



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

CICLO XXIII

COORDINATORE Prof. Capitani Silvano

STUDIO DELL'AZIONE DEL MITOTANE, FARMACO ADRENOLITICO, SULLA FUNZIONALITA' IPOFISARIA

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando

Dott. Gentilin Erica

Tutore

Prof. degli Uberti Ettore

(firma)

(firma)

Anni 2008/2010



DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ CON RICHIESTA DI EMBARGO TESI

AL MAGNIFICO RETTORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA UFFICIO DOTTORATO

Via delle Scienze, n. 41/B

44100 Ferrara

Tel. 0532/455284

Fax 0532/455285

e-mail dottorato@unife.it

Your E-Mail Address: gntnce@unife.it

Oggetto: embargo

Io sottoscritto Dott. Gentilin Erica

nata a Padova

Provincia Padova

il giorno 01-09-1982

avendo frequentato il corso di Dottorato di Ricerca in: Scienze Biomediche

Ciclo di Dottorato XXIII

Titolo della tesi in Italiano: Studio dell'azione del mitotane, farmaco adrenolitico, sulla funzionalità ipofisaria

Titolo della tesi in Inglese: Study of the action of mitotane, adrenolitic drug, on pituitary function

Titolo della tesi in altra Lingua Straniera se la stesura della tesi è autorizzata dal collegio dei docenti in una lingua diversa dall'italiano o inglese (spagnolo, tedesco, francese, ecc.) si ricorda di compilare il seguente campo. /

Tutore: Prof: Ettore degli Uberti

Settore Scientifico Disciplinare (SSD): MED/13

Parole chiave (max 10) in italiano, inglese ed eventuale 3° lingua: mitotane, ipofisi, apoptosi, pituitary function, apoptosis

CONSAPEVOLE --- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; -- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; -- 3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 4 copie di cui una in formato cartaceo e tre in formato .pdf, non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/dottorati/dottorati.htm> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; -- 4) del fatto che l'Università sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. --- DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA' --- 1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo, è del tutto identica a quelle presentate in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; -- 2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. ---

PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Dichiarazione per embargo

Chiede di non rendere accessibile i dati contenuti nella tesi per il seguente periodo di tempo: 12 mesi

Firma Dottorando

Ferrara, li 27-01-2011

Firma del Dottorando

Firma Tutore

Visto: Il Tutore

Si approva Firma del Tutore

INDICE

Introduzione	1
1 Il surrene	1
1.1 Patologie della corticale del surrene	2
1.1.1 Ipercortisolismo	3
1.1.2 Iperaldosteronismo primario	4
1.1.3 Sindromi adrenogenitali	6
1.1.4 Insufficienza corticosurrenalica primaria	7
1.1.5 Insufficienza corticosurrenalica secondaria	9
1.1.6 Neoplasie corticali	9
1.1.6.1 Carcinoma adrenocorticale	10
2 Ipofisi	17
2.1 Cellule tireotrope	18
2.1.1 Ipotiroidismo primario e secondario	20
2.2 Cellule adrenocorticotrope	21
Scopo dello studio	23
Materiali e metodi	24
1 Colture cellulari	24
2 Vitalità cellulare	25
3 Attività caspasica	26
4 Valutazione della secrezione ormonale	26
5 Estrazione e quantificazione dell'RNA	28

6 Retrotrascrizione	30
7 Real time PCR	31
8 Analisi statistica	32
Risultati	33
1 Mitotane e cellule ipofisarie TSH secernenti	33
1.1 Effetti del mitotane sul dosaggio degli ormoni tiroidei	33
1.2 Effetti del mitotane sulla vitalità delle cellule T α T1	34
1.3 Effetti del mitotane sull'attività caspatica in cellule T α T1	36
1.4 Effetti del mitotane sulla secrezione del TSH	37
1.5 Effetti del mitotane sull'espressione della subunità β del TSH	37
1.6 Effetti del mitotane sulla secrezione del TSH indotta dal TRH	38
1.7 Effetti del mitotane sull'espressione della subunità β del TSH indotta dal TRH	41
2 Mitotane e cellule ipofisarie ACTH secernenti	42
2.1 Effetti del mitotane sulla vitalità delle cellule AtT20/D16v-F2	42
2.2 Effetti del mitotane sull'attività caspatica in cellule AtT20/D16v-F2	46
2.3 Valutazione della secrezione dell'ACTH indotta dal CRH nel tempo	48
2.4 Effetti del mitotane sulla secrezione di ACTH	49
Discussione	56
Conclusioni	62
Ringraziamenti	63
Bibliografia	64

INTRODUZIONE

1 IL SURRENE

Le ghiandole surrenali sono ghiandole endocrine pari, di forma piramidale (circa $2 \times 6 \times 1$ cm, peso 4-6 g), posizionate nei pressi della sommità del rene, come dice il nome, dal quale sono separate per mezzo di tessuto adiposo. Il surrene è responsabile principalmente della regolazione della risposta allo stress mediante la sintesi di corticosteroidi e catecolammine, tra cui il cortisolo e l'adrenalina (1).

Il parenchima delle ghiandole surrenali, circondato da una capsula fibrosa, è diviso in due regioni di origine, struttura e funzione distinte: una più grande detta corteccia surrenale (75%), derivante dal mesoderma, ed una più piccola detta zona midollare (25%), derivante dall'ectoderma. La corteccia surrenale è divisa a sua volta in tre zone: la glomerulare (15%), più esterna, che sintetizza e secerne ormoni mineralcorticoidi per il mantenimento dell'equilibrio idrico (tra cui il più importante è l'aldosterone), la fascicolata (78%) che sintetizza e secerne i glucocorticoidi (principalmente cortisolo) e controlla il metabolismo di carboidrati, grassi e proteine, e la reticolare (7%), più interna, che produce gli ormoni sessuali come androgeni, estrogeni e progesterone. La regione midollare risulta ricoperta completamente dalla corticale e sintetizza vari ormoni tra i quali le catecolammine (principalmente epinefrina) che hanno diversi effetti tra cui il rapido adattamento ai cambiamenti dell'ambiente (1, 2, 3, 4, 5, 6).

La sintesi ormonale avviene a partire da colesterolo, proveniente dalla dieta o dalla sintesi endogena dall'acetato (Fig. 1); gli enzimi coinvolti in tale processo appartengono alla famiglia delle ossigenasi citocromo P-450. Il corticosurrene è in grado di sintetizzare glucocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni, progestinici ed estrogeni. La zona glomerulare è regolata dall'asse renina-angiotensina-aldosterone (RAA), poiché priva dell'enzima 17-idrossilasi e pertanto in grado di sintetizzare solo aldosterone. Al contrario si comportano le zone reticolare e fascicolata, regolate dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH), nelle quali, mancando la 18-idrossilasi, si formano solo glucocorticoidi ed androgeni (3).

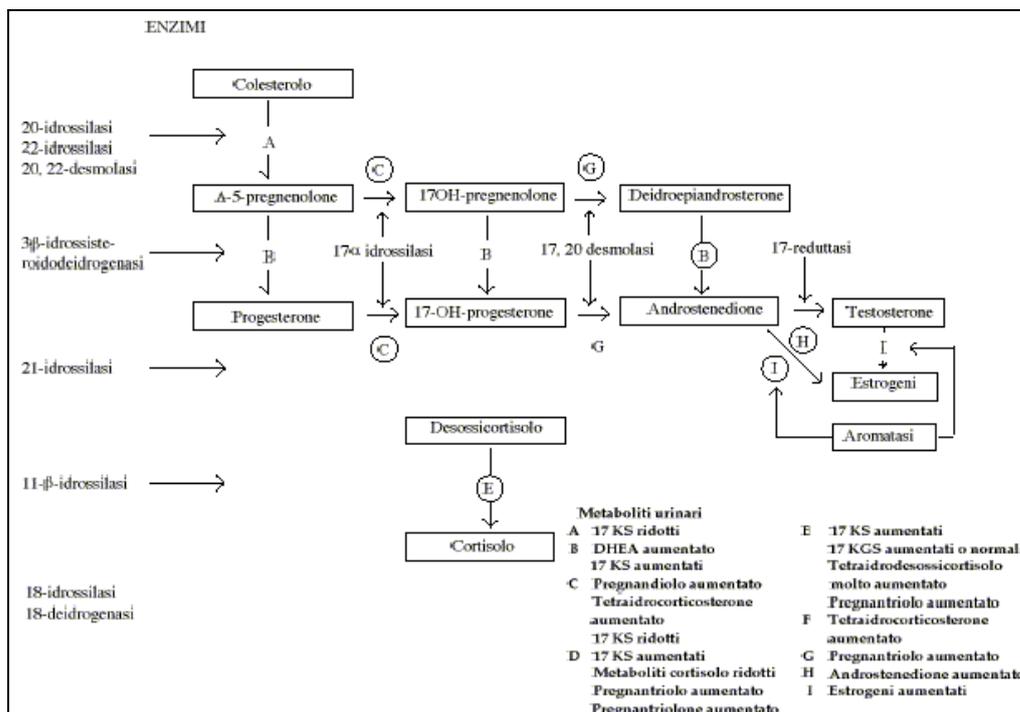


Fig.1 Biosintesi degli ormoni steroidei

1.1 PATOLOGIE DELLA CORTICALE DEL SURRNE

Le patologie riscontrabili a livello della corticale del surrene possono essere classificate come: iperfunzionanti o ipofunzionanti. Essendo fondamentalmente tre gli ormoni secreti dalla componente corticale della ghiandola surrenale (glucocorticoidi, mineralcorticoidi e ormoni sessuali), si possono distinguere tre sindromi associate ad iperfunzionalità: Sindrome di Cushing, determinata da un eccesso di cortisolo, iperaldosteronismo determinato da eccesso di aldosterone, e sindrome adrenogenitale che determina un eccesso di sintesi di testosterone (4). Le patologie ipofunzionanti, invece, possono essere determinate da alterata secrezione ormonale da parte del surrene, ma anche da una diminuita stimolazione delle ghiandole surrenali per insufficienza di ACTH. Si può osservare, quindi, sviluppo di: insufficienza adrenocorticale primaria acuta e cronica o insufficienza adrenocorticale secondaria (4, 5).

1.1.1 IPERCORTISOLISMO

La sindrome di Cushing è determinata da ogni condizione in grado di elevare i livelli di glucocorticoidi. Ci sono quattro possibili cause di eccesso di cortisolo. La più comune è la somministrazione prolungata di glucocorticoidi a scopo terapeutico. Le altre tre cause di ipercortisolismo sono endogene e riguardano malattie primitive ipotalamo-ipofisarie, associate a ipersecrezione di ACTH, ipersecrezione di cortisolo da parte di un adenoma, un carcinoma o un'iperplasia nodulare del surrene o secrezione di ACTH ectopico da parte di una neoplasia non endocrina. L'ipersecrezione primaria di ACTH rappresenta oltre il 50% dei casi di ipercortisolismo endogeno e viene detta Malattia di Cushing. Essa colpisce le donne con una frequenza cinque volte maggiore rispetto agli uomini e con un picco di incidenza dai 20 ai 30 anni. Nella maggior parte di queste pazienti l'ipofisi è sede di un piccolo adenoma ACTH secernente che non è responsabile di effetto massa a livello encefalico. Nella maggior parte dei restanti casi, tuttavia, nell'ipofisi non si trovano adenomi, ma solo un'iperplasia corticotropa. In qualche paziente, l'alterazione di base è a livello ipotalamico, con una ipersecrezione di ormone rilasciante la corticotropina (CRH). Nella malattia di Cushing si ha una iperplasia corticale nodulare, causata da alti livelli di ACTH che, a sua volta, è responsabile dell'ipercortisolismo. Le neoplasie primitive surrenaliche, come l'adenoma, il carcinoma o l'iperplasia, sono alla base del 15-30% dei casi di sindrome di Cushing endogena; questa forma è anche conosciuta come ACTH-indipendente o sindrome di Cushing surrenalica, poiché queste ghiandole hanno funzione autonoma, svincolate dal controllo ipofisario. Nell'adulto, carcinoma ed adenoma surrenalico hanno la stessa frequenza, mentre nel bambino è più comune il carcinoma. L'iperplasia surrenalica autonoma è molto rara. La produzione di cortisolo è solitamente maggiore in caso di carcinoma che negli adenomi e nelle iperplasie. In caso di neoplasia solitaria monolaterale, la corticale residua omolaterale ed il surrene controlaterale vanno incontro ad atrofia, a causa della soppressione della secrezione di ACTH indotta dagli elevati livelli di cortisolo. Quindi, nella sindrome di Cushing a origine surrenalica, i livelli di cortisolo sono marcatamente elevati, pur in presenza di diminuiti livelli di ACTH circolante. La secrezione ectopica di ACTH da parte di neoplasie non ipofisarie, costituisce la causa della sindrome di Cushing nella maggior parte dei restanti casi. Spesso, la neoplasia responsabile è un carcinoma polmonare a piccole cellule, anche se altre neoplasie, come i carcinoidi, i carcinomi midollari della tiroide ed i tumori a cellule insulari del pancreas,

possono essere associati a questa sindrome. Vi sono inoltre rari casi con produzione ectopica di fattore rilasciante la corticotropina, che a sua volta stimola la secrezione di ACTH e determina ipercortisolismo. Come nella variante ipofisaria, anche in questa forma i surreni vanno incontro ad iperplasia bilaterale, ma spesso il rapido declino del paziente, a causa della neoplasia, impedisce che raggiungano notevoli dimensioni. Questa varietà di sindrome di Cushing è più frequente negli uomini fra la quinta e la sesta decade di età. I primi sintomi della patologia sono ipertensione ed aumento del peso corporeo. Nel tempo si rende visibile il modello tipico di distribuzione centrale del tessuto adiposo, che porta ad obesità localizzata al tronco, faccia lunare e accumulo adiposo in regione cervicale e del dorso (gibbosità a bufalo). L'ipercortisolismo causa atrofia selettiva delle miofibre veloci (tipo II), il che porta a riduzione delle masse muscolari e debolezza della muscolatura prossimale degli arti. I glucocorticoidi stimolano la gluconeogenesi ed inibiscono la captazione cellulare del glucosio portando a iperglicemia, glicosuria e polidipsia. Gli effetti catabolici sulle proteine sono responsabili della perdita di collagene e riassorbimento osseo. Conseguentemente la cute è fragile, sottile e facilmente soggetta a ecchimosi; la cicatrizzazione è ritardata; l'addome è sede frequente di strie cutanee. Il riassorbimento osseo porta ad osteoporosi, a cui seguono lombalgie ed una maggiore predisposizione a fratture. I pazienti con sindrome di Cushing sono particolarmente esposti a varie infezioni per l'immunosoppressione causata dai glucocorticoidi. Fanno parte del quadro un certo numero di disturbi psichici, tra cui oscillazioni dell'umore, depressione e psicosi franca, come pure irsutismo e disturbi del ciclo mestruale.

1.1.2 IPERALDOSTERONISMO PRIMARIO

L'iperaldosteronismo primario (IAP) è un termine generico in cui sono comprese alcune rare sindromi strettamente correlate, caratterizzate dalla ipersecrezione cronica di aldosterone. Livelli eccessivi di aldosterone causano ritenzione di sodio e perdita di potassio, che portano ad ipertensione ed ipocaliemia (Fig. 2). L'iperaldosteronismo può essere primario o secondario ad una causa extrasurrenalica. L'iperaldosteronismo primario consiste in una produzione eccessiva autonoma di questo ormone, a cui consegue perdita di funzione del sistema renina-angiotensina e diminuzione dell'attività reninica plasmatica. Questa condizione può derivare da

una neoplasia surrenalica secernente aldosterone, solitamente un adenoma, o da un'iperplasia corticosurrenalica primaria. Nell'80% dei casi circa, l'iperaldosteronismo primario è sostenuto da un adenoma secernente monolaterale, condizione conosciuta come sindrome di Conn. Essa si verifica con frequenza circa doppia nelle donne di mezza età rispetto agli uomini.

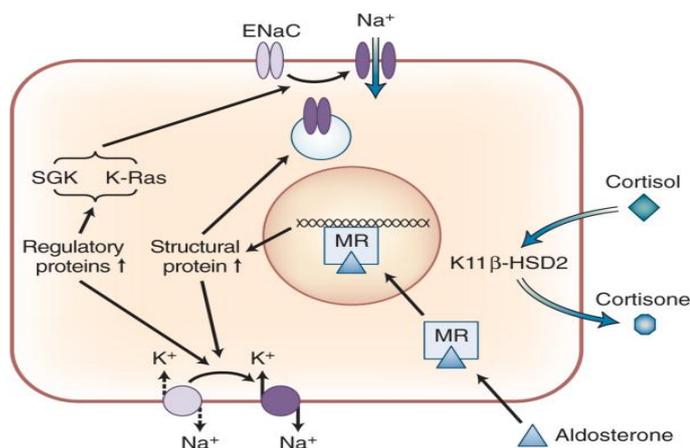


Fig 2: Azione dell'aldosterone sulle cellule epiteliali nella parte distale del nefrone.

Nella forma secondaria, invece, l'aldosterone viene secreto in seguito all'inattivazione del sistema renina-angiotensina. Sono caratteristici alti livelli di renina plasmatica e la condizione è di comune riscontro in corso di insufficienza cardiaca congestizia, riduzione della perfusione renale (nefrosclerosi arteriolare, stenosi dell'arteria renale), ipoalbuminemia e gravidanza (per gli aumenti determinati dagli estrogeni dei substrati reninici del plasma). Le manifestazioni cliniche dell'aldosteronismo primario sono rappresentate da ipertensione e ipocaliemia. I livelli sierici di renina, come accennato, sono bassi. L'ipocaliemia deriva da perdita renale di potassio e può causare una varia sintomatologia neuromuscolare, tra cui astenia, parestesie, disturbi visivi e, occasionalmente, tetania franca. La ritenzione di sodio comporta un aumento del sodio corporeo totale e un'espansione del volume extracellulare, producendo una concentrazione del sodio intracellulare con aumento della reattività vascolare. L'ipertensione è quindi in parte il risultato ultimo della ritenzione del sodio. Sia l'espansione del volume extracellulare che l'ipocaliemia impongono un sovraccarico di lavoro al cuore, talora causando modificazioni elettrocardiografiche e scompenso cardiaco.

1.1.3 SINDROMI ADRENOGENITALI

Le alterazioni della differenziazione sessuale, come la virilizzazione, possono conseguire ad affezioni primitive delle gonadi ed a svariate affezioni primitive surrenaliche. Quest'ultimo gruppo comprende le neoplasie corticosurrenaliche ed un gruppo di entità denominate iperplasie surrenaliche congenite. Le neoplasie corticosurrenaliche associate a virilizzazione sono per lo più rappresentate da carcinomi surrenalici a secrezione androgena piuttosto che da adenomi; si tratta comunque di tumori morfologicamente identici ad altre neoplasie corticali. Le iperplasie surrenaliche congenite rappresentano un gruppo di patologie dovute ad errori metabolici congeniti, a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzate dal deficit o dalla totale assenza di enzimi chiave nella sintesi degli steroidi, soprattutto del cortisolo. A causa del blocco nella sintesi di questo ormone, la steroidogenesi è convogliata verso altre vie, con il risultato di un aumento nella produzione di androgeni, responsabili della virilizzazione. Contemporaneamente il deficit di cortisolo induce un'iperproduzione di ACTH che stimola l'iperplasia della corteccia surrenale. In alcuni casi, il deficit enzimatico è a scapito anche della produzione di aldosterone, aggiungendo alla sindrome virilizzante i problemi di una massiva perdita di sali. In altri casi, il deficit di enzimi che si viene a creare è incompatibile con la vita, oppure può interessare solo la produzione di aldosterone, senza intaccare la sintesi del cortisolo. Esiste, quindi, un ampio spettro di sindromi cliniche possibili, in ognuna delle quali il deficit enzimatico può essere tale da bloccare completamente o solo in parte una o più vie della steroidogenesi. Circa il 90% dei casi di iperplasia surrenalica congenita è dovuto ad un difetto nella conversione del progesterone in 11-desossicorticosterone da parte dell'enzima 21-idrossilasi. A seconda del tipo di mutazione, questo difetto può essere totale o parziale. Si distinguono tre diverse sindromi: l'adrenogenitalismo con perdita di sali, l'adrenogenitalismo virilizzante semplice e l'adrenogenitalismo non classico, che comprende le forme fruste, completamente asintomatiche o associate a manifestazioni da eccesso di androgeni solo durante la seconda infanzia e la pubertà. La sindrome con perdita di sali deriva dall'incapacità di convertire il progesterone in desossicorticosterone a causa del deficit totale di idrossilasi. La sintesi di mineralcorticoidi è virtualmente assente e contemporaneamente c'è un blocco nella conversione dell'idrossiprogesterone in desossicortisolo, con insufficiente sintesi di cortisolo. Durante la vita fetale, l'equilibrio elettrolitico è mantenuto dal rene materno, ma alla nascita la

sindrome si rende subito manifesta con perdita di sali, iponatremia ed ipercaliemia, cui consegue acidosi, ipotensione, collasso cardiocircolatorio e, talora, morte. Contemporaneamente, il blocco nella sintesi del cortisolo e l'eccessiva produzione di androgeni induce virilizzazione, che nelle femmine può essere evidente già alla nascita o addirittura in utero, ma nei maschi è difficile da valutare. Nelle femmine si possono osservare vari gradi di virilizzazione, da una moderata ipertrofia del clitoride ad una completa fusione labioscrotale con ipertrofia clitoridea così marcata da inglobare l'uretra, con formazione di un organo simil-fallico. Nei maschi, la sindrome passa inizialmente inosservata finché, 5-15 giorni dopo la nascita, compare la crisi da perdita dei sali. La sindrome androgenitale virilizzante semplice, senza perdita di sali, che si presenta come ambiguità genitale, si manifesta quando il deficit di 21-idrossilasi è solo parziale. In tal caso, la produzione di mineralcorticoidi, anche se diminuita, è comunque sufficiente a garantire il riassorbimento dei sali; mentre, il basso livello di glucocorticoidi è insufficiente a garantire un controllo inibitorio sulla secrezione di ACTH. Quindi, il livello di aldosterone è parzialmente ridotto, ma quelli di testosterone e ACTH sono entrambi aumentati, con conseguente iperplasia corticosurrenalica. Il virilismo surrenalico non comune o ad insorgenza tardiva è molto più comune delle forme "classiche" appena descritte. Questi pazienti possono essere praticamente asintomatici o manifestare solo segni lievi di virilizzazione come l'irsutismo.

1.1.4 INSUFFICIENZA CORTICOSURRENALICA PRIMARIA

La malattia di Addison è una rara condizione causata da progressiva distruzione della corticale surrenalica. In generale, le manifestazioni cliniche dell'iposurrenalismo non si presentano fino a quando almeno il 90% del parenchima corticosurrenalico non risulti compromesso. Un gran numero di patologie possono colpire il surrene, tra cui linfomi, amiloidosi, sarcoidosi, emocromatosi, infezioni fungine ed emorragie, ma oltre il 90% dei casi di insufficienza cronica sono attribuibili alla surrenalite autoimmune, alla tubercolosi o a neoplasie metastatiche. La surrenalite autoimmune da sola è responsabile dal 60 al 70% dei casi, presentandosi in forma sporadica o familiare. Nella metà dei casi il surrene è l'unico organo colpito dal processo autoimmune, ma nei rimanenti concomitano affezioni analoghe in altri organi, come la tiroidite

di Hashimoto, l'anemia perniciosa, il diabete mellito di tipo I e l'ipoparatiroidismo idiopatico. In circa la metà dei casi di surrenalite autoimmune sono presenti anticorpi anti-surrene in circolo, così come anticorpi diretti contro altri organi e tessuti. Nei pazienti affetti c'è una notevole incidenza di particolari antigeni di istocompatibilità, soprattutto HLA-B8 e DR-3, il che suggerisce l'esistenza di una predisposizione genetica. Le infezioni, in particolare tubercolare e micotica, possono a loro volta essere causa della malattia di Addison. La surrenalite tubercolare è ora molto rara grazie allo sviluppo di agenti antitubercolari. Il coinvolgimento surrenalico deriva quasi sempre dalla disseminazione di un focolaio primario polmonare o del tratto genitourinario. L'insufficienza cronica può essere causata anche da infezioni fungine diffuse, sostenute soprattutto dall'*Histoplasma capsulatum* e dal *Coccidioides immitis*. La localizzazione metastatica è una potenziale causa di insufficienza surrenalica. I surreni rappresentano una sede abbastanza comune di metastatizzazione in pazienti con carcinomi disseminati. Nonostante in tali pazienti la funzionalità sia per lo più conservata, le metastasi distruggono occasionalmente una quantità tale di parenchima da determinare un certo grado di insufficienza funzionale. Quelle di più frequente riscontro sono di origine polmonare e mammaria seguite da carcinomi gastrointestinali, melanoma maligno e neoplasie emopoietiche. La malattia di Addison inizia insidiosamente e non richiama l'attenzione finché oltre il 90% della corticale, bilateralmente, non è distrutto ed i livelli di steroidi circolanti non sono scesi notevolmente. Inizialmente si manifesta con facile affaticabilità e progressiva debolezza, sintomi ai quali non viene generalmente dato grande valore. Comuni sono i disturbi gastrointestinali, rappresentati da anoressia, nausea, vomito, perdita di peso e diarrea. Nei pazienti con malattia surrenalica primitiva, gli alti livelli circolanti di precursori dell'ACTH stimolano i melanociti, con conseguente iperpigmentazione cutanea, particolarmente delle zone fotoesposte e dei punti soggetti a pressione, come collo, gomiti, ginocchia e nocche delle dita. Al contrario, l'iperpigmentazione non si riscontra in pazienti affetti da insufficienza corticosurrenalica secondaria a malattie primitive della regione ipotalamo-ipofisaria. La riduzione dell'attività mineralcorticoide, nell'insufficienza primaria, porta a perdita di sodio e potassio, a cui segue ipercaliemia, iponatremia, diminuzione dei fluidi corporei ed ipotensione. Il cuore presenta spesso dimensioni ridotte, a causa dell'ipovolemia cronica. L'ipoglicemia è una conseguenza occasionale del deficit di glucocorticoidi e della diminuita gluconeogenesi. Gli stress costituiti da infezioni, traumi, manovre chirurgiche possono scatenare in tali pazienti

una crisi surrenalica acuta, che si manifesta con vomito incoercibile, dolore addominale, ipotensione, coma e collasso vascolare. Questi pazienti vanno rapidamente incontro a morte a meno che non venga intrapresa immediatamente una terapia sostitutiva corticosteroidea.

1.1.5 INSUFFICIENZA CORTICOSURRENALICA SECONDARIA

Una qualsiasi affezione dell'ipotalamo o dell'ipofisi, come una metastasi, un'infezione, un infarto o danni da radioterapia, che causi una diminuzione del rilascio di ACTH può condurre allo sviluppo di un iposurrenalismo molto simile alla malattia di Addison. Analogamente agisce, la prolungata somministrazione di glucocorticoidi esogeni, sopprimendo la secrezione di ACTH e la funzione surrenalica. Tuttavia se l'iposurrenalismo è secondario, manca l'iperpigmentazione cutanea, poiché i livelli di ormone melanotropo restano bassi. Inoltre l'iposurrenalismo secondario è caratterizzato da deficit di cortisolo e di androgeni, ma la sintesi di aldosterone è nella norma. Quindi nell'iposurrenalismo secondario a insufficienza ipofisaria non c'è marcata iponatremia e ipercaliemia. Il deficit di ACTH si può manifestare da solo, anche se in molti casi rappresenta parte di un panipopituitarismo, associato a deficit multipli di altre tropine.

1.1.6 NEOPLASIE CORTICALI

Le neoplasie adrenocorticali, possono essere distinte in adenomi e carcinomi. Queste possono manifestarsi sia in forma iperfunzionante che ipofunzionante, anche se le due forme non sono distinguibili morfologicamente (2, 4).

L'adenoma corticale classico è una lesione nodulare, ben circoscritta, fino a 2.5 cm di asse maggiore, che provoca aumento di dimensione del surrene. Alcuni adenomi protrudono dalla capsula, altri sono contenuti nello spessore corticale, altri sembrano inglobati nella midollare.

I carcinomi corticosurrenalici sono neoplasie rare che insorgono ad ogni età. Sono più frequentemente funzionanti degli adenomi e pertanto spesso associati a virilizzazione o altre manifestazioni cliniche di iperfunzione surrenalica. Questi tumori sono generalmente molto

voluminosi (fino a oltre 20 cm) al momento della diagnosi, e hanno un alto grado di malignità (4).

Con il termine incidentalomi si intendono masse surrenaliche riscontrate casualmente in occasione di esami per immagini eseguiti per motivi diversi, non inerenti a patologie del surrene. L'occasionale osservazione di tali masse è stata stimata essere dello 0.5-1.5% di tutti i pazienti sottoposti a TAC dell'addome superiore. Le dimensioni variano da pochi millimetri fino a 10 cm di diametro. Gli incidentalomi costituiscono attualmente la patologia surrenalica di più frequente riscontro clinico. Tali masse si rivelano essere adenomi (33-53%) o carcinomi (fino al 18% dei casi) del surrene, feocromocitomi (0-23%), metastasi (0.5-21%), cisti (3-8%), semplici iperplasie (0-14%) (3).

1.1.6.1 CARCINOMA ADRENOCORTICALE

Il carcinoma adrenocorticale (CAC) è una patologia rara (7), che insorge principalmente nei bambini al di sotto dei 3 anni e negli adulti fra i 40 e i 50 anni, con una frequenza leggermente maggiore nel sesso femminile.

Il CAC può presentarsi in due diverse forme: ipersecretorica e non ipersecretorica.

I CAC ipersecretori sono comunemente caratterizzati da una secrezione aumentata combinata di glucocorticoidi ed androgeni. I glucocorticoidi sono responsabili della sindrome di Cushing, caratterizzata da obesità localizzata al tronco, perdita di proteine e conseguente formazione di strie cutanee, atrofia muscolare (miopatia) ed osteoporosi, aumentata suscettibilità alle infezioni, diabete, ipertensione, disturbi psichiatrici, disfunzioni gonadiche in uomini e donne. L'ipersecrezione di androgeni può essere alla base di una serie di cambiamenti nella donna, caratterizzati da irsutismo, anomalie mestruali, infertilità ed eventualmente virilizzazione franca, caratterizzata da calvizie, abbassamento della voce ed ipertrofia del clitoride. Possono essere ipersecreti anche altri steroidi biologicamente attivi. L'ipersecrezione di desossicorticosterone può portare ad un grave quadro clinico da eccesso di mineralcorticoidi, caratterizzato da ipertensione ed ipocaliemia. Eccezionalmente tumori con secrezione di estrogeni possono provocare ginecomastia nell'uomo e metrorragia dopo la menopausa nelle

donne. Un significativo sottogruppo di CAC secerne solo o prevalentemente una singola classe di steroidi biologicamente attivi, molto spesso androgeni, ma anche cortisolo (8, 9, 10, 11).

Alcuni CAC non-ipersecretori non presentano un quadro clinico da eccesso ormonale, ma possono produrre precursori biologicamente inattivi di steroidi, come 17-idrossiprogesterone. Solitamente tali tumori vengono diagnosticati come incidentalomi (9, 10, 11, 12), in occasione di esami per immagini eseguiti per motivi non correlati a patologia surrenalica. Frequentemente i CAC non associati ad iperfunzione vengono diagnosticati grazie a sintomi dovuti all'espansione del tumore. Essi riguardano manifestazioni locali, come dolore e palpazione della massa o metastasi a distanza, soprattutto a fegato, polmoni ed ossa. Il paziente può presentare febbre in concomitanza con la necrosi tumorale. Nella maggior parte dei casi lo stato generale del paziente non è deteriorato, perfino in presenza di una impressionante massa tumorale e di metastasi. Ciò spiega perché i CAC non associati ad ipersecrezione spesso vengano diagnosticati tardivamente (13).

Basi genetiche

Il carcinoma adrenocorticale può presentarsi in forma familiare, a seguito di difetti molecolari delle linee germinali, o in forma sporadica, a causa di difetti molecolari che comportano alterazioni somatiche (14).

Diverse alterazioni sono alla base della proliferazione clonale delle linee germinali, associata allo sviluppo della patologia, si è osservata, infatti, una correlazione tra la dimensione del tumore e alterazioni cromosomiche, suggerendo che queste si accumulano durante la progressione tumorale (15). Mediante analisi di ibridazione per comparazione di genomi (CGH), è stata dimostrata la presenza di delezioni a carico dei cromosomi: 1p, 17p, 22p, 22q, 2q e 11q, mentre studi di microsatelliti hanno evidenziato perdita di eterozigosi al locus 11q13 e 12p16 (¹⁶); inoltre si sono osservate mutazioni a carico di geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, come la sostituzione di una arginina con un'istidina nel dominio di trasmembrana di TP53 (¹⁷).

Mutazioni a carico di TP53 si osservano con un tasso elevato, anche nelle forme sporadiche (18) inoltre, in queste, la perdita di eterozigosi nel locus 17p13 è stata associata a maggiore aggressività del tumore (19). Altro marcatore importante nello studio di CAC sporadici, è il locus 11p15, a livello del quale sono localizzati i geni per il fattore di crescita insulino simile

(IGF2) e il gene per l'RNA di non codificazione H19. L'IGF2 risulta fortemente overespresso in pazienti con carcinoma adrenocorticale (19), per cui i suoi effetti proliferativi sono associati a crescita tumorale (20).

Mutazioni somatiche e germinali a carico del gene della menina, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1, sono state poi osservate solo in rari casi di carcinoma adrenocorticale (21, 22), mentre sono molto più frequenti le alterazioni nella via del segnale di Wnt associate ad accumulo di β -catenina, e determinate da mutazioni a carico del gene che codifica per essa (CTNN β 1), generalmente a livello del sito di fosforilazione della glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK3- β) (23).

Diagnosi

Gli approcci diagnostici per la determinazione di carcinoma adrenocorticale sono essenzialmente due: lo studio completo della funzionalità adrenocorticale e la diagnostica per immagini.

L'indagine endocrinologica di routine valuta l'eventuale over-secrezione di vari steroidi adrenocorticali, permettendo in questo modo di stabilire la localizzazione adrenocorticale del tumore. L'ipersecrezione di cortisolo ACTH indipendente è facilmente valutabile. Essa porta all'aumento del cortisolo urinario, che non è sopprimibile con alte dosi di desametasone, associato a livelli plasmatici di ACTH non rilevabili. Anche i livelli plasmatici di 17-idrossiprogesterone sono elevati (di base e/o dopo stimolazione da ACTH), come lo sono quelli di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), androgeno surrenalico specifico, che portano all'aumento della concentrazione plasmatica di testosterone nelle femmine. Altri steroidi, come desossicortisone plasmatico (DOC), Delta-4-androstenedione e, raramente, estrogeni, possono essere prodotti in eccesso dal tumore. Eccezionalmente può verificarsi la produzione di aldosterone, ciò diventa clinicamente importante per tumori sopra i 3 cm, a causa degli alti livelli plasmatici di aldosterone e della possibile associazione con la secrezione di cortisolo o altri steroidi, che escludono la diagnosi di adenoma di Conn.

L'Imaging è uno step diagnostico essenziale in quanto permette di eseguire una caratterizzazione del tumore, trovare evidenze di malignità, nonché definire estensione e stadiazione della massa tumorale.

La tomografia assiale computerizzata (TAC) è il metodo di indagine più utilizzato (24), in quanto è in grado di evidenziare i tipici caratteri che suggeriscono la malignità del tumore,

rappresentati dalla disomogeneità del tumore con zone di necrosi, talvolta calcificazioni, margini irregolari. Nel tumore maligno la densità ai Raggi-X è alta (sopra 20 UG) e ciò indica un basso contenuto lipidico in opposizione a ciò che si evidenzia negli adenomi per cui la misurazione dinamica della densità mediante contrasto rappresenta la tecnica più sensibile per la distinzione fra lesione benigna e maligna. La TAC contribuisce inoltre alla evidenziazione di invasione locale e metastasi a distanza, l'invasione dei vasi loco-regionali attraverso le vene renali e la vena cava inferiore può risalire fino all'atrio destro e causare embolismo metastatico polmonare (25).

Una volta dimostrata l'evidenza per CAC, è necessario procedere con la stadiazione e la valutazione prognostica, prima di decidere l'approccio terapeutico. Un tumore eterogeneo sopra i 6 cm, con ipersecrezione combinata di cortisolo e androgeni permette una facile diagnosi, con o senza evidenza di metastasi a distanza. Un tumore piccolo (4-5 cm) senza evidente secrezione di steroidi o disseminazione locale o a distanza può essere un problema diagnostico. In caso di dubbio, la presenza di un singolo indizio che faccia sospettare malignità è indicativo per l'intervento chirurgico. Un primo approccio per la stadiazione, e di conseguenza per la valutazione prognostica, è rappresentato dalle dimensioni del tumore e dalla presenza o assenza di metastasi a distanza.

Prognosi

La valutazione prognostica, in riferimento alla probabilità di ricomparsa della patologia e di diffusione di metastasi a distanza, si basa sull'analisi di: dimensione della massa tumorale, una combinazione di parametri istologici, presenza di marker molecolari.

La massa tumorale è un eccellente predittore di malignità (26): tumori di dimensioni superiori ai 6 cm hanno maggiori possibilità di svilupparsi in senso maligno, mentre masse inferiori ai 4 cm hanno bassissime possibilità di evolvere in senso maligno (2%); in assenza poi di una singola caratteristica patologica che sia indicativa di patologia maligna, i patologi hanno individuato una combinazione di vari parametri istologici che rendono possibile stabilire un "punteggio" per un dato tumore. La scala più utilizzata è il punteggio di Weiss (27), che prende in considerazione nove differenti parametri: ad ognuno viene attribuito il valore 1 quando presente, 0 quando assente. Il punteggio finale si ottiene sommando i valori ottenuti per ogni parametro. Un punteggio superiore a 3 è solitamente associato a tumore maligno, nonostante ci

sia una forte possibilità di associazione a malignità anche con valori inferiori (addirittura sotto 2).

Dal punto di vista biologico invece, si vanno a ricercare i marker molecolari associati al tumore adrenocorticale maligno (IGF2, locus 17p13 etc.) che risultano alterati per mutazioni o alterazioni cromosomiche, ma poiché tali anomalie molecolari sono state evidenziate prevalentemente in tumori con punteggio di Weiss inferiore a 3 o addirittura 2, è chiaro che tale punteggio non ha un'ottimale sensibilità diagnostica. Per questo motivo è stata proposta una modifica del punteggio di Weiss, che prende in considerazione soltanto i parametri istologici più indicativi. Tali parametri sono l'indice mitotico (2 punti), la presenza di cellule chiare 25% (2 punti), le mitosi atipiche (1 punto), la necrosi (1 punto) e l'invasione vascolare (1 punto). Le possibilità di guarigione sono, in oltre, legate all'estensione della malattia. La maggior parte degli anatomopatologi basa le prognosi sulla stadiazione secondo il sistema MacFarlane (28):

- a) STADIO 1: tumore locale con dimensione inferiore ai 5 cm;
- b) STADIO 2: tumore locale con dimensione superiore ai 5 cm;
- c) STADIO 3: tumore di qualsiasi dimensione che abbia infiltrato tessuti ed organi adiacenti e/o presenti invasione linfonodale o dei vasi ematici;
- d) STADIO 4: tumore con metastasi a distanza

Terapia: chirurgia e mitotane

Il carcinoma adrenocorticale rimane, ancora oggi, una patologia dalla prognosi infausta (8, 29, 30) e, ad oggi, l'asportazione completa del tumore è l'unica modalità terapeutica che consente di ottenere la guarigione. In assenza di metastasi, l'asportazione rappresenta di regola l'unico trattamento. La massa dovrebbe essere rimossa intera, asportando tutte le aree sospette che la circondano e i linfonodi regionali aumentati di volume. La migliore possibilità di cura si ha quando un tumore localizzato (stadio 1 o 2 di MacFarlane) è soggetto a completa asportazione (chirurgia "curativa").

Purtroppo almeno al 50% dei pazienti viene fatta diagnosi di CAC in stadi avanzati (tumore invasivo o metastatico), con probabilità di sopravvivenza a 5 anni pari a 0% per carcinoma metastatico ed, inoltre, anche in seguito a chirurgia "curativa" di tumori localizzati, in circa il 75-85% dei pazienti vi è recidiva della malattia (31, 32, 33). Data, quindi, l'elevata percentuale

di ricomparsa della patologia è risultato necessario l'uso di trattamenti adiuvanti (7, 33, 34, 35), e il mitotane (1,1dicloro-2(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano;o,p'DDD), un derivato sintetico dell'insetticida DDT, è ampiamente usato a questo scopo (33, 36, 37). Più di 40 anni fa è stato descritto il primo efficace utilizzo di tale sostanza in pazienti con CAC metastatico, dimostrando la diminuzione dell'ipersecrezione di cortisolo e l'azione antitumorale del farmaco (38). Il meccanismo d'azione di questa molecola non è stato ancora completamente chiarito, nonostante l'esteso uso clinico. Esso possiede attività adrenolitica con specificità per la corteccia surrenalica, inibendo la conversione intramitocondriale del colesterolo a pregnenolone e dell'11-desossicortisolo a cortisolo (39). È inoltre in grado di causare necrosi surrenalica selettiva, anche a livello di localizzazioni secondarie, e di contrastare la chemioresistenza del tumore riducendo la fuoriuscita cellulare di farmaci per inibizione, almeno in vitro, dell'espressione del gene MDR1 (40). L'azione citotossica si evidenzia, in animali da esperimento, con accumulo di lipidi ed atrofia della corteccia surrenalica, soprattutto a carico delle regioni fascicolata e reticolare (41); le alterazioni a carico della glomerulare sono relativamente poco evidenti. Alla microscopia elettronica si osserva distruzione delle creste mitocondriali seguita da rigonfiamento mitocondriale, lisi e quindi morte della cellula già dopo 12 ore di trattamento (42). L'effetto inibitorio sulla steroidogenesi si esplica prevalentemente sulla conversione del colesterolo a pregnenolone, facendo presupporre un coinvolgimento dell'enzima citocromo P450_{sc} (Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme) (43). Il farmaco inibisce anche altri enzimi citocromo P-450 dipendenti (11- e 18-β-idrossilasi) e non P-450 dipendenti (3-β-idrossisteroidodeidrogenasi) (44). Il mitotane viene routinariamente somministrato in compresse da 500 mg (Lysodren, Bristol Meyer Squibb) in base alla tollerabilità ed ai livelli sierici del farmaco. Per via dell'elevata tossicità, viene consigliato di monitorare le concentrazioni ematiche del farmaco; livelli superiori a 14 mg/l (44μM) sono in grado di esprimere effetto antineoplastico. I livelli ematici non sono così chiaramente correlati alla dose somministrata e per questa ragione il monitoraggio può essere utile al fine di migliorare la qualità di vita dei pazienti. A causa della lunga emivita del o,p'DDD, i livelli considerati terapeutici in genere vengono raggiunti dopo alcuni mesi di terapia (45). L'uso di basse dosi per lunghi periodi, monitorandone i livelli plasmatici, rende inoltre il mitotane adatto alla terapia adiuvante (46), consentendo il raggiungimento di concentrazioni plasmatiche adeguate, sebbene non sia mai stato definito un

valore soglia per l'efficacia dell'effetto antineoplastico del farmaco. È possibile che gli effetti terapeutici delle basse dosi possano rivelarsi migliori di quelli delle alti dosi grazie alla migliore compliance dei pazienti ad un trattamento continuativo. Il monitoraggio dei livelli plasmatici permette inoltre di raggiungere i livelli considerati terapeutici (14-20 mg/l, corrispondenti a 44- 62 μM) con dosi effettivamente più basse riducendo gli effetti collaterali ed ottenendo una migliore tollerabilità (36).

Per quanto riguarda la chemioterapia, i farmaci più frequentemente impiegati sono il cisplatino, l'etoposide, l'adriamicina (o doxorubicina), il 5-fluorouracile e la vincristina. Solo l'adriamicina ed il cisplatino hanno mostrato una qualche attività in monochemioterapia (47) .

Effetti collaterali del mitotane

In letteratura è stato riportato che vi è una stretta correlazione tra la concentrazione del mitotane e gli effetti collaterali che il trattamento con questo farmaco comporta. Diversi studi hanno evidenziato: tossicità neuronale, epatiti autoimmuni, incremento della fosfatasi alcalina, e della glutammintranspeptidasi nonché sintomi gastrointestinali (48). A seguito di trattamento con mitotane si è evidenziata, inoltre, una marcata riduzione dei livelli di FT4 (Tiroxina libera) non associati ad una riduzione dei livelli di TSH (Thyroid-stimulating hormone) o di FT3 (Triiodotironina libera) (48, 49). Successive analisi hanno dimostrato che il mitotane incrementa la globulina legante il T4 (TBG), e che compete con la tiroxina per il legame alla TBG (30), ma questi cambiamenti non spiegano l'alterazione della funzionalità tiroidea osservata durante il trattamento adiuvante (49). Recentemente è stata anche osservata una correlazione inversa significativa tra la concentrazione di cortisolo e mitotane così come inversa è risultata la correlazione tra la concentrazione di cortisolo e ACTH, anche se il monitoraggio di ACTH è stato di poco aiuto a causa di una grande dispersione di valori. L'insufficienza adrenale causata dalla chirurgia prevede terapia sostitutiva con cortisone acetato, che comunque non riporta i livelli di ACTH a valori fisiologici. Concentrazioni elevate di ACTH possono essere dovute a insufficiente ricambio di glucocorticoidi, anche se non è stata osservata una correlazione evidente tra la dose di cortisone acetato e livelli di ACTH, che, solo in un ristretto gruppo di pazienti, risultavano leggermente modificati in seguito ad incremento della dose sostitutiva (49). E' stato evidenziato che pazienti sottoposti a terapia

adiuvante con mitotane, in seguito a rimozione completa del CAC, e sostituiti con cortisone acetato, presentano ridotti livelli di ACTH rispetto a pazienti non trattati con mitotane.

2 IPOFISI

L'ipofisi è una ghiandola endocrina che si trova alla base del cervello, di diametro di circa 1 cm e di 0,5 gr di peso; è costituita da 2 componenti distinte sia dal punto di vista morfologico che funzionale: il lobo anteriore (adenoipofisi) e il lobo posteriore (neuroipofisi) (Fig. 3).

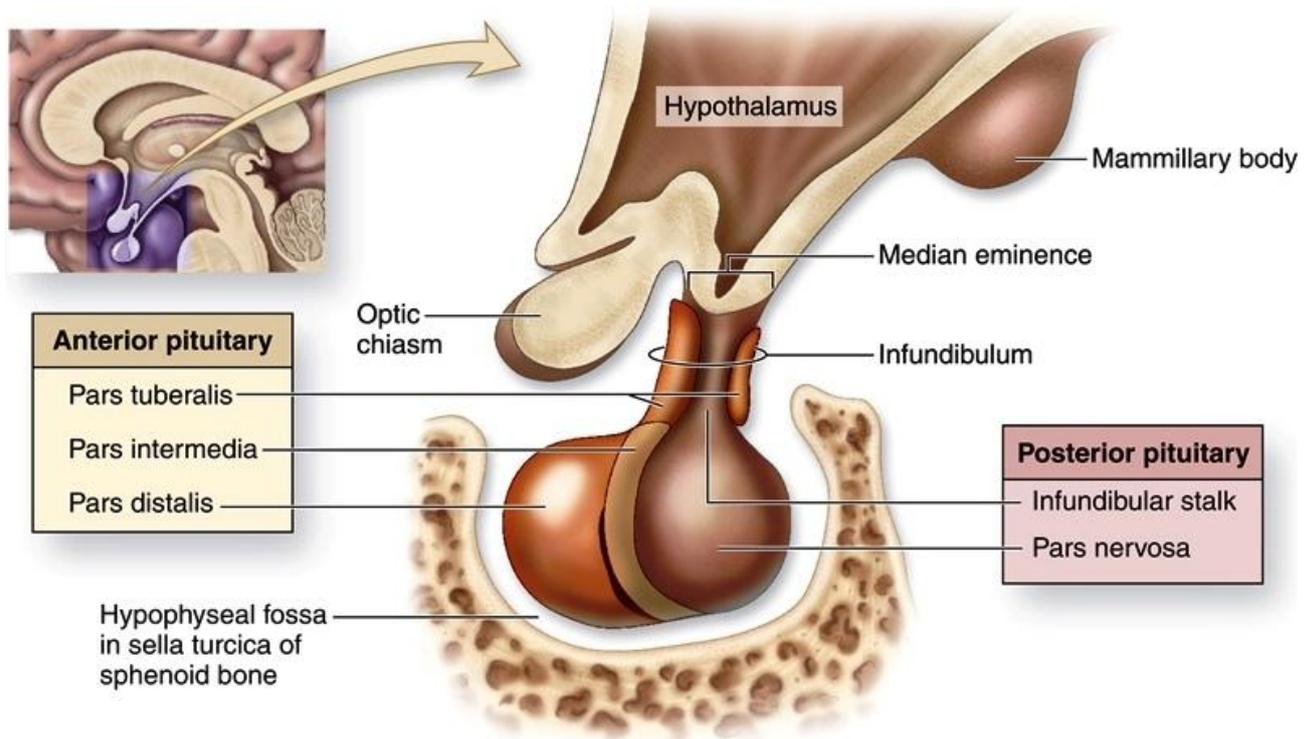


Fig. 3 Struttura dell'ipofisi

Essa gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attività di altri organi endocrini mediante la secrezione di tropine ipofisarie, a loro volta secrete in risposta a stimoli ormonali provenienti dall'ipotalamo, e prodotte da cellule specializzate. L'uso di anticorpi specifici diretti contro le tropine ipofisarie hanno permesso di identificare 5 tipi cellulari (Fig. 4):

- Cellule somatotrope, che rilasciano l'ormone somatotropo (GH)
- Cellule lattotrope, che rilasciano prolattina (PRL)
- Cellule tireotrope, che rilasciano l'ormone TSH
- Cellule gonadotrope, che rilasciano l'ormone follicolo stimolante (FSH) e luteinizzante (LH)
- Cellule corticotrope, che rilasciano l'ormone ACTH.

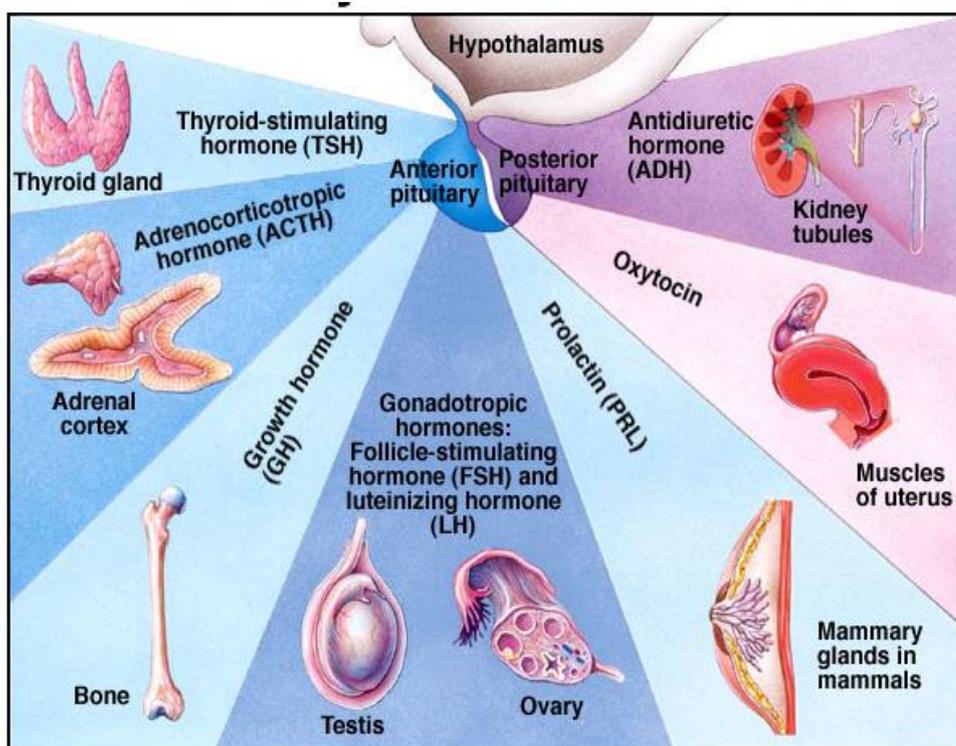


Fig. 4 Azione degli ormoni ipofisari

2.1 CELLULE TIREOTROPE

Le cellule tireotrope sono situate nell'area anteromediana della ghiandola, costituiscono il 5% delle cellule adenoipofisarie, sintetizzano e rilasciano la tireotropina o TSH (Thyroid Stimulating Hormone).

Il TSH è un ormone glicoproteico con un peso molecolare di 28.300 dalton ed è costituito da due catene peptidiche: la catena alfa e la catena beta, legate da due ponti non covalenti. La

subunità alfa del TSH umano ha un peso molecolare di 12.500 dalton ed è composta da 96 aminoacidi, identici nella loro sequenza lineare a quelli di LH, FSH e hCG (gonadotropina corionica). La subunità beta ha un peso molecolare di 13.800 dalton ed è costituita da 110 aminoacidi diversi sia da quelli di LH, FSH e hCG, ad essa viene attribuita la specificità immunologica e biologica del TSH completo. Le subunità beta e alfa, come tali, non hanno attività ormonale, ma l'acquistano se sono incubate insieme. E' possibile produrre ibridi ricombinando una subunità beta del TSH con le subunità alfa dell'LH o dell'FSH. Tutti questi ibridi hanno attività TSH, quindi le subunità beta di per sè non posseggono attività ormonale, ma conferiscono specificità ormonale ad una subunità alfa. Il gene che codifica per la subunità alfa è localizzato nel cromosoma 6 ed è costituito da 4 esoni e 3 introni. Questa subunità è espressa in cellule tireotrope, gonadotrope e della placenta, ma la sua regolazione è cellula specifica. Il gene che codifica per la subunità beta è localizzato nel cromosoma 1 ed è costituito da 3 esoni e due introni. Il fattore di trascrizione Pit1 lega direttamente il promotore del gene per conferire espressione tessuto-specifica. Entrambi i geni sono controllati negativamente dagli ormoni tiroidei e positivamente dall'ormone di rilascio ipotalamico TRH (Thyrotrophin Releasing Hormone).

Il TSH è sintetizzato ed è immagazzinato in piccoli granuli dispersi nel citoplasma. La secrezione del TSH si verifica mediante fusione dei granuli con la membrana plasmatica. Anche le subunità alfa e beta possono essere secrete nel sangue dove sono dosabili con specifici metodi radioimmunologici. Le subunità alfa e beta sono inizialmente sintetizzate in quantità equivalenti, ma sono secrete dall'ipofisi assieme al TSH intero in un rapporto beta/alfa di circa 1/3.

Il TSH agisce sulla ghiandola tiroidea inducendo la sintesi e il rilascio degli ormoni tiroidei, nonché il mantenimento trofico dei tireociti.

Il controllo ipotalamico sulle cellule tireotrope è complesso, l'azione stimolatoria è esercitata dal TRH che fu il primo degli ormoni di rilascio ipotalamici ad essere isolato ed identificato come un tripeptide, piroglutamyl-istidil-prolinamide. Il TRH è sintetizzato nei corpi cellulari di neuroni "peptidergici" in certe aree ipotalamiche (nucleo arcuato e nucleo paraventricolare) diffonde poi negli assoni fino all'eminenza mediana. Qui il TRH viene emesso dalle terminazioni nervose in un plesso capillare che fornisce sangue arterioso all'ipofisi anteriore in una specie di sistema portale. Il TRH si lega a recettori specifici e saturabili presenti sulla

membrana plasmatica delle cellule tireotrope. E' stato dimostrato che sulle stesse cellule il numero dei recettori non è costante, ma è soggetto a modificazioni a seconda dei vari stimoli (50, 51). In particolare il trattamento con ormone tiroideo in vivo diminuisce il numero dei recettori, mentre la tiroidectomia lo aumenta. Il legame del TRH ai recettori attiva l'adenilato ciclasi determinando l'aumento dell'AMP ciclico. La risposta delle cellule ipofisarie al TRH appare inoltre dipendente in modo critico dal calcio, infatti la chelazione del catione extracellulare inibisce la risposta del TSH al TRH, risposta che può essere ripristinata dall'aggiunta di calcio al mezzo di coltura. Inoltre l'incubazione di cellule ipofisarie in assenza di calcio impedisce lo stimolo del TRH sulla secrezione di TSH.

2.1.1 IPOTIROIDISMO PRIMARIO E SECONDARIO

Si tratta di una sindrome clinica e biochimica caratterizzata dalla carenza o assenza di ormoni tiroidei o dalla loro ridotta azione a livello dei diversi tessuti dell'organismo. E' la forma più frequente di disfunzione tiroidea.

L'ipotiroidismo può essere distinto in primario e secondario.

L'ipotiroidismo primario o primitivo interessa unicamente la tiroide e rappresenta la causa più frequente di ipotiroidismo (~95%). I sintomi non sono sufficienti a fare diagnosi, ma si deve ricorrere al dosaggio degli ormoni tiroidei, vengono quindi dosate le frazioni libere degli ormoni tiroidei, FT3 e FT4, che risulteranno ridotti, e la tireotropina, TSH, che invece sarà elevata. L'asse ipotalamo-ipofisario compensa la ridotta produzione degli ormoni tiroidei aumentando la produzione di TSH ipofisario.

Il rilievo di bassi o normali livelli di TSH in presenza di una diminuzione degli ormoni tiroidei circolanti è sinonimo di ipotiroidismo secondario o centrale, rappresentante circa il 5% dei casi. Nell'ipotiroidismo secondario il danno è a livello ipofisario ed è spesso associato a deficienza funzionale di TSH senza una chiara riduzione dei livelli sierici dell'ormone, infatti solo un terzo dei pazienti con ipotiroidismo centrale presentano livelli di TSH molto bassi, quindi la diagnosi si basa sulla valutazione dei livelli di FT4 che devono essere ridotti.

Chi soffre di questo disturbo accusa una serie di sintomi, con inizio lento e insidioso che determinano una riduzione delle performance fisiche e neurologiche: sonnolenza, astenia, aumento di peso senza apparente aumento dell'appetito, voce roca, depressione, perdita dei

capelli, stipsi, bradicardia (battito del cuore lento), possibili versamenti pleurici o pericardici, parestesie di mani e piedi (alterazioni della sensibilità, con formicolii), intolleranza al freddo, menorragia (aumento della durata e dell'intensità del flusso mestruale), ipotermia e spesso anemia (in genere in forma lieve), ipercolesterolemia, apnee notturne, aumentata frequenza di aborti. Nei casi più gravi si può andare incontro anche alla cosiddetta "facies mixedematosa", caratterizzata dal tipico gonfiore del viso (a causa, soprattutto, di un aumento del liquido interstiziale presente nei tessuti cutanei) fino al coma mixedematoso.

2.2 CELLULE ADRENOCORTICOTROPE

Le cellule adrenocorticotrope sono situate nell'area centrale profonda dell'ipofisi anteriore, costituiscono il 20% delle cellule adenoipofisarie, sintetizzano e rilasciano la corticotropina o ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone). Sono cellule basofile e contengono granuli secretori di circa 350 nm

L'ACTH è un ormone glicoproteico con un peso molecolare di 28.300 dalton, composto da 39 amminoacidi e con emivita di 7-15 minuti. E' codificato dal gene della proopiomelanocortina (POMC) situato sul cromosoma 2 e costituito da 3 esoni e 2 introni. POMC è un pre-ormone che con opportuni tagli di modificazione e maturazione proteolitica origina vari tipi di ormoni peptidici quali ACTH, β -lipotropina, γ -lipotropina, α -MSH, β -MSH e β -endorfina (Fig. 5).

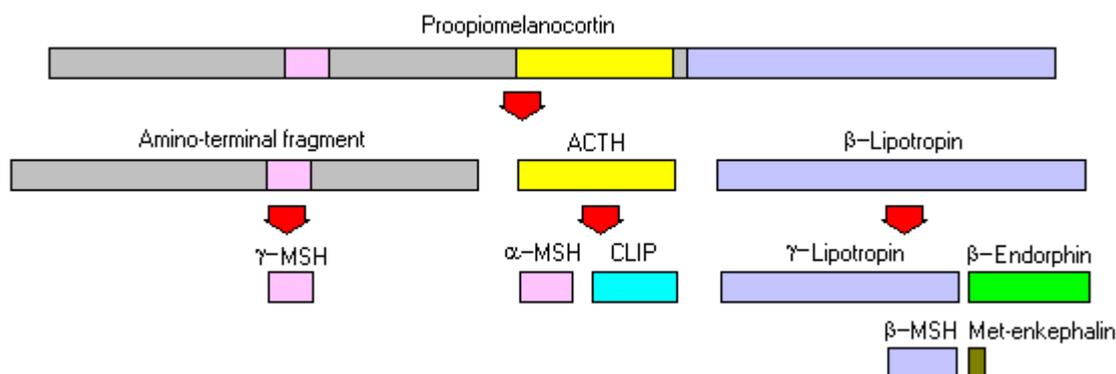


Fig. 5 Ormoni generati dal taglio proteolitico della proopiomelanocortina

L'espressione della proopiomelanocortina è dettata da una sinergia di segnali fra i quali il CRH, citochine, vasopressina, catecolammine, VIP (Peptide Vasoattivo Intestinale) e glucocorticoidi.

L'ACTH è sintetizzato ed è immagazzinato in piccoli granuli dispersi nel citoplasma e la sua secrezione si verifica mediante fusione dei granuli con la membrana plasmatica. Esso agisce a livello delle cellule della corticale del surrene stimolandone la secrezione ormonale (48), la steroidogenesi, il trofismo e l'espansione dei melanofori cutanei e mucosi. Il rilascio dell'ACTH viene stimolato, in maniera pulsatile secondo il ritmo circadiano, dall'ormone di rilascio ipotalamico CRH. Gli stress fisici e psichici stimolano le vie nervose che attivano la produzione di CRH, che a sua volta sollecita la secrezione di ACTH il quale stimola la risposta cortisolemica necessaria a fronteggiare l'evento stressante. Il controllo inibitorio della secrezione dell'ACTH avviene tramite il feedback negativo esercitato dal cortisolo e dall'ACTH stesso (Fig. 6). Il CRH legandosi allo specifico recettore di tipo 1 presente sulle cellule adrenocorticotrope determina l'aumento di cAMP, proteina chinasi A e CREB (cAMP Response Element-Binding), nonché l'attivazione del sito AP1 (Activator Protein-1) presente nel primo esone di POMC, attraverso il pathway delle MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). LIF (Leukemia Inhibitory Factor), una citochina proinfiammatoria espressa nell'ipofisi e nell'ipotalamo, attraverso il pathway JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), agisce in sinergia con il CRH e induce il legame di STAT3 alla proopiomelanocortina. I glucocorticoidi sono invece regolatori negativi dell'espressione di POMC.

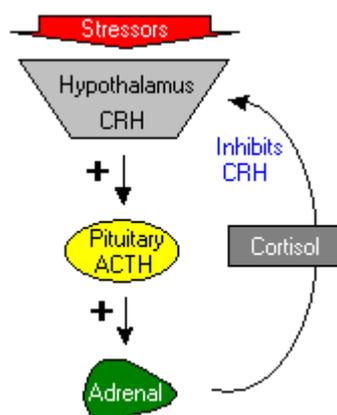


Fig. 6 Asse ipotalamo ipofisi surreni

SCOPO DELLO STUDIO

Il carcinoma adrenocorticale è una patologia rara caratterizzata da prognosi infausta con elevata frequenza di recidiva della malattia (75-85% dei pazienti) (31, 32, 33), per cui è necessario l'uso di trattamenti adiuvanti (7, 33, 34, 35), tra i quali il mitotane è ampiamente utilizzato (33, 36, 37). Più di 40 anni fa è stato descritto il primo utilizzo efficace di tale sostanza in pazienti con CAC metastatico, dimostrando la diminuzione dell'ipersecrezione di cortisolo e l'azione antitumorale del farmaco (38). L'utilizzo di mitotane è al centro di un grande dibattito a causa della sua tossicità, manifesta già a concentrazioni considerate di impatto terapeutico (14-20 mg/L). Recentemente è stato evidenziato che pazienti sottoposti a terapia adiuvante con mitotane, in seguito a rimozione completa del CAC, e sostituiti con cortisone acetato, presentano un quadro biochimico simile ad un ipotiroidismo centrale, caratterizzato da ridotti livelli di FT4 e livelli di TSH normali o solo lievemente ridotti (48, 49). Inoltre sono stati osservati ridotti livelli di ACTH rispetto a pazienti non trattati con mitotane (48).

Per spiegare la perturbazione della funzionalità tiroidea, lo scopo di questo studio è stato indagare se il mitotane interferisce con il dosaggio degli ormoni tiroidei o se influenza direttamente la secrezione di TSH e la funzionalità delle cellule tireotrope, in un modello murino di cellule ipofisarie TSH secernenti. Inoltre, scopo di questo studio è stata anche la valutazione degli effetti del mitotane sulla secrezione dell'ACTH e sulla funzionalità delle cellule adrenocorticotrope in un modello murino di cellule ipofisarie ACTH secernenti, per spiegare l'alterazione dei livelli di questa tropina in pazienti sottoposti a terapia con mitotane.

MATERIALI E METODI

1 COLTURE CELLULARI

In questo studio sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

- T α T1, adenoma ipofisario TSH secernente di topo, gentilmente inviate dalla Dott.ssa Pamela Mellon (Department of Reproductive Medicine and Neurosciences and the Center for Reproductive Science and Medicine, University of California, San Diego, CA), che crescono in adesione in piastre contenenti Matrigel (BD Biosciences, Bedford MA), in terreno di coltura Dulbecco's modified Eagle's medium (EuroClone, Milano, Italia) addizionato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco, Milano, Italia) e antibiotico/antimicotico (Euroclone)
- AtT20/D16v-F2 (ATCC; CRL-1795), adenoma ipofisario ACTH-secernente (Fig. 7), che crescono in adesione in Dulbecco's modified Eagle's medium (EuroClone) di coltura addizionato con 10% siero di cavallo (Gibco) e antibiotico/antimicotico (Euroclone).

Le cellule sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata con 5% CO₂ e 95% aria.

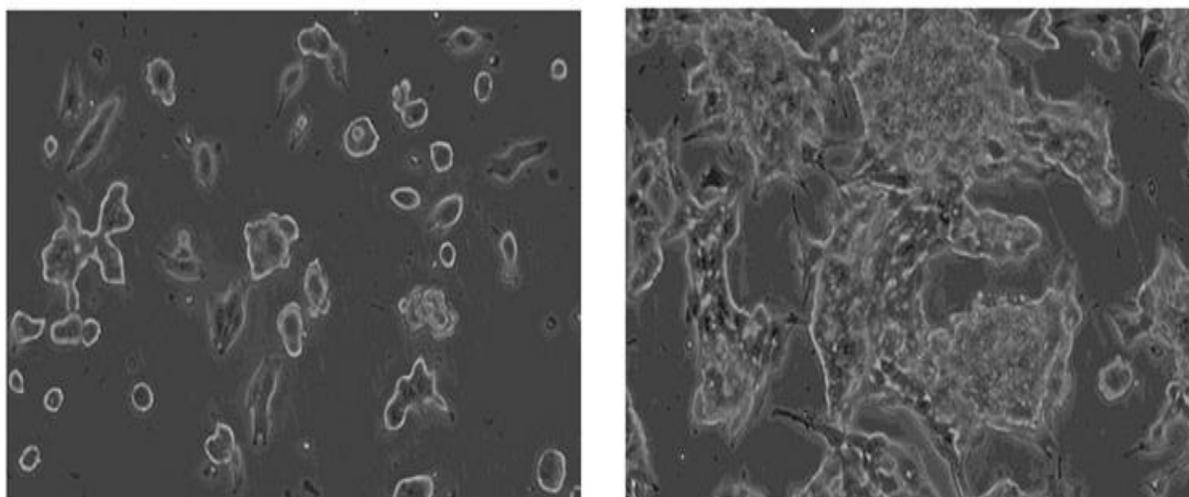
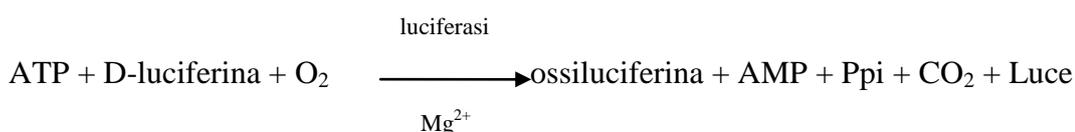


Fig. 7 Cellule AtT20/D16v-F2

2 VITALITÀ CELLULARE

La valutazione della vitalità delle cellule T α T1 è stata eseguita mediante il saggio MTT con l'ausilio del kit TACS MTT Cell Proliferation Assay (Trevigen Inc., Gaithersburg). Il saggio si basa sulla capacità delle cellule vive di ridurre chimicamente il sale di tetrazolio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) in un sale di formazano di colore violetto. Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. 20000 cellule/pozzetto sono state seminate in 100 μ l di terreno completo in piastre da 96 pozzetti, mantenute a 37°C per 24 ore e successivamente starvate per 48 ore con mezzo di coltura contenete l'0,5% di FBS, per sincronizzare il ciclo cellulare. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di mitotane (da 10 a 100 μ M) per 6, 24 e 48 ore. Al termine di ogni periodo di incubazione sono stati aggiunti 10 μ l di MTT ad ogni pozzetto, e dopo altre due ore sono stati aggiunti 100 μ l di soluzione di solubilizzazione. Il giorno dopo è stata eseguita la lettura spettrofotometrica mediante Wallac Victor 1420 multilabel Counter (Perkin Elmer).

La valutazione della vitalità delle cellule AtT20/D16v-F2 è stata eseguita monitorando, in luminescenza, la concentrazione di ATP, utilizzando il kit ATPlite 1step (PerkinElmer, Monza, Italy). L'ATP rappresenta un marcatore di cellule metabolicamente attive. Il sistema è basato sulla produzione di luce emessa dalla reazione dell'ATP con D-luciferina in presenza di ossigeno molecolare e luciferasi:



9000 cellule/pozzetto sono state seminate in 100 μ l di terreno completo in piastre da 96 pozzetti, mantenute a 37°C per 24 ore e successivamente starvate per 48 ore con mezzo di coltura contenete lo 0,5 % di FBS, per sincronizzare il ciclo cellulare. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di mitotane (da 10 a 100 μ M) per 6, 24 e 48 ore in presenza e assenza di CRH 100 nM. Al termine di ogni periodo di incubazione, l'ATPlite 1step buffer e il substrato liofilizzato sono stati equilibrati a temperatura ambiente. Successivamente il substrato è stato ricostituito con 10 ml di ATPlite 1step buffer e mescolato per inversione. Dopo aver fatto riposare la soluzione per 5 minuti, in modo che risulti limpida e omogenea, sono stati aggiunti 100 μ l del reagente ricostituito ad ogni pozzetto. La piastra è

stata poi agitata per 2 minuti a 700 rpm e la lettura è stata eseguita mediante Wallac Victor 1420 multilabel Counter (Perkin Elmer). La luminescenza ottenuta, è direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP e quindi alla vitalità cellulare.

3 ATTIVITÀ CASPASICA

Per determinare se la riduzione della vitalità cellulare fosse dovuta ad attivazione del processo apoptotico, è stato eseguito un test di misurazione di attività caspatica (Caspase-Glo 3-7 Assay, Promega, Milano, Italy). Il kit fornisce un substrato proluminescente di caspasi 3/7 DEVD-aminoluciferina e una luciferasi termostabile da risospendere con Caspase-Glo® 3/7 Buffer per ottenere il reagente Caspasi-Glo 3/7. La presenza di caspasi 3/7 determina la scissione del legame tra l'aminoluciferina e DEVD e il conseguente rilascio di aminoluciferina libera, che viene consumata dalla luciferasi, determinando emissione di segnale luminoso, che risulta essere proporzionale alla caspasi 3/7 attiva.

20000 cellule T α T1/pozzetto o 9000 cellule AtT20/D16v-F2/pozzetto, sono state seminate in 100 μ l di terreno completo in piastre da 96 pozzetti, mantenute a 37°C per 24 ore e successivamente starvate. Il giorno seguente, le cellule T α T1 sono state trattate con concentrazioni crescenti di mitotane (da 10 a 100 μ M), mentre le cellule AtT20/D16v-F2 sono state trattate con le stesse concentrazioni di mitotane in presenza e assenza di CRH 100 nM. I trattamenti sono stati mantenuti per 48h nella linea cellulare tireotropica e per 6, 24, 48 ore nella linea cellulare adrenocorticotropa. Al termine di ogni periodo di incubazione, il substrato Caspase-Glo® 3/7 è stato risospeso con 5 ml di Caspase-Glo® 3/7 Buffer. Successivamente, 100 μ l del reagente ricostituito sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, la piastra è stata poi agitata per 30 secondi a 300-500 rpm e incubata al buio 3 ore. La lettura è stata eseguita in luminescenza mediante Wallac Victor 1420 multilabel Counter (Perkin Elmer).

4 VALUTAZIONE DELLA SECREZIONE ORMONALE

La valutazione quantitativa della secrezione del TSH è stata effettuata applicando la tecnica ELISA (test di immunoassorbimento enzimatico, Enzyme Linked ImmunoSorbent

Assay) mediante il TSH ELISA kit (Shibajagi, Shibukawa, Japan). Il kit contiene l'anticorpo primario diretto contro la subunità β del TSH, mentre l'anticorpo biotinilato di rilevamento diretto contro la subunità α , permettendo la misurazione del TSH intero senza cross reattività con LH, FSH e hCG. I campioni da analizzare sono stati ottenuti raccogliendo il mezzo di coltura delle cellule piastrate, nelle piastre da 96 pozzetti, prima di ogni trattamento e al termine dei diversi tempi di incubazione con le crescenti concentrazioni di mitotane e TRH.

Sono stati caricati, in duplicato, nell'apposita piastra, sia gli standard che 50 μ l di ciascun campione diluito. La piastra è stata poi agitata tre volte ad 800 rpm per 10 secondi e incubata per due ore a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione ogni pozzetto è stato lavato per quattro volte con la soluzione di lavaggio, per poi aggiungere 50 μ l dell'anticorpo anti-TSH biotinilato. Dopo incubazione di un'ora a temperatura ambiente, la piastra è stata nuovamente lavata per quattro volte con la soluzione di lavaggio e reincubata per trenta minuti a 20-25°C in presenza di 50 μ l della soluzione di avidina coniugata a perossidasi. Al termine dell'incubazione la piastra è stata lavata quattro volte con il buffer di lavaggio. Successivamente, sono stati aggiunti 50 μ l di substrato cromogenico a ciascun pozzetto e dopo venti minuti di incubazione a temperatura ambiente sono stati aggiunti 50 μ l di soluzione di stop. La lettura dell'assorbanza è stata eseguita a 450 nm, mediante Wallac Victor 1420 multilabel Counter (Perkin Elmer) entro 30 minuti dall'aggiunta del substrato. Al termine dell'acquisizione, gli standard sono stati utilizzati per creare una curva di calibrazione per la quantificazione del TSH, mediante la quale sono stati calcolati i ng/ml di TSH presente in ciascun campione.

La valutazione quantitativa della secrezione dell'ACTH è stata effettuata mediante la stessa metodica, utilizzando il kit Mouse/rat ACTH lum ELISA (Calbiotech, California, USA). Tale kit si basa sull'utilizzo di un anticorpo biotinilato legante la regione C-terminale dell'ACTH (aminoacidi 34-39), e un secondo anticorpo, legante la regione mediana e N-terminale dell'ormone (aminoacidi 1-24), coniugato con una perossidasi vegetale estratta da rafano. I campioni da analizzare sono stati ottenuti raccogliendo il mezzo di coltura delle cellule piastrate, nelle piastre da 96 pozzetti, prima di ogni trattamento e al termine dei diversi tempi di incubazione con le crescenti concentrazioni di mitotane e CRH. Sono stati caricati nell'apposita piastra, con pozzetti rivestiti di streptavidina, 200 μ l di ciascuno standard ricostituito e ciascun campione, in duplicato; sono stati aggiunti 25 μ l dell'anticorpo biotinilato

e successivamente 25 µl dell'anticorpo coniugato a perossidasi, quindi la piastra è stata incubata due ore in continua agitazione. Al termine dell'incubazione la piastra è stata lavata cinque volte con 300 µl di buffer di lavaggio. Successivamente, sono stati aggiunti 100 µl di substrato luminescente a ciascun pozzetto ed è stata eseguita la lettura dell'emissione di luce mediante Wallac Victor 1420 multilabel Counter (Perkin Elmer) entro 5 minuti dall'aggiunta del substrato. Al termine dell'acquisizione della luminescenza, gli standard sono stati utilizzati per creare una curva di calibrazione per la quantificazione dell'ACTH, mediante la quale sono stati calcolati i pg/ml di ACTH presente in ciascun campione.

5 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

Dopo aver seminato 300000 cellule T α T1/pozzetto in piastre da 6 pozzetti, starvato ed eseguito i trattamenti di interesse, le cellule sono state raccolte con Trizol (Invitrogen, Milano, Italy) in eppendorf da 2 ml. Successivamente, l'RNA è stato estratto mediante il seguente protocollo. Per ml di Trizol (Invitrogen) usato per la raccolta delle cellule:

- Aggiungere 200 µl di cloroformio;
- Agitare per inversione 15 secondi;
- Incubare 3 minuti a temperatura ambiente;
- Centrifugare a 4°C per 15 minuti a 12000 rpm;
- Prelevare e raccogliere il surnatante;
- Aggiungere 500 µl di alcol isopropilico;
- Incubare 10 minuti a temperatura ambiente;
- Centrifugare a 4°C per 10 minuti a 12000 rpm;
- Scolare il pellet e lavarlo con 1 ml di etanolo al 70% (in H₂O DEPC-DiEtilPiroCarbonato);
- Vortexare;
- Centrifugare a 4° per 5 minuti a 7500 rpm;
- Scolare e lasciare asciugare il pellet 10 minuti;
- Risospendere il pellet in 20 µl di H₂O DEPC;

- Incubare a 55-60° per 10 minuti;
- Trasferire i campioni in ghiaccio e preparare un'aliquota da 3 µl, per la successiva quantificazione ;
- Conservare a -80°C.

Per quantificare l'RNA estratto è stato utilizzato il sistema automatizzato: Experion (BioRad, Milano, Italy). Prima dell'analisi è stata eseguita la pulizia degli elettrodi. Brevemente, è stato introdotto nella stazione di lavoro, per 2 minuti, prima, un cleaning chip (BioRad) contenente 800 µl di Experion electrode cleaner (BioRad), e successivamente, per 5 minuti, un cleaning chip contenente 800 µl di acqua DEPC; quest'ultima operazione è stata eseguita per due volte prima di lasciare asciugare gli elettrodi per 60 secondi. La quantificazione dell'RNA è stata eseguita mediante il kit Experion RNA stdSens (BioRad). Il gel-stain è stato preparato centrifugando 600 µl di RNA gel in uno spin filter a 1500 giri per 10 minuti, pipettando, poi, 65 µl di questo in una provetta per microcentrifuga Rnase-free e aggiungendo 1 µl di RNA stain. Dopo aver caricato 9 µl di gel stain nel pozzetto marcato GS del chip RNA stdsens (BioRad), è stato effettuato il priming del chip mediante la priming station (BioRad), utilizzando il programma indicato dal manuale. I campioni diluiti 1:10 e il marcatore di peso molecolare (BioRad stdsens kit), sono stati denaturati per 2 minuti a 70 °C. Il chip è stato caricato come segue:

- 9 µl di gel stain solution nel rimanente pozzetto marcato GS;
- 9 µl del gel filtrato (senza stain) nel pozzetto indicato con G;
- 5 µl di loading buffer nei pozzetti marcati da 1 a 12 e nell'L;
- 1 µl di RNA ladder nel pozzetto L;
- 1 µl di ciascun campione nei pozzetti da 1 a 12.

Il chip è stato prima vortexato 1 minuto e poi analizzato nella stazione di lavoro (BioRad).

Al termine della quantificazione è stata eseguita nuovamente la pulizia degli elettrodi con 800 µl di acqua DEPC per 60 secondi.

6 RETROTRASCRIZIONE

Sono stati retro-trascritti 7 µg di RNA estratto dalle cellule TαT1 come segue.

a. *Degradazione di eventuali residui di DNA nei campioni*

E' stata preparata una mix contenente: 2 µl di buffer DNAsi I + MgCl₂ (10X) (Fermentas, Canada), 3 µg di RNA, 3 µl DNAsi I (1 U/µl) (Fermentas), e H₂O fino ad arrivare ad un volume finale di 20 µl. La reazione di digestione enzimatica è stata incubata 30 minuti a 37°C.

b. *Inattivazione della DNAsi*

Dopo l'aggiunta di 2 µl di STOP buffer (25mM) (Fermentas), ogni campione è stato incubato a 65°C per 10 minuti.

c. *Retrotrascrizione (con kit Invitrogen Super Script First Strand)*

Sono stati aggiunti ad ogni µg di RNA: 1 µl di Random Examers (50 ng/µl), 1 µl di dNTPs (10 mM), e H₂O DEPC sino ad un volume di reazione finale di 10 µl. Ogni campione è stato poi incubato a 65°C per 5 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti: 2 µl di RT-buffer (10X), 4 µl di MgCl₂ (25 mM), 2 µl di DTT (0,1 mM) e 1 µl di RNAsi OUT (40 U/µl). Infine, dopo aver aggiunto 1 µl di Super Script (1U/µg), a ciascun campione, escludendo i controlli negativi, è stato avviato, in un termociclature GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystem, California, USA), un ciclo di amplificazione con il seguente programma: 25°C per 10 minuti, 42°C per 50 minuti e 70°C per 15 minuti. Al termine del ciclo di amplificazione, è stato aggiunto 1 µl di RNAsi H (2 U/µl) a tutti i campioni, i quali sono stati incubati a 37°C per 10 minuti, al fine di degradare qualsiasi residuo di RNA stampo e ottenere solamente cDNA.

Per verificare l'avvenuta retro-trascrizione e l'assenza di contaminazione dei campioni con DNA, è stata eseguita una reazione a catena della polimerasi (PCR) per amplificare il gene β-actina (ACTB) (Tab.1). A partire da 2 µl di ciascun campione sono stati aggiunti 25 µl di Master Mix (2X) (Promega, Milano, Italy), 1 µl di primer forward 10µM (Promega), 1 µl di

primer reverse 10 μ M (Promega) e H₂O MG (Molecular Grade) sino ad arrivare ad un volume finale di 50 μ l. I campioni sono stati caricati nel termociclatore GeneAmp 9700 PCR System (Applied Biosystem). Successivamente, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente Gel Star (Lonza, Basel, Switzerland). Il gel è stato visualizzato mediante Gel Doc XR (BioRad).

Primer forward	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCAT-3'	94°C 3 min	} 40 cicli
Primer reverse	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'	94°C 30 sec	
		55°C 30 sec	
		72°C 30 sec	

Tab.1 Primers e condizioni di amplificazione del gene ACTB

7 REAL TIME PCR

Per determinare l'espressione della subunità β del TSH di topo (β TSH) è stata eseguita la Real Time PCR quantitativa relativa (RQ-PCR), utilizzando il saggio TAqMan bTSH Mm00437190_m1 (Applied Biosystems). Come potenziali geni reference sono stati analizzati 5 geni housekeeping: 18s rRNA, ACTB, gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), L37 rRNA e ciclofillina (CYC). I primers e le sonde per valutare l'espressione di 18s (4319413E), GAPDH (4352339E) e ACTB (4352341E) sono inventariati e disponibili in commercio (TaqMan Endogenous Control; Applied Biosystems), mentre i primers e la sonda per L37 e CYC sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) (Tab. 2).

Geni	Primers e sonde
Ciclofillina	Primer Reverse 5'-AAACAGCTCGAAGGAGACGC-3' Primer Forward 5'-ACCGTGTTCTTCGACATCACG-3' Probe 5'-6'FAM-ATGACGAGCCCTTGGG-MGB-3'
L37 rRNA	Primer Reverse 5'-CAGCTGCCCTCTTGGGTTT-3' Primer Forward 5'-CCGCAGATTCAGACATGGATT-3' Probe 5'-6'FAM-TGAGGGAACAACGCC-MGB-3'

Tab. 2 Primers e sonde per il gene ciclofillina ed L37 rRNA

Tutte le reazioni di RQ-PCR sono state eseguite, registrate ed analizzate utilizzando lo strumento ABI 7700 Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems). Fra i diversi geni housekeeping, ACTB è stato selezionato come gene reference, in quanto, applicando il software geNorm versione 3.4 (52), è risultato il più stabile fra i diversi candidati. L'elaborazione dei dati è stata effettuata applicando il metodo descritto da Pfaffl (53).

8 ANALISI STATISTICA

I dati relativi al dosaggio degli ormoni tiroidei sono stati analizzati mediante test statistici non parametrici (mediana, quartili, coefficiente di correlazione di Spearman). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per valutare le differenze con livello di significatività del 5 %. Per gli altri esperimenti è stato valutato se i dati erano conformi ad una distribuzione normale ed è stato applicato il test di Bartlett, per l'analisi dell'omogeneità della varianza. I risultati sono stati comparati all'interno di ogni gruppo e fra i diversi gruppi mediante ANOVA. Il test di Student New-man-Keuls è stato applicato per individuare differenze statistiche fra i valori delle medie. $P < 0,05$ è stato considerato significativo in tutti i test.

RISULTATI

1 MITOTANE E CELLULE IPOFISARIE TSH SECERNENTI

1.1 EFFETTI DEL MITOTANE SUL DOSAGGIO DEGLI ORMONI TIROIDEI

Per determinare l'effetto del mitotane sul dosaggio degli ormoni tiroidei, TSH, FT3 e FT4 sono stati dosati in 34 sieri di pazienti mediante Elecsys 2010 system (Roche). I valori di riferimento per gli ormoni considerati sono i seguenti: TSH 0,27 – 4,20 μ IU/ml, FT3 2 – 4,40 pg/ml, FT4 0,90 – 1,70 ng/dl. Dei 34 pazienti selezionati in modo casuale, la funzionalità tiroidea era compatibile con diagnosi di ipotiroidismo in sei (TSH, $32,32 \pm 10,25$ μ IU/ml; FT3, $1,90 \pm 0,12$ pg/ml; FT4, $1,03 \pm 0,01$ ng/dl), di ipertiroidismo in sei (TSH, $0,05 \pm 0,01$ μ IU/ml; FT3, $4,94 \pm 0,47$ pg/ml; and FT4, $2,16 \pm 0,27$ ng/dl), ed eutiroidismo in 22 (TSH, $2,04 \pm 0,17$ μ IU/ml; FT3, $3,30 \pm 0,09$ pg/ml; and FT4, $1,31 \pm 0,03$ ng/dl). Il mitotane è stato risposeso in etanolo assoluto alla concentrazione di 160 mg/L, diluito in soluzione salina e aggiunto al siero di ciascun paziente alle concentrazioni finali di 5, 10, 20 e 40 mg/L (corrispondenti a 15,6, 31,2, 62,5 e 125 μ M, rispettivamente). Le concentrazioni di mitotane presenti nei sieri dei pazienti sono state in seguito verificate mediante dosaggio diretto del farmaco (variazione < del 2% rispetto le concentrazioni attese). Negli stessi sieri sono stati poi valutati i livelli degli ormoni tiroidei e non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa fra i valori osservati nei campioni in cui è stato aggiunto il mitotane rispetto ai campioni in cui non è stato aggiunto mitotane (Tab. 3).

RISULTATI

Mitotane	mg/L	0	5	10	20	40
	μM	0	15.6	31.2	62.5	125
Ipotiroidei (6)	TSH $\mu\text{U/ml}$	32.32 ± 10.25	33.12 ± 10.41	32.82 ± 10.31	33.01 ± 10.41	32.54 ± 10.50
	FT3 pg/ml	1.90 ± 0.12	1.83 ± 0.10	1.82 ± 0.07	1.77 ± 0.09	1.78 ± 0.07
	FT4 ng/dl	1.03 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.08 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.07 ± 0.01
Ipertiroidei (6)	TSH $\mu\text{U/ml}$	0.05 ± 0.01				
	FT3 pg/ml	4.94 ± 0.47	4.72 ± 0.51	4.61 ± 0.49	4.73 ± 0.51	4.65 ± 0.49
	FT4 ng/dl	2.16 ± 0.27	1.96 ± 0.14	2.28 ± 0.24	2.32 ± 0.26	2.38 ± 0.29
Eutiroidei (22)	TSH $\mu\text{U/ml}$	2.04 ± 0.17	2.10 ± 0.17	2.09 ± 0.17	2.09 ± 0.17	2.09 ± 0.17
	FT3 pg/ml	3.30 ± 0.09	3.26 ± 0.07	3.21 ± 0.08	3.23 ± 0.07	3.22 ± 0.07
	FT4 ng/dl	1.31 ± 0.03	1.37 ± 0.03	1.41 ± 0.04	1.41 ± 0.04	1.42 ± 0.04

Tab. 3 Valutazione della funzionalità tiroidea in 34 sieri di pazienti, prima e dopo aggiunta di mitotane alle concentrazioni indicate

1.2 EFFETTI DEL MITOTANE SULLA VITALITÀ DELLE CELLULE

T α T1

Per valutare gli effetti delle diverse concentrazioni di mitotane sulla vitalità delle cellule ipofisarie TSH secernenti murine, T α T1, sono state seminate 20000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Le cellule sono state quindi trattate con concentrazioni crescenti di mitotane: 10 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , e 100 μM , delle quali 40 e 60 μM rappresentano le concentrazioni considerate di impatto terapeutico. Il trattamento è stato mantenuto per 6 o 48 ore. Allo scadere del trattamento, mediante un'analisi con MTT assay (Trevigen), si sono andati ad osservare gli effetti del trattamento sulla vitalità cellulare, rispetto ad un campione di cellule controllo trattate con veicolo, ossia etanolo diluito 1:1000 (ct).

Dopo 6 ore di incubazione (Fig. 8) solo la concentrazione di mitotane pari a 100 μM riduce significativamente la vitalità cellulare (-56%).

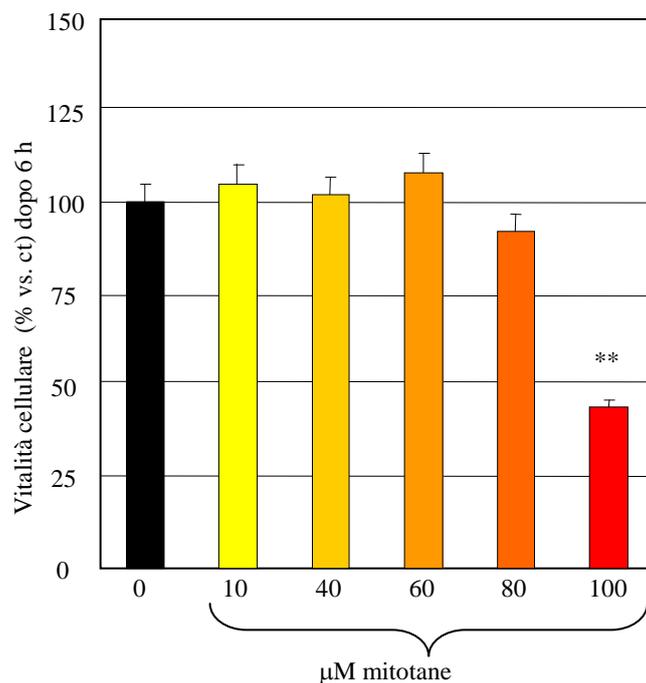


Fig. 8 Vitalità cellulare dopo 6 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. **, $P < 0,01$ vs. ct.

Dopo 48 ore di incubazione (Fig. 9), la vitalità cellulare si riduce significativamente a partire dalla concentrazione 60 µM (da -31%; $P < 0,05$ a -75,5%; $P < 0,01$ vs. ct).

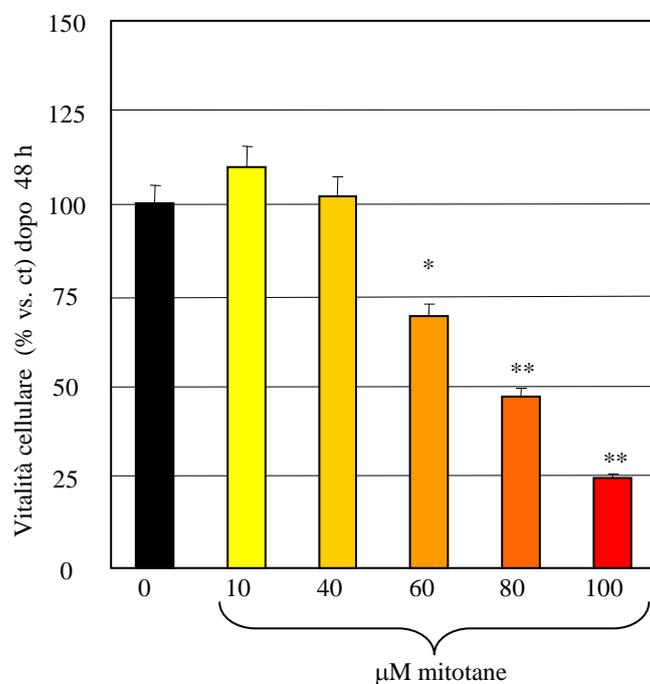


Fig. 9 Vitalità dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct.

1.3 EFFETTI DEL MITOTANE SULL'ATTIVITÀ CASPASICA IN CELLULE T α T1

Per valutare se la riduzione della vitalità cellulare osservata dopo 48 ore di trattamento con mitotane fosse determinata da apoptosi, è stato effettuato un saggio di attività caspatica. Dopo aver seminato 20000 cellule T α T1 per pozzetto e averle trattate per 48 ore con mitotane, abbiamo misurato l'attività delle caspasi 3/7. Il trattamento con mitotane determina un'attivazione caspatica significativa e dose dipendente a partire dalla concentrazione di 60 μ M (da +45.2%; P<0,05 a +72%; P<0,01 vs. ct) (Fig. 10). La concentrazione di mitotane 100 μ M non induce un ulteriore incremento dell'apoptosi rispetto alla concentrazione 80 μ M.

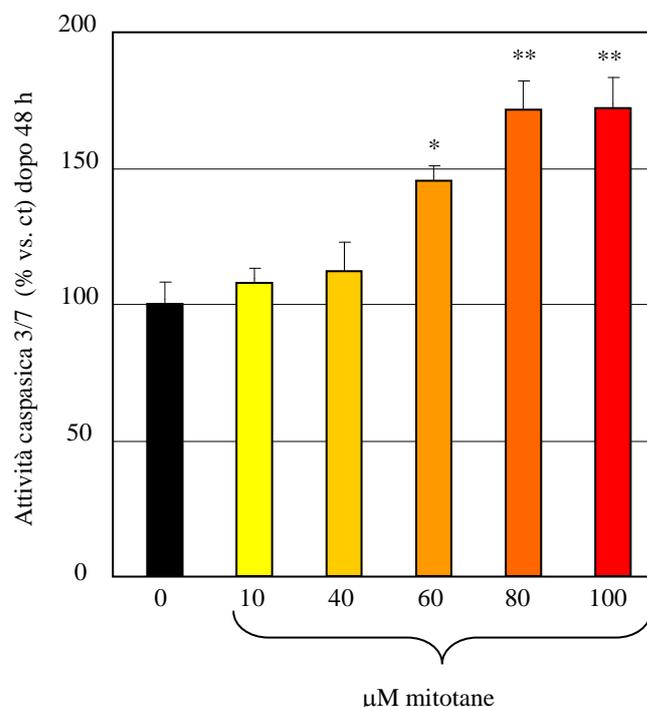


Fig. 10 Attività caspatica dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane.

*, P<0,05 e **, P<0,01 vs. ct.

1.4 EFFETTI DEL MITOTANE SULLA SECREZIONE DEL TSH

Per determinare gli effetti a breve termine del mitotane sulla secrezione del TSH da parte delle cellule ipofisarie T α T1, è stata valutata la concentrazione di TSH nel mezzo di coltura delle cellule trattate per 6 ore con concentrazioni crescenti di mitotane. Come mostrato nella figura 11, il mitotane riduce significativamente ed in modo dose dipendente la secrezione di TSH a partire dalla concentrazione di impatto terapeutico di 40 μ M (-25%; P<0,05).

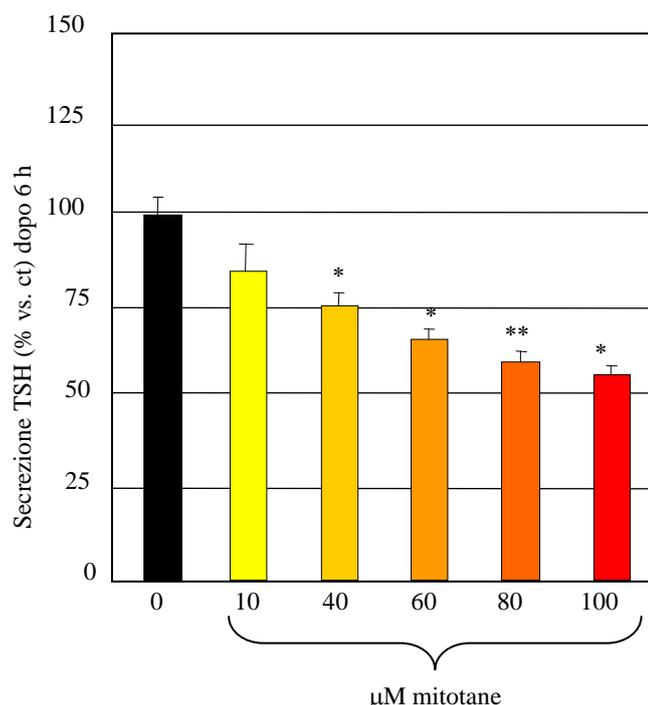


Fig. 11 Secrezione di TSH dopo 6 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. *, P<0,05 e **, P<0,01 vs. ct.

1.5 EFFETTI DEL MITOTANE SULL'ESPRESSIONE DELLA SUBUNITÀ β DEL TSH

Per determinare gli effetti del mitotane sull'espressione del TSH, sono stati valutati i livelli dell'mRNA della subunità β dell'ormone in cellule T α T1 trattate per 6 ore con concentrazioni crescenti di mitotane. Come mostrato nella figura 12, il mitotane a concentrazioni uguali o

superiori a 40 μM riduce significativamente ($P < 0,01$) l'espressione della subunità β del TSH (da -62% a -85%; vs. ct).

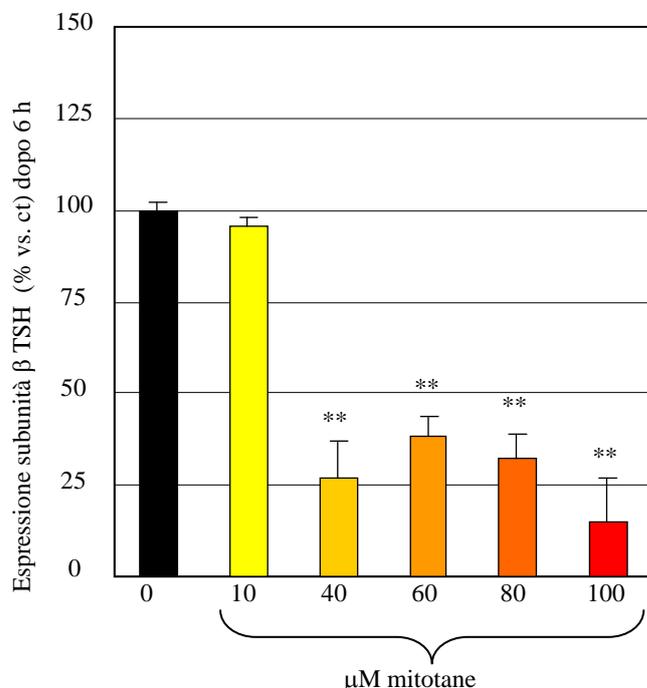


Fig. 12 Espressione della subunità β del TSH dopo trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane.

** $P < 0,01$ vs. ct.

1.6 EFFETTI DEL MITOTANE SULLA SECREZIONE DEL TSH INDOTTA DAL TRH

L'effetto del TRH in termini di secrezione dinamica di TSH è stato valutato incubando le cellule T α T1 per 0, 2, 5 e 30 minuti con TRH 100 nM, concentrazione che stimola significativamente l'espressione della subunità β del TSH (54). I livelli dell'ormone nel mezzo di coltura delle cellule trattate è stato valutato mediante ELISA. Come indicato nella figura 13, il TRH induce significativamente la secrezione del TSH, raggiungendo il picco massimo dopo 5 minuti (17,2 ng/ml).

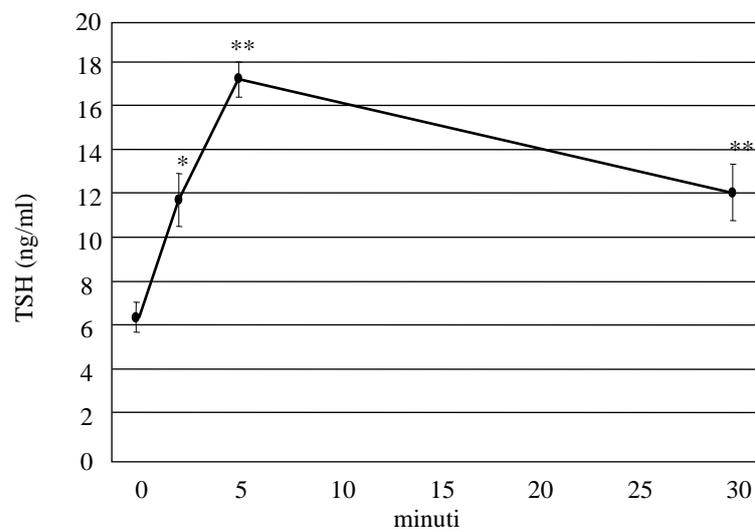


Fig. 13 Secrezione di TSH indotta da TRH. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct.

Per valutare gli effetti del mitotane sulla secrezione del TSH indotta dal TRH, è stata valutata la concentrazione di TSH nel mezzo di coltura delle cellule trattate per 5 minuti, con e senza TRH, in presenza di concentrazioni crescenti di mitotane. Come mostrato nella figura 14, il TRH induce significativamente la secrezione di TSH (+186% vs. ct; $P < 0,01$). Tutte le concentrazioni di mitotane (10-100 μM) bloccano la secrezione di TSH indotta dal TRH.

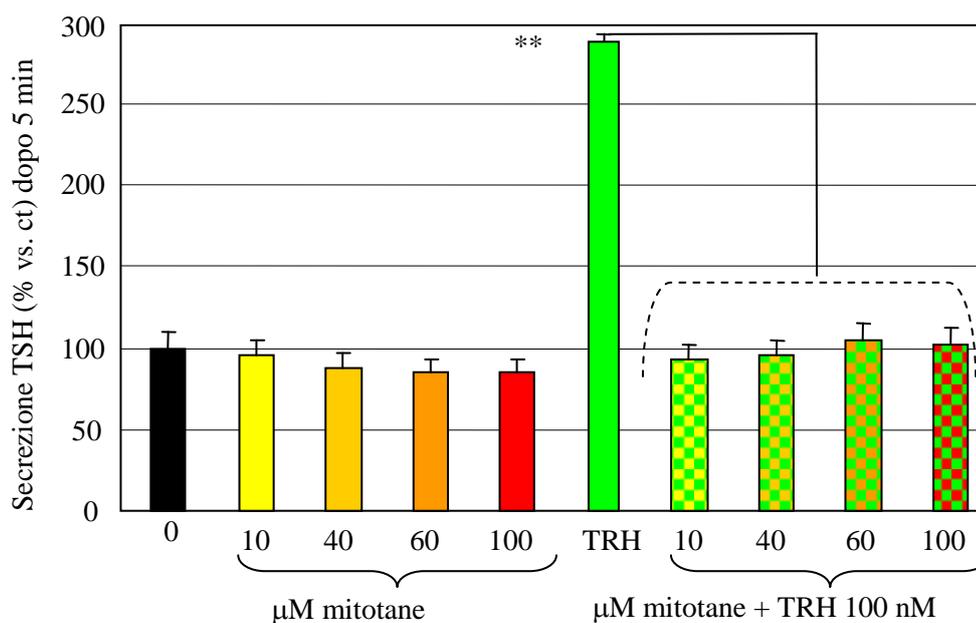
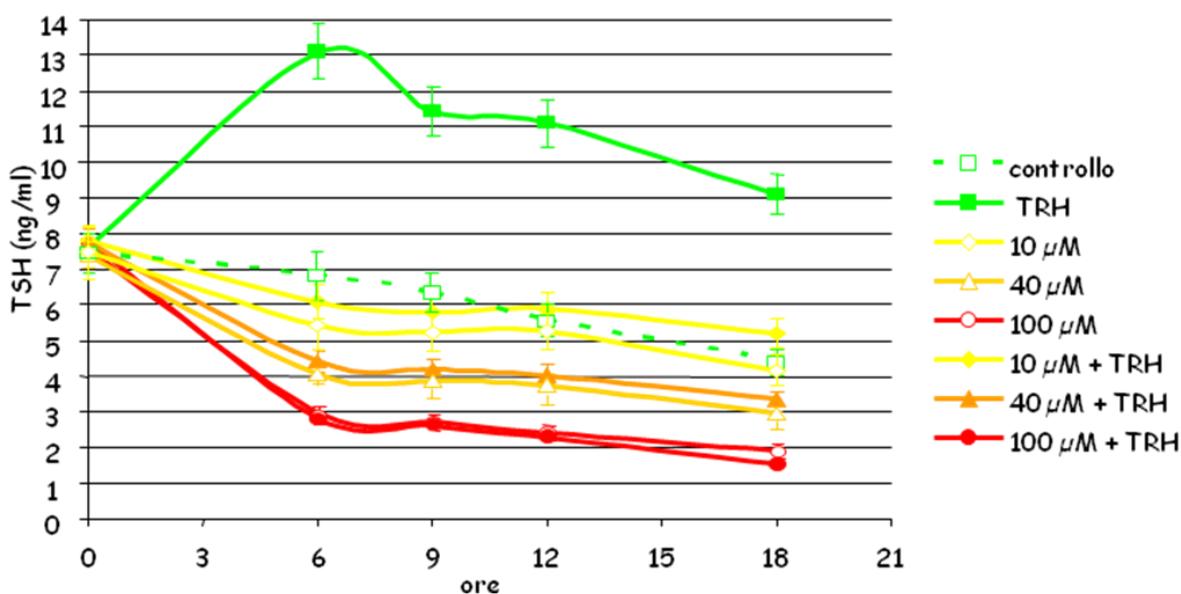


Fig. 14 Secrezione di TSH indotta da TRH dopo 5 minuti in presenza di mitotane. **, $P < 0,01$ vs. ct.

RISULTATI

Per valutare se l'effetto del mitotane sulla secrezione del TSH indotta dal TRH persiste nel tempo, è stato eseguito un time-course. Le cellule T α T1 sono state incubate per 0, 6, 9, 12 e 18 ore in presenza o assenza di mitotane (10 μ M, 40 μ M e 100 μ M) e poi stimolate per 5 minuti con TRH 100 nM. Come dimostra la figura 15, la secrezione basale di TSH nelle cellule di controllo diminuisce nel tempo (dopo 18 ore, -41% vs. ct al tempo 0). Come precedentemente osservato il TRH induce un incremento significativo ($P < 0,01$) della secrezione del TSH che persiste nel tempo (+92, +81, +100, +106% dopo 6, 9, 12 e 18 ore, rispettivamente, vs. ct).



TRH	-	100 nM	-	-	-	100 nM	100 nM	100 nM
Mitotane	-	-	10 μ M	40 μ M	100 μ M	10 μ M	40 μ M	100 μ M
Hours 0	7.40	7.60	7.50	7.45	7.40	7.80	7.75	7.70
6	6.80	13.10	5.44	4.12	2.80	6.10	4.40	2.70
9	6.30	11.40	5.25	3.93	2.60	5.80	4.18	2.55
12	5.55	11.10	5.30	3.80	2.30	5.90	4.50	2.20
18	4.40	9.10	4.20	3.00	1.80	5.20	3.35	1.50

Fig. 15 Effetti a lungo termine del mitotane sulla secrezione del TSH sia basale che indotta dal TRH

Il mitotane 10 μM determina una leggera riduzione non significativa della secrezione del TSH a tutti i tempi di incubazione comparata con le cellule controllo, ma blocca completamente la risposta al TRH. Il mitotane 40 e 100 μM riducono significativamente la secrezione del TSH, sia basale che indotta dal TRH.

1.7 EFFETTI DEL MITOTANE SULL'ESPRESSIONE DELLA SUBUNITÀ β DEL TSH INDOTTA DAL TRH

Per determinare se il mitotane è in grado di influenzare l'espressione della subunità β del TSH, le cellule T α T1 sono state incubate per 6 ore con concentrazioni crescenti di mitotane, in presenza e in assenza di TRH 100 nM. Come evidenziato dalla figura 16, il TRH induce un incremento significativo ($P < 0,01$) dell'espressione dell'mRNA della subunità β del TSH (+30% vs. ct). Il mitotane 10 μM non altera l'espressione della subunità β del TSH, sia basale che indotta dal TRH, mentre le concentrazioni di mitotane 40 e 60 μM determinano una significativa ($P < 0,01$) riduzione dell'espressione basale di TSH (-73 e -62% vs. ct, rispettivamente) e dell'espressione indotta dal TRH (-64 e -41% vs. cellule trattate con TRH, rispettivamente).

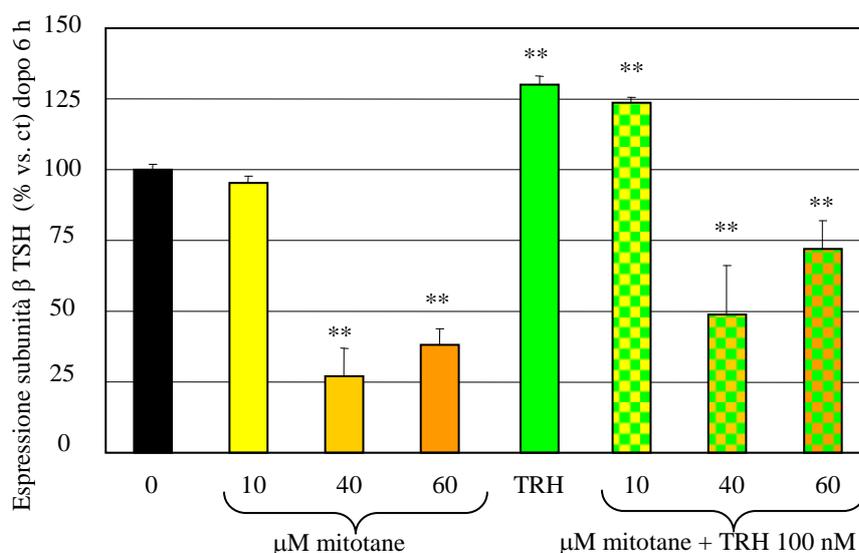


Fig. 16 Effetti del mitotane sull'espressione della subunità β del TSH indotta dal TRH. **, $P < 0,01$ vs. ct.

2 MITOTANE E CELLULE IPOFISARIE ACTH SECERNENTI

2.1 EFFETTI DEL MITOTANE SULLA VITALITÀ DELLE CELLULE AtT20/D16v-F2

Per valutare gli effetti del mitotane sulla vitalità delle cellule ipofisarie murine ACTH secernenti, le cellule AtT20/D16v-F2 sono state incubate con concentrazioni crescenti di mitotane (10 - 100 μ M) per 6, 24 e 48 ore.

Dopo 6 ore di incubazione (Fig. 17) nessuna concentrazione di mitotane influenza la vitalità cellulare rispetto al ct.

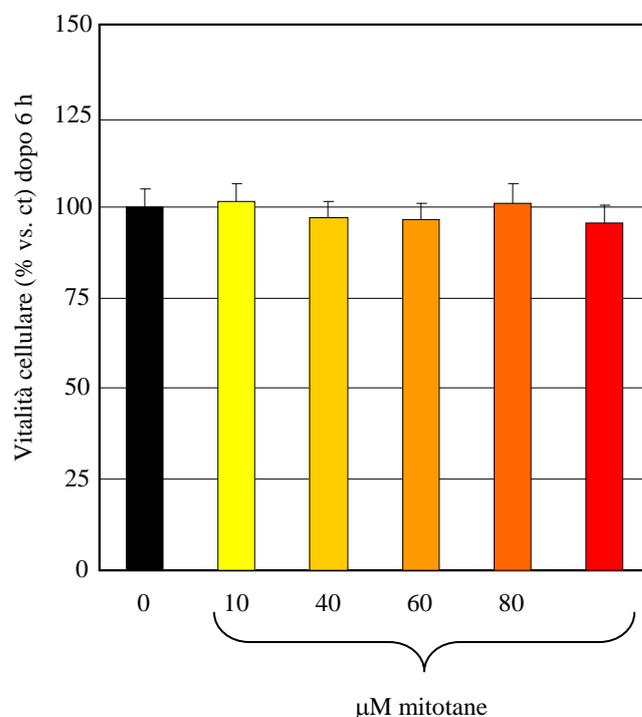


Fig. 17 Vitalità cellulare dopo 6 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane.

Dopo 24 ore di incubazione (Fig. 18), la vitalità cellulare è significativamente ($P < 0,01$) ridotta, in modo dose dipendente, dopo trattamento con mitotane 60 μ M (-20%), 80 μ M (-23%) e 100 μ M (-33%) verso le cellule controllo.

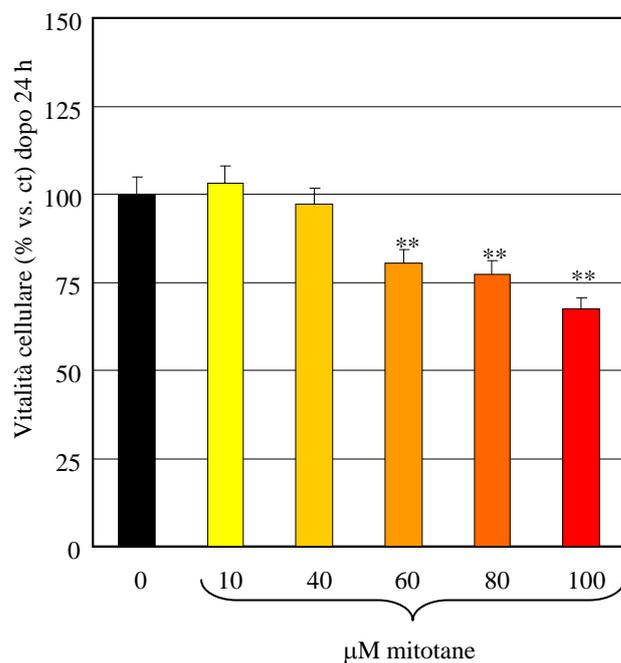


Fig. 18 Vitalità cellulare dopo 24 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. **, $P < 0,01$ vs. ct.

Dopo 48 ore di incubazione (Fig. 19), la vitalità cellulare si riduce in presenza di concentrazioni di mitotane comprese fra 40 e 100 μM (da -10% a -46% vs. ct), raggiungendo la significatività statistica ($P < 0,01$) a partire dalla concentrazione 60 μM .

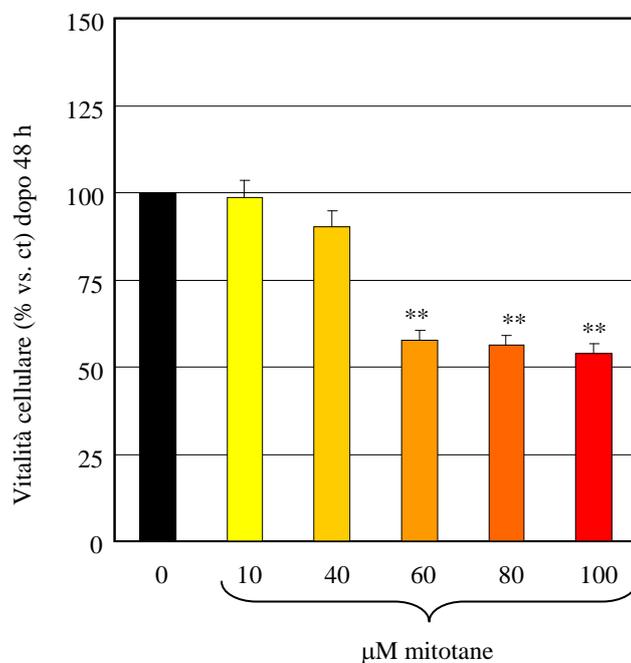


Fig. 19 Vitalità dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct.

RISULTATI

Per valutare se il mitotane influenza meccanismi fisiologici tipici delle cellule corticotrope, è stata valutata la risposta di queste cellule, in termini di vitalità cellulare e secrezione, in seguito a stimolazione con CRH.

Sono state seminate, quindi, 9000 cellule/pozzetto che poi sono state trattate per 6, 24 e 48 ore con diverse concentrazioni di mitotane in presenza di CRH 100 nM, concentrazione che induce significativamente la secrezione di ACTH (55). La vitalità cellulare è stata valutata mediante ATPlite 1step (PerkinElmer) rispetto sia alle cellule di controllo che alle cellule trattate con CRH in presenza di etanolo 1:1000 (solvente). È stato osservato che il CRH stimola la vitalità cellulare a tutti i tempi (+20% vs. ct; $P < 0,01$). Dopo 6 ore di incubazione, il mitotane (Fig. 20) riduce significativamente ($P < 0,05$) l'effetto stimolatorio del CRH alle concentrazioni di 60 μM (-6%), 80 μM (-13%) e 100 μM (-14%) vs. CRH 100 nM.

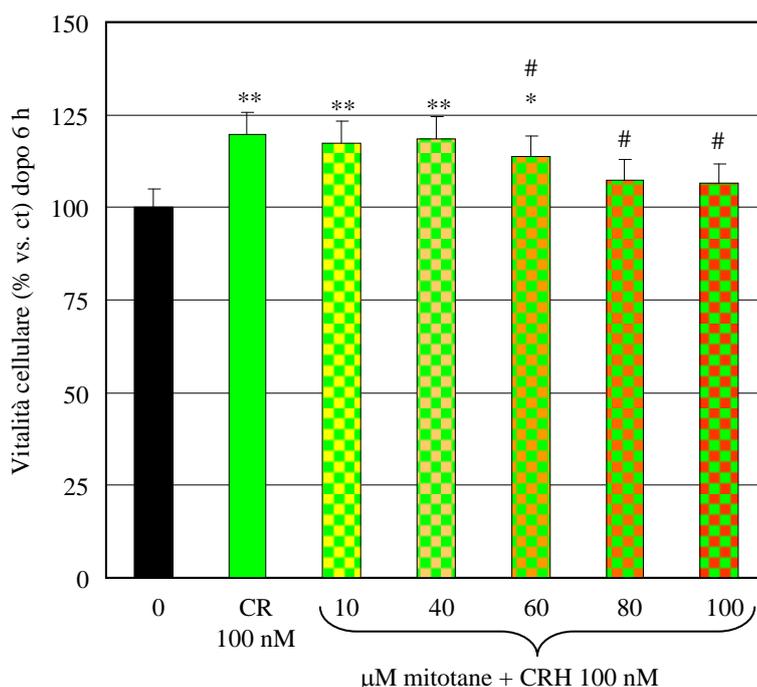


Fig. 20 Vitalità cellulare dopo 6 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct. #, $P < 0,05$ vs. CRH 100 nM.

I dati mostrano che è sufficiente la concentrazione di 40 μM per determinare, dopo 24 ore (Fig. 21), un calo significativo dell'effetto stimolatorio del CRH (-14% vs. CRH 100 nM; $P < 0,05$). D'altra parte, a concentrazioni più elevate (80 e 100 μM) si è osservata una totale perdita

dell'attività stimolatoria del CRH e quindi una riduzione della vitalità cellulare rispetto alle cellule controllo (-5%; $P < 0,05$ e -9%; $P < 0,01$).

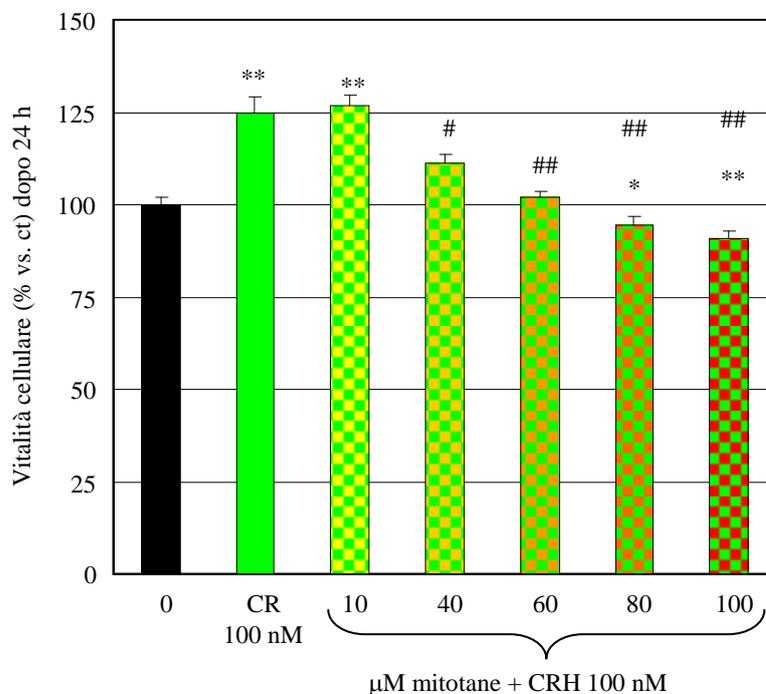


Fig. 21 Vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct. #, $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ vs. CRH 100 nM.

Dopo 48 ore di incubazione (Fig. 22) si osserva, dopo trattamento combinato mitotane-CRH, una riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare, che diventa significativa a 40 μM ove è pari al -17% ($P < 0,05$) rispetto al CRH 100 nM, per arrivare ad una riduzione del 52% (vs. CRH 100 nM; $P < 0,01$) in presenza di mitotane 100 μM . Inoltre, si è osservata una riduzione (-24%; $P < 0,05$) della vitalità cellulare rispetto alle cellule di controllo già alla concentrazione di mitotane 60 μM .

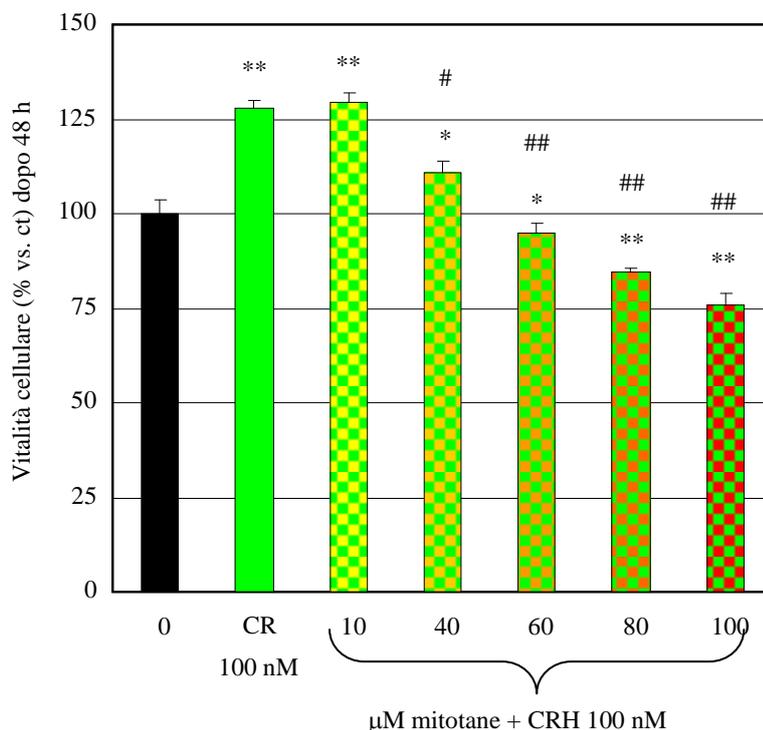


Fig. 22 Vitalità cellulare dopo 48 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct. #, $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ vs. CRH 100 nM.

2.2 EFFETTI DEL MITOTANE SULL'ATTIVITA' CASPASICA IN CELLULE AtT20/D16v-F2

Per valutare se la riduzione della vitalità cellulare indotta dal mitotane fosse determinata da apoptosi, è stato effettuato un saggio di attività caspasi. Dopo aver seminato 9000 cellule per pozzetto e averle trattate con mitotane (per 24 e 48 ore) è stata misurata l'attività delle caspasi 3/7. Dopo 24 ore (Fig. 23) dal trattamento con il mitotane, si osserva una attivazione significativa ($P < 0,01$) delle caspasi 3/7, a partire dalla concentrazione di 40 μM (da +42% a +486% vs. ct), in modo dose dipendente. Si riscontra lo stesso effetto anche dopo 48 ore, sempre a partire dalla concentrazione di 40 μM (da +19% a +153% vs. ct).

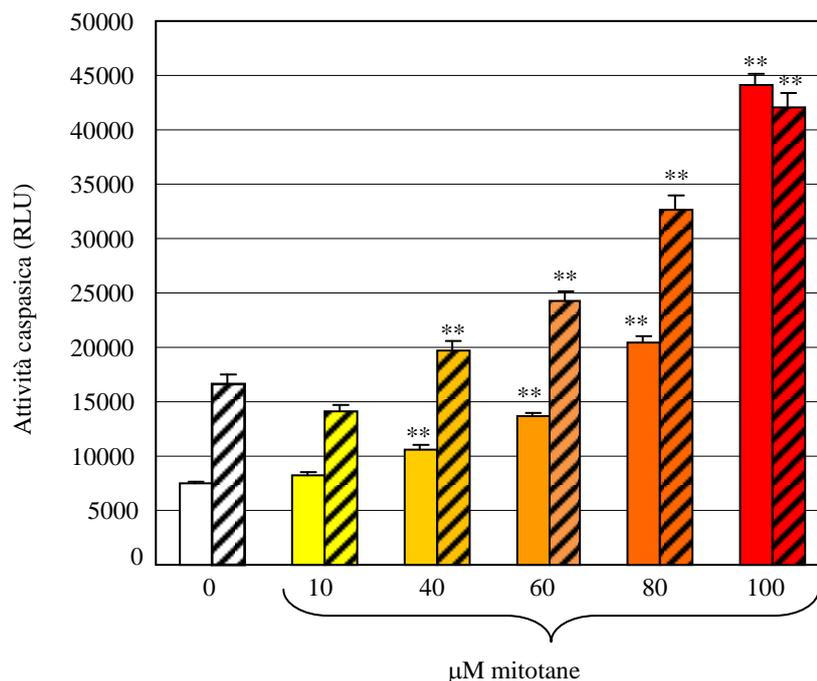


Fig. 23 Attività caspatica dopo 24 e 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane, rispettivamente rappresentate con barre uniformemente colorate e barre con trama a righe. **, $P < 0,01$ vs. ct.

Per valutare se il CRH protegge le cellule adrenocorticotrope dal meccanismo apoptotico attivato dal mitotane, le cellule AtT20/D16v-F2 sono state trattate per 6, 24 e 48 ore con diverse concentrazioni di mitotane in associazione con CRH 100 nM.

Il CRH riduce significativamente ($P < 0,01$) l'attività caspatica rispetto alle cellule di controllo, sia dopo 24 che dopo 48 ore (Fig. 24). Inoltre, dopo 24 ore l'attività caspatica aumenta significativamente ($P < 0,01$) in seguito a trattamento con mitotane 80 μM (+32%) e 100 μM (+305%) rispetto al CRH 100 nM. Con il passare del tempo si osserva un aumento dell'apoptosi a partire da concentrazioni minori: 40 μM (+10%; $P < 0,05$), 60 μM (+19%; $P < 0,05$), 80 μM (+40%; $P < 0,01$), 100 μM (+155%; $P < 0,01$) rispetto al trattamento con CRH 100 nM.

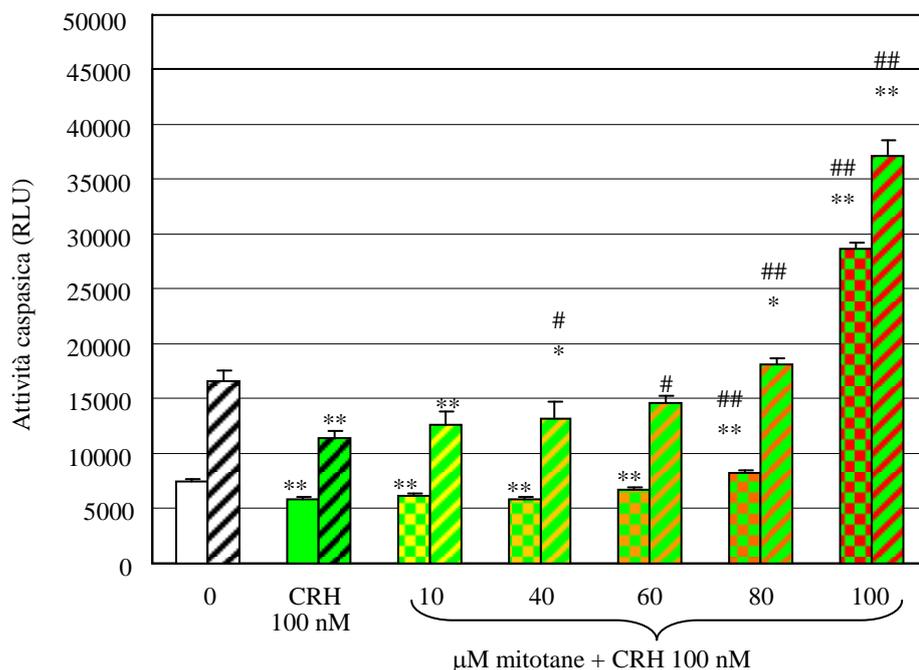


Fig. 24 Attività caspatica dopo 24 e 48 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione a CRH 100 nM. I diversi colori rappresentano diverse concentrazioni di mitotane (dal giallo al rosso) in presenza di CRH (verde); l'associazione è graficamente definita con quadri o righe, rispettivamente per 24 e 48 ore di trattamento. *, P<0,05 e **, P<0,01 vs. ct. #, P<0,05 e ## P<0,01 vs. CRH 100 nM.

2.3 VALUTAZIONE DELLA SECREZIONE DELL'ACTH INDOTTA DAL CRH NEL TEMPO

Per definire la risposta al CRH delle cellule adrenocorticotrope in termini di secrezione di ACTH, sono state seminate 9000 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti. Il giorno seguente le cellule sono state trattate con CRH 100 nM per: 0, 30, 60, 180 e 360 minuti. Al termine dei diversi tempi di stimolazione il mezzo di coltura delle cellule è stato raccolto e utilizzato per eseguire un test ELISA, al fine di quantificare l'ACTH secreto dalle cellule. E' stato osservato (Fig.25) un incremento significativo (P<0,05) della secrezione di ACTH dopo 3 e 6 ore, rispettivamente di +179% e +258% vs. il tempo 0.

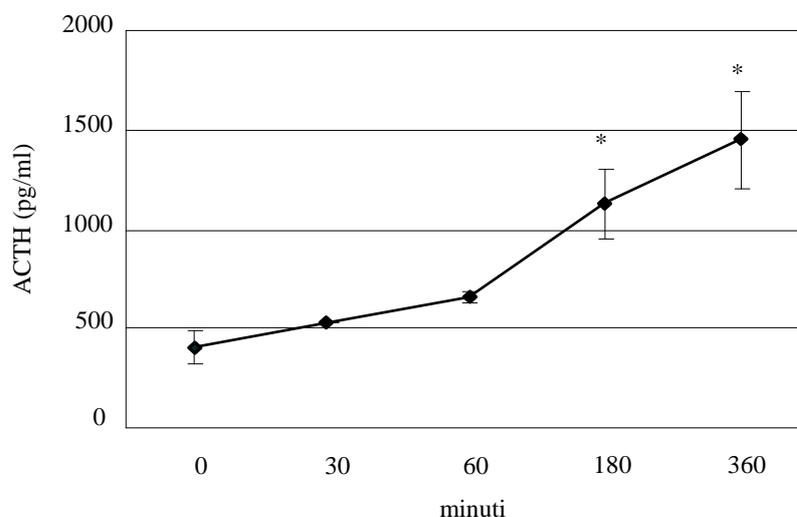


Fig. 25 Secrezione di ACTH dopo trattamento con CRH per 0, 30, 60, 180, 360 minuti. *, $P < 0,05$ vs. ct.

2.4 EFFETTI DEL MITOTANE SULLA SECREZIONE DI ACTH

Per determinare gli effetti a breve termine del mitotane sulla secrezione dell'ACTH da parte delle cellule ipofisarie AtT20/D16v-F2, è stato eseguito un test ELISA sul mezzo di coltura delle cellule trattate per 6, 24 e 48 ore con concentrazioni crescenti di mitotane in presenza o assenza di CRH. Inoltre, per valutare gli effetti a lungo termine del farmaco, le cellule sono state incubate per gli stessi tempi con differenti concentrazioni di mitotane e solo successivamente stimulate con CRH per 3 ore. Gli effetti del trattamento sulla secrezione sono stati valutati rispetto ad un controllo trattato con solo mezzo di coltura (ct+med).

Dopo 6 ore (Fig.26) di trattamento con mitotane non si hanno effetti sulla secrezione dell'ACTH rispetto alle cellule di controllo.

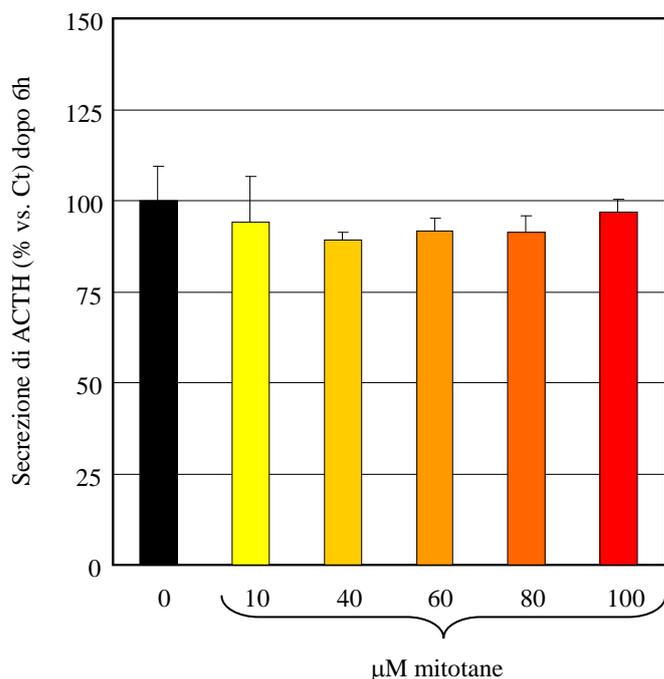


Fig. 26 Secrezione di ACTH dopo 6 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane

Dopo 24 ore (Fig. 27) di trattamento con mitotane si ha una riduzione significativa ($P < 0,01$) della secrezione di ACTH, in modo dose dipendente, a partire dalla concentrazione di 60 µM (da -29% a -45% vs. ct), così come dopo 48 ore (Fig. 28) (da -23% a -47% vs. ct).

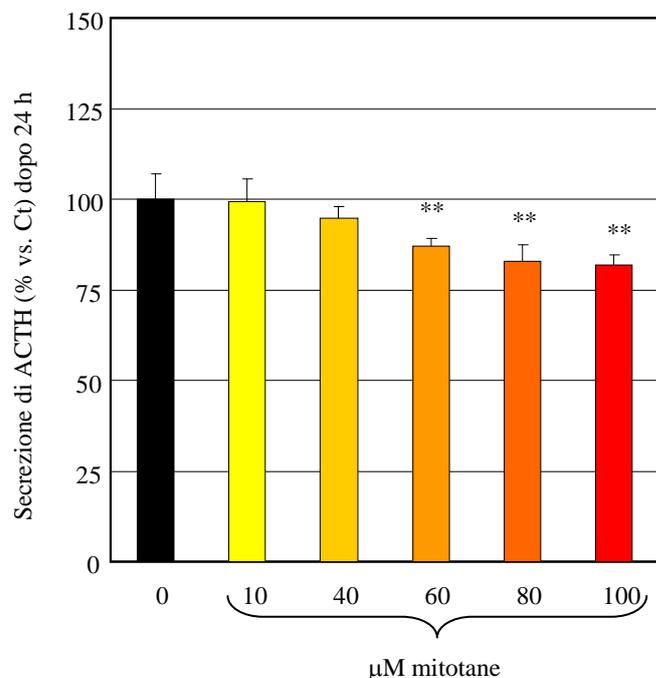


Fig. 27 Secrezione di ACTH dopo 24 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane. **, $P < 0,01$ vs. ct.

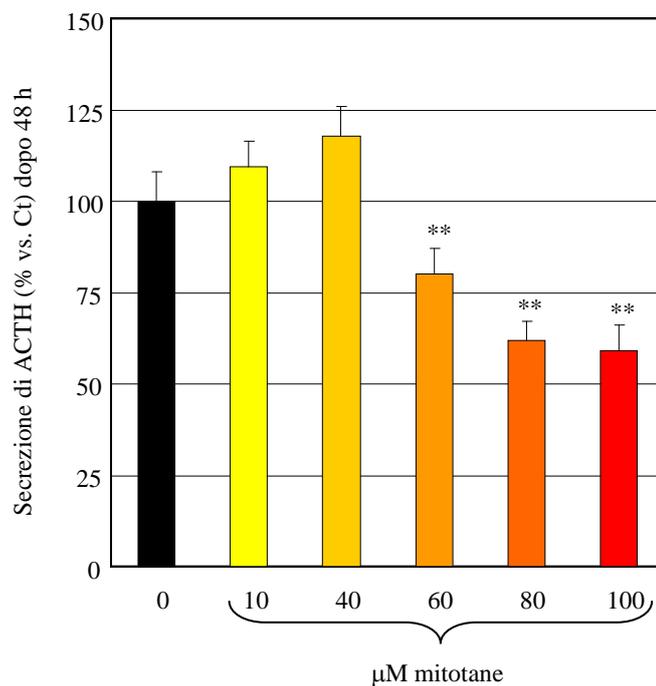


Fig. 28 Secrezione di ACTH dopo 48 ore di trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane.

** $P < 0,01$ vs. ct.

Dopo 6 ore (Fig. 29) di incubazione con CRH si osserva un incremento significativo ($P < 0,01$) della secrezione dell'ACTH rispetto alle cellule di controllo (+32%). Il trattamento con l'associazione mitotane/CRH determina una riduzione significativa ($P < 0,01$) della secrezione di ACTH a partire dalla concentrazione di 40 μM (-23% vs. CRH 100 nM), senza alcuna differenza fra le diverse concentrazioni.

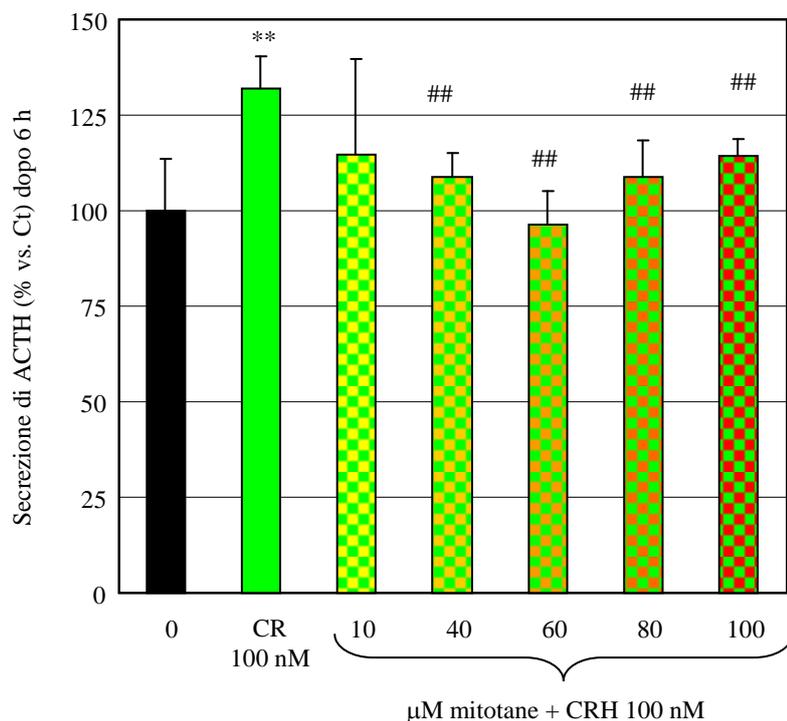


Fig. 29 Secrezione di ACTH dopo 6 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. **, P<0,01 vs. ct. ## P<0,01 vs. CRH 100 nM.

Dopo 24 ore (Fig. 30) l'effetto stimolatorio del CRH sulla secrezione dell'ACTH non è più apprezzabile. Il trattamento con l'associazione mitotane/CRH determina una riduzione significativa (P<0,01) della secrezione di ACTH alla concentrazione 100 μM (-26% vs. ct).

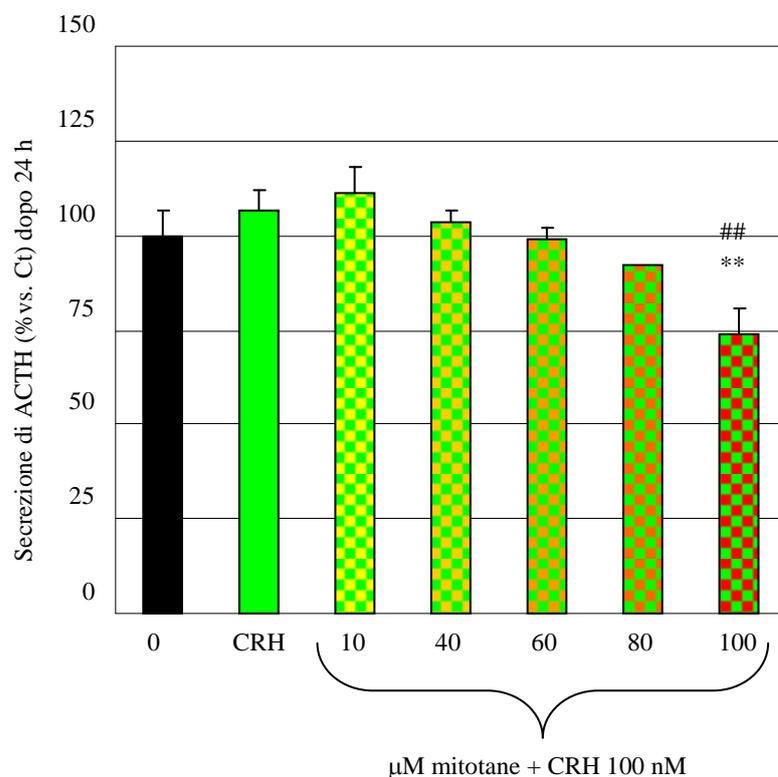


Fig. 30 Secrezione di ACTH dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. **, $P < 0,01$ vs. ct. ## $P < 0,01$ vs. CRH 100 nM.

Dopo 48 ore (Fig. 31) di incubazione con mitotane in associazione con CRH si ha un calo significativo della secrezione dell'ACTH a partire dalla concentrazione di 40 μM (-10% vs. ct; $P < 0,05$) fino a 100 μM (-23% vs. ct; $P < 0,01$).

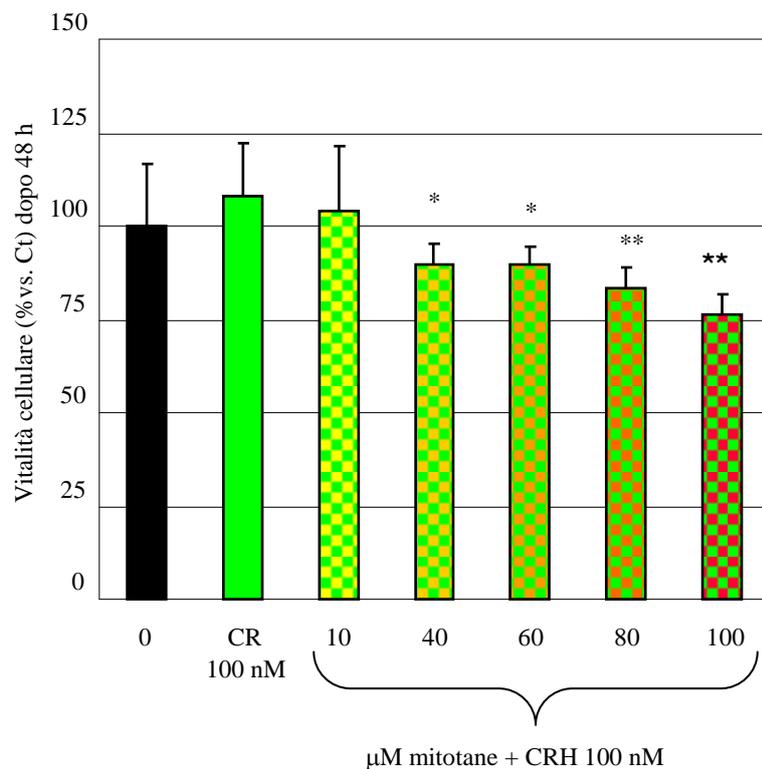


Fig. 31 Secrezione di ACTH dopo 48 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mitotane in associazione con CRH 100 nM. *, $P < 0,05$ e **, $P < 0,01$ vs. ct.

Trattando, invece, le cellule con concentrazioni crescenti di mitotane per 6, 24 e 48 ore e solo successivamente con CRH per 3 ore, si è osservato che nessuna concentrazione di mitotane è in grado di ridurre significativamente la secrezione di ACTH rispetto alle cellule di controllo a tutti i tempi considerati (Fig. 32).

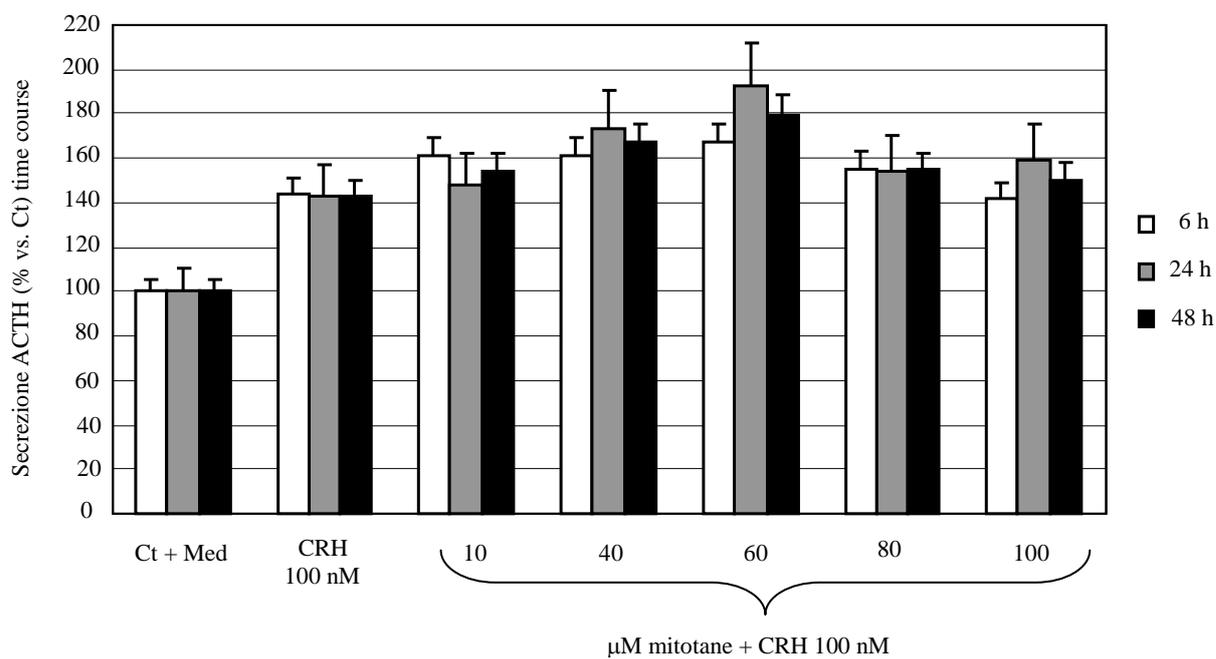


Fig. 32 Secrezione di ACTH dopo trattamento con concentrazioni crescenti di mitotane per 6, 24 e 48 ore e successiva incubazione con CRH 100 nM per 3 ore. Tutti i tempi e tutte le concentrazioni considerate raggiungono la significatività statistica $P < 0,01$

DISCUSSIONE

La recente dimostrazione che la terapia adiuvante con mitotane può prolungare il periodo di sopravvivenza libero da recidiva di malattia, dopo rimozione chirurgica di CAC, ha suscitato nuovo interesse in un farmaco già conosciuto: il mitotane (48). Derivato sintetico dell'insetticida DDT, possiede attività adrenolitica con specificità per la corteccia surrenalica, inibendo la conversione intramitocondriale del colesterolo a pregnenolone e dell'11-desossicortisolo a cortisolo (39). È inoltre in grado di causare necrosi surrenalica selettiva, anche a livello di localizzazioni secondarie, e di contrastare la chemioresistenza del tumore (40). In letteratura è riportato che pazienti trattati con mitotane sviluppano numerosi effetti collaterali come tossicità neuronale, epatiti autoimmuni, incremento della fosfatasi alcalina e della glutammin-transpeptidasi, sintomi gastrointestinali (48). Un approfondito studio del profilo di sicurezza del farmaco risulta di importanza critica per definire la messa a punto della terapia adiuvante. Attualmente, sono disponibili scarse informazioni sulle conseguenze del trattamento persistente con mitotane, in particolar modo per quanto riguarda la possibile diminuzione della funzionalità tiroidea (30, 48), nonché sulla diminuzione della funzionalità adrenocorticotropa, come sembrerebbe suggerire la diminuzione dei livelli di ACTH nei soggetti trattati con mitotane rispetto a quelli non sottoposti a trattamento farmacologico (48). Questo studio dimostra che il mitotane influenza la vitalità delle cellule ipofisarie tireotrope, la secrezione di TSH, nonché la responsività al TRH in cellule T α T1, modello murino di cellule TSH-secermenti, supportando l'ipotesi che il mitotane possa avere effetti inibitori sulla funzionalità tiroidea agendo a livello ipofisario. Questi dati offrono una spiegazione della peculiare perturbazione della funzionalità tiroidea osservata durante la terapia adiuvante con mitotane (ridotti livelli di FT4 non associati ad una riduzione dei livelli di TSH o di FT3), suggestiva di deficit ipofisario (48-49). La capacità del mitotane di indurre la sintesi di diverse proteine come ad esempio la TBG (Thyroxina Binding Globulin) (56, 57) non può spiegare completamente il quadro biochimico simile ad ipotiroidismo centrale. E' stato riportato che più di 40000 farmaci possono interferire con indagini di laboratorio (58), causando un' erronea interpretazione dei test e richiedendo, quindi, ulteriori indagini, costi addizionali ed un ritardo nella diagnosi. In bibliografia è noto che il dosaggio della tiroxina libera può essere alterato in pazienti sottoposti a terapia con diversi farmaci (59). Fenitoina e

carbamazepina, ad esempio, interferiscono con il dosaggio dell'FT4, riducendone i livelli (59), suggerendo che anche il mitotane possa interferire con la valutazione degli ormoni tiroidei. Questo studio dimostra che il mitotane non modifica la valutazione quantitativa degli ormoni tiroidei in pazienti ipo-, iper- ed eutiroidei.

Per spiegare il quadro biochimico compatibile con ipotiroidismo in pazienti trattati con mitotane, abbiamo ipotizzato che questo farmaco possa avere effetti tossici sulle cellule TSH secernenti ipofisarie. Utilizzando un modello in vitro, rappresentato dalla linea cellulare ipofisaria TSH secernente murina T α T1, abbiamo dimostrato che il mitotane è in grado di ridurre la vitalità cellulare ad alte concentrazioni (100 μ M, corrispondenti a 32 mg/L) dopo 6 ore di esposizione ed a concentrazioni terapeutiche (60 μ M, corrispondenti a 19,2 mg/L) dopo 48 ore. I nostri dati quindi indicano che il mitotane, a concentrazioni considerate di impatto terapeutico, riducono la vitalità delle cellule tireotrope dopo una prolungata esposizione. Questi risultati sono in linea con precedenti lavori che indicano che concentrazioni di mitotane più basse della concentrazione terapeutica, non influiscono sulla proliferazione di linee cellulari umane di CAC funzionanti (60, 61) e non funzionanti (62). Fang (60) dimostrò che il mitotane, a concentrazioni maggiori di 160 μ M, determina effetti tossici dose dipendenti su una linea cellulare di CAC funzionante umano, dopo tre giorni di esposizione. I nostri risultati indicano, invece, che una prolungata esposizione al farmaco causa una riduzione significativa della vitalità cellulare già a concentrazioni di impatto terapeutico, suggerendo che le cellule ipofisarie tireotrope siano più sensibili agli effetti tossici del mitotane comparate con le cellule della corteccia surrenalica. La riduzione della vitalità cellulare da noi osservata è determinata dall'attivazione del meccanismo apoptotico, in quanto il mitotane induce un'attivazione dose dipendente delle caspasi 3/7, in linea con precedenti studi (63). La riduzione significativa della vitalità cellulare osservata con dosi di mitotane pari a 100 μ M (32 mg/L) rispetto alla concentrazione 80 μ M (25.6 mg/L) non è supportata da un corrispondente aumento dell'attivazione caspatica, suggerendo che la riduzione della vitalità cellulare, osservata ad alte dosi di mitotane, non è esclusivamente dovuta al meccanismo apoptotico, ma probabilmente anche a necrosi, data l'origine del farmaco. E' di notevole importanza sottolineare che alte concentrazioni di farmaco possono essere raggiunte in terapia adiuvante allo scopo di raggiungere rapidamente la concentrazione target (48).

I nostri risultati indicano, inoltre, che il mitotane, a concentrazioni terapeutiche ($> 40 \mu\text{M}$, corrispondente a $> 12,8 \text{ mg/L}$) riduce in modo dose dipendente la secrezione di TSH già dopo 6 ore di esposizione in cellule $\text{T}\alpha\text{T1}$. La riduzione della secrezione della tropina non può essere attribuita alla riduzione della vitalità cellulare, in quanto, dopo sei ore, solo la concentrazione $100 \mu\text{M}$ è in grado di influenzarla. Queste evidenze sono ulteriormente rafforzate dall'osservazione che, dopo 6 ore, il mitotane alle stesse concentrazioni riduce anche l'espressione della subunità β del TSH, essenziale per la sintesi di una tropina funzionante (54). Questi risultati supportano l'ipotesi che il mitotane riduce precocemente e direttamente l'espressione del TSH, così come la secrezione, e solo successivamente agisce sulla vitalità delle cellule tireotrope. I nostri risultati sono in linea con precedenti lavori che indicano il mitotane, anche a concentrazioni inferiori a quella terapeutica, come un inibitore della secrezione steroidea nella linea cellulare adrenocorticale H295R, laddove non influisce sulla vitalità cellulare (61, 62). Gli effetti tossici delle diverse concentrazioni di mitotane sulle differenti linee cellulari possono essere ascritte a differenti sensibilità delle linee cellulari stesse.

Questo lavoro inoltre mostra che le cellule $\text{T}\alpha\text{T1}$ rispondono alla stimolazione con TRH, in termini di secrezione di TSH, in modo rapido e significativo. L'effetto del TRH, comunque, è completamente soppresso dal trattamento con il mitotane, indicando che il farmaco influisce rapidamente sulla capacità delle cellule tireotrope di rispondere a stimoli fisiologici. In aggiunta, i dati ottenuti sono consistenti con un prolungato effetto inibitorio del mitotane sulla secrezione sia basale che indotta dal TRH. La tropina di rilascio non è in grado di recuperare la funzionalità tireotropica in termini di secrezione di TSH, in cellule trattate con concentrazioni di mitotane uguali o superiori a quelle terapeutiche. La valutazione dell'espressione della subunità β del TSH conferma l'ipotesi che il mitotane agisce intensamente a livello delle cellule tireotrope, inibendo anche l'espressione del βTSH , sia basale che indotta dal TRH. Quest'ultimo non è in grado di recuperare la ridotta espressione della subunità β del TSH.

In particolar modo questi dati supportano l'ipotesi che il mitotane può indurre un ipotiroidismo secondario, riducendo sia la secrezione di TSH che la vitalità delle cellule tireotrope.

Recentemente è stato inoltre evidenziato che pazienti sottoposti a terapia adiuvante con mitotane presentano ridotti livelli di ACTH rispetto a pazienti non trattati con mitotane (48). Data l'evidenza dell'effetto tossico diretto del mitotane a livello ipofisario, per spiegare il

quadro biochimico caratterizzato da ridotti livelli di ACTH in pazienti trattati con mitotane, abbiamo ipotizzato che il farmaco possa avere effetti tossici diretti su cellule ipofisarie adrenocorticotrope. A tale scopo è stato utilizzato un modello murino di cellule: AtT20/D16v-F2, ed è stato dimostrato che il mitotane è in grado di ridurre la vitalità cellulare già dopo 24 ore di trattamento, a partire dalla concentrazione terapeutica più alta di 60 μM (19,2 mg/L), e a partire dalla concentrazione di 40 μM (12,8 mg/L) dopo un'esposizione di 48 ore. Questi risultati indicano che il mitotane, a concentrazioni terapeutiche, riduce la vitalità delle cellule ipofisarie ACTH secernenti dopo un tempo medio di esposizione, suggerendo che queste cellule siano più sensibili agli effetti tossici del mitotane rispetto a cellule di CAC, ma più resistenti delle cellule ipofisarie TSH secernenti. Questo studio ha dimostrato, inoltre, che la riduzione della vitalità cellulare è in parte associata ad attivazione del processo di morte cellulare programmata. Il mitotane, induce dopo 24 ore un'attivazione delle caspasi 3/7 in modo dose dipendente già alla concentrazione di impatto terapeutico di 40 μM , anche se a tale concentrazione non si osserva una corrispondente riduzione della vitalità cellulare, probabilmente perché il processo apoptotico è stato attivato, ma non ancora terminato. Dopo un'esposizione prolungata al farmaco (48 ore) non si osserva un incremento dell'attivazione dell'apoptosi proporzionale alla riduzione della vitalità, suggerendo che la morte cellulare osservata non sia dovuta esclusivamente ad apoptosi, ma anche ad altri meccanismi di morte cellulare, come ipotizzato anche per le cellule tireotrope.

Dall'analisi della secrezione dell'ACTH è stato osservato che il mitotane determina dopo 24 e 48 ore una riduzione dose dipendente della secrezione dell'ACTH a partire dalla concentrazione più alta della finestra terapeutica (60 μM). Tale riduzione non è determinata dalla riduzione della vitalità cellulare in quanto i dati ottenuti sono stati elaborati considerando solo le cellule effettivamente vitali. Questi dati hanno suggerito che la tossicità indotta dal mitotane determini una riduzione dell'attività fisiologica delle cellule ipofisarie ACTH secernenti, in accordo con i risultati riscontrati in letteratura che descrivono i ridotti livelli di ACTH in pazienti trattati con tale terapia adiuvante (48).

Per determinare se il trattamento con mitotane influisce anche sulla responsività delle cellule ACTH secernenti a stimoli fisiologici, sono stati valutati gli effetti del mitotane in presenza di CRH, il quale notoriamente stimola l'attività fisiologica delle cellule, inducendone la secrezione di ACTH (64). È stato osservato che, in cellule murine ipofisarie ACTH secernenti,

il CRH determina un incremento della vitalità cellulare rispetto a cellule non sottoposte allo stesso stimolo e che tale induzione si riduce in seguito a trattamento con mitotane, già dopo 6 ore, a partire dalla concentrazione più alta della finestra terapeutica. Dopo 24 ore di incubazione con il farmaco è stata osservata un'iniziale riduzione dell'effetto stimolatorio del CRH sulla vitalità cellulare alle concentrazioni di 40 e 60 μM , mentre a concentrazioni più elevate la responsività allo stimolo fisiologico è completamente soppressa. Con l'aumentare del tempo di esposizione è necessaria una quantità minore di farmaco (60 μM) per determinare la perdita totale della responsività al CRH. Questi risultati suggeriscono che il mitotane agisce profondamente a livello ipofisario, riducendo significativamente la capacità delle cellule ACTH secernenti di rispondere a stimoli fisiologici (65).

E' stato inoltre osservato che il CRH ha effetto protettivo sull'attivazione dell'apoptosi in cellule AtT20/D16v-F2. Il mitotane è in grado di ridurre l'effetto a concentrazioni maggiori della finestra terapeutica (80 μM). La differenza fra la riduzione della vitalità cellulare determinata dalla concentrazione di mitotane pari a 60 μM e la corrispondente attivazione del processo apoptotico, dopo 48 ore di trattamento, possono essere ascritte all'attivazione di processi diversi dalla morte cellulare programmata (66).

Inoltre, da questo lavoro, si evince che il CRH è effettivamente in grado di stimolare la secrezione di ACTH dopo 6 ore di esposizione al farmaco, effetto non apprezzabile a tempi superiori. Dopo breve esposizione il mitotane a concentrazioni uguali o superiori a quelle terapeutiche riduce significativamente la secrezione di ACTH indotta da CRH. A tempi di esposizione maggiori (24 ore) il CRH, pur non funzionando da stimolo secretorio, protegge le cellule dall'azione tossica del mitotane, effetto che viene a mancare dopo 48 ore. Questi risultati indicano che il mitotane agisce rapidamente e intensamente a livello delle cellule adrenocorticotrope.

I nostri risultati, inoltre, suggeriscono, inaspettatamente, che dopo un'esposizione prolungata al farmaco le cellule private dello stimolo tossico del mitotane sono in grado di rispondere alla stimolazione con CRH in termini di secrezione dell'ACTH. Data la profonda tossicità del farmaco a livello ipofisario, manifesta già a concentrazioni terapeutiche, è di notevole interesse osservare che le cellule siano in grado di riacquisire la capacità di rispondere allo stimolo fisiologico indipendentemente dal tempo di esposizione al mitotane.

Questi dati supportano l'ipotesi che il mitotane presenti effetti tossici ipofisari riducendo sia la secrezione di ACTH che la vitalità adrenocorticotropa.

L'uso di un modello cellulare per lo studio del meccanismo d'azione dei farmaci è largamente diffuso, in tale prospettiva, l'utilizzo delle linee cellulari murine T α T1 ed AtT20/D16v-F2 è da considerarsi ottimale. Entrambe le linee cellulari presentano le peculiarità proprie delle cellule da cui hanno origine e rappresentano linee clonali, completamente differenziate. Certamente, studi in modelli animali sono auspicabili per meglio comprendere gli effetti biologici dei farmaci nella totalità di un organismo.

CONCLUSIONI

I presenti dati supportano l'ipotesi che il mitotane può indurre direttamente un ipotiroidismo secondario, riducendo la vitalità cellulare tireotropica, la secrezione e l'espressione del TSH, nonché la responsività al TRH. Questo studio è di importanza clinica notevole, in quanto il mitotane manifesta effetti tossici a livello ipofisario a concentrazioni considerate di impatto terapeutico. L'ipotiroidismo centrale rappresenta il messaggio clinico di questo lavoro, che sottolinea l'importanza di considerare la perturbazione tiroidea come parte del quadro clinico-biochimico associato alla tossicità del mitotane. L'ipotiroidismo centrale può spiegare la sonnolenza e i problemi legati alla performance mentale frequentemente osservati in pazienti esposti ad alte dosi del farmaco (30, 67, 68, 33, 31, 45, 46), suggerendo che i medici dovrebbero tenere in considerazione la terapia sostitutiva con T4 per ripristinare la funzionalità tiroidea.

Non è secondario che il trattamento con questo farmaco determina, inoltre, una riduzione della vitalità delle cellule ipofisarie ACTH secernenti inducendo l'attivazione del processo apoptotico e una riduzione della secrezione dell'ACTH sia basale che indotta dal CRH. Il mitotane, quindi, influenza profondamente anche la funzionalità delle cellule corticotrope suggerendo un effetto tossico generalizzato alla ghiandola ipofisaria.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale:
Prof. Ettore degli Uberti,
Dott.ssa Maria Chiara Zatelli,
e tutto il gruppo di Fisiopatologia Endocrina.

*Da queste parti, comunque, non
guardiamo indietro a lungo.*

*Andiamo sempre avanti, aprendo nuove porte e
facendo cose nuove, perché siamo curiosi...*

E la curiosità ci porta verso nuovi orizzonti. (W. E. D.)

BIBLIOGRAFIA

1 Balboni GC, Bastianini A, Brizzi E, Castorina S, Comparini L, Donato RF, Filogamo G, Fusaroli P, Giordano Lanza G, Grossi CE, Manzoli FA, Marinozzi G, Miani A, Mitolo V, Motta P, Nesci E, Orlandini GE, Passaponti A, Pizzini G, Reale E, Renda T, Ridola C, Ruggeri A, Santoro A, Tedde G, Zaccheo D. Anatomia umana, III edizione 1990, volume 2, 9:598-608.

2 Bertagna X. Adrenal Cancer. 2006, 5:59-66.

3 Faglia G, Beck-Peccoz P. Malattie del sistema endocrino e del metabolismo, IV edizione 2006, 6:175-213.

4 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologic basis of disease. IV edizione 1999, 26: 1152-1168.

5 Oelkers W. Adrenal insufficiency. 1996; N Engl J Med; 335: 1206.

6 Cotran RS, Kumar V, Collins T. Le basi patologiche delle malattie volume 2, VI edizione 2000, 26:1335-1351.

7 Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. 2000, Cancer; 88(4): 711-36.

8 Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonin A, Bricaire H. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. 1990, N Engl J Med; 26 322(17): 1195-201.

-
- 9 Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. 2000, *Cancer*; 15 88(4): 711-36. 9.
- 10 Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. Management of adrenocortical carcinoma. 2004, *Clin Endocrinol (Oxf)*; 60 (3): 273-87. 10.
- 11 Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. 2006, *J Clin Endocrinol Metab*; 91 (7): 2650-5.
- 12 Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. 1995, *Endocr Rev*; 16 (4): 460-84. 12.
- 13 Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. 2006, *J Clin Endocrinol Metab*; 91(7): 2650-5.
- 14 Libe R, Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. 2005, *Eur J Endocrinol*; 153: 477–487.
- 15 Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumore size and malignancy. 1996, *Cancer Res*; 56 (18): 4219-23.
- 16 Kjelmann M, Kallioniemi OP, Karthu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumore size and malignancy. 1996, *Cancer Res*; 56 (18): 4219-23.

17 DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. 2002, *Nat Struct Biol*; 9 (1): 12-6.

18 Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, Boscaro M. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. 2001, *Eur J Endocrinol*; 145(2): 207-12.

19 Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. 2001, *Cancer Res*; 61 (18): 6762-7.

20 Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased levels of insuline-like growth factor 2 (IGF2) and IGF binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. 1998, *J Clin Endocrinol Metab*; 83 (5): 1713-20.

21 Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, Spiegel AM, Marx SJ. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. 1999, *J Clin Endocrinol Metab*; 84 (1): 216-9.

22 Schulte KM, Mengel M, Heinze M, Simon D, Scheuring S, Köhrer K, Röher HD. Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN1 gene in adrenal cancer. 2000, *J Clin Endocrinol Metab*; 85 (1): 441-8.

23 Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutation of β -catenin in adrenocortical tumor: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. 2005, *Cancer Res*; 65 (17): 7622-7.

-
- 24 Boland GW, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MM, Mueller PR. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. 1998, *AJR Am J Roentgenol*; 171 (1): 201-4.
- 25 Icard P, Louvel A, Le Charpentier M, Chapuis Y. Adrenocortical tumors with oncocytic cells: benign or malignant? 2001, *Ann Chir*; 126 (3): 249-53.
- 26 Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JK, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). 2003, *Ann Intern Med*; 138 (5): 424-9.
- 27 Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. 1984, *Am J Surg Pathol.*; 8 (3): 163-9
- 28 Mac Farlane DA. Cancer of the adrenal cortex: the natural story, prognosis and treatment in the study of 58 cases. 1958, *Ann Royal Coll Surg*; 109: 613-8.
- 29 Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. 2005, *Endocr Relat Cancer*; 12 (3): 667-80.
- 30 Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. 2006, *J Clin Endocrinol Metab*; 91 (6): 2027-37.
- 31 Pommier RF, Brennan MF. An eleven year experience with adrenocortical carcinoma. 1992, *Surgery*; 112: 963-70.
- 32 Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques DP, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. 2002, *J Clin Oncol*; 20: 941-50.

33 Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker A-C, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. Adjuvant Mitotane Treatment for Adrenocortical Carcinoma. 2007, *N Engl J Med*; 356: 2372-80.

34 Allolio B, Fassnacht M. Adrenocortical carcinoma: clinical update. 2006, *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 2027-37.

35 Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M, Allolio B. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. 2006, *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 4501-4.

36 Schteingart DE, Motazed A, Noonan RA, Thompson NW. Treatment of adrenal carcinomas. 1982, *Arch Surg*; 117: 1142-6.

37 Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. 2005, *Curr Opin Investig Drugs*; 6: 386-94.

38 Lipsett MB, Bergenstal DM. The metabolic and corticotrophin-suppressing activity of certain C21-deoxysteroids. 1959, *Acta Endocrinol (Copenh)*; 31 (1): 33-9.

39 Hart MM, Straw JA. Studies on the site of action of o,p'-DDD in the dog adrenal cortex. 1. Inhibition of ACTH-mediated pregnenolone synthesis. 1971, *Steroids*; 17 (5): 559-74.

40 Bates SE, Shieh CY, Mickley LA, Dichek HL, Gazdar A, Loriaux DL, Fojo AT. Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) which is also expressed by adrenocortical carcinomas. 1991, *J Clin Endocrinol Metab*; 73 (1): 18-29.

-
- 41 Vilar O, Tullner WW. Effects of o,p' DDD on histology and 17-hydroxycorticosteroid output of the dog adrenal cortex. 1959, *Endocrinology*; 65 (1): 80-6.
- 42 Kaminsky N, Luse S, Hartroft P. Ultrastructure of adrenal cortex of the dog during treatment with DDD. 1962, *J Natl Cancer Inst.*; 29: 127-59.
- 43 Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Lombardi CP, Crucitti P, Crucitti F, Favia G, Borrelli D, Boffi L, Capussotti L, Carbone G, Casaccia M, Cavallaro A, Del Gaudio A, Dettori G, Di Giovanni V, Mazziotti A, Marrano D, Masenti E, Miccoli P, Mosca F, Mussa A, Petronio R, Piat G, Marazano L. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. 1997, *Surgery*; 122 (6): 1212-8.
- 44 Hart MM, Swackhamer ES, Straw JA. Studies on the site of action of o,p'-DDD in the dog adrenal cortex. II. TPNH- and corticosteroid precursor-stimulation of o,p'-DDD inhibited steroidogenesis. 1971, *Steroids*; 17 (5): 575-86.
- 45 Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, Schlumberger M. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. 2001, *Cancer*; 92 (6): 1385-92.
- 46 Terzolo M, Pia A, Berruti A, Osella G, Ali A, Carbone V, Testa E, Dogliotti L, Angeli A. Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. 2000, *J Clin Endocrinol Metab*; 85 (6): 2234-8.
- 47 Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. 1998, *Cancer*; 83 (10): 2194-200.
- 48 Daffara F, De Francia S, Reimondo G, Zaggia B, Aroasio E, Porpiglia F, Volante M, Termine A, Di Carlo F, Dogliotti L, Angeli A, Berruti A, Terzolo M. Prospective evaluation of

mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly. 2008, *Endoc Relat Cancer*; 15 1043–1053.

49 Zatelli MC,* Gentilin E,* Daffara F, Tagliati F, Reimondo G, Carandina G, Ambrosio MR, Terzolo M, degli Uberti EC. Therapeutic concentrations of Mitotane (o,p_-DDD) inhibit thyrotroph cell viability and TSH expression and secretion in a mouse cell line model. 2010, *Endocrinology*; 151 (6): 2453-61.

50 Faglia G, Beck-Peccoz P, Ferrari C, Ambrosi B, Spada A, Travaglini P: Enhanced plasma thyrotrophin response to thyrotrophin-releasing hormone following oestradiol administration in man. 1973, *Clin Endocrinol*; 2: 207.

51 Gershengorn MC, Marcus-Samuels BE, Geras E: Estrogens increase the number of thyrotrophin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. 1979, *Endocrinology*; 105: 171.

52 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. 2002, *Genome Biol*; 3: research 0034.1–0034.11.

53 Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. 2001, *Nucleic Acids Res*; 29 (9): 45.

54 Kim KK, Song SB, Kang KI, Rhee M, Kim KE. Activation of the thyroid-stimulating hormone_-subunit gene by LIM homeodomain transcription factor Lhx2 2007. *Endocrinology*; 148:3468–3476.

55 Yamamori E, Iwasaki Y, Oki Y, Yoshida M, Asai M, Kambayashii M, Oiso Y, Nakashima N. Possible Involvement of Ryanodine Receptor-Mediated Intracellular Calcium Release in the Effect of Corticotropin-Releasing Factor on Adrenocorticotropin Secretion . 2004, *Endocrinology*; 145 (1): 36–38.

56 Van Seters AP, Moolenaar AJ. Mitotane increases the blood levels of hormone-binding proteins. 1991, *Acta Endocrinol*; 124: 526–533.

57 De Francia S, Pirro E, Zappia F, De Martino F, Sprio AE, Daffara F, Terzolo M, Berruti A, Di Carlo F, Ghezzi F. A new simple HPLC method for measuring mitotane and its two principal metabolites. Tests in animals and mitotane-treated patients. 2006, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 837: 69–75.

58 Kailajarvi M, Takala T, Gronroos P, Tryding N, Viikari J, Irjala K, Forsstrom J. Reminders of drug effects on laboratory test results. 2000, *Clin Chem*; 46: 1395–1400.

59 Dong BJ. How medications affect thyroid function. 2000, *West J Med*; 172: 102–106.

60 Fang VS. Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture. 1979, *Cancer Res*; 39: 139–145.

61 Stigliano A, Cerquetti L, Borro M, Gentile G, Bucci B, Misiti S, Piergrossi P, Brunetti E, Simmaco M, Toscano V. Modulation of proteomic profile in H295R adrenocortical cell line induced by mitotane. 2008, *Endocr Relat Cancer*; 15: 1–10.

62 Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A, Amendola D, Piergrossi P, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. 2008, *Endocr Relat Cancer*; 15: 623–634.

63 Pushkarev VM, Tronko ND, Kostyuchenko NN, Mikosha AS. Effect of o,p'-DDD and Li⁺ on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumour tissues of human adrenal cortex. 2007, *Ukr Biokhim Zh*; 79: 44–49.

64 Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier R. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and b-endorphin. 1981, *Science*; 213: 1394–1397.

65 van Wijk PA, Van Neck JW, Rijnberk A, Croughs RJM, Mol JA. Proliferation of the murine corticotropic tumour cell line AtT20 is affected by hypophysiotrophic hormones, growth factors and glucocorticoids. 1995, *Mol Cell Endocrinol*; 28; 111 (1): 13-9.

66 Lezoualc'h F, Engert S, Berning B, Behl C. Corticotropin-Releasing Hormone Mediated Neuroprotection against Oxidative Stress Is Associated with the Increased Release of Nonamyloidogenic Amyloid b Precursor Protein and with the Suppression of Nuclear Factor- κ B. 2000, *Mol Endocrinol*; 14 (1): 147-159.

67 Libe` R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. 2007, *Endocr Relat Cancer*; 14: 13–28.

68 Scheingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer, Korobkin M, Worden FP. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. 2005, *Endocr Relat Cancer*; 12: 667–680.