



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Dottorato di Ricerca in Medicina Clinica e Sperimentale

XXIX CICLO

*Valutazione della funzione surrenalica in
pazienti adulti affetti da β -talassemia*

Settore scientifico disciplinare di afferenza
MED/13

Tesi di dottorato di ricerca
Dott. Alberto G. Ambrogio
Matr. n°R10567

Coordinatore: Prof. Antonella D'Arminio Monforte
Tutor: Dr. Francesca Pecori Giraldi

Triennio Accademico 2013-2016

Sommario

INTRODUZIONE	2
Talassemia	2
Tabella 1. Principali parametri di sovraccarico marziale e relative soglie nel paziente talassemico	8
Complicanze endocrine	13
Disfunzione surrenalica nella β-talassemia	20
Tabella 2. Studi sull'insufficienza corticosurrenalica in pazienti β-talassemici	20
SCOPO DELLO STUDIO	29
PAZIENTI E METODI	30
Tabella 3. Valutazioni eseguite nel corso del studio	31
Valutazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene	32
Analisi statistica	34
RISULTATI	36
Tabella 4. Dati demografici, indicatori biochimici e strumentali della malattia ematologica di base e di sovraccarico marziale, funzione tiroidea, livelli di prolattina e IGF-1	36
Figura 1. Valutazioni basali HPA	37
Figura 2. CBG e correlazioni con cortisolo	38
Figura 3. Risposta del cortisolo al test di stimolo con ACTH e correlazione tra i picchi di cortisolo sierico e salivare	39
Figura 4. Correlazione tra cortisolo sierico e salivare in basale ed ai vari tempi del test di stimolo	40
Figura 5. Differenze tra ridotta riserva corticosurrenalica e conservata	41
Figura 6. Curva ROC del picco del cortisolo salivare dopo test di stimolo	43
Figura 7. Qualità della vita nei pazienti talassemici esaminati	45
Figura 8. Differenze nella qualità della vita tra pazienti responsivi e non	45
DISCUSSIONE	46
BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUZIONE

Talassemia

La β -talassemia, una delle malattie monogeniche più comuni al mondo, è caratterizzata dalla diminuita (β^+) o assente (β^0) sintesi di catene beta-globiniche con la conseguente ridotta formazione di emoglobina (Hb) e la comparsa di anemia microcitica. La malattia, inizialmente descritta nelle popolazioni di origine mediterranea, africana ed asiatica nella fascia tropicale e subtropicale estesa dal Mediterraneo al sud-est Asiatico, ha mostrato una diffusione globale in seguito al processo di migrazione dei popoli. Si calcola che l'1,5% della popolazione mondiale, per un totale di circa 80-90 milioni, sia “portatore sano” di β -talassemia, che i malati siano intorno ai 400 mila e che ogni anno nascano circa 60 mila nuovi malati, per la gran maggioranza nei paesi in via di sviluppo¹. In Italia si stima che la prevalenza dei “portatori sani” di β -talassemia vari tra il 2,4% del Lazio, il 5-8% della Puglia, il 7-8% della Sicilia e il 12,9% della Sardegna.

Oltre alla forma asintomatica, o talassemia minor, dal punto di vista clinico si distinguono due forme di diversa gravità: la

talassemia major, o morbo di Cooley, e la **talassemia intermedia**.

Il **morbo di Cooley** rappresenta la forma più grave con un esordio molto precoce ed un'anemia che, se non adeguatamente trattata, porta a morte il paziente nella prima infanzia per infezioni e cachessia. Le manifestazioni cliniche compaiono intorno al 4°- 6° mese di vita con il neonato che presenta pallore ingravescente, subittero ed epatosplenomegalia. Si associano spesso sintomi sistemici quali anoressia, decadimento delle condizioni generali e febbre. Quando il quadro è conclamato e l'espansione midollare determina alterazioni della struttura ossea e scheletrica, i bambini presentano una fisionomia caratteristica, con la tipica "facies microcitemica" determinata dagli zigomi sporgenti, dal naso con radice piuttosto infossata ed ali larghe, taglio degli occhi di tipo mongoloide, epicanto, ossa mascellari allargate e dal cranio rotondo ed ingrossato. All'esame radiologico il cranio mostra l'allargamento della diploe con possibile scomparsa del tavolato esterno e alterazione delle trabecole della spongiosa. La neoformazione di trabecole disposte radialmente conferisce il tipico aspetto del "cranio a spazzola"². Il quadro ematologico è

caratterizzato da anemia microcitica ipocromica, incremento del numero dei reticolociti ed iperbilirubinemia indiretta, ipersideremia ed iperferritinemia conseguenti all'emolisi ed all'eritropoiesi inefficace; lo striscio di sangue periferico mostra alterazioni morfologiche dei globuli rossi, mentre all'elettroforesi dell'emoglobina si osserva solo HbA₂ e HbF (omozigosi per β^0 -talassemia) o HbA₂, F, ed A in quantità non superiore al 10-15% (omozigosi per β^+ -talassemia). Se il trattamento trasfusionale è appropriato, il bambino ha una fisionomia pressoché normale, poiché le trasfusioni ovviano alla necessità della proliferazione midollare prevenendo pertanto le modificazioni scheletriche. La mancata formazione di globuli rossi alterati, cioè resi rigidi dalla presenza di corpi inclusi costituiti da catene α libere, evita inoltre lo sviluppo della splenomegalia.

Nella **talassemia intermedia**, la quale è caratterizzata da un'anemia cronica di minor entità e, per definizione, non necessita di un regime trasfusionale regolare, le manifestazioni cliniche compaiono invece più tardivamente. Lo spettro clinico ed ematologico è estremamente eterogeneo, variando da forme del tutto asintomatiche a forme con un grado più o meno spiccato di

anemia per le quali si rende comunque necessaria una terapia trasfusionale.

Come già accennato in precedenza, la β -talassemia major non trattata è inevitabilmente fatale. I mezzi terapeutici oggi a nostra disposizione hanno contribuito non solo a determinare il prolungamento ed il miglioramento della qualità di vita dei pazienti ma anche ad eliminare o quasi le manifestazioni un tempo tipiche della malattia.

Le emotrasfusioni rappresentano storicamente il primo approccio terapeutico alla talassemia. Un programma trasfusionale ottimale dovrebbe mantenere livelli di emoglobina intorno a 9-10,5 g/dl prima della trasfusione e non superiore a 15 g/dl dopo la trasfusione. Gli scopi di tale terapia includono la correzione dell'anemia, la soppressione dell'eritropoiesi inefficace e l'inibizione dell'aumentato assorbimento gastrointestinale di ferro. La splenectomia si rende necessaria in alcuni casi quando il fabbisogno trasfusionale diventa eccessivo, cioè supera di 1,5 volte quello di un paziente già splenectomizzato.

I pazienti sottoposti a terapia trasfusionale cronica possono con maggiore facilità contrarre malattie infettive come l'epatite B

(HBV) e C (HCV), l'infezione da citomegalovirus e da virus dell'immunodeficienza umana (HIV); grazie alle vaccinazioni, le infezioni da HBV sono ormai rare, mentre le altre sono ancora frequenti.

La terapia emotrasfusionale determina inevitabilmente un sovraccarico di ferro che è la causa principale di morbidità e mortalità nei pazienti talassemici. Il progressivo accumulo di ferro introdotto con le trasfusioni determina, a partire dai 9-10 anni di età, una serie di complicanze multiorgano tali da richiedere una terapia ferro-chelante. Il nostro organismo infatti non possiede mezzi efficaci che impediscano l'accumulo del ferro in eccesso o ne garantiscano la sua eliminazione. Il processo di accumulo a livello tissutale avviene in modo lento e progressivo in tutti gli organi, perlopiù fegato, cuore e ghiandole endocrine ma con velocità molto diverse a seconda dell'organo coinvolto, ad esempio l'accumulo è più rapido nel fegato rispetto al cuore³.

L'introduzione dei chelanti del ferro intorno agli anni '70 ha prolungato notevolmente la sopravvivenza media dei pazienti⁴. Il farmaco più utilizzato per la sua comprovata efficacia ed il primo ad essere stato introdotto nell'uso clinico è la **deferoxamina**

(DFO)⁵, che è in grado sia di ridurre il sovraccarico marziale già presente che di ritardare la sua comparsa in pazienti regolarmente sottoposti a terapia trasfusionale. I meccanismi d'azione della DFO non sono completamente noti, ma appare agire sul ferro proveniente dalla ferritina (rilasciato dalle cellule reticoloendoteliali) e dell'emosiderina nei tessuti (ad esempio cuore e fegato). La DFO può essere associata a **deferiprone** (L1), il primo farmaco ferro-chelante somministrabile per os⁶. Questo farmaco è riservato ai pazienti con talassemia major per i quali la terapia con deferoxamina è controindicata o non è tollerata.

Deferoxamina e deferiprone sono paragonabili per quanto riguarda i livelli di ferritina sierica e la concentrazione media epatica di ferro⁷. Per contro, a livello cardiaco, il deferiprone si è rivelato più efficace della deferoxamina nella rimozione di ferro, valutato come miglioramento di T2* e della frazione di eiezione del ventricolo sinistro⁶. L'effetto collaterale più grave del deferiprone è rappresentato dall'agranulocitosi, con un'incidenza di 0,6/100 pazienti/anno⁸. Più recentemente è stato sviluppato **deferasirox**, un nuovo farmaco attivo per via orale con una lunga emivita (12-16 ore) in grado di garantire una copertura chelante continua e

costante nelle 24 ore. In termini di efficacia deferasirox è apparso sovrapponibile a deferoxamina nella rimozione del ferro epatico e nella riduzione della ferritinemia^{7,9}. Oltre ai benefici a livello epatico, il farmaco si è dimostrato efficace nel rimuovere e prevenire l'accumulo di ferro a livello miocardico¹⁰.

Vi sono diversi metodi per valutare i depositi di ferro (vedi tabella 1), suddivisi in metodi indiretti o diretti¹¹.

Tabella 1. Principali parametri di sovraccarico marziale e relative soglie nel paziente talassemico

Parametri	Normale	Entità del sovraccarico marziale		
		Lieve	Moderato	Severo
Ferritina sierica (ng/ml)	<300	>1000	<2500	>2500
LIC (mg Fe/g peso secco)	<1,8	3-7	>7	>15
T2* epatico[^] (ms)	>6,3	6,3-2,6	2,6-1,4	<1,4
T2* cardiaco[^] (ms)	>20	14-20	14-10	<10

[^]Dati derivati da RM a 1,5 Tesla

I metodi di misurazione indiretta hanno il vantaggio di essere di facile esecuzione ed a basso costo, tuttavia l'esperienza clinica ha dimostrato che sovente sono fallaci. La **ferritina sierica** è il metodo indiretto più utilizzato, nonostante vi siano numerose

condizioni cliniche (ad esempio epatopatie, infezioni, infiammazioni, emolisi, emocromatosi, deficit di vitamina C) che ne influenzano i livelli, indipendentemente dai depositi di ferro. E' pertanto necessario ripetere il dosaggio ad intervalli regolari e valutare l'andamento dei valori nell'arco di alcuni mesi.

La **saturazione della transferrina** corrisponde al rapporto tra la sideremia e la capacità della transferrina di legare il ferro. Negli stati di sovraccarico di ferro, la percentuale di saturazione della transferrina è in genere elevata (>50%). Tuttavia diversi fattori, quali infezioni ed infiammazioni, possono alterare tale percentuale che non riflette quantitativamente i depositi di ferro corporei.

La **risonanza magnetica (RM)** è una metodica non invasiva che sfrutta le proprietà paramagnetiche della ferritina e dell'emosiderina per la rilevazione dei depositi di ferro in diversi organi, quali fegato, cuore, pancreas e milza. Lo scanner della RM rilascia energia agli atomi di idrogeno presenti nei tessuti che, una volta terminata l'eccitazione, ritornano allo stato iniziale restituendo, a loro volta, l'energia accumulata. Le proprietà paramagnetiche di ferritina ed emosiderina legate al ferro influenzano il processo di decadimento di energia, secondo una

modalità che è concentrazione dipendente. La RM misura pertanto la concentrazione tissutale di ferro in maniera indiretta calcolando l'influenza paramagnetica dei depositi di ferro sul comportamento degli atomi di idrogeno presenti nei tessuti: una maggiore concentrazione di ferro si traduce in un riduzione del tempo di rilassamento con caduta del segnale RM proporzionale al sovraccarico marziale nel tessuto stesso. In base alla sequenza di impulsi, i.e., spin-echo o gradient echo, il tempo di rilassamento viene espresso in millisecondi (ms) come T2 e T2*, rispettivamente. Tali parametri possono inoltre essere convertiti in R2 e R2* ($R2 = 1.000/T2$; $R2^* = 1.000/T2^*$), espressi in secondi o Hertz. Questi ultimi a differenza di T2 e T2* sono direttamente proporzionali ai depositi di ferro e correlano significativamente con la misurazione della concentrazione del ferro intraepatico (LIC) mediante biopsia¹². A livello cardiaco l'accumulo di ferro è invece stimato mediante la valutazione di T2*, che è in grado di identificare i pazienti a rischio per insufficienza cardiaca ed aritmia¹³. Per tale motivo la determinazione del T2* cardiaco è ormai entrata nella pratica clinica per la valutazione dell'efficacia della terapia ferro-chelante.

La **misurazione della concentrazione del ferro intraepatico (LIC)** mediante biopsia rappresenta ad oggi lo standard di riferimento per il sovraccarico marziale a livello epatico ¹¹. Si tratta di un metodo diretto accurato, che tuttavia non è scevro di complicanze, ed i cui risultati possono essere influenzati dalla fibrosi¹⁴. E' stato inoltre evidenziato che la distribuzione dei depositi di ferro intraepatici non è uniforme già nelle fasi pre-cirrotiche limitando l'accuratezza delle misurazioni ottenute tramite biopsia¹⁵. Allo stato attuale si ritiene che livelli di ferro epatico inferiori a 7 mg/g di tessuto epatico (peso secco) comportino un basso rischio di alterazioni cardiache o epatiche. Per contro, livelli superiori a 15 mg/g di tessuto epatico (peso secco) sono associati a un rischio elevato di morte per eventi cardiaci¹⁶.

Infine, lo **SQUID (dispositivo semiconduttore a interferenza quantistica)** è una metodica diretta non invasiva in grado di misurare variazioni molto piccole di flusso magnetico, come quelle provocate dal ferro immagazzinato sotto forma di ferritina ed emosiderina nell'organismo¹⁷. La concentrazione del ferro viene valutata su una porzione di fegato non periferica ma centrale circa

10.000 volte più grande di quella esplorabile tramite biopsia¹⁸. La sua sensibilità e la non invasività ne fanno uno strumento molto promettente, anche se il limite principale è rappresentato dall'elevato costo e la scarsa disponibilità della strumentazione.

Complicanze endocrine

Negli ultimi tre decenni, la terapia trasfusionale e la costante ottimizzazione della terapia ferro-chelante hanno determinato un incremento progressivo della sopravvivenza media¹⁹ ed un miglioramento della qualità di vita dei pazienti affetti da talassemia major²⁰. Parallelamente, questo ha fatto sì che emergessero diverse patologie cronico-degenerative, tra cui quelle endocrine, prima non riconoscibili per la mortalità precoce di questi pazienti²¹. La causa principale delle endocrinopatie nel paziente talassemico è l'emosiderosi²², la quale danneggia il parenchima endocrino verosimilmente attraverso l'aumento della formazione di radicali liberi e la perossidazione dei lipidi con conseguente alterazione di strutture cellulari, quali le membrane mitocondriali, lisosomiali e citoplasmatiche²³. E' noto infatti che se la capacità di legame della transferrina sierica viene saturata, la frazione ferrosa libera si accumula nel plasma; quest'ultima può accelerare la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e favorire la captazione di ferro da parte degli organi ad elevata densità di recettori per la transferrina, quali fegato, cuore e

ghiandole endocrine. Gli effetti deleteri del sovraccarico marziale possono colpire tutte le ghiandole endocrine, compresi l'ipofisi, le gonadi, il pancreas e la tiroide, contribuendo ai molteplici deficit ormonali del paziente talassemico. La suscettibilità individuale al sovraccarico di ferro e la sensibilità delle cellule all'effetto di questo metallo possono almeno in parte spiegare la discrepanza esistente tra livelli di ferritina ed alterazioni della funzione endocrina nei singoli pazienti. Al danno endocrino partecipano inoltre l'ipossia tissutale²⁴, conseguente all'anemia cronica, e l'epatopatia associata all'emosiderosi o all'epatite cronica virale²⁵, quest'ultima complicanza delle trasfusioni effettuate in passato.

Le **alterazioni del metabolismo osseo** rappresentano l'endocrinopatia di più comune riscontro nella β -talassemia. Oltre il 50% dei pazienti adulti regolarmente trasfusi manifesta una riduzione patologica dei valori di densità minerale ossea alla DXA (Dual X-ray Absorptiometry)²⁶. I fattori che interferiscono con il metabolismo osseo sono diversi e perlopiù agiscono inibendo l'attivazione degli osteoblasti e/o incrementando la funzione degli osteoclasti. Eritropoiesi inefficace ed espansione midollare, sovraccarico marziale, deficit di calcio, zinco e vitamina D,

tossicità della deferoxamina ed altre complicanze endocrine (ipogonadismo, ipoparatiroidismo) tutti contribuiscono all'osteopatia talassemica. Un'altra complicanza endocrina estremamente frequente è il **difetto dell'asse ipotalamo-ipofisogonadi**. Nella maggior parte dei casi la funzionalità gonadica è compromessa per l'accumulo di ferro a livello ipofisario. Le cellule dell'ipofisi anteriore sono particolarmente sensibili allo stress ossidativo indotto dai radicali liberi e le cellule gonadotrope sembrano esserlo maggiormente rispetto agli altri stipiti cellulari. Nei pazienti affetti da talassemia major l'ipogonadismo ipogonadotropo appare correlato in particolare con l'inizio precoce della terapia trasfusionale e livelli di ferritina sierica di circa 2000 ng/ml²⁷. Per contro, nei pazienti affetti da talassemia intermedia l'ipogonadismo è associato ad un'elevata LIC²⁸, all'avanzare dell'età²⁹ ed al trattamento con idrossiurea³⁰. Il quadro clinico più frequente è rappresentato da uno sviluppo puberale ritardato o assente, con infantilismo genitale e mancata comparsa dei caratteri sessuali secondari²⁷. Una percentuale variabile di pazienti con uno sviluppo puberale spontaneo più o meno completo può poi andare incontro ad un deterioramento della funzione sessuale e

riproduttiva nel corso degli anni con perdita della libido, impotenza ed amenorrea secondaria³¹.

Un'altra alterazione endocrina di frequente riscontro è la **compromissione della funzione pancreatica**, che si instaura generalmente nella seconda decade di vita³². La progressione verso il diabete mellito nella beta-talassemia avviene per tappe: ad una prima fase di insulino-resistenza con iperinsulinemia compensatoria e normale tolleranza glucidica, segue la ridotta tolleranza glucidica, per esaurimento delle β -cellule e conseguente deficit di secrezione insulinica progressiva fino al diabete manifesto³³. E' quindi importante diagnosticare precocemente un'alterazione del metabolismo glucidico in quanto l'intensificazione della terapia ferro-chelante permette di ridurre il dosaggio della terapia insulinica necessaria ai pazienti diabetici, così come è in grado di prevenire l'insorgenza del diabete mellito se iniziata ad un'età precoce³⁴. I meccanismi patogenetici alla base del danno pancreatico non sono stati ancora completamente chiariti. Lo sviluppo di diabete mellito nei pazienti talassemici sottoposti ad un intenso regime trasfusionale appare correlato principalmente all'effetto tossico del sovraccarico marziale a

livello della β -cellula con conseguente deficit insulinico. Infatti il danno ossidativo da deposito di ferro causa un'inflammatione cronica della β -cellula con conseguente fibrosi. Il danno a carico della membrana cellulare probabilmente scatena la risposta autoimmunitaria, responsabile a sua volta del deficit di secrezione insulinica³⁵. Rilevante è anche il danno epatico, sia da accumulo di ferro che da infezioni virali post-trasfusionali, che determina un'ulteriore compromissione del compenso glicemico. Infine, predisposizione genetica allo sviluppo di diabete mellito e compliance alla terapia ferro-chelante svolgono anch'esse un ruolo nell'insorgenza di alterazioni del metabolismo glucidico.

L'**ipostaturismo** è un'altra caratteristica clinica di comune osservazione nei pazienti affetti da β -talassemia. La secrezione di ormone della crescita (GH) risulta variabilmente compromessa nei bambini e adolescenti, in base ai risultati ottenuti su piccoli gruppi di pazienti trattati con regimi trasfusionali e terapia ferro-chelante diversi tra loro³⁶. Per quanto riguarda la popolazione adulta, studi recenti documentano un'elevata prevalenza del deficit di GH che si attesterebbe intorno al 20-30%²⁶. Oltre alla secrezione di GH, anche la secrezione di somatomedina C (o IGF-1), il mediatore di

gran parte degli effetti biologici del GH, e della sua binding protein IGFBP-3 è spesso ridotta, verosimilmente per il danno epatico.

Anche la funzione tiroidea può risultare compromessa e l'**ipotiroidismo primario** associato ad anticorpi antitiroidei negativi rappresenta la forma di gran lunga più frequente di danno dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (colpisce fino al 30% dei pazienti con talassemia)³⁷. L'**ipotiroidismo secondario**, seppur raro, è stato riscontrato con maggiore frequenza negli ultimi anni, in particolare nei pazienti di età più adulta³⁸. Nei pazienti talassemici può esservi anche una tireopatia iatrogena da farmaci quali amiodarone o interferone, utilizzati rispettivamente nella cardiomiopatia e nell'epatopatia del paziente talassemico.

Altra condizione di frequente riscontro è l'**ipocalcemia** caratterizzata da un'etiopatogenesi multifattoriale. Le cause più comuni sono l'ipoparatiroidismo, il deficit di vitamina D, il danno epatico cronico che impedisce l'idrossilazione della vitamina D, l'espansione midollare e la riduzione della massa ossea e del contenuto midollare. L'ipoparatiroidismo, in particolare, insorge nella seconda decade di vita e si verifica nel 6-13% dei pazienti

talassemici^{27,39}. La ridotta secrezione di paratormone sembra essere dovuta da un lato all'accumulo di ferro a livello ghiandolare e dall'altro al riassorbimento osseo secondario all'espansione midollare per eritropoiesi inefficace ed anemia cronica.

Disfunzione surrenalica nella β -talassemia

La patologia surrenalica nei pazienti talassemici è stata oggetto di pochi studi sino ad ora (vedi tabella 2).

Tabella 2. Studi sull'insufficienza corticosurrenalica in pazienti β -talassemici[∞]

Autore	Pz (n°)	Talassemia	Età (range aa)	Test	Cut-off (cortisolo sierico)	Insufficienza surrenalica
Masala, 1984	20	Major	6-10	ACTH 250 μ g	Non riportato	Non riportato
Bisbocci, 1989	14	Major (70%)	12-28	ACTH 5 μ g	Incremento assoluto inferiore a 3 DS il range di normalità	42,8%
		Intermedia [∞] (30%)		ACTH 250 μ g		0%
		ITT		33,3%		
Danesi, 1992	12	Major	17-24	ITT	Non riportato	Non riportato
				CRH		
Svrvatsa, 2005	20	Major	10-20	ACTH 1 μ g	<18 μ g/dl (500 nmol/l)	5%
				ACTH 250 μ g		5%
Jaruratanasirikul*, 2007	48	Major	8-25	ACTH 1 μ g	picco<18 μ g/dl (500 nmol/l)	45,8%
Scacchi, 2010	56	Major (80%)	18-50	ACTH 1 μ g	picco<18 μ g/dl (500 nmol/l)	32,1%
		Intermedia (20%)		ACTH 250 μ g in 8 ore		16,6%
Poomthavorn*, 2010	56	Major	6-13	ACTH 1 μ g	picco<16 μ g/dl (440 nmol/l)	53,6%
De Sanctis, 2011	25	Major	25-53	Glucagone	picco<21 μ g/dl (599 nmol/l)	72%
Elsedfy, 2011	45	Major	12-20	ACTH 250 μ g	picco<18 μ g/dl (500 nmol/l)	15,5%
Soliman, 2013	23	Major	8-26	ACTH 1 μ g	picco<15 μ g/dl (420 nmol/l)	30,4%
					picco<20 μ g/dl (550 nmol/l)	86,9%
				ACTH 250 μ g	picco<15 μ g/dl (420 nmol/l)	21,7%
					picco<20 μ g/dl (550 nmol/l)	52,1%
Huang*, 2015	18	Major	9-28	Glucagone	picco<18 μ g/dl (500 nmol/l)	61%
Uçar, 2016	121	Major	6-17	ACTH 1 μ g	picco<18 μ g/dl (500 nmol/l)	32,2%

[∞] Pazienti con talassemia intermedia politrasfusi

[∞] Sono riportati studi con almeno 10 pazienti

[^] Cortisolo in basale

* Nella casistica presenti pazienti affetti da HbE/ β -talassemia, HbH e Hb di Bart

Gli studi pubblicati riportano una prevalenza di insufficienza corticosurrenalica estremamente variabile, dallo 0% ad oltre l'80%, in rapporto al grado di sovraccarico marziale ed alle metodiche diagnostiche utilizzate.

Questi sono stati condotti in bambini e/o adolescenti e hanno evidenziato una ridotta riserva corticosurrenalica dopo stimolo a fronte di una sostanziale normalità dell'asse ipotalamo-ipofisurrene (HPA) in condizioni basali^{40,41}. Peraltro, il riscontro di elevati valori basali di ACTH in giovani talassemici è frequente in letteratura⁴², ciò a suggerire una possibile condizione di ipocorticosurrenalismo subclinico, quadro che potrebbe diventare clinicamente rilevante in caso di eventi "stressanti".

Per quanto riguarda il paziente talassemico adulto, solo tre studi ad oggi ne hanno valutato la funzione corticosurrenalica⁴³⁻⁴⁵. In analogia con quanto già osservato nei bambini e/o adolescenti, il nostro gruppo di ricerca ha documentato nei primi anni novanta un'aumentata risposta di ACTH associata ad una ridotta risposta di cortisolo al test di stimolo con CRH e all'ipoglicemia insulinica in un piccolo gruppo di adulti affetti da talassemia major⁴³. Un successivo studio, sempre del nostro gruppo, ha indagato la

funzione dell'asse HPA in 56 pazienti adulti affetti sia da β -talassemia major che intermedia⁴⁴. Una risposta deficitaria del cortisolo sierico è stata documentata nel 32% dei pazienti dopo test di stimolo con 1 μ g di ACTH in bolo e nel 17% dopo 250 μ g di ACTH infusi nell'arco di 8 ore. A sostegno di una condizione di insufficienza corticosurrenalica subclinica evidenziata dai test di stimolo, il 15% dei pazienti ha mostrato livelli basali di ACTH superiori alla norma in presenza di normali valori di cortisolo sierico del mattino e di cortisoluria nelle 24 ore. E' stata inoltre evidenziata una correlazione negativa tra i valori basali di ACTH e la risposta cortisolemica ai test di stimolo mentre nessuna correlazione è stata osservata tra quest'ultima ed i valori di ferritina o l'età dei pazienti.

Un'elevata prevalenza di ipocorticosurrenalismo è stata più recentemente confermata in uno studio multicentrico condotto su 25 pazienti adulti affetti da talassemia major⁴⁵. Il 72% dei pazienti ha mostrato una ridotta risposta cortisolemica al test di stimolo con glucagone considerando, tuttavia, un criterio di normalità piuttosto elevato, i.e., 21 μ g/dl.

Questi dati mettono in evidenza che i diversi approcci diagnostici utilizzati per porre diagnosi di ipocorticosurrenalismo possono divergere nell'esito, specie per le forme subcliniche. In questo contesto va ricordato che il test più accurato per porre diagnosi di ipocorticosurrenalismo, il **test all'ipoglicemia insulinica (ITT)**⁴⁶, è di difficile attuazione in pazienti pluricomplicati quali i talassemici. In alternativa all'ITT, possono essere utilizzati il **test di stimolo con ACTH**, a dose standard (250 µg) o bassa (1 µg)⁴⁷, o il **test di stimolo con glucagone**, quest'ultimo, tuttavia, non ancora universalmente validato⁴⁸. Per quanto riguarda il test di stimolo con ACTH dati contrastanti sono presenti in letteratura su quale dose sia la migliore in termini di accuratezza diagnostica. E' noto infatti che le dosi standard di ACTH, i.e., 250 µg, elicitino una risposta sovrafisiologica da parte dei surreni⁴⁹ compromettendo pertanto la sensibilità del test. Tale riscontro è peraltro corroborato da una recente metanalisi che ha rilevato la superiorità del test con ACTH ad 1 µg rispetto a quello con 250 µg⁵⁰.

Tutti i test soprariportati richiedono la misurazione delle concentrazioni sieriche di cortisolo le quali possono però essere

influenzate da alterazioni della concentrazione della transcortina o corticosteroid-binding globulin (CBG), una glicoproteina secreta dal fegato.

In alternativa alla misurazione nel siero, il cortisolo può essere misurato nelle urine delle 24 ore (**cortisolo libero urinario**, CLU), una misura integrata della frazione libera del cortisolo che tuttavia non trova particolare indicazione nella diagnosi di ipocorticosurrenalismo, oppure nella saliva, anch'essa riflesso della frazione libera dell'ormone e non influenzata da modificazioni della CBG. I punti di forza della determinazione del **cortisolo nella saliva** sono rappresentati dalla semplicità di esecuzione della raccolta, dalla non invasività dell'esame e dalla possibilità di conservare il campione a lungo, anche a temperatura ambiente. Negli anni ottanta il cortisolo salivare è stato proposto come alternativa al cortisolo sierico nella valutazione dell'asse HPA ed è oggi riconosciuto come uno dei tre esami di riferimento nello screening dell'ipercortisolismo endogeno⁵¹. Il passaggio del cortisolo libero dal siero alla saliva avviene principalmente attraverso due meccanismi: la diffusione intracellulare e l'ultrafiltrazione. E' stato dimostrato che ad un aumento della

concentrazione di cortisolo sierico corrisponde, dopo pochi minuti, un aumento della concentrazione di cortisolo salivare, quest'ultima peraltro non influenzata dalla velocità di produzione della saliva⁵². Diversi studi hanno rilevato una correlazione significativa tra cortisolo sierico totale e salivare sia in condizioni basali che dopo test di stimolo^{53,54}. Per quanto concerne la diagnosi di ipocorticosurrenalismo, la sensibilità e la specificità del cortisolo salivare dopo ITT o stimolazione con ACTH a dosi standard sono risultate pressoché sovrapponibili a quelle ottenute con il dosaggio del cortisolo nel siero⁵⁵. Il cortisolo salivare è inoltre da preferire in tutte quelle condizioni che comportano un'alterazione dei livelli di CBG e possono essere pertanto causa di errate diagnosi in caso di esclusiva valutazione del cortisolo sierico⁵⁶. L'assunzione di estrogeni per via orale aumenta, ad esempio, i livelli di CBG⁵⁷ mentre la presenza di insufficienza epatica o renale sembra ridurre i valori⁵⁸, rendendo di conseguenza difficile la corretta interpretazione dei valori di cortisolo sierico.

Una funzione surrenalica ridotta può avere svariate ricadute cliniche nel paziente talassemico, sia in acuzie, e.g., ridotta risposta agli stress, che in cronico. Il quadro clinico di

quest'ultimo, in particolare, risulta spesso sfumato e caratterizzato da sintomi e segni aspecifici, quali affaticamento, dolore muscolo-scheletrico diffuso, perdita di peso, ipotensione ortostatica, dolore addominale, depressione ed ansia, che rendono complesso un corretto inquadramento diagnostico. Tra gli esami ematochimici di routine va sempre ricercata l'eventuale presenza di alterazioni elettrolitiche, quali iponatriemia e/o iperpotassiemia, del metabolismo glucidico, quali ipoglicemia, quest'ultima particolarmente frequente in età infantile; più raro è il riscontro di eosinofilia. La sintomatologia derivante da tali alterazioni può influenzare negativamente la qualità di vita dei pazienti affetti da insufficienza corticosurrenalica che, qualunque ne sia l'origine, presentano non solo una compromissione della stessa⁵⁹ ma anche un elevato rischio di mortalità⁶⁰. La qualità di vita del paziente talassemico è già di per sé ridotta dalla malattia ematologica di base⁶¹, ma resta da stabilire il possibile impatto dell'ipocorticosurrenalismo. L'impiego dell'SF-36, il questionario per la valutazione della qualità della vita correlata alla salute più utilizzato e comprensivo di otto scale in grado di misurare la salute sia fisica che mentale, ha permesso di evidenziare in pazienti

affetti da ipocorticosurrenalismo un coinvolgimento di tutte le scale analizzate e, in particolare, un significativo peggioramento in termini di salute in generale, ruolo e salute fisica, vitalità^{59,62,63}.

Per quanto concerne gli esami strumentali che indagano i danni da sovraccarico marziale a carico di ipofisi e surrene, entrambi possibili sedi d'origine dell'ipocorticosurrenalismo, gli studi sino ad ora pubblicati appaiono promettenti ma sono ancora di carattere sperimentale^{67,77,78}. E' interessante notare come il parenchima ipofisario inizi ad accumulare ferro già a partire dalla prima decade di vita ma è solamente con la seconda che la riduzione del volume ghiandolare diventa evidente⁶⁴. Il volume ed i valori di R2 o T2* ipofisari rappresentano degli affidabili marker di sovraccarico marziale e possono essere utilizzati come "predittori" indiretti dell'insorgenza di un'ipofunzione anteroipofisaria^{64,65}. L'R2 o il T2* ipofisari correlano inoltre con i valori di ferritina sierica, LIC ed i corrispettivi parametri di deposito di ferro di altri sedi dell'organismo, quali fegato e cuore^{64,66}.

Solo due studi hanno ad oggi valutato il sovraccarico marziale a livello surrenalico mediante RM^{67,68}. Nello studio più recente, eseguito attraverso l'utilizzo di una RM a 3 Tesla, è stata osservata

una differenza significativa in termini di T2* surrenalico tra pazienti talassemici e gruppo di controllo sano così come si è osservata una correlazione positiva tra T2* surrenalico e cardiaco. Nessuna correlazione è stata invece rilevata tra valori di T2* surrenalico e ferritina sierica così come tra T2* surrenalico e T2* epatico⁶⁸. Per contro, nell'altro studio, una correlazione tra parametri strumentali di sovraccarico marziale a livello surrenalico ed epatico è stata rilevata mediante l'uso di una RM a 1.5 Tesla⁶⁷.

SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio si propone i seguenti obiettivi:

- stimare la prevalenza dell'ipocorticosurrenalismo in un'ampia casistica di pazienti adulti affetti da talassemia major
- valutare l'utilità di parametri cortisolemici alternativi, i.e., cortisolo salivare dopo stimolo nella diagnosi di ipocorticosurrenalismo
- approfondire i meccanismi patogenetici alla base del deficit corticosurrenalico, studiando la possibile correlazione tra funzione corticosurrenalica e parametri di sovraccarico marziale e stato ipossico
- studiare se vi è un'associazione tra qualità di vita dei pazienti talassemici e funzionalità dell'asse HPA

PAZIENTI E METODI

Sono stati arruolati 72 pazienti affetti da β -talassemia major afferenti ai reparti di Medicina Generale ad Indirizzo Endocrino-Metabolico dell'Istituto Auxologico Italiano di Milano, di Medicina Interna della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e di Oncoematologia Pediatrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia.

Quarantaquattro donne e ventotto uomini di età compresa tra i 25 ed i 60 anni sono stati sottoposti ad esami ematochimici di routine per la malattia ematologica di base e ad esami strumentali per la stadiazione del sovraccarico marziale. La concentrazione di ferro intraepatico (LIC) è stato stimato a partire dai valori di T2* epatico rilevati alla risonanza magnetica (Scanner MRI 1.5 Tesla Avanto Siemens, Enlargen - software CMR Tools, Imperial College, London) mediante la formula $[1/(T2^*/1000)] \times 0,0254 + 0,202^{69}$.

Parallelamente, sono stati valutati parametri ormonali basali e la qualità di vita mediante il questionario SF36⁷⁰ (vedi tabella 3).

Tabella 3. Valutazioni eseguite nel corso del studio

Esami ematochimici generali	<ul style="list-style-type: none">• Emocromo• Colinesterasi• Proteine totali ed albumina• Glicemia e fruttosamina• Sodio e potassio• Creatinina e clearance della creatinina• Ferritina
Esami ormonali relativi all'asse ipofisi-surrene	<ul style="list-style-type: none">• ACTH su due punti*• Cortisolo salivare e sierico del mattino (ore 8)• Cortisolo libero urinario e creatininuria su due raccolte delle 24 ore• Cortisol-binding globulin (CBG)• Cortisolo sierico e salivare dopo test di stimolo con 1 µg di ACTH 1-24
Altri esami ormonali	<ul style="list-style-type: none">• Prolattina su due punti*• IGF-1• TSH, FT4
Esami strumentali	<ul style="list-style-type: none">• Quantificazione del sovraccarico di ferro tramite risonanza magnetica a livello epatico (LIC e T2 star) e cardiaco (T2 star)
Valutazione della qualità di vita	<ul style="list-style-type: none">• Compilazione del questionario Short Form-36 Health Survey (SF-36)

* Eseguiti in condizioni senza stress

Al momento dello studio tutti i pazienti presentavano valori di emoglobina pre-trasfusionale superiori ai 7,5 g/dl in corso di regime trasfusionale stabile e trattamento ferro-chelante, ed una normale funzione tiroidea e/o gonadica, grazie ad adeguata terapia ormonale sostitutiva ove necessario. Nessun paziente era affetto da grave epatopatia o aveva fatto uso di terapia steroidea nei sei mesi

precedenti la valutazione. Tra i 72 pazienti arruolati 28 erano stati sottoposti ad intervento di splenectomia, 27 presentavano un'infezione cronica da HCV e 2 un'infezione da HCV associata a HBV. Un trattamento ferro-chelante con deferasirox, da solo o in associazione con deferoxamina, è stato registrato in oltre la metà dei pazienti in studio mentre una quota minore stava assumendo deferoxamina o deferiprone in monoterapia. Per quanto riguarda la terapia ormonale sostitutiva 36 su 44 pazienti erano in terapia con estroprogestinico, equamente suddivisi nelle formulazioni per os e per via transdermica.

Infine, 25 adulti sani, di pari età e sesso rispetto ai pazienti talassemici, sono stati arruolati come controlli per la determinazione dei valori normali di CBG.

Valutazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Prelievi basali per ACTH, cortisolo e CBG sono stati effettuati in tutti i pazienti arruolati che erano stati istruiti a consegnare, nel giorno della valutazione, due raccolte urine delle 24 ore per cortisolo libero urinario e creatininuria.

La riserva corticosurrenalica è stata valutata mediante

somministrazione per via endovenosa di un bolo di 1 μg di ACTH 1-24 (Synachten, Sigma-tau, Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Roma, Italia). Sono stati effettuati prelievi ematici per il dosaggio di cortisolo in condizioni basali e dopo 30, 60, e 90 minuti dall'iniezione del farmaco. Agli stessi tempi è stata raccolta saliva mediante Salivette. Il test è stato eseguito dopo un'astensione dal fumo ed un digiuno da cibo e bevande (ad eccezione di acqua) nelle due ore precedenti.

Valori di cortisolo sierico dopo test di stimolo inferiori a 18 $\mu\text{g}/\text{dl}$ sono stati considerati indicativi della presenza di ridotta riserva surrenalica⁷¹.

Le concentrazioni sieriche di tutti gli ormoni ed urinarie di cortisolo sono state determinate mediante Elettro Chemiluminescenza (ECLIA) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) mentre quelle sieriche di CBG sono state valutate mediante saggio immunoenzimatico (ELISA) (Elabscience Biotechnology, Bethesda, Maryland, Stati Uniti).

Per quanto concerne i dosaggi degli ormoni dell'asse HPA il limite di sensibilità inferiore era di 1 pg/ml per l'ACTH, 0,018 $\mu\text{g}/\text{dl}$ per il cortisolo sierico, urinario e salivare, 3,75 ng/ml per CBG. I

coefficienti di variazione intra ed interdosaggio erano 2,9% e 5,4%, 1,7% e 2,2%, 2,3% e 3,2%, 2,8% e 4,1% per ACTH, cortisolo sierico, urinario e salivare, rispettivamente.

I valori di riferimento del nostro laboratorio erano 10-50 pg/ml per l'ACTH, 5-25 µg/dl per il cortisolo sierico e 17-136 µg/24h per il cortisolo libero urinario.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante un software disponibile in commercio (StatView, Abacus Concepts, Berkeley, USA).

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard (ES). I valori basali di ACTH, cortisolo sierico e prolattina sono rappresentati come la media di due determinazioni eseguite a distanza di 20 minuti l'una dall'altra mentre i valori di cortisolo libero urinario sono espressione della media di due raccolte urinarie delle 24 ore.

Per le differenze tra i gruppi è stato utilizzato il test di Mann-Whitney per dati non appaiati mentre per la valutazione dell'associazione tra variabili è stata eseguita un'analisi di

regressione lineare. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

La curva Receiver Operator Characteristic (ROC), come grafico delle sensibilità e del complemento a 1 della specificità misurata a diversi livelli di soglia per un definito test, e l'indice di Youden (J)⁷² sono stati utilizzati per valutare l'efficienza diagnostica del cortisolo salivare.

RISULTATI

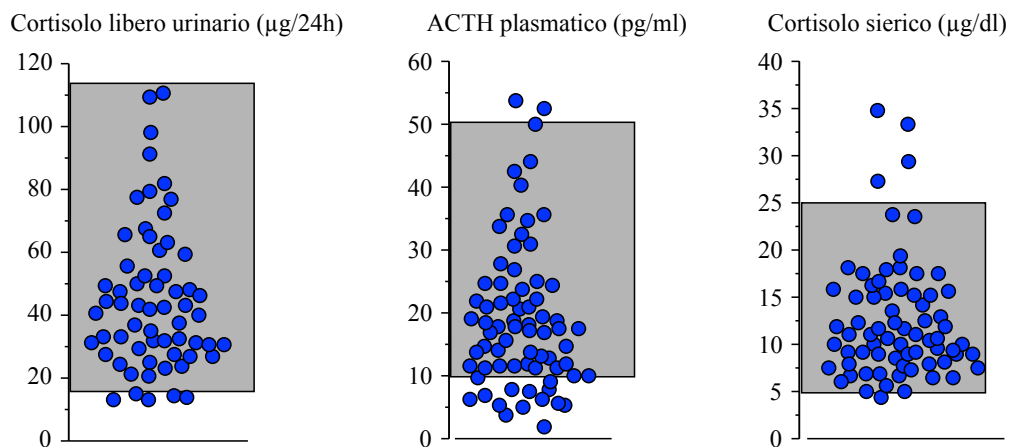
I dati demografici, gli indicatori biochimici e strumentali della malattia ematologica di base e di sovraccarico marziale, così come la funzione tiroidea, i livelli di prolattina e IGF-1 sono illustrati nella tabella 4.

Tabella 4. Dati demografici, indicatori biochimici e strumentali della malattia ematologica di base e di sovraccarico marziale, funzione tiroidea, livelli di prolattina e IGF-1

72 pazienti (44 donne – 28 uomini)	Media ± ES	Range di normalità
Età (aa)	40 ± 1,00	
BMI (kg/mq)	23 ± 0,39	18-25
Emoglobina (g/dl)	10 ± 0,15	13,8-18
Albumina (g/dl)	4 ± 0,06	3,2-5,2
AST (U/l)	31 ± 3,00	<40
ALT (U/l)	34 ± 4,50	<40
Creatinina (mg/dl)	1 ± 0,03	0,4-1,5
Sodio (mmol/l)	140 ± 0,34	136-147
Potassio (mmol/l)	4 ± 0,05	3,5-5,4
Ferritina (µg/l)	1226 ± 224,10	30-400
LIC (Fe/g di peso secco)	5 ± 0,56	<1,8
T2* epatico (ms)	10 ± 1,00	>6,3
T2* cardiaco (ms)	35 ± 1,70	>20
Fruttosamina (µmol/l)	299 ± 11,29	50-285
TSH (mU/l)	3 ± 0,18	0,27-4,5
FT4 (pmol/l)	17 ± 0,45	11,5-24,5
IGF-1 (µg/l)	79 ± 5,18	80-344
Prolattina (µg/l)	10 ± 0,73	2,5-17

I valori basali di cortisolo sierico e CLU sono apparsi inferiori ai limiti di norma (i.e., $<5 \mu\text{g}/\text{dl}$ e $<17 \mu\text{g}/24 \text{ ore}$) in 2 e 5 pazienti, rispettivamente. Uno di questi pazienti presentava inoltre valori ridotti di entrambi e bassi valori di ACTH (i.e., $<10 \text{ pg}/\text{ml}$). Per quanto concerne i valori di ACTH altri 14 pazienti mostravano valori bassi mentre valori superiori ai limiti di norma sono stati rilevati in 3 pazienti (50,1, 52,5 e 53,6 pg/ml , rispettivamente) (vedi figura 1).

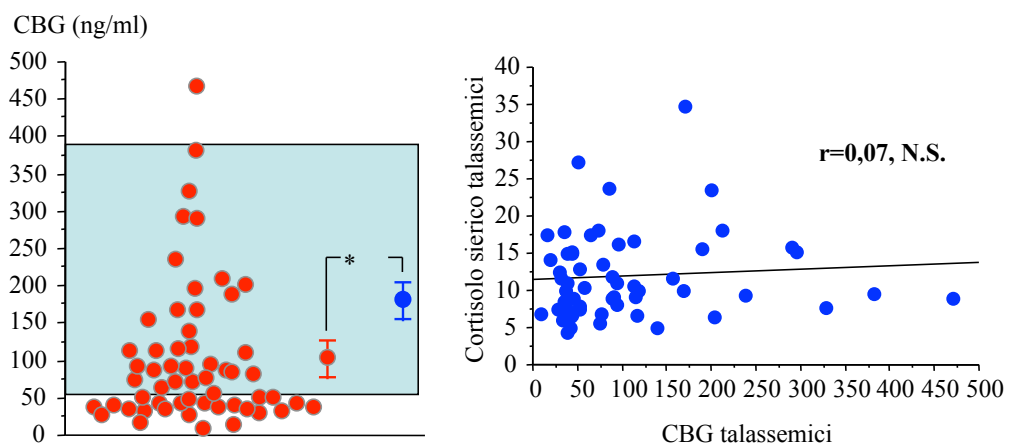
Figura 1. Valutazioni basali HPA



I valori basali di CBG nei pazienti talassemici, pur rientrando nella normalità, sono apparsi significativamente inferiori a quelli dei soggetti sani di controllo ($106,16 \pm 12,7$ vs $188,21 \pm 25,5 \text{ ng}/\text{ml}$,

$p < 0,001$). Una correlazione tra valori basali di CBG e cortisolo è stata osservata nei controlli sani ma non nei pazienti talassemici (vedi figura 2).

Figura 2. CBG e correlazioni con cortisolo



Nessuna differenza significativa in termini di CBG è stata riscontrata tra pazienti in terapia estroprogestinica e non ($102,3 \pm 19,28$ vs $113,7 \pm 35,07$ ng/ml, NS). I livelli di CBG non sono apparsi inoltre influenzati dalla modalità di assunzione della terapia estroprogestinica, i.e., per os o via transdermica ($71,8 \pm 37,63$ per os vs $125,5 \pm 21,62$ ng/ml per via transdermica, NS).

I valori di cortisolo salivare sono aumentati in maniera parallela a quelli di cortisolo sierico dopo stimolo con ACTH (vedi figura 3)

ed una correlazione positiva tra i livelli dei due analiti è stata rilevata sia in basale che al picco ed a tutti i tempi del test ($r=0,28$, $p<0,05$ in basale; $r=0,38$, $p<0,005$ al picco; $r=0,61$, $p<0,001$ a 90 minuti) (vedi figura 3 e 4).

Figura 3. Risposta del cortisolo al test di stimolo con ACTH e correlazione tra i picchi di cortisolo sierico e salivare

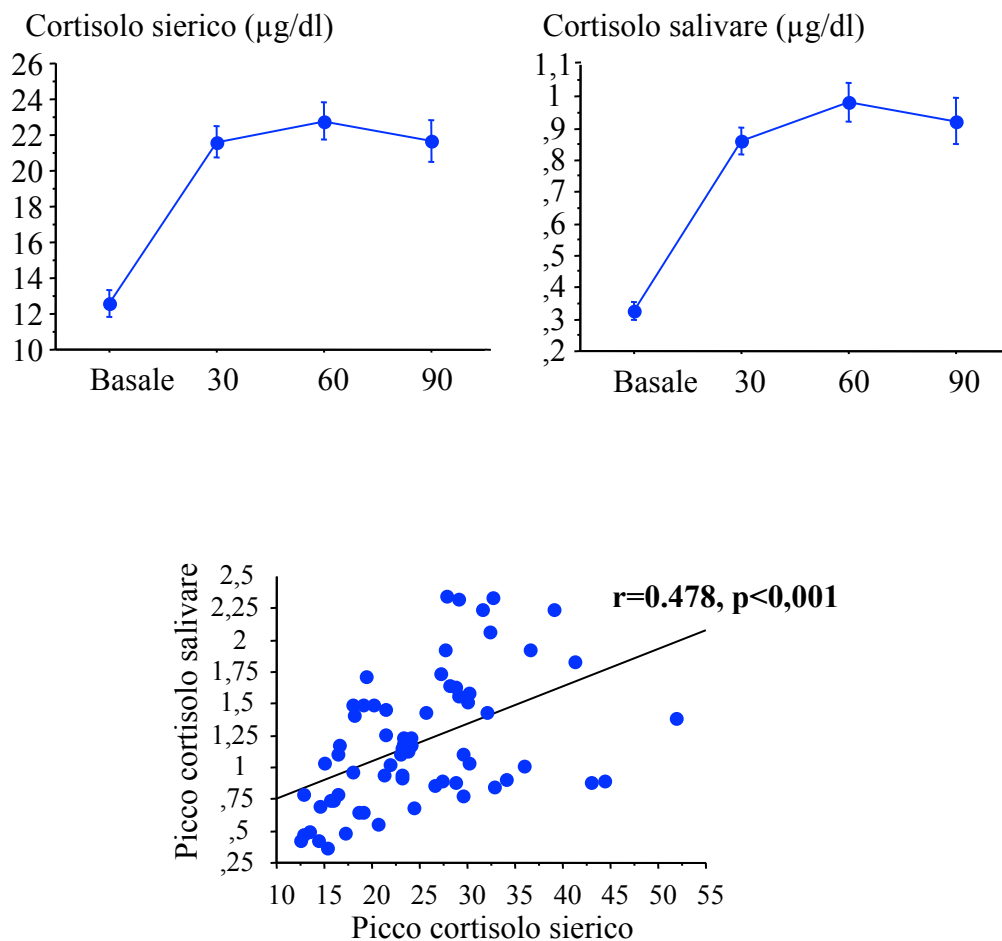
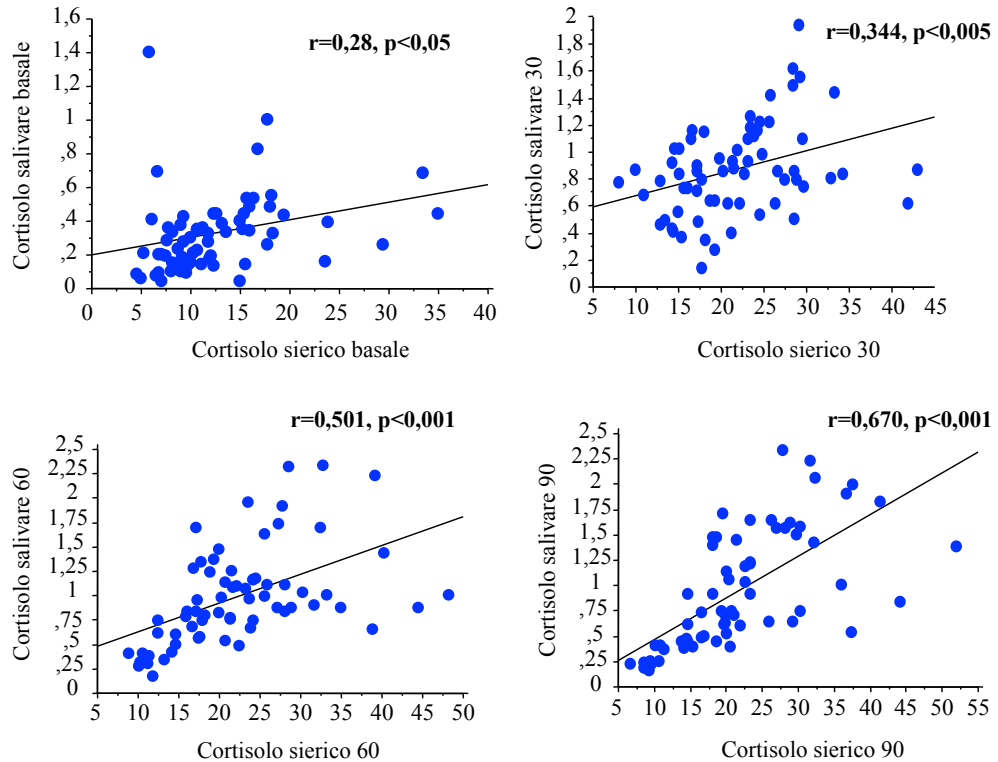


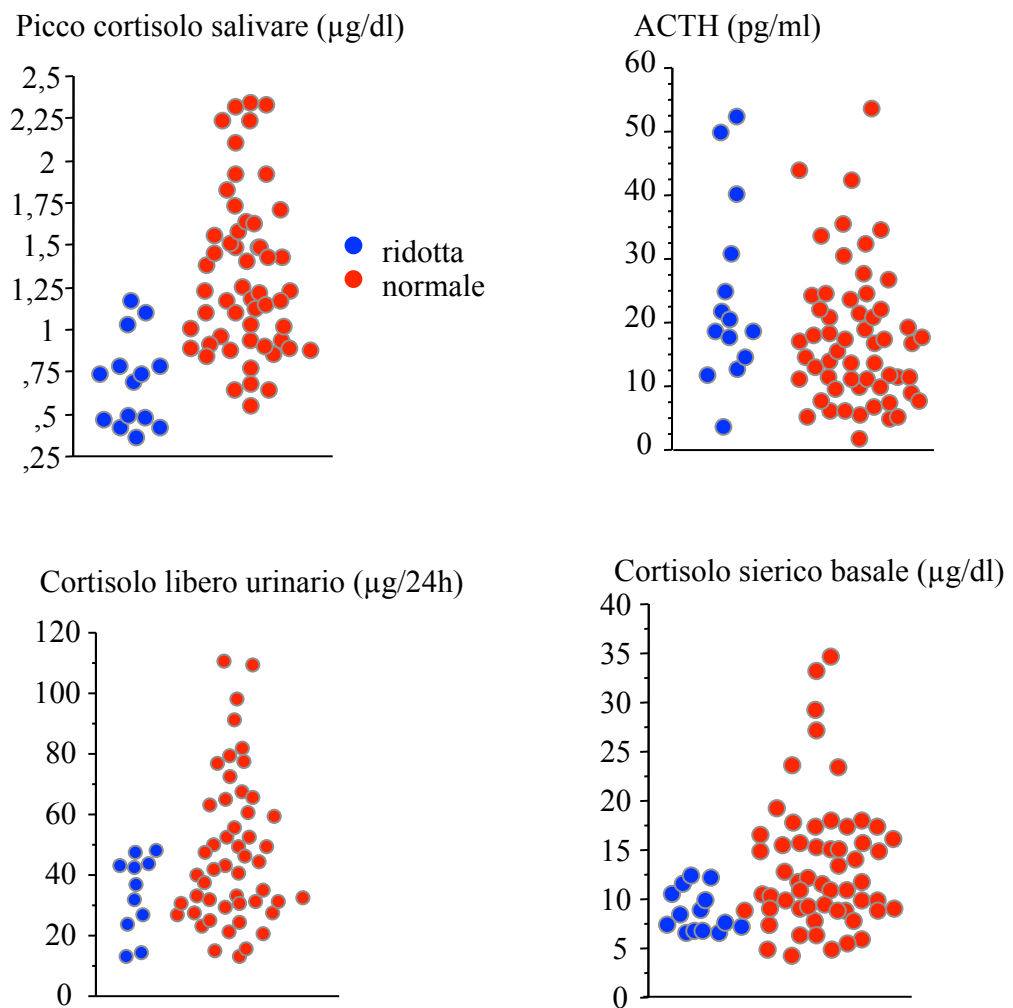
Figura 4. Correlazione tra cortisolo sierico e salivare in basale ed ai vari tempi del test di stimolo



Una risposta deficitaria del cortisolo sierico al test di stimolo con 1 μg di ACTH è stata documentata in 14 pazienti (19%). In media, i pazienti con ridotta riserva corticosurrenalica presentavano valori basali di ACTH tendenzialmente più elevati rispetto ai normoresponsivi ($24,2 \pm 3,84$ vs $17,8 \pm 1,42$ pg/ml, $p<0,064$; figura 5). Una differenza significativa è stata osservata tra valori basali di cortisolo sierico in pazienti con riserva corticosurrenalica ridotta o preservata ($8 \pm 0,57$ vs $13,5 \pm 0,88$ $\mu\text{g}/\text{dl}$, $p<0,01$; figura

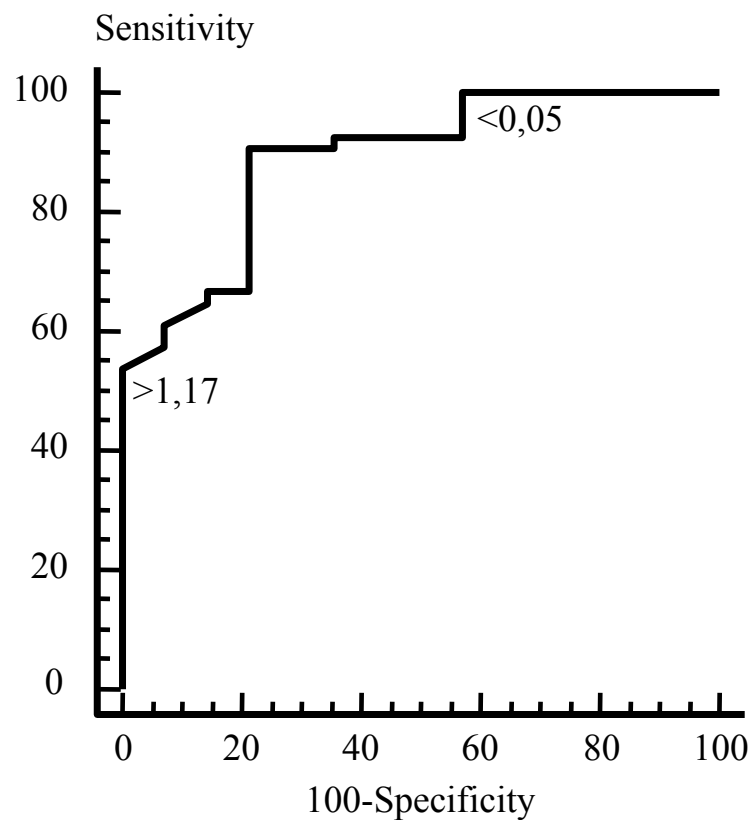
5). Anche il picco del cortisolo salivare è risultato più basso nei pazienti con ridotta riserva surrenalica ($0,7 \pm 0,29$ vs $1,3 \pm 0,47$ $\mu\text{g}/\text{dl}$, $p < 0,005$; figura 5). Nessuna differenza è stata rilevata in termini di età ($37,9 \pm 1,72$ vs $40,6 \pm 1,03$ anni, NS), quadro elettrolitico, glicemia e valori basali di CBG ($85,1 \pm 25,56$ vs $112,3 \pm 15$ ng/ml, NS) tra i due gruppi.

Figura 5. Differenze tra ridotta riserva corticosurrenalica e conservata



Dall'analisi bayesiana della curva ROC un picco del cortisolo salivare superiore a 0,79 $\mu\text{g}/\text{dl}$ discriminava, con buona accuratezza diagnostica, i pazienti affetti e non da insufficienza corticosurrenalica (sensibilità 90% e specificità 78%) (figura 6). Complessivamente, lo Youden index (J) era pari a 0,693 (intervallo di confidenza al 95%: 0,474; 0,855). Una sensibilità del 100% veniva ottenuta da un picco del cortisolo salivare superiore a 0,5 $\mu\text{g}/\text{dl}$, a scapito, tuttavia, di una bassa specificità (42%) (vedi figura 6).

Figura 6. Curva ROC del picco del cortisolo salivare dopo test di stimolo con ACTH



I valori di cortisolo sierico in condizioni basali e dopo test di stimolo sono apparsi significativamente più elevati nelle pazienti in terapia estroprogestinica rispetto a quelle non in trattamento ($15,25 \pm 1,35$ vs $10 \pm 2,12$ $\mu\text{g/dl}$, $p < 0,03$; $28,9 \pm 22,8 \pm 2,47$ $\mu\text{g/dl}$, $p < 0,03$), con una normale riserva corticosurrenalica presente nel

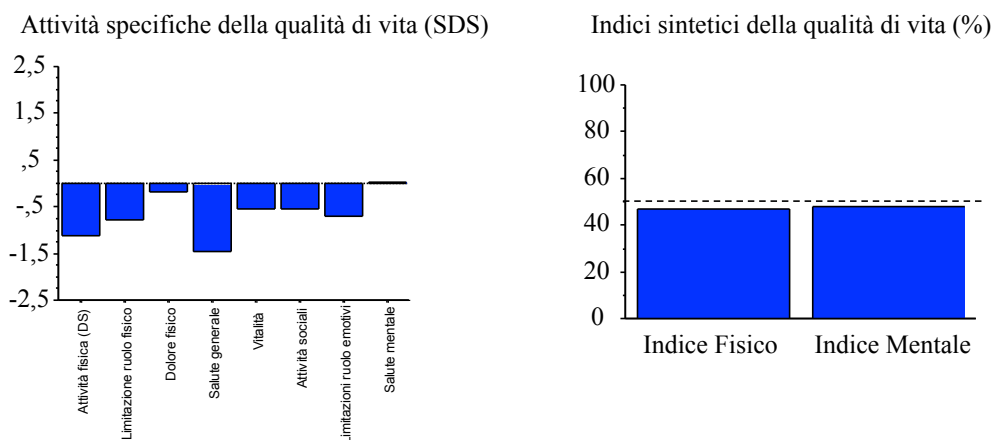
92% delle pazienti in terapia estroprogestinica rispetto al 62% di quelle senza terapia estroprogestinica.

Nessuno tra gli indicatori biochimici e strumentali della malattia ematologica e del sovraccarico marziale è apparso correlato ai parametri di funzione corticosurrenalica indagati.

Infine, la qualità di vita dei pazienti talassemici è apparsa in generale compromessa sia in termini di salute fisica che mentale.

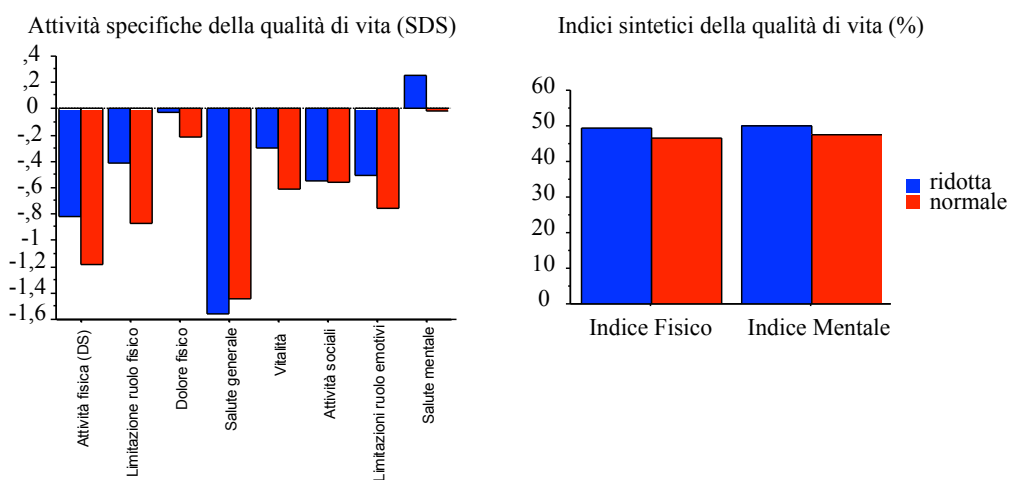
Le scale dell'SF-36 maggiormente colpite sono risultate salute in generale, attività fisica, limitazione nelle attività legate al proprio ruolo dovute a problemi di salute fisica ed emotivi (vedi figura 7).

Figura 7. Qualità della vita nei pazienti talassemici



Nessuna correlazione è stata riscontrata tra i parametri dell'SF-36 ed il picco del cortisolo sierico dopo test di stimolo con ACTH così come nessuna differenza significativa in termini di parametri dell'SF-36 è stata documentata tra pazienti con ridotta riserva corticosurrenalica e non (vedi figura 8).

Figura 8. Differenze nella qualità della vita tra pazienti responsivi e non



DISCUSSIONE

Il presente studio ha permesso di documentare una ridotta riserva corticosurrenalica nel 20% dei pazienti adulti affetti da β -talassemia major, nella più ampia casistica presente ad oggi in letteratura. Nei precedenti studi, ormai datati, la percentuale di pazienti adulti talassemici ai quali veniva diagnosticato un ipocorticosurrenalismo era estremamente variabile (vedi tabella 2). Diversi fattori tra cui il test adottato per la diagnosi ed i relativi cut-off così come il grado di sovraccarico marziale, dell'eventuale danno epatico e del danno ipossico, possono essere responsabili della variabilità di tale dato.

La diagnosi biochimica dell'ipocorticosurrenalismo si basa sul dosaggio del cortisolo sierico sia in condizioni basali che dopo stimolazione. Livelli molto bassi di cortisolo sierico al mattino, i.e., $<3 \mu\text{g/dl}$, sono indicativi di malattia mentre la diagnosi può essere esclusa in presenza di valori francamente normali, i.e., $>18 \mu\text{g/dl}$ ^{46,73}. La maggior parte degli individui indagati per insufficienza corticosurrenalica presenta in realtà valori intermedi e richiede pertanto l'esecuzione di ulteriori indagini. Tra queste il

gold standard è rappresentato dal test all'ipoglicemia insulinica (ITT), i.e., la valutazione della risposta del cortisolo sierico all'ipoglicemia insulino-indotta. Il test è tuttavia controindicato nei pazienti che presentino malattie cardio- e/o cerebrovascolari ed è quindi di difficile attuazione in pazienti fragili e pluricomplicati, quali i talassemici. In tali circostanze, le alternative sono il test di stimolo con ACTH, sia a basse (1 µg) che alte (250 µg) dosi ed, in minor misura, il test di stimolo con glucagone⁷⁴. Va peraltro ricordato che il test di stimolo con ACTH ad alte dosi determina uno stimolo sovralfisiologico a carico dei surreni con la possibilità pertanto di ottenere risposte falsamente negative, soprattutto nelle forme di ipocorticosurrenalismo di lieve entità. A testimonianza di ciò è stato dimostrato in soggetti sani come il picco di cortisolo sierico dopo ITT sia sovrapponibile a quello dopo basse dosi di ACTH mentre sia significativamente inferiore rispetto al picco ottenuto dopo alte dosi⁷⁵. Il limite maggiore del test con ACTH a basse dosi è invece rappresentato dall'attenta "preparazione" della soluzione da iniettare, dal momento che in commercio sono disponibili esclusivamente fiale da 250 µg ed è quindi necessario

diluire il suddetto preparato fino all'ottenimento di una soluzione da 1 µg.

Tutti i test dinamici eseguiti nel sospetto di ipocorticosurrenalismo sono accomunati dalla valutazione della risposta del cortisolo sierico, il cui picco costituisce il parametro indispensabile per la conferma della diagnosi. Oltre l'80% del cortisolo presente in circolo è legato ad una proteina di trasporto prodotta dal fegato, i.e., transcortina o cortisol binding protein (CBG), le cui variazioni di concentrazione influenzano inevitabilmente i livelli di cortisolo e, di conseguenza, la corretta diagnosi biochimica di ipocorticosurrenalismo. Una riduzione dei valori di CBG è stata evidenziata, in particolare, in pazienti affetti da epatopatia⁵⁶, quest'ultima frequente complicanza dei pazienti talassemici dovuta all'emocromatosi secondaria e/o alle infezioni virali post-trasfusionali⁷⁶. D'altro canto, la terapia estroprogestinica, spesso utilizzata per trattare l'ipogonadismo delle pazienti talassemiche, è responsabile di un aumento dei valori di CBG⁷⁷. La determinazione del cortisolo salivare, che riflette la frazione libera nel sangue e che non è influenzata dalle concentrazioni di CBG, potrebbe pertanto rappresentare una valida alternativa al dosaggio

del cortisolo sierico nella diagnostica dell'insufficienza corticosurrenalica. Abbiamo quindi voluto indagare, per la prima volta in assoluto, il cortisolo salivare durante test di stimolo con ACTH nei pazienti affetti da β -talassemia.

Dopo test di stimolo con ACTH a basse dosi si è assistito ad un incremento parallelo dei valori di cortisolo sierico e salivare con una correlazione positiva tra i due presente già in condizioni basali ed, ancora più evidente, ai vari tempi del test ed al picco. Questo risultato, come pure l'esito dell'analisi ROC, consentono di delineare l'efficienza diagnostica del cortisolo salivare al Synachten nei pazienti talassemici.

Le concentrazioni basali di CBG dei pazienti talassemici adulti studiati, pur in assenza di una grave epatopatia, sono risultate significativamente ridotte rispetto a quelli della popolazione sana di controllo. Questo dato appare in contraddizione con quanto osservato in un precedente studio su bambini e adolescenti affetti da β -talassemia major dove non venivano riportate differenze significative⁴⁰. Gli alterati valori di CBG riscontrati nei nostri pazienti non sembrano peraltro influenzare la corretta interpretazione dei risultati del test di stimolo con ACTH, dal

momento che i pazienti con ridotta riserva corticosurrenalica mostravano dei valori di CBG pressoché sovrapponibili a quelli con normale funzione corticosurrenalica. Questo verosimilmente è dovuto al fatto che la terapia estroprogestinica è da ritenersi sostitutiva in queste pazienti, a differenza del suo impiego in donne fertili. Peraltro, resta da chiarire perché la percentuale di pazienti con ridotta riserva surrenalica sia inferiore nelle donne in terapia estroprogestinica sostitutiva rispetto a donne senza estroprogestinici, quindi verosimilmente normogonadiche.

Per quanto concerne i meccanismi etiopatogenetici coinvolti nello sviluppo delle complicanze endocrine della talassemia, il sovraccarico marziale ed il danno ipossico cronico sembrano essere i principali fattori in causa²⁴. Contrariamente a quanto ipotizzato, le valutazioni eseguite nel presente studio non consentono di confermare un legame tra questi fattori e lo sviluppo dell'insufficienza corticosurrenalica. Non è stata, difatti, osservata alcuna correlazione tra la presenza dell'insufficienza corticosurrenalica ed i parametri di sovraccarico marziale e/o di danno ipossico indagati. Tale osservazione viene confermata, a differenza di precedenti studi^{44,45}, non solo considerando i valori

di ferritina sierica, un indicatore poco attendibile del carico di ferro corporeo, ma anche marker più accurati, quali i valori di LIC, T2* epatico e cardiaco. Studi futuri di risonanza magnetica sono necessari per stabilire l'utilità del monitoraggio del sovraccarico marziale a livello surrenalico.

Nessuna differenza in termini di età è stata riscontrata tra i pazienti con ridotta riserva corticosurrenalica e quelli con una normale risposta cortisolemica al test di stimolo con ACTH, confermando le osservazioni di uno studio del nostro gruppo nel quale si evidenziava l'assenza di un ruolo della durata di malattia nell'etiopatogenesi dell'ipocorticosurrenalismo⁴⁴.

Per quanto riguarda la qualità di vita del paziente talassemico il presente studio ha confermato la presenza di una compromissione della stessa, sia in termini di salute fisica che mentale. Diversi fattori tra cui, la cronicità della malattia e le numerose complicanze ad essa correlate, possono svolgere un ruolo nella riduzione della qualità di vita della talassemia. A tal proposito, la ridotta riserva corticosurrenalica documentata nella nostra ampia casistica non sembra avere un impatto negativo sulla qualità di vita dei pazienti. Tale osservazione potrebbe essere tuttavia secondaria

alla presenza di forme subcliniche di ipocorticosurrenalismo caratterizzate, per definizione, da quadri clinici sfumati. Altri studi sono necessari per chiarire l'effetto dell'insufficienza corticosurrenalica sulla qualità di vita dei pazienti adulti talassemici.

In conclusione, il presente studio ha documentato, nella più ampia casistica riportata ad oggi in letteratura, una ridotta riserva corticosurrenalica in una percentuale non trascurabile di pazienti adulti talassemici, sottolineando la necessità di eseguire periodici controlli della funzione corticosurrenalica al fine di ottenere una tempestiva diagnosi ed intraprendere un adeguato trattamento. E' stato inoltre dimostrato, per la prima volta nel paziente talassemico, come la determinazione del cortisolo nella saliva dopo test di stimolo con ACTH rappresenti una valida alternativa a quella nel siero. L'impiego del cortisolo salivare sembra essere pertanto di interesse nella diagnosi di ipocorticosurrenalismo dei pazienti talassemici, pazienti già anemici nei quali è importante limitare al minimo il consumo di sangue.

BIBLIOGRAFIA

1. Galanello, R. & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 11 (2010).
2. Orzincolo, C., Castaldi, G., Bariani, L. & Scutellari, P. N. [The evolutionary effects of therapy on the skeletal lesions in beta-thalassemia]. *Radiol. Med.* **87**, 381–8 (1994).
3. Anderson, L. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur. Heart J.* **22**, 2171–2179 (2001).
4. Graziano, J. H. & Cerami, A. Chelation therapy for the treatment of thalassemia. *Semin. Hematol.* **14**, 127–34 (1977).
5. Modell, B., Letsky, E. A., Flynn, D. M., Peto, R. & Weatherall, D. J. Survival and desferrioxamine in thalassaemia major. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* **284**, 1081–4 (1982).
6. Kuo, K. H. M. & Mrkobrada, M. A systematic review and meta-analysis of deferiprone monotherapy and in combination with deferoxamine for reduction of iron overload in chronically transfused patients with β -thalassemia. *Hemoglobin* **38**, 409–21 (2014).
7. Xia, S., Zhang, W., Huang, L. & Jiang, H. Comparative efficacy and safety of deferoxamine, deferiprone and deferasirox on severe thalassemia: a meta-analysis of 16

randomized controlled trials. *PLoS One* **8**, e82662 (2013).

8. Cohen, A. R. *et al.* Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicentre study. *Br. J. Haematol.* **108**, 305–12 (2000).
9. Aydinok, Y. *et al.* Observational study comparing long-term safety and efficacy of Deferasirox with Desferrioxamine therapy in chelation-naïve children with transfusional iron overload. *Eur. J. Haematol.* **88**, 431–8 (2012).
10. Cassinerio, E. *et al.* A 5-year follow-up in deferasirox treatment: improvement of cardiac and hepatic iron overload and amelioration in cardiac function in thalassemia major patients. *Ann. Hematol.* **94**, 939–45 (2015).
11. Wood, J. C. Estimating tissue iron burden: current status and future prospects. *Br. J. Haematol.* **170**, 15–28 (2015).
12. St. Pierre, T. G. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood* **105**, 855–861 (2005).
13. Kirk, P. *et al.* Cardiac T2* magnetic resonance for prediction of cardiac complications in thalassemia major. *Circulation* **120**, 1961–8 (2009).
14. Villeneuve, J.-P., Bilodeau, M., Lepage, R., Côté, J. & Lefebvre, M. Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens. *J. Hepatol.* **25**, 172–177 (1996).
15. Ambu, R. *et al.* Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassemia. *J. Hepatol.* **23**, 544–549 (1995).

16. Olivieri, N. F. & Brittenham, G. M. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* **89**, 739–61 (1997).
17. Brittenham, G. M. *et al.* Magnetic-susceptibility measurement of human iron stores. *N. Engl. J. Med.* **307**, 1671–5 (1982).
18. Fischer, R., Piga, A., Harmatz, P. & Nielsen, P. Monitoring long-term efficacy of iron chelation treatment with biomagnetic liver susceptometry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1054**, 350–7 (2005).
19. Borgna-Pignatti, C. *et al.* Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* **89**, 1187–93 (2004).
20. Musallam, K. M. *et al.* Health-related quality of life in adults with transfusion-independent thalassaemia intermedia compared to regularly transfused thalassaemia major: new insights. *Eur. J. Haematol.* **87**, 73–9 (2011).
21. Mokhtar, G. M., Gadallah, M., El Sherif, N. H. K. & Ali, H. T. A. Morbidities and mortality in transfusion-dependent Beta-thalassemia patients (single-center experience). *Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 93–103 (2013).
22. De Sanctis, V. *et al.* Impact of long-term iron chelation therapy on growth and endocrine functions in thalassaemia. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **19**, 471–80 (2006).
23. Naithani, R., Chandra, J., Bhattacharjee, J., Verma, P. & Narayan, S. Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major. *Pediatr. Blood Cancer* **46**, 780–5 (2006).
24. Ferro, E. *et al.* Oxidative damage and genotoxicity

- biomarkers in transfused and untransfused thalassemic subjects. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1829–37 (2012).
25. Burra, P. Liver abnormalities and endocrine diseases. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 553–63 (2013).
 26. Scacchi, M. *et al.* Bone turnover and mineral density in adult thalassemic patients: relationships with growth hormone secretory status and circulating somatomedins. *Endocrine* (2016). doi:10.1007/s12020-016-0865-1
 27. Gamberini, M. R., De Sanctis, V. & Gilli, G. Hypogonadism, diabetes mellitus, hypothyroidism, hypoparathyroidism: incidence and prevalence related to iron overload and chelation therapy in patients with thalassaemia major followed from 1980 to 2007 in the Ferrara Centre. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **6 Suppl 1**, 158–69 (2008).
 28. Musallam, K. M. *et al.* Elevated liver iron concentration is a marker of increased morbidity in patients with β thalassemia intermedia. *Haematologica* **96**, 1605–12 (2011).
 29. Vogiatzi, M. G. *et al.* Differences in the prevalence of growth, endocrine and vitamin D abnormalities among the various thalassaemia syndromes in North America. *Br. J. Haematol.* **146**, 546–56 (2009).
 30. Taher, A. T. *et al.* Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood* **115**, 1886–92 (2010).
 31. Caruso-Nicoletti, M. *et al.* Management of puberty for optimal auxological results in beta-thalassaemia major. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **14 Suppl 2**, 939–44 (2001).

32. De Sanctis, V., Soliman, A. & Yassin, M. Iron overload and glucose metabolism in subjects with β -thalassaemia major: an overview. *Curr. Diabetes Rev.* **9**, 332–41 (2013).
33. Ghergherehchi, R. & Habibzadeh, A. Insulin resistance and β cell function in patients with β -thalassemia major. *Hemoglobin* **39**, 69–73 (2015).
34. Bhat, K. G. & Periasamy, P. K. Effect of long-term transfusion therapy on the glycometabolic status and pancreatic Beta cell function in patients with Beta thalassemia major. *J. Fam. Med. Prim. care* **3**, 119–23 (2014).
35. Monge, L. *et al.* The possible role of autoimmunity in the pathogenesis of diabetes in B-thalassemia major. *Diabetes Metab.* **27**, 149–54 (2001).
36. Delvecchio, M. & Cavallo, L. Growth and endocrine function in thalassemia major in childhood and adolescence. *J. Endocrinol. Invest.* **33**, 61–8 (2010).
37. Mariotti, S. *et al.* β -thalassemia and thyroid failure: is there a role for thyroid autoimmunity? *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **8 Suppl 2**, 307–9 (2011).
38. De Sanctis, V. *et al.* High prevalence of central hypothyroidism in adult patients with β -thalassemia major. *Georgian Med. News* 88–94 (2013).
39. Angelopoulos, N. G. *et al.* Hypoparathyroidism in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia. *J. Bone Miner. Metab.* **24**, 138–45 (2006).
40. Poomthavorn, P. *et al.* High Prevalence of ‘Biochemical’ Adrenal Insufficiency in Thalassemics: Is It a Matter of

Different Testings or Decreased Cortisol Binding Globulin?
J. Clin. Endocrinol. Metab. **95**, 4609–4615 (2010).

41. Soliman, A. *et al.* Cortisol response to low dose versus standard dose (back-to-back) adrenocorticotrophic stimulation tests in children and young adults with thalassemia major. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **17**, 1046 (2013).
42. Banani, S. A. & Omrani, G. H. Cortisol and adrenocorticotrophic hormone response to surgical stress (splenectomy) in thalassaemic patients. *Pediatr. Surg. Int.* **16**, 400–3 (2000).
43. Danesi, L. *et al.* Evaluation of hypothalamic-pituitary function in patients with thalassemia major. *J. Endocrinol. Invest.* **15**, 177–84 (1992).
44. Scacchi, M. *et al.* The pituitary-adrenal axis in adult thalassaemic patients. *Eur. J. Endocrinol.* **162**, 43–8 (2010).
45. De Sanctis, V. *et al.* Growth hormone and adrenal response to intramuscular glucagon test and its relationship to IGF-1 production and left ventricular ejection fraction in adult B-thalassemia major patients. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **8 Suppl 2**, 290–4 (2011).
46. Arlt, W. & Allolio, B. Adrenal insufficiency. *Lancet (London, England)* **361**, 1881–93 (2003).
47. Tordjman, K. *et al.* Low-dose (1 microgram) adrenocorticotrophin (ACTH) stimulation as a screening test for impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: sensitivity, specificity and accuracy in comparison with the high-dose (250 microgram) test. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **52**, 633–40 (2000).

48. Berg, C. *et al.* Diagnostic utility of the glucagon stimulation test in comparison to the insulin tolerance test in patients following pituitary surgery. *Eur. J. Endocrinol.* **162**, 477–482 (2010).
49. Arvat, E. *et al.* Stimulatory effect of adrenocorticotropin on cortisol, aldosterone, and dehydroepiandrosterone secretion in normal humans: dose-response study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3141–6 (2000).
50. Kazlauskaite, R. *et al.* Corticotropin Tests for Hypothalamic-Pituitary- Adrenal Insufficiency: A Metaanalysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4245–4253 (2008).
51. Nieman, L. K. *et al.* The diagnosis of Cushing’s syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1526–40 (2008).
52. Vining, R. F., McGinley, R. A., Maksvytis, J. J. & Ho, K. Y. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann. Clin. Biochem.* **20 (Pt 6)**, 329–35 (1983).
53. Karpman, M. S., Neculau, M., Dias, V. C. & Kline, G. A. Defining adrenal status with salivary cortisol by gold-standard insulin hypoglycemia. *Clin. Biochem.* **46**, 1442–6 (2013).
54. Kosák, M. *et al.* Serum cortisol seems to be a more appropriate marker for adrenocortical reserve evaluation in ACTH test in comparison to salivary cortisol. *Physiol. Res.* **63**, 229–36 (2014).
55. Deutschbein, T., Unger, N., Mann, K. & Petersenn, S. Diagnosis of secondary adrenal insufficiency in patients with hypothalamic-pituitary disease: comparison between serum

and salivary cortisol during the high-dose short synacthen test. *Eur. J. Endocrinol.* **160**, 9–16 (2009).

56. Galbois, A. *et al.* Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J. Hepatol.* **52**, 839–45 (2010).
57. Westhoff, C. L., Petrie, K. A. & Cremers, S. Using changes in binding globulins to assess oral contraceptive compliance. *Contraception* **87**, 176–81 (2013).
58. Coolens, J.-L., Van Baelen, H. & Heyns, W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J. Steroid Biochem.* **26**, 197–202 (1987).
59. Hahner, S. *et al.* Impaired Subjective Health Status in 256 Patients with Adrenal Insufficiency on Standard Therapy Based on Cross-Sectional Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 3912–3922 (2007).
60. Bensing, S. *et al.* Increased death risk and altered cancer incidence pattern in patients with isolated or combined autoimmune primary adrenocortical insufficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **69**, 697–704 (2008).
61. Gollo, G. *et al.* Changes in the quality of life of people with thalassemia major between 2001 and 2009. *Patient Prefer. Adherence* **7**, 231–236 (2013).
62. Løvås, K., Loge, J. H. & Husebye, E. S. Subjective health status in Norwegian patients with Addison's disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **56**, 581–8 (2002).
63. Kluger, N. *et al.* Impaired health-related quality of life in Addison's disease - impact of replacement therapy,

- comorbidities and socio-economic factors. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **81**, 511–518 (2014).
64. Noetzli, L. J. *et al.* Pituitary iron and volume predict hypogonadism in transfusional iron overload. *Am. J. Hematol.* **87**, 167–171 (2012).
 65. Christoforidis, A. *et al.* MRI for the determination of pituitary iron overload in children and young adults with β -thalassaemia major. *Eur. J. Radiol.* **62**, 138–142 (2007).
 66. Çetinçakmak, M. G. *et al.* MRI-based evaluation of the factors leading to pituitary iron overload in patients with thalassemia major. *J. Neuroradiol.* **43**, 297–302 (2016).
 67. Drakonaki, E. *et al.* Adrenal glands in beta-thalassemia major: magnetic resonance (MR) imaging features and correlation with iron stores. *Eur. Radiol.* **15**, 2462–8 (2005).
 68. Guzelbey, T. *et al.* Evaluation of Iron Deposition in the Adrenal Glands of β Thalassemia Major Patients Using 3-Tesla MRI. **13**, (2016).
 69. Wood, J. C. *et al.* MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood* **106**, 1460–5 (2005).
 70. Apolone, G. & Mosconi, P. The Italian SF-36 Health Survey. *J. Clin. Epidemiol.* **51**, 1025–1036 (1998).
 71. Bornstein, S. R. *et al.* Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 364–89 (2016).

72. YOUDEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**, 32–5 (1950).
73. Grinspoon, S. K. & Biller, B. M. Clinical review 62: Laboratory assessment of adrenal insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 923–31 (1994).
74. De Sanctis, V. *et al.* Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases The ICET-A Survey on Current Criteria Used by Clinicians for the Assessment of Central Adrenal Insufficiency in Thalassemia: Analysis of Results and Recommendations. *Mediterr J Hematol Infect Dis www.mjhid.org* **8**, (2016).
75. Gonzálbez, J. *et al.* Establishment of reference values for standard dose short synacthen test (250 microgram), low dose short synacthen test (1 microgram) and insulin tolerance test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in normal subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **53**, 199–204 (2000).
76. Dessì, C. *et al.* Thalassemia major between liver and heart: Where we are now ☆. *Blood Cells, Mol. Dis.* **55**, 82–88 (2015).
77. White, T., Ozel, B., Jain, J. K. & Stanczyk, F. Z. Effects of transdermal and oral contraceptives on estrogen-sensitive hepatic proteins. *Contraception* **74**, 293–6 (2006).