



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI LAUREA

**Rischio trombotico e danno endoteliale in pazienti con sindrome  
ROHHAD: studio osservazionale monocentrico**

**Confronto con pazienti affetti da obesità o da tumore ipotalamico esorditi in  
età pediatrica**

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Mohamad Maghnie

**Correlatrice:**

Prof.ssa Flavia Napoli

**Candidata:**

Silvia Marcenaro

Anno Accademico 2022/2023

## ABSTRACT

**INTRODUZIONE:** In letteratura viene riportata l'associazione tra sindrome ROHHAD ed eventi trombotici. L'obiettivo dello studio è valutare il rischio trombotico e il danno endoteliale nei soggetti con sindrome ROHHAD, confrontandolo con pazienti con obesità o con tumore ipotalamico in età pediatrica.

**METODI:** Lo studio ha coinvolto 28 soggetti, di cui 14 con sindrome ROHHAD, 8 con obesità semplice e 6 con tumore ipotalamico, di età compresa tra 8 e 30 anni. La diagnosi di sindrome ROHHAD necessita la presenza di almeno 3 criteri clinici (obesità ad esordio rapido, ipoventilazione, NET, disordini ipotalamo-ipofisari, disautonomie). L'indice di iperemia reattiva (RHI) è stato rilevato tramite EndoPAT; l'indice di desaturazione dell'ossigeno (ODI) tramite ossimetria transcutanea notturna; i disordini ipotalamo-ipofisari mediante analisi biochimiche e test di stimolo.

**RISULTATI:** Due pazienti con sindrome ROHHAD hanno manifestato eventi trombotici all'età di 3 e 19 anni. EndoPAT ha rilevato un risultato patologico in 4 pazienti con sindrome ROHHAD (66,7%), 4 con obesità (50%), 5 con tumore ipotalamico (83,3%).

Sono state dimostrate correlazioni significative tra RHI e PT ( $r_s=-0,600$ ), fibrinogeno ( $r_s=-0,657$ ), antitrombina ( $r_s=-0,400$ ), fattore di von Willebrand ( $r_s=-0,500$ ), tra ODI e antitrombina ( $r_s=-0,721$ ) e tra BMI SDS e PT ( $r_s=0,552$ ), aPTT ( $r_s=-0,541$ ), fattore VIII ( $r_s=0,555$ ), fattore di von Willebrand ( $r_s=0,709$ ), proteina C ( $r_s=0,828$ ), D-dimero ( $r_s=0,545$ ).

**CONCLUSIONI:** Nei pazienti con sindrome ROHHAD è presente una relazione tra danno endoteliale e profilo coagulativo alterato, BMI SDS e disturbi respiratori del sonno. Non vi era alcuna differenza significativa nel rischio trombotico tra pazienti e controlli a causa del basso numero di soggetti in studio. Crediamo sia necessario estendere lo studio ad un numero maggiore di pazienti, e sia indicato studiare attentamente il rischio trombotico nei soggetti affetti da sindrome ROHHAD, una sindrome ad elevata mortalità.

## INDICE DEGLI ACRONIMI

5-HIAA	5-Hydroxyindoleacetic Acid
6MWT	6-Minute Walking Test
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
ADH	Antidiuretic Hormone
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ADMA	Asymmetric Dimethylarginine
AGRP	Agouti-Related Peptide
AHA	Anti-Hypothalamus Antibody
AHI	Apnea-Hypopnea Index
AIx	Augmentation Index
APA	Anti-Pituitary Antibody
APAO	Antero-Posterior diameter of intra-renal abdominal Aorta
aPTT	activated Partial Thromboplastin Time
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BiPAP	Bilevel Positive Airway Pressure
BMI	Body Mass Index
CART	Cocaine and Amphetamine Related Transcript
CCA	Common Carotid Artery
CCHS	Congenital Central Hypoventilation Syndrome
CFPWV	Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity
CIMT <sub>max</sub>	maximal CCA IMT
CO <sub>2</sub>	Diossido di Carbonio
COX2	Cyclooxygenases-2
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
DHEAS	Dehydroepiandrosterone Sulfate
DM	Diabete Mellito
DOC	Disturbo Ossessivo Compulsivo
EEG	Elettroencefalogramma
EndoPAT	Endo Peripheral Artery Tonometry
ET-1	Endothelin-1

ETCO <sub>2</sub>	End-Tidal CO <sub>2</sub>
FMD	Flow-Mediated vasodilatation
ft3	free Triiodothyronine 3
ft4	free Triiodothyronine 4
GH	Growth Hormone
GHD	Growth Hormone Deficiency
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone
GTN	Glyceryl Trinitrate
HCRT	Hypocretin
HCRTR1	Hypocretin Receptor 1
HCRTR2	Hypocretin Receptor 2
HDL	High-Density Lipoprotein
HTR1A	5-Hydroxytryptamine Receptor 1A
I123I-MIBG	Iodine-123 Metaiodobenzylguanidine
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGFBP3	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3
IL	Interleukin
IMT	Intima-Media Thickness
ITT	Insulin Tolerance Test
LO-CHS	Late-Onset Central Hypoventilation Syndrome
LO-CHS/HD	Late-Onset Central Hypoventilation Syndrome associated with Hypothalamic Dysfunction syndrome
Lp-PLA2	Lipoprotein-associated Phospholipase A2
LT1-R	Leukotriene 1 Receptor
LT2-R	Leukotriene 2 Receptor
MC4R	Melanocortin-4-Receptor
MOF	Multiple Organ Failure
MRP8/14	Myeloid-Related Protein 8/14
MSH	Melanocyte Stimulating Hormone
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NET	Neural crest Tumor
NH	Nocturnal Hypoventilation
NIV	Non-Invasive Ventilation
NO	Nitric Oxide
NPY	Neuropeptide Y
Ntrk2	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
ODI	Oxygen Desaturation Index
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
OSAS	Obstructive Sleep Apnea Syndrome
OTP	Orthopedia homeobox
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAP	Positive Airway Pressure
PAT	Peripheral Arterial Tonometry
pCO <sub>2</sub>	partial Pressure of Carbon dioxide
PCOS	Polycystic Ovarian Syndrome
PCR	Proteina C-Reattiva
PHOX2B	Paired-like Homeobox 2B
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PT	Prothrombin Time
PWA	Pulse Wave Analysis
PWS	Prader-Willi Syndrome
PWV	Pulse Wave Velocity
RAI1	Retinoic Acid-Induced 1
RHI	Reactive Hyperaemia Index
RM	Risonanza Magnetica
ROHHAD	Rapid-onset Obesity, Hypothalamic dysfunction, Hypoventilation, Autonomic Dysregulation
ROHHADNET	Rapid-onset Obesity, Hypothalamic dysfunction, Hypoventilation, Autonomic Dysregulation, NET
ROS	Reactive Oxygen Species

$r_s$	coefficiente di correlazione per Ranghi di Spearman
SaO <sub>2</sub>	Saturazione Arteriosa dell'Ossigeno
SCD40L	Soluble CD40 Ligand
SDB	Sleep-Disordered Breathing
SIADH	Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone secretion
SNA	Sistema Nervosa Autonomo
SNRI	Serotonin-Noradrenaline Reuptake Inhibitors
SWA	Slow Wave Activity
SWS	Slow Wave Sleep
TAT	Thrombin-Antithrombin complex
TEP	Tromboembolia Polmonare
TEV	Tromboembolismo Venoso
TF	Tissue Factor
TF-PCA	Tissue Factor-Procoagulant Activity
TIA	Transient Ischaemic Attack
TNF	Tumor Necrosis Factor
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone
TT	Thrombin Time
TVP	Trombosi Venosa Profonda
VCAM	Vascular Cellular Adhesion Molecule
vWF	von Willebrand Factor

## INDICE

1.	INTRODUZIONE .....	1
	1.1 La sindrome ROHHAD.....	1
	1.2 OSAS e rischio trombotico .....	20
	1.3 Obesità e rischio trombotico.....	30
	1.4 EndoPAT.....	33
2.	MATERIALI E METODI.....	37
	2.1 Obiettivo dello studio .....	37
	2.2 Soggetti .....	37
	2.3 Metodi .....	39
	2.4 Metodi statistici.....	41
3.	RISULTATI .....	43
	3.1 Studio di pazienti con sindrome ROHHAD .....	43
	3.2 Confronto tra pazienti con sindrome ROHHAD, controlli con obesità e controlli con tumore ipotalamico.....	62
	3.3 Confronto tra pazienti con sindrome ROHHAD e controlli con tumore ipotalamico.....	67
4.	DISCUSSIONE .....	71
	4.1 EndoPAT e profilo coagulativo.....	71
	4.2 Sodiemia ed ematocrito .....	72
	4.3 BMI e rischio trombotico .....	72
	4.4 Disturbi respiratori del sonno .....	73
	4.5 Disturbi endocrini.....	74
5.	CONCLUSIONI.....	77
6.	BIBLIOGRAFIA.....	78

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 La sindrome ROHHAD**

La sindrome ROHHAD è una rara sindrome ad elevata mortalità, scoperta nel 1965 da Fishman e colleghi (1). Fu descritta per la prima volta la condizione di un bambino di 3 anni e mezzo, caratterizzata da iperfagia, disfunzione ipotalamica e ipoventilazione alveolare primaria a esordio tardivo, senza una causa primaria di natura polmonare, cardiaca o neuromuscolare. Inizialmente fu assimilata alla cosiddetta “sindrome di Ondine” da Severinghaus e Mitchell, rifacendosi alla storia della mitologica ninfa dell’acqua Ondine, la quale, una volta abbandonata dal marito mortale, si vendicò togliendogli tutte le funzioni automatiche che gli permettevano di respirare. Appena egli si addormentò, ciò gli provocò la morte: da queste similitudini è nato il primo nome della sindrome.

Successivamente, la sindrome di Ondine venne rinominata CCHS (Congenital Central Hypoventilation Syndrome) per la forma ad esordio neonatale (2). Furono studiati anche casi di pazienti che presentavano lo stesso quadro clinico dei pazienti con CCHS, ma che esordivano in epoca più tardiva: da qui il nome LO-CHS (Late-Onset Central Hypoventilation Syndrome) (3).

Entrambe le sindromi sono causate dalla mutazione del gene PHOX2B, localizzato nella regione 4p12: oltre il 90% dei pazienti è eterozigote per una mutazione che provoca l’espansione di un tratto presentante 20 alanine sull’esone 3 di PHOX2B, che vengono ripetute 24-33 volte; il restante 10% presenta mutazioni missenso, nonsense e frameshift (4).

Nel 2000, Katz e colleghi (3), studiando almeno 10 casi pubblicati di pazienti con LO-CHS associata a disfunzione ipotalamica (5,6), ipotizzarono la presenza di una sindrome distinta, denominata LO-CHS/HD (Late-onset Central Hypoventilation Syndrome associated with Hypothalamic Dysfunction syndrome): la somiglianza con CCHS è notevole, ma a distinguerla sono il diverso periodo di esordio e la presenza della disfunzione ipotalamica. Successivamente si scoprì anche la patogenesi differente (3). Nel 2007 fu coniato per LO-CHS/HD il termine “sindrome ROHHAD”, da Ize-Ludlow e colleghi (7).



ROHHAD è un acronimo che indica i principali sintomi caratterizzanti questa sindrome, nell'ordine in cui questi si presentano solitamente: obesità a esordio rapido (Rapid-onset Obesity), disfunzione ipotalamica (Hypothalamic dysfunction), ipoventilazione (Hypoventilation), disregolazione autonoma (Autonomic Dysregulation).

Recentemente è stato coniato il termine ROHHADNET, per indicare l'associazione con i tumori della cresta neurale, presenti circa nel 40% dei pazienti (8,9).

Al mondo sono stati riconosciuti circa 160 casi (10,11); si tratta di una sindrome a preponderanza femminile (F:M=2:1) (11), sebbene i dati inerenti ai disturbi del sonno acquisiti, caratteristici della malattia, siano preponderanti nel sesso maschile (M:F=2:1) (12).

L'eziopatogenesi della sindrome ROHHAD è ad oggi ancora sconosciuta; da quando è stata scoperta sono state espresse diverse ipotesi: le più accreditate sono quella genetica, epigenetica e autoimmune.

Per quanto riguarda la ricerca di un gene correlato all'insorgenza di questa patologia, il primo ad essere stato preso in esame è il gene PHOX2B. PHOX2B codifica per un fattore di trascrizione di 314 amminoacidi, fondamentale per lo sviluppo e la funzione del sistema nervoso autonomo, per la regolazione del ciclo cellulare dei neuroni e per la migrazione della cresta neurale. Questa associazione è stata ricercata perché PHOX2B è il gene la cui mutazione è alla base della CCHS. Vista la notevole somiglianza tra le due sindromi, si è ipotizzata una possibile causa comune, ma in nessun paziente con ROHHAD, ad oggi, sono state riscontrate mutazioni in questo gene (4,13).

Un altro gene studiato è BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), che codifica per un fattore conosciuto per il suo ruolo nello sviluppo e mantenimento della popolazione neuronale coinvolta nel controllo respiratorio e dei neuroni implicati nella sensibilità nocicettiva. Anch'esso non risulta essere mutato nei pazienti con sindrome ROHHAD (7).

Il gene Ntrk2, che codifica per TrkB (Tropomyosin receptor kinase B), risulta essere implicato nella sensibilità al dolore, nella regolazione della fame e del peso corporeo. Visto il suo ruolo, si è pensato potesse essere implicato nella patogenesi della ROHHAD, ma anch'esso non risulta essere mutato in nessun paziente (7).

Tra gli altri geni indagati come possibili responsabili della sindrome, si ricordano: HTR1A (5-hydroxytryptamine receptor 1A), importante per il ruolo svolto nel controllo dell'appetito e nel controllo cardiorespiratorio; OTP (orthopedia homeobox), importante per il controllo omeostatico; PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), fondamentale per il controllo cardiorespiratorio e termoregolatore, il metabolismo glucidico e lipidico. Nessuno di questi geni è risultato correlato in maniera significativa alla Sindrome ROHHAD (14).

In uno studio eseguito nel 2013 (15), è stata diagnosticata ad una bambina con sindrome ROHHAD la narcolessia, confermata dall'assenza di ipocretina-1 nel liquido cerebrospinale. Si è quindi ipotizzato che le due patologie potessero essere associate, considerando che l'ipocretina-1 ha un ruolo importante nella regolazione del sistema autonomo, nella regolazione centrale cardiorespiratoria e nel rilascio di catecolamine in circolo. In entrambe le condizioni si è inoltre notata un'associazione con l'aumento di peso corporeo e l'attivazione della lipogenesi.

L'ipocretina-1 e l'ipocretina-2, conosciute anche come orexine, sono due proteine che si legano ai recettori HCRTR1 e HCRTR2 con diversa affinità. Per capire se ci potesse essere una correlazione patogenetica con la sindrome ROHHAD, Barclay nel 2015 eseguì uno studio, sequenziando l'esoma di 16 pazienti, alla ricerca di una possibile mutazione ai geni HCRT, HCRTR1 e HCRTR2. Non è stata riscontrata nessuna anomalia ma, dato che il DNA sequenziato era ottenuto solo da campioni di sangue periferico, non si esclude la possibilità di un quadro di mosaicismo, con mutazioni somatiche *de novo* presenti in altri tessuti (16).

Nel 2015, uno studio ha rilevato la presenza di una mutazione nonsense del gene RAI1 (retinoic acid-induced 1) in una paziente con diagnosi clinica di sindrome ROHHAD (17). RAI1 è situato sul cromosoma 17, ed è il gene mutato alla base della sindrome di Smith-Magenis. Grazie a questo studio è stato ipotizzato un potenziale *overlap* tra le due sindromi anche se, in uno studio successivo, questa mutazione non è stata riscontrata in nessuno dei pazienti con ROHHAD (18).

L'ipotesi epigenetica nasce in seguito ad una serie di studi eseguiti su gemelli monozigoti, con una presentazione clinica discordante. In questi bambini, solo uno dei due soggetti presenta i caratteri tipici della sindrome ROHHAD, mentre l'altro non manifesta nessuna

caratteristica associata. In particolare, grazie ad uno studio condotto da Patwari e colleghi nel 2011 (19), si è potuta studiare una coppia di gemelle monozigoti di cui solo una delle bambine presentava il fenotipo caratteristico della sindrome ROHHAD. La possibilità di avere una sola diagnosi all'interno di una coppia di gemelli monozigoti non ha escluso l'eventualità che vi sia una mutazione genetica alla base della patologia; tuttavia, dal risultato di questo studio si è rafforzata l'ipotesi che ci possano essere delle variazioni epigenetiche nel genoma di questi pazienti, che spiegherebbe il differente fenotipo.

Nel 2015, un altro studio ha esaminato una coppia di gemelli monozigoti con fenotipo discordante, sequenziando il loro esoma alla ricerca di una mutazione causativa nel bambino affetto, ma nessuna sequenza differente è stata riscontrata. Si è quindi dedotta l'ipotesi della presenza di mutazioni *de novo* della linea germinale o un quadro di mosaicismo per la presenza di mutazioni somatiche. Nonostante lo studio abbia utilizzato anche campioni provenienti dai NET dei pazienti, non si è riconosciuta nessuna mutazione causativa. L'esito dello studio non smentisce comunque questa teoria, dal momento che si potrebbe non aver campionato i tessuti corretti, come l'ipotalamo o il tronco encefalico (18).

La teoria immunologica è una delle più accreditate, e molti studi avvalorano questa ipotesi.

Uno studio del 2019 ha riportato il caso di una paziente di 3 anni con Sindrome ROHHAD, in cui sono stati rilevati anticorpi anti-ipotalamo (AHA) e anti-ipofisi (APA) nel liquido cerebrospinale, con bande oligoclonali (20). Gli anticorpi AHA e APA non sono finora mai stati ricercati in altri studi.

Un altro studio, nel 2013, ha ritrovato nel liquido cerebrospinale di due pazienti la presenza di bande oligoclonali, indice della sintesi intratecale di immunoglobuline G oligoclonali (21). Il riscontro di un'associazione con la celiachia in una paziente di 13 anni (22) ha ulteriormente avvalorato l'ipotesi immunologica.

Diversi studi, eseguiti su pazienti con sindrome ROHHAD, hanno mostrato un miglioramento nel quadro clinico del paziente in seguito a una terapia immunosoppressiva con Ciclofosfamide ad alte dosi, Rituximab, immunoglobuline e corticosteroidi. In uno studio pubblicato da Sirvent del 2003, tuttavia, sono stati riportati due casi dove i pazienti non hanno risposto al trattamento (23).

Il primo studio, in cui è stata riportata l'efficacia della terapia immunosoppressiva, è stato eseguito da Huppke nel 2009; la paziente era una bambina di 7 anni, con sindrome ROHHAD, a cui sono state somministrate immunoglobuline per via endovenosa: ciò ha portato ad un lento miglioramento dei disturbi comportamentali, delle disonie e dei problemi cardiovascolari (24). Due studi del 2011 e del 2016, rispettivamente eseguiti da Paz-Priel (25) e Jacobson (26), hanno visto tre pazienti trattati con alte dosi di Ciclofosfamide, riportando un importante miglioramento dal punto di vista comportamentale, neuropsicologico, respiratorio, termoregulatorio, nel controllo dell'appetito e nella sensibilità al dolore. In un altro studio, condotto da Ibáñez-Micó nel 2017, si è trattata una paziente di 2 anni con terapia immunosoppressiva, iniziando prima con immunoglobuline endovena, che hanno agito sull'aspetto idroelettrolitico e l'ipotermia, ma non hanno portato a miglioramento del comportamento. Successivamente è stata somministrata Ciclofosfamide ad alte dosi, che ha portato a un miglioramento evidente del quadro clinico, ma associato a una grave neutropenia che ha causato uno shock settico con complicanze multiple (27).

In uno studio del 2015 è stato riportato il caso di un paziente con sindrome ROHHAD in cui è stata rilevata, alla RM dell'encefalo, una iperintensità in T2 nella zona della sostanza grigia periacqueduttale, dello splenio del corpo calloso e del nucleo caudato destro. Inoltre, è stata rilevata la presenza di bande oligoclonali e elevati livelli di neopterina nel liquido cefalorachidiano. La somministrazione a lungo termine di corticosteroidi, immunoglobuline e micofenolato mofetile, ha portato a un beneficio evidente sulle funzioni neuropsicologiche e sui disordini autonomici (28).

Ad ulteriore sostegno della teoria immunologica c'è il riscontro autoptico in 5 pazienti di segni di encefalite, caratterizzata da infiltrati linfocitici perlopiù perivascolari, distribuiti variamente a livello cerebrale. Nel 1994 North e colleghi pubblicarono un articolo riguardo 2 pazienti con "disfunzione ipotalamica idiopatica", successivamente inquadrata come sindrome ROHHAD; uno di questi all'autopsia presentava infiltrati diffusi e perivascolari linfocitocitari a livello ipotalamico e mesencefalico. Gli stessi autori l'anno successivo studiarono il caso di un bambino di 3 anni con estesi infiltrati linfocitocitari all'ipotalamo, talamo e mesencefalo, associati a perdita neuronale e astrocitosi reattiva (29). Nel 1997 un altro studio, condotto da Nunn e colleghi, ha riscontrato all'autopsia di un paziente con la stessa patologia un diffuso infiltrato linfocitario a livello dell'ipotalamo e

del tronco encefalico, esteso fino al midollo spinale cervicale superiore. Nelle stesse zone era presente anche una lieve spongiosi, astrocitosi reattiva e una modesta perdita neuronale (30).

Un altro caso è quello descritto da Sethi e colleghi nel 2014 (31): la paziente era una bambina di 5 anni con sindrome ROHHAD nella quale, all'autopsia, è stata riscontrata la presenza di un'encefalite ipotalamica con infiltrati cronici perivascolari, ricchi di linfociti T CD3+ e cellule della microglia.

Nel 2020 è stato pubblicato un articolo sul caso di un bambino in cui sono stati trovati all'autopsia i segni di un'encefalite coinvolgente l'ipotalamo e il tegmento del tronco encefalico, in particolare a livello del ponte e del bulbo. Il pattern dell'infiammazione consisteva in infiltrati infiammatori perlopiù perivascolari, ricchi di linfociti B e linfociti T helper. A livello parenchimale, sono invece stati riscontrati infiltrati nodulari diffusi e con densità irregolare, che contenevano le stesse cellule di cui sopra, oltre che linfociti T citotossici, alcuni evidentemente attivi (32). La distribuzione topografica di questi infiltrati non sembra essere correlata completamente con le anomalie che si riscontrano alle immagini neuroradiologiche.

Diversi sintomi tipici della sindrome ROHHAD, come disturbi autonomici, attacchi epilettici, cambiamenti di umore e personalità, sono comuni anche a patologie dei neurotrasmettitori: per tale motivo si è ipotizzato che una carenza di serotonina potrebbe essere alla base della sindrome. In uno studio è stata utilizzata la Clomipramina, un farmaco inibitore del *reuptake* di serotonina e noradrenalina (SNRI), che sembra aver dato dei buoni risultati per quanto riguarda l'apnea centrale, ma si è dimostrato inefficace per i sintomi ipotalamici e autonomici. Spesso i neurotrasmettitori non vengono ricercati nel liquido cefalorachidiano, ad eccezione dello studio di Nunn (30), che però non ha riscontrato anomalie. Uno studio del 2011, condotto da Chew e colleghi, ha riportato il caso di un bambino di 11,5 anni nel quale sono stati riscontrati bassi livelli di 5-HIAA (acido 5-idrossiindolacetico) nel liquor, ma ancora non si comprende il significato di tali risultanze (33).

Recentemente si è affermata l'ipotesi che la sindrome ROHHAD possa essere una sindrome paraneoplastica. Questa ipotesi è stata formulata dopo il riscontro di tumori della cresta neurale (NET), come ganglioneuroma e ganglioneuroblastoma, nel 40% dei pazienti.

Il primo studio ad aver ipotizzato un ruolo dei NET all'interno della sindrome è stato condotto nel 1995 da Ouvrier e colleghi (34); questi avevano seguito l'anno precedente i casi di 2 bambini che presentavano tutte le manifestazioni tipiche della sindrome ipotalamica idiopatica, come disfunzione ipotalamica, iperfagia, ipersonnia, difficoltà respiratoria notturna e insensibilità al dolore. All'autopsia riscontrarono la presenza di un ganglioneuroma addominale in un paziente (29). Nel 1995 studiarono il caso di un altro bambino di 3 anni, con la stessa sintomatologia, che presentava un ganglioneuroblastoma toracico paravertebrale (34).

I NET sono tumori che possono provocare sindromi paraneoplastiche, come la sindrome opsoclono-mioclono, ma sono stati riportati anche casi di miopia, paralisi, epilessia, atassia. Da qui nasce l'idea che la sindrome ROHHAD possa essere una conseguenza della presenza di tumori NET, trattabile con la rimozione del tumore e immunoterapia. Si sono ricercati a lungo degli autoanticorpi nel liquido cefalorachidiano che potessero indicare la causa patogenetica, ma senza risultati. Ciò non elimina la possibilità di una patogenesi paraneoplastica, dal momento che in altre sindromi non sono ancora stati trovati gli autoanticorpi associati anche per motivi di tipo tecnico. Inoltre, molte sindromi paraneoplastiche sono dovute a una risposta mediata da linfociti T citotossici, quindi, gli anticorpi sarebbero una risposta secondaria e non i mediatori diretti del danno al sistema nervoso. Infine, si è ipotizzato che la disfunzione ipotalamica associata ai NET possa essere indipendente da meccanismi immunologici, ma derivare da una alterazione nella differenziazione e migrazione delle cellule della cresta neurale durante il periodo fetale (23).

Da quando si è notata tale associazione, i pazienti con ROHHAD vengono sempre monitorati nel tempo per rilevare la presenza di neoplasia, anche se non sempre questa viene riscontrata. Per tale motivo ci sono ancora dei dubbi sul loro ruolo nella patogenesi della malattia (23).

La sindrome ROHHAD si manifesta tra 0 e 9 anni, con un picco tra 2 e 4 anni. Tutti i pazienti, prima dell'esordio, presentano una crescita e uno sviluppo regolare, con un buono stato di salute generale.

La presentazione clinica dei pazienti è molto eterogenea, sia per severità che per tempistica (7,9,11). Solitamente il primo sintomo della patologia che si riscontra è l'iperfagia, con un rapido incremento ponderale (BMI >95esimo percentile) e obesità ad esordio rapido. I pazienti presentano un aumento di peso anche di 10-15 kg in un periodo di 6-12 mesi (1).

Successivamente (solitamente dopo circa un anno) si può instaurare una disfunzione ipotalamica; essa si manifesta con deficit di GH (growth hormone), diabete insipido, disnatremia, SIADH (syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion), ipodipsia, pubertà precoce centrale, adrenarca prematuro, amenorrea, ipogonadismo ipogonadotropo, iperprolattinemia, ipotiroidismo, deficit di ACTH. Per quanto riguarda la disregolazione autonómica, i pazienti con sindrome ROHHAD possono manifestare sintomi oftalmologici (come visione offuscata, alterata risposta pupillare alla luce, strabismo, ptosi palpebrale), alterata percezione del dolore, dismotilità intestinale, bradicardia, eccessiva sudorazione, disregolazione termica (ipotermia, ipertermia), estremità fredde, livedo reticularis, fenomeno di Raynaud, incontinenza urinaria (9,11,35).

Molto frequenti nei pazienti con sindrome ROHHAD sono i disordini comportamentali. In particolare, si possono riscontrare cambi d'umore repentini, irritabilità, aggressività, iperattività, ritiro sociale, scarso rendimento scolastico, disabilità intellettiva, disturbo depressivo maggiore, ansia, ADHD (attention deficit hyperactivity disorder), DOC (disturbo ossessivo compulsivo), disturbo bipolare, psicosi (9,11,26,28,35).

Nel 2013 Grudnikoff e colleghi hanno riportato il caso di una paziente di 14 anni con gravi alterazioni della personalità, irritabilità, aggressività e disturbi del sonno. Nella sua adolescenza, la paziente ha riportato atteggiamenti di evitamento, angoscia, ansia, incubi notturni, allucinazioni uditive notturne; tutti sintomi intermittenti, e che tendevano al peggioramento durante le esacerbazioni di disfunzionalità autonome e respiratorie. Il trattamento con Lorazepam e Citalopram, associato ad una buona gestione delle disautonomie e dell'ipoventilazione, hanno portato ad un miglioramento della sintomatologia (36).

In diversi studi è stata riscontrata un'associazione tra disturbi neurocognitivi e alterata ventilazione (7,36); infatti, solitamente le alterazioni comportamentali si manifestano 1,5 anni dopo l'esordio di ipoventilazione (9). Un'ulteriore dimostrazione è data dal fatto che,

in seguito all'inizio del trattamento con ventilazione non invasiva (NIV) a domicilio, i pazienti evidenziano un notevole miglioramento in ambito comportamentale (9).

Un aspetto molto frequente della sindrome ROHHAD è l'ipoventilazione centrale, che solitamente si manifesta alcuni anni dopo l'esordio clinico; i pazienti presentano spesso una ventilazione adeguata quando sono svegli, mentre di notte richiedono la ventilazione artificiale, per la bassa risposta all'ipercapnia. Viene fatta diagnosi di ipopnea centrale quando il bambino presenta un calo  $\geq 30\%$  rispetto al basale della pressione nasale o del flusso misurato con il dispositivo PAP, in assenza di sforzo toracico o addominale, per una durata di almeno 2 respiri ed associata a una desaturazione d'ossigeno  $\geq 3\%$  o a un arousal; l'apnea centrale ha le stesse caratteristiche, ma una riduzione di flusso  $\geq 90\%$ . Si può diagnosticare un'ipoventilazione centrale in presenza di un aumento  $>50$  mmHg della pCO<sub>2</sub> arteriosa, end-tidal o transcutanea, per  $> 25\%$  del tempo di sonno totale (37).

Questa è la causa principale di morte prematura nei pazienti, che solitamente muoiono improvvisamente per arresto cardiorespiratorio.

Uno studio del 2015 condotto da Carroll e colleghi (38) ha analizzato i dati di 100 test di funzionalità respiratoria eseguiti su 7 pazienti con ROHHAD. L'obiettivo era quello di studiare la loro risposta ventilatoria, cardiaca e cerebrovascolare a stimoli esogeni, in stato di veglia: i risultati indicano una diminuzione dei volumi correnti e di flusso inspiratorio in risposta a una situazione di ipossia e ipercapnia durante la veglia, mentre le evidenze in condizioni di iperossia e ipercapnia iperossica sono indistinguibili dai controlli. Comparando questi dati con i risultati dedotti da altri studi simili eseguiti su pazienti con CCHS (39), si è dedotto che, nonostante entrambe le sindromi provochino una ventilazione spontanea inadeguata durante la veglia e un'ipoventilazione severa durante il sonno, la sindrome ROHHAD presenta una condizione meno grave rispetto alla CCHS. Dallo studio di Carroll risulta infatti una sensibilità periferica all'ipossia più conservata nella ROHHAD, e una minore depressione respiratoria e cardiocircolatoria, sebbene i risultati mostrino una suscettibilità significativa all'ipossiemia (a differenza della CCHS, dove il problema principale è l'ipercapnia). Tali risultati potrebbero sembrare in contrasto con la teoria che vede un deficit della funzione chemiosensoriale come causa dell'ipoventilazione: ciò che si ipotizza è che il flusso inspiratorio ridotto e la diminuzione del volume corrente al test combinato ipossia-ipercapnia indichi una incapacità dei pazienti



a mantenere un corretto scambio di gas respiratori e di avvertire la sensazione di asfissia (38).

È necessario inoltre ricordare che i pazienti con sindrome ROHHAD presentano una severa obesità, che provoca un quadro restrittivo polmonare, con diminuzione del volume residuo polmonare, del volume corrente e tachipnea. In alternativa, l'ipoventilazione centrale potrebbe essere causata da una disfunzione del Sistema Nervoso Autonomo, con una alterata risposta all'ipossia e all'ipercapnia. Inoltre, è risultato che anche l'ipotiroidismo, molto frequente nella sindrome ROHHAD, è strettamente collegato con la regolazione centrale della ventilazione (40).

L'ipoventilazione centrale spesso non viene diagnosticata all'esordio, perché la polisonnografia, o il monitoraggio cardiorespiratorio in sonno, sono esami che non vengono eseguiti frequentemente nei pazienti. È consigliato quindi effettuarne uno il prima possibile, associato ad una capnografia, nei pazienti che dimostrano sintomi tipici ROHHAD, come aumento di peso rapido senza una causa apparente o disordini autonomici ed endocrinologici. Nei pazienti con un elevato sospetto, sarebbe opportuno ripetere l'esame almeno annualmente per un minimo di 5 anni.

Molti bambini con sindrome ROHHAD presentano, nel loro quadro clinico, diversi disturbi respiratori del sonno (SDB): OSAS (obstructive sleep apnea syndrome), alterata risposta ventilatoria al diossido di carbonio (CO<sub>2</sub>), episodi cianotici, insufficienza respiratoria con ipoventilazione notturna (NH).

Uno studio retrospettivo, eseguito nel 2016 da Reppucci e colleghi, ha valutato l'ipoventilazione notturna di 6 pazienti con sindrome ROHHAD, monitorandoli tramite polisonnografia. L'esordio della manifestazione respiratoria è avvenuto in media a 7,2 anni. Al primo esame il 66% dei pazienti presentava un quadro di OSA, il 17% di ipoventilazione notturna e il 17% entrambi. È stato quindi consigliato ai pazienti con OSA di perdere peso e a coloro che avevano ipoventilazione notturna l'utilizzo di BiPAP. Uno dei pazienti è deceduto prima del follow up, mentre in tutti gli altri casi è stato possibile riscontrare l'insorgenza di ipoventilazione notturna, con necessità di terapia con BiPAP. Inoltre, il 50% dei pazienti ha manifestato respiro irregolare durante la veglia, con pause di durata tra i 10 e i 47 secondi, accompagnate da moderata desaturazione d'ossigeno. In un paziente si è vista anche ipertensione polmonare, mentre in un altro si è notata una

riduzione della frequenza cardiaca a 40 battiti/minuto. Questo studio ha dimostrato che all'esordio, tra i disturbi respiratori del sonno, il più frequente risulta essere l'OSA, soprattutto di moderata-severa gravità. L'ipoventilazione notturna si presenta poi in tutti i soggetti con il passare del tempo (41). Inoltre, nei bambini con ROHHAD si manifesta un'importante riduzione della durata del periodo di sonno totale, probabilmente dovuta alla presenza di alcuni disturbi quali l'insonnia (42).

Durante la veglia i pazienti presentano una certa stabilità ventilatoria, grazie al centro respiratorio presente nel tronco encefalico, che compensa la scarsa risposta agli stimoli chimici. Si è testata anche la capacità funzionale submassimale di questi bambini, attraverso il 6MWT (6 Minute Walking Test), e non si è riscontrata nessuna difficoltà, dimostrando che normali attività quotidiane sono sicure per questi soggetti (42).

In alcuni pazienti è possibile notare alterazioni neurologiche come epilessia, episodi di perdita di coscienza, disturbi del sonno, narcolessia, nistagmo, allucinazioni, astenia generale. Spesso l'insorgenza di crisi epilettiche si verifica in seguito a episodi di ipossiemia.

Un recente studio di Goldbart (43) si è occupato dell'analisi del sonno dei pazienti con ROHHAD, ed in particolare del sonno ad onde lente (SWS), caratterizzato da onde delta (0,75-4 Hz). SWS può essere misurato attraverso l'attività a onde lente (SWA) e rappresenta un indicatore della regolazione dell'omeostasi del sonno. Sembra infatti che una debolezza nelle connessioni corticali porti ad una riduzione della sincronizzazione dei network cerebrali, e quindi del livello di SWA. L'intensità della SWA è controllata dai centri ipotalamici coinvolti nella regolazione del rilascio di GH, del metabolismo energetico e del Sistema Nervoso Autonomo (SNA). Nei soggetti obesi e con OSA si è riscontrata una riduzione della SWA, che può però normalizzarsi una volta trattato il paziente.

Nello studio di Goldbart sono stati osservati 2 bambini con ROHHAD, 4 con OSA e 6 controlli in ogni fase del sonno. Entrambi i bambini con ROHHAD hanno mostrato una potenza notevolmente inferiore delle onde delta durante la fase N3 dei primi 2 cicli di sonno; non si sono invece riscontrate anomalie nella latenza del sonno. L'ipotesi formulata è che l'aumento repentino e importante di peso nella sindrome ROHHAD sia esacerbato dalla diminuzione di SWA; questa teoria sarebbe supportata da studi che hanno dimostrato

che l'interruzione di SWS può alterare l'equilibrio autonomico e aumentare il rischio di obesità. La disfunzionalità ipotalamica tipica della sindrome ROHHAD potrebbe quindi provocare un calo della SWA e accelerare l'aumento di peso.

In letteratura sono stati descritti alcuni casi di pazienti con LO-CCHS e CCHS che hanno presentato trombosi venosa cerebrale. I primi esempi sono stati riportati da Boubred nel 2002 (44): si trattava di 2 bambini, di 3,5 e 7 anni, con diagnosi di LO-CCHS, in cui alla RM cerebrale è stato possibile riconoscere la presenza di una trombosi venosa ai seni laterali. All'epoca non era ancora conosciuta la mutazione del gene PHOX2B; quindi, si era ipotizzato che la causa dell'ipoventilazione centrale potesse essere l'ischemia causata da questo evento. Nel 2011 però Joseph (45) indicò la presenza di un nuovo caso: un neonato che aveva manifestato episodi di ipoventilazione e che alla RM mostrava una trombosi venosa al seno trasverso destro. Dopo la terapia, le immagini radiografiche sono migliorate, ma la sintomatologia del bambino non si è risolta. Questo ha permesso di arrivare alla diagnosi di CCHS, confermata successivamente con un esame genetico. Si deduce quindi che i fenomeni trombotici siano una conseguenza delle sindromi ipoventilatorie, ma il meccanismo patogenetico non è ancora stato compreso; nessun fattore di rischio protrombotico è stato rinvenuto in questi pazienti.

Le ipotesi formulate sono molto varie: si presume che alla base del processo trombogenico ci sia una stasi ematica a livello dei seni venosi; questa potrebbe essere causata da una riduzione del flusso sanguigno cerebrale per una alterata regolazione autonomica. Si è dimostrato poi che durante le apnee si ha una prolungata flessione della testa, che può provocare una compressione del seno sagittale da parte dell'occipite. Anche la policitemia potrebbe giocare un ruolo importante in questi episodi, causando una condizione di ipercoagulabilità. Infine, asistolie cardiache e aritmie possono contribuire alla patogenesi della trombosi (45). Inoltre, i disordini idroelettrolitici, quali diabete e ipersodiemia, che si associano alla sindrome ROHHAD, possono determinare una condizione di disidratazione con conseguente rischio aumentato di trombosi.

Come si è detto, nel 40% circa dei pazienti affetti da sindrome ROHHAD è stata riscontrata la presenza di tumori della cresta neurale, come ganglioneuroma, neuroblastoma e ganglioneuroblastoma, del tutto asintomatici. Questi tumori sono localizzati, in ordine di frequenza, a livello surrenalico, toracico, cervicale paravertebrale,

addominale paravertebrale e retropancreatico. In circa la metà dei pazienti con NET, il tumore viene diagnosticato dopo meno di un anno dall'esordio clinico; nella maggioranza dei casi entro 2 anni dall'inizio di aumento di peso corporeo.

Nel 2019, Jalal Eldin e colleghi hanno riportato il caso di una paziente di 26 anni affetta da sindrome ROHHAD che ha presentato un epatocarcinoma, in un quadro di cirrosi epatica, legata a una precedente diagnosi di NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease). La donna presentava anche ipersplenismo, severa insulino-resistenza, diabete mellito, ipertrigliceridemia (46). Altre manifestazioni cliniche di frequente riscontro sono: febbre, cefalea, ipertensione polmonare, prolasso rettale, celiachia, scoliosi (9). Spesso i bambini con sindrome ROHHAD giungono all'attenzione del medico per le ricorrenti infezioni delle alte vie respiratorie.

Data l'incidenza in costante aumento dell'obesità infantile, è fondamentale prendere in considerazione questa sindrome nella diagnosi differenziale, affinché si riduca il rischio di diagnosi tardiva, a cui è associato un elevato tasso di complicanze e di mortalità e una peggiore qualità di vita per il paziente.

La sindrome ROHHAD ha una diagnosi perlopiù clinica. Data la sua vastissima gamma di manifestazioni, è necessario che il paziente venga seguito da diversi specialisti nell'ambito dell'endocrinologia, pneumologia, infettivologia, oncologia, psichiatria. Gli aspetti più caratterizzanti della patologia, che facilitano la diagnosi, sono: obesità a rapido esordio in età infantile, ipoventilazione alveolare durante il sonno, segni di disfunzione ipotalamica e disturbi autonomici.

Considerando la rarità di questa patologia, è fondamentale, ai fini della diagnosi, escludere altre cause di obesità infantile (come la sindrome di Prader-Willi, PWS) e di alterazioni nella respirazione e disregolazione autonoma (come la CCHS). La sindrome ROHHAD è una delle 30 sindromi pleiotropiche con obesità ad esordio rapido come caratteristica principale. Nella maggior parte delle altre patologie però sono presenti dismorfie facciali e ritardo mentale e sono assenti sintomi tipici da disfunzioni ipotalamiche, ipoventilazione o presenza di NET. Più complessa è la diagnosi se si ha a che fare con forme incomplete di ROHHAD (47).

Nei pazienti con obesità severa, esattamente come nella sindrome ROHHAD, è possibile osservare complicazioni quali OSA, ipoventilazione, ipercortisolismo, deficit di ormoni sessuali, aumento di TSH e mancata risposta del GH al test di stimolazione. Questi bambini presentano però in genere elevati livelli di IGF-1 e alta statura. Altre sindromi pediatriche caratterizzate dall'obesità severa sono la sindrome di Bardet-Biedl e quella di Alstrom, ma anche in questo caso il fenotipo dei pazienti risulta differente.

Un ormone coinvolto nella patogenesi di alcune sindromi caratterizzate da obesità è la leptina, una proteina sintetizzata dal tessuto adiposo, in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e agire sui neuroni. La sua funzione è quella di regolare il metabolismo energetico e ridurre l'appetito, causando poi perdita di peso corporeo. In particolare, essa agisce sul nucleo arcuato ipotalamico, dove si trovano 2 popolazioni cellulari: i neuroni POMC (Pro-Opiomelanocortin), che producono le molecole anoressizzanti  $\alpha$ -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) e CART (Cocaine and Amphetamine Related Transcript), e un secondo gruppo che esprime NPY (Neuropeptide Y) e AGRP (Agouti-Related Peptide), con effetto oressizzante. Nel 1997 sono stati riportati i primi casi di pazienti con mutazioni genetiche che causano un deficit congenito di leptina. Il quadro clinico presenta obesità severa ad esordio rapido e iperfagia, iperinsulinemia, ipogonadismo ipogonadotropo, un aumentato rischio di infezioni. La terapia consiste nella somministrazione giornaliera di leptina per via sottocutanea, a cui i pazienti rispondono brillantemente, con una drastica perdita di peso. Altri pazienti hanno riportato un quadro sintomatologico molto simile, ma dovuto ad una mutazione del gene che codifica per il recettore della leptina.

Un'altra sindrome con cui fare diagnosi differenziale è causata dalla mutazione di POMC. La patologia si manifesta fin dall'epoca neonatale con crisi surrenaliche dovuta alla mancanza di ACTH, pallore cutaneo, capelli e peli rossi, obesità e iperfagia (48).

Nel 1998 sono state studiate una serie di famiglie che presentavano obesità e una mutazione al gene MC4R. MC4R è un recettore associato alla proteina Gs presente a livello del sistema nervoso, in particolare nei nuclei ipotalamici coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico (49). Successivamente si è scoperto che esistono più di 50 mutazioni a carico di questo gene, che nell'insieme hanno una prevalenza di 0,5-1% negli adulti obesi, che arriva al 6% nei soggetti con obesità severa fin dall'infanzia. L'esordio è

caratterizzato da iperfagia e incremento ponderale, aumento anche della massa magra e della densità ossea, altezza elevata. Probabilmente la frequenza importante di questa patologia è dovuta al fatto che non causa infertilità, e che anche mutazioni eterozigoti con perdita parziale di funzione portano al fenotipo patologico (48).

Generalmente, la sindrome ROHHAD è facilmente distinguibile dalle altre sindromi complesse caratterizzate da obesità per il suo esordio improvviso, per l'assenza di sintomi alla nascita e nei primi mesi di vita e per le manifestazioni autonomiche, respiratorie e endocrinologiche.

Una patologia con cui spesso è necessario fare diagnosi differenziale è la CCHS, sindrome caratterizzata da un deficit chemosensoriale che porta a scarsa risposta all'ipercapnia e ipoventilazione. Come si è detto, si tratta di una sindrome la cui origine è nota, essendo associata alla mutazione del gene PHOX2B. La CCHS e la sua corrispettiva ad esordio tardivo, la LO-CCHS, sono entrambe patologie con obesità ad esordio rapido, alterazioni respiratorie durante il sonno e la veglia, disturbi della personalità e disregolazione autonoma; spesso viene riscontrata anche l'associazione con tumori della cresta neurale. Il quadro clinico è pertanto molto simile a quello della sindrome ROHHAD: ciò che permette di differenziarle è l'epoca di esordio e la patogenesi (50).

La patologia con cui più frequentemente è necessario fare diagnosi differenziale è la sindrome di Prader-Willi (PWS), a causa di diversi sintomi in comune. Superficialmente, infatti, i pazienti affetti da queste patologie possono essere confusi per via della severa obesità infantile a cui sono soggetti. La PWS si manifesta fin dall'epoca neonatale con ipotonia, scarso appetito, crescita ridotta seguita poi da un improvviso aumento di peso nella prima infanzia e una continua ricerca di cibo più tardivamente. Altre manifestazioni tipiche della PWS sono disabilità intellettiva da lieve a moderata, disturbi comportamentali, deficit di GH o di altre tropine ipofisarie, ipogonadismo e una caratteristica morfologia facciale caratterizzata da labbro superiore sottile, ponte nasale stretto, fronte bassa, caratteristica conformazione degli occhi. I pazienti con PWS spesso presentano anche alterazioni nella respirazione durante la notte, disfunzione ipotalamica e autonoma, mani e piedi di piccole dimensioni, strabismo, scoliosi, osteopenia, crisi epilettiche e alterata percezione del dolore. Come si può notare, molte di queste

caratteristiche sono tipiche anche della sindrome ROHHAD, e da questo *overlap* nasce proprio la difficoltà nella diagnosi differenziale.

La PWS è una sindrome molto più frequente della ROHHAD (incidenza 1:15000/30000 nati vivi), motivo per cui tutti i pazienti in cui si sospetta quest'ultima vengono prima testati per la PWS (1). La PWS è causata da una anomalia genetica presente in alcune regioni del braccio lungo del cromosoma 15, in cui manca l'espressione dei geni paterni. Vista la forte somiglianza fra le 2 sindromi, si è ipotizzato che possano condividere un'origine comune. In particolare, un'ipotesi sarebbe che solo uno dei geni presenti nelle regioni PWS risulti essere mutato, come nel caso della sindrome di Schaaf-Yang. Uno studio del 2018, condotto da Barclay e colleghi, ha testato 7 pazienti con ROHHAD proprio a questo proposito (51): il test che normalmente viene eseguito è sensibile alla metilazione del DNA, e verifica il contributo paterno delle regioni genomiche PWS. Fisiologicamente, infatti, il cromosoma materno viene metilato in modo che i geni non vengano espressi, mentre quelli paterni non sono metilati. La PWS si verifica quando la copia paterna della regione PWS è assente o metilata, e quindi silenziata. In tutti e 7 i pazienti coinvolti nello studio non è stata riscontrata nessuna anomalia nelle regioni PWS con il completo sequenziamento dell'esoma (18,51). Nessuno studio ha però ancora esaminato i livelli di espressione di questi geni nei pazienti con ROHHAD; quindi non è ancora possibile escludere la presenza di alterazioni epigenetiche oppure il coinvolgimento di altri geni associati alle regioni PWS (51).

Oltre all'aspetto genetico, ci sono aspetti fenotipici che aiutano a differenziare la diagnosi tra le due sindromi: *in primis*, l'esordio della patologia è caratterizzato da tempi differenti, perché i bambini con PWS presentano già le prime manifestazioni patologiche in epoca neonatale, mentre nella sindrome ROHHAD il paziente viene descritto come sano solitamente fino ai 2 anni di vita.

Le 4 manifestazioni tipiche della ROHHAD (obesità a rapido esordio, disturbi ipotalamici e autonomici, ipoventilazione) sono presenti anche nella PWS, ma con alcune caratteristiche differenti: per esempio, l'ipoventilazione nella PWS risulta essere meno severa e spesso i pazienti non necessitano di un supporto con ventilazione artificiale (1). Nonostante ciò, sono stati riportati casi di pazienti morti per arresto cardiorespiratorio e quindi, dopo aver documentato la presenza di ipoventilazione, è necessario monitorare il

paziente e trattarlo se necessario (51). Infine, la risposta ai test di funzionalità respiratoria è differente nelle due sindromi (38), così come il grado di iperfagia, l'andamento dell'aumento di peso, alcune manifestazioni di disfunzionalità autonoma e ipotalamica. Da questo si può dedurre che il meccanismo alla base dei sintomi di queste patologie sia differente.

Il *workup* diagnostico è molto vario, vista l'eterogeneità della presentazione clinica, ed estremamente complesso per la mancanza di un test diagnostico specifico; l'obesità può essere studiata tramite morfometria, bioimpedenziometria e calcolando il BMI del soggetto. La disfunzione ipotalamica viene invece diagnosticata tramite indagini ormonali, quali: secrezione di ADH/copeptina, IGF-1, funzionalità tiroidea, prolattina, funzionalità gonadotropica, ACTH. Fondamentale in età pediatrica, in presenza di poliuria e polidipsia, è il test di deprivazione dell'acqua, che consente di studiare la natura delle alterazioni nell'equilibrio idroelettrolitico.

Una RM encefalo può essere utilizzata per escludere la possibilità di un'anomalia ipotalamo-ipofisaria, che spieghi il quadro clinico dei pazienti. Ad oggi sono stati riportati, in seguito a RM encefaliche, casi ROHHAD associati a ipodensità bilaterali ai gangli della base (29), cisti della tasca di Rathke (7,8), ipointensità a livello pontino e mesencefalico (7), atrofia cerebrale generalizzata (33).

Nello studio eseguito da Ize-Ludlow e colleghi, circa un terzo dei pazienti presentava alterazioni alla RM, per lo più a livello pontino e mesencefalico, e danni ischemici diffusi. È stato però ammesso che molte delle immagini presentate sono state prodotte dopo la morte per arresto cardiorespiratorio (7).

Come sopra riportato, Chow e colleghi hanno descritto il caso di un ragazzo con ROHHAD, in cui è stata rilevata una iperintensità in T2 a livello del grigio periacquoduttale (28). Visto il suo ruolo importante nelle risposte sensoriali e autonome agli stimoli e nel controllo delle funzioni corporee di base, un suo coinvolgimento spiegherebbe i diversi aspetti della ROHHAD.

Risultano spesso però interessate anche le vie nervose coinvolte nella vista, che portano poi a manifestazioni come alterata risposta alla luce e strabismo.



Studi sul liquido cefalorachidiano permettono di rilevare anomalie come pleiocitosi, presenza di bande oligoclonali e elevati livelli di neopterinina (28).

Conoscere i livelli di glucosio, colesterolo, trigliceridi e insulina è fondamentale per riscontrare la presenza di un disordine metabolico.

Per quanto riguarda l'ipoventilazione, è necessario eseguire una polisonnografia, un test di funzionalità polmonare e valutare i livelli di gas ematici e la capnografia transcutanea (o end-tidal) durante il sonno. Per studiare l'aspetto cardiaco è sempre consigliato eseguire ecocardiogramma e monitoraggio Holter 24h.

Vari esami vengono poi richiesti per studiare la disregolazione autonoma, come l'ecocardiografia, gli anticorpi antitransglutaminasi, l'EEG. Si è soliti eseguire sempre anche test genetici, per ricercare eventuali mutazioni riconducibili ad una sindrome nota.

Per la diagnosi di eventuali NET, alcuni studi consigliano, durante il follow-up, il dosaggio di metaboliti delle catecolamine nelle urine (acido omovanillico e vanilmandelico), lo screening per l'enolasi neurone-specifico, la scintigrafia con <sup>123</sup>I-MIBG (metaiodobenzilguanidina) e RM al torace e addome. È pratica comune eseguire uno screening annuale con RM, intensificando la frequenza i primi 2 anni dopo la diagnosi (9).

Una volta diagnosticata la sindrome ROHHAD, è necessario monitorare il paziente ogni 3-6 mesi, per assicurarsi che la ventilazione sia trattata adeguatamente, tramite la saturazione dell'emoglobina (>95%) e i livelli di pCO<sub>2</sub> (35-45 mmHg). Il trattamento varia a seconda delle manifestazioni che il paziente presenta.

Al riscontro di obesità è necessario intervenire con una dieta alimentare sana ed esercizio fisico, sebbene tali misure non siano di per sé sufficienti. La rimozione chirurgica di adenoidi e tonsille può essere necessaria, se considerata utile per ridurre gli episodi di OSA.

Per trattare i disturbi respiratori dei pazienti, in un primo tempo si utilizza solitamente NIV notturna. Circa la metà dei pazienti necessita di ventilazione artificiale 24h, mentre la restante parte solo di un supporto notturno. Quest'ultimo può consistere in tracheostomia e ventilazione meccanica, oppure ventilatore BiPAP (bilevel positive airway pressure). Si è notato che i pazienti che necessitano di un supporto ventilatorio tutto il giorno presentano manifestazioni respiratorie più precoci rispetto ai pazienti che richiedono un supporto solo

durante il sonno. Lo stesso non si è invece riscontrato per quanto riguarda i sintomi autonomici o ipotalamici (9).

Nel caso di un episodio acuto di distress respiratorio, è possibile procedere con una tracheostomia, ed eventualmente si può arrivare all'intubazione, in caso di insufficienza respiratoria acuta. È stato anche descritto un caso in cui è stato necessario utilizzare un pacemaker diaframmatico per trattare il paziente (36).

La gestione della respirazione è fondamentale non solo per evitare l'insorgere di un'insufficienza respiratoria, ma anche per evitare gli effetti di una ipercapnia protratta e per controllare al meglio il peso corporeo.

In molti casi si è notato un miglioramento delle condizioni cliniche dei pazienti in seguito alla somministrazione di immunoglobuline per endovena, Ciclofosfamide, Rituximab, Micofenolato, corticosteroidi (25,26): questa è una delle motivazioni per cui l'ipotesi patogenetica immunologica è una delle più accreditate. Ad oggi, sono molti gli studi che cercano di capire il motivo di tale risposta clinica.

La patologia ha un tasso di mortalità del 50-60% (41). Le cause di morte sono solitamente arresto cardiorespiratorio o shock settico con MOF (multiple organ failure) (31). La morte sopraggiunge all'incirca all'età di 10 anni (52).

## 1.2 OSAS e rischio trombotico

L'OSAS (obstructive sleep apnea syndrome) è un disturbo respiratorio che si manifesta durante il sonno, caratterizzato da un'ostruzione parziale prolungata delle alte vie respiratorie o un'ostruzione completa intermittente che impedisce la normale ventilazione, causando frammentazione del sonno e desaturazione della ossiemoglobina.

La gravità della sindrome viene valutata in base al numero medio di apnee o ipopnee per ore di sonno, su una specifica scala denominata AHI (apnea-hypopnea index). Nell'adulto, un AHI tra 5 e 15/h viene considerato OSAS lieve, tra 16 e 30/h moderato, superiore a 30/h severo. Per quanto riguarda i criteri pediatrici invece, si considera OSAS lieve tra 1 e 5/h e moderato-grave sopra i 5/h (53). I sintomi tipici comprendono russamento, sonnolenza diurna, cefalea al risveglio, disturbi dell'umore e del comportamento (54).

Si tratta di una condizione patologica che può colpire fino al 3% dei bambini in età prepuberale (55); la percentuale sale al 15% se si considera solo la popolazione pediatrica obesa, condizione a cui l'OSAS è strettamente collegata. Si è notato che la presenza di apnee notturne durante il sonno provoca un rischio aumentato di DM2 (diabete mellito di tipo 2), aterosclerosi, disturbi cardiovascolari, irrigidimento vascolare (56).

La patogenesi è multifattoriale e comprende fattori anatomici, craniofacciali e neuromuscolari (55). Diversi autori ritengono fondamentale anche il ruolo dell'infiammazione sistemica cronica. Negli ultimi anni sono molti i marker infiammatori di cui si è rilevata un'aumentata concentrazione ematica; probabilmente i livelli elevati cronici di citochine nel sangue portano ad una severa reazione sistemica infiammatoria, provocando importanti conseguenze a livello cardiovascolare e nervoso (57). Inoltre, sono stati ritrovati infiltrati infiammatori ed edema subepiteliale nei tessuti dei pazienti dopo adenotonsillectomia, nonché un aumento dell'espressione di IL8 sulle cellule epiteliali dei bronchi (58). I leucociti risultano essere aumentati soprattutto nello strato muscolare del palato molle e dei pilastri tonsillari: si pensa che tale infiammazione alla mucosa orofaringea dei pazienti possa essere una risposta alla continua vibrazione dei tessuti durante il russamento.

I cisteinil-leucotrieni sono dei potenti mediatori d'infiammazione, attivatori e chemioattrattori dei neutrofili. Un'*up-regulation* dei loro recettori LT1-R e LT2-R è stata

trovata nelle tonsille di bambini dopo adenotonsillectomia (59). Solitamente questa sovraespressione è presente anche nei pazienti con tonsilliti ricorrenti, ma risulta essere comunque inferiore rispetto ai livelli tipici dei pazienti con OSAS. Inoltre, la distribuzione all'interno del tessuto tonsillare risulta differente: mentre nei pazienti con tonsilliti ricorrenti LT1-R e LT2-R si ritrovano solo nell'epitelio tonsillare, nei pazienti con OSAS si riscontrano anche in aree extrafollicolari e all'interno dei vasi sanguigni. Sorprendente è stato scoprire che non risultano essere presenti nei centri germinativi: ciò sarebbe spiegato da una loro espressione solo nelle ultime fasi di maturazione cellulare, oppure da una migrazione attraverso i vasi (60).

I dati riguardanti le apnee notturne in pazienti pediatriche non sono molti, ma si è notata una correlazione con un aumentato rischio di sindrome metabolica e resistenza insulinica. Diversi studi hanno esaminato specificatamente il legame tra eventi cardiovascolari e OSAS nei bambini: vari fattori, tra cui disfunzione endoteliale, irrigidimento delle arterie, e infiammazione sistemica, sono coinvolti in questa associazione.

L'ipotesi è che, nei pazienti obesi, l'OSAS sia un fattore di rischio indipendente per eventi cardiovascolari, come modifiche strutturali carotidiche e irrigidimento delle grandi arterie, a prescindere dal grado di obesità, dall'insulino-resistenza, dalle misure di adiposità viscerale.

Lo studio di Koren del 2015 (61) si è posto l'obiettivo di valutare il contributo dell'obesità e dell'OSAS come indici di modifica della struttura macrovascolare nei pazienti obesi. Si è così scoperto che l'indice di massa corporea (BMI) è il principale predittore di IMT (intima-media thickness) carotideo e CFPWV (carotid-femoral pulse wave velocity), mentre l'OSAS non è un predittore indipendente. Il maggior impatto sull'AIX (augmentation index), aggiustando per la frequenza cardiaca, lo ha l'insulino-resistenza, mentre sul diametro CCA (common carotid artery) l'ETCO<sub>2</sub> (end-tidal pCO<sub>2</sub>) media e il sesso. L'HDL è un fattore predittivo minore di cIMTmax (maximal CCA IMT).

L'unico studio pediatrico che ha esaminato la relazione tra OSAS e rigidità arteriosa non ha riscontrato anomalie, ma ha riferito una maggiore vasodilatazione da GTN (trinitrato glicerico) nei bambini con desaturazione notturna dell'ossiemoglobina, probabilmente dovuta alla vasocostrizione basale da ipossiemia cronica (56).

Per la prima volta, con lo studio di Koren, si è esaminato il contributo dell'OSAS alla PWV e all'Aix. La CFPWV riflette un aspetto diverso rispetto ad esempio all'IMT, perché dipende dalla rigidità della parete arteriosa e non dalla funzione endoteliale. Nello studio l'obesità è risultata essere il principale correlato della PWV, piuttosto che la desaturazione notturna. L'ipotesi che ne deriva è che l'irrigidimento delle grandi arterie non sia indipendentemente correlato ad OSAS, ma piuttosto associato allo stress cronico che gli adulti riportano, e che richiede anni per agire. Di conseguenza, nei pazienti pediatrici non è ancora possibile visualizzare questi danni accumulati attraverso la misurazione di PWV e Aix (61).

Un aspetto inatteso riscontrato nello studio è il mancato rapporto tra ET<sub>CO<sub>2</sub></sub> notturno e diametro carotideo, dato che il diossido di carbonio è un vasodilatatore. Si è ipotizzato quindi che l'ipercapnia, rilevata dai chemocettori, porti ad un'attivazione del SNA ortosimpatico e dell'asse renina-angiotensina-aldosterone. L'angiotensina II ha diversi effetti, tra cui attivare il sistema dell'endotelina e l'enzima NADPH ossidasi, che aumenta la sintesi di superossido a discapito dell'ossido nitrico (NO). Essendo NO un potente vasodilatatore, questo compromette la vasodilatazione e porta a disfunzione endoteliale. L'endotelina-1 (ET-1) è invece un vasocostrittore sintetizzato a livello dell'endotelio e della muscolatura liscia vascolare. Se ET-1 si lega al recettore dell'endotelina tipo B l'effetto è vasodilatazione attraverso la sintesi di NO, mentre se si lega al recettore tipo A sulla muscolatura liscia provoca una vasocostrizione intensa e prolungata. Fisiologicamente NO inibisce la trascrizione di ET-1; tuttavia, in situazioni patologiche come nell'OSAS, il calo di NO provoca un'eccessiva attivazione del sistema dell'endotelina (54).

Nei pazienti che soffrono di OSAS e sviluppano quindi ipercapnia notturna cronica si ipotizza questo possa causare una diminuita dilatazione carotidea. Un'altra ipotesi è che l'ipercapnia cronica provochi inizialmente vasodilatazione cerebrale e, in un contesto di arterie centrali rigide, danni microvascolari: questo potrebbe portare ad una risposta vasocostrittoria protettiva da parte dell'arteria carotide (61).

Nei pazienti pediatrici con OSAS è stata dimostrata un'attivazione aumentata di NADPH ossidasi (62), ma inibendo l'enzima o bloccando il recettore dell'endotelina tipo A si

riduce la produzione di ROS (reactive oxygen species) e si ripristina la corretta vasodilatazione (54).

Nei pazienti adulti che soffrono di OSAS, in linea con l'ipotesi di una patogenesi infiammatoria, si sono riscontrati livelli elevati nel sangue di citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL $\beta$ , IL6, IL8,IFN $\gamma$ ) e mediatori della risposta infiammatoria sistemica (ICAM, VCAM, fattori della coagulazione, PCR) (58). Molte ricerche degli ultimi decenni stanno tentando di dimostrare lo stesso risultato anche nei pazienti pediatrici.

Nel 2010 è stato effettuato uno studio da Gozal per valutare i livelli di TNF $\alpha$  nel sangue dei pazienti con OSAS, e sono risultati aumentati rispetto ai controlli (63). Lo stesso esito si è ottenuto qualche anno prima con altri marker, come IL6 e IL8 (64). IL6 è una citochina proinfiammatoria fortemente coinvolta nella sintesi di PCR, nel rischio aterosclerotico e cardiovascolare. Viene prodotta in diversi tessuti, tra cui quello adiposo, a tal punto che i livelli plasmatici di IL6 possono anche riflettere il grado di adiposità del soggetto (65).

IL8 è una potente chemochina, fondamentale nell'infiammazione sistemica presente nell'OSAS, che è in grado indurre il rilascio di mieloperossidasi e ROS da parte dei neutrofili e richiamare cellule infiammatorie. La concentrazione di IL8 è stata riscontrata elevata anche nei pazienti obesi, questo perché lo stress ossidativo e l'attivazione simpatica sono presenti sia nell'OSAS che nell'obesità (59).

I bambini con OSA hanno anche una percentuale più elevata di neutrofili nell'espettorato, direttamente proporzionale alla severità della condizione (66). Nei pazienti pediatrici con OSAS, a differenza di quelli adulti, non si è riscontrata un'alterazione nei livelli di ICAM-1 mentre si è notata una forte associazione con l'obesità. Si ipotizza che questa differenza collegata all'età sia in realtà dovuta alla durata e alla gravità inferiore della malattia nei pazienti pediatrici (67).

Un altro marcatore che è stato studiato è l'IFN $\gamma$ , una citochina sintetizzata dai linfociti T helper 1, che risulta essere aumentata nei pazienti affetti da OSAS. La sua produzione segue solitamente un ritmo circadiano, con un picco nelle prime fasi del sonno e raggiungendo un livello minimo nelle ore mattutine: ciò ha suggerito che il sonno possa portare ad un'attivazione del sistema linfocitario T helper 1, a discapito di quello T helper 2. Nei pazienti OSAS questo ritmo viene mantenuto ma, rispetto ai controlli, il picco

avviene precocemente, probabilmente per un'alterazione dell'equilibrio T helper 1/T helper 2 (68).

A lungo si è cercato di comprendere anche il ruolo della PCR (proteina C-reattiva), importante marker di infiammazione e di rischio cardiovascolare. Si tratta di una proteina di origine epatica, che viene sintetizzata in risposta a una serie di segnali infiammatori, dove viene coinvolta anche IL6: diversi studi hanno dimostrato che nei bambini con OSAS è presente una concentrazione ematica di PCR più elevata, indipendentemente dal loro peso corporeo (65,69,70). Il dato risulta invece correlato alla severità dell'OSAS (AHI), al grado d'ipossiemia e di frammentazione del sonno (65,70).

In uno studio condotto da Kaditis nel 2004, non è stata rilevata nessuna differenza nei livelli di PCR tra i pazienti con OSAS e i controlli: si è ipotizzato che ciò sia dovuto ad una diversa prevalenza di obesità all'interno della coorte dello studio, rispetto agli altri studi eseguiti, ma anche a fattori genetici e ambientali (65,71). Questi valori, come si è dimostrato anche per altri fattori, si normalizzano con la terapia (72).

Di recente scoperta è il fatto che i valori ematici di PCR risultano essere particolarmente aumentati in tutti i pazienti con OSA che presentano anche disturbi cognitivi: questo probabilmente evidenzia sia la reazione infiammatoria che sta alla base dell'OSAS e che causa danno neuronale, sia il rilascio di PCR e altre pentrassine da parte dei neuroni danneggiati stessi (73).

Un ruolo piuttosto significativo sembrano ricoprirlo le citochine proinfiammatorie IL17 e IL23. IL17 è una molecola secreta dai linfociti T helper 17 e cellule dell'immunità innata, sotto lo stimolo di altre citochine proinfiammatorie, come IL1 e IL6. Una volta sintetizzata, IL17 crea degli omodimeri e eterodimeri che si vanno a legare al loro recettore specifico presente sulla superficie di cellule infiammatorie: ciò provoca una reazione infiammatoria, caratterizzata dal rilascio di altre citochine proinfiammatorie, neovascolarizzazione, reclutamento cellulare, danno tissutale. IL23 è invece una citochina immunomodulatoria che agisce sui linfociti T, affinché venga prodotto IFN $\gamma$ , ed è in grado di regolare le cellule T helper 17. In uno studio del 2016 si è scoperto che nei pazienti pediatrici con OSAS si riscontra un aumento anomalo di IL17 e IL23, soprattutto in coloro che presentano disturbi cognitivi (57).

Un altro marker che si è studiato nei pazienti con OSAS è il ligando CD40 solubile (sCD40L), una proteina che lega CD40 sulla superficie delle cellule endoteliali e promuove l'espressione di mediatori dell'infiammazione, fattori di crescita e del fattore tissutale (TF). Sono stati rilevati in circolo, nei pazienti adulti con OSAS, livelli aumentati di sCD40L, che si sono poi ridotti in seguito a terapia ventilatoria. È stato quindi eseguito uno studio anche su pazienti pediatrici, nel 2007, da Gozal e colleghi (55): l'obiettivo era dimostrare che la funzione endoteliale risulta essere alterata nei bambini con OSAS, a prescindere dal loro peso corporeo, e che in seguito alla terapia chirurgica di adenotonsillectomia questa può normalizzarsi. Ciò che è stato riscontrato è che la riperfusionemica nei pazienti con OSAS è severamente più lenta rispetto ai controlli, ma nella maggior parte dei soggetti si è normalizzata dopo terapia. In coloro che invece non hanno presentato un miglioramento, si è notata una forte familiarità per patologie cardiovascolari. Per quanto riguarda i livelli ematici di nitrotirosina e ADMA (inibitore endogeno dell'NO sintasi), non ci sono anomalie nei pazienti con OSAS, al contrario dei livelli di sCD40L, che risultano essere fortemente aumentati. Anche in questo caso, dopo l'adenotonsillectomia, si è verificato un miglioramento simile a quello verificatosi per la riperfusionemica (55).

Nonostante il risultato dello studio abbia confermato la teoria iniziale, si è anche dimostrato come la familiarità per patologie cardiovascolari giochi un ruolo chiave nella funzione endoteliale di questi pazienti. Quello che è stato ipotizzato è che ci sia un'interazione fra le due condizioni; quindi, l'OSAS in età pediatrica attiverebbe una serie di meccanismi che aumenterebbero il rischio cardiovascolare, e questo si manifesterebbe poi solo nei soggetti con familiarità, nonostante la terapia. Un'altra ipotesi è che l'OSAS nell'infanzia porti ad un'attivazione infiammatoria e all'avvio di processi aterosclerotici, come dimostrano gli elevati livelli di sCD40L nel sangue (55).

Nel 2016 Gozal ha eseguito un altro studio (74) sui pazienti pediatrici con OSAS, questa volta per misurare i livelli ematici di fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine (Lp-PLA2). Lp-PLA2 è una lipasi calcio-indipendente, sintetizzata da monociti e macrofagi, che perlopiù circola legata alle LDL; quando le LDL vengono ossidate a livello dell'intima vasale, la lipasi catalizza una reazione sulla loro superficie, portando al rilascio di lisofosfatidilcolina e acidi grassi ossidati. Questi ultimi stimolano l'espressione di molecole di adesione e citochine proinfiammatorie a livello endoteliale, favorendo



l'adesione e la trasformazione dei macrofagi in cellule schiumose. Inoltre, Lp-PLA2 è in grado direttamente di ridurre la capacità dell'endotelio di produrre NO. È ormai noto che questo enzima rappresenta un fattore di rischio indipendente delle patologie cardiovascolari e che risulta aumentato nel sangue di soggetti obesi, anche bambini: lo scopo dello studio di Gozal è valutare se questo incremento sia presente anche nei pazienti con OSAS. L'esito ha dimostrato che sia i bambini obesi che quelli normopeso ma che soffrono di OSAS presentano livelli ematici aumentati di Lp-PLA2. Inoltre, grazie alla terapia, è possibile notare un miglioramento dei valori (74).

Nel 2005 uno studio condotto da O'Brien e colleghi (67) ha studiato, per la prima volta, l'interazione tra SDB (sleep-disordered breathing) e attività autonoma nei pazienti pediatrici. Per fare ciò è stata utilizzata una tecnica non invasiva che consente di monitorare costantemente il tono simpatico dei vasi arteriosi, denominata PAT (peripheral arterial tonometry). Si tratta di una tecnica che utilizza la pletismografia a livello del dito ed elimina le pulsazioni venose, per misurare continuamente la forma d'onda del polso arterioso. PAT misura la variazione di volume pulsatile utilizzando una sonda pneumo-ottica, che riflette la variazione relativa del volume ematico nel dito. L'esame consiste nel posizionare su un dito di ciascuna mano un sensore e registrare per 5 minuti l'attività basale; dopodiché ad un braccio viene stretto il bracciale dello sfigmomanometro ad una pressione sovrasistolica per altri 5 minuti, misurando costantemente la reazione vasale. Infine, viene sgonfiato il bracciale e si misura per altri 5 minuti l'indice di iperemia reattiva (RHI). RHI è ciò che ci permette di valutare la funzione endoteliale; quindi, maggiore è il suo valore e migliore sarà la funzionalità dei vasi (75).

Un'attivazione del SNA ortosimpatico provoca vasocostrizione e la conseguente riduzione del segnale al PAT; quindi qualsiasi attivazione ortosimpatica può essere rilevata attraverso la perfusione periferica. In questo studio sono stati valutati 2 gruppi di bambini, con e senza OSAS: l'esame è stato eseguito prima in condizioni basali, poi dopo che ai pazienti era stato chiesto di fare 3 respiri profondi a distanza di 60 secondi l'uno dall'altro. Infine, ad un sottogruppo è stato proposto un ulteriore test dopo 5 minuti, che consisteva nell'inserire la mano sinistra in un contenitore pieno di acqua ghiacciata per 30 secondi, mentre si eseguiva l'esame. Sono state ideate queste due prove perché entrambe stimolano la vasocostrizione periferica attraverso il sistema ortosimpatico.

I risultati hanno dimostrato una maggiore attivazione simpatica nei bambini che soffrono di SDB, come dimostrato dalle attenuazioni del segnale PAT, e una maggiore latenza nel ritorno alle condizioni basali dopo i vari test, suggerendo una reattività vascolare alterata. La causa di questa disfunzione autonoma non è ancora chiara, ma si pensa che un ruolo importante sia rivestito dall'ipossia intermittente, l'ipercapnia e i continui risvegli a cui sono soggetti i pazienti con SDB. Un'altra ipotesi è che l'attivazione simpatica possa essere mediata dall'infiammazione del microcircolo, tipica di tali soggetti.

La disfunzione endoteliale è uno dei meccanismi principalmente coinvolti nel processo aterosclerotico e nei conseguenti disturbi cardiovascolari. Le cause di danno endoteliale in questo contesto non sono ancora del tutto chiare, ma si ipotizza un ruolo importante dell'ipossiemia, della produzione di ROS e dell'infiammazione sistemica. L'OSAS è anche associato a condizioni patologiche come l'obesità e l'ipertensione, che concorrono all'incremento del danno. Sicuramente le apnee notturne sono una condizione che provoca un aumento dello stress ossidativo. I ROS risultano aumentati sia per la produzione da parte di neutrofili e monociti, sia per l'attivazione simpatica e l'ipossia intermittente. Lo stress ossidativo porta anche ad un aumento dell'espressione di molecole di adesione sull'endotelio, che provocano la migrazione di cellule infiammatorie e la formazione precoce di placche aterosclerotiche. L'ipercoagulabilità è un'altra condizione dovuta al danno endoteliale, perché l'esposizione dei tessuti subendoteliali della parete dei vasi attiva l'aggregazione piastrinica. Oltre a questo, nei pazienti con OSAS si sono riscontrati livelli aumentati di fattori della coagulazione (XII, VII), fibrinogeno, P-selectina, PAI-1 e complesso trombina-antitrombina nel sangue (67,76).

Nel 2018 è stato fatto uno studio da Zhang e colleghi, con l'obiettivo di valutare il danno endoteliale nei pazienti con OSAS ed identificare i potenziali fattori associati. Lo studio prevedeva l'utilizzo dell'esame EndoPAT per calcolare RHI dei pazienti; si è così dimostrato che i soggetti con OSAS presentano un importante danno endoteliale, maggiore anche dei coetanei che russano durante il sonno ma non presentano apnee notturne. Si è provata anche una associazione tra età e BMI con RHI (75). È importante sottolineare che non tutti i bambini con OSAS mostrano una funzione endoteliale anormale; la maggior parte presenta un RHI uguale a quello dei coetanei che russano solamente. Questo aspetto era già stato notato in diversi studi precedenti, e si è cercato di trovare il motivo di tale

eterogeneità; probabilmente un ruolo chiave è svolto dall'espressione genica, le modifiche epigenetiche, la risposta immunitaria e la differente attivazione dei processi di riparazione.

Durante recenti studi, si è notata l'associazione tra il marker aterogenico MRP8/14 (myeloid-related protein 8/14) e la disfunzione endoteliale presente nei pazienti OSAS. MRP8/14 è una calprotectina, secreta da monociti e neutrofili, grazie all'interazione con l'endotelio; si è riscontrata una *up-regulation* di questa proteina nei pazienti che soffrono di apnee notturne, e si pensa possa che ciò possa indicare il ruolo chiave rivestito da MRP8/14 nella regolazione dell'aterogenesi. I livelli di questa calprotectina sono ulteriormente peggiorati dalla presenza di obesità. È stato inoltre dimostrato che MRP8/14 contribuisce alla fisiologica risposta al danno vascolare ed è significativamente correlata ai livelli circolanti di PCR e IL6: di conseguenza questa proteina, non solo è un marcatore affidabile di OSAS, ma è utile anche per valutare la risposta infiammatoria dell'organismo nei confronti di condizioni come le apnee notturne e l'obesità (77).

È ormai evidente che i pazienti che soffrono di OSAS presentino un vasto numero di anomalie emostatiche che provocano un aumento di rischio per patologie vascolari, tra cui il tromboembolismo venoso. In particolare, i meccanismi coinvolti sono l'ipossia, l'iperattività autonoma ortosimpatica, lo stress ossidativo, l'infiammazione sistemica, il danno endoteliale e l'ipercoagulabilità. L'aumento dell'attività e della concentrazione di fattori della coagulazione e piastrine e una minore attivazione di PAI-1 indica la presenza di uno stato protrombotico.

In tutti gli studi che sono stati eseguiti, le apnee notturne sono sempre state rilevate come un fattore di rischio indipendente per il TEV (tromboembolismo venoso), sia TVP (trombosi venosa profonda) che TEP (tromboembolia polmonare). In particolare il rischio è risultato 2-3 volte aumentato rispetto alla popolazione generale (78).

Un'altra associazione a lungo studiata è quella con TIA e ictus: secondo uno studio del 2010 il 72% dei pazienti con ictus presenta SDB, di cui 30% ha una forma severa (AHI>30/h). La patogenesi di questa associazione non è ancora certa; probabilmente una parte di pazienti, prima dell'evento cerebrovascolare, presentava già apnee notturne non diagnosticate, a cui si sommano un'alterazione nella pervietà delle alte vie aeree e una maggior percentuale di tempo trascorso in posizione supina post-ictus. Inoltre, durante il sonno si ha fisiologicamente un aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> nel sangue. Dopo un

evento cerebrovascolare, il centro respiratorio a livello bulbare perde in parte la sua sensibilità alla CO<sub>2</sub> e questo porta a iperventilazione e di conseguenza ipocapnia: è possibile che una respirazione intermittente, con episodi di ipossia e ipercapnia, possa essere un meccanismo compensatorio per normalizzare la pCO<sub>2</sub>. Si ipotizza anche che la corteccia cerebrale possa fungere da soppressore di questi pattern respiratori patologici generati dal tronco encefalico ma, in seguito a un evento cerebrovascolare, questo controllo venga meno (79). L'AHI medio nei pazienti rimane costante nella fase acuta, subacuta e cronica dopo l'ictus (80).

Considerando l'associazione fra le due patologie, si è pensato inizialmente che trattare l'SDB potesse portare ad una riduzione del rischio di complicanze, come aritmie o ipertensione. Recenti studi hanno messo in discussione il potenziale beneficio di questa terapia, visto il carattere compensatorio della SDB. In uno studio si è notato addirittura un aumento della mortalità nei pazienti con scompenso cardiaco, dopo il trattamento della condizione respiratoria (79).

### **1.3 Obesità e rischio trombotico**

La prevalenza di obesità pediatrica negli ultimi decenni sta aumentando in modo preoccupante, con evidenti ripercussioni sulla salute. Negli USA la prevalenza dell'obesità di grado 3 in età pediatrica è del 17,3%, ed è una percentuale che ci si aspetta possa peggiorare nei prossimi anni. Questo provoca una serie di conseguenze ormai note, quali diabete mellito tipo 2 (DM2), sindrome metabolica, patologie cardiovascolari, OSA e PCOS (polycystic ovarian syndrome). Il motivo per cui questo trend in crescita desta tanta preoccupazione è legato al probabile aumento che si avrà nel prossimo futuro di eventi cerebrovascolari e cardiovascolari (81).

L'obesità aumenta la perossidazione lipidica e induce attivazione piastrinica, causando danno endoteliale e prematura aterogenicità. Il tessuto adiposo è un organo endocrino che fisiologicamente rilascia adipochine sia pro-infiammatorie, come TNF $\alpha$  o IL6, sia antiinfiammatorie, come l'adiponectina. Quest'ultima ha un ruolo fondamentale per l'omeostasi metabolica, perché sembra essere il modulatore dell'insulina, ha un ruolo protettivo contro l'infiammazione, stimola la produzione di NO e inibisce l'accumulo di lipidi nei macrofagi. Agisce anche a livello cardiaco, proteggendo i cardiomiociti dall'ischemia con la sintesi di NO e attivando COX2 (cyclooxygenases-2), ostacolando la fibrosi e l'ipertrofia cardiaca, migliorando la contrattilità e aumentando l'afflusso di calcio nelle cellule. A livello vascolare, l'adiponectina migliora la funzione endoteliale, riduce l'infiammazione, regola il rimodellamento muscolare e l'angiogenesi. Nei soggetti obesi si sono osservati bassi livelli di adiponectina, fin dall'infanzia.

Il precoce danno endoteliale presente nei bambini obesi viene confermato dalle alte concentrazioni nel sangue di fattore di von Willebrand (vWF), D-dimero, TAT (thrombin-antithrombin complex) e PAI-1: PAI-1 e vWF sono due marcatori di danno endoteliale, TAT indica una condizione di ipercoagulabilità e il D-dimero è associato ad un aumentato turnover della fibrina (81).

Diversi studi hanno analizzato l'associazione tra obesità e disturbi infiammatori e coagulativi. Rispetto ai controlli, nei pazienti obesi si è notata una concentrazione più elevata di insulina, leptina e PCR; l'attività del fibrinogeno e dei fattori della coagulazione VII e VIII è maggiore e PT (prothrombin time) e TT (thrombin time) più brevi. Non risultano invece alterati i livelli di antitrombina, D-dimero e aPTT (activated partial

thromboplastin time). Le correlazioni più forti sono state osservate tra il fibrinogeno e BMI, circonferenza della vita, PCR, insulina e leptina in entrambi i sessi: in particolare, la PCR risulta essere il determinante più forte per il fibrinogeno, la cui sintesi probabilmente viene stimolata da mediatori infiammatori prodotti dal tessuto adiposo. Livelli elevati di fibrinogeno sono stati associati a un aumentato rischio di eventi cardiovascolari; si è calcolato che un aumento della concentrazione di 1 g/L porta a un raddoppio del tasso di complicanze. Preoccupante è anche l'associazione con le trombosi venose: un aumento dei livelli di fibrinogeno da 3 a 5 g/L aumenta di quattro volte il rischio trombotico.

Anche la produzione del fattore VIII della coagulazione risulta essere indotta dagli stati infiammatori, ed in particolare essa viene stimolata da PCR e insulina. Questi riscontri hanno permesso di ipotizzare che la resistenza insulinica possa compromettere la funzionalità endoteliale e che la leptina vada a stimolare l'espressione del fattore tissutale (TF) (82,83).

Il fattore tissutale è una glicoproteina prodotta dal tessuto adiposo in seguito a stimoli infiammatori e in risposta alla leptina. Si è studiata l'attività procoagulante del TF (TF-PCA) nei bambini obesi e questa si è dimostrata effettivamente aumentata (83).

Un recente studio italiano ha valutato la possibile correlazione tra C-IMT, FMD e APAO (Antero-Posterior diameter of infra-renal abdominal Aorta) e l'obesità pediatrica. Ciò che è emerso dalla ricerca è che FMD non risulta essere legato a nessun parametro emostatico o metabolico; C-IMT è significativamente associato all'età, altezza e pressione arteriosa sistolica. APAO è l'unica misurazione che risulta essere strettamente dipendente dai parametri metabolici e antropometrici, ma non emostatici. Ad esempio, si è calcolato che ogni calo di 1 µg/ml nella concentrazione di adiponectina è associato ad un aumento di 0,065 mm di APAO. Studi precedenti avevano riscontrato anche una correlazione tra la concentrazione di adiponectina nel sangue e C-IMT (81).

Un altro meccanismo che può favorire il rischio trombotico è l'aumento della pressione intraddominale e la riduzione del ritorno venoso causato dall'adiposità centrale che promuove la stasi venosa (84). Anche se i bambini sono generalmente poco predisposti a eventi cardiovascolari e trombosi, l'obesità, insieme ad altri fattori, può portare ad un severo aumento di rischio (82).

Un interessante studio condotto nel 2013 ha valutato la prevalenza di pazienti obesi o sovrappeso in un gruppo di 53 bambini con trombosi venosa cerebrale e ictus. Il risultato ha indicato un'aumentata prevalenza di obesità nel gruppo di bambini con trombosi venosa, a dimostrare la stretta correlazione fra le due condizioni (85).

Un altro studio è stato eseguito nel 2014 sempre con lo stesso obiettivo. Si sono studiati 48 pazienti, di cui 21 obesi, che hanno avuto un episodio di tromboembolismo venoso, e si sono comparati con un gruppo di controllo composto da 274 bambini, di cui 69 obesi. La probabilità di un bambino obeso di sviluppare una trombosi è stata calcolata come 2,1 volte superiore ai suoi coetanei sani (84).

L'obesità è una condizione che porta a numerose complicanze, e per questo motivo deve essere trattata fin dalla giovane età. Una corretta terapia può portare a una riduzione del rischio trombotico e cardiovascolare in età adulta. Solitamente i bambini obesi hanno un rischio raddoppiato di trombosi venosa rispetto ai coetanei, ma coloro che riescono a raggiungere il loro normopeso entro i 13 anni dimostrano un rischio pari a quello della popolazione generale: questo dimostra l'importanza di un corretto monitoraggio e trattamento dei pazienti pediatrici obesi (86).

## 1.4 EndoPAT

Ormai è noto che l'alterazione dell'endotelio sia un importante predittore precoce di patologie cardiovascolari, visto il suo ruolo nel promuovere la vasodilatazione, la fibrinolisi e l'effetto antiaggregante. L'endotelio vasale, se danneggiato da stimoli come l'ipertensione e il fumo, può rilasciare una cascata di fattori pro-trombotici, infiammatori e aterosclerotici (87).

Nella popolazione pediatrica la disfunzione endoteliale è stata riscontrata in alcune patologie come il diabete di tipo 1 (DM1) e di tipo 2 (DM2), la disfunzione ipotalamica associata a diverse endocrinopatie, l'insufficienza renale e la sindrome metabolica (88,89).

Essendo una condizione che può portare ad aterosclerosi, e di conseguenza a coronaropatie o ictus, se venisse diagnosticata e trattata precocemente, si potrebbe evitare una progressione del danno a livello vasale. Per fare ciò, esistono test invasivi, come l'angiografia coronarica, o non invasivi, che vengono preferiti da utilizzate come screening nella popolazione pediatrica (87).

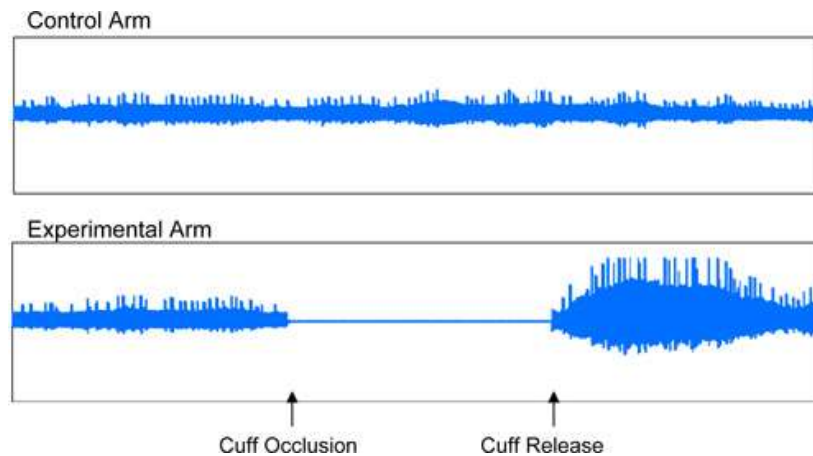
Endo Peripheral Artery Tonometry 2000 (EndoPAT 2000) è un nuovo esame non invasivo, che misura la disfunzione endoteliale, ideato da Itamar Medical (Cesarea, Israele). La tonometria arteriosa periferica (PAT) sfrutta l'iperemia reattiva indotta in un polpastrello della mano, dopo l'occlusione temporanea del flusso sanguigno, per valutare lo stato dell'endotelio microvascolare (89,90).



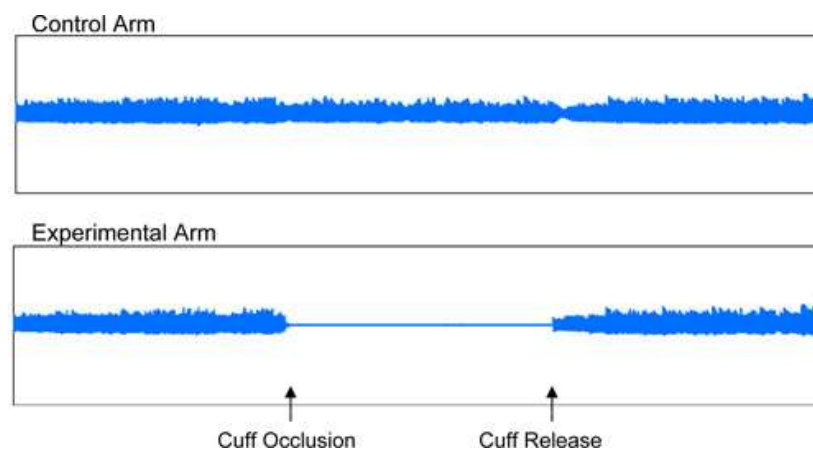
**Immagine 1.** Endo Peripheral Artery Tonometry 2000 (EndoPAT 200) (91)



L'esame consiste nel posizionare delle sonde pletismografiche sugli indici delle mani del paziente, con il fine di misurare l'ampiezza delle onde del polso arterioso. La registrazione prevede 3 fasi di 5 minuti ciascuna: linea di base, fase ischemica e fase post-ischemica. Nella prima fase viene misurato il segnale base proveniente dalle due sonde. Dopodiché viene gonfiato il bracciale dello sfigmomanometro, precedentemente posizionato sul braccio non dominante del paziente, e mantenuto gonfio per 5 minuti. La pressione di gonfiaggio viene mantenuta ad un minimo di 200 mmHg. In questo modo si potranno osservare segnali differenti provenire dalle due sonde pletismografiche. Nell'ultima fase, il bracciale viene rapidamente sgonfiato e si registra così l'iperemia reattiva per il tempo rimanente.



**Immagine 2.** EndoPAT con esito nella norma. Si può notare la presenza di un aumento del segnale in seguito al rilascio dello sfigmomanometro, indice di una normale funzione endoteliale (92)



**Immagine 3.** EndoPAT con esito patologico. Si può notare la mancanza di una reazione vasodilatatoria proveniente dalla sonda del lato ischemizzato, tipica di soggetti con danno endoteliale (92)

Ciò che deriva da questa misurazione è l'indice iperemico reattivo (RHI), calcolato come il rapporto tra l'ampiezza dell'onda del polso (PWA) media e l'ampiezza media durante il periodo di equilibrio. Per evitare interferenze con l'ambiente esterno, il risultato viene normalizzato con il segnale contemporaneo proveniente dal dito controlaterale. Minore risulta essere RHI, maggiore è il danno endoteliale. Nella popolazione adulta, per essere considerato normale, RHI deve essere superiore a 1,67. È preferibile fare una trasformazione logaritmica naturale di RHI (LnRHI) poiché indica un risultato più vicino alla distribuzione normale (90).

Tra i principali vantaggi abbiamo la semplicità di esecuzione, l'indipendenza dall'operatore, la pluralità di strutture nelle quali poter effettuare l'esame (90), e l'assenza di sensazioni dolorose per la maggior parte dei soggetti testati (93).

EndoPAT è stato studiato prevalentemente nella popolazione adulta, in quanto i bambini e gli adolescenti sono soggetti a cambiamenti ormonali che possono influenzarne il risultato. In particolare, è stato visto come con l'aumentare dell'età, fino all'età adolescenziale, i livelli di RHI tendano ad aumentare, anche nei soggetti sani. In diversi studi, si è notata la correlazione tra la concentrazione ematica di DHEAS (deidroepiandosterone solfato) e la funzione endoteliale, proprio a dimostrare l'effetto positivo degli ormoni puberali sulla maturazione dei vasi (90,94,95). Inoltre gli estrogeni, legandosi al loro recettore situato sull'endotelio e sulle cellule muscolari lisce dei vasi, hanno un effetto vasodilatante. Estrogeni e DHEAS inducono anche la produzione endoteliale di ossido nitrico (NO) (94,95). Nel 2016 Hidgins e colleghi hanno ipotizzato che nei bambini la microcircolazione dei polpastrelli sia molto complessa e si modifichi con il tempo, spiegando questa differenza età-dipendente (95).

Un altro limite dell'esame EndoPAT è che non è mai stato ideato un cut-off di RHI specifico per l'età pediatrica.

Sono stati fatti diversi studi, utilizzando EndoPAT in pazienti pediatriche obese, con il fine di identificare in essi precocemente un RHI alterato rispetto ai coetanei normopeso. I risultati sono stati molto vari: in alcuni casi è stato misurato un indice RHI significativamente più basso nei gruppi composti da soggetti obese (96,97), in altri studi questo non è stato riscontrato (88,90,94,98,99).

Un esempio è lo studio condotto da He e colleghi nel 2022, che ha interessato 545 soggetti, tra i 7 e i 17 anni, di cui 80 sovrappeso e 73 obesi. In questo caso si è notato che l'indice RHI risultava essere assolutamente indipendente dal BMI dei pazienti, bensì essere correlato all'età. In particolare è stato dimostrato che i bambini in fase post-puberale hanno una risposta vasodilatatoria periferica maggiore rispetto a chi si trova in età pre-puberale (98). Si è concluso che questo possa essere correlato maggiormente ad una funzione microvascolare ancora immatura, piuttosto che ad un danno endoteliale (89).

Un altro studio è stato condotto da Czipelova e colleghi nel 2019, e ha coinvolto 58 partecipanti, tra i 12 e i 23 anni, suddivisi in due gruppi in base al BMI. Non è stata riscontrata nessuna differenza fra i risultati, ma si è scoperto che i pazienti obesi iniziavano il test con un livello di vasocostrizione periferica inferiore, rispetto ai soggetti normopeso, e questo, a parità di RHI, indica una funzione endoteliale ben conservata (88).

Nel 2020, Kochummen e i suoi colleghi hanno ideato uno studio con 58 pazienti pediatriche, dividendoli in 3 gruppi sulla base della diagnosi di obesità, diabete mellito di tipo 1 o di tipo 2. Non è stata rilevata nessuna differenza fra questi soggetti per quanto riguarda l'indice RHI, ma è sempre stato registrato un RHI inferiore al cut off 1,67. Questo indica che sia il diabete che l'obesità creano un danno all'endotelio vascolare e influiscono sull'iperemia reattiva (96).

EndoPAT è stato utilizzato anche come test per diagnosticare un danno endoteliale nei pazienti affetti da disturbi respiratori come OSAS. In particolare, è stato visto come l'indice RHI in questi pazienti fosse notevolmente inferiore rispetto a soggetti sani. Inoltre, è stato dimostrato come la perdita di peso, non solo vada a migliorare la condizione patologica, ma anche la disfunzione endoteliale (75,100).

## 2. MATERIALI E METODI

Il Comitato Etico dell'Istituto di Ricovero e Cura a carattere scientifico Giannina Gaslini di Genova ha approvato questo studio (n°IGG-MOMA007) e il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti, dai genitori o dal tutore legale prima del suo inizio.

### 2.1 Obiettivo dello studio

L'obiettivo principale di questo studio è valutare la funzione endoteliale in soggetti affetti da sindrome ROHHAD, confrontati con soggetti affetti da tumore ipotalamico o da obesità semplice.

L'obiettivo secondario è valutare, negli stessi soggetti, i fattori di rischio trombotico e descrivere l'eventuale associazione tra parametri coagulativi e BMI, la presenza di disturbi respiratori del sonno, difetti ormonali, resistenza insulinica.

### 2.2 Soggetti

La popolazione studiata consiste in 28 soggetti, di cui 9 maschi e 19 femmine, con età compresa tra gli 8 e i 30 anni. Il gruppo in esame è composto da 14 pazienti affetti da Sindrome ROHHAD (4 maschi e 10 femmine), con età compresa tra 8 e 30 anni. Quattro di questi ultimi (1 maschio e 3 femmine) sono deceduti prima del completamento di questo studio. Il primo gruppo di controllo comprende 8 soggetti obesi (3 maschi e 5 femmine), con età compresa tra 9 e 18 anni. Il secondo gruppo di controllo è composto da 6 soggetti affetti da tumori ipotalamici (2 maschi e 4 femmine), con età compresa tra 10 e 26 anni.

Il criterio d'inclusione per il gruppo in esame è la diagnosi clinica di Sindrome ROHHAD. Sono stati esclusi tutti i soggetti ritenuti non capaci di comprendere o collaborare per l'esecuzione del test EndoPAT.

La Sindrome ROHHAD è stata diagnosticata da specialisti in Endocrinologia Pediatrica. La diagnosi è per lo più clinica e vengono utilizzati i criteri elencati in **Tabella 1**.

Per avere una diagnosi certa è necessario riscontrare la presenza di:

- 3 criteri maggiori  
oppure
- $\geq 2$  criteri maggiori +  $\geq 2$  criteri minori.

In presenza di:

- $\geq 1$  criterio maggiore +  $\geq 4$  criteri minori  
oppure
- $\geq 2$  criteri maggiori +  $\geq 1$  criterio minore

la diagnosi è probabile (ulteriori sintomi possono comparire durante il follow up).

Criteri maggiori	Criteri minori
Obesità a rapida insorgenza tra 2 e 5 anni	Disautonomie/alterazione della sensibilità dolorifica
Ipoventilazione centrale con necessità di ventilazione non invasiva (NIV) o ventilazione invasiva in sonno	$\geq 1$ endocrinopatia (deficit di GH -GHD-, ipotiroidismo centrale, pubertà precoce centrale, ipogonadismo ipogonadotropo, sindrome di Cushing, insufficienza surrenalica centrale, diabete insipido centrale)
Tumore neurale (ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, neuroblastoma)	Iperprolattinemia
	Strabismo
	Problemi comportamentali
	Alterazioni idroelettrolitiche

**Tabella 1.** Criteri diagnostici per Sindrome ROHHAD/ROHHADNET

Per quanto riguarda i gruppi di controllo, nel primo gruppo sono stati inclusi soggetti con obesità e sindrome metabolica, escludendo giovani con diagnosi di diabete mellito (DM), con segni e sintomi suggestivi di sindrome ROHHADNET o di obesità sindromica/genetica o non in grado di collaborare. Nel secondo gruppo sono stati inseriti invece solo soggetti con diagnosi di tumore ipotalamico, in grado di collaborare per l'esecuzione del test EndoPAT.

I controlli sono stati appaiati con i pazienti in base a sesso, età e BMI SDS.

Le fasce di età utilizzate sono: 8-9.99 anni, 10-13.99 anni, 14-17.99 anni,  $\geq 18$  anni.

Per quanto riguarda il BMI SDS, si sono scelti controlli che si discostassero di massimo  $\pm 1$  deviazione standard dai pazienti.

## 2.3 Metodi

Sono stati misurati altezza (h) e peso (w) e l'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come

$$BMI = w/h^2$$

Le misurazioni sono state fatte con approssimazione di 0,5 cm e 0,5 kg, al mattino a digiuno, a piedi nudi e indumenti leggeri, con strumenti standard, regolarmente calibrati.

La pressione arteriosa è stata misurata in tre diverse occasioni, a distanza di un minuto l'una dall'altra, ed è stato calcolato il valore medio. È stato utilizzato un apparecchio automatico, con un bracciale delle dimensioni adeguate, posto attorno al braccio non dominante del paziente.

La diagnosi di obesità è stata eseguita secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Per i soggetti fino ai 18 anni, utilizzando le curve di riferimento, viene considerato indicativo di obesità un BMI > 97° percentile e obesità grave > 99° percentile. Nei pazienti di età adulta si diagnostica l'obesità con un BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, potendo specificare se lieve (30-34,9 kg/m<sup>2</sup>), moderata (35-39,9 kg/mg<sup>2</sup>) o grave ( $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>).

La diagnosi di OSAS è stata eseguita grazie alla poligrafia notturna, attraverso la registrazione del flusso nasale, dei movimenti toracici e addominali, della saturazione emoglobinica di ossigeno, della frequenza cardiaca, la pletismografia e la rilevazione delle posizioni mantenute in sonno e dei movimenti. L'indice di apnea ostruttiva è stato calcolato dividendo il numero di apnee ostruttive per le ore di sonno notturne. La diagnosi viene considerata per AHI  $\geq 1$ /h nel bambino fino a 13 anni, AHI  $\geq 5$ /h nell'adulto e nel bambino di età  $\geq 13$  anni. L'indice di desaturazione dell'ossigeno (ODI) è stato definito invece come il numero di episodi di desaturazione emoglobinica dell'ossigeno (almeno 3 punti percentuale), diviso per il numero di ore di registrazione.

La diagnosi di ipoventilazione centrale è stata effettuata tramite capnografia transcutanea. Si definisce ipoventilazione la presenza di pCO<sub>2</sub> transcutanea >50 mmHg per più del 25% del tempo totale di sonno(37).

Gli esami EndoPAT sono stati eseguiti in posizione seduta, tra le 14:00 e le 16:00, in condizioni standard (temperatura della stanza costante e minimizzazione degli stimoli). I

pazienti sono stati istruiti a non parlare o muoversi durante l'esecuzione del test. È stato richiesto loro, inoltre, di evitare qualsiasi esercizio fisico nelle 24 ore precedenti l'esame. Nessun paziente ha manifestato reazioni avverse riconducibili ad EndoPAT.

I risultati delle misurazioni (RHI e LnRHI) sono stati calcolati automaticamente da EndoPAT 2000.

Gli esami emocromocitometrici, il profilo elettrolitico e coagulativo (aPTT, PT, fibrinogeno, antitrombina, proteina S, proteina C, fattore VIII di coagulazione, fattore di von Willebrand, d-dimero) sono stati eseguiti su campioni di sangue venoso periferico prelevati nelle prime ore del mattino, in seguito a digiuno notturno.

Per fare diagnosi di intolleranza glucidica e resistenza insulinica è stato eseguito il test da carico orale di glucosio (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT). L'esame consiste in un prelievo di sangue venoso, a digiuno da almeno 8 ore, per valutare la glicemia e l'insulinemia basale del paziente. Se il valore di glicemia riscontrato risulta essere inferiore a 126 mg/dL, il paziente viene invitato ad assumere 75 g di glucosio disciolti in circa 150 mL di acqua. I prelievi ematici vengono ripetuti a 30/60/90/120 minuti. Si fa diagnosi di intolleranza glucidica se, a 120 minuti dall'assunzione del carico di glucosio, la glicemia è 140-199 mg/dL. Si fa diagnosi di resistenza insulinica quando l'insulina basale risulta essere maggiore di 15  $\mu$ UI/mL oppure quando i valori di insulina a 120 minuti dal carico di glucosio superano 150  $\mu$ UI/mL oppure quando la somma dei valori di insulina misurati (basale, a 30/60/90/120 minuti dal carico) superano 300  $\mu$ UI/mL.

La diagnosi di deficit di ACTH è stata effettuata in pazienti che mostravano sintomi quali astenia, nausea, scarsa risposta allo stress, misurando i valori di ACTH e cortisolo plasmatico a digiuno. In caso di valori patologici (cortisolo basale < 3 mg/dL), la diagnosi è stata confermata mediante test con ACTH low dose, test con insulina e/o test con glucagone (101).

La diagnosi di ipotiroidismo centrale è stata fatta rilevando le concentrazioni di TSH, FT4 e FT3 nel sangue. Un valore di FT4 inferiore al range in assenza di incremento di TSH, o con TSH solo modicamente aumentato, confermato in due diversi prelievi, è sufficiente per la diagnosi di ipotiroidismo centrale (102).

La diagnosi di GHD è stata posta, in soggetti con criteri clinici come da consensus (103) e da note AIFA 39 (bassa statura o decanalizzazione staturale), misurando la concentrazione

ematica di IGF1 (Insulin-like growth factor 1) e IGFBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3) e, nel caso di valori inferiori alla norma, sono stati eseguiti due test di stimolo. In particolare, come test di stimolo, sono stati utilizzati il test di tolleranza all'insulina (ITT), l'infusione di arginina, clonidina, levodopa o glucagone. A seconda del farmaco utilizzato, sono state misurate le concentrazioni di GH in tempi differenti. La diagnosi di GHD si considera valida quando il picco di GH risulta inferiore a 8 ng/mL, dopo due stimolazioni farmacologiche. La diagnosi di GHD in età di transizione, in soggetti con GHD in età pediatrica, è stata effettuata tramite ITT e/o test GHRH + arginina.

## **2.4 Metodi statistici**

Innanzitutto, sono state effettuate le analisi statistiche descrittive; le variabili categoriche (es.: genere, intolleranza glucidica, ecc.) sono state riportate in termini di frequenze assolute e percentuali; le variabili quantitative (es.: BMI SDS, RHI, ecc.) sono state riportate in termini di mediana e primo e terzo quartile (1° - 3° q), dato che le distribuzioni non erano normali ma asimmetriche (*skewed*). In alcuni casi il numero di dati disponibili era estremamente esiguo ed in questi casi è stato riportato il valore minimo e massimo.

L'associazione tra diverse variabili categoriche è stata valutata mediante test Chi quadrato oppure mediante il test Esatto di Fisher in caso di un numero di frequenze attese inferiore a 5.

La relazione tra variabili quantitative nei gruppi di pazienti, con sole due modalità (es.: fibrinogeno nei pazienti con/senza tumore neurale), è stata valutata mediante il test non parametrico U di Mann-Whitney (dato il basso numero di casi e dunque variabili non distribuite in modo normale). L'analisi della normalità delle distribuzioni è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk.

La relazione tra variabili quantitative nei soggetti in esame, in caso di un numero di modalità superiore a 2 (es.: BMI-SDS nei pazienti ROHHAD, nei controlli obesi e nei controlli con tumore ipotalamico) è stata valutata mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis (che rappresenta un'analisi della varianza non parametrica).

L'analisi delle correlazioni tra parametri quantitativi (es.: RHI vs BMI SDS) è stata effettuata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (rS).



Questo coefficiente viene interpretato in modo analogo al coefficiente di correlazione parametrico di Pearson.

In questo studio è stata seguita l'interpretazione secondo Swinscow:

- $r_S < 0.2$ : la correlazione è assente o molto debole
- $r_S = 0.2 - 0.39$ : la correlazione è debole
- $r_S = 0.4 - 0.59$ : la correlazione è moderata
- $r_S = 0.6 - 0.79$ : la correlazione è forte
- $r_S \geq 0.8$  la correlazione è molto forte.

Questi limiti, sono stati proposti da Swinscow ma devono essere comunque considerati arbitrari e i risultati andrebbero valutati considerando soprattutto il plot dei dati (104).

Tutti i test statistici erano a 2 code; un valore di  $P < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo. Per la gestione e per l'analisi dei dati sono stati utilizzati i seguenti software:

- il software Microsoft Excel per la gestione dei dati
- il software “Statistica” (versione 9.1, Stat Soft Corporation, Tulsa, OK, USA) per il calcolo dei coefficienti di correlazione di Spearman e per la realizzazione dello “scatterplot” nelle analisi di correlazione lineare semplice
- il software “Stata” (versione 17, Stata Corporation, College Station, TX, USA) per le altre analisi inferenziali (test di Shapiro-Wilk, test chi-quadrato ed Esatto di Fisher, test U di Mann-Whitney, e Test di Kruskal-Wallis).

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Studio di pazienti con sindrome ROHHAD

In questo studio sono stati analizzati i dati di 14 pazienti con Sindrome ROHHAD. In **Tabella II** vengono riportate le principali caratteristiche prese in esame.

	N. (%)
Genere: Maschi	4 (28,6 %)
Femmine	10 (71,4 %)
	<i>Mediana (1° – 3° q)</i>
BMI SDS all'EndoPAT	3,4 (2,9 - 3,6)
BMI SDS (massimo raggiunto)	5,0 (4,4 - 7,3)
Deficit di GH	10 (71,4 %)
Ipotiroidismo centrale	10 (71,4 %)
Deficit di ACTH	9 (64,3 %)
Disordini del sodio	9 (64,3 %)
Iperprolattinemia	13 (92,9 %)
Disturbi respiratori del sonno	11 (78,6 %)
Tumore neurale	4 (28,6%)
Eventi tromboembolici maggiori	2 (14,3%)

**Tabella II.** Descrizione dei pazienti ROHHAD in studio [N = 14].

Per quanto riguarda i pazienti con sindrome ROHHAD che hanno eseguito EndoPAT [N=6], si è andata ad analizzare la relazione tra i risultati dell'esame (RHI e EndoPAT patologico/nella norma) e diverse variabili qualitative e quantitative.

In **Tabella III** e **Tabella IV** sono stati riportati i risultati dello studio della relazione tra alcune variabili cliniche ed EndoPAT (patologico/normale). A causa del numero estremamente esiguo di pazienti aventi un esame EndoPAT normale [N=2], non è stato possibile eseguire alcun test statistico.

In **Tabella III** sono state inserite le relazioni con le variabili categoriche.

	EndoPAT patologico [N=4] N. (%)	EndoPAT normale [N=2] N. (%)
Intolleranza glucidica: Sì	1 (25 %)	1 (50 %)
No	3 (75 %)	1 (50 %)
Resistenza insulinica: Sì	3 (75 %)	1 (50 %)
No	1 (25 %)	1 (50 %)
Tumore neurale: Sì	0 (0 %)	1 (50 %)
No	4 (100 %)	1 (50 %)

**Tabella III.** Valutazione della relazione tra variabili cliniche ed EndoPAT (Patologico/Normale) nei pazienti ROHHAD, che hanno eseguito l'esame EndoPAT [N = 6].

Si è potuto constatare che nei pazienti affetti da sindrome ROHHAD, non vi è relazione tra la presenza di intolleranza glucidica e/o resistenza insulinica e un'alterata funzione endoteliale.

Si è però evidenziato che tutti i pazienti con EndoPAT patologico [N=4], non presentano tumore neurale (NET); mentre tra i pazienti con risultato nella norma [N=2], è presente una diagnosi di NET.

In **Tabella IV** sono state studiate le relazioni tra alcune variabili quantitative, come BMI SDS al momento dell'EndoPAT e il profilo coagulativo dei pazienti e l'esito dell'EndoPAT.

Nel profilo coagulativo, i parametri esaminati sono:

- PT (%)
- aPTT (sec)
- Fibrinogeno (mg/100 mL)
- Fattore VIII (%)
- Fattore di von Willebrand (%)

	EndoPAT patologico [N=4] Mediana (Min - max)	EndoPAT normale [N=2] Valori osservati
BMI SDS all'EndoPAT	3,18 (2,53 - 3,96)	3,22 - 3,5
PT (%)	101,8 (90,1 - 108)	89,3 - 96,7
aPTT (sec)	25,6 (19,8 - 31,9)	26,8 - 33,7
Fibrinogeno (mg/100 mL)	336,5 (302 - 403)	246 - 303
Fattore VIII (%)	134,15 (68,43 - 201)	129,48 - 147,74
Fattore di von Willebrand (%)	127 (75,63 - 343)	65,55 - 107,26

**Tabella IV.** Valutazione della relazione tra variabili cliniche ed EndoPAT (Patologico/Normale) nei pazienti ROHHAD, che hanno eseguito l'esame EndoPAT [N = 6].

Nessuna di queste relazioni è risultata significativa.

Le stesse variabili qualitative e quantitative sono state studiate in relazione all'RHI.

Per quanto riguarda i parametri qualitativi, nessun risultato è stato considerato rilevante (**Tabella V**).

<b>Intolleranza glucidica</b>		
	Sì [N=2] Min - max	No [N=4] Mediana (Min - max)
RHI	1,00 - 1,77	1,21 (1,04 - 1,99)
<b>Resistenza insulinica</b>		
	Sì [N=4] Mediana (Min - max)	No [N=2] Min - max
RHI	1,16 (1,00 - 1,99)	1,15 - 1,77
<b>Tumore neurale</b>		
	Sì [N=1] Valore osservato	No [N=5] Mediana (Min - max)
RHI	1,99	1,15 (1 - 1,77)

**Tabella V.** Valutazione della relazione tra alcune variabili cliniche e RHI nei pazienti ROHHAD, che hanno eseguito l'esame EndoPAT [N = 6].

Le variabili quantitative sono state riportare in **Tabella VI**.

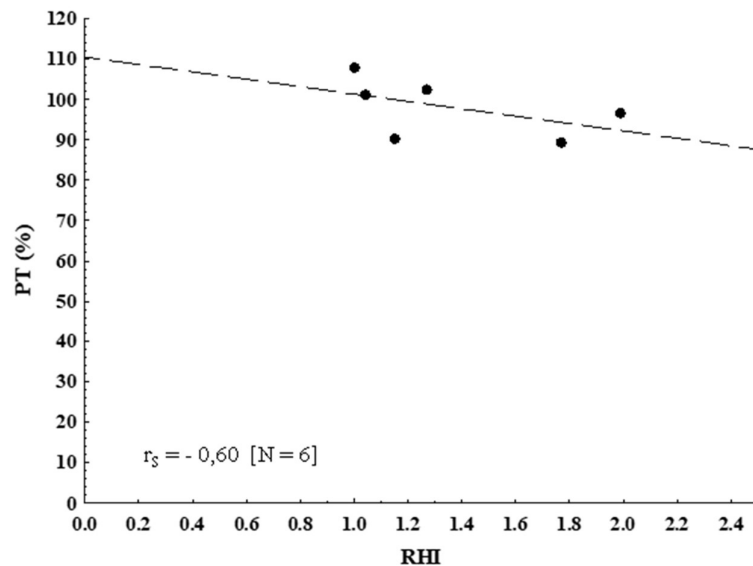
Correlazione tra RHI e:	N	$r_s$	P
PT (%)	6	<b>-0,600</b>	0,21
aPTT (sec)	6	0,314	0,54
Fibrinogeno (mg/100 mL)	6	<b>-0,657</b>	0,16
Fattore VIII (%)	6	0,200	0,70
von Willebrand (%)	5	<b>-0,500</b>	0,39
Antitrombina (%)	5	<b>-0,400</b>	0,70

$r_s$ : Coefficiente di Correlazione per Ranghi di Spearman.

**Tabella VI.** Correlazione tra parametri della coagulazione e RHI nei pazienti ROHHAD che hanno effettuato EndoPAT [N =6].

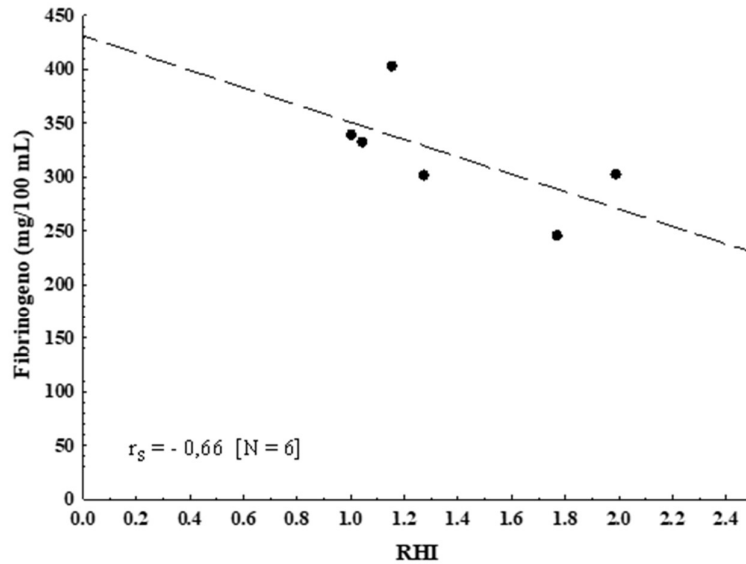
In quest'ultima analisi sono state trovate forti correlazioni negative tra:

- RHI e PT ( $r_s = -0,600$ ,  $p = 0,21$ ) (**Figura 1**)
- RHI e fibrinogeno ( $r_s = -0,657$ ,  $p = 0,16$ ) (**Figura 2**).



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 1.** Correlazione tra RHI e PT nei pazienti ROHHAD che hanno eseguito il test EndoPAT [N = 6].

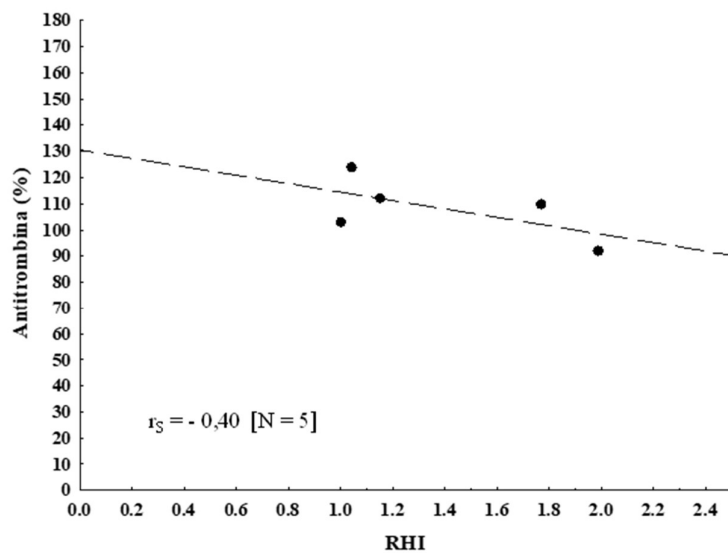


$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 2.** Correlazione tra RHI e fibrinogeno nei pazienti ROHHAD che hanno eseguito il test EndoPAT [N = 6].

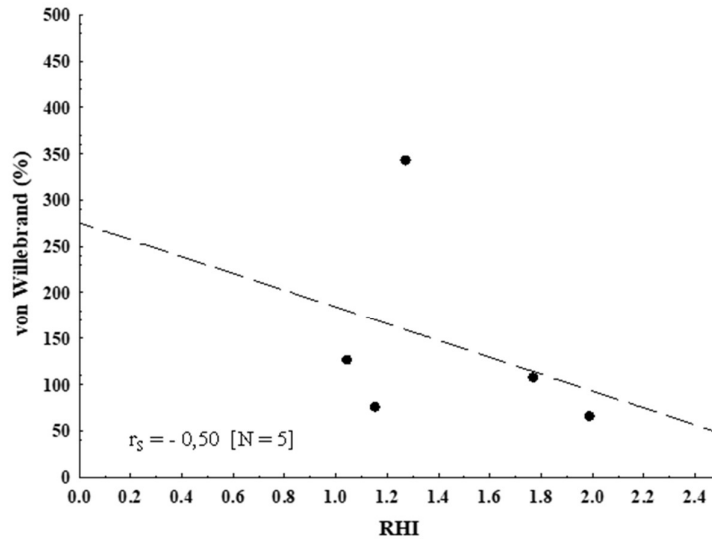
Altre correlazioni negative moderate sono state individuate tra:

- RHI e antitrombina ( $r_s = -0,400$ ,  $p = 0,70$ ) (**Figura 3**)
- RHI e fattore di von Willebrand ( $r_s = -0,500$ ,  $p = 0,39$ ) (**Figura 4**)



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 3.** Correlazione tra RHI e antitrombina nei pazienti ROHHAD che hanno eseguito il test EndoPAT [N = 5].



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 4.** Correlazione tra RHI e fattore di von Willebrand nei pazienti ROHHAD che hanno eseguito il test EndoPAT [N = 5].

Per tutti i pazienti con sindrome ROHHAD partecipanti allo studio, sono state studiate le relazioni tra il profilo coagulativo completo e alcune variabili quantitative e qualitative.

Tra le variabili qualitative sono state considerate:

- presenza di tumore neurale (**Tabella VII**)
- deficit di GH (**Tabella VIII**)
- ipotiroidismo centrale (**Tabella IX**)
- deficit di ACTH (**Tabella X**)
- disordini del sodio (**Tabella XI**)
- disordini respiratori del sonno (**Tabella XII**)

	Tumore neurale Sì [N=4] Mediana (Min - max)	Tumore neurale No [N=10] Mediana (Min - max)	P Test U di Mann- Whitney
PT (%)	101,35 (94,9 - 108,2)	99,45 (87,5 - 122,33)	0,73
aPTT (sec)	26,8 (22,6 - 35,2)	26,2 (16,9 - 122,5)	0,62
Fibrinogeno (mg/100 mL)	305,5 (210 - 363)	283,5 (29,3 - 527)	0,73
Fattore VIII (%)	129,48 (117,1 - 161,8) [N = 3]	152,87 (68,43 - 296) [N = 8]	-
von Willebrand (%)	110,56 (65,55 - 190,2) [N = 3]	127 (75,63 - 343) [N = 7]	-
Antitrombina (%)	97 (92 - 101) [N = 3]	110 (97 - 487) [N = 7]	-
Proteina C (%)	116 (109 - 141) [N = 3]	108 (98 - 150) [N = 6]	-
Proteina S (%)	71,1 (68,4 - 124,7) [N = 3]	91,6 (71,9 - 119,5) [N = 7]	-
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,3) [N = 3]	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 7]	-
Omocisteina (micromol/L)	9,5 (5,6 - 9,5) [N = 3]	10 (6 - 13) [N = 5]	-

**Tabella VII.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di tumore neurale nei pazienti ROHHAD [N =14].



	Deficit di GH Sì [N=10] Mediana (Min - max)	Deficit di GH No [N=4] Mediana (Min - max)	P Test U di Mann- Whitney
PT (%)	98,95 (87,5 - 108,2)	102,85 (96,8 - 122,33)	0,24
aPTT (sec)	26,8 (19,8 - 35,2)	25,3 (16,9 - 122,5)	0,61
Fibrinogeno (mg/100 mL)	302,5 (181 - 403)	302,5 (29,3 - 527)	0,84
Fattore VIII (%)	138,61 (68,43 - 201) [N = 8]	183 (110,3 - 296) [N = 3]	-
von Willebrand (%)	108,91 (65,55 - 343) [N = 8]	261,34 (199,47- 323,2) [N = 2]	-
Antitrombina (%)	105 (92 - 124) [N = 7]	103 (97 - 487) [N = 3]	-
Proteina C (%)	108,5 (98 - 150) [N = 8]	135 [N = 1]	-
Proteina S (%)	82,95 (68,4 - 124,7) [N = 8]	105,15 (90,8 - 119,5) [N = 2]	-
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 7]	0,3 (0,3 - 0,55) [N = 3]	-
Omocisteina (micromol/L)	9,5 (5,6 - 13) [N = 7]	10 [N = 1]	-

**Tabella VIII.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di deficit di GH nei pazienti ROHHAD [N =14].

	Ipotiroidismo centrale Sì [N=10] Mediana (Min - max)	Ipotiroidismo centrale No [N=4] Mediana (Min - max)	P Test U di Mann- Whitney
PT (%)	97,25 (87,5 - 108,2)	107 (96,7 - 122,33)	0,11
aPTT (sec)	26,2 (16,9 - 35,2)	26,8 (24,7 - 122,5)	0,43
Fibrinogeno (mg/100 mL)	283,5 (181 - 527)	305,5 (29,3 - 340)	0,95
Fattore VIII (%)	159,9 (68,43 - 296) [N = 8]	117,06 (110,3- 129,5) [N = 3]	-
von Willebrand (%)	158,61 (75,63 - 343) [N = 8]	88,06 (65,55 - 110,56) [N = 2]	-
Antitrombina (%)	107,5 (97 - 124) [N = 6]	100 (92 - 487)	0,51
Proteina C (%)	108 (98 - 150) [N = 7]	125 (109 - 141) [N = 2]	-
Proteina S (%)	98,4 (71,9 - 124,7) [N = 7]	71,1 (68,4 - 90,8) [N = 3]	-
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 7]	0,3 (0,3 - 0,3) [N = 3]	-
Omocisteina (micromol/L)	9,5 (6 - 13) [N = 5]	9,5 (5,6 - 10) [N = 3]	-

**Tabella IX.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di ipotiroidismo centrale nei pazienti ROHHAD [N =14].

	Deficit di ACTH Sì [N=9] Mediana (Min - max)	Deficit di ACTH No [N=5] Mediana (Min - max)	P Test U di Mann- Whitney
PT (%)	96,7 (87,5 - 108,2)	106 (102,4 - 122,33)	<b>0,012</b>
aPTT (sec)	26,8 (16,9 - 35,2)	24,7 (19,8 - 122,5)	0,54
Fibrinogeno (mg/100 mL)	303 (185 - 527)	302 (29,3 - 340)	0,36
Fattore VIII (%)	152,87 (68,43 - 296) [N = 8]	117,06 (110,3 - 201) [N = 3]	-
von Willebrand (%)	117,13 (65,55 - 323,2) [N = 8]	226,78 (110,56 - 343) [N = 2]	-
Antitrombina (%)	105 (92 - 124) [N = 7]	103 (97 - 487) [N = 3]	-
Proteina C (%)	108 (98 - 135) [N = 7]	145,5 (141 - 150) [N = 2]	-
Proteina S (%)	98,4 (71,1 - 124,7) [N = 7]	74,3 (68,4 - 90,8) [N = 3]	-
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,55) [N = 7]	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 3]	-
Omocisteina (micromol/L)	9,5 (5,6 - 13) [N = 5]	9,5 (7,6 - 10) [N = 3]	-

**Tabella X.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di deficit di ACTH nei pazienti ROHHAD [N =14].

	Disordini del sodio Sì [N=9] Mediana (Min - max)	Disordini del sodio No [N=5] Mediana (Min - max)	P Test U di Mann- Whitney
PT (%)	96,8 (87,5 - 108,2)	106 (96,7 - 122,33)	0,06
aPTT (sec)	26,5 (16,9 - 35,2)	26,8 (21,7 - 122,5)	0,87
Fibrinogeno (mg/100 mL)	302 (185 - 527)	303 (29,3 - 340)	0,44
Fattore VIII (%)	159,9 (68,43 - 296) [N = 8]	117,06 (110,3 - 129,5) [N = 3]	-
von Willebrand (%)	158,61 (75,63 - 343) [N = 8]	88,06 (65,55 - 110,56) [N = 2]	-
Antitrombina (%)	107,5 (97 - 124) [N = 6]	100 (92 - 487) [N = 4]	0,51
Proteina C (%)	108 (98 - 150) [N = 7]	125 (109 - 141) [N = 2]	-
Proteina S (%)	98,4 (71,9 - 124,7) [N = 7]	71,1 (68,4 - 90,8) [N = 3]	-
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 7]	0,3 (0,3 - 0,3) [N = 3]	-
Omocisteina (micromol/L)	9,5 (6 - 13) [N = 5]	9,5 (5,6 - 10) [N = 3]	-

**Tabella XI.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di disordini del sodio nei pazienti ROHHAD [N = 14].

	Disordini respiratori nel sonno Sì [N=11] Mediana (Min - max)	Disordini respiratori nel sonno No [N=3] Mediana (Min - max)
PT (%)	96,8 (87,5 - 108,2)	106 (101,2 - 122,33)
aPTT (sec)	25,9 (16,9 - 35,2)	31,9 (26,8 - 122,5)
Fibrinogeno (mg/100 mL)	302 (181 - 527)	308 (29,3 - 333)
Fattore VIII (%)	147,74 (68,43 - 296) [N = 9]	137,53 (117,06 - 158) [N = 2]
von Willebrand (%)	148,74 (65,55 - 343) [N = 8]	118,78 (110,56 - 127) [N = 2]
Antitrombina (%)	103 (92 - 112) [N = 7]	124 (97 - 487)
Proteina C (%)	109 (98 - 150) [N = 7]	124,5 (108 - 141) [N = 2]
Proteina S (%)	95 (71,1 - 124,7) [N = 8]	70,15 (68,4 - 71,9) [N = 2]
D-Dimero (mg/L)	0,3 (0,3 - 0,64) [N = 8]	0,3 (0,3 - 0,3) [N = 2]
Omocisteina (micromol/L)	9,75 (5,6 - 13) [N = 6]	7,75 (6 - 9,5) [N = 2]

**Tabella XII.** Relazione tra parametri della coagulazione e presenza di disordini respiratori nel sonno nei pazienti ROHHAD [N = 14].

A causa del ridotto numero di pazienti in esame, per alcune relazioni non è stato possibile eseguire alcun test statistico. Nonostante ciò, si è potuto notare un considerevole aumento dei valori del fattore di von Willebrand nei pazienti non affetti da deficit di GH e/o di ACTH, rispetto ai soggetti che ne sono affetti (**Tabella VIII** e **Tabella X**).

Inoltre, è evidente una relazione statisticamente significativa ( $p = 0,012$ ) tra presenza /assenza di deficit di ACTH e PT (**Tabella X**). In particolare, si è notato un valore di PT più basso nei pazienti affetti da sindrome ROHHAD con deficit di ACTH, rispetto a chi non lo presenta.

Tra le variabili quantitative, analizzate in relazione al profilo coagulativo completo, sono state inserite:

- ematocrito (**Tabella XIII**)
- sodiemia (**Tabella XIV**)
- ODI al momento del prelievo (**Tabella XV**)
- BMI SDS al momento del prelievo (**Tabella XVI**)

Correlazione tra Ht (%) e:	N	rs	P
PT (%)	14	-0,051	0,86
aPTT (sec)	14	-0,200	0,49
Fibrinogeno (mg/100 mL)	14	0,128	0,66
Fattore VIII (%)	11	-0,305	0,36
von Willebrand (%)	10	-0,347	0,33
Antitrombina (%)	10	-0,170	0,64
Proteina C (%)	9	-0,042	0,91
Proteina S (%)	10	0,024	0,95

*rs: Coefficiente di Correlazione per Ranghi di Spearman.*

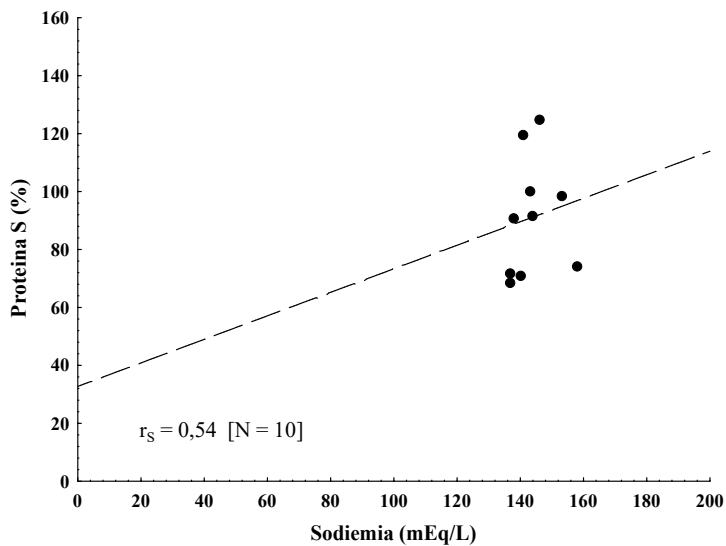
**Tabella XIII.** Correlazione tra parametri della coagulazione ed ematocrito nei pazienti ROHHAD [N=14].

Correlazione tra sodiemia (mEq/L) e:	N	rs	P
PT (%)	14	-0,374	0,19
aPTT (sec)	14	-0,189	0,52
Fibrinogeno (mg/100 mL)	14	0,135	0,65
Fattore VIII (%)	11	0,356	0,28
von Willebrand (%)	10	0,256	0,48
Antitrombina (%)	10	-0,067	0,85
Proteina C (%)	9	0,055	0,89
Proteina S (%)	10	<b>0,541</b>	0,11

*rs: Coefficiente di Correlazione per Ranghi di Spearman.*

**Tabella XIV.** Correlazione tra parametri della coagulazione e sodiemia nei pazienti ROHHAD [N = 14].

Una moderata correlazione positiva è stata riscontrata tra sodiemia e proteina S ( $r_s = 0,541$ ,  $p = 0,11$ ) (**Figura 5**).



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 5.** Correlazione tra sodiemia e proteina S nei pazienti ROHHAD [N = 10].

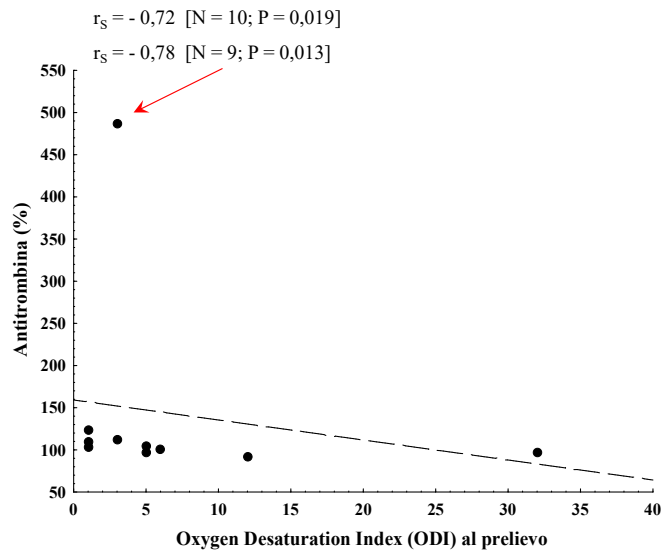
Correlazione tra			
Oxygen Desaturation Index (ODI) e:	N	$r_s$	P
PT (%)	14	-0,127	0,67
aPTT (sec)	14	0,026	0,93
Fibrinogeno (mg/100 mL)	14	-0,078	0,79
Fattore VIII (%)	11	0,256	0,45
von Willebrand (%)	10	0,178	0,62
Antitrombina (%)	10	<b>-0,721</b>	0,019
Proteina C (%)	9	<b>0,427</b>	0,25
Proteina S (%)	10	-0,238	0,51

$r_s$ : Coefficiente di Correlazione per Ranghi di Spearman.

**Tabella XV.** Correlazione tra parametri della coagulazione e Oxygen Desaturation Index (ODI) al prelievo nei pazienti ROHHAD [N = 14].

Una correlazione significativa è quella tra Oxygen Desaturation Index (ODI) al momento del prelievo e l'antitrombina ( $p = 0,019$ ). Fra i due parametri è presente una forte correlazione negativa ( $r_s = -0,721$ ).

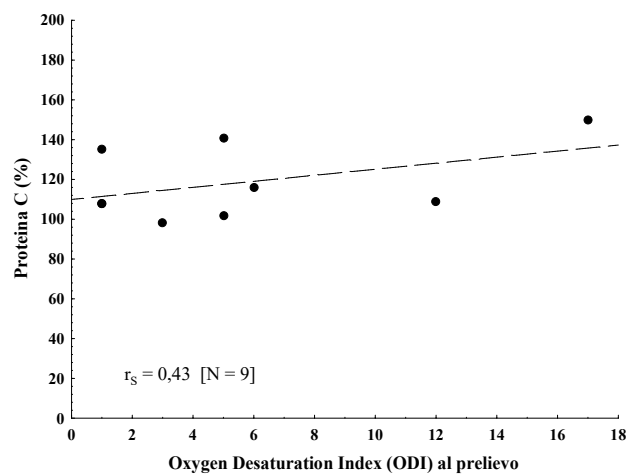
È stato inoltre notato come un valore di antitrombina si discostasse nettamente dagli altri 9 dati; quindi, è stata ripetuta l'analisi escludendolo. In questo caso la correlazione risulta ancora più evidente ( $r_s = -0,78$ ) e significativa ( $p = 0,013$ ) (**Figura 6**).



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 6.** Correlazione tra Oxygen Desaturation Index e antitrombina nei pazienti ROHHAD [N = 10].

Una modesta correlazione positiva è inoltre presente tra ODI e proteina C ( $r_s = 0,427$ ,  $p = 0,25$ ) (**Figura 7**).



$r_s$ : Coefficiente di Correlazione di Spearman

**Figura 7.** Correlazione tra ODI e proteina C nei pazienti ROHHAD [N = 9].



Correlazione tra:			
BMI SDS al prelievo e:	N	$r_s$	P
PT (%)	14	<b>0,552</b>	0,041
aPTT (sec)	14	<b>-0,541</b>	0,046
Fibrinogeno (mg/100 mL)	14	0,112	0,70
Fattore VIII (%)	11	<b>0,555</b>	0,08
von Willebrand (%)	10	<b>0,709</b>	0,022
Antitrombina (%)	10	-0,359	0,31
Proteina C (%)	9	<b>0,828</b>	0,006
Proteina S (%)	10	0,188	0,60
D-Dimero (mg/L)	10	<b>0,545</b>	0,10
Omocisteina (micromol/L)	8	-0,120	0,78

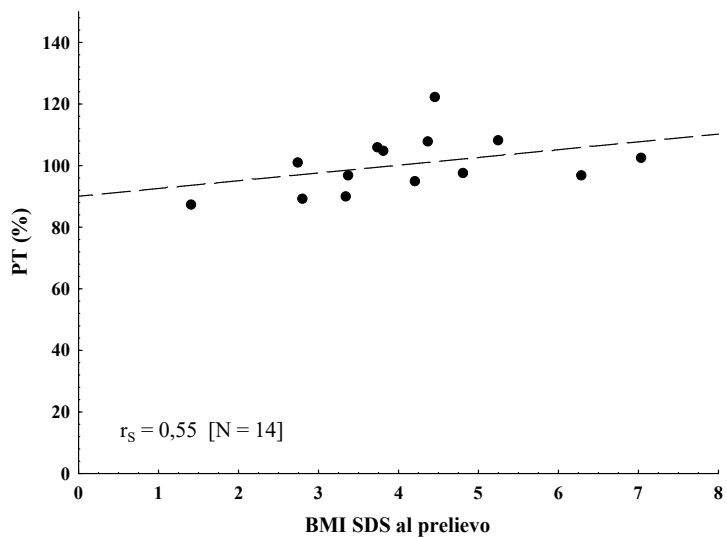
*$r_s$ : Coefficiente di Correlazione per Ranghi di Spearman*

**Tabella XVI.** Correlazione tra parametri della coagulazione e BMI SDS al prelievo nei pazienti ROHHAD [N = 14].

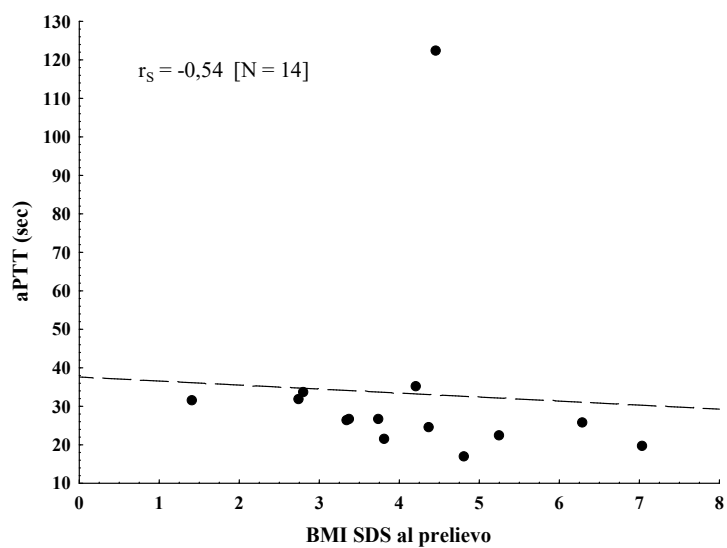
Altri dati significativi sono stati individuati ponendo in relazione il BMI SDS al prelievo con:

- PT ( $r_s = 0,552$ ,  $p = 0,041$ ) (**Figura 8**)
- aPTT ( $r_s = -0,541$ ,  $p = 0,046$ ) (**Figura 9**)
- fattore VIII ( $r_s = 0,555$ ,  $p = 0,08$ ) (**Figura 10**)
- fattore di von Willebrand ( $r_s = 0,709$ ,  $p = 0,022$ ) (**Figura 11**)
- proteina C ( $r_s = 0,828$ ,  $p = 0,006$ ) (**Figura 12**)
- D-dimero ( $r_s = 0,545$ ,  $p = 0,10$ )

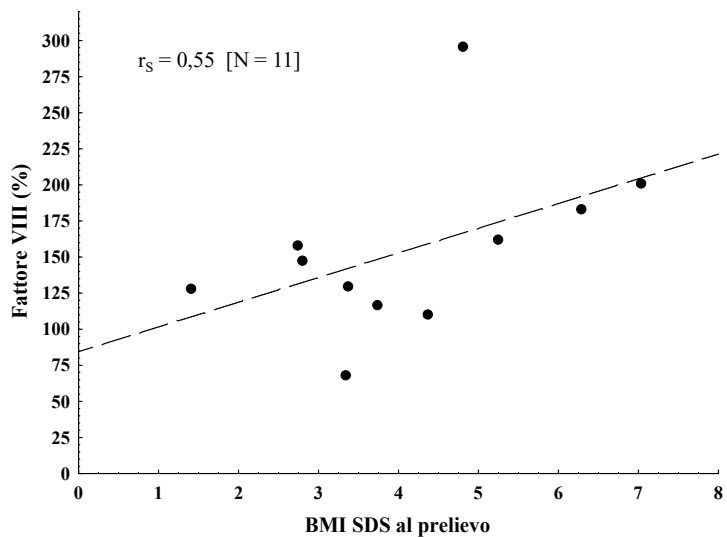
È quindi presente una correlazione positiva tra BMI SDS e PT, fattore VIII, fattore di von Willebrand, proteina C e D-dimero, mentre risulta negativa nel caso dell'aPTT (**Tabella XVI**).



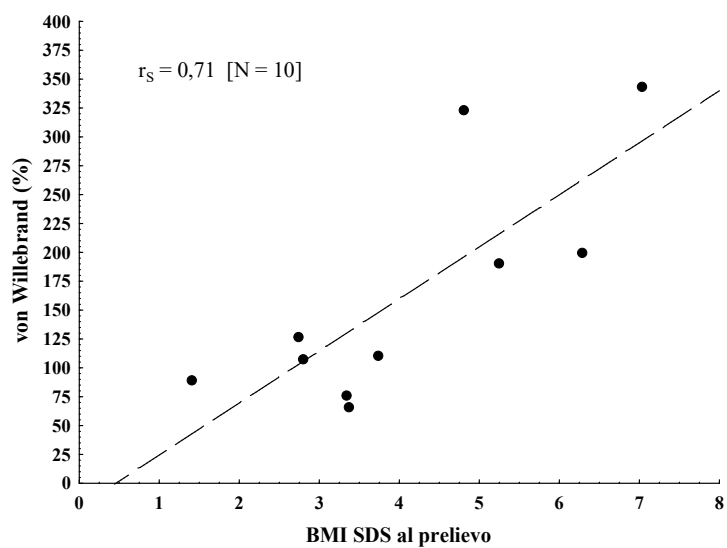
**Figura 8.** Correlazione tra BMI SDS al prelievo e PT nei pazienti ROHHAD [N = 14].



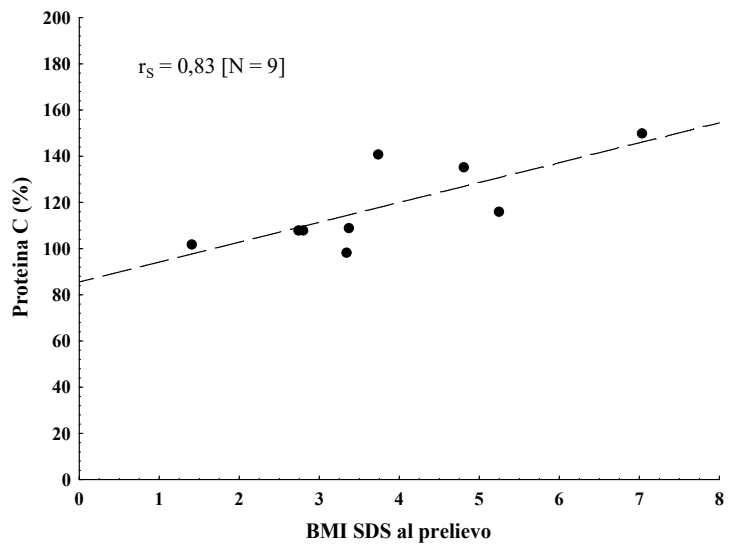
**Figura 9.** Correlazione tra BMI SDS al prelievo e aPTT nei pazienti ROHHAD [N=14].



**Figura 10.** Correlazione tra BMI SDS al prelievo e fattore VIII nei pazienti ROHHAD [N=11].



**Figura 11.** Correlazione tra BMI SDS al prelievo e fattore di von Willebrand nei pazienti ROHHAD [N=10].



**Figura 12.** Correlazione tra BMI SDS al prelievo e proteina C nei pazienti ROHHAD [N=9]

### 3.2 Confronto tra pazienti con sindrome ROHHAD, controlli con obesità e controlli con tumore ipotalamico

Lo studio ha messo a confronto pazienti con sindrome ROHHAD [N=14], controlli con obesità [N=8] e controlli con tumore ipotalamico [N=6].

In **Tabella XVII** sono state messe a confronto alcune variabili categoriche e quantitative nei tre gruppi di soggetti in esame.

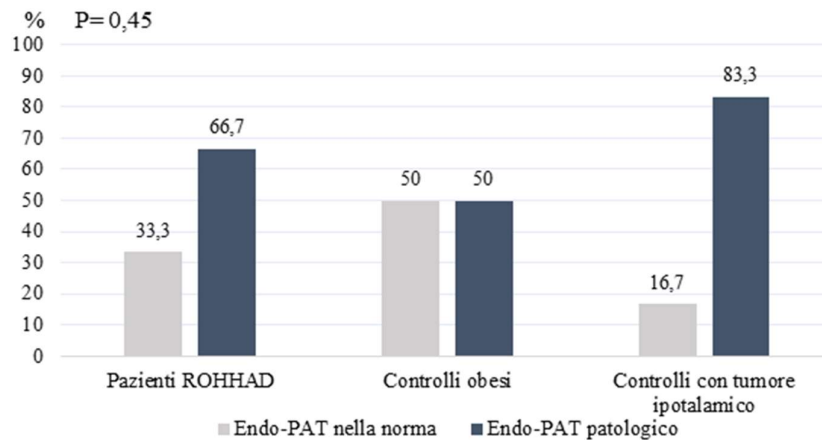
	Pazienti ROHHAD [N=14]	Controlli obesi [N=8]	Controlli con tumore ipotalamico [N=6]	P
Genere: Maschi	4 (28,6 %)	3 (37,5 %)	2 (33,3 %)	1,00 <sup>#</sup>
Femmine	10 (71,4%)	5 (62,5%)	4 (66,7%)	
EndoPAT: Patologico	4 (66,7 %)	4 (50 %)	5 (83,3 %)	0,45 <sup>#</sup>
Normale	2 (33,3%)	4 (50%)	1 (16,7%)	
Intolleranza glucidica: Sì	4 (28,6 %)	2 (28,6 %)	1 (16,7 %)	1,00 <sup>#</sup>
No	10 (71,4%)	5 (71,4%)	5 (83,3%)	
Resistenza insulinica: Sì	11 (78,6 %)	8 (100 %)	5 (83,3 %)	0,41 <sup>#</sup>
No	3 (21,4%)	0 (0%)	1 (16,7%)	
	<i>Mediana</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mediana</i>	
	<i>(1° - 3° q)</i>	<i>(1° - 3° q)</i>	<i>(1° - 3° q)</i>	
BMI SDS	3,4 (2,7 - 3,6)	3,5 (3,1 - 3,6)	3,3 (3 - 4,1)	0,98 <sup>§§</sup>
RHI	1,2 (1 - 1,8)	1,6 (1,2 - 2,2)	1,4 (0,9 - 1,7)	0,35 <sup>§§</sup>
Glicemia a 60' (OGTT)	153 (127 - 167)	136 (97 - 156)	137,5 (125 - 150)	0,51 <sup>§§</sup>

<sup>#</sup>P : Test Esatto di Fisher; <sup>§§</sup>P: test non parametrico di Kruskal-Wallis.

**Tabella XVII.** Confronto tra pazienti ROHHAD, controlli obesi e controlli con tumore ipotalamico.

Come descritto precedentemente, i pazienti con sindrome ROHHAD non differivano significativamente per genere, presenza di resistenza insulinica e/o intolleranza glucidica, BMI SDS secondo le tabelle WHO, dai pazienti con obesità semplice né da quelli con obesità secondaria a tumore ipotalamico.

Dall'analisi statistica dei dati raccolti in **Tabella XVII**, non è risultata nessuna differenza significativa ( $p=0,45$ ) nei risultati dell'esame EndoPAT tra pazienti con sindrome ROHHAD, controlli obesi e controlli neuro-oncologici (**Figura 13**). Nonostante questo, è possibile osservare nei pazienti con sindrome ROHHAD e nei controlli con tumore ipotalamico una maggiore tendenza ad avere EndoPAT con risultato patologico.



*P: Test Esatto di Fisher*

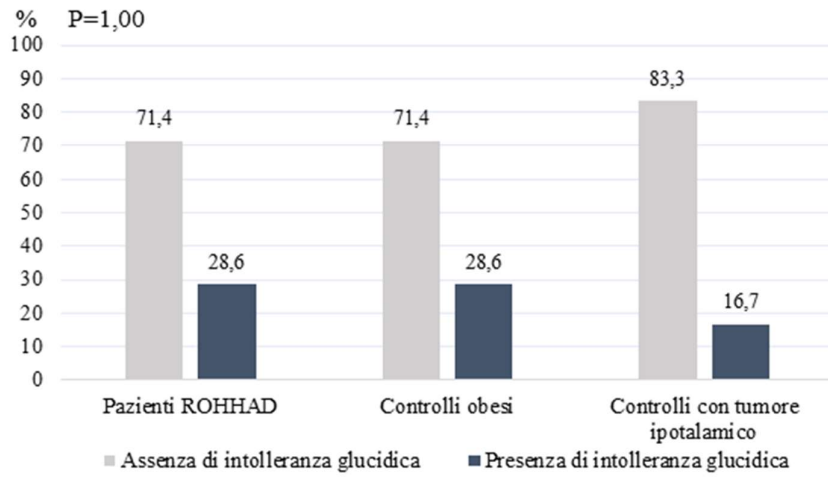
**Figura 13.** EndoPAT nei pazienti ROHHAD, nei controlli obesi e nei controlli con tumore ipotalamico.

Anche per l'indice di iperemia reattiva (RHI) non è risultata alcuna differenza significativa nel valore mediano calcolato nei tre gruppi:

- RHI = 1,2 nel gruppo di pazienti con sindrome ROHHAD
- RHI = 1,6 nel gruppo di controlli obesi
- RHI = 1,4 nel gruppo di controlli con tumore ipotalamico

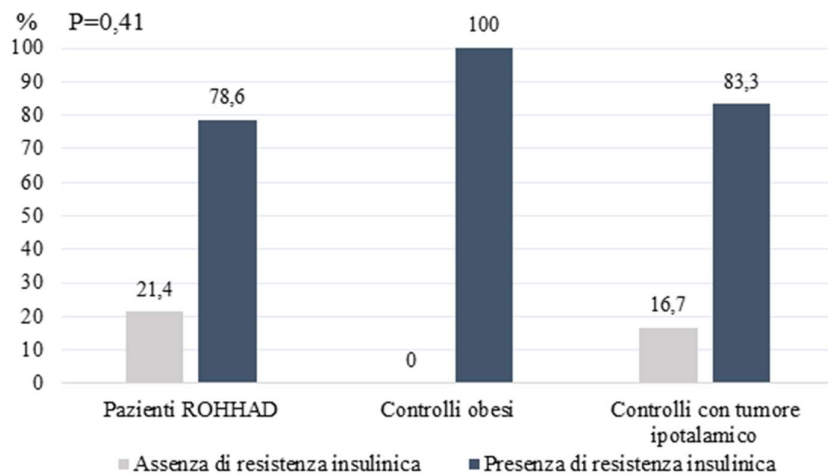
In tutti e tre i gruppi di soggetti il risultato mediano risulta essere patologico, perché al di sotto del cut-off considerato normale (v.n. > 1,67). In particolare, i pazienti con sindrome ROHHAD risultano essere il gruppo con il valore che più si discosta dalla soglia.

Infine non si è rilevata, tra i tre gruppi, nessuna differenza significativa per quanto riguarda la presenza di intolleranza glucidica ( $p=1$ ) (**Figura 14**), resistenza insulinica ( $p=0,41$ ) (**Figura 15**), BMI z-score al momento dell'esecuzione di EndoPAT ( $p=0,98$ ) e glicemia a 60 minuti all'OGTT ( $p=0,51$ ).



*P: Test Esatto di Fisher*

**Figura 14.** Intolleranza glucidica nei pazienti ROHHAD, nei controlli obesi e nei controlli con tumore ipotalamico.



*P: Test Esatto di Fisher*

**Figura 15.** Resistenza insulinica nei pazienti ROHHAD, nei controlli obesi e nei controlli con tumore ipotalamico.

Anche unendo in un unico gruppo tutti i controlli dello studio, e confrontandoli con i pazienti ROHHAD, non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa nei dati presi in esame (**Tabella XVIII**).

	Pazienti ROHHAD [N=14]	Controlli [N=14]	P
Genere: Maschi	4 (28,6 %)	5 (35,7 %)	1,00 <sup>#</sup>
Femmine	10 (71,4%)	9 (64,3%)	
EndoPAT: Patologico	4 (66,7 %)	9 (64,3 %)	1,00 <sup>#</sup>
Normale	2 (33,3%)	5 (35,7%)	
Intolleranza glucidica: Sì	4 (28,6 %)	3 (23,1 %)	1,00 <sup>#</sup>
No	10 (71,4%)	10 (76,9%)	
Resistenza insulinica: Sì	11 (78,6 %)	13 (92,9 %)	0,60 <sup>#</sup>
No	3 (21,4%)	1 (7,1%)	
	<i>Mediana (1° – 3° q)</i>	<i>Mediana (1° – 3° q)</i>	
BMI SDS	3,4 (2,7 - 3,6)	3,4 (3 - 3,7)	0,90 <sup>##</sup>
RHI	1,2 (1 - 1,8)	1,4 (1,1 - 2)	0,62 <sup>##</sup>
Glicemia a 60' (OGTT)	153 (127 - 167)	136 (119 - 150)	0,26 <sup>##</sup>

<sup>#</sup>P : Test Esatto di Fisher; <sup>##</sup>P: Test non parametrico U di Mann-Whitney.

**Tabella XVIII.** Confronto tra pazienti ROHHAD, controlli obesi e controlli con tumore ipotalamico.

In tutti i soggetti che hanno eseguito l'esame EndoPAT (pazienti e controlli), si è studiata la relazione tra RHI e BMI SDS al momento del test.

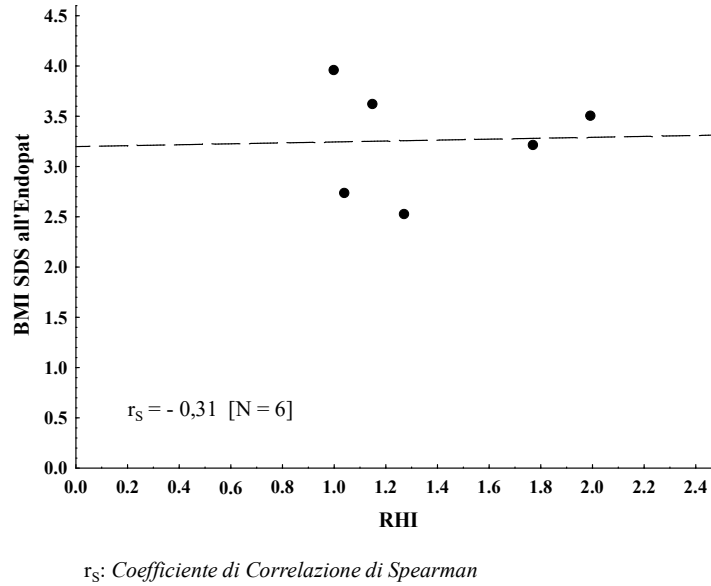
In **Tabella XIX** sono state riportate sia le relazioni calcolate nei soli pazienti ROHHAD, sia in tutti i soggetti partecipanti a questo studio [N=22].

Correlazione tra RHI e:	N	r <sub>s</sub>	P
BMI SDS nei pazienti ROHHAD	6	-0,314	0,54
BMI SDS nei pazienti e nei controlli	22	0,108	0,63

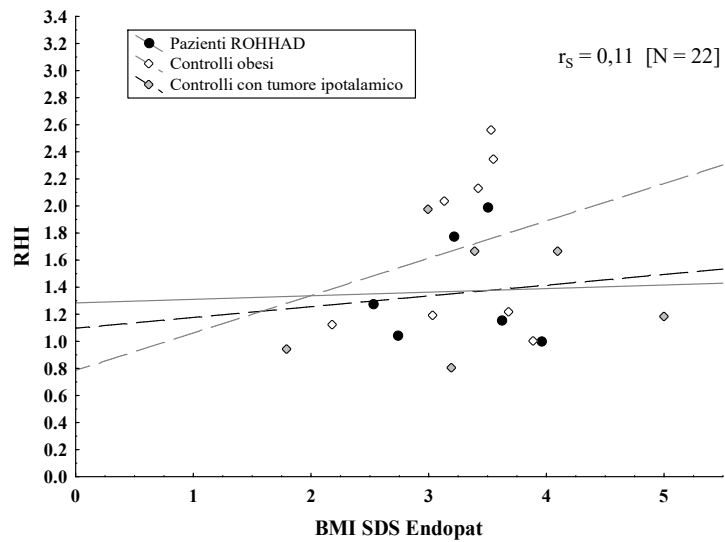
**Tabella XIX.** Correlazione tra RHI e BMI SDS nei pazienti ROHHAD che hanno effettuato EndoPAT [N = 6] e in tutti i soggetti in studio (pazienti ROHHAD con EndoPAT e controlli) [N = 22].



In entrambi i casi non sono state riscontrate correlazioni significative (**Figura 16, Figura 17**).



**Figura 16.** Correlazione tra RHI e BMI SDS all'EndoPAT nei pazienti ROHHAD che hanno eseguito il test EndoPAT [N = 6].



**Figura 17.** Correlazione tra RHI e BMI SDS all'EndoPAT in tutti i soggetti presi in esame (pazienti ROHHAD che hanno eseguito EndoPAT, controlli obesi e controlli con tumore ipotalamico) [N = 22].

### 3.3 Confronto tra pazienti con sindrome ROHHAD e controlli con tumore ipotalamico

In ultimo sono state studiate alcuni disturbi endocrinologici, presenti nei pazienti con sindrome ROHHAD e nei controlli con tumore ipotalamico.

In particolare, sono stati presi in esame:

- difetto di GH
- ipotiroidismo centrale
- deficit di ACTH
- disordini del sodio

In **Tabella XX** è stata confrontata la presenza/assenza del disturbo endocrinologico nei due gruppi in esame.

	Presenza del disturbo endocrino	Assenza del disturbo endocrino	P Test Esatto di Fisher
	Difetto di GH: Sì [N=11]	Difetto di GH: No [N=1]	
Pazienti ROHHAD	5 (83.3 %)	1 (16.7 %)	1,00
Controlli	6 (100 %)	0 (0 %)	
	Ipotiroidismo: Sì [N=8]	Ipotiroidismo: No [N=4]	
Pazienti ROHHAD	4 (66.7 %)	2 (33.3 %)	1,00
Controlli	4 (66.7 %)	2 (33.3 %)	
	Difetto di ACTH: Sì [N=7]	Difetto di ACTH: No [N=5]	
Pazienti ROHHAD	4 (66.7 %)	2 (33.3 %)	1,00
Controlli	3 (50 %)	3 (50 %)	
	Disordini del Sodio: Sì [N=7]	Disordini del Sodio: No [N=5]	
Pazienti ROHHAD	4 (66.7 %)	2 (33.3 %)	0,24
Controlli	1 (16.7 %)	5 (83.3 %)	

**Tabella XX.** Relazione tra presenza / assenza di disturbi endocrini nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].

Si può notare come non si siano rilevate particolari differenze tra i due gruppi, eccetto che per i disordini del sodio. Infatti, nei pazienti ROHHAD si contano 4 soggetti con disordini del sodio su 6 totali, mentre c'è un solo soggetto con tumore ipotalamico affetto da disordine del sodio, su 6 totali.

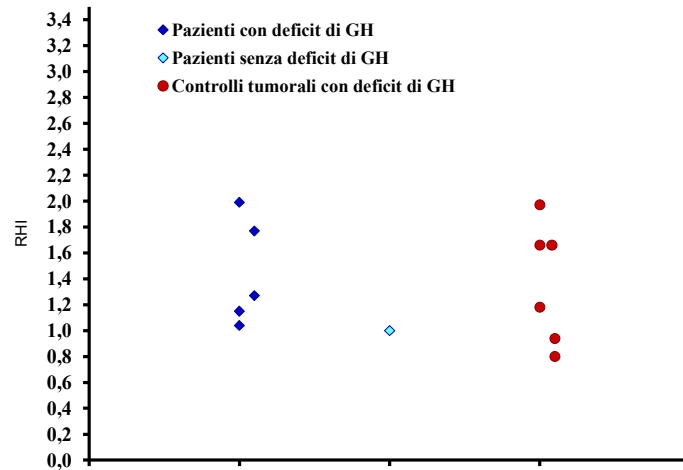
Successivamente è stata studiata la possibile correlazione tra RHI e i disturbi endocrini (**Tabella XXI**). Ogni gruppo di soggetti è stato suddiviso a sua volta in due sottogruppi, a seconda della presenza o assenza di disturbo endocrino.

A causa dello scarso numero di partecipanti, non è stato possibile eseguire alcun test statistico.

	Pazienti ROHHAD		Controlli con tumore ipotalamico	
	Presenza del disturbo endocrino	Assenza del disturbo endocrino	Presenza del disturbo endocrino	Assenza del disturbo endocrino
	Difetto di GH: Sì [N=5] Mediana (Min - max)	Difetto di GH: No [N=1] Valore osservato	Difetto di GH: Sì [N=6] Mediana (Min - max)	Difetto di GH: No [N=0] -
RHI	1,27 (1,04 – 1,99)	1,00	1,42 (0,80 – 1,97)	-
	Ipotiroidismo: Sì [N=4] Mediana (Min - max)	Ipotiroidismo: No [N=2] Media (Min - max)	Ipotiroidismo: Sì [N=4] Mediana (Min - max)	Ipotiroidismo: No [N=2] Media (Min - max)
RHI	1,21 (1,04 – 1,77)	1,50 (1,00 – 1,99)	1,42 (0,94 – 1,97)	1,23 (0,80 – 1,66)
	Difetto di ACTH: Sì [N=4] Mediana (Min - max)	Difetto di ACTH: No [N=2] Media (Min-max)	Difetto di ACTH: Sì [N=3] Mediana (Min - max)	Difetto di ACTH: No [N=3] Mediana (Min - max)
RHI	1,46 (1,04 – 1,99)	1,14 (1,00 – 1,27)	1,66 (1,18 – 1,97)	0,94 (0,80 – 1,66)
	Disordini del Sodio: Sì [N=4] Mediana (Min - max)	Disordini del Sodio: No [N=2] Media (Min - max)	Disordini del Sodio: Sì [N=1] Valore osservato	Disordini del Sodio: No [N=5] Mediana (Min - max)
RHI	1,21 (1,04 – 1,77)	1,50 (1,00 – 1,99)	1,97	1,18 (0,80 – 1,66)

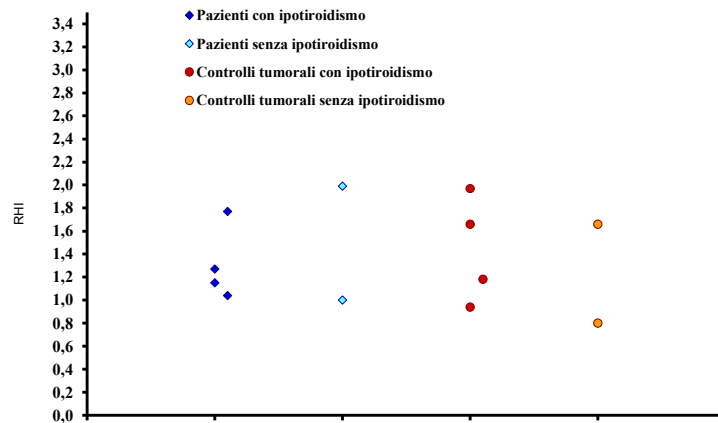
**Tabella XXI.** Relazione tra RHI e presenza / assenza di disturbi endocrini nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].

Per quanto riguarda lo studio della relazione tra GHD e RHI, si nota come tutti i pazienti con tumore ipotalamico presentino anche una diagnosi di GHD. Nonostante questo, è visibile che non ci siano differenze tra le relazioni dei tre sottogruppi in esame (**Figura 18**).

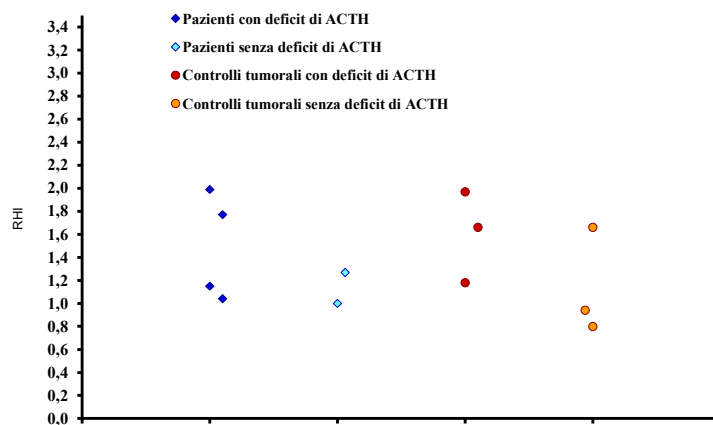


**Figura 18.** Relazione tra RHI e presenza / assenza di deficit di GH nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].

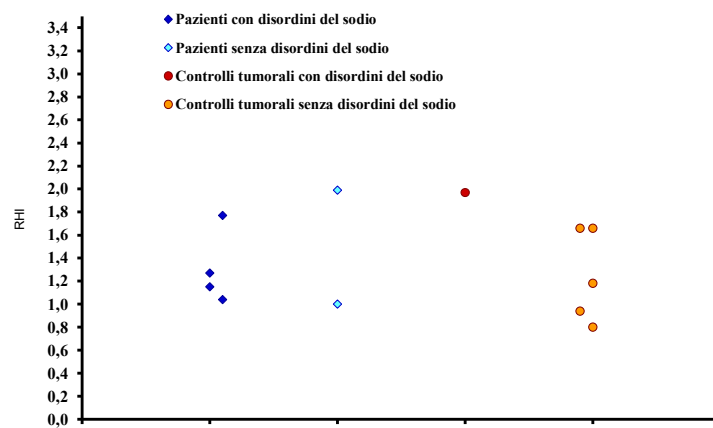
Lo stesso risultato si può osservare anche per le successive tre relazioni (**Figura 19**, **Figura 20**, **Figura 21**).



**Figura 19.** Relazione tra RHI e presenza / assenza di ipotiroidismo nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].



**Figura 20.** Relazione tra RHI e presenza / assenza di deficit di ACTH nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].



**Figura 21.** Relazione tra RHI e presenza / assenza di disordini del sodio nei pazienti ROHHAD [N=6] e nei controlli con tumore ipotalamico [N=6].

## 4. DISCUSSIONE

### 4.1 EndoPAT e profilo coagulativo

L'esame EndoPAT è uno strumento moderno e innovativo, che permette, in modo semplice e non invasivo, di studiare lo stato dell'endotelio dei vasi sanguigni. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare, grazie all'utilizzo proprio di questo dispositivo, il danno endoteliale nei pazienti con sindrome ROHHAD. Inoltre, analizzando il risultato emerso dall'esame e il profilo coagulativo dei partecipanti, si è cercato di osservare quali potessero essere le cause di questo precoce fenomeno.

Nel nostro studio sono stati sottoposti ad EndoPAT 6 pazienti affetti da sindrome ROHHAD, 8 controlli obesi e 6 pazienti affetti da tumore ipotalamico.

I risultati hanno dimostrato nei pazienti ROHHAD un esito patologico nel 66,7% dei soggetti, nei controlli obesi nel 50%, nei controlli oncologici nell'83,3% dei casi.

Da questa prima rilevazione si è potuto quindi constatare che nei 3 gruppi in esame c'è una certa tendenza a presentare un EndoPAT alterato, più alta nei pazienti oncologici e nei pazienti affetti da sindrome ROHHAD rispetto ai soggetti con obesità semplice, anche se il dato, vista la bassa numerosità, non è risultato significativo.

Questa informazione è stata poi confermata dalla mediana degli RHI, calcolati negli esami EndoPAT. Si è potuto notare come in tutti e 3 i gruppi del nostro studio la mediana degli RHI risulti al di sotto del cut-off stabilito come valore normale (v.n.  $>1,67$ ). In particolare, il gruppo di controlli obesi, pur presentando una mediana al di sotto del cut-off (mediana=1,6), è quello che maggiormente si avvicina alla soglia del valore normale. Al contrario, il gruppo di pazienti con sindrome ROHHAD è quello che maggiormente si discosta dalla soglia di normalità (mediana=1,2).

Questi dati, associati alle informazioni precedenti sull'esito patologico o nella norma dell'esame EndoPAT, hanno rivelato come nel gruppo di soggetti con obesità semplice ci sia una minore tendenza ad avere un esame EndoPAT patologico, rispetto agli altri 2 gruppi in esame.

In questo studio è stata anche studiata la relazione tra profilo coagulativo e danno endoteliale nei pazienti con sindrome ROHHAD. Ciò che è stato dimostrato è una forte

correlazione negativa tra RHI e PT e tra RHI e fibrinogeno. Altre correlazioni negative sono state individuate tra RHI e fattore di von Willebrand e tra RHI e antitrombina.

Ad oggi, in letteratura non esistono dati sull'esito dell'esame EndoPAT da parte di pazienti affetti da sindrome ROHHAD, né sulla relazione tra l'esito dell'esame e il profilo coagulativo.

#### **4.2 Sodiemia ed ematocrito**

Il profilo coagulativo è stato analizzato anche in relazione alla sodiemia e all'ematocrito dei pazienti ROHHAD. L'unica correlazione statisticamente significativa è stata rilevata tra sodiemia e proteina S.

Nonostante non abbiamo riscontrato dati significativi nella nostra coorte, sono numerosi gli studi in letteratura che indicano l'ematocrito come un fattore importante nell'ambito del rischio trombotico. Infatti, all'aumentare dell'ematocrito, si è riscontrata un'accelerazione nella formazione di trombi e una maggiore attivazione delle piastrine (105–110).

Per quanto riguarda la sodiemia, non essendo correlata ad alterazioni del profilo coagulativo, si ipotizza che la presenza o assenza di disidratazione o diabete insipido non influisca direttamente sul rischio trombotico dei pazienti ROHHAD, o almeno, che costituisca un fattore di rischio indipendente.

#### **4.3 BMI e rischio trombotico**

In seguito, è stata analizzata la correlazione tra BMI SDS al prelievo e profilo coagulativo, nei pazienti con sindrome ROHHAD. Sono state individuate diverse relazioni significative, in particolare una forte correlazione positiva è stata rilevata tra BMI e fattore di von Willebrand, proteina C e fibrinogeno.

In letteratura sono diversi gli studi che hanno rilevato una correlazione tra BMI e fattore di von Willebrand (57,83,111,112), D-dimero (113,114), fattore VIII (113–115), proteina S (113,114) e fibrinogeno (113,116).

Altre correlazioni tra BMI e profilo coagulativo sono state individuate in particolare con PT e aPTT. Si è notato che all'aumentare del BMI SDS dei pazienti in esame, era presente

un aumento del tempo di protrombina (PT), ed un calo del tempo di tromboplastina parziale (aPTT), entrambe alterazioni che comportano un maggior rischio trombotico.

Questi dati, riguardanti PT e aPTT, sono stati confermati in diversi studi (111,115–119).

Risulta quindi ormai certo che il BMI sia un fattore fondamentale per il danno endoteliale e il rischio trombotico nei pazienti adulti e pediatrici.

A dimostrazione di ciò, altri autori hanno anche esaminato l'effetto di un miglioramento dello stile di vita sul profilo coagulativo nei soggetti obesi. Ciò che è emerso è un calo di diversi fattori della coagulazione, in particolare proteina S e fattore VIII (122).

Un'analisi approfondita è stata eseguita sulla relazione tra BMI SDS e danno endoteliale, attraverso l'uso di EndoPAT. Tutti i soggetti facenti parte del nostro studio erano stati precedentemente selezionati sulla base del BMI SDS, in modo tale che tra i 3 gruppi in esame non ci fosse una differenza significativa. Dopodiché si è cercato di capire se ci fosse una correlazione tra il peso corporeo dei pazienti e un possibile danno endoteliale rilevato tramite EndoPAT. Quest'analisi è stata eseguita sia per il solo gruppo di pazienti ROHHAD, sia per tutti e 28 i soggetti partecipanti allo studio. In entrambi i casi non è stata riscontrata nessuna tendenza all'aumento del danno endoteliale (valutato come RHI) all'aumentare del BMI SDS.

La relazione tra RHI e BMI SDS in pazienti pediatrici obesi era già stata analizzata in altri studi, rivelando risultati contrastanti. In alcuni casi era stato riportato un valore di RHI inferiore nei soggetti obesi rispetto a quelli normopeso. Questo era stato interpretato come un nesso di causalità tra il BMI e il danno endoteliale presente già in questi giovani pazienti (88,96,97,123–125). Inoltre, in alcuni casi si era anche dimostrato come, al ridursi del BMI dei pazienti, si verificasse un miglioramento dell'RHI all'EndoPAT (100,126).

In altri studi invece non era stata rilevata alcuna differenza significativa in merito (88,95,96,99,127,128).

#### **4.4 Disturbi respiratori del sonno**

A causa dell'esiguo numero di pazienti ROHHAD, in particolare di quelli affetti da sindrome ROHHAD che non presentano disturbi respiratori del sonno, in questo studio non



è stato possibile osservare una relazione significativa tra profilo coagulativo e disturbi respiratori del sonno (SDB).

In letteratura è però ormai noto l'effetto procoagulativo dei disturbi respiratori del sonno, indipendentemente da fattori come il BMI. In particolare, è stata dimostrata una relazione positiva tra SDB lievi-moderati e alcuni marker trombotici, come il fibrinogeno (129,130). Questa relazione segue un andamento lineare fino a valori di AHI pari circa a 15, dopodiché raggiunge un plateau (130).

Non si è dimostrata la stessa associazione con altri fattori coagulativi, come il D-dimero (130–133) e il fattore di von Willebrand (132–134).

Diversi studi hanno inoltre individuato una certa sensibilità dei fattori della coagulazione al trattamento con CPAP (129,135–138). Questo dato è stato però smentito da un altro studio che ha osservato che, sebbene i livelli di fattori procoagulanti prima del trattamento siano maggiori nei pazienti che soffrono di OSAS rispetto ai soggetti sani, poi questi valori migliorano con CPAP-placebo subterapeutica (139). Un altro studio non ha rilevato modifiche nei livelli dei fattori di coagulazione in seguito né al trattamento con CPAP né con CPAP-placebo (132–134).

In alcuni studi è stata mostrata anche una correlazione tra PT e aPTT e la severità delle apnee notturne (AHI) o tra PT e la saturazione arteriosa dell'ossigeno (SaO<sub>2</sub>) (140,141). Anche questi valori sono migliorati in seguito al trattamento con CPAP (142).

Abbiamo poi studiato la correlazione tra Oxygen Desaturation Index (ODI) e profilo coagulativo. Da questa analisi sono emerse due correlazioni significative: in particolare, una forte correlazione negativa tra ODI e antitrombina; in letteratura invece sono state descritte relazioni tra ODI e aPTT nei pazienti pediatrici (117,141).

#### **4.5 Disturbi endocrini**

Al nostro studio hanno preso parte pazienti con sindrome ROHHAD e controlli affetti da tumore ipotalamico. A causa delle loro patologie, questi soggetti presentano frequentemente disturbi endocrinologici (in particolare deficit di GH, ipotiroidismo centrale, deficit di ACTH, disordini del sodio), che abbiamo voluto porre in relazione con un'eventuale alterazione dello stato coagulativo.

Ciò che si è potuto constatare è che, nonostante la non significatività statistica dell'analisi per l'esiguo numero di dati, nei pazienti ROHHAD non affetti da deficit di GH e/o ACTH, i valori di fattore di von Willebrand fossero notevolmente aumentati rispetto ai pazienti affetti.

È stata riscontrata poi una forte relazione tra PT e la presenza/assenza di deficit di ACTH. In particolare, nei 9 pazienti affetti il valore di PT rilevato era inferiore rispetto ai 5 pazienti non affetti.

In letteratura sono presenti diversi studi che hanno segnalato un importante ruolo dell'ormone GH nelle vie della coagulazione intrinseca ed estrinseca. In particolare, si è notato che i pazienti con deficit di GH presentassero valori di PT e aPTT uguali a quelli dei soggetti sani, ma concentrazioni di fibrinogeno superiori. In seguito alla somministrazione di ormone, è stato constatato un aumento nei valori di PT, mentre aPTT e fibrinogeno rimanevano costanti (143,144).

In altri studi si è notato un aumento del fattore di von Willebrand e del fattore VIII nei pazienti affetti da deficit di GH, in seguito alla somministrazione acuta di ormone (145).

Da questi casi si può dedurre che l'ormone GH non sia fondamentale per la sintesi basale dei fattori coagulativi, ma che un suo incremento possa avere un ruolo nella via estrinseca della coagulazione (145,146).

Recentemente anche il ruolo dell'ipotiroidismo nel rischio trombotico è stato analizzato. Ciò che è emerso è che nei pazienti affetti da ipotiroidismo possa essere presente sia uno stato di ipercoagulabilità e ipofibrinolisi, sia uno stato di ipocoagulabilità, a seconda della severità del deficit ormonale (147,148). In particolare, in caso di ipotiroidismo lieve, si evidenzia uno stato di ipercoagulabilità e ipofibrinolisi, con un incremento di fattore VIII e fattore di von Willebrand (149–156). In presenza di ipotiroidismo moderato-severo, è presente uno stato di ipocoagulabilità con aumento di PT, aPTT ridotto, fattore VIII e fibrinogeno ridotti (149,153,154,157). Tutte queste alterazioni nel profilo coagulativo dei pazienti si vanno a risolvere in seguito al trattamento con terapia sostitutiva (149,158–160). I dati sul ruolo del deficit di ACTH nel rischio trombotico sono invece scarsi.

Nei soggetti partecipanti al nostro studio è stato possibile poi analizzare la relazione tra danno endoteliale e disturbi endocrini, attraverso l'esecuzione di EndoPAT. A causa dello scarso numero di partecipanti, non è stato possibile calcolare alcun risultato statisticamente

significativo. In ogni caso, non è stata riscontrata alcuna relazione tra RHI e la presenza o assenza di disturbi endocrini, sia nei pazienti ROHHAD che nei controlli oncologici.

In letteratura sono presenti dati riguardanti la relazione tra danno endoteliale e disturbi endocrinologici.

In particolare, è noto l'effetto antiossidante e vasodilatatore dell'ormone GH. Questo spiega perché, in un recente studio giapponese, sia emerso che i pazienti affetti da deficit di GH trattati con terapia sostitutiva, presentino un miglioramento notevole nell'esito di EndoPAT (161). I nostri pazienti con sindrome ROHHAD e deficit di GH, durante l'esecuzione di EndoPAT, erano tutti in trattamento con terapia sostitutiva, e questo potrebbe spiegare l'assenza di riscontri significativi.

## 5. CONCLUSIONI

Il nostro studio ha evidenziato nei soggetti affetti da sindrome ROHHAD la presenza di danno endoteliale e rischio trombotico fin dall'età pediatrica.

Questo riscontro è in linea con i risultati provenienti da pazienti pediatrici con obesità semplice o con tumore ipotalamico. Nel nostro studio è emersa però una maggiore tendenza da parte dei pazienti con sindrome ROHHAD a presentare un esame EndoPAT patologico rispetto ai coetanei con obesità semplice.

Si è inoltre osservata, nella sindrome ROHHAD, una relazione tra danno endoteliale e profilo coagulativo alterato, BMI SDS e disturbi respiratori del sonno.

Le relazioni maggiormente significative riscontrate nel nostro studio sono:

- RHI e PT / fibrinogeno
- ODI e antitrombina
- BMI e PT / aPTT / fattore VIII / fattore di von Willebrand / proteina C / D-dimero

Questi risultati confermano la presenza di una stretta relazione tra rischio trombotico e alcune caratteristiche tipiche della sindrome ROHHAD, come l'ipoventilazione centrale e l'obesità ad esordio rapido.

A causa della rarità della patologia in esame, i pazienti con sindrome ROHHAD partecipanti allo studio sono in numero estremamente esiguo. Questo, in alcune analisi, non ha permesso di raggiungere un risultato statisticamente significativo.

Crediamo quindi sia necessario ampliare il numero di pazienti partecipanti allo studio - idealmente promuovendo studi multicentrici - e studiare approfonditamente il danno endoteliale e il rischio trombotico nei soggetti affetti da sindrome ROHHAD, una sindrome estremamente rara e spesso fatale.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Fishman LS, Samson JH, Sperling DR. PRIMARY ALVEOLAR HYPOVENTILATION SYNDROME (ONDINE'S CURSE). *Am J Dis Child* 1960. agosto 1965;110:155–61.
2. Weese-Mayer DE, Silvestri JM, Menzies LJ, Morrow-Kenny AS, Hunt CE, Hauptman SA. Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis, management, and long-term outcome in thirty-two children. *J Pediatr.* marzo 1992;120(3):381–7.
3. Katz ES, McGrath S, Marcus CL. Late-onset central hypoventilation with hypothalamic dysfunction: a distinct clinical syndrome. *Pediatr Pulmonol.* gennaio 2000;29(1):62–8.
4. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* aprile 2003;33(4):459–61.
5. Del Carmen Sanchez M, Lopez-Herce J, Carrillo A, Moral R, Arias B, Rodriguez A, et al. Late onset central hypoventilation syndrome. *Pediatr Pulmonol.* marzo 1996;21(3):189–91.
6. Proulx F, Weber ML, Collu R, Lelièvre M, Larbrisseau A, Delisle M. Hypothalamic dysfunction in a child: a distinct syndrome? Report of a case and review of the literature. *Eur J Pediatr.* giugno 1993;152(6):526–9.
7. Ize-Ludlow D, Gray JA, Sperling MA, Berry-Kravis EM, Milunsky JM, Farooqi IS, et al. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation presenting in childhood. *Pediatrics.* luglio 2007;120(1):e179–188.
8. Bougnères P, Pantalone L, Linglart A, Rothenbühler A, Le Stunff C. Endocrine manifestations of the rapid-onset obesity with hypoventilation, hypothalamic, autonomic dysregulation, and neural tumor syndrome in childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* ottobre 2008;93(10):3971–80.
9. Harvengt J, Gernay C, Mastouri M, Farhat N, Lebrethon MC, Seghaye MC, et al. ROHHAD(NET) Syndrome: Systematic Review of the Clinical Timeline and Recommendations for Diagnosis and Prognosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 luglio 2020;105(7):dgaa247.
10. Ghosh R, Malik M, Daley TC, Kasi AS. Images: Sleep-disordered breathing and hypoventilation in a child with obesity and hypothalamic dysfunction. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med.* 1 gennaio 2022;18(1):339–42.
11. Lee JM, Shin J, Kim S, Gee HY, Lee JS, Cha DH, et al. Rapid-Onset Obesity with Hypoventilation, Hypothalamic, Autonomic Dysregulation, and Neuroendocrine Tumors (ROHHADNET) Syndrome: A Systematic Review. *BioMed Res Int.* 2018;2018:1250721.

12. Kapsimalis F, Kryger MH. Gender and obstructive sleep apnea syndrome, part 2: mechanisms. *Sleep*. 1 agosto 2002;25(5):499–506.
13. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. aprile 2004;74(4):761–4.
14. Rand CM, Patwari PP, Rodikova EA, Zhou L, Berry-Kravis EM, Wilson RJA, et al. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation: analysis of hypothalamic and autonomic candidate genes. *Pediatr Res*. ottobre 2011;70(4):375–8.
15. Dhondt K, Verloo P, Verhelst H, Van Coster R, Overeem S. Hypocretin-1 deficiency in a girl with ROHHAD syndrome. *Pediatrics*. settembre 2013;132(3):e788-792.
16. Barclay SF, Rand CM, Gray PA, Gibson WT, Wilson RJA, Berry-Kravis EM, et al. Absence of mutations in HCRT, HCRTR1 and HCRTR2 in patients with ROHHAD. *Respir Physiol Neurobiol*. 15 gennaio 2016;221:59–63.
17. Thaker VV, Esteves KM, Towne MC, Brownstein CA, James PM, Crowley L, et al. Whole exome sequencing identifies RAI1 mutation in a morbidly obese child diagnosed with ROHHAD syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. maggio 2015;100(5):1723–30.
18. Barclay SF, Rand CM, Borch LA, Nguyen L, Gray PA, Gibson WT, et al. Rapid-Onset Obesity with Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (ROHHAD): exome sequencing of trios, monozygotic twins and tumours. *Orphanet J Rare Dis*. 25 agosto 2015;10:103.
19. Patwari PP, Rand CM, Berry-Kravis EM, Ize-Ludlow D, Weese-Mayer DE. Monozygotic twins discordant for ROHHAD phenotype. *Pediatrics*. settembre 2011;128(3):e711-715.
20. Giacomozzi C, Guaraldi F, Cambiaso P, Niceta M, Verrillo E, Tartaglia M, et al. Anti-Hypothalamus and Anti-Pituitary Auto-antibodies in ROHHAD Syndrome: Additional Evidence Supporting an Autoimmune Etiopathogenesis. *Horm Res Paediatr*. 2019;92(2):124–32.
21. Sartori S, Priante E, Pettenazzo A, Marson P, Suppiej A, Benini F, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal bands in rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome: new evidence supporting immunological pathogenesis. *J Child Neurol*. marzo 2014;29(3):421–5.
22. Cemeroglu AP, Eng DS, Most LA, Stalsonburg CM, Kleis L. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome and celiac disease in a 13-year-old girl: further evidence for autoimmunity? *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. gennaio 2016;29(1):97–101.

23. Sirvent N, Bérard E, Chastagner P, Feillet F, Wagner K, Sommelet D. Hypothalamic dysfunction associated with neuroblastoma: evidence for a new Paraneoplastic syndrome? *Med Pediatr Oncol.* maggio 2003;40(5):326–8.
24. Huppke P, Heise A, Rostasy K, Huppke B, Gärtner J. Immunoglobulin therapy in idiopathic hypothalamic dysfunction. *Pediatr Neurol.* settembre 2009;41(3):232–4.
25. Paz-Priel I, Cooke DW, Chen AR. Cyclophosphamide for rapid-onset obesity, hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome. *J Pediatr.* febbraio 2011;158(2):337–9.
26. Jacobson LA, Rane S, McReynolds LJ, Steppan DA, Chen AR, Paz-Priel I. Improved Behavior and Neuropsychological Function in Children With ROHHAD After High-Dose Cyclophosphamide. *Pediatrics.* luglio 2016;138(1):e20151080.
27. Ibáñez-Micó S, Marcos Oltra AM, de Murcia Lemauviel S, Ruiz Pruneda R, Martínez Ferrández C, Domingo Jiménez R. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysregulation, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD syndrome): A case report and literature review. *Neurol Barc Spain.* dicembre 2017;32(9):616–22.
28. Chow C, Fortier MV, Das L, Menon AP, Vasanwala R, Lam JCM, et al. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD) syndrome may have a hypothalamus-periaqueductal gray localization. *Pediatr Neurol.* maggio 2015;52(5):521–5.
29. North KN, Ouvrier RA, McLean CA, Hopkins IJ. Idiopathic hypothalamic dysfunction with dilated unresponsive pupils: report of two cases. *J Child Neurol.* luglio 1994;9(3):320–5.
30. Nunn K, Ouvrier R, Sprague T, Arbuckle S, Docker M. Idiopathic hypothalamic dysfunction: a paraneoplastic syndrome? *J Child Neurol.* giugno 1997;12(4):276–81.
31. Sethi K, Lee YH, Daugherty LE, Hinkle A, Johnson MD, Katzman PJ, et al. ROHHADNET syndrome presenting as major behavioral changes in a 5-year-old obese girl. *Pediatrics.* agosto 2014;134(2):e586-589.
32. Gharial J, Ganesh A, Curtis C, Pauranik A, Chan J, Kurek K, et al. Neuroimaging and Pathology Findings Associated With Rapid Onset Obesity, Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (ROHHAD) Syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1 maggio 2021;43(4):e571–6.
33. Chew HB, Ngu LH, Keng WT. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation and autonomic dysregulation (ROHHAD): a case with additional features and review of the literature. *BMJ Case Rep.* 1 marzo 2011;2011:bcr0220102706.
34. Ouvrier R, Nunn K, Sprague T, McLean C, Arbuckle S, Hopkins I, et al. Idiopathic hypothalamic dysfunction: a paraneoplastic syndrome? *Lancet Lond Engl.* 11 novembre 1995;346(8985):1298.

35. Filippidou M, Petropoulou T, Botsa E, Vasilakis IA, Smyrnaki P, Orfanou I, et al. ROHHAD syndrome - A still unrecognized cause of childhood obesity: report of three cases. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 30 settembre 2020;33(10):1341–8.
36. Grudnikoff E, Foley C, Poole C, Theodosiadis E. Nocturnal Anxiety in a Youth with Rapid-onset Obesity, Hypothalamic Dysfunction, Hypoventilation, and Autonomic Dysregulation (ROHHAD). *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry J Acad Can Psychiatr Enfant Adolesc*. agosto 2013;22(3):235–7.
37. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 ottobre 2012;8(5):597–619.
38. Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE. Rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation (ROHHAD): Response to ventilatory challenges. *Pediatr Pulmonol*. dicembre 2015;50(12):1336–45.
39. Carroll MS, Patwari PP, Kenny AS, Brogadir CD, Stewart TM, Weese-Mayer DE. Residual chemosensitivity to ventilatory challenges in genotyped congenital central hypoventilation syndrome. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 15 febbraio 2014;116(4):439–50.
40. Milla CE, Zirbes J. Pulmonary complications of endocrine and metabolic disorders. *Paediatr Respir Rev*. marzo 2012;13(1):23–8.
41. Reppucci D, Hamilton J, Yeh EA, Katz S, Al-Saleh S, Narang I. ROHHAD syndrome and evolution of sleep disordered breathing. *Orphanet J Rare Dis*. 30 luglio 2016;11(1):106.
42. Selvadurai S, Benzon D, Voutsas G, Hamilton J, Yeh A, Cifra B, et al. Sleep-disordered breathing, respiratory patterns during wakefulness and functional capacity in pediatric patients with rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation and autonomic dysregulation syndrome. *Pediatr Pulmonol*. febbraio 2021;56(2):479–85.
43. Goldbart AD, Arazi A, Golan-Tripto I, Levinsky Y, Scheuerman O, Tarasiuk A. Altered slow-wave sleep activity in children with rapid-onset obesity with hypothalamic dysregulation, hypoventilation, and autonomic dysregulation syndrome. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 ottobre 2020;16(10):1731–5.
44. Boubred F, Lethel V, Hugonencq C, Viard L, Raybaud C, Camboulives J, et al. [Central alveolar hypoventilation syndrome and cerebral venous thrombosis: fortuitous association?]. *Arch Pediatr Organe Off Soc Francaise Pediatr*. marzo 2002;9(3):266–70.



45. Joseph L, Goldberg S, Shahroor S, Gomori M, Mimouni FB, Picard E. Sinus vein thrombosis as presenting finding in the congenital central hypoventilation syndrome: an insight on the pathophysiology of the association. *Pediatr Pulmonol.* agosto 2011;46(8):826–8.
46. Jalal Eldin AW, Tombayoglu D, Butz L, Affinati A, Meral R, Ontan MS, et al. Natural history of ROHHAD syndrome: development of severe insulin resistance and fatty liver disease over time. *Clin Diabetes Endocrinol.* 2019;5:9.
47. Abaci A, Catli G, Bayram E, Koroglu T, Olgun HN, Mutafoğlu K, et al. A case of rapid-onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, autonomic dysregulation, and neural crest tumor: ROHHADNET syndrome. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol.* febbraio 2013;19(1):e12-16.
48. Farooqi IS, O’Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med.* 2005;56:443–58.
49. Govaerts C, Srinivasan S, Shapiro A, Zhang S, Picard F, Clement K, et al. Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function. *Peptides.* ottobre 2005;26(10):1909–19.
50. Kaw R, Kaminska M. Obesity Hypoventilation: Traditional Versus Nontraditional Populations. *Sleep Med Clin.* dicembre 2020;15(4):449–59.
51. Barclay SF, Rand CM, Nguyen L, Wilson RJA, Wevrick R, Gibson WT, et al. ROHHAD and Prader-Willi syndrome (PWS): clinical and genetic comparison. *Orphanet J Rare Dis.* 20 luglio 2018;13(1):124.
52. Aljabban L, Kassab L, Bakoura NA, Alsalka MF, Maksoud I. Rapid-onset obesity, hypoventilation, hypothalamic dysfunction, autonomic dysregulation and neuroendocrine tumor syndrome with a homogenous enlargement of the pituitary gland: a case report. *J Med Case Reports.* 22 novembre 2016;10(1):328.
53. Kaditis AG, Alonso Alvarez ML, Boudewyns A, Alexopoulos EI, Ersu R, Joosten K, et al. Obstructive sleep disordered breathing in 2- to 18-year-old children: diagnosis and management. *Eur Respir J.* gennaio 2016;47(1):69–94.
54. Durgan DJ, Bryan RM. Cerebrovascular consequences of obstructive sleep apnea. *J Am Heart Assoc.* agosto 2012;1(4):e000091.
55. Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Serpero LD, Sans Capdevila O, Dayyat E. Obstructive sleep apnea and endothelial function in school-aged nonobese children: effect of adenotonsillectomy. *Circulation.* 13 novembre 2007;116(20):2307–14.
56. Dubern B, Aggoun Y, Boulé M, Fauroux B, Bonnet D, Tounian P. Arterial alterations in severely obese children with obstructive sleep apnoea. *Int J Pediatr Obes IJPO Off J Int Assoc Study Obes.* 3 maggio 2010;5(3):230–6.

57. Huang YS, Guilleminault C, Hwang FM, Cheng C, Lin CH, Li HY, et al. Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea. *Medicine (Baltimore)*. ottobre 2016;95(41):e4944.
58. Nadeem R, Molnar J, Madbouly EM, Nida M, Aggarwal S, Sajid H, et al. Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 ottobre 2013;9(10):1003–12.
59. Li X, Hu R, Ren X, He J. Interleukin-8 concentrations in obstructive sleep apnea syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Bioengineered*. dicembre 2021;12(2):10666–81.
60. Goldbart AD, Goldman JL, Li RC, Brittan KR, Tauman R, Gozal D. Differential expression of cysteinyl leukotriene receptors 1 and 2 in tonsils of children with obstructive sleep apnea syndrome or recurrent infection. *Chest*. luglio 2004;126(1):13–8.
61. Koren D, Chirinos JA, Katz LEL, Mohler ER, Gallagher PR, Mitchell GF, et al. Interrelationships between obesity, obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular risk in obese adolescents. *Int J Obes* 2005. luglio 2015;39(7):1086–93.
62. Loffredo L, Zicari AM, Occasi F, Perri L, Carnevale R, Angelico F, et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in children with sleep disordered breathing: role of NADPH oxidase. *Atherosclerosis*. maggio 2015;240(1):222–7.
63. Gozal D, Serpero LD, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Khalyfa A, Tauman R. Sleep measures and morning plasma TNF-alpha levels in children with sleep-disordered breathing. *Sleep*. marzo 2010;33(3):319–25.
64. Li AM, Lam HS, Chan MHM, So HK, Ng SK, Chan IHS, et al. Inflammatory cytokines and childhood obstructive sleep apnoea. *Ann Acad Med Singapore*. agosto 2008;37(8):649–54.
65. Tauman R, O'Brien LM, Gozal D. Hypoxemia and obesity modulate plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in sleep-disordered breathing. *Sleep Breath Schlaf Atm*. giugno 2007;11(2):77–84.
66. Li AM, Hung E, Tsang T, Yin J, So HK, Wong E, et al. Induced sputum inflammatory measures correlate with disease severity in children with obstructive sleep apnoea. *Thorax*. gennaio 2007;62(1):75–9.
67. O'Brien LM, Serpero LD, Tauman R, Gozal D. Plasma adhesion molecules in children with sleep-disordered breathing. *Chest*. aprile 2006;129(4):947–53.
68. Tam CS, Wong M, McBain R, Bailey S, Waters KA. Inflammatory measures in children with obstructive sleep apnoea. *J Paediatr Child Health*. maggio 2006;42(5):277–82.

69. Larkin EK, Rosen CL, Kirchner HL, Storer-Isser A, Emancipator JL, Johnson NL, et al. Variation of C-reactive protein levels in adolescents: association with sleep-disordered breathing and sleep duration. *Circulation*. 19 aprile 2005;111(15):1978–84.
70. Tauman R, Ivanenko A, O'Brien LM, Gozal D. Plasma C-reactive protein levels among children with sleep-disordered breathing. *Pediatrics*. giugno 2004;113(6):e564–569.
71. Kaditis AG, Alexopoulos EI, Kalampouka E, Kostadima E, Germenis A, Zintzaras E, et al. Morning levels of C-reactive protein in children with obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 febbraio 2005;171(3):282–6.
72. Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Tauman R, Gozal D. Plasma C-reactive protein in nonobese children with obstructive sleep apnea before and after adenotonsillectomy. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 luglio 2006;2(3):301–4.
73. Gozal D, Crabtree VM, Sans Capdevila O, Witcher LA, Kheirandish-Gozal L. C-reactive protein, obstructive sleep apnea, and cognitive dysfunction in school-aged children. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 luglio 2007;176(2):188–93.
74. Kheirandish-Gozal L, Philby MF, Qiao Z, Khalyfa A, Gozal D. Endothelial Dysfunction in Children With Obstructive Sleep Apnea Is Associated With Elevated Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Plasma Activity Levels. *J Am Heart Assoc*. 9 febbraio 2017;6(2):e004923.
75. Zhang F, Wu Y, Feng G, Ni X, Xu Z, Gozal D. Polysomnographic correlates of endothelial function in children with obstructive sleep apnea. *Sleep Med*. dicembre 2018;52:45–50.
76. Budhiraja R, Parthasarathy S, Quan SF. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 giugno 2007;3(4):409–15.
77. Bhattacharjee R, Kim J, Alotaibi WH, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Gozal D. Endothelial dysfunction in children without hypertension: potential contributions of obesity and obstructive sleep apnea. *Chest*. marzo 2012;141(3):682–91.
78. Lippi G, Mattiuzzi C, Franchini M. Sleep apnea and venous thromboembolism. A systematic review. *Thromb Haemost*. novembre 2015;114(5):958–63.
79. Scherbakov N, Sandek A, Ebner N, Valentova M, Nave AH, Jankowska EA, et al. Sleep-Disordered Breathing in Acute Ischemic Stroke: A Mechanistic Link to Peripheral Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 11 settembre 2017;6(9):e006010.
80. Seiler A, Camilo M, Korostovtseva L, Haynes AG, Brill AK, Horvath T, et al. Prevalence of sleep-disordered breathing after stroke and TIA: A meta-analysis. *Neurology*. 12 febbraio 2019;92(7):e648–54.

81. Ciccone MM, Faienza MF, Altomare M, Nacci C, Montagnani M, Valente F, et al. Endothelial and Metabolic Function Interactions in Overweight/Obese Children. *J Atheroscler Thromb.* 1 agosto 2016;23(8):950–9.
82. Loid P, Långström S, Viljakainen H, Mäkipernaa A, Heikinheimo M, Mäkitie O. Prothrombotic state in young females with severe early-onset obesity. *Pediatr Res.* gennaio 2018;83(1–1):2–4.
83. Singh A, Foster GD, Gunawardana J, McCoy TA, Nguyen T, Vander Veur S, et al. Elevated circulating tissue factor procoagulant activity, factor VII, and plasminogen activator inhibitor-1 in childhood obesity: evidence of a procoagulant state. *Br J Haematol.* agosto 2012;158(4):523–7.
84. Stokes S, Breheny P, Radulescu A, Radulescu VC. Impact of obesity on the risk of venous thromboembolism in an inpatient pediatric population. *Pediatr Hematol Oncol.* agosto 2014;31(5):475–80.
85. Pearson V, Ruzas C, Krebs NF, Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ, Bernard TJ. Overweight and obesity are increased in childhood-onset cerebrovascular disease. *J Child Neurol.* aprile 2013;28(4):517–9.
86. Sundbøll J, Ängquist L, Adelborg K, Gjørde LK, Ording A, Sørensen TIA, et al. Changes in Childhood Body-Mass Index and Risk of Venous Thromboembolism in Adulthood. *J Am Heart Assoc.* 19 marzo 2019;8(6):e011407.
87. Hayden J, O'Donnell G, deLaunois I, O'Gorman C. Endothelial Peripheral Arterial Tonometry (Endo-PAT 2000) use in paediatric patients: a systematic review. *BMJ Open.* 18 gennaio 2023;13(1):e062098.
88. Czippelova B, Turianikova Z, Krohova J, Wiszt R, Lazarova Z, Pozorciakova K, et al. Arterial Stiffness and Endothelial Function in Young Obese Patients - Vascular Resistance Matters. *J Atheroscler Thromb.* 1 novembre 2019;26(11):1015–25.
89. La Valle A, Crocco M, Chiarenza DS, Maghnie M, d'Annunzio G. Endothelial impairment evaluation by peripheral arterial tonometry in pediatric endocrinopathies: A narrative review. *World J Diabetes.* 15 giugno 2021;12(6):810–26.
90. Jurko T, Mestanik M, Mestanikova A, Zeleňák K, Jurko A. Early Signs of Microvascular Endothelial Dysfunction in Adolescents with Newly Diagnosed Essential Hypertension. *Life Basel Switz.* 13 luglio 2022;12(7):1048.
91. Yamaoka-Tojo M. Endothelial Function for Cardiovascular Disease Prevention and Management. *Int J Clin Cardiol.* 27 settembre 2017;4:103.
92. Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp JoVE.* 15 ottobre 2010;(44):2167.
93. Van De Maele K, Devlieger R, Provyn S, De Schepper J, Gies I. Feasibility and Tolerance of Fingertip Peripheral Arterial Tonometry Measurements in School-Aged Children. *Front Pediatr.* 2021;9:622056.

94. Bhangoo A, Sinha S, Rosenbaum M, Shelov S, Ten S. Endothelial function as measured by peripheral arterial tonometry increases during pubertal advancement. *Horm Res Paediatr.* 2011;76(4):226–33.
95. Hudgins LC, Annavajjhala V, Kovanlikaya A, Frank MD, Solomon A, Parker TS, et al. Non-invasive assessment of endothelial function in children with obesity and lipid disorders. *Cardiol Young.* marzo 2016;26(3):532–8.
96. Kochummen E, Umpaichitra V, Marwa A, Joshi K, Chin VL, Perez-Colon S. Assessment of Microvascular Function in Children and Adolescents with Diabetes and Obesity. *Int J Endocrinol Metab.* gennaio 2020;18(1):e90094.
97. Agarwal C, Cohen HW, Muzumdar RH, Heptulla RA, Renukuntla VS, Crandall J. Obesity, hyperglycemia and endothelial function in inner city Bronx adolescents: a cross-sectional study. *Int J Pediatr Endocrinol.* 29 ottobre 2013;2013(1):18.
98. He W, Zhang Y, Li X, Mu K, Dou Y, Ye Y, et al. Multiple non-invasive peripheral vascular function parameters with obesity and cardiometabolic risk indicators in school-aged children. *BMC Pediatr.* 19 marzo 2022;22(1):146.
99. Mueller UM, Walther C, Adam J, Fikenzer K, Erbs S, Mende M, et al. Endothelial Function in Children and Adolescents Is Mainly Influenced by Age, Sex and Physical Activity - An Analysis of Reactive Hyperemic Peripheral Artery Tonometry. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 25 aprile 2017;81(5):717–25.
100. Jacobs S, Mylemans E, Ysebaert M, Vermeiren E, De Guchtenaere A, Heuten H, et al. The impact of obstructive sleep apnea on endothelial function during weight loss in an obese pediatric population. *Sleep Med.* ottobre 2021;86:48–55.
101. Patti G, Guzzeti C, Di Iorgi N, Maria Allegri AE, Napoli F, Loche S, et al. Central adrenal insufficiency in children and adolescents. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* agosto 2018;32(4):425–44.
102. Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents [Internet]. 2011 [citato 9 maggio 2023]. Disponibile su: <https://karger.com/books/book/2695/Diagnostics-of-Endocrine-Function-in-Children-and>
103. Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. *GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab.* novembre 2000;85(11):3990–3.
104. Swinscow TVD. *Statistics at Square One.* 9th ed. revised by Campbell MJ: University of Southampton: BMJ Publishing Group, Chapter 11, 1997: 78.
105. Walton BL, Lehmann M, Skorczewski T, Holle LA, Beckman JD, Cribb JA, et al. Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood.* 4 maggio 2017;129(18):2537–46.

- 106.Sorlie PD, Garcia-Palmieri MR, Costas R, Havlik RJ. Hematocrit and risk of coronary heart disease: the Puerto Rico Health Program. *Am Heart J.* aprile 1981;101(4):456–61.
- 107.Erikssen G, Thaulow E, Sandvik L, Stormorken H, Erikssen J. Haematocrit: a predictor of cardiovascular mortality? *J Intern Med.* novembre 1993;234(5):493–9.
- 108.Gagnon DR, Zhang TJ, Brand FN, Kannel WB. Hematocrit and the risk of cardiovascular disease--the Framingham study: a 34-year follow-up. *Am Heart J.* marzo 1994;127(3):674–82.
- 109.Wannamethee G, Shaper AG, Whincup PH. Ischaemic heart disease: association with haematocrit in the British Regional Heart Study. *J Epidemiol Community Health.* aprile 1994;48(2):112–8.
- 110.Toss F, Nordström A, Nordström P. Association between hematocrit in late adolescence and subsequent myocardial infarction in Swedish men. *Int J Cardiol.* 9 ottobre 2013;168(4):3588–93.
- 111.Gaebler N, Haggemüller B, Kapapa M, Serra A, Tews D, Funcke JB, et al. Age- and BMI-Associated Expression of Angiogenic Factors in White Adipose Tissue of Children. *Int J Mol Sci.* 21 ottobre 2019;20(20):5204.
- 112.Gómez García A, Núñez GG, Sandoval MEV, Castellanos SG, Alvarez Aguilar C. Factors associated with early platelet activation in obese children. *Clin Med Res.* settembre 2014;12(1–2):21–6.
- 113.Iglesias Morcillo M, Freuer D, Peters A, Heier M, Meisinger C, Linseisen J. Body Mass Index and Waist Circumference as Determinants of Hemostatic Factors in Participants of a Population-Based Study. *Med Kaunas Lith.* 26 gennaio 2023;59(2):228.
- 114.Hörber S, Lehmann R, Stefan N, Machann J, Birkenfeld AL, Wagner R, et al. Hemostatic alterations linked to body fat distribution, fatty liver, and insulin resistance. *Mol Metab.* 31 maggio 2021;53:101262.
- 115.Christiansen SC, Lijfering WM, Naess IA, Hammerstrøm J, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, et al. The relationship between body mass index, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost JTH.* settembre 2012;10(9):1761–7.
- 116.De Pergola G, Pannacciulli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest.* novembre 2002;25(10):899–904.
- 117.Shen T, Wang J, Yang W, Li L, Qiao Y, Yan X, et al. Hematological Parameters Characteristics in Children with Obstructive Sleep Apnea with Obesity. *Risk Manag Healthc Policy.* 2021;14:1015–23.
- 118.Balagopal PB, de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic,

- research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 14 giugno 2011;123(23):2749–69.
119. Stoppa-Vaucher S, Dirlwanger MA, Meier CA, de Moerloose P, Reber G, Roux-Lombard P, et al. Inflammatory and prothrombotic states in obese children of European descent. *Obes Silver Spring Md*. agosto 2012;20(8):1662–8.
120. Hafez M, El-Masry S, Musa N, Fathy M, Hassan M, Hassan N, et al. Relationship between visceral obesity and plasma fibrinogen in obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. marzo 2016;29(3):289–96.
121. Chan P, Lin TH, Pan WH, Lee YH. Thrombophilia associated with obesity in ethnic Chinese. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. ottobre 1995;19(10):756–9.
122. Hörber S, Lehmann R, Fritsche L, Machann J, Birkenfeld AL, Häring HU, et al. Lifestyle Intervention Improves Prothrombotic Coagulation Profile in Individuals at High Risk for Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 13 luglio 2021;106(8):e3198–207.
123. Landgraf K, Friebe D, Ullrich T, Kratzsch J, Dittrich K, Herberth G, et al. Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children. *J Clin Endocrinol Metab*. aprile 2012;97(4):E556–564.
124. Mahmud FH, Hill DJ, Cuerden MS, Clarson CL. Impaired vascular function in obese adolescents with insulin resistance. *J Pediatr*. novembre 2009;155(5):678–82.
125. Pareyn A, Allegaert K, Verhamme P, Vinckx J, Casteels K. Impaired endothelial function in adolescents with overweight or obesity measured by peripheral artery tonometry. *Pediatr Diabetes*. marzo 2015;16(2):98–103.
126. Bruyndonckx L, Hoymans VY, De Guchteanaere A, Van Helvoirt M, Van Craenenbroeck EM, Frederix G, et al. Diet, exercise, and endothelial function in obese adolescents. *Pediatrics*. marzo 2015;135(3):e653–661.
127. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 13 maggio 2008;117(19):2467–74.
128. Tryggestad JB, Thompson DM, Copeland KC, Short KR. Obese children have higher arterial elasticity without a difference in endothelial function: the role of body composition. *Obes Silver Spring Md*. gennaio 2012;20(1):165–71.
129. Chin K, Ohi M, Kita H, Noguchi T, Otsuka N, Tsuboi T, et al. Effects of NCPAP therapy on fibrinogen levels in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. giugno 1996;153(6 Pt 1):1972–6.
130. Wessendorf TE, Thilmann AF, Wang YM, Schreiber A, Konietzko N, Teschler H. Fibrinogen levels and obstructive sleep apnea in ischemic stroke. *Am J Respir Crit Care Med*. dicembre 2000;162(6):2039–42.

131. Mehra R, Xu F, Babineau DC, Tracy RP, Jenny NS, Patel SR, et al. Sleep-disordered breathing and prothrombotic biomarkers: cross-sectional results of the Cleveland Family Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 settembre 2010;182(6):826–33.
132. von Känel R, Loredó JS, Ancoli-Israel S, Dimsdale JE. Association between sleep apnea severity and blood coagulability: Treatment effects of nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Breath Schlaf Atm*. settembre 2006;10(3):139–46.
133. Harańczyk M, Koniecznyńska M, Płazak W. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath Schlaf Atm*. marzo 2022;26(1):231–42.
134. Zamarrón C, Riveiro A, Gude F. Circulating levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnoea syndrome. Effects of nasal continuous positive airway pressure. *Arch Med Sci AMS*. 31 dicembre 2011;7(6):1023–8.
135. Hui DS, Ko FW, Fok JP, Chan MC, Li TS, Tomlinson B, et al. The effects of nasal continuous positive airway pressure on platelet activation in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. maggio 2004;125(5):1768–75.
136. Bokinsky G, Miller M, Ault K, Husband P, Mitchell J. Spontaneous platelet activation and aggregation during obstructive sleep apnea and its response to therapy with nasal continuous positive airway pressure. A preliminary investigation. *Chest*. settembre 1995;108(3):625–30.
137. Sanner BM, Konermann M, Tepel M, Groetz J, Mummenhoff C, Zidek W. Platelet function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J*. ottobre 2000;16(4):648–52.
138. Chin K, Kita H, Noguchi T, Otsuka N, Tsuboi T, Nakamura T, et al. Improvement of factor VII clotting activity following long-term NCPAP treatment in obstructive sleep apnoea syndrome. *QJM Mon J Assoc Physicians*. settembre 1998;91(9):627–33.
139. Robinson GV, Pepperell JCT, Segal HC, Davies RJO, Stradling JR. Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials. *Thorax*. settembre 2004;59(9):777–82.
140. Hong SN, Yun HC, Yoo JH, Lee SH. Association Between Hypercoagulability and Severe Obstructive Sleep Apnea. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg*. 1 ottobre 2017;143(10):996–1002.
141. Yang J, Xue W, Wei Z, Hou C, Zhu H, Xu H, et al. The Associations of Platelet Activation and Coagulation Parameters with Obstructive Sleep Apnoea: A Large-Scale Observational Study. *Int J Clin Pract*. 2023;2023:5817644.
142. Sökücü SN, Ozdemir C, Dalar L, Karasulu L, Aydın S, Altın S. Complete blood count alterations after six months of continuous positive airway pressure treatment in patients with severe obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 15 agosto 2014;10(8):873–8.



143. Negrev N, Nyagolov Y, Stanchewa E. Somatotropin and somatostatin effects on vitamin K-dependent plasma coagulation factors. *Eur J Pharmacol.* 24 aprile 1995;277(2-3):145-9.
144. Sävendahl LS, Grankvist K, Engström KG. Growth hormone deficiency impairs blood clotting and reduces factor VII coagulant activity in rat. *Thromb Haemost.* aprile 1995;73(4):626-9.
145. Borckenstein M, Muntean W. Effects of growth hormone on the factor VIII complex in patients with growth hormone deficiency. *Metabolism.* dicembre 1984;33(12):1065-7.
146. Miljic D, Miljic P, Doknic M, Pekic S, Djurovic M, Colovic M, et al. Changes in prothrombin and activated partial thromboplastin time during replacement therapy with human recombinant growth hormone in growth hormone deficient adults. *Horm Athens Greece.* 2006;5(3):187-91.
147. Erem C. Thyroid disorders and hypercoagulability. *Semin Thromb Hemost.* febbraio 2011;37(1):17-26.
148. Franchini M. Hemostasis and thyroid diseases revisited. *J Endocrinol Invest.* ottobre 2004;27(9):886-92.
149. Thoyyib M, Garg S, Gupta N, Aggarwal S, Pandit S. Study on Coagulation Factor VIII and Fibrinogen Levels in Patients with Thyroid Disorders. *Indian J Endocrinol Metab.* 2018;22(4):479-84.
150. Rogers JS, Shane SR, Jencks FS. Factor VIII activity and thyroid function. *Ann Intern Med.* novembre 1982;97(5):713-6.
151. Mouton S, Nighoghossian N, Berruyer M, Derex L, Philippeau F, Cakmak S, et al. Hyperthyroidism and cerebral venous thrombosis. *Eur Neurol.* 2005;54(2):78-80.
152. Müller B, Tsakiris DA, Roth CB, Guglielmetti M, Staub JJ, Marbet GA. Haemostatic profile in hypothyroidism as potential risk factor for vascular or thrombotic disease. *Eur J Clin Invest.* febbraio 2001;31(2):131-7.
153. Chadarevian R, Bruckert E, Giral P, Turpin G. Relationship between thyroid hormones and fibrinogen levels. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* dicembre 1999;10(8):481-6.
154. Cantürk Z, Cetinarslan B, Tarkun I, Cantürk NZ, Ozden M, Duman C. Hemostatic system as a risk factor for cardiovascular disease in women with subclinical hypothyroidism. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* ottobre 2003;13(10):971-7.
155. Egeberg O. Influence of thyroid function on the blood clotting system. *Scand J Clin Lab Invest.* 1 gennaio 1963;15(1):1-7.
156. Simone JV, Abildgaard CF, Schulman I. Blood coagulation in thyroid dysfunction. *N Engl J Med.* 11 novembre 1965;273(20):1057-61.

157. Shih CH, Chen SL, Yen CC, Huang YH, Chen CD, Lee YS, et al. Thyroid hormone receptor-dependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins. *Endocrinology*. giugno 2004;145(6):2804–14.
158. Ozcan MA, Cömlekçi A, Demirkan F, Yüksel F, Sari I, Demir T, et al. Plasma levels of free tissue factor pathway inhibitor in patients with various thyroid disorders. *Thromb Res*. 1 giugno 2003;110(4):243–7.
159. Gullu S, Sav H, Kamel N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. marzo 2005;152(3):355–61.
160. Alioğlu B, Kılıç N, Şimşek E, Dallar Y. Increased thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and decreased tissue factor pathway inhibitor and thrombomodulin levels in children with hypothyroidism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. settembre 2012;4(3):146–50.
161. Suzuki K, Yanagi K, Shimizu M, Wakamatsu S, Niitani T, Hosonuma S, et al. Effect of growth hormone replacement therapy on plasma diacron-reactive oxygen metabolites and endothelial function in Japanese patients: The GREAT clinical study. *Endocr J*. 30 gennaio 2018;65(1):101–11.