



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

**Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e Malattie del ricambio**

Tesi di Specializzazione:

**Sindrome di Cushing e malattie autoimmuni organo e non organo
specifiche: revisione di un'ampia casistica**

Relatori:

Prof. Claudio Marcocci
Dott. Luca Manetti

Candidata:

Dr.ssa Valentina Raffaelli

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1. RIASSUNTO.....	4
2. INTRODUZIONE.....	6
2.1 Immunità innata: cenni	6
2.1.1 Barriere chimico-fisiche	7
2.1.2 Fagocitosi e <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (PAMPS)	7
2.1.3 Citochine	8
2.2 Immunità innata e sistema neuroendocrino	8
2.3 Immunità acquisita: cenni	10
2.4 Immunità acquisita e sistema neuroendocrino	12
2.5 Focus sul ruolo dei glucocorticoidi	13
2.6 Autoimmunità: cenni	16
2.7 Malattie autoimmuni	18
3. SCOPO DELLA TESI	22
4. PAZIENTI E METODI	23
4.1 Popolazione dello studio.....	23
4.2 Criteri di diagnosi di ipercortisolismo	25
4.2.1 Criteri di diagnosi di Malattia di Cushing	25
4.2.2 Criteri di diagnosi di Sindrome di Cushing da secrezione ectopia	26
4.2.3 Criteri di diagnosi di Sindrome di Cushing	26
4.2.4 Criteri di guarigione/remissione di malattia	26
4.3 Criteri di definizione di attività di malattia	27
4.3.1 Criteri di definizione di remissione e controllo di malattia	27
4.4 Considerazioni sull' <i>outcome</i> di alcuni pazienti	28
4.5 Trattamento dell'ipercortisolismo	29
4.5.1 Trattamenti dei pazienti affetti da Malattia di Cushing	29
4.5.2 Trattamenti dei pazienti affetti da Sindrome di Cushing da secrezione	30

ectopia	
4.5.3 Trattamenti dei pazienti affetti da Sindrome di Cushing	30
4.6 Rapporti tra autoimmunità e Sindrome di Cushing	30
4.7 Analisi statistica	33
5. RISULTATI	34
5.1 Premessa.....	34
5.2 <i>Outcome</i>	34
5.2.1 <i>Outcome</i> positivo	34
5.2.2 <i>Outcome</i> negativo	35
5.3 Patologie immuno-mediate	36
5.3.1 Patologie immuno-mediate all'arruolamento	36
5.3.2 Patologie immuno-mediate al tempo dell'ultima valutazione	37
5.3.3 Modulazione delle malattie immuno-mediate durante il follow-up	39
5.3.3.1 Dettagli clinici sui pazienti che hanno manifestato episodi di riacutizzazione nel corso del follow-up	41
5.3.4 Patologie immuno-mediate: dati riassuntivi sulla prevalenza	41
5.3.5 Focus sulla tiroide con particolare attenzione alle malattie autoimmuni	43
6. DISCUSSIONE	46
6.1 Rapporti tra sindrome di Cushing e autoimmunità	46
7. CONCLUSIONI.....	49
8. BIBLIOGRAFIA.....	50

1. RIASSUNTO

La fitta e complessa rete di scambi tra sistema neuroendocrino e immunitario è nota da ormai più di un ventennio e si esplica, attraverso feed-back bidirezionali, a vari livelli. Sicuramente un ruolo decisivo è svolto dai glucocorticoidi (GC) che rimangono, a oggi, il più potente meccanismo endogeno d'inibizione del processo infiammatorio e dell'immunità.

I GC svolgono un'importante azione sul sistema immunitario (fisiologica e farmacologica), modulando in modo significativo l'attività di tutte le cellule che partecipano alla risposta immune (naturale e adattativa).

La Sindrome di Cushing (SC) è caratterizzata da anomalie del sistema immunitario e l'eccesso di GC induce uno stato reversibile di immunosoppressione. Questo effetto in parte si riflette in un miglioramento delle malattie autoimmuni durante la SC attiva. Al contrario, la remissione della malattia con un ripristino di livelli di cortisolo nel range della normalità, sembra essere associato con un rischio di peggioramento di malattie autoimmuni note e, inoltre, con l'insorgenza di quadri di nuova diagnosi.

Fatta eccezione per numerosi case report, che descrivono la comparsa di una malattia autoimmune, o il suo peggioramento, in pazienti affetti da SC dopo la risoluzione dell'ipercortisolismo e per un unico studio, che peraltro valuta la prevalenza esclusivamente della tiroidite cronica autoimmuni in questa categoria di pazienti, in letteratura non esistono, attualmente, studi di popolazione che valutino la prevalenza delle malattie immuno-mediate in soggetti affetti da SC sia ACTH dipendente che indipendente. Pertanto questo studio storico prospettico si pone l'obiettivo valutare, in una popolazione di pazienti affetti da sindrome di Cushing, la prevalenza delle malattie immuno-mediate (autoimmuni, organo- e non organo-specifiche, e allergiche) in fase attiva e in remissione

dall'ipercortisolismo, al fine di stabilire una possibile correlazione tra l'andamento clinico (inteso come remissione/persistenza) della malattia endocrina e l'insorgenza o il peggioramento di patologie autoimmuni/allergiche.

2. INTRODUZIONE

La stretta relazione tra sistema neuroendocrino e immunitario è ormai nota dagli anni 80, in particolare, grazie al lavoro di Weigent e Blalock (1). E' stata, infatti, dimostrata l'esistenza del circuito sistema neuroendocrino - sistema immunitario, alla cui base, vi è un meccanismo molecolare complesso, che coinvolge l'uso condiviso di molecole di segnale comuni e i loro recettori suggerendo, quindi, una comunicazione bidirezionale tra i due sistemi. Le principali conclusioni alle quali questi due autori arrivarono furono che: 1) le cellule del sistema immunitario esprimono i recettori per la maggior parte dei neuropeptidi ed ormoni circolanti e, le stesse, possono sintetizzare ormoni neuroendocrini biologicamente attivi, 2) gli ormoni neuroendocrini possono, quindi, influenzare l'attività del sistema immunitario e infine, 3) le citochine possono, a loro volta, influenzare il tessuto neuroendocrino.

Il network di connessione tra i due sistemi, coinvolge anche il sistema nervoso, essendo mediato, non solo, da circuiti ormonali, citochine, neuropeptidi e chemochine ma anche da vie nervose e neurotrasmettitori (2). Le cellule del sistema immunitario, endocrino e nervoso possono sia sintetizzare sia esprimere i recettori per citochine, ormoni, neurotrasmettitori e neuropeptidi. In tal modo, attraverso un'azione autocrina, paracrina ed endocrina, queste molecole sono i mediatori di un'intensa comunicazione a *feedback* bidirezionali (3). In particolare, ormoni, neuropeptidi e neurotrasmettitori partecipano, insieme alle citochine, alla risposta immunitaria innata e acquisita.

2.1 Immunità innata: cenni

L'immunità innata, vera prima linea di difesa dell'organismo, è un insieme di processi di protezione, presenti già prima dell'esposizione all'antigene, messi in atto dall'organismo contro eventi patogeni. È un

sistema non specifico, a differenza dell'immunità acquisita, è immediata (0-96 ore), altamente efficiente e non ha memoria immunologica.

I componenti principali dell'immunità innata sono:

- 1) barriere fisico-chimiche;
- 2) proteine ematiche: componenti del sistema del complemento ed altri mediatori dell'infiammazione;
- 3) le cellule fagocitiche (macrofagi);
- 4) fattori solubili, come ad esempio le citochine.

Infine i linfociti NK (Natural Killer), i mastociti, gli eosinofili, i basofili, i macrofagi, i neutrofilo e le cellule dendritiche sono ulteriori preziosi componenti del sistema immunitario innato che, collaborando con l'immunità acquisita, identificando ed eliminando gli agenti patogeni, cercano di attivare una risposta immunitaria ottimale.

2.1.1 Barriere chimico-fisiche

La prima barriera d'ingresso è rappresentata dagli epitelio, a partire da quello della cute fino a quelli delle mucose dell'apparato respiratorio, gastrointestinale e genitourinario.

Le mucose, inoltre, sono in grado di produrre il muco, fluido viscoso ricco in glicoproteine, che imprigiona i microorganismi impedendo loro il legame all'epitelio e grazie al movimento delle ciglia vengono espulsi col muco stesso. Inoltre, il basso pH dello stomaco, così come gli enzimi digestivi presenti nell'intestino o nella saliva, rappresenta un'ulteriore barriera protettiva. Infine, la flora saprofitica fisiologica svolge un'azione di competizione nei confronti dei patogeni proteggendo l'organismo ospite (pro-biotici).

2.1.2 Fagocitosi e *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPS)

La risposta immediatamente successiva a quella delle barriere chimico-fisiche dell'organismo è rappresentata dalla fagocitosi. Questo processo è mediato prevalentemente da fagociti professionisti (come i neutrofili circolanti, i macrofagi tissutali e gli eosinofili) e in minor quota da monociti circolanti che si trasformano in macrofagi maturi dopo essere stati richiamati nel sito d'infezione, dopo la fase infiammatoria iniziale.

I fagociti sono in grado di riconoscere i patogeni tramite recettori che si legano a strutture altamente conservate tra i microrganismi, dette PAMPS (*pathogen associated molecular patterns*). A differenza degli antigeni, i PAMPS sono strutture molto comuni tra i patogeni, condivise anche da virus e batteri diversi, e sono prodotti solo dai patogeni e non dalle cellule ospiti, permettendo la fondamentale distinzione tra *self* e *non-self*.

I recettori per i PAMP sono detti *pattern recognition receptors* (PRR) e possono svolgere la funzione di opsonizzazione del patogeno oppure quella di attivare le cellule della risposta immunitaria sia innata che acquisita (ecco perché i fagociti rappresentano il legame tra la risposta immunitaria nativa e acquisita).

Un'altra classe di recettori per i PAMPS, è rappresentata dai *Toll like receptors* (TLR), proteine transmembrana. A differenza di quanto visto per le proteine opsonizzanti o per i recettori che facilitano la fagocitosi, il legame tra TLRs e PAMPS attiva una cascata di segnali che conduce, in ultima analisi, alla rimozione del microorganismo.

Una volta legato il PAMPS, il recettore TLR dimerizza e va ad attivare la via di segnale (comune anche ai recettori della famiglia dell'interleuchina -1 (IL1R) responsabile dell'attivazione precoce del fattore trascrizionale *nuclear factor kB* (NF-kB). Le vie di segnale di NF-kB attivate dai TLR portano alla produzione di alcune molecole pro-infiammatorie come le interleuchine 1 β e 12, il TNF α ma anche la

chemochina CXCL8 (IL-8), che è responsabile dell'attrazione al sito infiammatorio dei neutrofili.

2.1.3 Citochine

Le principali citochine pro-infiammatorie sono l'interleuchina 1 β (IL 1 β) e il *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), peraltro le prime ad essere prodotte e ad aumentare in circolo durante l'infiammazione, prodotte da cellule del sistema immune ed in particolare dai macrofagi attivati. Successivamente sono rilasciate IL6, IL8 e la citochina antinfiammatoria IL10.

Gli Interferoni sono prodotti e rilasciati dalle cellule infettate dai virus per favorire la protezione dall'infezione virale delle cellule circostanti; inoltre attivano le cellule NK.

2.2 Immunità innata e sistema neuroendocrino

Lo stretto network esistente tra sistema neuroendocrino e sistema immunitario inizia con l'attività dell'immunità innata e in particolare con l'azione delle citochine. Le citochine pro-infiammatorie, come IL-1 α e β e IL-6, sintetizzate dalle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells*, APC) attraverso la via dei TLRs, superano la barriera emato-encefalica e raggiungono, nel sistema nervoso centrale, i centri che controllano la termoregolazione a livello dell'ipotalamo anteriore e vanno ad attivare i neuroni dell'organo vascoloso della lamina terminale e del nucleo parvicellulare stimolando il rilascio di Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) (4), ciò comporta un incremento della produzione di glucocorticoidi (GC) che controbilancia la risposta infiammatoria. Proprio il rilascio dei GC è il più potente meccanismo endogeno di soppressione della risposta genica all'infiammazione e del segnale Toll receptor (4). Le citochine interagiscono con gli assi ipotalamo-ipofisari anche bypassando il SNC ed agendo direttamente sulle cellule ipofisarie .

Come è noto, anche il sistema del complemento svolge un ruolo di rilievo nell'immunità innata ed anche questo rappresenta un punto di collegamento focale tra sistema immune ed endocrino. Il recettore del complemento C3a si trova, infatti, a livello del surrene, dell'ipofisi, delle cellule gliali e dei neuroni (5), suggerendo che il C3a possa attivare direttamente l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e stimolare il rilascio di ormone della crescita (GH), prolattina (PRL) e ormone adrenocorticotropo (ACTH).

2.3 Immunità acquisita: cenni

Rispetto all'immunità naturale, l'immunità acquisita, detta anche specifica, rappresenta un sistema di difesa più sofisticato, costituito da meccanismi che vengono indotti e stimolati dall'esposizione all'antigene, sono strettamente specifici per le diverse molecole e la loro intensità ed efficacia è incrementata da ripetute esposizioni. Caratteristica del tutto particolare e unica del sistema immunitario specifico è inoltre la capacità di discriminare tra antigeni esogeni e antigeni autologhi. In definitiva, l'immunità acquisita ha l'obiettivo di potenziare la risposta immunitaria naturale, amplificando, orientando e focalizzando tale risposta nei confronti dell'agente estraneo. Possiamo distinguere due tipi d'immunità specifica: umorale, rappresentata dagli anticorpi e che interviene nella risposta ad antigeni extracellulari, e l'immunità cellulo-mediata che è coinvolta nell'eliminazione di cellule infettate da microrganismi intracellulari (virus, miceti ed alcune specie di batteri) e di cellule neoplastiche.

La prima fase della risposta immunitaria specifica è la processazione degli antigeni da parte di cellule macrofagiche e dendritiche (APC) e la successiva presentazione ai linfociti T e B che presentano recettori specifici (TCR e BCR, T e B cell receptor) espressi sulla membrana

cellulare atti al riconoscimento e al legame con gli antigeni. Il legame antigene-recettore, determina l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione in cellule effettrici. Alcune cellule, prodotte durante l'espansione clonale, vanno incontro alla differenziazione in cellule della memoria, che sono in grado, ad un eventuale nuovo incontro con lo stesso antigene, di rispondere più rapidamente, con selettività ed efficienza.

I linfociti sono le uniche cellule dell'organismo in grado di riconoscere specificamente antigeni diversi, grazie a recettori espressi sulla membrana cellulare. Ogni individuo possiede un elevato numero di cloni linfocitari, ciascuno dei quali derivato da un singolo precursore ed esprime un recettore per un antigene diverso da quello di tutti gli altri cloni linfocitari, e capace di riconoscere un unico determinante antigenico. Il legame dell'antigene al recettore specifico seleziona il clone linfocitario con la maggiore affinità e lo attiva, stimolandone la proliferazione e la differenziazione.

I linfociti B producono gli anticorpi, inizialmente espressi sulla membrana cellulare come recettori per l'antigene. Sfruttando complessi meccanismi genetici sintetizzano un elevato numero di anticorpi diversi producendo un *pool* anticorpale estremamente diversificato permettendo al sistema immunitario di riconoscere enormi quantità di antigeni differenti. Il legame linfocita B-antigene porta alla prima fase dell'attivazione del linfocita a seguito della quale, grazie all'azione di citochine rilasciate dai linfociti T *helper*, il linfocita B diventerà plasmacellula in grado di produrre e rilasciare in forma solubile gli anticorpi specifici per quell'antigene.

I linfociti T, attraverso il loro recettore di membrana (*T cell receptor*, TRC), legano peptidi patogeni solo se complessati a proteine di membrana, codificate dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e sintetizzate dalle APC. Funzionalmente si

distinguono in T helper (CD4) e T citotossici (CD8). I primi hanno il compito di favorire la risposta immunitaria rilasciando due citochine: stimolanti altri linfociti T e i macrofagi (IL-1, IL-2, IFN- γ) e attivanti i linfociti B (IL-4, IL-5, IL-6, IL10); i secondi eliminano le cellule infettate o neoplastiche che esprimono sulla loro membrana gli antigeni estranei complessati alle molecole MHC.

2.4 Immunità acquisita e sistema neuroendocrino

Il sistema neuroendocrino interagisce con l'immunità acquisita (detta anche specifica) a vari livelli modulandone la risposta.

A partire dalla fine degli anni '80, studi condotti su ratti ipofisectomizzati con deficit di GH, PRL e TSH (topo *Snall-Bagg dwarf* con ipopituitarismo derivante con una mutazione puntiforme di fattore di trascrizione Pit-1), hanno evidenziato l'insorgenza di alterazioni dello sviluppo di diversi comparti del sistema immunitario, nonché la compromissione delle risposte immunitarie sia cellulo-mediata sia umorale (6). I GC inibiscono la produzione di citochine pro-infiammatorie e spostando, l'equilibrio dei linfociti T *helper 1*/T *helper 2* verso il sottotipo 2, determinano l'aumento rilevante dei livelli circolanti di citochine anti-infiammatorie. Un ruolo di rilievo nel controllo dell'attività del sistema immunitario e in particolare dell'immunità acquisita, è svolto dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Infatti, a livello delle cellule degli organi linfoide e delle cellule immunitarie della periferia, sono presenti i recettori degli steroidi sessuali e del *gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH). E' noto come il GnRH sia coinvolto nel processo di maturazione dei linfociti che si verifica nel timo ed, inoltre, stimoli il rilascio di IL-2, IFN- γ e dei linfociti T-*helper* (7). Gli estrogeni, agendo attraverso i recettori specifici (ER), modulano gli effetti dei linfociti B e T maturi. Livelli fisiologici di estrogeni incrementano la produzione di citochine

pro-infiammatorie, mentre concentrazioni farmacologiche ne riducono la sintesi (7). Infine, altri due ormoni di rilievo nell'immunomodulazione, sono il *Thyroid stimulating hormon* (TSH) e la PRL. Nelle condizioni di stress acuto e cronico si ha, tipicamente, un'alterazione della funzione del sistema ipotalamo-ipofisi-tiroide che porta al delinarsi della sindrome da bassa T3, che va a modulare la risposta dell'immunità acquisita. Riguardo alla PRL è noto che le cellule immunitarie esprimano sia l'ormone che il suo recettore (8). Inoltre la PRL è in grado di stimolare la sintesi dell'ossido nitrico, il rilascio d'immunoglobuline e citochine (8) ed è un mitogeno di linfociti T (9).

2.5 Focus sul ruolo dei glucocorticoidi

Il ruolo inibitorio dei glucocorticoidi è noto già dalla fine degli anni 40 quando Philip Hench e i suoi collaboratori, alla ricerca di una cura per l'artrite reumatoide, sperimentarono un nuovo farmaco denominato cortisone approvato dalla *Food and Drug Administration* proprio in quegli anni. Le ricerche che ne seguirono chiarirono molti degli aspetti riguardanti la struttura e gli effetti biologici del farmaco e valse a questo gruppo di medici ricercatori il Premio Nobel nel 1950.

Studi successivi indicarono un ruolo decisivo dell'ipercortisolismo nel determinismo di disfunzioni del sistema immunitario, a partire da una vera e propria involuzione della massa del tessuto linfoide fino a una linfopenia associata un aumento della suscettibilità alle infezioni (10). Risale al 1989 la prima dimostrazione che un deficit dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) è un importante fattore di rischio per la suscettibilità allo sviluppo di artrite su base infiammatoria in ratti predisposti alle malattie autoimmuni (11). Da allora, la compromissione dell'asse HPA è stata dimostrata in molte malattie infiammatorie e autoimmuni nell'uomo, attraverso anche numerosi modelli animali, inclusa l'artrite reumatoide

(12), il Morbo di Crohn (13), la sclerosi multipla (13) e condizioni allergiche come l'asma e le dermatiti (14). Proprio a partire dagli anni '90 è stata riportata la correlazione tra la remissione dell'ipercortisolismo, nei pazienti affetti da Sindrome di Cushing, e lo sviluppo/esacerbazione di malattie autoimmuni (15). In particolare, sono stati pubblicati vari *case report* sull'esacerbazione del morbo celiaco (16), lo sviluppo di sarcoidosi (17), di lupus eritematoso sistemico (18), la comparsa di tiroide cronica linfocitaria (19).

Da un lato, i difetti dell'asse HPA incrementano la suscettibilità e la severità dell'infiammazione, dall'altro l'iperattività dell'asse HPA, in assenza d'infiammazione, come nella Sindrome di Cushing, causa immunosoppressione e aumenta la suscettibilità all'infiammazione. I GC giocano un ruolo fondamentale nella regolazione fisiologica dello sviluppo della risposta immune e nella soppressione della risposta infiammatoria. Gli effetti antinfiammatori e immunosoppressivi dei GC sono inestricabilmente connessi, condividendo molti meccanismi e *pathways*.

I GC esercitano il loro effetto immunomodulatore attraverso il loro recettore (GR) localizzato nel citoplasma in forma inattiva (complessato alle proteine *heat-shock*). Il legame dei GC al recettore intracellulare comporta la liberazione dalle proteine *heat-shock* e la traslocazione del complesso GC-GR nel nucleo. A questo livello il GC-GR può:

- 1) influenzare direttamente la trascrizione genica attraverso la dimerizzazione del recettore ed il successivo legame con specifiche sequenze palindromiche (*GC response elements*) facenti parte di promotori di geni *target*

- 2) interagire, attraverso una modalità non dipendente dalla dimerizzazione, con altri fattori di trascrizione quali NF-kB e AP-1 (*activator protein-1*) (20), bloccando la loro capacità di attivare

l'espressione genica con un processo chiamato "trans-repressione".

E' proprio la trans-repressione a mediare prevalentemente l'azione anti-infiammatoria dei GC.

La trans-repressione dei geni dell'infiammazione è il meccanismo generalmente accettato alla base della loro risposta antinfiammatoria. I GCs inibiscono, per esempio, fattori vasoattivi e chemiotattici, enzimi lipolitici, proteolitici, proinfiammatori come ciclo-ossigenasi (COX)-2 e *nitricoxide synthase type 2* (NOS2).

Inoltre, i GC proteggono dall'apoptosi anche il tessuto in cui l'infiammazione si sviluppa con un'azione anti-apoptotica diretta e con una mediata dall'inibizione dei mediatori dell'infiammazione, capaci essi stessi di indurre apoptosi-(21).

In maniera simile, i GC inibiscono la produzione di mediatori importanti per la generazione di una risposta immune regolando citochine, recettori per citochine, apoptosi e proliferazione in una complessa rete di segnali che coinvolge tutte le cellule della risposta immune (22).

L'azione antinfiammatoria dei GR si esplica principalmente attraverso la stabilizzazione delle membrane lisosomiali, l'inibizione della sintesi delle prostaglandine e leucotrieni, il blocco dei mediatori della risposta infiammatoria (bradichinina, serotonina, istamina, IL-1 e 2, fattore attivante il plasminogeno) e la riduzione della permeabilità vascolare. Inoltre, riducono l'attività chemiotattica e della migrazione leucocitaria (attraverso azione su ELAM-1 e ICAM-1) con aumento dei neutrofilo circolanti.

L'azione immunosoppressiva dei GC, che si osserva in seguito al trattamento delle malattie autoimmunitarie e nella infiammazione cronica, dipende soprattutto dalla modulazione della risposta immunitaria adattativa con particolare riferimento all'attivazione dei linfociti T.

Inoltre, i GC modulano la differenziazione dei linfociti T maturi controllando l'espressione di citochine e dei loro recettori. I GC, ad esempio, *down*-regolano l'IL-2, cruciale per l'attivazione ed espansione dei linfociti T (23), inibiscono la produzione di IFN- γ inibendo lo sviluppo di una risposta Th-1, mentre *up*-regolano la produzione di IL-4 favorendo una risposta Th-2.

L'azione immunosoppressiva è caratterizzata da: riduzione dei linfociti circolanti, dei monociti e degli eosinofili e, di questi ultimi, inibisce la degranulazione. I GC, inoltre, inibiscono la produzione di citochine, soprattutto IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 e 6, riducono l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I e II, e inibiscono la produzione degli anticorpi da parte dei linfociti B.

L'azione inibitoria sull'asse immunitario influenza, a sua volta, l'asse HPA, poiché la conseguente ridotta secrezione di IL-1 riduce la secrezione di CRH e ACTH.

In ultima analisi, i GC a dosi farmacologiche, riducono la risposta infiammatoria e la massa degli organi linfatici (milza, timo e linfonodi), ma aumentano la suscettibilità alle infezioni da batteri, virus, miceti e parassiti.

2.6 Autoimmunità: cenni

L'autoimmunità è una condizione strettamente legata ad anomalie dei processi fisiologici d'induzione e di mantenimento della tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti del *self*.

La tolleranza immunologica consiste nella perdita della capacità del sistema immunitario a rispondere a un determinato antigene, indotta da un precedente incontro con l'antigene stesso.

Quando i linfociti incontrano l'antigene specifico si possono verificare tre condizioni: 1) il linfocita viene attivato determinando la risposta

immune specifica; 2) il linfocita viene inattivato od eliminato con conseguente tolleranza nei confronti di quell'antigene; 3) l'antigene non induce alcuna risposta, né di tipo positivo, né di tipo negativo (anergia). Esistono due principali modalità di induzione della tolleranza immunologica, la tolleranza centrale e la tolleranza periferica.

La tolleranza centrale si verifica a livello degli organi linfatici centrali (midollo osseo per i linfociti B, timo per i linfociti T) quando i linfociti, durante lo sviluppo e la maturazione, incontrano il rispettivo antigene. In tal caso, essi non vengono attivati, ma divengono tolleranti nei confronti di quell'antigene. In genere, gli antigeni esistenti ad alte concentrazioni a livello degli organi linfatici primari, sono gli autoantigeni (gli antigeni provenienti dall'ambiente esterno vengono generalmente catturati dalle cellule dell'immunità naturale e trasportati verso gli organi linfatici secondari: milza, linfonodi, tessuti linfoidei delle mucose). I linfociti immaturi, dotati di recettori ad alta affinità nei confronti degli autoantigeni incontrati a livello degli organi linfatici primari durante il loro sviluppo, vengono eliminati.

La tolleranza periferica permette di mantenere la tolleranza nei confronti di quegli autoantigeni che non sono rappresentati a livello timico o midollare, ma sono invece espressi nei tessuti periferici. Esistono infatti numerosi cloni di linfociti maturi che sfuggono al processo di selezione negativa per mancanza di contatto con gli autoantigeni e che sono quindi potenzialmente autoreattivi una volta arrivati in periferia. In particolare, i linfociti B autoreattivi divengono funzionalmente incapaci di rispondere all'antigene, oppure sono addirittura esclusi dai follicoli linfatici. Mentre la tolleranza periferica nei confronti dei linfociti T autoreattivi può verificarsi attraverso tre meccanismi principali: l'anergia, la delezione, la soppressione.

Una rottura della tolleranza (conseguente al deficit o all'alterazione dei meccanismi normalmente responsabili del mantenimento della tolleranza) può determinare una risposta del sistema immunitario nei confronti del *self* e quindi provocare l'insorgenza di fenomeni di autoimmunizzazione.

Come abbiamo visto, i meccanismi fondamentali per lo sviluppo e il mantenimento della tolleranza al *self* sono rappresentati dalla eliminazione dei linfociti immaturi che incontrano gli autoantigeni durante il loro processo di sviluppo (selezione negativa) e dalla delezione o inattivazione funzionale dei linfociti maturi che incontrano autoantigeni nel corso della vita, la perdita della tolleranza nei confronti degli autoantigeni può essere la conseguenza sia di una selezione anomala dei linfociti autoreattivi, cioè di un difetto della tolleranza centrale, sia di alterazioni della presentazione degli autoantigeni alle cellule del sistema immunitario, cioè di un'anomalia della tolleranza periferica.

E' noto che nello sviluppo di una risposta autoimmunitaria vi deve essere un evento scatenante che determina la rottura della tolleranza periferica. L'accesso inappropriato ad antigeni tissutali, la loro espressione ed alterata presentazione antigenica, come anche l'espressione di molecole co-stimolatorie o HLA di classe II da parte di APC non professioniste, sono tutte potenziali cause di sviluppo di autoimmunità. Durante il danno tissutale e la reazione infiammatoria che ne consegue vi possono essere le condizioni per la rottura della tolleranza periferica

L'autoimmunità può ovviamente risultare da anomalie dei linfociti B, dei linfociti T o di entrambe le popolazioni linfocitarie.

2.7 Malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni sono un gruppo di patologie clinicamente eterogenee sia per le modalità di presentazione sia per la gravità, con

quadri clinici che variano da affezioni limitate ad un organo, a forme con interessamento sistemico.

Per essere definite tali le malattie autoimmuni devono soddisfare i seguenti criteri:

1) gli autoanticorpi o linfociti T autoreattivi devono essere trovati in corso di malattia e devono essere trovati nel tessuto danneggiato (questi due criteri sono facilmente soddisfatti nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, in particolare quelle che hanno come *target* ghiandole endocrine; più complicato da soddisfare dove l'autoantigene non è noto);

3) il livello di autoanticorpi e della risposta T cellulare riflette l'attività della malattia

4) la riduzione della risposta autoimmunitaria determina un miglioramento

5) il trasferimento degli anticorpi o cellule T ad un ospite secondario determina lo sviluppo della patologia autoimmune (dimostrato ampiamente nei modelli animali). Nell'uomo sono dimostrabili casi in neonati per trasferimento transplacentare di autoanticorpi (morbo di Basedow neonatale, pemfigo neonatale, anemia emolitica).

6) l'immunizzazione con autoantigeni e la conseguente induzione di una risposta autoimmune causa la malattia (dimostrato nei modelli animali).

Le malattie autoimmuni possono colpire qualsiasi organo, sebbene alcuni sistemi sembrano particolarmente suscettibili (come le ghiandole endocrine).

In base alla sede della reazione immunologica aberrante le malattie autoimmuni possono essere distinte in organo-specifiche e non-organospecifiche (o sistemiche).

Nelle malattie organo specifiche la risposta autoimmunitaria è diretta verso antigeni multipli di un organo. Tipicamente coinvolgono ghiandole

endocrine e gli auto-antigeni sono spesso recettori ormonali o enzimi intracellulari tipici dell'organo interessato (tiroidite cronica linfocitaria e diabete di tipo 1). Nelle malattie non organo specifiche la reazione autoimmune coinvolge più organi e tessuti ed è diretta contro molecole *self* largamente distribuite nell'organismo in particolare molecole intracellulari coinvolte nella trascrizione del DNA (esempi di patologie autoimmuni sistemiche sono il Lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide e le dermatomiositi).

In realtà la suddivisione in organo e non organo specifiche è talvolta puramente didattica perché esiste un *continuoum* tra malattie che colpiscono in maniera esclusiva un solo organo e quelle sistemiche. Inoltre, soggetti che presentano una malattia autoimmune sono spesso predisposti a svilupparne altre.

Le malattie autoimmuni sono patologie in cui si riconosce un'eziopatogenesi multifattoriale. A partire da un *background* genetico predisponente, vi è un evento scatenante che abbatte la tolleranza periferica attraverso molteplici meccanismi:

- 1-alterazione dell'anergia clonale,
- 2-mancata attivazione dell'apoptosi,
- 3-mancata soppressione delle cellule T,
- 4-mimetismo molecolare,
- 5-attivazione linfocitaria policlonale,
- 6-rilascio di antigeni sequestrati,
- 7-esposizione di epitopi *self* o criptici.

Quindi si riconosce, contemporaneamente, la presenza di geni di suscettibilità che influenzano il mantenimento della tolleranza, e fattori ambientali scatenanti (infezioni, ormoni, agenti fisici) che promuovono l'attivazione di linfociti auto-reattivi.

Una volta innescato il processo autoimmune, con rottura della tolleranza immunologica, i meccanismi che determinano il danno tissutale e/o funzionale nelle malattie autoimmuni sono riconducibili ai meccanismi di reazioni d'ipersensibilità di tipo II (o citotossico: gli anticorpi interagiscono con gli antigeni presenti sulla superficie cellulare, cioè vanno a danneggiare direttamente le cellule rendendole suscettibili alla fagocitosi), III (o mediata da immunocomplessi: il legame antigene-anticorpo forma un complesso che attiva il sistema del complemento) e IV (o cellulo-mediata: il danno tissutale è prodotto dall'attivazione di linfociti T).

3. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo primario di questo studio storico prospettico è di valutare, in una popolazione di pazienti affetti da sindrome di Cushing, seguita presso il Dipartimento di Endocrinologia dell'Università di Pisa, la prevalenza delle malattie immuno-mediate (autoimmuni, organo- e non organo-specifiche, e allergiche). In particolare, lo studio di prevalenza è stato focalizzato su tre momenti della storia clinica dei pazienti: la diagnosi dell'ipercortisolismo, il follow-up e, infine, l'ultima valutazione effettuata, al fine di stabilire una possibile correlazione tra l'andamento clinico (inteso come remissione/persistenza) della malattia endocrina e l'insorgenza o il peggioramento di patologie autoimmuni/allergiche.

Come obiettivo secondario questo studio si propone di investigare, le caratteristiche cliniche, biochimiche e radiologiche della popolazione esaminata in un singolo centro.

4. PAZIENTI E METODI

4.1 Popolazione dello studio

In questo studio storico prospettico sono stati valutati 181 pazienti affetti da sindrome di Cushing (SC) afferiti consecutivamente presso il Dipartimento di Endocrinologia dell'Università di Pisa tra Marzo 1987 e Settembre 2013. Da questo gruppo sono stati esclusi 21 pazienti: 14 con follow-up inferiore a 6 mesi, 7 perché erano già in remissione di malattia al primo accesso presso la nostra Struttura.

Tutti i pazienti al momento dell'arruolamento non assumevano terapia medica per il controllo dell'ipercortisolismo né, tanto meno, terapie mediche interferenti con i dosaggi ormonali eseguiti (farmaci in grado di: a) indurre/inibire il sistema citocromo P450 CYP3A4; b) aumentare i livelli di *cortisol-binding globulin* (CBG); c) aumentare i livelli di cortisolo libero urinario) (24)

Le caratteristiche cliniche dei pazienti, sono state recuperate analizzando retrospettivamente le cartelle cliniche al momento della prima valutazione presso questo Dipartimento (T0), nel corso del follow-up (Tf-u) e, infine, al tempo dell'ultima visita eseguita (Tf).

Pertanto i pazienti arruolati sono 160 pazienti, 138 femmine (86.2%) e 22 uomini (13.8%), con un'età media al T0 di $46,8 \pm 14,3$ (16,1-76) anni, tutti con SC attiva:

- 100 pazienti (62,5%) affetti da Malattia di Cushing (MC): 49 microadenoma ipofisario, 14 macroadenoma ipofisario, 3 sella vuota; 34 pazienti presentavano un'*imaging* negativa
- età media alla diagnosi: $42,6 \pm 14,1$ anni (16,1-76).
- 56 (35%) erano affetti da ipercortisolismo ACTH indipendente (SC): 34 (60.7%) con adenoma surrenalico (AS), 21 (37.5%) iperplasia surrenalica nodulare bilaterale (ISNB) e 1 (1.8%) carcinoma surrenalico;

- età media: 54.1±11.9 (24.2-74.9);
- 4 (2.5%) presentavano una diagnosi di SC da secrezione ectopica di ACTH (CE): 1 tumore occulto, 2 con carcinoma midollare della tiroide e 1 affetto da carcinoide polmonare.
- Età media: 50.3±11.4 (38.8-66.0)

Tabella 1. Caratteristiche cliniche ed *imaging* della popolazione in studio a T0

	Popolazione	MC (%)	SC (%)	CE (%)
N.pazienti (%)	160 (100)	100 (62.5)	56 (35)	4 (2.5)
Sesso (F/M)	138/22	91/9	47/9	0/4
età±DS (range)	46.8±14.3 (16.1-76)	42.6±14.1 (16.1-76)	54.1±11.9 (24.2-74.9);	50.3±11.4 (38.8-66.0)
BMI±DS (range)	29.6±7.2 (19.4-57)	30.1±7.4 (20-57)	29.1±7.1 (19.4-50)	26.7±5.6 (23-34.8)
imaging		49microadenoma 14macroadenoma 3 sella vuota 34 negativa	34 AS 21 ISNB 1 carcinoma surrenalico;	1 negativa, 2 carcinoma midollare della tiroide con metastasi latero-cervicali 1 carcinoide polmonare.

MC: Malattia di Cushing, SC: Sindrome di Cushing, CE: Sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH, AS: adenoma surrenalico; ISNB: iperplasia surrenalica nodulare bilaterale.

Al termine del follow-up [68.9±50.8 mesi (6-240.6)] l'età media dei pazienti era di 52.6±14.2 anni (17.8-82.4). Le caratteristiche cliniche e l'*imaging* sono riassunte nella tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche ed *imaging* della popolazione in studio a Tf

	Popolazione	MC	SC	CE
età±DS (range)	52.6±14.2 (17.8-82.4)	48.6±14.2 (17.8-82.4)	59.2±11.9 (26-80)	57.6±12 (48.9-75)
BMI±DS (range)	29.1±6.8 (17-57)	29.6±7.0 (17-57)	28.5±6.6 (19-45)	27.5±5.3 (23-33)
imaging		7 microadenoma 3 macroadenoma 11 sella vuota 78 negativa	8 AS 18 ISNB 2 carcinoma surrenalico (metastasi epatiche e pelviche)	4 negativa

MC: Malattia di Cushing, SC: Sindrome di Cushing, CE: Sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH, AS: adenoma surrenalico; ISNB: iperplasia surrenalica nodulare bilaterale.

4.2 Criteri di diagnosi di ipercortisolismo

4.2.1 Criteri di diagnosi di Malattia di Cushing

La diagnosi di ipercortisolismo ACTH dipendente di origine ipofisaria si basa su:

- 1) la presenza di un quadro clinico compatibile con ipercortisolismo;
- 2) assenza di ritmo circadiano del cortisolo sierico, con livelli di cortisolo sierico della mezzanotte elevato;
- 3) elevati livelli di cortisolo libero urinario (CLU) in associazione a livelli plasmatici di ACTH alle ore 8 del mattino inappropriatamente normali/elevati (≥ 20 pg/ml);

4) assente risposta al test di soppressione a basse dosi prolungato con desametasone 2 mg per 48 ore [cortisolo sierico dopo test >18 ng/ml];

5) soppressione del cortisolo sierico dopo test soppressione *overnight* con desametasone ad alte dosi maggiore del 50%;

6) iper-risposta dei livelli di cortisolo sierico (tra 30 e 50%) di ACTH plasmatico (50%) dopo test di stimolo con CRH e.v.

4.2.2 Criteri di diagnosi di Sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH

La diagnosi di CE si basa sui punti già enunciati 1, 2, 3 e 4 in associazione a: una mancata soppressione del cortisolo sierico dopo test soppressione *overnight* con desametasone ad alte dosi (riduzione dei livelli <50%), mancata risposta di cortisolo e ACTH al test di stimolo con CRH e.v. e assenza di un gradiente centro-periferia dopo esecuzione di cateterismo dei seni petrosi inferiori dopo stimolo CRH (<3).

4.2.3 Criteri di diagnosi di Sindrome di Cushing

La diagnosi di SC si è basa sui punti 1 e 2 in associazione a elevati valori di CLU con livelli plasmatici di ACTH del mattino soppressi (<10 pg/ml), con una mancata soppressione di C_L (>18 ng/ml) in presenza di lesioni surrenaliche all'esame di Tomografia computerizzata (TC) e/o di RMN.

4.2.4 Criteri di guarigione/remissione di malattia

Nei pazienti sottoposti a trattamento medico, chirurgico, radioterapico la diagnosi di remissione si basa su:

- 1) regressione o scomparsa dei sintomi/segni clinici dell'ipercortisolismo;
- 2) ripristino della circadianità del ritmo del cortisolo;
- 3) normalizzazione dei livelli di CLU;

4) adeguata soppressione dei livelli di cortisolo dopo test di soppressione

4.3 Criteri di definizione di attività di malattia

I pazienti sono stati classificati sulla base di parametri ormonali sopracitati (25), in

- *status* 2: ipercortisolismo subclinico,
- *status* 3: ipercortisolismo lieve (*mild*),
- *status* 4: ipercortisolismo franco (*overt*),

(vedi tabella)

Tabella 3 Definizione *status* nei pazienti a T0

STATUS	DEFINIZIONE DELL'IPERCORTISOLISMO	CL (ng/ml)	CLU (µg/24h)	ACTH (pg/ml)
2	subclinico	>18	44-139 36-120*	Generalmente ai limiti bassi della norma
3	<i>mild</i>	>18	>350 >100*	Qualsiasi valore (generalmente inappropriatamente alto)
4	<i>overt</i>	>18	>1.5 volte limite superiore di normalità (>585; >180*)	Qualsiasi valore

**metodo di dosaggio valido fino al 2004*

4.3.1 Criteri di definizione remissione e controllo di malattia

- *status* 0: guarigione (iposurrenalismo);
- *status* 1: remissione (eucortisolismo);
- *status* 5: ipercortisolismo persistente dopo trattamento e in terapia medica:
- 5C: ipercortisolismo controllato in terapia,

5NC: ipercortisolismo non controllato in terapia.

Tabella 4 Definizione di remissione e controllo di malattia

Le caratteristiche biochimiche della popolazione al momento dell'arruolamento e a Tf sono riassunte nelle tabelle che seguono (Tabella

STATUS	CL (ng/ml)	CLU (µg/24h)	ACTH (pg/ml)	TERPIA IN ATTO
0	N.E.	N.E	inferiore /superiore della norma	sostitutiva
4	>18	>1.5 volte limite superiore di normalità (>585; >180*)	Qualsiasi valore	nessuna
5 C NC	>18	44-390 36-120* >390 >120*	Qualsiasi valore	cabergolina ketoconazolo mitotane

5 e 6).

Tabella 5 Tabella riassuntiva dello status vs la diagnosi di SC a T0 e a Tf

		MC	SC	CE
T0	N° pazienti status 2/3/4	32/32/36	41/7/8	1/1/2
TF	N° pazienti status 0/1/2/3/4	37/43/8/2	6/22/27/- /-	3/-/-/1/-
	N° pazienti status 5C/5NC	6/3	1/0	-

4.4 Considerazioni sull'outcome di alcuni pazienti

I pazienti con status 5C sono in tutto 7. Per la persistenza dell'ipercortisolismo dopo precedenti trattamenti, a Tf assumono terapia medica ottenendo un adeguato

controllo dell'attività di malattia (come indicato dei livelli medi di CLU). Sei di loro sono MC (5 in terapia con cabergolina alla dose di 2 mg/settimana e 1 in terapia con ketoconazolo 200 mg/die) e 1 è affetto da carcinoma surrenalico in terapia con doxorubicina, etoposide e cisplatino.

I pazienti con status 5NC sono 3 pazienti, tutti affetti da MC 2 dei quali con imaging negativa per lesioni ipofisarie e 1 con microadenoma. Due sono in terapia con cabergolina alla dose media di 3,75 mg/settimana e il terzo assume ketoconazolo 200 mg/settimana.

Una paziente affetta a T0 da SC da AS nel corso del follow-up ha presentato la recidiva di un grave ipercortisolismo associato a metastasi epatiche, ovariche e peritoneali da carcinoma surrenalico. Un'altra paziente, affetta da MC da macroadenoma ipofisario a 60 mesi dalla diagnosi ha presentato metastasi vertebrali con la conseguente diagnosi di carcinoma ipofisario.

4.5 Trattamento dell'ipercortisolismo

4.5.1 Trattamento dei pazienti affetti da Malattia di Cushing

Dei 100 pazienti affetti da MC tutti, eccetto uno, sono stati sottoposti a trattamento (Tabella 7):

-95/100 adenomectomia per via trans-fenoidale;

-2/100 surrenectomia bilaterale per via laparoscopica;

-1/100 surrenectomia monolaterale;

-1/100 terapia medica. Paziente, di 76 anni per il quale, in considerazione delle sue condizioni cliniche generali (cardiopatía ischemica cronica con deficit della funzione ventricolare sinistra, diabete mellito) è stata preferita una terapia conservativa al trattamento chirurgico e/o radioterapico (vista, peraltro, l'assente visualizzazione di lesioni ipofisarie aggredibili da queste metodiche, quadro di sella vuota all'esame RMN).

33 dei 99 pazienti, inoltre, sono stati sottoposti ad un secondo trattamento (15/33 seconda adenomectomia, 6/33 hanno intrapreso l'assunzione di dopamino agonisti, 4/33 surrenectomia bilaterale, 3/33 chirurgia stereotassica con gamma-knife, 2/33 radioterapia convenzionale, 2/33 assumono ketoconazolo, 1/33 in terapia con Pasireotide) e di questi 21 ne hanno subito un terzo. Infine 12 pazienti hanno subito più di tre trattamenti tra chirurgico, radioterapico e medico con un massimo di 6 trattamenti in 3 pazienti.

La paziente che non è stata sottoposta ad alcun trattamento, affetta da un ipercortisolismo subclinico (*status* 2), ha preferito non sottoporsi all'intervento di adenomectomia per via trans-fenoidale. È stata persa al follow-up.

4.5.2 Trattamento dei pazienti affetti da Sindrome di Cushing da secrezione ectopica di ACTH

Il paziente con diagnosi di ectopico occulto è stato sottoposto a surrenectomia bilaterale; il paziente affetto da carcinoide polmonare è stato sottoposto a lobectomia polmonare atipica e linfadenomectomia ilo-mediastinica, a surrenectomia bilaterale e a successiva somministrazione di analoghi della somatostatina a lento rilascio. I due affetti da carcinoma midollare della tiroide sono stati sottoposti a tiroidectomia totale e varie interventi di linfadenomectomia laterocervicale ed infine, uno è stato sottoposto a surrenectomia bilaterale e l'altro ha intrapreso l'assunzione di ketoconazolo (entrambi sono deceduti rispettivamente a 19 e 20 mesi dalla diagnosi di CE).

4.5.3 Trattamento dei pazienti affetti da Sindrome di Cushing

Dei 56 pazienti affetti da SC (Tabella 8):

-23/56 (8/34 (23.5%) AS e 15/21 (71.4%) ISNB) non sono stati sottoposti ad alcun trattamento, per le modeste dimensioni delle lesioni nodulari, la loro stazionarietà durante follow-up, per il grado lieve dell'ipercortisolismo (*status* 2) e l'assenza di complicanze sistemiche e, in aggiunta, per gli AS, età alla diagnosi superiore di 65 anni;

-30/56 (26/34 (76.5%) AS, 3/21 (14.3%) AIMAH, e 1 carcinoma surrenalico) sono stati sottoposti a surrenectomia monolaterale;

-3/56 (3/21 (14.3%) AIMAH) sono stati sottoposti a surrenectomia bilaterale.

Due pazienti su 56, entrambi affetti da carcinoma surrenalico, hanno effettuato più di due trattamenti. Entrambi sono deceduti rispettivamente a 46.4 e 30 mesi dalla diagnosi.

4.6 Rapporti tra autoimmunità e sindrome di Cushing

Analizzando la popolazione appena descritta abbiamo ricercato la presenza di malattie autoimmuni (organo e non organo specifiche) e allergiche, distinguendo tra i quadri già noti e malattie di nuova insorgenza.

Abbiamo specificato, ove possibile, l'andamento clinico nel corso del follow-up, ponendo particolare attenzione verso eventuali episodi di riacutizzazione/peggioramento di disordini immunitari noti. In aggiunta abbiamo indicato i tempi d'insorgenza dell'evento immuno-mediato, relazionandoli allo *status* dell'ipercortisolismo e al tempo intercorso da un'eventuale remissione del SC.

Nei pazienti arruolati sono stati dosati i seguenti anticorpi organo specifici: anti-tireoglobulina (AbTg), anti-tireoperossidasi (AbTPO), anti-recettore del TSH (TRAb), anti parete gastrica (Ab PCA), anti endomisio, anti transglutaminasi (AbTGT), anti glutammico decarbossilasi (AbGAD), anti recettore dell'acetilcolina (Ab Ach-R). Riportando l'andamento della concentrazione/titolo anticorpale nel tempo, con maggiore attenzione ai pazienti che a T0 avevano già una diagnosi di malattia autoimmune organo specifica e a quelli che l'hanno manifestata nel corso del follow-up.

La diagnosi di TH veniva confermata sulla base del rilievo di positività degli anticorpi anti-tiroide e al rilievo di ipoeocgenicità della ghiandola all'esame ecografica mentre, la diagnosi di Morbo di Basedow veniva confermata dalla presenza di ipertiroidismo primitivo associato a positività dei TRAb.

Per la diagnosi di gastrite atrofica autoimmune, in presenza di una clinica evidente e di titolo anticorpale elevato, veniva eseguita esofago-gastro-duodenoscopia per confermare il sospetto diagnostico.

Per la diagnosi di Morbo celiaco ci siamo avvalsi della consulenza del gastroenterologo.

Nessun paziente presentava positività degli 21OHAb e quindi la diagnosi di Malattia di Addison.

Solo una esegua di pazienti presentava dosaggio degli AchR che risultava negativa.

Per quanto riguarda la diagnosi di malattie autoimmuni non organo specifiche e delle allergiche ci siamo avvalsi della consulenza di specialisti (reumatologi, immunologici, allergologi).

L'associazione di più malattie autoimmuni identifica, come è noto, la Sindrome Polighiandolare Autoimmune (SPA) pertanto facendo riferimento alla classificazione di Betterle *et al* abbiamo identificato i pazienti affetti da SPA (tabella 6) (26).

Tabella 6 Classificazione SPA (Classification of the APS according to Neufeld 1980)

SPA 1	Candidiasi cronica, Ipoparatiroidismo cronico, Morbo di Addison (almeno 2 manifestazioni)
SPA-2	Addison (sempre presente) e malattie autoimmuni della tiroide e/o Diabete mellito di tipo 1
SPA-3	malattie autoimmuni della tiroide associate ad altre malattie autoimmuni (esclusi Morbo di Addison e ipoparatiroidismo)
SPA-4	Combinazioni non incluse nei gruppi precedenti

Infine abbiamo calcolato la prevalenza delle malattie immuno-mediate nei pazienti affetti da SC attiva e quelli in remissione valutando la presenza di una correlazione tra lo sviluppo/peggioramento della patologia autoimmune/allergica e la remissione dall'ipercortisolismo.

4.7 Analisi statistica

I dati relativi alle variabili continue sono stati espressi come media \pm la deviazione standard, mentre le variabili non continue sono state espresse come percentuale.

Il confronto tra le medie di vari gruppi è stato eseguito tramite analisi della varianza per le variabili qualitative e per mezzo del test Chi-quadro per le variabili categoriche. Un valore di $P < 0.05$ è considerato statisticamente significativo.

L'analisi statistica è stata effettuata per mezzo di JMP per Windows nella versione 9.0.1 (JMP, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

5. RISULTATI

5.1 Premessa

La valutazione delle caratteristiche cliniche, biochimiche e di *imaging* della popolazione affetta da SC è, in realtà, elemento essenziale alla comprensione dello scopo principale della tesi, ovvero, indicare se vi è una modulazione della prevalenza delle malattie immuno-mediate nonché del loro andamento clinico nei pazienti affetti da SC sia in fase attiva che in remissione.

5.2 Outcome

Esaminando l'esito dei trattamenti ai quali i pazienti sono stati sottoposti è possibile identificare due categorie: quella che include i pazienti con un *outcome* positivo e quindi con remissione o guarigione dall'ipercortisolismo e il gruppo dei pazienti con persistenza di malattia (*outcome* negativo). Quest'ultimo include sia pazienti con ipercortisolismo attivo non in trattamento sia quelli in terapia medica tra i quali distingueremo, in base ai livelli di CLU, i controllati (CLU nei limiti della norma) e i non controllati (CLU superiore alla normalità).

5.2.1 Outcome positivo

111 pazienti (69.4%) presentavano risoluzione dell'ipercortisolismo; 46 (41.4%) avevano una completa guarigione (iposurrenalismo) mentre 65 (58.6%) mostravano una remissione con eucortisolismo.

Tabella 7 Out come positivo:

DIAGNOSI DI CUSHING IMAGING	n° pazienti (% sul totale out come positivo), [% su totale pz]	STATUS
--------------------------------	-------------------------------------------------------------------	--------

MC		
-66 negativa		
-8 sella vuota	80/111 (72.1), [50]	37/80 status 0
-1 macroadenoma,		43/80 status 1
-5 microadenoma		
SC		
-28 negativa	28/111 (25.2), [17.5]	6/28 status 0
		22/28 status 1
CE		
-3 negativo	3/111 (2.7), [1.87]	3/3 status 0

5.2.2 Outcome negativo

Quarantanove (30.6%) pazienti presentano una persistenza dell'ipercortisolismo, dei quali 25 pazienti (15.6%) hanno una persistenza di malattia dopo trattamento.

Ventiquattro pazienti (15%) [1 MC, 8 AS e 15 ISNB] non sono stati sottoposti ad alcun trattamento chirurgico/radioterapico e/o medico (viste le modeste dimensioni delle lesioni nodulari, la loro stazionarietà durante follow-up, per il grado lieve dell'ipercortisolismo (*status* 2) e l'assenza di complicanze sistemiche e, età alla diagnosi superiore di 65 anni).

Tabella 8 Outcome negativo

DIAGNOSI DI CUSHING IMAGING	n° pazienti (% sul totale out come negativo), [% su totale pz]	STATUS
MC		8/20 status 2
-3 microadenoma		2/20 status 3
-2 macroadenoma	20/49 (40.8) [12.5]	1/20 status 4
-3 sella vuota		6/20: status 5C
-12 negativa		3/20 status 5NC

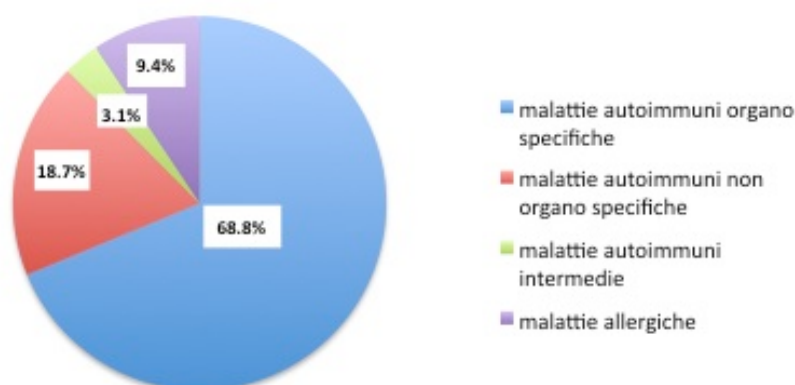
SC		
-8 AS	28/49 (57.1) [17.5]	27/28 status 2
-18 ISNB		1/28 status 5C
-2 carcinoma surrenalico		
CE (carcinoma midollare della tiroide)	1/49 (2.1) [0.6]	status 3

5.3 Patologie immuno-mediate

5.3.1 Patologie immuno-mediate all'arruolamento

Al momento della prima valutazione 29 (18.1%) pazienti presentavano la diagnosi di malattia immuno-mediata: 3 pazienti affetti da asma bronchiale allergico e nel complesso si riscontravano 29 malattie autoimmuni delle quali 22 organo specifiche (15 tiroidite cronica autoimmune (TH) delle quali 1 associata a ipotiroidismo; 4 Morbo di Basedow senza oftalmopatia attiva (*clinical activity score* medio pari a 2), 1 sclerosi multipla (SM), 1 gastrite autoimmune, 1 menopausa precoce); 6 non organo specifiche [2 Sindrome di Sjogren, 1 polimialgia reumatica, 2 psoriasi, una delle quali complicate da artrite psoriasica, 1 Lupus eritematoso sistemico (LES)] e 1 intermedia (Rettocolite ulcerosa, RCU)

Fig.1: Malattie immuno-mediate a T0



Facendo riferimento alla classificazione di Betterle *et al* (26) 2 pazienti erano affetti da una SPA di tipo 3: uno con diagnosi di Morbo di Basedow

e gastrite autoimmune e il secondo con Tiroidite cronica linfocitaria e Sindrome di Sjogren. Inoltre, un paziente presentava, contemporaneamente, malattia autoimmune e allergica: asma bronchiale allergico e menopausa precoce.

Tabella 9 Malattie autoimmuni e allergiche rilevate a T0

Malattie autoimmuni e allergiche presenti a T0	N°casi (%)
Tiroidite cronica linfocitaria	15 (51.7)
Morbo di Basedow	4 (13.8)
Menopausa precoce	1 (3.4)
Gastrite autoimmune	1 (3.4)
Sclerosi Multipla	1 (3.4)
Rettocolite ulcerosa	1 (3.4)
Sindrome di Sjogren	2 (6.9)
Polimialgia reumatica	1 (3.4)
Psoriasi	2 (6.9)
Lupus eritematoso sistemico	1 (3.4)
Asma bronchiale allergico	3

5.3.2 Patologie immuno-mediate al tempo dell'ultima valutazione

Al momento dell'ultima valutazione clinica effettuata presso questo Dipartimento è così delineato: i pazienti coinvolti sono 44/160 (27.5%), 43 F e 1 M, per un totale di 51 malattie: la quasi totalità delle quali clinicamente stazionarie e in buon controllo in terapia (3 asma bronchiale allergica in buon controllo con terapia beta-agonisti e cortisonici al bisogno; 1 eczema cronico recidivante da contatto, in terapia con topici a base di tacrolimus; 1 eritema anulare centrifugo, stazionario per numero e dimensioni delle lesioni cutanee; 22 TH, 10 con ipotiroidismo in terapia sostitutiva con L-tiroxina; 4 Morbo di Basedow tutti in remissione e senza

segni di oftalmopatia; 2 menopausa precoce; 3 gastriti croniche autoimmuni; 1 morbo celiaco; 3 Sindrome di Sjogren; 1 xeroftalmia isolata; 2 polimialgia reumatica; 1 LES stazionaria in terapia immunosoppressiva con acido micofenolico; 1 RCU; 4 psoriasi una delle quali complicata da artrosi non in progressione; 1 AR clinicamente stazionaria, 1SM).

Fig.2: Malattie immuno-mediate a Tf

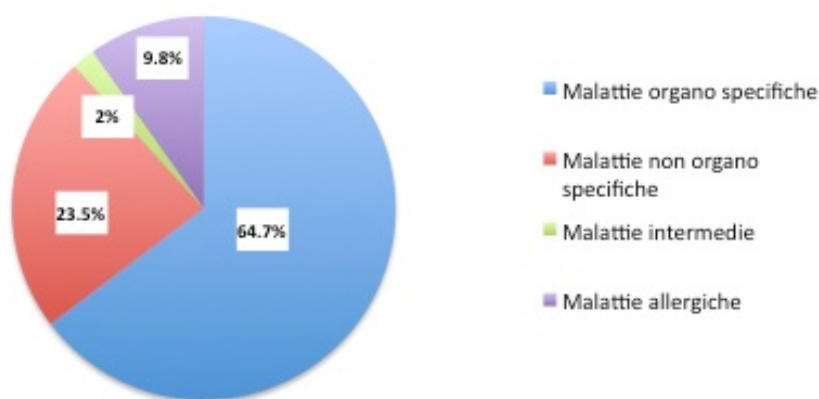


Tabella 10 Malattie autoimmuni e allergiche a Tf.

Malattie Autoimmuni	N° casi
Tiroidite cronica linfocitaria	22
Morbo di Basedow	4
Menopausa precoce	2
Gastrite autoimmune	3
Morbo celiaco	1
Sclerosi Multipla	1
Rettocolite ulcerosa	1
Sindrome di Sjogren	3
Polimialgia reumatica	2
Psoriasi	4
Lupus eritematoso sistemico	1
Artrite reumatoide	1

Xeroftalmia isolata	1
Asma bronchiale allergica	3
Eczema cronico recidivante da contatto	1
Eritema granulare centrifugo	1

5.3.3 Modulazione delle malattie immuno-mediate durante il follow-up

Nel corso del follow-up 15 (9.4%) pazienti, 1 maschio e 14 femmine, hanno presentato una patologia autoimmune di nuova insorgenza per un totale di 19 malattie: 11 organo specifiche (1 menopausa precoce, 7 TH delle quali 2 con eutiroidismo, 4 con ipotiroidismo e 1 con episodi di Hashitossicosi; 2 gastrite autoimmune, 1 morbo celiaco); 6 non organo specifiche (1 Sindrome di Sjogren, 1 polimialgia reumatica, 1 artrite reumatoide, 2 psoriasi e 1 xeroftalmia isolata) ed infine 2 malattie allergiche (1 eczema cronico recidivante da contatto e 1 eritema granulare centrifugo).

Fig.3 Malattie immuno-mediate di nuova insorgenza durante il follow-up.

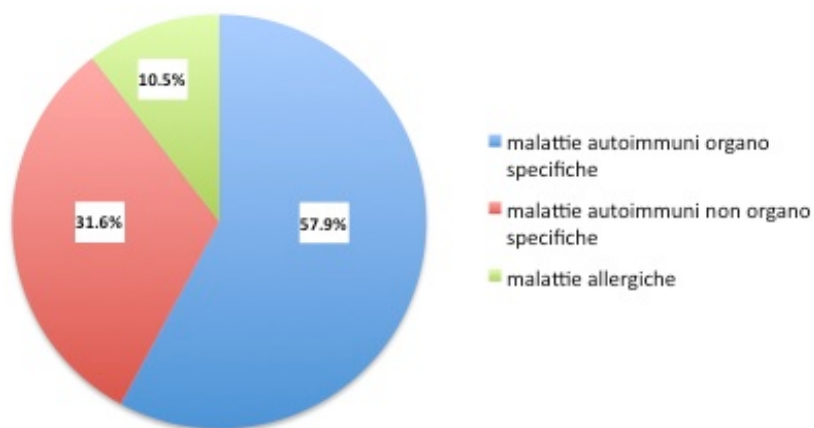


Tabella 11 Malattie autoimmuni e allergiche rilevate nel corso del follow-up

Malattie autoimmuni e allergiche diagnosticate durante il follow-up	N°casi
TH	7
Menopausa precoce	1
Gastrite autoimmune	1
Morbo celiaco	1
Sindrome di Sjogren	1
Polimialgia reumatica	1
Psoriasi	2
Lupus eritematoso sistemico	1
Artrite reumatoide	1
Xeroftalmia isolata	1
Eritema granulare centrifugo	1
Eczema cronico recidivante da contatto	1

In due pazienti è stata diagnosticata una SPA di tipo 3 per l'insorgenza, in presenza di precedenti diagnosi di TH e psoriasi, rispettivamente di gastrite autoimmune e morbo celiaco in un caso e di TH con eutiroidismo nell'altro. Un terzo paziente ha manifestato l'associazione: Morbo di Basedow e eritema granulare centrifugo.

Infine 3 pazienti affetti da SM, LES e asma bronchiale allergica hanno manifestato un episodio di riacutizzazione

Segnaliamo, infine che, durante i regolari controlli, 5 pazienti con diagnosi a T0 di TH (33.3%), tutti di sesso femminile, hanno presentato la comparsa di ipotiroidismo per il quale è stata intrapresa adeguata terapia sostitutiva con levo-tiroxina. In riferimento allo *status* della SC al momento della diagnosi: 4 erano in remissione ed 1 era iposurrenalico in terapia sostitutiva. Seppur tutti i casi d'ipotiroidismo nell'ambito di una diagnosi nota di TH registrati nel corso del del follow-up si siano

manifestati a carico di pazienti con CS in remissione, non crediamo che il ripristino dell'eucortisolismo sia responsabile del “peggioramento” della TH. Riteniamo molto più probabile che l'insorgenza dell'ipotiroidismo sia l'evoluzione attesa in un quadro di TH di lunga data anche se, a supporto di questo, non abbiamo documentazione disponibile per risalire al tempo intercorso tra la diagnosi di TH e la comparsa dell'ipotiroidismo.

5.3.3.1 Dettagli clinici sui pazienti che hanno manifestato episodi di riacutizzazione nel corso del follow-up

Paziente n°1. La paziente affetta da Malattia di Cushing da microadenoma ipofisario ACTH secernente. SM ha effettuato un accesso al Pronto Soccorso per l'improvvisa comparsa di manifestazioni neurologiche (parestesie, disestesie in regione braccio-crurale destro, dolori crampi formi in regione lombare ed addominale inferiore, ipoestesia tattile all'emivolto destro ed ipoageusia) in presenza di una quadro morfologico RMN stazionario, dopo 6.6 mesi dall'intervento di adenomectomia per via tran-sfenoidale che aveva portato ad un miglioramento clinico-biochimico ma non ad una risoluzione della Malattia di Cushing (a T0: *status* 3, post-adenomectomia: *status* 2).

Paziente n°2. La seconda paziente, affetta da SC da AS, trascorsi 17.9 mesi dall'intervento di surrenectomia monolaterale, ha presentato una riacutizzazione del LES (comparsa di eritema a farfalla del volto, artralgie a carico delle piccole articolazioni delle mani e modesto incremento della proteinuria), per la quale, in regime di ricovero, è stata sottoposta a terapia cortisonica e.v. per 3 giorni seguita da successiva terapia orale con dose a scalare.

Paziente n°3. La terza paziente, affetta da Malattia di Cushing, a distanza di 11 mesi dalla remissione, ha presentato un grave peggioramento dell'asma bronchiale allergica. Per il quale è stato necessario un ricovero ospedaliero con introduzione di cortisonici e teofillina.

5.3.4 Patologie immuno-mediate: dati riassuntivi sulla prevalenza

Come abbiamo precedentemente esposto, al momento della prima valutazione presso questo Istituto, 29 pazienti presentano la diagnosi di malattia immuno-mediata mentre a Tf il numero dei pazienti sale a 44. La

prevalenza della malattie immuno-mediate, pertanto, a Tf è significativamente più alta che a T0 (27.5 vs 18.1%, $P < 0.0001$).

Tabella 12. Tabella di contingenza Malattie immuno-mediate T0 vs Tf

		MALATTIE IMMUNO-MEDIATE A T0		
MALATTIE IMMUNO-MEDIATE A TF		NON AFFETTI	AFFETTI	
Conteggio				
%del totale				
%di colonne				
%di righe				
NON AFFETTI		116	0	116
		72.50	0.00	72.50
		88.55	0.00	
		100.00	0.00	
AFFETTI		15	29	44
		9.38	18.13	27.50
		11.45	100.00	
		34.09	65.91	
		131	29	160
		81.88	18.13	

Valutando questo dato in relazione allo *status* dell'ipercortisolismo a TF abbiamo: dei 44 pazienti affetti da malattie immuno-mediate, 30 (68.2%) con *outcome* positivo (15 guariti e 14 in remissione, 1 è persistente ma eucortisolemico in terapia con dopamino-agonisti) 14 (31.8%) con *outcome* negativo. Dal confrontando della prevalenza delle malattie immuno-mediate nella popolazione attiva e in quella in remissione si evidenzia che i pazienti in remissione presentano una prevalenza significativamente maggiore di malattie immuno-mediate rispetto agli attivi ($P < 0.001$).

Tabella 13 Confronto tra la prevalenza della Malattie immuno-mediate della popolazione in studio in fase attiva (T0) e dopo la remissione

	Attivo (T0)	Remissione (Tf)	Persistente (Tf)	P
N°pazienti	160	111	49	<0.0001*
Pazienti affetti (%)	29 (18.1)	30 (27.2)	14 (28.6)	

P*: Attivo vs Remissione .

5.3.5 Focus sulla tiroide con particolare attenzione alle malattie autoimmuni

Dalla documentazione clinica disponibile, è stato possibile recuperare il valore del TSH a T0 e a Tf per tutti i pazienti. Sono stati esclusi, dalla valutazione statistica, tutti i pazienti in terapia con L-tiroxina (10/160 a T0 e 46/160 a Tf). In accordo con la letteratura (31), i livelli medi di TSH della popolazione attiva sono significativamente inferiori (P=0.0017) rispetto a quelli dei pazienti in remissione (Tabelle 23).

Tabella 14: Confronto dei livelli di TSH tra i pazienti attivi e dopo la remissione

	Attivo (T0)	Outcome positivo	Outcome negativo	P
N°pazienti con dosaggio TSH/totale pazienti	150/160	78/111	36/49	0.0017*
TSH μU/ml	0.938 \pm 1.03	1.49 \pm 1.05	0.964 \pm 0.560	N.S. (0.47)**

P*: Attivo vs Remissione; P**: attivo vs persistente, N.S.: non significativa

Passando alle malattie autoimmuni della tiroide, come sintetizzato nei paragrafi precedenti, a T0 abbiamo:

a) 15 pazienti (9.4%) affetti da TH tutti con eutiroidismo eccetto uno (6.7%) con ipotiroidismo già in terapia sostitutiva con L-tiroxina. Tutti presentano AbTg e AbTPO positivi [AbTg 189.6 \pm 316.6 (0.5-1144);

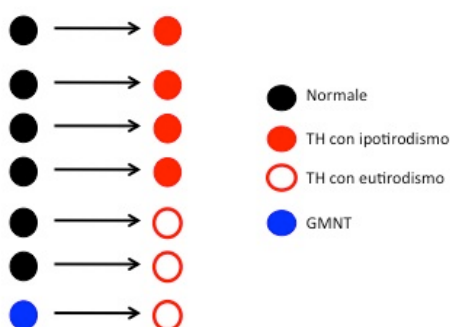
AbTPO 331.7±539.3 (0.5-2000)] eccetto un paziente, di sesso femminile, che a T0 ha una ghiandola marcatamente disomogenea e ipoecogena all'esame ecografico e un valore di TSH di 9.9 µU/ml.

b) 4 pazienti affetti da morbo di Basedow. Al momento della diagnosi dell'ipercortisolismo nessuno di loro aveva un'oftalmopatia attiva (*clinical activity score* pari a 2) e solo 1 paziente, peraltro affetto da miopia, presentava modesto esoftalmo. Tutti eccetto uno, già stato sottoposto a terapia radiometabolica con 131-I con successivo ipotiroidismo per il quale assumeva L-tiroxina, presentavano un ipertiroidismo in presenza di TRAb positivi (valore medio: 6.1±0.95, range: 5.2-7.1).

A Tf:

a) 22 (13.8%) pazienti affetti da TH 10 (45.4%) dei quali con ipotiroidismo in terapia sostitutiva con L-tiroxina. Tutti, eccetto due pazienti, presentano AbTg e AbTPO positivi [AbTg 459.2±569.7 (0.5-1593); AbTPO 144.9±226.2 (0.5-778)]. Dei due con anticorpi negativi, una a T0 aveva già la diagnosi di TH con anticorpi positivi e ha mostrato progressiva una negativizzazione nel tempo; l'altro con titolo anticorpale negativo durante il follow-up, ha presentato un progressivo innalzamento dei livelli di TSH associato a una riduzione dell'ecogenicità della ghiandola all'esame ecografico). Pertanto durante il follow-up si sono avute 7 nuove diagnosi di TH delle quali 4 (57.1%) con ipotiroidismo e 1 associata ad episodi di Hashitossicosi (Figura 5).

Figura 4. Pazienti con nuova diagnosi di TH a Tf



La prevalenza di TH a T0 è significativamente inferiore rispetto a quella presente a Tf (P<0.0001).

I nuovi casi di TH registrati durante il follow-up si sono presentati esclusivamente in pazienti in remissione (5/7 erano iposurrenali) a 30±32.9 mesi [(3.5-85.6), mediana: 16.6 mesi] dalla cura.

Il titolo degli AbTg presenta un aumento significativo tra la popolazione attiva e i pazienti con *outcome* positivo (39.07±225.9 vs 44.8±222.9 U/ml, P=0.0087) mentre non si registrano modificazioni significative del titolo degli AbTPO attivi vs remissione (P=0.7).

Se confrontiamo la prevalenza di TH nella popolazione attiva rispetto ai pazienti in remissione emerge un ulteriore dato interessante sulla relazione tra TH e *status* dell'ipercortisolismo, peraltro in linea con i dati precedentemente pubblicati: il paziente affetto da SC che, a seguito del trattamento, presenta una remissione, ha un rischio maggiore di manifestare un quadro di TH.

Tabella 15: Confronto della prevalenza di TH nei pazienti attivi e dopo la remissione

	Attivo (T0)	Remissione (Tf)	Persistente (Tf)	P
N°pazienti affetti da TH/totale pazienti	15/160	18/111	4/49	<0.0001*

P*: attivi vs remissione

b) non sono presenti nuove diagnosi di morbo di Basedow. I 4 pazienti affetti sono stati tutti sottoposti a terapia radiometabolica con 131-I con successivo ipotiroidismo per il quale assumono L-tiroxina e negativizzazione dei TRAb.

6. DISCUSSIONE

6.1 Rapporti tra sindrome di Cushing e autoimmunità

La fitta e complessa rete di scambi tra sistema neuroendocrino e immunitario è nota da ormai più di un ventennio e si esplica, attraverso feed-back bidirezionali, a vari livelli. Sicuramente un ruolo decisivo è svolto dai GC che rimangono, a oggi, il più potente meccanismo endogeno d'inibizione del processo infiammatorio e dell'immunità.

I GC svolgono un'importante azione sul sistema immunitario (fisiologica e farmacologica), modulando in modo significativo l'attività di tutte le cellule che partecipano alla risposta immune (naturale e adattativa). L'attività immunosoppressiva si sovrappone a quella antinfiammatoria: entrambe richiedono l'attivazione del recettore dei GC (GR) e condividono meccanismi molecolari che coinvolgono l'inibizione della attività leucocitaria. D'altra parte, i GC agiscono anche sulle strutture parenchimali e connettivali proteggendole dagli effetti nocivi della risposta infiammatoria, sempre attraverso l'attivazione del GR.

E' noto che l'ipercortisolismo persistente si correla a atrofia del tessuto linfoide e a linfopenia, in contrasto con l'incremento della massa linfoide e dei linfociti che si verifica nel Morbo di Addison (15), sottolineando il ruolo chiave dei GC nel modulare il sistema immunitario.

Fatta eccezione per numerosi case report, che descrivono la comparsa di una malattia autoimmune, o il suo peggioramento, in pazienti affetti da SC dopo la risoluzione dell'ipercortisolismo e per il lavoro di *Colao et al* del 2000 (27), che peraltro valuta la prevalenza esclusivamente della tiroidite cronica autoimmuni in questa categoria di pazienti, in letteratura non esistono, attualmente, studi di popolazione che valutino la prevalenza delle malattie immuno-mediate in soggetti affetti da SC sia ACTH dipendente che indipendente.

Questo studio storico-prospettico ha lo scopo di valutare la prevalenza

di malattie autoimmuni organo e non organo specifiche in una serie di pazienti affetti da SC, MC e SCE al momento della diagnosi dell'ipercortisolismo e al tempo dell'ultima valutazione effettuata presso il nostro Istituto, siano essi in remissione o ancora persistenti. Nella popolazione in esame, oltre alle malattie autoimmuni organo e non organo specifiche, abbiamo individuato anche alcuni quadri allergici (3 casi di asma bronchiale allergica, 1 dei quali insorto dopo la remissione dell'ipercortisolismo e 1 riacutizzato dopo la cura della SC; 1 di eritema cronico recidivante da contatto e 1 eczema anulare centrifugo entrambi diagnosticati dopo l'insorgenza di iposurrenalismo post-chirurgico). A nostra conoscenza, solamente il lavoro di *da Mota* pubblicato nel 2011, ha riportato, in precedenza, l'insorgenza di malattie allergiche dopo la remissione della SC. Questa correlazione può essere, in parte, giustificata dalla capacità dei GC di inibire i livelli di IgE circolanti e di ridurre il numero delle mast cellule in diverse sedi, quali pelle, polmone e intestino (28). Un altro meccanismo sembra correlato alla efficacia dei GC di stimolare il rilascio di IL-10 e, conseguentemente, delle cellule T regolatorie (Treg), linfociti CD4+ che giocano un ruolo chiave nel mantenere la tolleranza periferica ma anche nell'attenuare la risposta allergica in periferia.

I risultati evidenziano un aumento statisticamente significativo della prevalenza delle malattie immuno-mediate tra i pazienti con CS fase attiva rispetto a quelli in remissione (18.1% vs 27.2%, $P < 0.0001$) a confermare che, nella complessa patogenesi multifattoriale di queste malattie, nel paziente affetto da SC la remissione dell'ipercortisolismo si aggiunge come elemento rilevante nel favorirne la comparsa.

Facendo riferimento anziché all'interessanza dei quadri immuno-mediatati, nello specifico, alle malattie autoimmuni della tiroide, in accordo con quanto già indicato (27), anche nella nostra popolazione con *outcome*

positivo si registra un incremento statisticamente significativo delle diagnosi di TH rispetto alla fase attiva ($P < 0.0001$). Questo sottolinea, anche nel nostro caso, come il *rebound* immunologico che si verifica nel soggetto ipercortisolemico dopo remissione, può correlarsi significativamente ad un maggior rischio di sviluppare una tiroidite cronica linfocitaria, tenendo sempre, presente, comunque, della sua origine multifattoriale. Un possibile ruolo eziopatogenetico potrebbe essere svolto dai macrofagi e dalle cellule Natural Killer (NK). E' noto che trattamento dei macrofagi con GC induce una sottopopolazione macrofagica M2 nella quale le citochine pro-infiammatorie, che giocano un ruolo chiave nella patogenesi di malattie autoimmunitarie e infiammatorie, come il TNF- α (29, 30), sono down-regolate. Le cellule NK fanno parte dell'immunità innata e hanno un ruolo fondamentale nel riconoscere e distruggere le cellule tumorali e quelle infettate da virus. Sono le meno specializzate del sistema immunitario e, senza richiedere un'attivazione, distruggono ogni elemento cellulare riconosciuto come *non-self* grazie all'interazione con il complesso maggiore di istocompatibilità (cellule con bassa espressione di MHC I, ad esempio le cellule tumorali, sono riconosciute come non self, viceversa, quelle con un'alta espressione sono resistenti alla citotossicità delle NK). Un'alterazione nella capacità di riconoscere tali recettori rende le NK anche le principali responsabili di malattie autoimmuni. Nei pazienti affetti da ipercortisolismo e tanto più, nei pazienti con MC piuttosto che SC, l'attività spontanea delle cellule NK è ridotta (32), per azione soprattutto dell'ACTH. Pertanto, una remissione dalla malattie endocrina potrebbe scatenare un incremento dell'attività di queste cellule, NK e macrofagi, facilitando la comparsa di malattie autoimmuni.

Tutti i pazienti con nuova diagnosi di TH, eccetto uno, nell'arco del follow-up, hanno presentato una progressiva positivizzazione del titolo

anticorpale, che perdura nel tempo, correlato alla comparsa d'ipoecogenicità della ghiandola all'esame ecografico. Inoltre in 4 su 7 pazienti la TH si è manifestata con ipotiroidismo. A differenza di quanto indicato dallo studio citato in precedenza, le nuove diagnosi di TH non sono a carico di soggetti già affetti da patologia nodulare tiroidea né tantomeno in quelli con titolo anticorpale positivo già a T0, infatti, fatta eccezione per un caso affetto da GMNT, gli altri 6 non presentavano malattie tiroidee.

Sempre relativamente alle malattie autoimmuni della tiroide per quanto riguarda il Morbo di Basedow non abbiamo riscontrato una modificazione della prevalenza tra attivi e remissione. L'elemento da sottolineare è l'assenza, in tutti e 4 i pazienti affetti, sia nella fase con SC attiva che in remissione, di un'oftalmopatia basedowiana attiva in accordo sempre col ruolo immunomodulatore svolto dall'ipercortisolismo endogeno sull'attività cellulo-mediata.

7. CONCLUSIONI

Il *rebound* immunitario ormai non è più solo un'ipotesi ma un evento reale nel paziente affetto da Sindrome di Cushing dopo la remissione e che frequentemente si manifesta con la comparsa di nuove malattie immuno-mediate o con la riacutizzazione di quadri già noti a distanza anche di diversi mesi dal trattamento.

Nella nostra serie si delinea un aumento significativo della prevalenza delle malattie immuno-mediate durante la remissione e l'aumento del rischio di recidive di quadri già diagnosticati.

BIBLIOGRAFIA

1. **Weigent D.A., Blalock J.E.** Interactions between the Neuroendocrine and Immune Systems: Common Hormones and Receptors. *Immunological Reviews* 1987; Dec;100:79-108.
2. **Szyper-Kravitz M, Zandman-Goddard G, Lahita RG, Shoenfeld Y.** The neuroendocrine-immune interactions in systemic lupus erythematosus: a basis for understanding disease pathogenesis and complexity *Rheum Dis Clin North Am.* 2005 Feb;31(1):161-75.
3. **Basedovsky H.O, del Rey A.** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr rev* 1996; 17: 64–102.
4. **Turrin NP, Rivest S.** Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Exp Biol Med* 229:996-1006
5. **Francis K, Lewis BM, Akatsu H, Monk PN, Cain SA, Scanlon MF, Morgan BP, Ham J, Gasque P.** Complement C3a receptors in the pituitary gland: a novel pathway by which an innate immune molecule releases hormones involved in the control of inflammation. *FASEB J* 17:2266-2268
6.
7. **Tanriverdi F, Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM.** The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol.* 2003 Mar;176(3):293-304. Review.
8. **Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Blanco F.** Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 2006 Jun-Dec;13(2-4):109-23. Review.
9. **Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Cervera-Castillo H, Sánchez L, Jara LJ, Zenteno E, Blanco-Favela F.** Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Nov-Dec;23(6):769-77.
10. **Bateman A, Singh A, Kral T, Solomon S.** The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr Rev.* 1989 Feb;10(1):92-112. Review
11. **Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, Wilder RL.** Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall

- arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2374-8.
12. **Crofford LJ**. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002 Mar;31(1):1-13. Review.
 13. **Gold SM, Mohr DC, Huitinga I, Flachenecker P, Sternberg EM, Heesen C**. The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. *Trends Immunol*. 2005 Dec;26(12):644-52. Epub 2005 Oct 7. Review.
 14. **Buske-Kirschbaum A**. Cortisol responses to stress in allergic children: interaction with the immune response. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):325-32. doi: 10.1159/000216190. Epub 2009 Jun 29.
 15. **McGregor AM**. Immunoendocrine interactions and autoimmunity. *N Engl J Med*. 1990 Jun 14;322(24):1739-41.
 16. **Candrina R, Di Stefano O**. Exacerbation of celiac disease after cure of Cushing's disease. *Am J Med*. 1993 Sep;95(3):341.
 17. **Steuer A, Cavan DA, Lowy C**. Sarcoidosis presenting after resection of an adrenocortical adenoma. *BMJ*. 1995 Mar 4;310(6979):567-8.
 18. **Noguchi Y, Tamai H, Fujisawa K, Nagano J, Mukuta T, Komaki G, Masubayashi S, Kubo C, Torisu M, Nakagaki H, Imayama S**. Systemic lupus erythematosus after pituitary adenomectomy in a patient with Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998 May;48(5):670-2.
 19. **Takasu N, Ohara N, Yamada T, Komiya I**. Development of autoimmune thyroid dysfunction after bilateral adrenalectomy in a patient with Carney's complex and after removal of ACTH-producing pituitary adenoma in a patient with Cushing's disease. *J Endocrinol Invest*. 1993 Oct;16(9):697-702.
 20. **Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, Wilder RL**. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2374-8.
 21. **Clark AR**. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 79-97.

22. **Rook GA.** Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 567-81.
23. **Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM.** Regulation of the human interleukin-2 gene by the alpha and beta isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136: 23-8.
24. **Gilbert R, Lim EM.** The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline *Clin Biochem Rev.* 2008 Aug;29(3):103-6.
25. **Terzolo M., Pia A. and Reimondo G.** Subclinical Cushing's syndrome: definition and management, *Clinical Endocrinology* (2012) 76, 12–18
26. **Corrado Betterle, Renato Zanchetta** Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS) *ACTA BIO MEDICA* 2003; 74; 9-33
27. **Colao A, Pivonello R, Faggiano A, Filippella M, Ferone D, Di Somma C, Cerbone G, Marzullo P, Fenzi G, Lombardi G.** Increased prevalence of thyroid autoimmunity in patients successfully treated for Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Jul;53(1):13-9.
28. **da Mota F, Murray C, Ezzat S.J** Overt immune dysfunction after Cushing's syndrome remission: a consecutive case series and review of the literature. *Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1670-4. doi: 10.1210/jc.2011-1317. Epub 2011 Aug 3.
29. **Steer JH, Vuong Q, Joyce DA.** Suppression of human monocyte tumour necrosis factor-alpha release by glucocorticoid therapy: relationship to systemic monocytopenia and cortisol suppression. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 43: 383-9.
30. **Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M.** Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453-61
31. **Bartalena L, Martino E, Petrini L, Velluzzi F, Loviselli A, Grasso L, Mammoli C, Pinchera A.** The nocturnal serum thyrotropin surge is abolished in patients with adrenocorticotropin (ACTH)-dependent or ACTH-independent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jun;72(6):1195-9.

- 32. Masera RG, Staurengi A, Sartori ML, Angeli A.** Natural killer cell activity in the peripheral blood of patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 1999 Apr;140(4):299-306.