

# Indice

RIASSUNTO .....	- 3 -
SUMMARY .....	- 5 -
1. INTRODUZIONE.....	- 7 -
1.1 La Sindrome di Cushing (CS).....	- 7 -
1.2 Il Fattore von Willebrand (VWF) .....	- 13 -
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO .....	- 19 -
3. MATERIALI E METODI.....	- 21 -
3.1. Soggetti .....	- 21 -
3.2. Valutazione quantitativa del VWF.....	- 21 -
3.3. Analisi genetica.....	- 22 -
3.4. Analisi statistica .....	- 24 -
4. RISULTATI.....	- 27 -
4.1 Effetto del sistema ABO e dell'età sui livelli di VWF, nella popolazione normale.....	- 27 -
4.2 Suddivisione dei pazienti con CS in base ai livelli di VWF e al gruppo sanguigno.....	- 27 -
4.3 Caratteristiche dei gruppi A e B di pazienti .....	- 28 -
4.4 Analisi degli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF.....	- 28 -
4.5. Analisi della regione -2144 (GT) <sub>n</sub> del promotore del gene VWF.....	- 29 -
4.6 Contributo dei polimorfismi del promotore del gene VWF alla determinazione dei livelli di VWF, nella popolazione normale .....	- 31 -
5. DISCUSSIONE.....	- 39 -
BIBLIOGRAFIA .....	- 43 -



## RIASSUNTO

La Sindrome di Cushing (CS) è associata ad uno stato ipercoagulabile dovuto prevalentemente all'incremento cortisolo-dipendente dei livelli di fattore von Willebrand (VWF) e fattore VIII (FVIII). Questa condizione contribuisce all'aumentato rischio cardiovascolare della CS predisponendo i pazienti allo sviluppo di eventi tromboembolici. Infatti i soggetti con CS presentano una mortalità per cause cardiovascolari quattro volte superiore rispetto alla popolazione generale.

In condizioni normali le concentrazioni plasmatiche di VWF sono altamente variabili poiché vengono influenzate da numerosissimi fattori sia ambientali che genetici. Il sistema dei gruppi sanguigni ABO è il principale modulatore genetico dei livelli di VWF, ma un ruolo significativo è stato anche attribuito ai polimorfismi -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF. Tali polimorfismi segregano principalmente come aplotipo 1 (GCAG) o aplotipo 2 (CTGA) e l'aplotipo 1 si associa a livelli di VWF mediamente più elevati rispetto all'aplotipo 2. Un altro elemento funzionale recentemente caratterizzato nel promotore del gene VWF, è il microsatellite -2144 (GT)<sub>n</sub> che modula l'up-regolazione dei livelli di VWF in condizioni di shear stress.

Questo studio è nato dall'osservazione, mai riportata prima, che alcuni pazienti con CS sono resistenti all'azione del cortisolo quale up-regolatore dei livelli di VWF: questi soggetti presentano tutti i sintomi classici associati all'ipercortisolismo, ma mantengono valori di VWF perfettamente normali. Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare se la presenza di particolari aplotipi nel promotore del gene VWF influenzi l'aumento dei livelli di VWF indotto da eccesso di glucocorticoidi. A tal fine sono stati analizzati i polimorfismi -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G, -2527 G/A e -2144 (GT)<sub>n</sub> in una coorte di 69 pazienti affetti da CS.

I pazienti sono stati suddivisi, in relazione ai livelli di VWF, in gruppo A (VWF aumentato) e gruppo B (VWF normale). Tale suddivisione è stata effettuata tenendo conto del gruppo sanguigno di ciascun individuo e utilizzando due diversi range di norma per il VWF: 62-117 U/dL per i soggetti di gruppo O e 68-171 U/dL per quelli di gruppo non O, calcolati su 160 soggetti normali omogenei, per sesso ed età, ai pazienti studiati.

Il gruppo A (VWF aumentato) comprendeva 40 pazienti, il gruppo B (VWF normale) 29. Le distribuzioni aplotipiche degli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G e -2527 G/A nei due gruppi di pazienti sono risultate statisticamente diverse, con una prevalenza dell'aplotipo 1 nel gruppo A e dell'aplotipo 2 nel gruppo B (p=0.003). Una differenza statisticamente significativa è emersa anche tra i singoli gruppi di pazienti e la popolazione normale (p=0.0002 e p=0.006, per A e B

rispettivamente). L'analisi degli Odds-ratio (OR) ha rivelato che nei pazienti con CS il rischio di sviluppare alti livelli di VWF, e quindi una condizione trombofilica, è 4 volte superiore in presenza dell'aplotipo 1 rispetto al 2 (OR=3.8, p=0.001); tale rischio diventa ben 14 volte più elevato in condizioni di omozigosi 1/1 rispetto a 2/2 (OR=14.5, p=0.01).

Per quanto concerne il locus (GT)<sub>n</sub>, i risultati della genotipizzazione hanno rivelato l'esistenza, nella popolazione generale, di alleli di lunghezza variabile tra 15 e 24 ripetizioni GT: (GT)<sub>21</sub> (39.4%) e (GT)<sub>19</sub> (34.1%) sono gli alleli più frequenti. Nei pazienti con CS è stata dimostrata un'associazione tra alleli (GT)<sub>S</sub> (short, 15-19 ripetizioni GT) e incremento dei livelli di VWF (gruppo A), e tra alleli (GT)<sub>L</sub> (long 20-24 GT) e livelli di VWF normali (gruppo B) (p=0.01). Il calcolo degli OR ha definito che le varianti (GT)<sub>S</sub> conferiscono ai pazienti un rischio circa 3 volte superiore di sviluppare alti livelli di VWF, rispetto agli alleli (GT)<sub>L</sub> (OR=2.8, p=0.01) e che tale rischio sale fino a 13 volte in presenza di una condizione di omozigosi (GT)<sub>S</sub>/(GT)<sub>S</sub> rispetto a (GT)<sub>L</sub>/(GT)<sub>L</sub> (OR=13.1, p=0.01). Sia l'aplotipo 1 che gli alleli (GT)<sub>S</sub> rappresentano quindi un marcatore di rischio trombotico per i pazienti affetti da CS. Un'altra interessante osservazione, emersa in questo studio, è che i loci (GT)<sub>n</sub> e aplotipo -3268/-2709/-2661/-2527 sono parte di un'unica regione di linkage disequilibrium (LD) del promotore del gene VWF: l'aplotipo 1 segrega prevalentemente con gli alleli (GT)<sub>S</sub>, l'aplotipo 2 con gli alleli (GT)<sub>L</sub> (p<0.0001).

Per quanto riguarda la determinazione dei livelli di VWF in condizioni normali, nella popolazione sana oggetto di questo studio, non è emerso alcun effetto dei polimorfismi -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G, -2527 G/A e -2144 (GT)<sub>n</sub> (p=0.69).

In conclusione i risultati ottenuti in questo studio dimostrano che un'ampia regione di LD del promotore del gene VWF è coinvolta nel modulare l'up-regolazione dei livelli di VWF indotta da corticosteroidi. Nei pazienti con CS, la presenza del pattern GCAG (aplotipo 1) e di varianti (GT)<sub>S</sub> conferisce un aumentato rischio di sviluppare uno stato di ipercoagulabilità dovuto ad alti livelli di VWF, costituendo quindi un nuovo marcatore di rischio trombotico; al contrario il pattern CTGA (aplotipo 2) e gli alleli (GT)<sub>L</sub> rappresentano, in questo senso, un fattore di protezione. Il fatto che i polimorfismi in esame, apparentemente, non influenzino i livelli di VWF in condizioni normali, suggerisce che essi potrebbero essere parte di un sistema di up-regolazione trascrizionale che viene attivato dalla presenza di particolari stimoli ambientali.

## SUMMARY

Cushing's Syndrome (CS) is associated with a hypercoagulable state, mainly due to a cortisol-induced increase in von Willebrand factor (VWF) and factor VIII (FVIII) levels. The condition increases the cardiovascular risk in CS patients, predisposing them to thromboembolic complications. The mortality rate due to cardiovascular events in CS subjects is 4 times the figure for the general population.

In normal conditions, plasma VWF concentrations are highly variable because they are influenced by several environmental and genetic factors. The ABO blood group system is the main inherited modulator of VWF levels, but a role has also been attributed to the VWF gene promoter polymorphisms -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G and -2527 G/A, which segregate mainly as haplotype 1 (GCAG) or haplotype 2 (CTGA), the former being associated with higher mean VWF levels than the latter. Another functional element recently characterized in the VWF gene promoter is the microsatellite -2144 (GT)<sub>n</sub>, which modulates the up-regulation of VWF levels in shear stress conditions.

This study originated from the hitherto unreported observation that some patients with CS are not susceptible to the hemostatic effect of cortisol excess: despite having the classic symptoms of hypercortisolism, their VWF levels remain normal. The aim of this work was to establish whether particular polymorphic patterns in the VWF gene promoter influence corticosteroid-induced VWF modulation. To do so, polymorphisms -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G, -2527G/A and -2144 (GT)<sub>n</sub> of VWF gene promoter were analyzed in a cohort of 69 CS patients.

The CS patients were divided into groups A or B, depending on whether their VWF levels were high or normal, respectively. For the purposes of this classification, their ABO blood group was considered and two different normal ranges for VWF were used, i.e. 62-117 U/dL for O blood group cases and 68-171 U/dL for non-O patients, calculated on 160 normal individuals matched for gender and age.

There were 40 CS patients in group A (high VWF levels) and 29 in group B (normal VWF levels). Haplotype distributions for SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G and -2527G/A differed statistically between the two groups, haplotype 1 being more represented in group A and haplotype 2 in group B (p=0.003). A statistically significant difference was also found between the two patient groups and the controls (p=0.0002 and p=0.006 for groups A and B, respectively). OR analysis revealed that CS patients with haplotype 1 have a 4-fold risk of developing high VWF levels and a consequent thrombophilic condition by comparison with cases with haplotype 2 (OR=3.8, p=0.001).

This risk increases to up to 14-fold for patients with genotype 1/1 respect to genotype 2/2 (OR=14.5, p=0.01).

As for the -2144 (GT)<sub>n</sub> locus, alleles from 15 to 24 GT repeats long were seen in the normal population, (GT)<sub>21</sub> and (GT)<sub>19</sub> being the most frequent (39.4% and 34.1%, respectively). In CS patients, (GT)<sub>S</sub> variants (Short, 15-19 GT repeats) were found associated with increased VWF levels (group A), and (GT)<sub>L</sub> alleles (Long, 20-24 GT repeats) with normal VWF levels (group B) (p=0.01). The OR revealed that the risk of high VWF levels was 3 times greater for (GT)<sub>S</sub> alleles than for (GT)<sub>L</sub> (OR=2.8, p=0.01), and 13 times greater for genotype (GT)<sub>S</sub>/(GT)<sub>S</sub> than for (GT)<sub>L</sub>/(GT)<sub>L</sub> (OR=13.1, p=0.01). Both haplotype 1 and (GT)<sub>S</sub> alleles therefore constitute markers of thrombotic risk for CS patients.

Another interesting finding that emerged in this study was that the loci (GT)<sub>n</sub> and haplotype -3268/-2709/-2661/-2527 of the VWF gene promoter are in strong linkage disequilibrium (LD): haplotype 1 mainly segregates with (GT)<sub>S</sub>, haplotype 2 with (GT)<sub>L</sub> (p<0.0001).

As for the VWF levels determination in normal conditions, no effect of polymorphisms -3268 G/C, -2709 C/T, 2661 A/G, -2527G/A and -2144 (GT)<sub>n</sub> was demonstrated in the healthy population investigated (p=0.69).

In conclusion, our results showed that a large LD region of the VWF gene promoter is involved in modulating corticosteroid-induced VWF up-regulation. In CS haplotype 1 (GCAG) and (GT)<sub>S</sub> alleles are associated with a greater risk of developing a hypercoagulable state due to an increase in VWF levels, so they constitute new markers of thrombotic risk. On the other hand, haplotype 2 and (GT)<sub>L</sub> represent a protective factor for CS patients. The finding that the polymorphisms investigated had no detectable effect on VWF modulation in normal conditions suggests that they may be part of a transcriptional regulatory system, which is triggered by particular environmental stimuli.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La Sindrome di Cushing (CS)

La Sindrome di Cushing (CS) è una complessa patologia endocrina, caratterizzata da un insieme di manifestazioni cliniche legate all'eccesso cronico di corticosteroidi (1-3). Si distinguono due forme di CS: la prima, la più frequente, è legata a cause iatrogene (terapie a base di corticosteroidi a scopo antiinfiammatorio e/o immunosoppressivo), la seconda è dovuta ad iperсекреzione endogena di cortisolo. Le forme di tipo endogeno si distinguono in ACTH-dipendenti (80-85% dei casi) e ACTH-indipendenti (15-20%). Nelle forme ACTH-dipendenti la secrezione cronica di ACTH stimola la produzione eccessiva di cortisolo da parte del surrene; la causa principale di queste forme è la presenza di adenomi ipofisari - si parla di Malattia di Cushing (CD) -, ma si possono riscontrare anche casi di sindrome da ipersecrezione ectopica di ACTH dovuta a neoplasie non ipofisarie, e più raramente tumori secernenti CRH (sindrome da CRH ectopico) (4). Nelle forme ACTH-indipendenti, invece, la CS può essere dovuta a neoplasie surrenaliche (adenoma o carcinoma) o ad iperplasia surrenale nodulare.

La CS, escludendo le forme iatrogene, è una patologia rara nella popolazione generale, basti considerare che la CD ha un'incidenza compresa tra 0.7 e 2.4 casi per milione/anno (5-6).

### 1.1.2 Caratteristiche cliniche

Le manifestazioni cliniche della CS dipendono dal grado e dalla durata dell'ipercortisolismo, dalla presenza o meno di eccesso di androgeni e dalla concomitanza di effetti tumore-correlati, nei casi di carcinoma surrenalico o di sindrome da ACTH ectopico. Il sintomo più comune è lo sviluppo progressivo di obesità, generalmente centrale, che coinvolge il collo, il tronco e l'addome, risparmiando invece gli arti che spesso presentano addirittura ipotrofia muscolare.

L'accumulo di grasso a livello delle fosse temporali può produrre la caratteristica "*facies lunaris*" o "*faccia a luna piena*", spesso accompagnata da pletora a livello delle guance, degli zigomi, della superficie anteriore del collo e della parte del torace esposta al sole. Spesso i pazienti presentano un cuscinetto di grasso in sede dorso-cervicale che determina il cosiddetto "*gibbo di bufalo*"; in relazione al grado di obesità l'adipe può accumularsi anche a livello della fossetta sovraclaveare (7). Le manifestazioni dermatologiche sono frequenti e varie: la cute diventa fragile e può desquamarsi (segno di Liddle), le ferite lievi guariscono lentamente, mentre quelle chirurgiche vanno incontro a deiscenza. Lo stiramento della cute comporta la comparsa di strie che possono apparire rosse o color porpora (*strie rubrae*) a causa della sottigliezza della cute che comporta l'esposizione dei vasi sottostanti.

L'ipercortisolismo stimola la gluconeogenesi epatica e lo sviluppo di insulino resistenza predisponendo i pazienti allo sviluppo di intolleranza ai carboidrati e, nel 15-20% dei casi, di un diabete mellito franco. *L'Acantosis Nigricans*, segno di resistenza all'insulina, è spesso riscontrabile a livello ascellare e attorno al collo.

L'ipertensione arteriosa è molto comune nei pazienti con CS (70-80% dei casi) e rappresenta spesso il primo segno della patologia. In genere si tratta di una forma lieve-moderata, tuttavia nelle forme caratterizzate da livelli di cortisolo molto elevati, si può osservare un'ipertensione severa, scarsamente responsiva alla terapia medica (8).

La densitometria ossea mostra nella maggior parte dei pazienti un quadro di osteoporosi responsabile, nei casi più gravi, di crolli vertebrali, fratture costali multiple anche spontanee e, meno frequentemente, di fratture delle ossa lunghe (9).

Le donne sono più colpite dalla patologia rispetto agli uomini e possono presentare alterazioni mestruali e sintomi, quali irsutismo, acne e virilizzazione, dovuti all'iperandrogenismo (10).

Alterazioni psichiche sono presenti in più del 50% dei pazienti e generalmente sono rappresentate da labilità emotiva, depressione, astenia, perdita della libido, irritabilità, ansia, attacchi di panico e paranoia lieve (11). L'insonnia è spesso presente come sintomo iniziale e sembra essere correlata alla perdita del ritmo circadiano del cortisolo (12).

Alla CS è infine associato uno stato di ipercoagulabilità (13), condizione che predispone i pazienti allo sviluppo di eventi tromboembolici e che contribuisce, nel quadro clinico generale, ad aumentare il rischio di aterosclerosi e quindi di danni al sistema cardiovascolare dei pazienti (vedi paragrafo 1.1.4).

**Figura 1.** Paziente affetta da CS.



*Facies lunaris, irsutismo e adipe nelle fossette sovraclaveari in una paziente con CS.*

### 1.1.3 Diagnosi e terapia

La presenza di CS è da sospettare ogni qualvolta si presentino nel paziente obesità centrale, *facies lunaris* e rubeosi, irsutismo, strie *rubrae*, ipotrofia muscolare, ipertensione arteriosa, diabete o intolleranza glucidica. La clinica, tuttavia, può risultare ingannevole poiché i sintomi della CS spesso si presentano in maniera sfumata e possono inoltre essere segno anche di altre condizioni patologiche quali l'obesità grave, l'alcolismo cronico o la depressione maggiore (pseudo-Cushing) (14). La diagnosi di CS pertanto si articola lungo un percorso di esami che prevede due fasi successive (15):

- 1) Dimostrazione laboratoristica del sospetto clinico di ipercortisolismo
- 2) Identificazione eziologica della sindrome.

La prima fase prevede l'esecuzione di numerosi test bio-umorali i cui risultati, sommati all'osservazione delle caratteristiche cliniche del paziente, determinano la conferma dell'ipercortisolismo. Il primo esame da eseguire è il *dosaggio del Cortisolo Libero Urinario (CLU)*, che risulta l'indagine più sensibile per la diagnosi di CS. Tuttavia ha una bassa specificità poiché livelli di CLU sopra la norma ( $>75\mu\text{g/dL}$ ) si riscontrano anche in pazienti con pseudo-Cushing. Il *test di soppressione con desametazone a basse dosi (1mg)* permette di escludere da ulteriori approfondimenti la maggior parte dei falsi positivi: una cortisolemia inferiore a  $1.8\mu\text{g/dL}$  esclude la diagnosi di CS, valori tra  $1.8\mu\text{g/dL}$  e  $3\mu\text{g/dL}$  vengono considerati dubbi mentre valori superiori a  $3\mu\text{g/dL}$  sono considerati diagnostici (16-17). Tuttavia, anche se raramente, la mancata inibizione del cortisolo dopo trattamento con desametazone può presentarsi anche in alcuni casi di pseudo-cushing. Il *dosaggio della cortisolemia basale delle ore 8* non ha alcuna rilevanza nella diagnosi, per via della sua elevata variabilità, mentre un *cortisolo plasmatico delle ore 23* superiore a  $1.8\mu\text{g/dL}$  (o  $3\mu\text{g/dL}$  secondo alcuni autori) è da considerarsi patologico alla stregua di un CLU elevato o di una mancata inibizione con desametazone (16, 18). Il *dosaggio del cortisolo salivare notturno*, più comodo e meno invasivo, è un test diagnostico molto sensibile. Il cut-off di  $2\text{ng/mL}$  ( $5.2\text{nmol/L}$ ) sembra avere una sensibilità del 100% e una specificità del 96% (19).

La seconda fase dell'iter diagnostico prevede la determinazione dell'eziologia della sindrome. Il primo passo è quello di distinguere le forme ACTH-dipendenti dalle ACTH-indipendenti. Valori di ACTH plasmatici indosabili o ridotti ( $<10\text{pg/mL}$ ) sono indicativi di forme ACTH-indipendenti, mentre valori di ACTH tra 10 e 20  $\text{pg/mL}$  non permettono di escludere forme ACTH-dipendenti lievi o cicliche. Per conferma in questi casi è fondamentale eseguire un test al CRH. Valori di ACTH superiori a 20  $\text{pg/mL}$  sono indicativi di CS ACTH-dipendente.

Il *test di soppressione con desametazone ad alte dosi (8mg)* permette di distinguere le forme dovute ad adenoma ipofisario da quelle con sede ectopica/surrenalica, poiché nel primo caso alte

concentrazioni di glucocorticoidi (GC) hanno un effetto inibitorio sulla secrezione di ACTH e cortisolo, mentre le forme ectopiche sono in genere insensibili al feedback negativo. Il test ha una sensibilità variabile tra 60% e 80%. E' possibile aumentare l'attendibilità diagnostica dell'indagine se ad essa viene affiancato *il test di stimolo al CRH* o quello *alla desmopressina*.

Dopo l'esecuzione e la valutazione di tutti i test ormonali si ricorre ad RMN ipofisaria, nel sospetto di CS ACTH-dipendente. Nei pazienti con CS ACTH-dipendente che presentino un quadro clinico, esami bio-umorali e radiologici non concordi nel definire l'origine ectopica o ipofisaria della sindrome, si ricorre al *cateterismo dei seni petrosi*, una metodica diagnostica molto attendibile ma invasiva che valuta il gradiente di ACTH tra i seni petrosi destro e sinistro e una vena periferica in condizioni basali e dopo stimolo con CRH. In presenza di una forma ectopica della patologia i metodi utilizzati per identificare la localizzazione del tumore sono TAC o RMN collo-torace-addome seguite, eventualmente, da Scintigrafia (Octreoscan), PET-TAC o Colonscopia e EGDS.

Il trattamento della CS, ad oggi, è essenzialmente di tipo chirurgico. Le forme ACTH-indipendenti guariscono soltanto dopo asportazione del surrene malato; anche nei casi di malattia ipofisaria la prima scelta è quella chirurgica (resezione transfenoidale dell'adenoma) tuttavia la percentuale di insuccesso raggiunge il 30-40%, con recidive a lungo termine nel 25% dei casi (20).

Nel caso in cui l'ipercortisolismo si ripresenti dopo un primo ed un eventuale secondo intervento chirurgico, oppure nei pazienti in cui è difficile individuare l'adenoma ipofisario durante la chirurgia endoscopica, il trattamento di seconda scelta è la radioterapia (RT) che può avvalersi di diverse tecniche: RT convenzionale, stereotassica e radiochirurgia (Gamma-Knife e Cyber-Knife). Il limite dell'approccio radioterapeutico consiste prevalentemente nel tempo necessario per ottenere una risposta, infatti per assistere ad una adeguata riduzione dei livelli di ACTH e quindi di cortisolo, bisogna attendere mesi, a volte addirittura anni. Inoltre la RT può portare ad ipopituitarismo (50-60%) ed esiste il rischio di sviluppare un secondo tumore (1-2%).

La *RT convenzionale* è ormai quasi completamente abbandonata, in quanto gravata da importanti effetti collaterali. La tecnica *RT stereotassica* permette di trattare in maniera molto selettiva l'adenoma ipofisario, frazionando la dose terapeutica in diverse sedute: questo comporta un tempo più lungo di trattamento e anche un maggior tempo di attesa per la risposta, ma ha il grande vantaggio di ridurre il rischio di danni alle strutture vicine (in particolare alle vie ottiche). Le *tecniche radiochirurgiche* si realizzano invece in un'unica seduta in cui l'adenoma ipofisario o il suo residuo post-chirurgico, vengono irradiati con estrema precisione con una dose leggermente inferiore a quella somministrata complessivamente da un trattamento con RT stereotassica. Il vantaggio di questa tecnica sta senz'altro nella rapidità del trattamento, tuttavia resta ancora da

dimostrare se essa sia maggiormente efficace o a più rapida risposta, senza incremento del rischio di danni al sistema nervoso centrale, visto il mancato frazionamento della dose terapeutica.

In attesa dell'intervento chirurgico, in preparazione ad esso, o nei casi non guariti in attesa di altri trattamenti, ai pazienti viene somministrata una terapia medica per cercare di ridurre il loro elevato rischio cardiovascolare. Tra i farmaci inibitori della steroidogenesi il *ketoconazolo* è quello meglio tollerato dai pazienti e quindi il più utilizzato. Tuttavia le alte posologie richieste per ridurre i sintomi dell'ipercortisolismo (non meno di 600mg/die) causano problemi a livello epatico permettendo quindi solo terapie brevi, in attesa di altri trattamenti. Farmaci come il *rosiglitazone*, gli *analoghi della somatostatina* e la *cabergolina* sono risultati meno efficaci di quanto ci si aspettasse sulla base degli studi preliminari (21). La *SOM230*, nuovo analogo della somatostatina, così come il *mifepristone (RU 486)* sono in corso di sperimentazione (22, 23).

Esistono casi di CD che non rispondono a nessuno dei trattamenti sopra descritti; dal momento che l'ipercortisolismo è una patologia potenzialmente letale, in alcuni pazienti si ricorre alla surrenectomia bilaterale. Questo intervento pur riducendo il rischio di morte espone il paziente al rischio di sviluppare la sindrome di Nelson (crescita incontrollata dell'adenoma ipofisario) o a quello di lasciare in sede il tumore ectopico responsabile della patologia, inoltre costringe il paziente ad una terapia sostitutiva con corticosteroidi e mineralcorticoidi per tutta la vita.

Per quanto riguarda la terapia per le complicanze associate alla CS, essa può comprendere, a seconda dei casi, una profilassi antitrombotica (*eparina a basso peso molecolare*), una terapia antiipertensiva con farmaci tradizionali e una terapia antiosteoporotica (*difosfonati*).

#### **1.1.4 Il rischio cardiovascolare nella CS**

Come descritto in precedenza, l'ipersecrezione cronica di cortisolo provoca obesità centrale, ipertensione, resistenza insulinica e dislipidemia, condizioni che determinano nei pazienti con CS un fenotipo simile a quello della sindrome metabolica e che costituiscono associati fattori di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi, causa primaria di ogni accidente cardiovascolare (24). Di fatto nei pazienti con CS le complicanze cardiovascolari (aterosclerosi precoce, coronaropatie, infarto e ictus) causano una mortalità 4 volte superiore rispetto alla popolazione generale (6) e tale incremento del rischio è stato dimostrato anche in soggetti con CS subclinica da adenoma surrenalico (25).

Dati recenti hanno dimostrato che l'ipercortisolismo è responsabile, indipendentemente dalla presenza degli altri fattori di rischio, di danni diretti a livello cardiaco: si osserva in particolare un

incremento dello spessore della parete ventricolare sinistra che è correlato non tanto all'entità dell'ipercortisolismo, quanto alla sua durata. I meccanismi attraverso cui il cortisolo determina questa ipertrofia cardiaca non sono chiari, ma la presenza di recettori per i GC, nel cuore animale ed umano, suggerisce che esso possa svolgere un'azione diretta sul miocardio (26).

I GC inoltre inducono il rilascio di endotelina (ET) da parte delle cellule muscolari lisce vascolari ed inibiscono l'attività del sistema dell'ossido nitrico (NO). L'ET è il peptide con maggior potenza vasocostrittrice e con marcati effetti ipertensivi, mitogenici e aterogenici. I livelli plasmatici di ET nei pazienti con CS risultano significativamente alterati, rispetto ai controlli sani, e sembrano decrescere in alcuni pazienti trattati con successo (27). Il sistema dell'NO, potente vasodilatatore, è invece un importante fattore di protezione vascolare che risulta depresso nei pazienti con CS (28). Tutti questi fattori contribuiscono a determinare, nella CS, un rischio cardiovascolare molto elevato che è presente in fase attiva di malattia, ma che permane anche dopo remissione dell'ipercortisolismo (29). Alcuni studi hanno infatti dimostrato che, a distanza di 5 anni dalla guarigione, nonostante il miglioramento parziale di alcuni parametri, il danno vascolare dovuto alla presenza di placche aterosclerotiche persiste e i pazienti rimangono comunque soggetti a rischio (30). Ciò suggerisce che l'ipercortisolismo dopo aver innescato il processo aterogenico, non sia più indispensabile per il suo mantenimento, ed evidenzia l'importanza di un trattamento il quanto più possibile precoce della patologia.

### **Ipercoagulabilità nella CS**

La CS si associa ad alterazioni importanti del sistema coagulativo che comportano uno stato di ipercoagulabilità e contribuiscono in maniera determinante ad aumentare il rischio cardiovascolare dei pazienti. E' stato dimostrato che elevate concentrazioni di GC stimolano la sintesi di fattore von Willebrand (VWF) che, a sua volta, determina l'aumento dei livelli circolanti di fattore VIII (FVIII). Tale aumento correla con la gravità dell'ipercortisolismo e i livelli di VWF e FVIII ritornano normali dopo remissione della patologia (31) (vedi paragrafo 1.2.6). La CS è associata inoltre ad una ridotta capacità fibrinolitica dovuta all'aumento cortisolo-dipendente dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno tissutale (PAI-1), a cui consegue una ridotta fibrinolisi del coagulo e quindi uno stato protrombotico (32).

I livelli dei fattori della coagulazione II, V, VII, X e XII risultano aumentati nella CS, mentre appare deficitaria l'attività dell'Antitrombina III: anche questo contribuisce alla determinazione dello stato trombotico dei pazienti (33). Infine un contributo alla condizione trombofilica della CS è dato anche dalla presenza di iperomocisteinemia che costituisce un fattore di rischio per cardiopatia ischemica e trombosi venosa profonda (34).

I pazienti con CS, in definitiva, sono portatori di una condizione protrombotica importante e questo si riflette sulla frequenza degli eventi tromboembolici che, come accennato precedentemente, è molto più elevata nella CS rispetto alla popolazione generale. Pertanto è importante che questi pazienti siano sottoposti a profilassi antitrombotica soprattutto nelle situazioni di rischio come la degenza pre e post-chirurgica, o in caso di cateterismo dei seni petrosi (32).

## 1.2 Il Fattore von Willebrand (VWF)

Il fattore Von Willebrand (VWF) è una glicoproteina multimerica ad elevato peso molecolare che svolge un ruolo fondamentale nelle prime fasi dell'emostasi, mediando la formazione del trombo piastrinico nei siti di danno vascolare. Funge inoltre da carrier del fattore VIII (FVIII) (35-37).

Il VWF è presente nel plasma, nelle cellule endoteliali, nelle piastrine e nella matrice sub-endoteliale (38).

### 1.2.1 Il gene

Il gene che codifica il VWF è localizzato sul cromosoma 12, all'estremità del braccio corto (12p13.31). È costituito da 52 esoni e copre un totale di 178 kb. Viene trascritto in un mRNA di 8.5 kb (39). Sul cromosoma 22 esiste uno pseudogene parziale del VWF, una copia non funzionale della porzione del gene che va dall'esone 23 al 34: il grado di omologia tra le due sequenze è del 97%, tuttavia lo pseudogene non dà origine ad alcun trascritto funzionale (40, 41).

### 1.2.1 Struttura e biosintesi

Il VWF viene sintetizzato dalle cellule endoteliali e dai megacariociti e la proteina, nella sua forma matura, è il risultato di numerose modifiche post-traduzionali (42, 43).

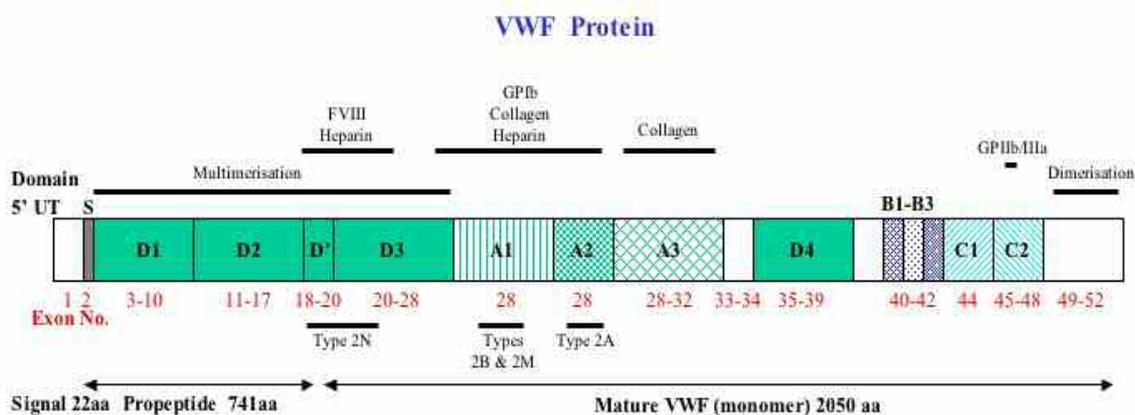
Il primo prodotto della traduzione (pre-pro-VWF) è costituito da 2813 aminoacidi e include

- **Peptide di segnale:** 22 residui
- **Pro-peptide:** 741 residui
- **Subunità matura:** 2050 residui

Il peptide di segnale indirizza il pre-pro-VWF al Reticolo Endoplasmatico (RE) dove la molecola va incontro ad una prima N-glicosilazione e alla dimerizzazione mediante formazione di ponti disolfuro che uniscono due monomeri a livello delle estremità carbossi-terminali (44). I dimeri di VWF correttamente glicosilati lasciano il RE e vengono trasportati nell'apparato di Golgi: in questo compartimento cellulare ha luogo la multimerizzazione della molecola, inoltre viene completata la

glicosilazione (N ed O-linked) e vengono solfatati alcuni oligosaccaridi N-linked. Il processo di multimerizzazione prevede la formazione di ponti disolfuro tra le porzioni N-terminali delle diverse molecole e, successivamente la rimozione del pro-peptide (45, 46). Si ottiene così la proteina matura, costituita da un insieme di strutture multimeriche di peso molecolare (PM) variabile tra i 500 e i 20.000 KDa (47). Le forme a più alto PM sono quelle emostaticamente più efficaci (46). Nelle cellule endoteliali il VWF maturo viene per la maggior parte secreto (95%), ma una piccola quantità viene storta in granuli citoplasmatici detti corpi di Weibel-Palade (49); nelle piastrine invece il VWF viene immagazzinato in strutture dette  $\alpha$ -granuli (50). Il VWF storto è costituito da forme a peso molecolare molto elevato che vengono secrete in maniera regolata per azione di numerose sostanze quali istamina, trombina, fibrina, desmopressina (analogo sintetico della vasopressina) agonisti  $\beta$ -adrenergici e molti altre (51). Nel plasma il VWF ha un'emivita di circa 12 ore e una concentrazione media di 10  $\mu$ g/mL.

**Figura 2.** Struttura e domini funzionali del VWF



### 1.2.2 Funzione

Il VWF ha due ruoli fondamentali nel processo emostatico: media l'adesione e l'aggregazione delle piastrine al sub-endotelio nei siti di lesione vascolare, e trasporta il FVIII in circolo, proteggendolo dalla degradazione (1).

In condizioni normali VWF e piastrine circolanti non interagiscono tra loro; in seguito a lesione della parete vasale il VWF, tramite il dominio A3, si lega al collagene del tessuto sottoendoteliale esposto e, in questa conformazione, la sua affinità di legame per le piastrine diventa sufficiente per legarle e trattenerle nel sito danneggiato, dando quindi inizio alla formazione del trombo. In questa prima fase il legame con le piastrine coinvolge il dominio A1 del VWF e il recettore piastrinico di superficie GPIIb (52). Successivamente, quando le piastrine sono state attivate, entra in gioco un

secondo recettore, GPIIb-IIIa, che è in grado di legare fibrinogeno, fibronectina e VWF con alta affinità (53, 54), consentendo la rapida crescita e stabilizzazione del coagulo. Il legame tra GPIIb-IIIa e VWF è mediato dal dominio C1.

La seconda funzione del VWF consiste nel trasportare il FVIII in circolo attraverso la formazione di un complesso non covalente FVIII-VWF. Il legame avviene tra la porzione amino-terminale del VWF maturo (domini D' e D3), e i residui 1669-1689 della catena leggera del FVIII (55). In questa conformazione il FVIII è stabilizzato e protetto dall'azione delle proteasi plasmatiche (56, 57). Quando il FVIII viene attivato, durante la cascata coagulativa, subisce proteolisi a livello dell'aminoacido Arg1689: questo taglio provoca il disassemblamento del complesso FVIII-VWF e il rilascio del FVIII nella forma attiva.

### **1.2.3 La Malattia di von Willebrand (MVW)**

L'efficacia emostatica del VWF dipende dalla sua concentrazione, da un corretto grado di multimerizzazione della molecola, e dall'integrità di tutti i suoi domini funzionali. Alterazioni di tipo quantitativo o qualitativo del VWF causano la malattia di von Willebrand (MVW) il più frequente difetto emorragico ereditario (58, 59). I sintomi più comuni di questa patologia sono epistassi, ematomi, prolungato sanguinamento dopo ferite ed estrazione dentaria, metrorragia e più raramente sanguinamento gastro-intestinale. Tuttavia le forme quantitative più severe, oppure i difetti che danneggiano l'interazione VWF-FVIII, provocano riduzioni importanti del FVIII causando sintomi simili a quelli osservati nell'emofilia A (sanguinamento a livello delle articolazioni, o dei tessuti molli inclusi muscoli e cervello).

La MVW comprende tre forme principali: Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3 (60, 61). Nella MVW di tipo1, la forma più frequente, la molecola è presente in quantità ridotta, ma la sua struttura e funzionalità sono normali. Anche la MVW di tipo 3 è un difetto quantitativo, ma in questo caso il fenotipo è molto più severo essendo caratterizzato da assenza completa di VWF. La MVW di tipo 2 comprende invece alterazioni di tipo qualitativo e si suddivide in vari sottotipi (2A, 2B, 2M, 2N) a seconda di quale dominio funzionale della molecola è coinvolto.

### **1.2.4 Fattore von Willebrand e rischio trombotico**

Come riportato precedentemente una adeguata concentrazione plasmatica di VWF è indispensabile per assicurare un'emostasi corretta e proteggere quindi l'organismo dalle emorragie in seguito a lesioni vascolari. Il processo emostatico tuttavia, se attivo in maniera eccessiva, può diventare causa di trombosi, provocando uno stato di ipercoagulabilità e portando ad aterosclerosi. In particolare il VWF, per il suo ruolo di mediatore nella formazione del trombo piastrinico e per la sua funzione di

stabilizzatore del FVIII, diventa un importante fattore predisponente alla trombosi, se presente in concentrazioni troppo elevate (62). Numerosi studi hanno dimostrato che l'aumento dei livelli circolanti di VWF si associa ad una maggiore incidenza di coronaropatie ed eventi trombotici, nella popolazione generale ma soprattutto nei soggetti ad alto rischio, quelli cioè che hanno già sviluppato un accidente cardiovascolare o che sono affetti da diabete o aterosclerosi (63, 64). In questi pazienti concentrazioni elevate di VWF costituiscono un fattore di rischio associato per lo sviluppo di infarto del miocardio ed ictus ischemico, eventi cardiovascolari che possono risultare anche mortali. Sebbene la comprensione dei meccanismi tramite cui il VWF influenza la patogenesi della malattia trombotica necessiti ancora di molti approfondimenti, è indubbio che la misurazione dei livelli di VWF debba essere considerata uno strumento importante per una accurata determinazione del rischio trombotico, soprattutto alla luce del fatto che le condizioni fisiopatologiche che up-regolano questa molecola sono numerosissime (vedi 1.2.5).

### **1.2.5 Modulatori dei livelli circolanti di VWF**

La concentrazione media di VWF plasmatico in condizioni fisiologiche è di ca.10 µg/mL, ma i valori osservati nella popolazione normale si collocano in un range molto ampio che va da 5 µg/mL a 20 µg/mL del valore medio. Questo è dovuto all'esistenza di numerosi fattori, sia genetici che ambientali, in grado di modulare la sintesi e il rilascio della molecola (65). Il VWF fa parte delle molecole della fase acuta i cui livelli aumentano, in maniera transitoria, in risposta a numerosissime condizioni fisio-patologiche tra cui la gravidanza, l'esercizio fisico, traumi, stati infiammatori, assunzione di farmaci (estroprogestinici, ormoni tiroidei, cortisone), diabete, disfunzione renale, ipertiroidismo e cancro. I meccanismi alla base di queste variazioni sembrano coinvolgere la via dei recettori β-adrenergici, tuttavia i pathways molecolari non sono stati ancora definiti (66-69).

#### **Effetto dei glucocorticoidi (GC)**

I GC vengono ampiamente utilizzati come farmaci per il trattamento di patologie di tipo infiammatorio: per il loro effetto pleiotropico sul sistema immunitario offrono infatti benefici clinici importanti. Tuttavia, soprattutto se somministrati per lunghi periodi, i GC hanno un effetto di attivatori dell'emostasi e per questo possono contribuire a causare aterosclerosi, trombosi e quindi danni di tipo cardiovascolare (70). E' noto in particolare che l'eccesso di GC, sia esso endogeno come nel caso della CS o farmacologico, provoca l'aumento dei livelli plasmatici di VWF contribuendo all'instaurarsi di una condizione di ipercoagulabilità del sangue (31). Alcuni dati recenti sembrano indicare che tale aumento avvenga attraverso l'up-regolazione trascrizionale del mRNA VWF, tuttavia gli effetti specifici dei GC sulle cellule endoteliali e sulle piastrine non sono

ancora stati chiariti in modo approfondito e, considerata la complessità biologica dei sistemi di regolazione dell'espressione genica, questo meccanismo necessiterà di future conferme (71).

### **Ruolo del sistema ABO**

Sebbene i fattori ambientali che influenzano i livelli di VWF siano numerosissimi, la variabilità osservata nella popolazione è principalmente fondata su base genetica. Il principale modulatore genetico dei livelli di VWF è costituito dal sistema dei gruppi sanguigni ABO: i soggetti con gruppo sanguigno O presentano livelli medi di VWF 25-30% più bassi rispetto ai soggetti con gruppo sanguigno non-O (A, B ed AB), come conseguenza di una minore sopravvivenza della molecola in circolo (72).

### **Contributo dei polimorfismi del promotore del gene VWF**

Un altro modulatore genetico dei livelli di VWF, è rappresentato da un gruppo di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) presenti nel promotore del gene VWF: -3268 G/C, -2709C/T, 2661A/G e -2527G/A (7-8). Tali SNPs sono in linkage disequilibrium (LD) e segregano prevalentemente secondo due aplotipi: GCAG (aplotipo 1) e CTGA (aplotipo 2). Nella popolazione normale la condizione di omozigosi per l'aplotipo 1 si associa a livelli di VWF più elevati, rispetto a quella di omozigosi per l'aplotipo 2; valori intermedi di VWF si osservano in condizioni di eterozigosi. Il contributo di questi aplotipi alla determinazione dei livelli di VWF è comunque di entità molto minore rispetto a quello dato dal sistema ABO, con valori della molecola che differiscono di circa il 10% tra le tre classi di genotipi (73, 74).

Recentemente è stato dimostrato il ruolo di modulatore trascrizionale anche per un altro elemento genetico del promotore VWF: la regione -2144 (GT)<sub>n</sub>, caratterizzata da un numero variabile di ripetizioni del dinucleotide GT (75). Una diversa lunghezza della GT-repeat sembra modulare l'aumento di VWF in risposta a condizioni di shear stress: in particolare GT-repeat lunghe - (GT)<sub>23</sub> - sono associate ad una maggiore attività promotoriale rispetto a quelle corte - (GT)<sub>17</sub> - (76). Non è noto se in condizioni normali il locus (GT)<sub>n</sub> contribuisca a determinare la variabilità dei livelli di VWF, d'altra parte le informazioni su questa regione del promotore sono molto scarse poiché essa, prima di questo studio funzionale, veniva utilizzata soltanto come marcatore polimorfico nelle analisi di linkage in famiglie affette da MVW (77, 78).

### **1.2.6 Il fattore von Willebrand nei pazienti con Sindrome di Cushing**

Uno studio condotto nel 1999 su un gruppo di 20 soggetti con CS ha rivelato che le alterazioni del VWF dovute all'ipercortisolismo, riguardano sia i livelli circolanti che la struttura della molecola (31): nei pazienti le concentrazioni plasmatiche di VWF risultano notevolmente aumentate e il pattern multimerico della molecola è caratterizzato dalla presenza di forme con PM particolarmente

elevato (ULM, *Unusually Large Multimers*), strutture che in genere si trovano solo nei compartimenti di stoccaggio del VWF. Inoltre anche i livelli di FVIII sono aumentati e i pazienti mostrano, in vitro, aggregazione spontanea delle piastrine. Il follow-up dei soggetti sottoposti ad intervento chirurgico ha dimostrato un miglioramento del quadro coagulativo con la remissione della patologia. Inizialmente, nel periodo immediatamente successivo all'intervento, i parametri coagulativi tendono a peggiorare ulteriormente, tuttavia dal terzo mese in poi nei casi in cui la chirurgia ha eliminato la causa dell'ipercortisolismo, si osserva un decremento dei livelli di VWF e una parallela diminuzione delle forme ULM. Nell'arco di tempo di circa 1 anno i livelli di VWF e FVIII sono del tutto normalizzati. E' interessante sottolineare che, durante l'intero corso della patologia, il contenuto intrapiastrinico di VWF dei pazienti risulta sempre normale, il che suggerisce che l'eccesso di cortisolo non influenzi la sintesi di VWF operata dai megacariociti.

### **Nuova osservazione**

Contrariamente a quanto finora riportato in letteratura, non sempre la Sindrome di Cushing comporta aumento dei livelli di VWF. Sono giunti infatti alla nostra osservazione numerosi pazienti con CS in fase attiva che, pur avendo valori di cortisolo molto elevati, mantengono livelli di VWF assolutamente nella norma. Questi pazienti, alcuni con CS di origine ipofisaria, altri con CS surrenalica presentano tutti i sintomi classici associati all'ipercortisolismo (obesità, ipertensione, insulino resistenza...) ma non sono suscettibili all'azione del cortisolo quale up-regolatore dei livelli di VWF. Questa è una osservazione importante, considerato il ruolo del VWF nella patogenesi della malattia trombotica, e genera quindi interessanti spunti di ricerca: quali caratteristiche rendono la molecola del VWF resistente ad up-regolazione da parte dei glucocorticoidi? Meccanismi simili possono modulare i livelli di VWF anche in risposta ad altri stimoli?

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Questo studio si prefigge di indagare il contributo dei polimorfismi -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF, nella regolazione dei livelli plasmatici di VWF in pazienti affetti da CS, per verificare se esiste un aplotipo/genotipo critico nella up-regolazione trascrizionale del VWF indotta da glucocorticoidi. Si propone inoltre di caratterizzare il locus (GT)<sub>n</sub> del promotore VWF nella popolazione normale e nei pazienti con CS, per verificare se un diverso numero di ripetizioni GT nella regione 5'-UTR del gene si associ a differenti livelli di VWF circolante, in condizioni normali e patologiche.



## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1. Soggetti**

Tutti gli individui oggetto di questo studio sono stati analizzati dopo aver ottenuto il loro consenso scritto, in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

Sono stati studiati 69 soggetti affetti da CS, 15 maschi e 54 femmine, giunti ad osservazione presso la Divisione di Endocrinologia dell'Università di Padova. L'età media dei pazienti era di  $44.2 \pm 14.2$  anni. 51 risultavano affetti da CS di natura ipofisaria, 14 da CS di origine surrenalica e 4 da forme ectopiche della patologia. Al momento dello studio tutti i pazienti erano in fase attiva di malattia, e non sottoposti a terapia farmacologica. 160 individui sani, provenienti dalla stessa area geografica ed omogenei ai pazienti per sesso ed età, sono stati analizzati come gruppo di controllo.

Inoltre è stata studiata una popolazione normale più ampia (394 individui) al fine di valutare il contributo dei polimorfismi del promotore del gene VWF alla determinazione dei livelli di VWF in condizioni normali.

#### **3.1.1 Criteri per la diagnosi di CS**

La diagnosi di Sindrome di Cushing è stata formulata sulla base delle caratteristiche cliniche, dei dati biochimici e neuroradiologici dei soggetti. I criteri ormonali utilizzati per identificare l'ipercortisolismo sono: livelli di cortisolo libero urinario (CLU) sopra la norma ( $>75 \mu\text{g}/24\text{h}$ ), perdita del ritmo circadiano del cortisolo plasmatico (cortisolo alle ore 24.00  $>4.5 \mu\text{g}/\text{dL}$ ) e mancata soppressione del cortisolo dopo somministrazione di 1mg di desametasone (cortisolemia  $>3 \mu\text{g}/\text{dL}$ ). La diagnosi eziologica delle diverse forme di CS si è basata sulla misurazione dei livelli di ACTH basali o dopo test con desmopressina e CRH (15). I pazienti sono stati inoltre sottoposti a TAC addominale/toracica o RMN ipofisaria ed eventuale osteoscan o cateterismo dei seni petrosi a seconda dei risultati dei dati ormonali.

### **3.2. Valutazione quantitativa del VWF**

I campioni di sangue raccolti per l'analisi emostatica sono stati anticoagulati con sodio citrato al 3.8% (1:10 vol/vol). Il sangue intero è stato centrifugato 15 minuti a  $800 \times g$  per ottenere il plasma povero di piastrine (PPP) e, successivamente, sottoposto ad ultracentrifugazione (4 minuti a 12.000 rpm) per eliminare i frammenti cellulari presenti.

Il dosaggio quantitativo dell'antigene VWF (VWF:Ag) è stato eseguito con metodo immunoenzimatico di tipo diretto, non competitivo (ELISA) (79). I campioni in esame ed un pool standard opportunamente diluiti vengono incubati con un primo anticorpo policlonale anti-VWF adeso alla plastica di una piastra da microtitolazione. Dopo incubazione e lavaggio con tampone

PBS/tween per allontanare la molecola non legata, viene aggiunto il secondo anticorpo anti-VWF coniugato con perossidasi (HRP-anti-VWF) (Dako,Amsterdam, Netherland). L'attività dell'enzima perossidasi, valutata mediante aggiunta del suo substrato (OPD), è direttamente proporzionale alla quantità di VWF presente. La determinazione precisa della quantità di molecola presente in ciascun campione avviene mediante la comparazione con una curva standard di riferimento. I valori di VWF:Ag vengono espressi in U/dL.

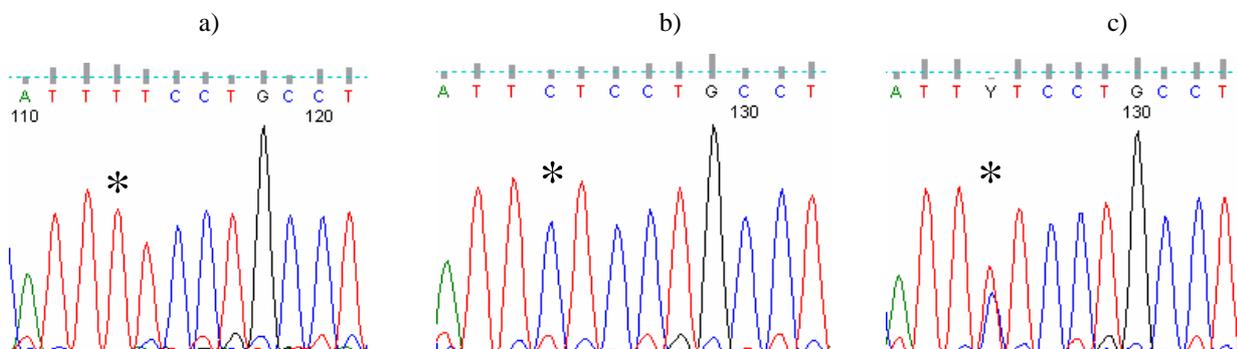
### 3.3. Analisi genetica

Il DNA di tutti i soggetti è stato estratto da sangue intero utilizzando il kit per estrazione QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Tutte le reazioni di amplificazione sono state eseguite a partire da 50 ng di DNA genomico, utilizzando la DNA polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) in un volume finale di 25 µl, e un termociclatore GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems).

#### 3.3.1 SNPs -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A

Gli SNPs -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A sono stati analizzati tramite sequenziamento diretto. La regione contenente i 3 polimorfismi è stata amplificata utilizzando i primer PRO1(F) 5'ataagagctggaagtggaaa3' e PRO2(R) 5'gggagtgatggtttgagtct3' e un programma di amplificazione che prevede: 95°C per 10 min, 35 cicli a 94°C per 45 sec, 59°C per 45 sec, 72°C per 45 sec, e uno step di estensione finale a 72°C per 12 min. I prodotti di amplificazione sono stati successivamente purificati con il metodo EXO-SAP per rimuovere primers e dNTPs in eccesso e sequenziati con il metodo dei dideossi utilizzando il kit Big Dye Terminator Sequencing v.2.5 (Perkin Elmer) e un sequenziatore automatico ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (vedi Figura 2).

**Figura 2.** Analisi di sequenziamento per il polimorfismo -2709 C/T.



\* indica la posizione nucleotidica -2709 C/T.

a): Condizione di omozigosi T/T;

b): Omozigosi C/C;

c): Eterozigosi C/T.

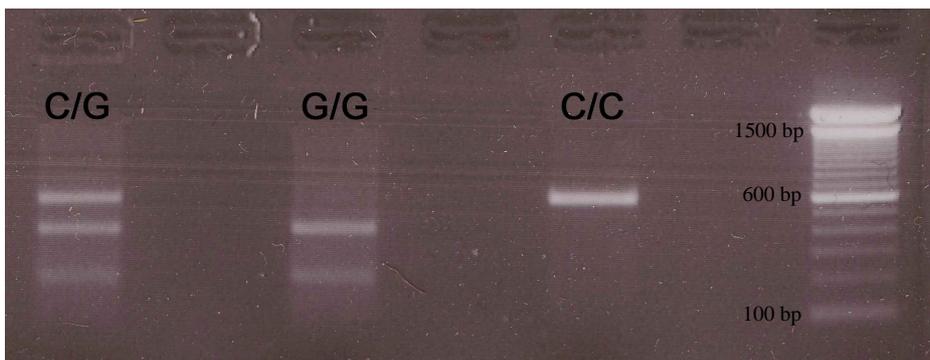
### 3.3.2 SNP -3268 G/C

La caratterizzazione dello SNP in posizione -3268 è stata effettuata tramite digestione enzimatica utilizzando l'enzima di restrizione FauI, poiché la presenza di numerose ripetizioni rendeva questa zona del promotore difficile da sequenziare. La regione è stata amplificata mediante PCR utilizzando i primer PRO3(F) 5'ttcatcgtcaagagagctt3' e PRO4(R) 5'actggaggccgcacattaca3' e le seguenti condizioni di amplificazione: 95°C per 10 min, seguiti da 35 cicli a 94°C per 30 sec, 58°C per 30 sec e 72°C per 45 sec, e uno step di estensione finale a 72°C per 12 min. I frammenti amplificati sono stati successivamente precipitati - con Etanolo assoluto (2 Vol) e Sodio Acetato 3M (1/10 Vol) - e risospesi in H<sub>2</sub>O. Infine le reazioni di digestione sono state allestite in un volume finale di 15 µl e incubate over-night a 55°C. La mix di reazione era composta da:

DNA (10ng/µl)	10 µl
Buffer II 10X	1.5 µl
FauI (2U/µl)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	3.0 µl

I risultati della digestione enzimatica e l'assegnazione dei genotipi sono descritti in Figura 3.

**Figura 3.** Analisi di restrizione per il polimorfismo -3268 G/C.

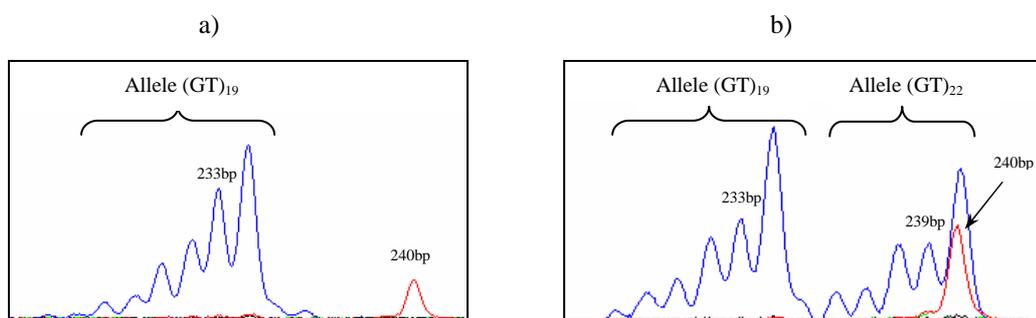


*Omozigoti G/G: FauI riconosce la sequenza 5'...CCCGC... 3' e taglia l'amplificato in 2 frammenti di 390bp e 193bp. Omozigoti C/C: manca la sequenza bersaglio per cui l'enzima non agisce e si ottiene un'unica banda corrispondente all'amplificato non digerito (583bp). Eterozigoti G/C: un allele (G) viene digerito mentre l'altro (C) no.*

### 3.3.3 Locus (GT)<sub>n</sub>

Il locus polimorfico (GT)<sub>n</sub> del promotore del gene VWF è stato amplificato tramite PCR utilizzando la coppia di primer PROgt(F) 5'tgcccattgcatcagttact3' e PROgt(R) 5'tggggagtgatggtttgagt 3' in cui l'oligo forward è stato marcato all'estermintà 5' con il fluoroforo 6-FAM. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono: 95°C per 10 min, seguiti da 35 cicli a 94°C per 45 sec, 63°C per 45 sec, 72°C per 45 sec, e uno step di estensione finale a 72°C per 12 min. 10 ng di amplificato sono stati quindi denaturati (95°C per 2 minuti in presenza di formammide) e analizzati in un sequenziatore automatico ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). L'output dello strumento è stato analizzato mediante il programma GenescanView 1.2, che ha permesso di determinare la precisa lunghezza, in paia di basi, di ogni frammento amplificato (Figura 4). Per stabilire il numero corrispondente di ripetizioni GT, due campioni omozigoti sono stati sequenziati e poi utilizzati come standard per attribuire il numero esatto di ripetizioni a tutte le varianti alleliche: i campioni scelti erano gli alleli di lunghezza 233bp e 239bp corrispondenti ad un numero di ripetizioni GT pari a 19 e 22, rispettivamente.

**Figura 4.** Analisi in fluorescenza del microsatellite -2144 (GT)<sub>n</sub>



a): Profilo di un campione omozigote (GT)<sub>19</sub>/(GT)<sub>19</sub>

b): Profilo di un campione eterozigote (GT)<sub>19</sub>/(GT)<sub>22</sub>

Oltre al picco corrispondente alla lunghezza  $n$  del frammento sono visibili i picchi  $n+A$  (dovuti all'aggiunta di una A per azione della polimerasi) e i picchi  $(n-2)$  e  $(n-4)$  con i rispettivi  $+A$ . I picchi di colore rosso corrispondono alla banda 240bp del marcatore Rox 400 (AB).

### 3.4. Analisi statistica

Il test t di Student per gruppi indipendenti è stato utilizzato per confrontare i valori medi di VWF:Ag dei soggetti normali di gruppo O rispetto ai non-O, e dei soggetti con età  $\leq 40$  rispetto a quelli con età  $> 40$  anni. Tale test inoltre è stato utilizzato per confrontare età, livelli medi di VWF:Ag e di CLU tra i gruppi A e B di pazienti con CS. Per quanto riguarda la distribuzione maschi/femmine, la frequenza delle forme ipofisarie/surrenaliche/ectopiche della patologia e la distribuzione dei gruppi sanguigni O/non-O, tra i due gruppi di pazienti, esse sono state confrontate

applicando il Test del chi-quadrato (o il test di Fisher, quando appropriato). Una volta eseguita la caratterizzazione genetica di tutti gli individui, l'analisi del Chi-quadrato è stata utilizzata per confrontare le frequenze genotipiche e aplotipiche dei gruppi A e B di pazienti tra loro e rispetto ai normali. Per confrontare le distribuzioni alleliche (GT)<sub>n</sub> tra i gruppi A, B e normali e per analizzare le differenze nei valori medi di VWF:Ag tra le diverse classi di genotipi, nella popolazione normale, è stato utilizzato il test ANOVA ad una via. Il test ANOVA a due vie è stato invece usato per valutare l'effetto del locus (GT)<sub>n</sub> e degli SNPs -3268 G/C -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A sulla determinazione dei livelli di VWF nella popolazione normale, tenendo conto contemporaneamente anche del contributo del sistema ABO e dell'età. L'Analisi delle Corrispondenze (80) è stata utilizzata per mettere in relazione l'appartenenza ad un determinato gruppo (A, B o sani) e il numero di GT-repeat del promotore del gene VWF, e per analizzare la co-segregazione dei loci (GT)<sub>n</sub> e aplotipo -3268/-2709/-2661/-2527. Il LD tra (GT)<sub>n</sub> e -3268/-2709/-2661/-2527 è stato dimostrato utilizzando il test del Chi-quadrato e calcolando i coefficienti D' ed R<sup>2</sup> tramite il software R (<http://www.r-project.org/>).



## 4. RISULTATI

### 4.1 Effetto del sistema ABO e dell'età sui livelli di VWF, nella popolazione normale

I gruppi sanguigni del sistema ABO costituiscono, in condizioni normali, il principale modulatore genetico dei livelli di VWF: i soggetti di gruppo O presentano valori plasmatici di VWF circa il 25% più bassi rispetto ai soggetti con gruppo sanguigno non-O (A, B ed AB) (72). Anche l'età, seppure con un contributo più modesto, influenza i livelli di VWF, con valori della molecola che tendono ad aumentare a partire dai 40 anni in su (66). La popolazione normale oggetto di questo studio presentava un'età media di  $39.1 \pm 11.3$  e un valore di VWF pari a  $105.6 \pm 45.1$ . Suddividendo i soggetti in base al gruppo sanguigno, i livelli medi di VWF osservati erano  $89.2 \pm 27.3$  U/dL per gli individui di gruppo O e  $119.0 \pm 51.7$  U/dL per quelli non-O (T-test,  $p=0.0002$ ) (Figura 1a). Sono stati quindi definiti due diversi range di norma per il VWF: 62-117 U/dL per il gruppo sanguigno O e 68-171 U/dL per i gruppi non-O. Per quanto riguarda l'età è stato osservato un suo lieve effetto modulatore, infatti i soggetti fino ai 40 anni presentavano livelli medi di VWF più bassi rispetto a quelli di età maggiore. La differenza, tuttavia, non è risultata statisticamente significativa (T-test,  $p=0.219$ ) (Figura 1b).

### 4.2 Suddivisione dei pazienti con CS in base ai livelli di VWF e al gruppo sanguigno

L'eccesso di corticosteroidi, sia esso endogeno o dovuto a terapia farmacologica, esercita un'azione up-regolante sui livelli plasmatici di VWF (vedi 1.2.5). Tutti i pazienti con CS oggetto di questo studio erano in fase attiva di malattia e caratterizzati, pertanto, da livelli molto elevati di cortisolo libero urinario (CLU). Non tutti però presentavano anche l'up-regolazione dei livelli di VWF attesa come conseguenza coagulativa dell'eccesso di cortisolo. In base a questa osservazione si è deciso quindi di raggruppare i soggetti con CS in due categorie

- **Gruppo A:** pazienti con valori aumentati di VWF
- **Gruppo B:** pazienti con valori normali di VWF

Per questa operazione si è tenuto conto dell'influenza esercitata dal sistema ABO sulla determinazione dei livelli di VWF, considerando quindi il gruppo sanguigno di ciascun soggetto e i due range di norma (62-117 U/dL per il gruppo O e 68-171 U/dL per il gruppo non-O) precedentemente calcolati. Quaranta pazienti sono risultati appartenere al gruppo A, 29 al gruppo B.

### **4.3 Caratteristiche dei gruppi A e B di pazienti**

Il gruppo A comprendeva soggetti con CS e livelli aumentati di VWF (40 soggetti), il gruppo B pazienti con CS e livelli di VWF nella norma (29 individui). I due gruppi di pazienti sono risultati omogenei per quanto riguarda età ( $p=0.17$ ), distribuzione maschi/femmine ( $p=0.24$ ), frequenza delle forme ipofisarie/surrenaliche/ectopiche della patologia, ( $p=0.21$ ) e distribuzione dei gruppi sanguigni O/non-O ( $p=0.34$ ) (Tabella 1). Essi avevano inoltre valori simili di CLU ( $1788.5\pm 459.5$  nmol/24h per il gruppo A e  $1024.9\pm 154.4$  nmol/24h per il gruppo B,  $p=0.17$ ) ad indicare un andamento analogo della patologia nei due gruppi. I livelli medi di VWF sono risultati l'unica differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti: i valori osservati erano  $232.1\pm 15.6$  U/dL per il gruppo A e  $125.1\pm 4.7$  U/dL per il gruppo B ( $p<0.0001$ ) (Figura 2).

Nel gruppo A è stata dimostrata una correlazione diretta tra i livelli di CLU e i livelli di VWF ( $r=0.66$ ,  $p<0.0001$ ), suggerendo che l'aumento del VWF fosse correlato al grado di aumento di cortisolo. Nessuna correlazione è emersa invece per i soggetti di gruppo B ( $r=0.052$ ,  $p=0.79$ ) (Figura 3).

### **4.4 Analisi degli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF**

Studi precedenti hanno dimostrato che, nella popolazione normale, i polimorfismi -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF costituiscono un modulatore genetico dei livelli di VWF, con l'aplotipo 1 (GCAG) associato a livelli di VWF mediamente più elevati rispetto all'aplotipo 2 (CTGA) (73, 74). Considerato il loro contributo in condizioni normali, si è deciso di verificare se gli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A avessero un ruolo anche nella modulazione dei livelli di VWF in condizioni di eccesso cronico di cortisolo. Tutti gli individui oggetto di questo studio sono stati quindi genotipizzati per le quattro posizioni polimorfiche in esame e le frequenze dei genotipi 1/1, 1/2 e 2/2 sono state calcolate nei due gruppi di pazienti con CS e nei sani. I risultati hanno confermato la co-segregazione degli SNPs secondo i due pattern principali GCAG (aplotipo 1) e CTGA (aplotipo 2). Nella popolazione normale, in analogia con i dati della letteratura, il 13.1% degli individui è risultato omozigote 1/1, il 41.9% eterozigote 1/2, il 43.1% omozigote 2/2, mentre 1.9% degli individui aveva un genotipo diverso, dovuto a eventi di ricombinazione all'interno dei singoli aplotipi di SNPs. Per quanto riguarda i pazienti con CS il gruppo A comprendeva 25% di soggetti con genotipo 1/1, 35% con genotipo 1/2 e 27.5% di tipo 2/2; il 12.5% degli individui aveva genotipi non conformi alla co-segregazione dei quattro SNPs. Nel gruppo B, invece, un solo paziente portava genotipo 1/1 (3.4%), mentre il 31.6% era 1/2, il 57.9% 2/2 e il 10.5% aveva genotipi differenti. La differenza nelle distribuzioni

genotipiche tra i due gruppi di pazienti è risultata statisticamente significativa (chi-quadro,  $p=0.04$ ), come sono risultate diverse anche le distribuzioni genotipiche tra i singoli gruppi A e B e i soggetti sani (chi-quadro,  $p=0.003$  e  $p=0.025$ , per A e B rispettivamente) (Tabella 2). Considerando le frequenze aplotipiche è emersa una prevalenza dell'aplotipo 1 nel gruppo A rispetto al B e ai sani (45%, 19% e 34.7%, rispettivamente), e dell'aplotipo 2 nel gruppo B rispetto ad A e ai soggetti sani (75.9%, 47.5% e 64.4%, rispettivamente). Anche in questo caso l'analisi del chi-quadro ha rivelato una differenza significativa, sia tra A e B ( $p=0.002$ ), sia tra i singoli gruppi di pazienti e i sani ( $p=0.0002$  e  $p=0.006$ , per A e B rispettivamente) (Tabella 3). I dati raccolti indicavano quindi un'associazione preferenziale tra presenza dell'aplotipo 1 e up-regolazione dei livelli di VWF (pazienti di gruppo A), e tra aplotipo 2 e mantenimento di valori normali di VWF (pazienti di gruppo B). Per quantificare il rischio associato ai diversi genotipi è stata eseguita l'analisi degli odds-ratio (OR) da cui è emerso che, nei pazienti con CS, il rischio di sviluppare alti livelli di VWF è 4 volte superiore in presenza dell'aplotipo 1 rispetto al 2 (OR=3.8,  $p=0.001$ ) e che tale rischio diventa 14 volte più elevato in condizioni di omozigosi 1/1 rispetto a 2/2 (OR=14.5,  $p=0.01$ ) (81). Per quanto riguarda il contributo degli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A alla modulazione dei livelli di VWF nella popolazione sana, a sorpresa, sono stati ottenuti risultati differenti da quanto riportato in letteratura: nei 160 individui sani oggetto di questo studio, infatti, non è stata riscontrata alcuna associazione tra livelli di VWF e presenza degli aplotipi 1 o 2. I valori medi di VWF osservati erano:  $111.9\pm 45.6$  per i soggetti omozigoti 1/1,  $104.9\pm 33.3$  per gli eterozigoti 1/2 e  $109.5\pm 45.4$  per gli omozigoti 2/2; il test ANOVA non ha rilevato, tra le tre classi, alcuna differenza statisticamente significativa ( $p=0.71$ ).

In definitiva gli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A, seppur apparentemente non coinvolti nella modulazione dei livelli di VWF in condizioni normali, sembrano costituire un importante fattore di rischio/protezione verso l'incremento dei livelli circolanti di VWF, in condizioni patologiche di eccesso di glucocorticoidi.

#### **4.5. Analisi della regione -2144 (GT)<sub>n</sub> del promotore del gene VWF**

E' stato recentemente descritto, per la regione microsatellite (GT)<sub>n</sub> del promotore del gene VWF, un ruolo di modulatore trascrizionale dei livelli di VWF, in risposta a condizioni di shear stress (76). Questo studio si prefigge di caratterizzare il numero e la frequenza, finora mai descritti, delle varianti (GT)<sub>n</sub> presenti nella popolazione normale, e di indagare se un diverso numero di ripetizioni GT nella regione 5'-UTR del gene VWF si associ a differenti livelli di VWF circolante anche in condizioni patologiche di eccesso di glucocorticoidi.

#### 4.5.1 Caratterizzazione delle varianti alleliche (GT)<sub>n</sub> nei sani e nei pazienti con CS

La genotipizzazione dei 160 soggetti sani oggetto dello studio ha rivelato l'esistenza di alleli di lunghezza variabile da 15 a 24 GT-repeats, diffusi nella popolazione secondo una distribuzione bimodale con un picco a 21 e l'altro a 19 repeats. (GT)<sub>21</sub> è risultato l'allele più frequente (39.4%), seguito da (GT)<sub>19</sub> (34.1%) e (GT)<sub>20</sub> (10.6%). I restanti alleli presentavano frequenze al di sotto del 10%, (GT)<sub>22</sub>, o del 5%, (GT)<sub>15-17-18-23-24</sub> (Figura 4a). Nei soggetti con CS la distribuzione delle varianti (GT)<sub>n</sub> è risultata del tutto paragonabile a quella osservata nella popolazione normale (Figura 4b). Alcune differenze sono emerse, tuttavia, analizzando in maniera separata i due gruppi di pazienti: nel gruppo A (VWF alto) l'allele (GT)<sub>19</sub> è risultato più frequente del (GT)<sub>21</sub> (42.5% vs 30.0%) (Figura 4c); al contrario nei soggetti di gruppo B la frequenza di (GT)<sub>19</sub> calava al 22.4%, risultando drasticamente abbattuta sia rispetto al gruppo A sia rispetto ai sani, mentre quella dell'allele (GT)<sub>21</sub> aumentava fino al 48.3% (Figura 4d). L'analisi eseguita mediante il test ANOVA ad una via, ha dimostrato una diversa distribuzione allelica tra i gruppi A, B e sani ( $p=0.043$ ), anche se il successivo test di Tukey ha evidenziato che la differenza statisticamente significativa era esclusivamente quella esistente tra i due gruppi di pazienti ( $p<0.05$ ), mentre non sono risultate rilevanti le differenze tra i singoli gruppi A e B, e i sani. In particolare il gruppo A presentava un numero di ripetizioni GT mediamente più basso rispetto al gruppo B ( $19.96\pm 1.24$  vs  $20.50\pm 1.05$ ). L'analisi delle Corrispondenze ha confermato l'associazione preferenziale tra pazienti di gruppo A e alleli con 17, 18, 19 ripetizioni GT, e tra pazienti di gruppo B e alleli con 20, 21, 22 GT-repeats (Figura 5). Tenendo conto di questa associazione e ricordando la distribuzione bimodale delle varianti (GT)<sub>n</sub>, si è deciso di suddividere gli alleli in due gruppi: S (*short*), se il numero di ripetizioni varia da 15 a 19, L (*long*) se il numero di ripetizioni è pari a 20 o più.

#### 4.5.2 Associazione tra lunghezza della GT-repeat e up-regolazione dei livelli di VWF, nei pazienti con CS

In base alla suddivisione degli alleli (GT)<sub>n</sub> in varianti S ed L (vedi paragrafo precedente) le frequenze genotipiche osservate sono state le seguenti: nella popolazione normale il 18.8% dei soggetti portava genotipo S/S, il 40% era eterozigote S/L e il 41.3% omozigote L/L. Per quanto riguarda i due gruppi di pazienti con CS, il genotipo S/S è risultato molto frequente nel gruppo A (22.5%), mentre era presente in uno solo dei pazienti di gruppo B (3.4%), al contrario il genotipo L/L era maggiormente rappresentato nel gruppo B (55.2%) rispetto al gruppo A (27.5%): le distribuzioni genotipiche dei due gruppi sono risultate statisticamente diverse (Chi-quadro,  $p=0.021$ ) (Tabella 4). Considerando le frequenze alleliche è emersa una prevalenza degli alleli (GT)<sub>S</sub> nel gruppo A rispetto al B e, viceversa, degli alleli (GT)<sub>L</sub> nel gruppo B rispetto ad A (Test di Fisher,  $p=0.01$ ) (Tabella 5). Questi dati suggerivano una correlazione tra incremento di VWF

indotto da corticosteroidi e presenza di alleli (GT)<sub>S</sub> nel promotore del gene VWF. L'analisi degli OR ha confermato questa osservazione, rivelando che, nei pazienti con CS, gli alleli (GT)<sub>S</sub> conferiscono un rischio circa 3 volte superiore di sviluppare alti livelli di VWF, rispetto agli alleli (GT)<sub>L</sub> (OR=2.8, p=0.01) e che tale rischio sale fino a 13 volte nei soggetti omozigoti S/S rispetto a quelli L/L (OR=13.1, p=0.01).

In definitiva quindi, nella Sindrome di Cushing, gli alleli (GT)<sub>S</sub> costituiscono un fattore di rischio verso lo sviluppo di una condizione ipercoagulabile dovuta all'aumento di VWF, mentre gli alleli (GT)<sub>L</sub> sono, in questo senso, un fattore di protezione.

#### **4.5.3 Co-segregazione dei loci (GT)<sub>n</sub> e aplotipo 3268/-2709/-2661/-2527.**

I dati finora raccolti hanno dimostrato che, nei pazienti con CS, l'aplotipo 1 (GCAG) e gli alleli (GT)<sub>S</sub> sono preferenzialmente associati ad una condizione di up-regolazione dei livelli di VWF, mentre l'aplotipo 2 (CTGA) e le varianti (GT)<sub>L</sub> si associano a valori normali di VWF. Considerando la contiguità dei loci in esame - i quattro SNPs, già dimostrati in linkage, e la zona GT-repeat sono compresi in una regione di poco più di 1000 basi - si è deciso di verificare se essi appartengano ad un unico blocco di linkage disequilibrium (LD). Nella popolazione normale le combinazioni L/L-2/2, S/L-1/2 e S/S-1/1 erano quelle predominanti con frequenze, rispettivamente, di 30.6%, 28.7% e 10%: ciò suggeriva l'esistenza di una associazione preferenziale tra (GT)<sub>S</sub> e aplotipo1 e tra (GT)<sub>L</sub> ed aplotipo 2. L'analisi del chi-quadrato ha rivelato che le distribuzioni genotipiche osservate erano effettivamente diverse da quelle attese secondo l'ipotesi dell'indipendenza dei loci, confermando dunque l'esistenza del LD (p<0.0001): (GT)<sub>S</sub> segrega preferenzialmente con l'aplotipo 1, (GT)<sub>L</sub> con l'aplotipo 2.

## **4.6 Contributo dei polimorfismi del promotore del gene VWF alla determinazione dei livelli di VWF, nella popolazione normale**

Nella prima parte di questo studio era emerso un dato contrastante rispetto a quanto pubblicato in letteratura: nella popolazione sana in esame non era stata osservata alcuna differenza, per quanto riguarda i livelli medi di VWF, tra soggetti con genotipo 1/1, 1/2 e 2/2 (vedi paragrafo 4.4). L'ultima parte di questo lavoro si è occupata quindi di indagare in maniera più approfondita il ruolo dei polimorfismi in esame nella determinazione dei livelli di VWF in condizioni non patologiche. Grazie alla raccolta di una coorte molto più numerosa di soggetti sani (394 individui) è stato possibile valutare il contributo dei quattro SNPs e della regione microsatellite del promotore del gene VWF, tenendo in considerazione anche l'effetto degli altri due importanti determinanti dei livelli di VWF: il sistema dei gruppi sanguigni ABO e l'età. La popolazione aveva un'età media di 39.4±11 anni e un valore di VWF pari a 97.9±30.7 U/dL. In accordo con i dati precedenti e con

quanto riportato in letteratura, i livelli di VWF erano più bassi nei soggetti di gruppo O, rispetto ai non-O ( $85.3 \pm 24.0$  U/dL vs  $108.3 \pm 31.8$  U/dL, rispettivamente,  $p < 0.0001$ ) e un lieve contributo era dato anche dall'età con valori di VWF mediamente più elevati nei soggetti dai 40 anni in su, rispetto ai più giovani ( $101.3 \pm 33.2$  U/dL vs  $95.4 \pm 28.8$  U/dL, rispettivamente,  $p = 0.06$ ). Tutti i soggetti sani oggetto dello studio sono stati genotipizzati per i loci -3268/-2709/-2661/-2527 e (GT)<sub>n</sub>. Il LD esistente tra essi è stato confermato dall'analisi del chi-quadrato ( $p < 0.0001$ ) e dal calcolo dei parametri  $D' = 0.70$  ed  $R^2 = 0.66$ . La co-segregazione dei due loci in esame è stata valutata anche mediante l'Analisi delle Corrispondenze che ha evidenziato come il genotipo S/S sia fortemente associato al genotipo 1/1, S/L al 1/2 ed L/L al 2/2 (Figura 6).

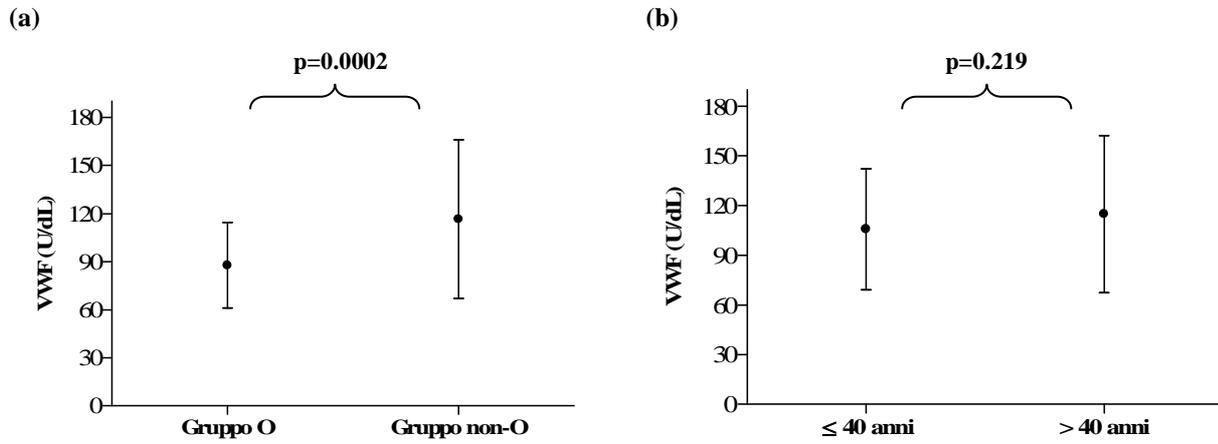
#### **4.6.1 Effetto degli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T, -2661 A/G e -2527 G/A**

In analogia con quanto trovato precedentemente (vedi paragrafo 4.4) i valori medi di VWF nelle classi genotipiche 1/1, 1/2 e 2/2 sono risultati simili ( $95.4 \pm 27.9$  U/dL,  $97.4 \pm 31.1$  U/dL e  $99.1 \pm 31.3$  U/dL, rispettivamente, ANOVA/Kruskal Wallis,  $p = 0.70/0.87$ ), suggerendo il non coinvolgimento degli SNPs in esame nella determinazione dei livelli di VWF, in condizioni normali. A questo punto i soggetti sani sono stati suddivisi, oltre che in base al genotipo, anche in relazione all'età ( $\leq 40$ /  $> 40$  anni) e al gruppo sanguigno (O/non-O), per verificare che un eventuale contributo degli aplotipi 1 e 2 non fosse stato mascherato dall'effetto dei due principali modulatori del VWF: di nuovo l'analisi statistica non ha rivelato alcun contributo degli SNPs in esame alla determinazione dei livelli di VWF (Tabella 6).

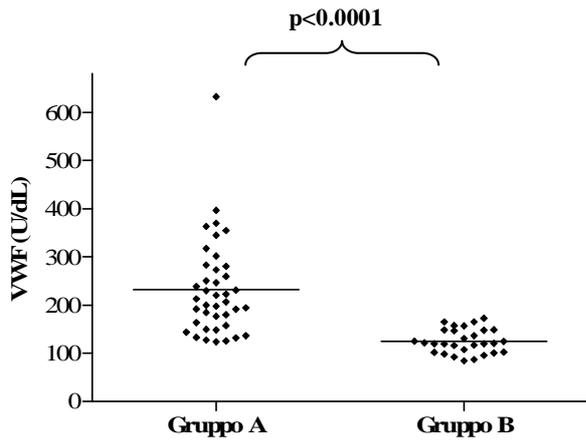
#### **4.6.2 Effetto del locus (GT)<sub>n</sub>**

Nella popolazione sana oggetto di studio le classi di genotipi S/S, S/L e L/L presentavano valori medi di VWF molto simili: essi erano, rispettivamente,  $98.4 \pm 29.3$  U/dL,  $97.2 \pm 32.5$  U/dL e  $98.7 \pm 29.5$  U/dL (ANOVA/Kruskal Wallis,  $p = 0.91/0.65$ ). Questa prima analisi sembrava escludere, anche per la regione (GT)<sub>n</sub>, un ruolo di modulatore trascrizionale dei livelli di VWF, in condizioni normali. È stato tuttavia eseguito un successivo test ANOVA a due vie per valutare in maniera più approfondita il ruolo regolativo del locus in esame, abbattendo la variabilità indotta da età e gruppo sanguigno: l'analisi non ha rivelato alcun contributo del locus (GT)<sub>n</sub> alla determinazione dei livelli di VWF ( $p = 0.98$ ), nemmeno considerando l'effetto del sistema ABO e dall'età ( $p = 0.39$ ) (Figura 7). Alla luce del LD precedentemente dimostrato, è stato infine analizzato l'effetto "cooperativo" dei loci -3268/-2709/-2661/-2527 e (GT)<sub>n</sub>: l'analisi, eseguita sempre mediante test ANOVA a due vie, ha confermato che entrambe le regioni non hanno alcun ruolo di modulatori trascrizionali dei livelli circolanti di VWF in condizioni normali ( $p = 0.69$ ), nemmeno normalizzando i valori di VWF in relazione ad età e gruppo sanguigno ( $p = 0.94$ ) (81).

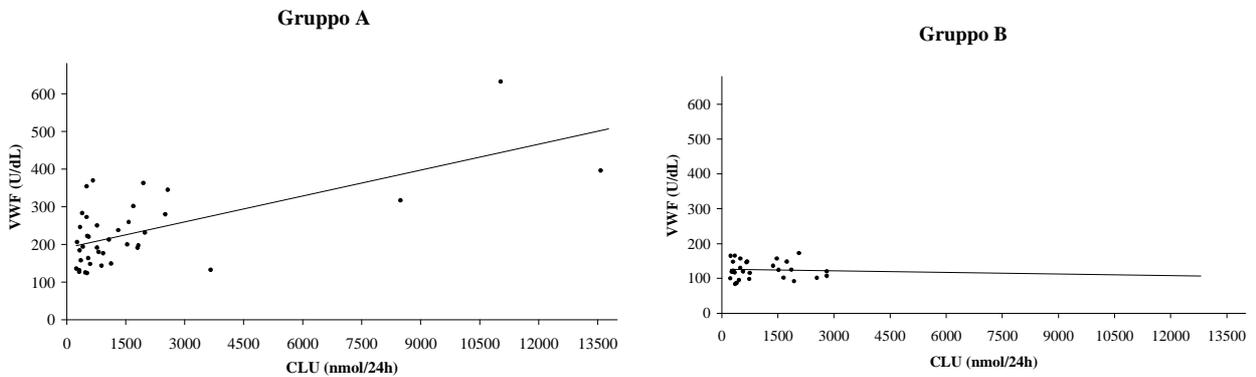
**Figura 1.** Effetto del sistema ABO (a) e dell'età (b) sui livelli di VWF, nella popolazione normale.



**Figura 2.** Livelli medi di VWF nei gruppi A e B di pazienti.

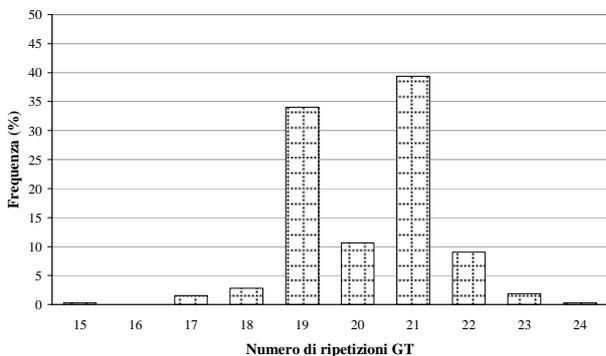


**Figura 3.** Correlazione tra livelli di CLU e VWF nei due gruppi di pazienti.

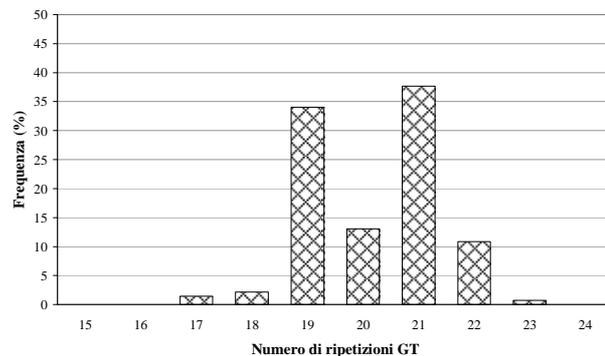


**Figura 4.** Distribuzione degli alleli (GT)<sub>n</sub> nei pazienti con CS e nei sani.

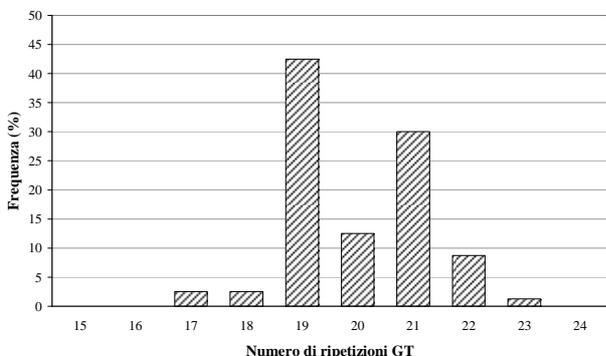
**a) Sani**



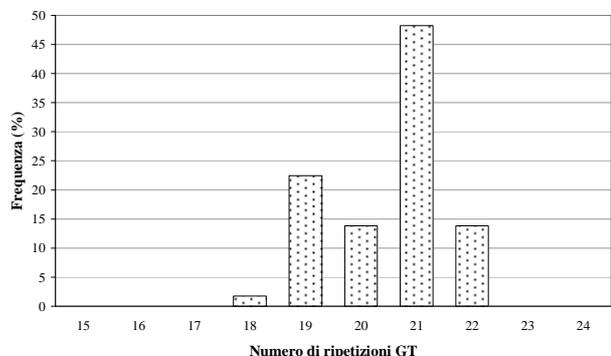
**b) Pazienti (Gruppo A + Gruppo B)**



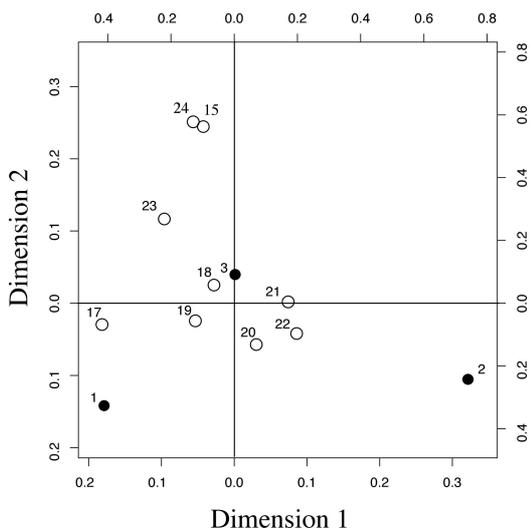
**c) Gruppo A**



**d) Gruppo B**



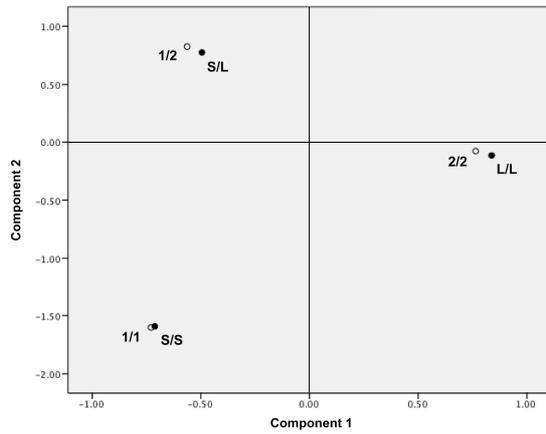
**Figura 5.** Associazione tra numero di ripetizioni GT e gruppi A, B e sani.



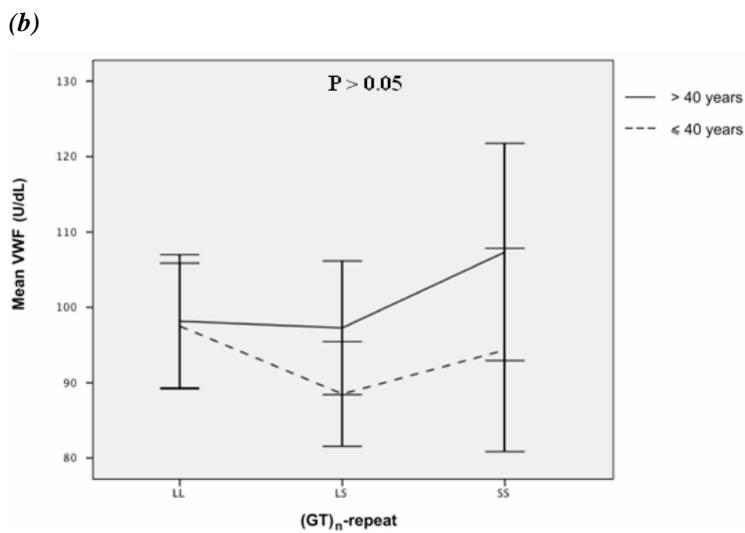
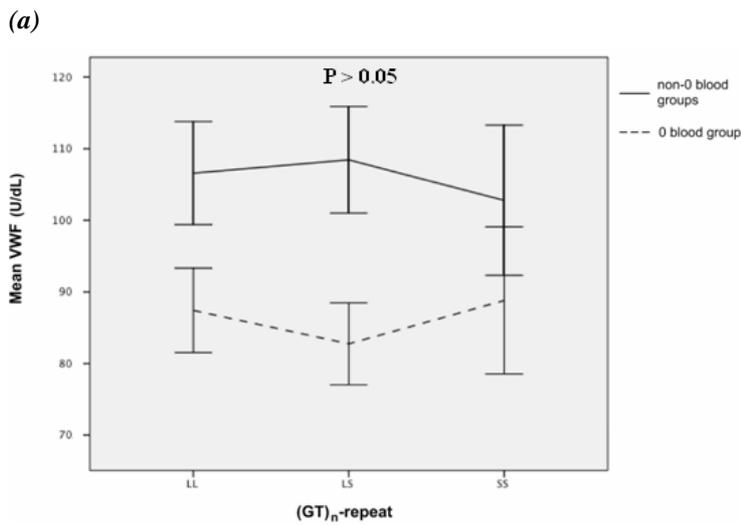
In bianco sono riportati gli alleli (GT)<sub>n</sub> in nero i 3 gruppi studiati:

1=Gruppo A (VWF alto); 2=Gruppo B (VWF normale); 3=Sani

**Figura 6.** Co-segregazione dei loci -2144 ( $GT)_n$  e aplotipo -3268/-2709/-2661/-2527.



**Figura 7.** Effetto del locus ( $GT)_n$  sui livelli di VWF in relazione ai gruppi sanguigni (a) e all'età (b).



**Tabella 1.** Caratteristiche principali dei gruppi A e B di pazienti.

	<b>Gruppo A</b>	<b>Gruppo B</b>	<b>Analisi statistica</b>
<b>Numero di pazienti</b>	40	31	
<b>M/F</b>	11/29	4/25	p=0.24°
<b>Ipo/Surr/Ecto</b>	28/8/4	23/6/0	p=0.21*
<b>Gruppo O/non-O</b>	20/20	11/18	p =0.34°
<b>Età (anni)</b>	46.3 ± 15.6	40.9 ± 10.6	p =0.17
<b>CLU (nmol/24h)</b>	1788.5 ± 459.5	1024.9 ± 154.4	p =0.17^
<b>VWF (U/dL)</b>	232.1 ± 15.6	125.1 ± 4.7	p <0.0001^

\* Test Chi-quadrato

° Test esatto di Fisher

^ T-test di Student

I valori di CLU e VWF sono espressi come media ± SEM

**Tabella 2.** Frequenze genotipiche per gli SNPs -3268, -2709, -2661 e -2527 nei pazienti e nei soggetti sani.

<b>Genotipo</b>					<b>Analisi statistica</b>
	<b>1/1</b>	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>	<b>Altro</b>	<b>Test chi-quadro</b>
<b>Gruppo A</b>	25% (10)	35% (14)	27.5% (11)	12.5% (5)	A vs B p=0.040
<b>Gruppo B</b>	3.4% (1)	31% (9)	55.3% (16)	10.3% (3)	A vs Sani p=0.003
<b>Sani</b>	13.1% (21)	43.1% (69)	41.9% (67)	1.9% (3)	B vs Sani p=0.025

Aplotipo 1: -3268G, -2709C, -2661A, -2527G

Aplotipo 2: -3268C, -2709T, -2661G, -2527A

Tra parentesi è riportato il numero di individui

**Tabella 3.** Frequenze aplotipiche per gli SNPs -3268, -2709, -2661 e -2527 nei pazienti e nei soggetti sani.

<b>Aplotipo</b>				<b>Analisi statistica</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Altro</b>	<b>Test chi-quadro</b>
<b>Gruppo A</b>	45% (36)	47.5% (38)	7.5% (6)	A vs B p=0.003
<b>Gruppo B</b>	19% (11)	75.9% (44)	5.2% (3)	A vs Sani p=0.0002
<b>Sani</b>	34.7% (111)	64.4% (206)	0.9% (3)	B vs Sani p=0.006

Aplotipo 1: -3268G, -2709C, -2661A, -2527G

Aplotipo 2: -3268C, -2709T, -2661G, -2527A

Tra parentesi è riportato il numero di individui

**Tabella 4.** Frequenze genotipiche per il locus  $(GT)_n$  nei pazienti con CS e nei sani.

	Genotipo			Analisi statistica
	S/S	S/L	L/L	Test Chi-quadro
<b>Gruppo A</b>	22.5% (9)	50.0% (20)	27.5% (11)	A vs B p=0.02 A vs Sani p=0.28 B vs Sani p=0.10
<b>Gruppo B</b>	3.4% (1)	41.4% (12)	55.2% (16)	
<b>Sani</b>	18.8% (30)	40.0% (64)	41.3% (66)	

S: numero di  $GT \leq 19$

L: numero di  $GT \geq 20$

Tra parentesi è riportato il numero di individui

**Tabella 5.** Frequenze alleliche per il locus  $(GT)_n$  nei pazienti con CS e nei sani.

	Allele		Analisi statistica
	S	L	Test esatto di Fisher
<b>Gruppo A</b>	47.5% (38)	52.5% (42)	A vs B p=0.01 A vs Sani p=0.16 B vs Sani p=0.04
<b>Gruppo B</b>	24.1% (14)	75.9% (44)	
<b>Sani</b>	38.7% (124)	61.3% (196)	

S: numero di  $GT \leq 19$

L: numero di  $GT \geq 20$

Tra parentesi è riportato il numero di individui

**Tabella 6.** Contributo degli SNPs del promotore VWF ai livelli di VWF, in relazione ad età e gruppo sanguigno.

>40 anni (n=165)			≤40 anni (n=214)		
Genotipo	VWF (U/dL)	p value*	Genotipo	VWF (U/dL)	p value*
<b>Gruppo non-O</b>			<b>Gruppo non-O</b>		
1/1 (n=15)	86.2±24.9	0.41/0.52	1/1 (n=16)	96.1±31.8	0.40/0.62
1/2 (n=38)	80.2±19.7		1/2 (n=53)	102.2±24.9	
2/2 (n=36)	89.8±23.0		2/2 (n=48)	107.0±31.4	
<b>Gruppo O</b>			<b>Gruppo O</b>		
1/1 (n=10)	105.0±32.1	0.21/0.28	1/1 (n=20)	92.5±23.6	0.41/0.22
1/2 (n=35)	119.1±37.8		1/2 (n=40)	85.7±26.1	
2/2 (n=31)	113.5±33.0		2/2 (n=37)	82.8±27.1	

1:Aplotipo -3268G, -2709C, -2661A, -2527G.

2:Aplotipo -3268C, -2709T, -2661G, -2527A.

I valori di VWF sono espressi come media ± d.s.

Tra parentesi è indicato il numero di soggetti.

\*Test ANOVA ad una via/Kruskal-Wallis.



## 5. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che un'ampia regione di LD del promotore del gene VWF è coinvolta nel modulare l'up-regolazione, indotta da eccesso di corticosteroidi, dei livelli di VWF. In particolare, nei pazienti con CS, il pattern polimorfico GCAG (aplotipo 1) e le varianti (GT)<sub>S</sub> (15-19 ripetizioni) si associano ad un aumentato rischio di sviluppare alti livelli di VWF e quindi uno stato protrombotico, mentre il pattern CTGA (aplotipo 2) e gli alleli (GT)<sub>L</sub> (20 o più ripetizioni) costituiscono, in questo senso, un fattore di protezione.

I pazienti affetti da CS sono soggetti a rischio cardiovascolare elevato, infatti l'ipertensione, l'obesità e la resistenza insulinica dovute all'ipercortisolismo causano aterosclerosi e danni cardiaci, che spesso permangono anche dopo remissione della patologia e che comportano un tasso di mortalità per cause cardiovascolari 4 volte superiore in questi pazienti rispetto alla popolazione normale (30, 81). Uno stato di ipercoagulabilità è inoltre associato alla CS: esso è dovuto prevalentemente all'aumento di sintesi del VWF in risposta all'eccesso di cortisolo ed è una condizione che costituisce un ulteriore fattore di rischio trombotico per questi pazienti (31, 83).

Lo studio di un'ampia coorte di soggetti con CS, ha rivelato tuttavia che non sempre la Sindrome di Cushing causa up-regolazione del VWF, infatti il 42% dei pazienti oggetto di questo studio, pur avendo livelli molto elevati di cortisolo, manteneva valori di VWF perfettamente nella norma. Tale osservazione suggeriva che anche altri fattori, oltre all'eccesso di corticosteroidi, potessero essere coinvolti nell'up-regolazione del VWF nella Sindrome di Cushing, ed è stato questo il punto di partenza di questo lavoro. Sono stati quindi oggetto di studio due gruppi di pazienti con CS, caratterizzati rispettivamente da livelli elevati (gruppo A) e livelli normali (gruppo B) di VWF.

Il VWF è una molecola altamente variabile, le sue concentrazioni infatti sono influenzate da numerosi fattori, sia ambientali che genetici (65). In condizioni normali il principale modulatore dei livelli di VWF è il sistema dei gruppi sanguigni ABO, che comporta valori di VWF mediamente più bassi per i soggetti di gruppo O rispetto a quelli di gruppo non O, contribuendo al 25-30% della variabilità osservata nella popolazione normale (72). Tenuto conto di ciò, l'attribuzione di ciascun paziente al gruppo A o B, punto chiave di questo lavoro, è stata effettuata considerando il gruppo sanguigno di ciascun soggetto e utilizzando per il VWF due range di norma diversi, calcolati sulla popolazione sana: 62-117 U/dL per il gruppo O e 68-171 U/dL per il gruppo non-O.

I polimorfismi di singoli nucleotidi -3268 G/C, -2709 C/T -2661 A/G e -2527 G/A del promotore del gene VWF sono stati recentemente caratterizzati come nuovi modulatori genetici dei livelli di VWF nella popolazione normale: essi sono in linkage disequilibrium (LD) e la condizione genotipica GCAG/GCAG (1/1) si associa a concentrazioni di VWF mediamente più elevate,

rispetto alla CTGA/CTGA (2/2) mentre la condizione di eterozigosi 1/2 risulta associata a livelli intermedi di VWF (73, 74). Tenuto conto del loro contributo in condizioni normali e del fatto che i glucocorticoidi agiscono attraverso un recettore nucleare, si è deciso di verificare se gli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T -2661 A/G e -2527 G/A fossero coinvolti nel meccanismo di modulazione trascrizionale dei livelli di VWF, anche in condizioni di eccesso cronico di cortisolo. I risultati ottenuti dall'analisi di genotipizzazione hanno dimostrato che, nella Sindrome di Cushing, esiste un'associazione tra aplotipo 1 (GCAG) e pazienti con elevati livelli di VWF (Gruppo A), e tra aplotipo 2 e pazienti con VWF normale (Gruppo B). Il rischio di sviluppare up-regolazione del VWF, e quindi una condizione protrombotica, risulta 4 volte più elevato in presenza dell'aplotipo 1, rispetto al 2, e aumenta fino a 14 volte in condizioni di omozigosi 1/1 rispetto a 2/2.

L'ipotesi di un ruolo di modulatore trascrizionale per l'aplotipo -3268/-2709/-2661/-2527 ha trovato un ulteriore supporto nei risultati dell'analisi bioinformatica condotta sul locus VWF (TRANSFAC database), che ha predetto la posizione nucleotidica -3268 come *core* di una sequenza *consensus* per il fattore di trascrizione Sp1. Quando in posizione -3268 è presente una G (aplotipo1), tale sequenza è un *consensus* perfetto per Sp1, mentre la presenza di una C (aplotipo 2) la rende un *consensus* non ideale. Sp1 fa parte della cascata di fattori di trascrizione coinvolti nel meccanismo di trasduzione del segnale, attivato dall'azione dei glucocorticoidi (84, 85). Dati recentemente pubblicati hanno dimostrato che i glucocorticoidi aumentano l'espressione del gene Monoamine-ossidasi A (MAO-A), indirettamente, mediante l'azione di Sp1 sul gene: la sostituzione del dinucleotide GC nel *core* della sequenza di riconoscimento per Sp1 inibisce la capacità del dexametazone di up-regolare la trascrizione genica di MAO-A (86). In analogia con questo meccanismo, è lecito ipotizzare che, nei pazienti con CS, l'up-regolazione dei livelli di VWF in risposta all'eccesso di cortisolo, sia più elevata in presenza dell'aplotipo 1 perché questa è la condizione che comporta una maggiore affinità di legame del fattore Sp1 al proprio sito di riconoscimento.

L'azione diretta dei glucocorticoidi (GC) sulla trascrizione genica è mediata da un recettore citoplasmatico (GR, *Glucocorticoid Receptor*) che, attivato dal ligando, permea la membrana nucleare, e va a legarsi sul promotore dei geni responsivi riconoscendo una sequenza bersaglio GRE (*Glucocorticoid Response Element*) (84). Gli elementi GRE sono dei palindromi composti da due esameri intervallati da un numero variabile di nucleotidi la cui sequenza consenso è TGTACAnnnTGTYCY. L'analisi bioinformatica del locus VWF predice, nel promotore del gene, due esameri *half-GRE* localizzati uno a monte e l'altro a valle di una regione costituita da un numero variabile di ripetizioni GT. Si è scelto quindi di estendere lo studio dei polimorfismi del promotore del gene VWF anche al locus (GT)<sub>n</sub>, per verificare se tale elemento fosse in grado di

modulare l'aumento dei livelli di VWF in risposta ai corticosteroidi, fungendo da spaziatore tra i due esameri GRE: a seconda del numero di GT, infatti, i due esameri risultano più o meno distanziati tra loro e questo potrebbe determinare una maggiore o minore affinità di legame tra l'elemento GRE e la molecola di GC. Tale scelta è stata supportata anche dalla recente dimostrazione che il locus -2144 (GT)<sub>n</sub> del promotore VWF ha un ruolo di modulatore trascrizionale in condizioni di shear stress (76). Lo scopo di questa seconda parte dello studio è stato anche quello di caratterizzare il numero e la frequenza, finora mai descritti, degli alleli (GT)<sub>n</sub> nella popolazione normale.

I risultati ottenuti hanno rivelato l'esistenza di 9 alleli (GT)<sub>n</sub>, con un numero di ripetizioni GT variabile da 15 a 24 e hanno inoltre dimostrato che il locus fa parte, insieme agli SNPs -3268 G/C, -2709 C/T -2661 A/G e -2527 G/A, di un'unica regione di linkage disequilibrium (LD) del promotore del gene VWF. Per comodità, e sulla base della distribuzione bimodale delle frequenze alleliche osservata nella popolazione normale, le varianti (GT)<sub>n</sub> sono state suddivise in due gruppi: S (*Short*, se il numero di ripetizioni GT variava da 15 a 19) ed L (*Long*, se le ripetizioni GT erano 20 o più). Sulla base di questa classificazione è stata dimostrata l'esistenza di un'associazione preferenziale tra i loci -3268/-2709/-2661/-2527 e (GT)<sub>n</sub>: l'aplotipo 1 (GCAG) segrega prevalentemente con le varianti (GT)<sub>S</sub>, l'aplotipo 2 (CTGA) con le (GT)<sub>L</sub>. La co-segregazione è giustificata dal fatto che i cinque polimorfismi sono tutti compresi in un range di poco più di 1 Kb. Per quanto concerne i pazienti con CS la presenza di alleli (GT)<sub>S</sub> è risultata associata ad incremento del VWF (gruppo A) conferendo ai pazienti un rischio 3 volte più elevato di sviluppare uno stato di ipercoagulabilità, rispetto alla presenza delle varianti (GT)<sub>L</sub>. Tale rischio diventava addirittura 13 volte superiore in condizioni di omozigosi (GT)<sub>S</sub>/(GT)<sub>S</sub>, rispetto a (GT)<sub>L</sub>/(GT)<sub>L</sub>. Quindi, come gli aplotipi 1 e 2, allo stesso modo gli alleli (GT)<sub>S</sub> e (GT)<sub>L</sub> costituiscono, per i pazienti con CS, rispettivamente un fattore di rischio e di protezione verso l'up-regolazione dei livelli di VWF e quindi verso l'instaurarsi di uno stato protrombotico. Questi risultati appaiono in contraddizione con i dati della letteratura che riportano, seppur in condizioni diverse (shear stress), un maggior effetto up-regolatore sui livelli di VWF per la variante lunga (GT)<sub>23</sub>, rispetto alla più corta (GT)<sub>17</sub> (18). Tale discrepanza potrebbe essere dovuta all'esistenza di diversi meccanismi che up-regolano il VWF in risposta a shear stress e ad eccesso di glucocorticoidi: se così fosse il locus (GT)<sub>n</sub> fungerebbe da elemento up- o down-regolatore della trascrizione di VWF, a seconda dello stimolo presente. Oppure i nostri risultati potrebbero essere semplicemente il risultato del LD esistente tra i loci (GT)<sub>n</sub> e aplotipo -3268/-2709/-2661/-2527: in questo caso la GT-repeat potrebbe non avere alcun ruolo funzionale nella modulazione dei livelli di VWF, e il rischio associato alla presenza delle (GT)<sub>S</sub>, allora, sarebbe dovuto esclusivamente alla co-segregazione con l'aplotipo 1. Viceversa,

potrebbe essere la regione (GT)<sub>n</sub> l'elemento funzionale, e l'effetto dei quattro SNPs solo la conseguenza del LD. L'analisi di pazienti con genotipo 11/LL o 22/SS avrebbe potuto suggerire il ruolo funzionale di un elemento piuttosto che dell'altro, ma questi due genotipi, attesi come combinazioni molto rare a causa del LD che caratterizza la regione, non sono stati trovati in nessuno dei pazienti oggetto dello studio. Ad ogni modo, indipendentemente da quali siano i meccanismi molecolari alla base dell'attività promotoriale del gene VWF, entrambi i loci -3268/-2709/-2661/-2527 e (GT)<sub>n</sub> si sono dimostrati dei nuovi validi marcatori in grado di predire il rischio di incremento del VWF associato alla Sindrome di Cushing. Questo ha implicazioni cliniche importanti perché potrebbe permettere, mediante una semplice analisi genetica, di predire l'instaurarsi di una condizione di ipercoagulabilità dando la possibilità di definire un ulteriore fattore di rischio tromboembolico in pazienti già sottoposti a forte rischio cardiovascolare per l'obesità, la dislipidemia e l'ipertensione che caratterizzano la patologia.

Per quanto riguarda il contributo dei polimorfismi in esame alla determinazione dei livelli di VWF nella popolazione normale, ciò che è emerso in questo studio indica che né gli SNPs né il locus (GT)<sub>n</sub> hanno alcun ruolo di modulatori. Questi risultati erano del tutto inattesi poiché, essendo noto dalla letteratura l'effetto up-regolatore dell'aplotipo 1 sui livelli di VWF nella popolazione normale Canadese (74, 75), ed essendo stato dimostrato in questo lavoro il LD tra i loci -3268/-2709/-2661/-2527 e (GT)<sub>n</sub>, ci si aspettava un contributo rilevante dell'aplotipo 1 e degli alleli (GT)<sub>S</sub> anche in condizioni non patologiche. La discrepanza rispetto ai dati della letteratura potrebbe essere dovuta al fatto che il contributo dei polimorfismi in esame è molto piccolo per cui è necessaria una coorte più numerosa di soggetti per rilevarne l'effetto. In ogni caso, i dati ottenuti suggeriscono che i polimorfismi del promotore del gene VWF siano parte di un sistema di regolazione trascrizionale che si attiva in risposta a stimoli esterni quali l'eccesso cronico di cortisolo e lo shear stress. Considerato il numero elevato di condizioni che up-regolano i livelli di VWF e considerato il ruolo che questa molecola ha nella determinazione di una condizione ipercoagulabile e quindi nella patogenesi della malattia trombotica, sarebbe interessante valutare se i polimorfismi del promotore del gene VWF costituiscano un sistema di regolazione trascrizionale comune anche ad altre condizioni (gravidanza, terapia con estroprogestinici, ipertensione ecc.) e verificare quindi se l'aplotipo1 (GCAG) e le varianti (GT)<sub>S</sub> siano dei marcatori di rischio trombotico più generali.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull Johns Hopkins Hosp* 1932.; 50:137
- 2) Boscaro M, Barzon L, Fallo F, Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet* 2001; 357:783-91.
- 3) Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing' syndrome. *Lancet* 2006; 3667: 1605-17.
- 4) Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, Mullen N, Wesley RA, Nieman LK. Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(8): 4955-62.
- 5) Lindholm J, Juul S, Jørgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, Hagen C, Jørgensen J, Kosteljanetz M, Kristensen L, Laurberg P, Schmidt K, Weeke J. Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):117-23.
- 6) Etxabe J, Vazquez JA. Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994;40(4):479-84.
- 7) Plotz CM, Knowlton AI, Ragan N C. The natural history of Cushing's syndrome. *Am J Med.* 1952;13(5):597-614.
- 8) Magiakou MA, Smyrnaki P, Chrousos GP. Hypertension in Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20(3):467-82.
- 9) Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(4):144-9.
- 10) Lado-Abeal J, Rodriguez-Arno J, Newell-Price JD, Perry LA, Grossman AB, Besser GM, Trainer PJ. Menstrual abnormalities in women with Cushing's disease are correlated with hypercortisolemia rather than raised circulating androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(9):3083-8.
- 11) Jeffcoate WJ, Silverstone JT, Edwards CR, Besser GM. Psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: response to lowering of plasma cortisol. *Q J Med.* 1979; 48(191): 465-72.
- 12) Born J, Späth-Schwalbe E, Schwakenhofer H, Kern W, Fehm HL. Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68(5): 904-11.
- 13) Jacoby RC, Owings JT, Ortega T, Gosselin R, Feldman EC. Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing syndrome; discussion 1006-7. *Arch Surg.* 2001; 136(9):1003-6.

- 14) Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev.* 1998;19(5):647-72.
- 15) Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A, Boscaro M. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(12):5593-602.
- 16) Findling JW, Raff H. Newer diagnostic techniques and problems in Cushing's disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1999; 28(1):191-210.
- 17) Wood PJ, Barth JH, Freedman DB, Perry L, Sheridan B. Evidence for the low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome--recommendations for a protocol for biochemistry laboratories. *Ann Clin Biochem.* 1997; 34:222-9.
- 18) Papanicolaou DA, Yanovski JA, Cutler GB Jr, Chrousos GP, Nieman LK. A single midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(4):1163-7
- 19) Viardot A, Huber P, Puder JJ, Zulewski H, Keller U, Müller B. Reproducibility of nighttime salivary cortisol and its use in the diagnosis of hypercortisolism compared with urinary free cortisol and overnight dexamethasone suppression test. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5730-6.
- 20) Invitti C, Pecori Giraldi F, 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(2):440-8.
- 21) Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Faggiano A, Bodei L, de Krijger RR, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Dopamine receptor expression and function in corticotroph ectopic tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):65-9.
- 22) Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Stratakis CA, Klibanski A. The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4482-8.
- 23) Johanssen S, Allolio B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(5):561-9.
- 24) Arnaldi G, Mancini T, Polenta B, Boscaro M. Cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Pituitary.* 2004;7(4):253-6.

- 25) Tauchmanovà 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(11):4872-8
- 26) Muiesan ML, Lupia M, Salvetti M, Grigoletto C, Sonino N, Boscaro M, Rosei EA, Mantero F, Fallo F. Left ventricular structural and functional characteristics in Cushing's syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41(12):2275-9.
- 27) Kirilov G, Tomova A, Dakovska L, Kumanov P, Shinkov A, Alexandrov AS. Elevated plasma endothelin as an additional cardiovascular risk factor in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2003;149(6):549-53.
- 28) Mitchell BM, Webb RC. Impaired vasodilation and nitric oxide synthase activity in glucocorticoid-induced hypertension. *Biol Res Nurs.* 2002; 4(1):16-21.
- 29) Faggiano A, Pivonello R, Spiezia S, De Martino MC, Filippella M, Di Somma C, Lombardi G, Colao A. Cardiovascular risk factors and common carotid artery caliber and stiffness in patients with Cushing's disease during active disease and 1 year after disease remission. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2527-33.
- 30) Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M, Lombardi G. Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(8):2664-72.
- 31) Casonato A, Pontara E, Boscaro M, Sonino N, Sartorello F, Ferasin S, Girolami A. Abnormalities of von Willebrand factor are also part of the prothrombotic state of Cushing's syndrome. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* 1999; 10, 145–151.
- 32) Boscaro M, Sonino N, Scarda A, Barzon L, Fallo F, Sartori MT, Patrassi GM, Girolami A. Anticoagulant prophylaxis markedly reduces thromboembolic complications in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 3662–3666
- 33) Patrassi GM, Dal Bo Zanon R, Boscaro M, Martinelli S, Girolami A. (1985) Further studies on the hypercoagulable state of patients with Cushing's syndrome. *Thrombosis and Haemostasis,* 54, 518–520.
- 34) Terzolo M, Allasino B, Bosio S, Brusa E, Daffara F, Ventura M, Aroasio E, Sacchetto G, Reimondo G, Angeli A, Camaschella C. Hyperhomocysteinemia in patients with Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3745–3751
- 35) Ruggeri ZM. Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:142-149.
- 36) Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Ann Rev Biochem* 1998;67:395-424.

- 37) Foster PA, Fulcher CA, Marti T, et al. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1987;262:8443-8446.
- 38) Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71:1906-1909.
- 39) Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30: 253-269,
- 40) Bernardi F, Marchetti G, Casonato A, Gemmati D, Patracchini P, Legnani C, DeRosa V, Girolami A, Conconi F. Characterization of polymorphic markers in the von Willebrand factor gene and pseudogene. *Br J Haematol.* 1990;74(3):282-9.
- 41) Marchetti G, Patracchini P, Volinia S, Aiello V, Schiavoni M, Ciavarella N, Calzolari E, Schwienbacher C, Bernardi F. Characterization of the pseudogenic and genic homologous regions of von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 1991;78(1):71-9.
- 42) Sussman LL, Rand JH. Subendothelial deposition of von Willebrand's factor requires the presence of endothelial cells. *J. Lab. Clin. Med.* 1982; 100: 526-532.
- 43) Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: Identifications of a large precursor polypeptide chain. *J. Biol. Chem.* 1983;258: 2065-67.
- 44) Marti T, Rosselet SJ, Titani K, Walsh KA. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* 26, 8099-8109, 1987.: 2 independent intracellular processes. *Blood* 2000; 96: 1808-1815.
- 45) Haberichter SL, Fahs SA, Montgomery RR. Von Willebrand factor storage and multimerization: 2 independent intracellular processes. *Blood* 2000; 96: 1808-1815.
- 46) Wise RJ, Pittman DD, Handin RL, Kaufman RJ, Orkin SH. The Propeptide of von Willebrand Factor Independently Mediates the Assembly of von Willebrand Multimers. *Cell* 1988; 52: 229-236.
- 47) Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA. Substructure of human von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1491-1500,.
- 48) Gralnick HR, Williams SB, Morisato DK. Effect of multimeric structure of the factor VIII/von Willebrand factor protein on binding to platelets. *Blood.* 1981; 58: 387-392.
- 49) Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1982; 95(1): 355-60.

- 50) Cramer EM, Meyer D, le Menn R, Breton-Gorius J. Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 1985;66(3):710-3.
- 51) Spom LA, Marder VJ, Wagner DV. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 1986; 46: 186.
- 52) Marchese P, Murata M, Mazzucato M, Pradella P, De Marco L, Ware J, Ruggeri ZM. Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding. *J Biol Chem*. 1995;270(16):9571-8.
- 53) Federici AB, Bader R, Pagani S, Colibretti ML, De Marco L, Mannucci P. M. Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and Ib/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *British Journal of Haematology* 1989; 73: 93-99.
- 54) Fujimoto T, Ohara S, Hawiger J. Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets *J Clin Invest*. 1982;69(6):1212-22
- 55) Schatz SM, Zimmermann K, Hasslacher M, Kerschbaumer R, Dockal M, Gritsch H, Turecek PL, Schwarz HP, Dorner F, Scheiflinger F. Mutation of the surface-exposed amino acid Trp to Ala in the FVIII C2 domain results in defective secretion of the otherwise functional protein. *Br J Haematol*. 2004;125(5):629-37.
- 56) Wise RJ, Damer LA, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The Role of von Willebrand Factor Multimers and Propeptide Cleavage in Binding and Stabilization of Factor VIII. *J. Bio. Chem*. 1991; 32: 2194821955.
- 57) Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, Sakurai Y, Shibata M, Suzuki H, Tanaka I, Yoshioka A. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood*. 2002; 99(11): 3993-8.
- 58) Ruggeri ZM, Zimmerman TS. von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 1987; 70: 895-904,.
- 59) Ruggeri ZM. Pathogenesis and Classification of von Willebrand Disease. *Haemostasis* 1994;24: 565-575.
- 60) Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* 1994;71: 520-525.
- 61) Ginsburg D. Molecular genetics of von Willebrand disease. *Thromb Haemost.* 1999; 82(2):585-91
- 62) Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost.* 2006;95(1):49-55.

- 63) Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2006;4(6):1186-93.
- 64) Bongers TN, de Maat MP, van Goor ML, Bhagwanbali V, van Vliet HH, Gómez García EB, Dippel DW, Leebeek FW. High von Willebrand factor levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke.* 2006; 37(11): 2672-7.
- 65) De Lange M, Snieder H, Ariens R, et al. The genetics of haemostasis. *Lancet* 2001; 357: 101-105.
- 66) Aillaud MF, Pignol F, Alessi MC, et al. Increase in plasma concentration of plasminogen activator inhibitor, fibrinogen, von Willebrand factor, factor VIII:C and in erythrocyte sedimentation rate with age. *Thromb Haemost* 1986; 55: 330–332.
- 67) Miller CH, Haff E, Platt SJ, Rawlins P, Drews CD, Dilley AB, Evatt B. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(10):2191-2197.
- 68) Stirling Y, Woolf L, North WR, et al. Hemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1984; 52: 176–182.
- 69) Pottinger BE, Read RC, Paleolog EM, et al. Von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 1989; 53: 387–394.
- 70) Brotman DJ, Girod JP, Posch A, Jani JT, Patel JV, Gupta M, Lip GY, Reddy S, Kickler TS. Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. *Thromb Res.* 2006; 118(2): 247-52.
- 71) Jilma B, Cvitko T, Winter-Fabry A, Petroczi K, Quehenberger P, Blann AD. High dose dexamethasone increases circulating P-selectin and von Willebrand factor levels in healthy men. *Thromb Haemost.* 2005;94(4):797-801.
- 72) Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ. The effect of ABO blood group in the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691–1695.
- 73) Keightley AM, Lam YM, Brady JN, Cameron CL, Lillicrap D. Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. *Blood* 1999; 93: 4277-83.
- 74) Harvey PJ, Keightley AM, Lam YM, Cameron C and Lillicrap L. A single nucleotide polymorphism at nucleotide -1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels. *Brit J Haematol* 2000; 109: 349-353.

- 75) Zhang ZP, Deng LP, Blombäck M, Anvret M. Dinucleotide repeat polymorphism in the promoter region of the human von Willebrand factor gene (vWF gene). *Hum Mol Genet.* 1992; 1(9): 780.
- 76) Hough C, Cameron CL, Notley CR, Brown C, O'Brien L, Keightley AM, Berber E, Lillicrap D. Influence of a GT repeat element on shear stress responsiveness of the VWF gene promoter. *J Thromb Haemost* 2008; 6(7):1183-1190.
- 77) Eikenboom JC, Castaman G, Vos HL, et al. Characterization of the genetic defects in recessive type 1 and type 3 von Willebrand disease patients of Italian origin. *Thromb Haemost* 1998; 79: 709-717.
- 78) Casana P, Martínez F, Haya S, Espinós C, Aznar JA. Significant linkage and non-linkage of type 1 von Willebrand disease to the von Willebrand factor gene. *Bri J Haematol* 2001; 115: 692-700.
- 79) Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza von Willebrand disease. *Blood.* 2002; 99: 180-184.
- 80) Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S.* Fourth edition. Springer.
- 81) Daidone V, Cattini MG, Pontara E, Sartorello F, Gallinaro L, Marotti A, Scaroni C, Pagnan A and Casonato A Microsatellite (GT)<sub>n</sub>-repeats and SNPs in the von Willebrand factor gene promoter do not influence circulating von Willebrand factor levels under normal conditions. *Thromb Haemost* 2008 (accessibile on-line).
- 82) Small M, Lowe GD, Forbes CD, Thomson JA. Thromboembolic complications in Cushing's syndrome. *Clinical Endocrinology.* 1983; 19, 503–511.
- 83) Dal Bo Zanon R, Fornasiero L, Boscaro M, Cappellato G, Fabris F, Girolami A. Increased factor VIII associated activities in Cushing's syndrome: a probable hypercoagulable state. *Thrombosis and Haemostasis.* 1982; 47, 116–117.
- 84) Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* 2004; 500: 51–62.
- 85) De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine reviews.* 2003; 24: 488–522.
- 86) Ou XM, Chen K, Shih JC. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J Bio Chem.* 2006; 281: 21512-21525