschi e femmine tra SH+ ed SH- le variabili categoriche sono state analizzate dopo correzione per prevalenza di maschi mediante General Linear Modelling. Come atteso i valori di 1-mgDST e CLU sono risultati più alti mentre i livelli di ACTH sono risultati più bassi nei pazienti con SH+ rispetto a quelli SH-. I pazienti SH+ sono significativamente più anziani degli SH- (media \pm SD 65.43 \pm 2,15 vs 64.06 \pm 1.14 $p=0.028$ range 51-83 e 27-80 rispettivamente), e mostrano un diametro maggiore dell'adenoma (media \pm SD 2.58 \pm 0.19 vs 2.36 \pm 0.10 range 1.0-5.0 e 0.5-4.2 rispettivamente), il BMI è maggiore nei pazienti SH- che negli SH+ (media \pm SD 27.32 \pm 0.53 vs 26.55 \pm 1.00 $P=0.003$ range 20-39.8 e 19-35.6 rispettivamente). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata in termine di BMD, durata della menopausa e parametri di metabolismo osseo tra i due gruppi, mentre la prevalenza di fratture vertebrali e lo SDI sono significativamente più alti nel gruppo SH+ (55.0% vs 29.8% $P= 0.04$ e 1.15 \pm 0.28 vs 0.63 \pm 0.15 $P= 0.018$).

Alla fine del follow-up 7 pazienti (7 femmine, 1 maschio) prima definiti come SH- hanno mostrato parametri di funzione dell'asse HPA compatibili con ipercortisolismo subclinico e sono stati raggruppati tra gli SH+. Tutti i pazienti SH+ all'arruolamento si sono mantenuti tali al follow-up.

Le modificazioni cliniche e biochimiche nei pazienti con e senza SH dopo i 2 anni di follow-up sono mostrate rispettivamente in tabella 5 e 6.

Alla fine del follow-up si sono osservate 23 nuove fratture con un'incidenza cumulativa del 22% (48% tra gli SH+ e 13% tra gli SH-).

Tra i due gruppi al termine del follow-up, così come si verificava al baseline, non si osservano differenze significative in termine di metabolismo calcio-fosforico (Tabella 7), né di BMD.

Tuttavia nei pazienti SH+ abbiamo osservato una prevalenza di fratture vertebrali significativamente maggiore rispetto al baseline (81.5 % vs 48.1%; $P= 0,021$), ed un peggioramento dello SDI (1.39 ± 2.83 vs 0.41 ± 1.44 ; $P=0.008$), mentre negli SH- non abbiamo trovato alcuna variazione significativa.

L'analisi di regressione logistica ha mostrato che la presenza di SH è correlata al peggioramento dello SDI, quindi all'insorgenza di nuove fratture o alla progressione del grado di deformazione di una frattura pre-esistente, indipendentemente dall'età, dal sesso, dal BMI, dagli anni di menopausa dalla BMD a livello lombare e dallo SDI basale (OR 11.92, 95%CI 4.0-35.5, $P= 0.001$) (Tabella 8). Andando a considerare maschi e femmine separatamente abbiamo osservato che negli SH+ la media dello SDI peggiorava più frequentemente negli uomini rispetto alle donne, (figura 9). La sensibilità e la specificità dell'SH nel predire il peggioramento dello SDI sono risultate rispettivamente del 63% e 87% con un VPP del 63% e un VPN dell'87%.

I parametri clinici e biochimici dei 23 pazienti in cui è stata valutata la secrezione di GH (11 SH+ e 12 SH-), sono mostrati in tabella 9.

I pazienti SH+ ed SH- risultano paragonabili per età, BMI, CV, massa grassa, glicemia, insulinemia, HOMA Index ed IGFI espressi come SDS rispetto alla media per età (IGFI-DS) (Tabella 10). Soltanto 1 paziente, appartenente al gruppo SH+, mostra un deficit totale di GH (picco GH 5.4 ng/ml, BMI 25.6 Kg/ m²). Il picco di GH e la risposta del GH dopo test di stimolo con Arg+GHRH, espressa come area sotto la curva (AUC-

GH), sono risultati inferiori negli SH+ rispetto agli SH- (rispettivamente 22.0 ± 19.4 vs 42.6 ± 27.9 , $P=0.05$ e 1931.4 ± 1710.8 vs 3864.2 ± 2294.4 , $P=0.03$). Il picco di GH e L'AUC-GH risultano correlati negativamente al BMI (rispettivamente $R=-0.48$, $P=0.02$; $R=-0.52$, $P=0.01$) ed alla CV (rispettivamente $R=-0.44$, $P=0.04$; $R=-0.48$, $P=0.02$), non vi sono correlazioni con i parametri di funzione surrenalica, del metabolismo glucidico né con lo SDI. Dopo l'intervento, nei 6 pazienti SH+ operati, si osserva un tendenziale miglioramento dell'AUC-GH ($P=0.072$) (Tabella 10). Escludendo dall'analisi statistica la paziente con deficit completo di GH, tale dato non si modifica.

Tabella 4- Caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti con (SH+) e senza SH (SH-) al baseline.

	Pazienti SH-(84)	Pazienti SH+(20)	P
N° di maschi/femmine	59/25	9/11	0.04
Età (anni)	64.06±1.14 (27-80)	65.43±2.15 (51-83)	0.028
BMI (kg/m²)	27.32±0.53 (20-39.8)	26.55±1.00 (19-35.6)	0.003
Diametro dell' adenoma(cm)	2.36±0.10 (0.5-4.2)	2.58±0.19 (1.0-5.0)	0.036
ACTH (pg/ml)	16.69±1.20 (5-62.8)	8.00±2.25 (5-20.2)	0.05
1-mgDST (µg/dl)	1.60±0.09 (0.5-4.6)	3.32±0.18 (1.3-6.2)	0.028
CLU (µg/24ore)	42.72±4.24 (2.2-150.7)	74.34±7.98 (11.4-263.5)	0.032
Ipogonadismo (anni)	5.94±0.99 (0-45)	5.72±1.87 (0-23)	0.500
LS BMD (z-score)	0.10±0.15 (-2.8-4.1)	-1.30±0.29 (-1.8-2.5)	0.975
FN BMD (z-score)	0.01±0.10 (-1.6-2.1)	-0.09±0.19 (-2.4-2.7)	0.879
FT BMD (z-score)	0.03±0.11 (-1.7-2.1)	-0.14±0.21 (-2.4-2.2)	0.566
SDI	0.63±0.15 (0-5)	1.15±0.28 (0-4)	0.018
N° di pazienti fratturati (%)	25 (29.8)	11 (55.0)	0.040

I dati sono espressi come media ± SD con il range indicato in parentesi o come valore assoluto con la percentuale in parentesi. Le variabili categoriche sono state corrette mediante general linear modelling per ridurre l'errore dovuto alla differente percentuale di maschi e femmine tra i due gruppi. BMI: body mass index; 1-mgDST: cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1-mg di desametasone; CLU: cortisolo libero urinario. LS BMD: bone mineral density misurata alla colonna (L1-L4); FN e FT BMD: bone mineral density misurata al collo femorale e al femore totale. SDI: Spinal Deformity Index, somma del grado di frattura delle singole vertebre tra T4 e L4 valutate con metodo semiquantitativo. SH: ipercortisolismo subclinico diagnosticato in presenza di almeno due parametri alterati tra: 1mgDST > 3.0 µg/dl, UFC > 70 µg/24h, ACTH < 10 pg/ml.

Tabella 5- Modificazioni cliniche e biochimiche dei pazienti con ipercortisolismo subclinico (SH+) dopo 2 anni di follow-up.

	Pazienti SH+ (27) 15F/12M		
	Baseline	Follow-up	P
BMI (kg/m²)	26.57±4.30 (19.3-35.6)	27.13±4.17 (19.3-34.5)	0.630
Diametro dell' adenoma (cm)	2.82±0.99 (1.0-5.0)	2.89±0.96 (1.2-5.0)	0.782
ACTH (pg/ml)	8.55±3.67 (5-20.2)	9.08±3.50 (5-16)	0.592
1-mgDST (µg/dl)	3.01±1.16 (1.3-6.2)	2.61±0.95 (0.7-4.2)	0.175
CLU (µg/24ore)	66.84±54.4 (11.4-263.5)	58.27±36.08 (11.1-138.6)	0.498
LS BMD (z-score)	0.01±1.17 (-1.8-2.5)	0.27±1.37 (-2.0-3.6)	0.459
FN BMD (z-score)	-0.43±0.10 (-2.4-2.7)	0.00±1.07 (-2.4-2.6)	0.880
FT BMD (z-score)	-0.79±1.07 (-2.4-2.2)	0.16±1.14 (-2.4-2.5)	0.435
SDI	0.41±1.44 (0-4)	1.39±2.83 (0-8)	0.008
N° di pazienti fratturati (%)	13 (48.1)	22 (81.5)	0.021

I dati sono espressi come media ± SD con il range indicato in parentesi o come valore assoluto con la percentuale in parentesi.

BMI: body mass index; 1-mgDST: cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1-mg di desametasone; CLU: cortisolo libero urinario; ACTH: adrenocorticotroph hormone.

LS BMD: bone mineral density misurata alla colonna (L1-L4); FN e FT BMD: bone mineral density misurata al collo femorale e al femore totale.

SDI: Spinal Deformity Index, somma del grado di frattura delle singole vertebre tra T4 e L4 valutate con metodo semiquantitativo. SH: ipercortisolismo subclinico diagnosticato in presenza di almeno due parametri alterati tra: 1mgDST > 3.0 µg/dl, UFC > 70 µg/24h, ACTH < 10 pg/ml.

Tabella 6- Modificazioni cliniche e biochimiche in pazienti senza ipercortisolismo subclinico SH (SH-) dopo 2 anni di follow-up.

	Pazienti SH- (77) 53F/24M		
	Baseline	Follow-up	P
BMI (kg/m²)	27.39±4.45 (20.0-39.8)	27.56±5.16 (28.4-41.0)	0.822
Diametro dell' adenoma (cm)	2.09±0.72 (0.5-3.8)	2.17±0.71 (1.0-4.1)	0.513
ACTH (pg/ml)	16.76 ±11.20 (5.0-62.8)	17.96±10.46 (5.0-57.0)	0.492
1-mgDST (µg/dl)	1.54±0.66 (0.5-4.6)	1.44±0.80 (0.4-5.0)	0.359
CLU (µg/24ore)	42.18±26.79 (2.2-150.7)	40.01±19.44 (8.8-93.2)	0.567
LS BMD (z-score)	0.04±1.38 (-2.8-4.1)	0.162±1.44 (-2.6-4.6)	0.585
FN BMD (z-score)	0.07±0.78 (-1.6-2.1)	0.11±0.83 (-1.7-2.9)	0.741
FT BMD (z-score)	0.05±0.86 (-1.7-2.1)	0.14±0.86 (-1.7-2.2)	0.527
SDI	0.65±1.20 (0-5)	0.86±1.49 (0-6)	0.343
N° di pazienti fratturati (%)	23 (29.9)	28 (36.4)	0.247

I dati sono espressi come media ± SD con il range indicato in parentesi o come valore assoluto con la percentuale in parentesi.

BMI: body mass index; 1-mgDST: cortisolo sierico dopo test di soppressione con 1-mg di desametasone; CLU: cortisolo libero urinario; ACTH: adrenocorticotroph hormone.

LS BMD: bone mineral density misurata alla colonna (L1-L4); FN e FT BMD: bone mineral density misurata al collo femorale e al femore totale.

SDI: Spinal Deformity Index, somma del grado di frattura delle singole vertebre tra T4 e L4 valutate con metodo semiquantitativo. SH: ipercortisolismo subclinico diagnosticato in presenza di almeno due parametri alterati tra: 1mgDST > 3.0 µg/dl, UFC > 70 µg/24h, ACTH < 10 pg/ml.

Tabella 7- Parametri di metabolismo calcio-fosforo alla fine del follow-up in pazienti con (SH+) e senza ipercortisolismo subclinico (SH-).

	SH+ (27) 15F/12M	SH- (77) 53F/24M	P
Caalb adj mg/dl	9.35±0.44 (8.4-10.1)	9.37±0,45 (8.4-10.5)	0.857
Fosfatasi alcalina U/I	73.67±20.64 (31-115)	76.14±21.35 (41-156)	0.602
PTH pg/ml	56.81±28.06 (13-142)	53.19±26.84 (12-164)	0.552
25OHvitD3 ng/ml	27.39±12.95 (15-61.4)	25.60±10.58 (15-81)	0.479
Calciuria mg/24h	207.48±143.79 (31-517)	168.99±81.93 (24-384)	0.093

I dati sono espressi come media ± SD con il range indicato in parentesi.

SH: ipercortisolismo subclinico diagnosticato in presenza di almeno due parametri alterati tra: 1mgDST > 3.0 µg/dl, UFC > 70 µg/24h, ACTH < 10 pg/ml.

Tabella 8- Odds ratio per lo sviluppo di nuove fratture vertebrali dopo correzione mediante analisi di regressione logistica per i potenziali fattori di rischio.

	Odds ratio	P	95% CI
Età (incremento di 1 anno)	1.061	0.236	0.962-1.169
Anni dalla menopausa (incremento di 1 anno)	1.034	0.493	0.939-1.139
femmine vs maschi	2.937	0.321	0.350-24.653
BMI (incremento di 1 kg/m ²)	1.011	0.857	0.898-1.139
LS BMD (riduzione di 1 unità di Z-score)	1.064	0.763	0.712-1.588
SH (presenza vs assenza)	11.857	0.001	4.072-34.525

BMI: body mass index; LS BMD: bone mineral density misurata alla colonna (L1-L4);

SH: ipercortisolismo subclinico diagnosticato in presenza di almeno due parametri alterati tra: 1mgDST > 3.0 µg/dl, UFC > 70 µg/24h, ACTH < 10 pg/ml.

Tabella 9- Caratteristiche cliniche e biochimiche dei 23 pazienti con adenoma surrenalico con (SH+) e senza ipercortisolismo subclinico (SH-) sottoposti ad indagine per la secrezione di GH.

	Pazienti SH- (12)	Pazienti SH+ (11)	P
Età (anni)	62.2 ± 7.9 (44-74)	58.9 ± 6.4 (46-71)	0.29
BMI (kg/m²)	26.3 ± 4.4 (20.4-35)	27.6 ± 5.4 (19.2-36.1)	0.53
CV (cm)	85.3 ± 9.5 (75-103)	94.4 ± 13.9 (72-118)	0.08
FM (%)	32.3 ± 8.6 (18-54)	29 ± 8.9 (15-43)	0.37
Glicemia (mg/dl)	94.9 ± 23.5 (67-138)	92 ± 19.1 (68-130)	0.74
Insulinemia (μU/ml)	7.9 ± 4.3 (2-14.7)	11.1 ± 8.2 (3.5-25.2)	0.25
HOMA Index	2.0 ± 1.5 (0.3-4.6)	2.5 ± 2.0 (0.7-5.9)	0.54
IGF1-SDS	-0.5 ± 0.9 (-1.9-1.8)	-0.9 ± 0.7 (-2;-0,2)	0.16
Picco GH (μg/L)	42.6 ± 27.9 (9.5-93.2)	22.0 ± 19.4 (5.4-75.7)	0.05
GH-AUC (μg/L per 120')	3864.2 ± 2294.4 (924-8084)	1931.4 ± 1710.8 (521.6-6464.7)	0.03

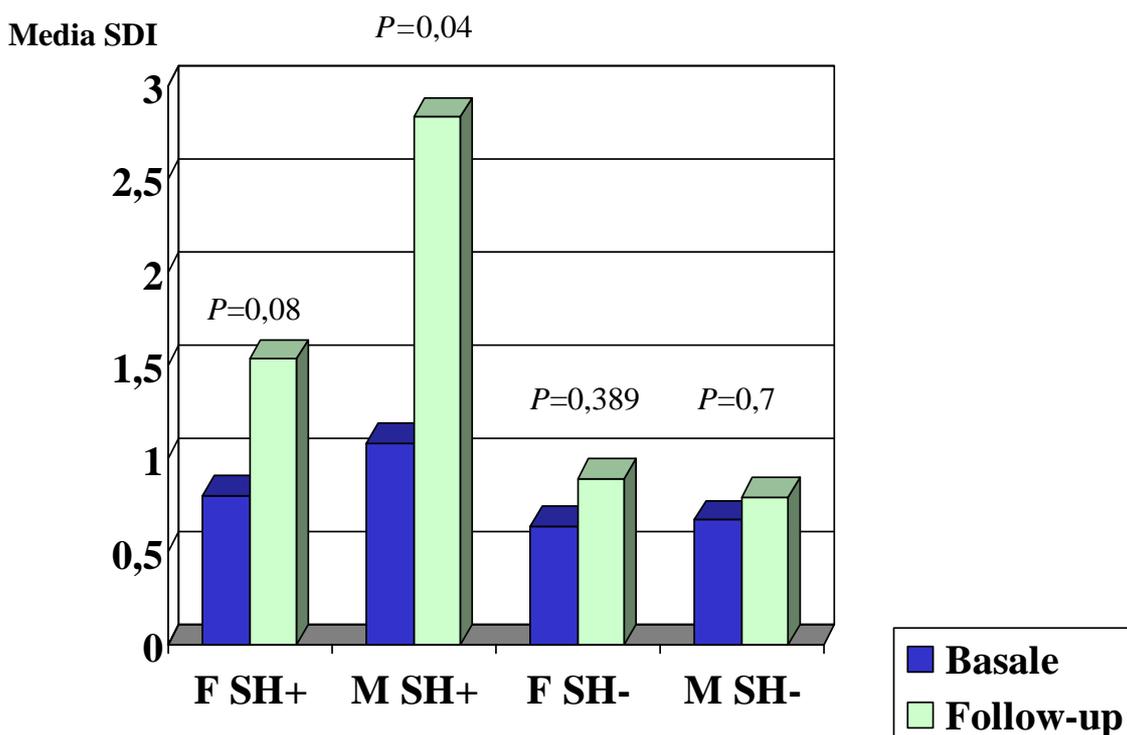
BMI: body mass index; CV: circonferenza vita; FM: massa grassa; HOMA Index: indice di resistenza insulinica; IGF1-SDS: valori di insulin-like growth factor 1, espressi come standard deviation; GH: growth hormone; GH-AUC: area sotto la curva della secrezione di GH durante test di stimolo con Arg+GHRH

Tabella 10- Valori di IGF1, picco di GH e GH-AUC pre e post intervento.

	Pre-intervento (n=6)	Post-intervento (n=6)	P
IGF1-SDS	-0.9 ± 0.6	-0.2 ± 1.4	0.16
Picco GH (µg/L)	17.3 ± 11.1	29.8 ± 18.6	0.14
GH-AUC (µg/L per 120')	1645.8 ± 1032.9	3244.8 ± 2207.5	0.072

*IGF1-SDS: valori di insulin-like growth factor 1 espressi come standard deviation;
GH: growth hormone; GH-AUC: area sotto la curva della secrezione di GH durante
test di stimolo con Arg+GHRH.*

Figura 9



Valori medi di SDI nei diversi gruppi SH+ ed SH- divisi per sesso nel basale (colonna in grigio) e nel follow-up (colonna in nero); P= basale vs follow-up.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

La prevalenza di SH nella nostra popolazione è risultata del 25.9% [131, 114]. Questo dato è in accordo con quelli della letteratura che mostrano generalmente una prevalenza di SH tra il 15 e il 30%, a seconda dei criteri utilizzati per la diagnosi. Il 6.7% dei pazienti inclusi nello studio, durante il periodo di osservazione, sviluppa un quadro di SH. Anche questo risultato conferma quanto noto dalla letteratura e rafforza l'idea che sia importante un follow-up funzionale oltre che morfologico di almeno 24 mesi nei pazienti con incidentaloma surrenalico.

I dati che emergono dal nostro studio confermano anche l'effetto negativo dell'ipercortisolismo sull'osso, soprattutto in termini di qualità [131, 147]. Infatti la prevalenza di fratture vertebrali e lo SDI, indice indiretto della microarchitettura ossea, sono significativamente maggiori nel gruppo di pazienti affetti da ipercortisolismo subclinico rispetto a quelli senza, e si associano alla presenza di SH indipendentemente dal sesso, dallo stato gonadico, dalla massa ossea, e dal BMI.

Risultato ancor più interessante, e nuovo, è che nel corso di due anni di osservazione questi pazienti hanno sviluppato 23 nuove fratture vertebrali con un'incidenza cumulativa del 22%, rispettivamente del 48% tra gli SH+ e del 13% tra gli SH-. Questo fenomeno sembra interessare in particolar modo il sesso maschile, come anche già osservato nei pazienti con S.Cushing [179]. A differenza di quello che è emerso in studi precedenti, ed in particolar modo nello studio di Chiodini et al del 2009 [156], nel presente studio non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa in termini di BMD tra i due gruppi. Questa apparente discordanza potrebbe essere da attribuire da una parte al fatto che i pazienti inclusi in questo studio al momento del reclutamento avevano più anziani rispetto a quelli dello studio del 2009. Questa

differenza di età potrebbe essere associata ad uno stato di artrosi più avanzato, che, a sua volta, porterebbe ad un sovrastima della massa ossea, almeno alla colonna. Inoltre, i nostri pazienti presentano un minor grado di attività di malattia, come dimostrato dai livelli di 1-mgDST più bassi (3.32 ± 0.18 vs 4.3 ± 2.8). Questa differenza di attività di malattia potrebbe spiegare anche la minor prevalenza di fratture rispetto ai pazienti dello studio precedente (55% vs 70.6%). Infine è da considerare come nel presente studio la supplementazione di calcio e vitamina D abbia potuto svolgere un effetto benefico sulla massa ossea, resosi evidente al termine del follow-up [180].

In accordo con il dato sul BMD, i parametri di turnover osseo, calcio, PTH, fosfatasi alcalina, non sono significativamente diversi tra i due gruppi. Questo risultato è in accordo con i dati della letteratura che mostrano livelli di calcemia, PTH e fosfatasi alcalina sovrapponibili tra pazienti con SH e controlli [160]. Un limite del presente studio è la mancanza del dosaggio di un marker di apposizione ossea sensibile (ad esempio l'osteocalcina) che, al contrario, si è dimostrato ridotto nei pazienti con SH [141]. Tuttavia, nel presente studio la calciuria nelle 24 ore è risultata tendenzialmente aumentata nei pazienti con SH, come accade nel Cushing conclamato [181]. Infine è importante sottolineare come criteri utilizzati per la diagnosi di SH hanno dimostrato una sensibilità del 63% e una specificità dell' 87% nel predire il peggioramento dello SDI, suggerendo che molti più pazienti di quelli che riusciamo ad identificare hanno probabilmente un lieve eccesso di cortisolo e un rischio elevato di frattura.

Per quanto riguarda la secrezione di GH questo è il primo studio che sia stato condotto con disegno caso-controllo, anche se su una casistica limitata. I risultati confermano l'ipotesi che anche nell'ipercortisolismo subclinico ci sia una riduzione della secrezione di GH, indipendentemente dal BMI. Il dato nuovo presente nel nostro studio è che la secrezione di GH sembra normalizzarsi dopo guarigione dal SH.

La riduzione dell'attività dell'asse GH-IGF-1 sembra essere un fattore importante nella patogenesi del danno osseo da glucocorticoidi. Il fatto di riscontrare nei pazienti con SH una riduzione della secrezione di GH fornisce una possibile chiave di lettura del danno osseo nei pazienti con ipercortisolismo subclinico.

Al momento attuale delle conoscenze, tuttavia, non è noto se la risoluzione del SH porti ad un miglioramento del BMD e soprattutto ad una riduzione del rischio di frattura.

In conclusione, i pazienti con incidentaloma surrenalico ed ipercortisolismo subclinico sono a rischio di sviluppare nel tempo nuove fratture vertebrali anche in presenza di normale massa ossea. L'SH inoltre sembra determinare una parziale inibizione della secrezione di GH che in parte potrebbe contribuire a questo processo. Tale deficit tende a normalizzarsi dopo surrenectomia. Sono necessari studi prospettici, randomizzati, d'intervento per valutare l'andamento della massa ossea e delle fratture vertebrali dopo risoluzione dell'ipercortisolismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Thompson GB, Young Jr WF. Adrenal incidentaloma. *Current Opin Oncol* 2003; 15:84-90.
2. Chidiac RM, Aron DC. Incidentalomas. A disease of modern technology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997; 26: 233-253.
3. Griffing G. A-I-D-S: The new endocrine epidemic. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1530-31.
4. Rinehart JF, Williams OO, Cappeller WS. Adenomatous hyperplasia of the adrenal cortex associated with essential hypertension. *Arch Path* 1941; 34: 1031-34.
5. Russi S, Blumenthal HT, Gray SH. Small adenomas of the adrenal cortex in hypertension and diabetes. *Arch Intern Med* 1945; 76: 284-91.
6. Commons RR, Callaway CP. Adenomas of the adrenal cortex. *Arch Intern Med* 1948; 81: 37-41.
7. Schroeder HA. Clinical types – the endocrine hypertensive syndrome. In *Hypertensive Disease: Causes and Control*, pp 295 – 333. Ed. HA Schroeder. Philadelphia: Lea & Febiger, 1953.
8. Devenyi I. Possibility of normokalaemic primary aldosteronism as reflected in the frequency of adrenal cortical adenomas. *Journal of clinical Pathology* 1967; 20: 49-51.
9. Kokko JP, Brown TC, Berman MM. Adrenal adenomas and hypertension. *Lancet* 1967; 1: 468-70.
10. Hedeland H, Ostberg G, Hokfelt B. On the prevalence of adrenocortical adenomas in an autopsy material in relation to hypertension and diabetes. *Acta Med Scand* 1968; 184:211-4.

11. Yamada EY, Fukunaga FH. Adrenal adenoma and hypertension. A study in the Japanese in Hawaii. *Jpn Heart J.* 1969; 10:11-19.
12. Granger P, Genest J. Autopsy study of adrenal in unselected normotensive and hypertensive patients. *CMAJ* 1970; 103:34-6.
13. Russell RP, Masi AT, Ritcher ED. Adrenal cortical adenomas and hypertension. A clinical pathologic analysis of 690 cases with matched controls and a review of the literature. *Medicine* 1972; 51:211-25.
14. Abecassis M, McLoughlin MJ, Langer B, Kudlow JE. Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance, and management. *Am J Surg* 1985; 149:783-8.
15. Meagher AP, Hugh TB, Casey JK, Chisholm DJ, Farrell JC, Yeates M. Primary adrenal tumors – a ten years experience. *Aust N Z J Surg* 1988; 58:457-62.
16. Reinhard C, Saeger W, Schubert B. Adrenocortical nodules in post-mortem series. Development, functional significance, and differentiation from adenomas. *Gen Diagn Pathol* 1996; 141:203-8.
17. Barzon L, Sonino N, Fallo F et al. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:273-85.
18. Bovio S, Cataldi A, Reimondo G, Sperone P, Novello S, Berruti A, Borasio P, Fava C, Dogliotti L, Scagliotti GV, Angeli A, Terzolo M. Prevalence of adrenal incidentaloma in a contemporary computerized tomography series. *Endocrinol Invest* 2006; 29:298-302.
19. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 1995; 16:460-84.
20. Anagnostis P, Karagiannis A, Tziomalos K, Kakafika AI, Athyros VG, Mikhailidis DP. Adrenal incidentaloma: a diagnostic challenge. *Hormones (Athens)* 2009; 8:163-84.

21. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004; 25:309-40.
22. Dobbie JW. Adrenocortical nodular hyperplasia: the ageing adrenal. *J Pathol* 1969; 99:1-18.
23. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40:465-77.
24. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:685-9.
25. Seppel T, Schlaghecke R. Augmented 17 alpha-hydroxyprogesterone response to ACTH stimulation as evidence of decreased 21-hydroxylase activity in patients with incidentally discovered adrenal tumours ('incidentalomas'). *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41:445-51.
26. Reincke M, Peter M, Sippel WG, Allolio B. Impairment of 11beta-hydroxylase but not 21-hydroxylase in adrenal "incidentalomas". *Eur J Endocrinol* 1997; 136:196-200.
27. Schulze E, Scharer G, Rogatzki, Priebe L, Lewicka S, Bettendorf M, Hoepffner W, Heinrich UE, Schwabe U. Divergence between genotype and phenotype in relatives of patients with the intron 2 mutation of steroid-21-hydroxylase. *Endocr Res* 1995; 21:359-64.
28. Bornstein SR, Stratakis CA, Chrousos GP. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med* 1999; 130:759-71.

29. Stratakis CA. New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 300:152-7.
30. De Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1819-29.
31. Stratakis CA. Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:404-10.
32. Bernard MH, Sidhu S, Berger N, Peix JL, Marsh DJ, Robinson BG, Gaston V, Le Bouc Y, Gicquel C. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:998-1001.
33. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:637-644.
34. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR. The clinically inapparent adrenal mass: Update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004; 25:309-40.
35. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003; 169:5-11.
36. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2027-37.

37. Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. *Horm Res* 1997; 47:279-83.
38. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Gregianin M, Macrì C, Boscaro M. Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:55-62.
39. Kasperlik-Zeluska AA, Rosłonowska E, Słowinska-Srzednicka J, Migdalska B, Jeske W, Makowska A, Snochowska H. Incidentally discovered adrenal mass (incidentaloma): investigation and management of 208 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 46:29-37.
40. Lieberman SA, Eccleshall TR, Feldman D. ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications. *Eur J Endocrinol* 1994; 131:67-73.
41. Stratakis CA, Kirschner LS. Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macro-nodular disease) leading to Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* 1998; 30:456-63.
42. Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E, Oberg K. Clinical and genetic features of adrenocortical lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:76-81.
43. Doppman JL, Travis WD, Nieman L, Miller DL, Chrousos GP, Gomez MT, Cutler GB Jr, Loriaux DL, Norton JA. Cushing syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease: findings at CT and MR imaging. *Radiology* 1989; 172:415-20.

44. Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JK, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS. Management of the clinically inapparent adrenal mass. *Ann Intern Med* 2003; 138:424-9.
45. Barzon L, Zucchetta P, Boscaro M, Marzola MC, Bui F, Fallo F. Scintigraphic patterns of adrenocortical carcinoma: morpho-functional correlates. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:743-8.
46. Wong KK, Komissarova M, Avram AM, Fig LM, Gross MD. Adrenal cortical imaging with I-131 NP-59 SPECT-CT. *Clin Nucl Med* 2010; 35:865-9.
47. Okada M, Shimono T, Komeya Y, Ando R, Kagawa Y, Katsube T, Kuwabara M, Yagyu Y, Kumano S, Imaoka I, Tsuchiya N, Ashikaga R, Hosono M, Murakami T. Adrenal masses: the value of additional fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography (FDG-PET/CT) in differentiating between benign and malignant lesions. *Ann Nucl Med* 2009; 23:349-54.
48. Mantero F, Arnaldi G. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Ancona, Italy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29:107-25.
49. Young WF Jr. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med* 2007; 356: 601-10.
50. Gopan T, Remer E, Hamrahian AH. Evaluating and managing adrenal incidentalomas. *Cleve Clin J Med* 2006; 73:561-68.
51. Linos DA. Adrenal incidentaloma (Adrenaloma). *Hormones (Athens)* 2000; 2: 12-21.
52. Latronico AC, Chrousos G P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1317-24.
53. Izaki H, Fukumori T, Takahashi M, Taue R, Kishimoto T, Tanimoto S, Nishitani MA, Kanayama HO. Indications for laparoscopic adrenalectomy for non-functional

- adrenal tumor with hypertension: usefulness of adrenocortical scintigraphy. *Int J Urol* 2006; 13:677-81.
54. Luton JP, Martinez M, Coste J, Bertherat J. Outcome in patients with adrenal incidentaloma selected for surgery: an analysis of 88 cases investigated in a single clinical center. *Eur J Endocrinol* 2000; 143:111-7.
 55. Cerfolio RJ, Vaughan ED Jr, Brennan TG Jr, Hirvela ER. Accuracy of computed tomography in predicting adrenal tumor size. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176:307-9.
 56. Mayo-Smith WW, Boland G W, Noto RB, Lee MJ. State-of-the-art adrenal imaging. *Radiographics* 2001; 21:995-1012.
 57. Ilias I, Sahdev A, Reznick RH, Grossman AB, Pacak K. The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:587-99.
 58. Guerrieri M, De Sanctis A, Crosta F, Arnaldi G, Boscaro M, Lezoche G, Campagnacci R. Adrenal incidentaloma: surgical update. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:200-4.
 59. Pasqual E, Bacchetti S, Waclaw B, Bertolissi F, Grimaldi F, Cagol PP. Adrenal incidentalomas: indications for surgery. *Chir Ital* 2003; 55:29-34.
 60. Gittens PR Jr, Solish AF, Trabulsi EJ. Surgical management of metastatic disease to the adrenal gland. *Semin Oncol* 2008; 35:172-6.
 61. Mercier O, Fadel E, Mussot S, Fabre D, Chataigner O, Chapelier A, Darteville P. Is surgery required for patients with isolated adrenal metastasis of non-small cell lung carcinoma? *Presse Med* 2007; 36:1743-52.

62. Mittendorf EA, Lim S J, Schacherer CW, Lucci A, Cormier JN, Mansfield PF, Gershenwald JE, Ross MI, Lee JE. Melanoma adrenal metastasis: natural history and surgical management. *Am J Surg* 2008; 195: 363-8.
63. Bastounis EA, Karayiannakis AJ, Anapliotou ML, Nakopoulou L, Makri GG, Papalambros EL. Incidentalomas of the adrenal gland: diagnostic and therapeutic implications. *Am Surg* 1997; 63:356-60.
64. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Paoletta A, Boscaro M. Risk factors and long term follow-up of adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:520-26.
65. Siren J, Tervahartiala P, Sivula A, Haapiainen R. Natural course of adrenal incidentalomas seven-year follow-up study. *World J Surg* 2000; 24:579-82.
66. Grossrubatscher E, Vignati F, Possa M, Lohi P. The natural history of incidentally discovered adrenocortical adenomas: a retrospective evaluation. *Endocrinol Invest* 2001; 24:846-55.
67. Libè R, Dall'Asta C, Barbetta L, Baccarelli A, Beck-Peccoz P, Ambrosi B. Long term follow-up study of patients with adrenal incidentalomas. *Eur J. Endocrinol* 2002;147:489-94.
68. Bernini GP, Moretti A, Oriandini C, Bardini M, Taurino C, Salvetti A. Long-term morphological and hormonal follow-up in a single unit on 115 patients with adrenal incidentalomas. *Br J Cancer* 2005; 92:1104-9.
69. Bulow B, Jansson S, Juhlin C, Steen L, Thorén M, Wahrenberg H, Valdemarsson S, Wängberg B, Ahrén B. Adrenal incidentaloma – follow-up results from a Swedish prospective study. *Eur J Endocrinol* 2006; 154:419-423.

70. Gagliardi L, Torpy DJ. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma: a common problem or an artefact of current diagnostic testing? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72:277-8.
71. Cawood TJ, Hunt PJ, O'Shea D, Cole D, Soule S. Recommended evaluation for adrenal incidentalomas is costly, has high false positive rates and confers a risk of fatal cancer that is similar to the risk of the adrenal lesion becoming malignant; time for a re-think? *Eur J Endocrinol* 2009; 161:513-27.
72. Charbonnel B, Chatal JF, Ozanne P. Does the corticoadrenal adenoma with pre-Cushing's syndrome exist? *J Nucl Med* 1981; 22:1059-1061.
73. Ross NS. Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 539-46.
74. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, Nuzzo V, Lombardi G. Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1440-8.
75. Vassilatou E, Vryonidou A, Michalopoulou S, Manolis J, Caratzas J, Phenekos C, Tzavara I. Hormonal activity of adrenal incidentalomas: results from a long-term follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 70:674-9.
76. Jockenhövel F, Kuck W, Hauffa B, Reinhardt W, Benker G, Lederbogen S, Olbricht T, Reinwein D. Conservative and surgical management of incidentally discovered adrenal tumors (incidentalomas). *J Endocrinol Invest* 1992; 15:331-7.
77. Osella G, Terzolo M, Borretta G, Magro G, Alí A, Piovesan A, Paccotti P, Angeli A. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1532-9.

78. Barry MK, van Heerden JA, Farley DR, Grant CS, Thompson GB, Ilstrup DM. Can adrenal incidentalomas be safely observed? *World J Surg.* 1998; 22:599-603.
79. Terzolo M, Alì A, Osella G, Borretta G, Cesario F, Paccotti P, Angeli A. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48:89-97.
80. Tsuiki M, Tanabe A, Takagi S, Naruse M, Takano K. Cardiovascular risks and their long-term clinical outcome in patients with subclinical Cushing's syndrome. *Endocr J.* 2008; 55:737-45.
81. Tsagarakis S, Vassiliadi D, Thalassinos N. Endogenous subclinical hypercortisolism: Diagnostic uncertainties and clinical implications. *J Endocrinol Invest* 2006; 29:471-82.
82. Chiodini I, Mascia ML, Muscarella S, Battista C, Minisola S, Arosio M, Santini SA, Guglielmi G, Carnevale V, Scillitani A. Subclinical hypercortisolism among outpatients referred for "Osteoporosis". *Ann Intern Med* 2007; 147:541-8.
83. Leibowitz G, Tsur A, Chaiden SD, Salameh M, Raz I, Cerasi E, Gross DJ. Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44:717-722.
84. Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, Gin H, Roger P, Tabarin A. Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5808-13.
85. Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A, Arosio M, Bacci S, Di Lembo S, Epaminonda P, Augello G, Enrini R, Ambrosi B, Adda G, Trischitta V. Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol* 2005; 153:837-44.

86. Esteban NV, Loughlin T, Yergey AL, Zawadzki JK, Booth JD, Winterer JC, Loriaux DL. Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution/mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:39-45.
87. Peacey RS, Guo CY, Robinson A Price A, Giles MA, Eastell R, Weetman AP. Glucocorticoid replacement therapy: are patients over treated and does it matter? *Clin Endocrinol Metab (Oxf)* 1997; 46:255-61.
88. Huiras CM, Pehling GB, Caplan RH. Adrenal insufficiency after operative removal of apparently non-functioning adrenal adenomas. *JAMA* 1989; 261:894-8.
89. Kloos RT, Gross MD, Shapiro B. Investigation of incidentally discovered, biochemically non-hypersecretory benign adrenal adenomas: a review of the current knowledge and areas for future investigation. *Internal Med* 1994; 2:9-15.
90. NIH State-of-the-science statement on management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). NIH Consensus and State-of-the-Science Statements 2002; 19:1-23.
91. Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence of low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome-recommendation for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem* 1997; 34:222-229.
92. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Grobbee DE, de Jong FH, Lamberts SW. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:47-54.
93. Valli N, Catargi B, Ronci N, Vergnot V, Leccia F, Ferriere JM, Chene G, Grenier N, Laurent F, Tabarin A. Biochemical screening for subclinical cortisol-secreting adenomas amongst adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2001;144:401-8.

94. Barzon L, Fallo F, Sonino N, Boscaro M. Overnight dexamethasone suppression of cortisol is associated with radiocholesterol uptake patterns in adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol*. 2001; 145:223-4.
95. Trainer PJ, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991; 34:317-30.
96. Tsagarakis S, Kokkoris P, Roboti C, Malagari C, Kaskarelis J, Vlassopoulou V, Alevizaki C, Thalassinou N. The low-dose dexamethasone suppression test in patients with adrenal incidentalomas: comparisons with clinically euadrenal subjects and patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48:627-33.
97. Ambrosi B, Perevelli S, Passini E, Re T, Ferrario R, Colombo P, Sartorio A, Faglia G. Abnormalities of endocrine function in patients with clinically "silent" adrenal masses. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:422-8.
98. Tsagarakis S, Roboti C, Kokkoris P, Vasiliou V, Alevizaki C, Thalassinou N. Elevated post-dexamethasone suppression cortisol concentrations correlate with hormonal alterations of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in patients with adrenal incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:165-71.
99. Lavoie H, Lacroix A. Partially autonomous cortisol secretion by incidentally discovered adrenal adenomas. *Trends Endocrinol Metab* 1995;6:191-194.
100. Hadjidakis D, Tsagarakis S, Roboti C, Sfakianakis M, Iconomidou V, Raptis SA, Thalassinou N. Does subclinical hypercortisolism adversely affect the bone mineral density of patients with adrenal incidentalomas? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58:72-77
101. Crapo L. Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism* 1979; 28:955-77.

102. Invitti C, Pecori Giraldi F, de Martin M, de Martin M, Cavagnini F. Diagnosis and management of Cushing's syndrome: results of an Italian multicentre study. Study Group of the Italian Society of Endocrinology on the Pathophysiology of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:440-8.
103. Aron DC. Adrenal incidentaloma and glucocorticoid autonomy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:157-8.
104. Putignano P, Bertolini M, Losa M, Cavagnini F. Screening for Cushing's syndrome in obese women with and without polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:539-44.
105. Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Magro GP, Termine A, Paccotti P, Angeli A. Different pattern of steroid secretion in patients with adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:740-4.
106. Reincke M, Nieke J, Krestin GP, Saeger W, Allolio B, Winkelmann W. Preclinical Cushing's syndrome in adrenal "incidentalomas": comparison with adrenal Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 826-32.
107. Terzolo M, Pia A, Ali A, Osella G, Reimondo G, Bovio S, Daffara F, Procopio M, Paccotti P, Borretta G, Angeli A. Adrenal incidentaloma: a new cause of the metabolic syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 998-1003.
108. McLeod MK, Thompson NW, Gross MD, Bondeson AG, Bondeson L. Sub-clinical Cushing's syndrome in patients with adrenal gland incidentalomas. Pitfalls in diagnosis and management. *Am Surg.* 1990; 56:398-403.
109. Newell-Price J, Trainer P, Perry L, Wass J, Grossman A, Besser M. A single sleeping midnight cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995; 43:545-50.

110. Papanicolaou DA, Yanoski JA, Cutler GB, Chrousos GP, Nieman LK. A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1163-7.
111. Terzolo M, Bovio S, Reimondo G, Pia A, Osella G, Borretta G, Angeli A. Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34:423-39.
112. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Conton PA, Reimondo G, Dall'Asta C, Bemporad D, Angeli A, Opocher G, Mannelli M, Ambrosi B, Mantero F. Midnight serum cortisol as a marker of increased cardiovascular risk in patients with a clinically inapparent adrenal adenoma. *Eur J Endocrinol* 2005; 153:307-15.
113. Findling JW, Raff H. Diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin of North Am* 2001; 30:729-47.
114. Masserini B, Morelli V, Bergamaschi S, Ermetici F, Eller-Vainicher C, Barbieri AM, Maffini MA, Scillitani A, Ambrosi B, Beck-Peccoz P, Chiodini I. The limited role of midnight salivary cortisol in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:87-92.
115. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, Rault A, Loiseau H, Gatta B, Valli N, Letenneur L, Tabarin A. Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:456-62.
116. Morioka M, Fujii T, Matsuki T, Jo Y, Kobayashi T, Tanaka H, Ohashi T, Kondo K. Preclinical Cushing's syndrome: report of seven cases and a review of the literature. *Int J Urol* 2000; 7:126-32.

117. Tanabe A, Naruse M, Nishikawa T, Yoshimoto T, Shimizu T, Seki T, Takagi S, Imaki T, Takano K. Autonomy of cortisol secretion in clinically silent adrenal incidentaloma. *Horm Metab Res* 2001; 33:444-50.
118. Reincke M. Subclinical Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29:43-56.
119. Tauchmanova L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri EA, Fazio S, Lombardi G. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4872-8.
120. Beierwaltes WH, Sturman MF, Ryo U, Ice RD. Imaging functional nodules of adrenal glands with ¹³¹I-9-iodocholesterol. *J Nucl Med* 1974; 15:246-51.
121. Dominguez-Gadea L, Diez L, Piedrola-Maroto G, Crespo A. Scintigraphic diagnosis of subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentalomas. *Nucl Med Commun.* 1996;17:29-32.
122. Donadio F, Morelli V, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Carletto M, Castellani M, Dellavedova L, Scillitani A, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Role of adrenal gland scintigraphy in patients with subclinical hypercortisolism and incidentally discovered adrenal mass. *J Endocrinol Invest* 2009; 32:576-80.
123. Gross MD, Wilton GP, Shapiro B, Cho K, Samuels BI, Bouffard JA, Glazer G, Grekin RJ, Brady T. Functional and scintigraphic evaluation of the silent adrenal mass. *J Nucl Med.* 1987; 28:1401-7.
124. Bardet S, Rohmer V, Murat A, Guillemot C, Maréchaud R, Chupin M, Lecomte P, Simon D, Delemer B, Schneebelli S, Beutter D, Jacquin V, Peltier P, Charbonnel B. ¹³¹I-6 beta-iodomethylnorcholesterol scintigraphy: an assessment of its role in the investigation of adrenocortical incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996; 44:587-96.

125. Fagour C, Bardet S, Rohmer V, Arimone Y, Lecomte P, Valli N, Tabarin A. Usefulness of adrenal scintigraphy in the follow-up of adrenocortical incidentalomas: a prospective multicenter study. *EJE* 2009; 160:257-64.
126. Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Savoca C, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Iorio L, Beck-Peccoz P, Ambrosi B, Arosio M, Scillitani A, Chiodini I. Subclinical Hypercortisolism: correlation between biochemical diagnostic criteria and clinical aspects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 73:161-6.
127. Bondanelli M, Campo M, Trasforini G, Ambrosio MR, Zatelli MC, Franceschetti P, Valentini A, Pansini R, degli Uberti EC. Evaluation of hormonal function in a series of incidentally discovered adrenal masses. *Metabolism* 1997; 46:107-13.
128. Bulow B, Ahrén B. Adrenal incidentaloma--experience of a standardized diagnostic programme in the Swedish prospective study. *J Intern Med* 2002; 252: 239-46.
129. Tütüncü NB, Gedik O. Adrenal incidentaloma: report of 33 cases. *J Surg Oncol* 1999; 70:247-50.
130. Favia G, Lumachi F, Basso S, D'Amico DF. Management of incidentally discovered adrenal masses and risk of malignancy. *Surgery* 2000; 128:918-24.
131. Chiodini I, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Torlontano M, Cammisa M, Trischitta V, Scillitani A. Spinal volumetric bone mineral density and vertebral fractures in female patients with adrenal incidentalomas: the effect of subclinical hypercortisolism and gonadal status. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2237-41.
132. Matsuda M, De Fronzo R. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462-70.

133. Fernandez-Real JM, Richart Engel W, Simò R, Salinas I, Webb SM. Study of glucose tolerance in consecutive patients harbouring incidental discovered tumours. *Clin Endocrinol* 1998; 49:53-61.
134. Garrapa GG, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faloia E. Body composition and metabolic features in women with adrenal incidentaloma or Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5301-6.
135. Angeli A, Terzolo M. Editorial: adrenal incidentaloma- a modern disease with old complications. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 4869-71.
136. Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, Passini E, Bottasso B, Federici A. Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108:294-8.
137. Erbil Y, Ozbey N, Barbaros U, Unalp HR, Salmaslioglu A, Ozarmagan S. Cardiovascular risk in patients with non functional adrenal incidentaloma: myth or reality? *World J Surg* 2009; 33:2099-105.
138. Yener S, Genc S, Akinci B, Secil M, Demir T, Comlekci A, Ertlav S, Yesil S. Carotid intima media thickness is increased and associated with morning cortisol in subjects with non-functioning adrenal incidentaloma. *Endocrine* 2009; 35:365-70.
139. Sereg M, Szappanos A, Toke J, Karlinger K, Feldman K, Kaszper E, Varga I, Gláz E, Rácz K, Tóth M. Atherosclerotic risk factors and complications in patients with non-functioning adrenal adenomas treated with or without adrenalectomy: a long-term follow-up study. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:647-655.
140. Devogelaer JP. Incidentaloma, glucocorticoid excess and low bone mineral density: a coincidence? *Eur J Endocrinol* 2001; 145:237-9.

141. Torlontano M, Chiodini I, Pileri M, Guglielmi G, Cammisa M, Modoni S, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A. Altered bone mass and turnover in female patients with adrenal incidentaloma: the effect of subclinical hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2381-5.
142. Chiodini I, Tauchmanovà L, Torlontano M, Battista C, Guglielmi G, Cammisa M, Colao A, Carnevale V, Rossi R, Di Lembo S, Trischitta V, Scillitani A. Bone involvement in eugonadal male patients with adrenal incidentaloma and subclinical hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5491-4.
143. Tauchmanovà L, Rossi R, Nuzzo V, del Puente A, Esposito-del Puente A, Pizzi C, Fonderico F, Lupoli G, Lombardi G. Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:241-7.
144. Bardet S, Rohmer V, Boux de Casson F, Coffin C, Ronci N, Sabatier JP, Lecomte P, Audran M, Henry-Amar M, Tabarin A. Bone mineral density and biological markers of bone repair in patients with adrenal incidentaloma: effect of subclinical hypercortisolism. *Rev Med Interne*. 2002; 23:508-17.
145. Osella G, Reimondo G, Peretti P, Alì A, Paccotti P, Angeli A , Terzolo M. The patients with incidentally discovered adrenal adenoma (incidentaloma) are not at increased risk of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:604-7.
146. Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Guglielmi G, Cammisa M, Trischitta V, Scillitani A. Bone loss rate in adrenal incidentalomas: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5337-41.
147. Chiodini I, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Ermetici F, Morelli V, Salcuni A, Carnevale V, Urbano F, Muscarella S, Ambrosi B, Arosio M, Beck-

- Peccoz P, Scillitani A. Eugonadal male patients with adrenal incidentalomas and Subclinical hypercortisolism have increased rate of vertebral fractures. *Clin Endocrinol* 2009; 70:208-13.
148. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid induced osteoporosis: an update. *Trend Endocrinol Metab* 2006; 17:144-9.
149. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Predicting Human Vertebral Bone Strength by Vertebral Static Histomorphometry. *Bone* 2002; 30, Issue 3:502-8.
150. Link TM, Majumdar S, Grampp S, Guglielmi G, van Kuijk C, Imhof H, Glueer C, Adams JE. Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis. Review. *Eur Radiol* 1999; 9:1781-8.
151. Minne HW, Leidig G, Wüster C, Siromachkostov L, Baldauf G, Bickel R, Sauer P, Lojen M, Ziegler R. A newly developed spine deformity index (SDI) to quantitate vertebral crush fractures in patients with osteoporosis. *Bone Miner* 1988; 3:335-49.
152. Genant HK, Wu CY, van Knijk C, Nevitt M. Vertebral fracture assessment using a semi-quantitative technique. *J Bone Miner* 1993; 8:1137-48.
153. Genant HK, Delmas PD, Chen P, Jiang Y, Eriksen EF, dalsky GP, Marcus R, san Martin J. Severity of vertebral fracture reflects deterioration of bone microarchitecture. *Osteoporos Int* 2007; 18:69-76.
154. Delmas PD, Genant HK, Crans GG, Stock JL, Wong M, Siris E. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and non vertebral fractures: results for the MORE trial. *Bone* 2003; 33:522-32.
155. Crans GG, Genant HK, Krege JH. Prognostic utility of a semiquantitative spinal deformity index. *Bone* 2005; 37:175-179.
156. Chiodini I, Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Iorio L, Beck-Peccoz P, Arosio M,

- Ambrosi B, Scillitani A. Bone mineral density, prevalence of vertebral fractures and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian Multicenter Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:3207-14.
157. Osella G, Terzolo M, Reimondo A, Piovesan A, Pia A, Termine A, Paccotti P, Angeli A. Serum markers of bone and collagen turnover in patients with Cushing's syndrome and in subjects with adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3303-7.
158. Sartorio A, Conti A, Ferrero S, Giambona S, Re T, Passini E, Ambrosi B. Evaluation of markers of bone and collagen turnover in patients with active and preclinical Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 1998;138:146-52.
159. Francucci CM, Pantanetti P, Garrapa GG, Massi F, Arnaldi G, Mantero F. Bone metabolism and mass in women with Cushing's syndrome and adrenal incidentaloma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57:587-93.
160. Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A. Review article. Skeletal involvement in adult patients with endogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest* 2008; 31: 267-76.
161. Manenschijn L, van den Akker ELT, Lamberts SWJ, van Rossum EFC, Clinical Features Associated with Glucocorticoid Receptor Polymorphisms An Overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2009; 1179:179-98 .
162. Morelli V, Donadio F, Eller-Vainicher C, Cirello V, Olgiati L, Savoca C, Cairoli E, Salcuni AS, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest* 2010; 40:803-11.

163. Burguera B, Muruais C, Peñalva A, Dieguez C, Casanueva F.F. Dual and selective actions of glucocorticoids upon basal and stimulated growth hormone release in man. *Neuroendocrinology* 1990; 51:51-8.
164. A.E. Smals, G.F. Pieters, A.G. Smals, T.J. Benraad, P.W. Kloppenborg. Human pancreatic growth hormone releasing hormone fails to stimulate human growth hormone both in Cushing's disease and in Cushing's syndrome due to adrenocortical adenoma. *Clin Endocrinol* 1986; 24:401-7.
165. M. Tzanela, N. Karavitaki, C. Stylianidou, S. Tsagarakis, N. C. Thalassinou. Assessment of GH reserve before and after successful treatment of adult patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 2004; 60:309-14.
166. Leal-Cerro A, Soto A, Martínez MA, Alvarez P, Isidro L, Casanueva FF, Dieguez C, Cordido F. Effect of withdrawal of somatostatin plus growth hormone (GH)-releasing hormone as a stimulus of GH secretion in Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57:745-9.
167. J.P. Monson. Long-term experience with GH replacement therapy: efficacy and safety. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:S9-14.
168. R. D. Murray, J. E. Adams, S. M. Shalet. Adults with Partial Growth Hormone Deficiency Have an Adverse Body Composition. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2004; 89:1586-91.
169. Wuster C, Abs R, Bengtsson BA, Bennmarker H, Feldt- Rasmussen U, Hernberg-Stahl E et al. The influence of growth hormone deficiency, growth hormone replacement therapy, and other aspects of hypopituitarism on fracture rate and bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001 16 398–405.
170. M. Tzanela, D. Zianni, Ch. Stylianidou, N. Karavitaki, S. Tsagarakis, N. C. Thalassinou. Evaluation of GH reserve in patients with adrenal incidentalomas and

- biochemical evidence of subclinical autonomous glucocorticoid hypersecretion. *Clin. Endocrinol* 2005; 62:597-602.
171. Kasperlik-Załuska AA, Otto M, Cichocki A et al. Incidentally discovered adrenal tumors: a lesson from observation of 1,444 patients. *Horm Metab Res* 2008; 40:338-341.
172. Barzon L, Fallo F, Sonino N, Boscaro M. Development of overt Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 2002;146: 61-66.
173. Emral R, Uysal AR, Asik M, Gullu S, Corapcioglu D, Tonyukuk V, Erdogan G. Prevalence of subclinical Cushing's syndrome in 70 patients with adrenal incidentaloma: clinical, biochemical and surgical outcomes. *Endocrine J* 2003; 50:399-408.
174. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Suzuki T, Watanabe T. The improvement of insulin resistance in patients with adrenal incidentaloma by surgical resection. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54:797-804.
175. Chiodini I, Morelli V, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Torlontano M, Coletti F, Iorio L, Cuttitta A, Ambrosio A, Vicentini L, Pellegrini F, Copetti M, Beck-Peccoz P, Arosio M, Ambrosi B, Trischitta V, Scillitani A. Beneficial metabolic effects of prompt surgical treatment in patients with an adrenal incidentaloma causing biochemical hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2736-45.
176. Guglielmi G, Giannatempo GM, Blunt BA, Grampp S, Gluer CC, Cammisa M, Genant HK. Spinal bone mineral density by quantitative CT in a normal Italian population. *Eur Radiol* 1995; 5:269-75.
177. Corneli G, Di Somma C, Baldelli R, Rovere S, Gasco V, Croce CG, Grottoli S, Maccario M, Colao A, Lombardi G, Ghigo E, Capanni F, Aimaretti G. The cut-off

- limits of the GH-response to GH releasing hormone-arginine test related to body mass index. *Eur J Endocrinol* 2005; 153:257–264.
178. Ghigo E, Aimaretti G, Gianotti L, Bellone J, Arvat E, Camanni F. New approach to the diagnosis of growth hormone deficiency in adults. *Eur J Endocrinol* 1996; 134:352-6.
179. Pecori Giraldi F, Moro M, Cavagnini F. Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease. Study Group on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1554-8.
180. Richy F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY. Efficacy of alphacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int* 2004;15:301-10.
181. Findling JW, Raff H. Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34:385-402.