



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Sperimentali

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali

Direttore: Prof. Gaetano Thiene

INDIRIZZO: Metodologia Clinica, Scienze Endocrinologiche e Diabetologiche

Coordinatore: Prof. Roberto Vettor

CICLO XXV

ASPETTI DI GENETICA MOLECOLARE E POSSIBILI IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE NEI TUMORI CORTICOSURRENALICI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo : Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Carla Scaroni

Tutor : Prof. Franco Mantero

Dottorando : Beatrice Rubin

INDICE

INDICE	Pag. 1
RIASSUNTO	Pag. 5
ABSTRACT	Pag. 8
INTRODUZIONE	Pag. 11
1. Le ghiandole surrenali	Pag. 11
2. Ipersurrenalismo ed insufficienza surrenalica	Pag. 13
2.1 Iperaldosteronismo primario e Sindrome di Conn	Pag. 13
2.2 Ipercortisolismo e Sindrome di Cushing	Pag. 14
2.3 Ipersecrezione di steroidi sessuali e Sindrome adrenogenitale	Pag. 14
2.4 Insufficienza surrenalica e Morbo di Addison	Pag. 15
3. Tumori corticosurrenalici (ACT)	Pag. 15
3.1 Adenoma corticosurrenalico (ACA)	Pag. 16
3.2 Carcinoma corticosurrenalico (ACC)	Pag. 17
3.2.1 Caratteristiche cliniche del carcinoma corticosurrenalico	Pag. 18
3.2.2 Predisposizione genetica al carcinoma corticosurrenalico	Pag. 18
4. Metodi diagnostici dei tumori corticosurrenalici	Pag. 20
4.1 Profilo ormonale (work-up ormonale)	Pag. 20
4.2 Metodi di Imaging	Pag. 21
4.3 Parametri istopatologici e diagnosi differenziale	Pag. 21
5. Trattamento dei tumori corticosurrenalici	Pag. 24
5.1 Trattamento chirurgico	Pag. 24
5.2 Altre terapie ablativo: terapie radiante, termoablazione con radiofrequenze	Pag. 25
5.3 Terapia adiuvante con Mitotane	Pag. 25
5.4 Chemioterapia citotossica, terapie target e trials clinici	Pag. 26
5.5 Nuove strategie terapeutiche	Pag. 27
6. Tumorigenesi ACT sporadici	Pag. 28
6.1 Geni oncosoppressori e oncogeni coinvolti nella tumorigenesi corticosurrenalica	Pag. 29

6.2 Alterazioni nelle principali vie del segnale	Pag. 32
7. Angiogenesi	Pag. 33
7.1 Famiglia dei fattori di crescita vascolare endoteliali (VEGF)	Pag. 34
7.2 Famiglia dei recettori del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR)	Pag. 37
8. Angiogenesi tumorale	Pag. 40
8.1 Angiogenesi nei tumori della ghiandola surrenale	Pag. 43
8.2 Terapie anti-angiogeniche	Pag. 44
8.3 Molecole anti-VEGF	Pag. 45
9. Sorafenib	Pag. 47
10. Everolimus	Pag. 50
11. Via del segnale delle MAP Chinasi (Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway) nei tumori corticosurrenali	Pag. 52
12. Via del segnale di Wnt/β-catenina (Wnt/β-catenin signaling pathway) nei tumori corticosurrenali	Pag. 54
12.1 Wnt/ β -catenina signaling pathway ed angiogenesi	Pag. 56
12.2 Wnt/ β -catenina signaling pathway ed adesione cellulare	Pag. 58
12.3 XAV939	Pag. 60
SCOPO DELLO STUDIO	Pag. 62
MATERIALI E METODI	Pag. 63
1. Raccolta dei tessuti dai pazienti colpiti da tumori alla ghiandola surrenale	Pag. 63
2. Estrazione acidi nucleici dai campioni biologici corticosurrenali	Pag. 65
2.1 Estrazione DNA	Pag. 65
2.2 Estrazione RNA attraverso RNeasy® Mini Kit (Quiagen)	Pag. 65
2.3 Estrazione RNA tramite TRIZOL	Pag. 66
3. Determinazione concentrazioni acidi nucleici (RNA e DNA) con Nanodrop ND-1000	Pag. 67
4. Valutazione della qualità dell'RNA mediante Agilent 2100 Bioanalyzer	Pag. 68
5. Trattamento dei campioni di RNA con DNAsi	Pag. 69
6. Retrotrascrizione RNA (sintesi cDNA)	Pag. 70

7. Analisi di espressione genica tramite Real-Time PCR	Pag. 71
8. Analisi di espressione genica tramite tecnica di immunohistochimica (IHC)	Pag. 75
9. Colture cellulari di linee cellulari stabilizzate (H295R e SW13) e colture primarie	Pag. 75
9.1 Cellule corticosurrenaliche stabili H295R	Pag. 75
9.2 Cellule stabili SW13	Pag. 75
9.3 Colture cellulari primarie da tumori corticosurrenalici	Pag. 75
10. Composti chimici analizzati <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Pag. 76
11. Analisi di proliferazione cellulare (MTT assay)	Pag. 76
12. Valutazione della morte cellulare programmata per apoptosi	Pag. 78
12.1 Analisi in fluorescenza	Pag. 78
12.2 Analisi in citofluorimetria	Pag. 78
13. Analisi ciclo cellulare attraverso la tecnica citofluorimetrica	Pag. 79
14. Estrazione proteica da cellule e da tessuto	Pag. 79
15. Quantificazione della concentrazione proteica	Pag. 79
16. Westen blot (Immunoblot)	Pag. 80
17. Analisi di Immunoprecipitazione (IP)	Pag. 81
17.1 Soluzioni utilizzate per estrazione proteica, analisi di western blot ed immunoprecipitazione	Pag. 81
18. Trattamenti farmacologici <i>in vivo</i>	Pag. 82
19. Analisi genetica delle vie del segnale di Raf/Ras/ERK/MEK e di Wnt/β-catenina	Pag. 83
19.1 Analisi High Resolution Melting (HRM)	Pag. 83
19.2 Purificazione dei prodotti di amplificazione	Pag. 85
19.3 PCR di sequenza e successiva purificazione	Pag. 85
19.4 Sequenziamento genico	Pag. 86
20. Analisi statistica dei risultati	Pag. 86
 RISULTATI	 Pag. 87
1. Valutazione dell'espressione genica di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 nei tessuti corticosurrenalici in RT-PCR ed IHC	Pag. 87
2. Valutazione dell'espressione genica di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 nelle linee cellulari stabilizzate H295R e SW13	Pag. 88

3. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus sulla proliferazione cellulare di colture cellulari H295R ed SW13	Pag. 89
3.1 Sorafenib: inibizione della proliferazione cellulare	Pag. 89
3.2 Everolimus: inibizione della proliferazione cellulare	Pag. 90
3.3 Associazione dei due farmaci: Sorafenib ed Everolimus	Pag. 90
4. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus in colture cellulari primarie surrenaliche	Pag. 91
5. Valutazione della morte programmata cellulare per apoptosi	Pag. 93
5.1 Valutazione apoptosi attraverso il metodo in fluorescenza	Pag. 93
5.2 Valutazione apoptosi attraverso il metodo citofluorimetrico	Pag. 93
6. Valutazione ciclo cellulare attraverso il metodo citofluorimetrico con ioduro di propidio	Pag. 94
7. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus in vitro sulle pathway intracellulari di PI(3)K/Akt/mTOR e di Raf/MEK/ERK	Pag. 95
8. Trattamento farmacologico di Sorafenib ed Everolimus <i>in vivo</i>	Pag. 97
9. Analisi genetica delle vie del segnale di Raf/Ras/ERK/MEK e di Wnt/β-catenina	Pag. 99
10. Analisi di espressione della via del segnale di Wnt/β-catenina	Pag. 103
10.1 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Real-time PCR	Pag. 103
10.2 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Immunoistochimica (IHC)	Pag. 104
11. Analisi di espressione delle molecole di adesione cellulare (E-caderina ed N-caderina)	Pag. 105
11.1 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Real-time PCR	Pag. 105
11.2 Analisi di espressione attraverso la tecnica Immunoistochimica (IHC)	Pag. 106
12. Correlazione tra l'espressione genica di β-catenina in rapporto a N-caderina e VEGF	Pag. 106
13. Effetto anti-proliferativo di XAV939, farmaco che interagisce nella via del segnale di Wnt/β-catenina	Pag. 108
DISCUSSIONE	Pag. 109
PROSPETTIVE FUTURE	Pag. 115
BIBLIOGRAFIA	Pag. 116

RIASSUNTO

Presupposti dello studio. I più comuni tumori corticali della ghiandola surrenalica (ACT) sono tumori benigni definiti adenomi corticosurrenalici (ACA) con una incidenza stimata di circa 7,3%. I tumori maligni, i carcinomi corticosurrenalici (ACC), sono invece rare neoplasie endocrine, con prognosi infausta ed incidenza di circa 1-2 casi per milione. I trattamenti per l'ACC sono inefficaci nella maggior parte dei casi ed attualmente si basano sull'uso di mitotane (o,p'DDD) con o senza i tradizionali agenti chemioterapici. Poiché le prognosi di ACA o di ACC sono estremamente differenti è importante differenziare queste due tipologie di tumore.

Numerosi tumori attraverso il processo di angiogenesi stimolano la crescita dei vasi ematici dell'ospite. Recentemente è stata osservata una over-espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) negli ACC ed i recettori di VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2) trovati anch'essi sulle cellule tumorali, suggeriscono un possibile effetto autocrino di VEGF per la crescita cellulare.

Il farmaco sorafenib, un inibitore multichinasico, inibisce la fosforilazione di VEGFR-2 ed induce *in vivo* l'arresto della crescita di alcuni tumori. Il farmaco everolimus, analogo della rapamicina, inibisce mTOR coinvolto nella sopravvivenza cellulare e situato valle di VEGFR-2; è inoltre in grado bloccare la produzione di fattori pro-angiogenici in molti tumori neuroendocrini.

Ad oggi, le alterazioni genetiche note che colpiscono gli ACT sono limitate ed inoltre nella tumorigenesi corticosurrenalica sono coinvolte una grande varietà di vie del segnale, in particolar modo la via del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK e la via di Wnt/ β -catenina risultano spesso alterate. Un'alterazione frequentemente riscontrata negli ACT è l'attivazione costitutiva della β -catenina, una molecola multifunzionale coinvolta anche nei processi di adesione cellulare assieme alle caderine (E-caderina ed N-caderina). Le caderine sembrano essere coinvolte nello sviluppo di molti carcinomi, ma le informazioni riguardanti la loro espressione negli ACT è molto limitata.

Scopo. L'obiettivo dello studio è stato quello di: a) valutare l'espressione di VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 nei tessuti surrenalici normali e/o tumorali; b) esaminare l'effetto dei due farmaci, sorafenib ed everolimus, *in vitro* sulla vitalità cellulare, sull'apoptosi e su alcune pathways cellulari in linee stabilizzate (H295R, SW13), in colture primarie di ACT ed *in vivo* in modelli murini xenotrapiantati; c) analizzare la presenza di alterazioni geniche nei componenti chiave della via del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK (studiando i geni *BRAF*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*) e nella via del segnale di Wnt/ β -

catenina (valutando i geni *CTNNB1* e *AXIN-2*) ed indagare l'espressione della β -catenina in relazione alle molecole di adesione cellulare E-caderina ed N-caderina.

Materiali e Metodi. Sono stati raccolti 24 carcinomi corticosurrenali (adrenocortical carcinoma, ACC), 37 adenomi secernenti aldosterone (aldosterone producing adenoma, APA), 28 adenomi secernenti cortisolo (cortisol producing adenoma, CPA), 6 adenomi non secernenti (non-secreting adenoma, NSA) e 8 campioni di surrene normale (normal adrenal, NA). L'espressione genica di VEGF e dei suoi recettori (VEGFR-1 e VEGFR-2) è stata valutata in 63 ACT tramite real-time PCR. Nelle linee cellulari (SW13 e H295R) e nelle colture primarie corticosurrenaliche, attraverso il test MTT è stata osservata la vitalità cellulare incubando con sorafenib ed everolimus in un range di concentrazioni da 10 μ M a 0,1 nM. In microscopia a fluorescenza (TUNEL) e dall'analisi citofluorimetrica (Anessina V) è stato valutato il grado di apoptosi indotto dai farmaci e tramite western blotting è stato analizzato il loro possibile coinvolgimento nelle vie di PI(3)K/Akt/mTOR e di Ras/Raf/MEK/ERK. Gli effetti dei farmaci, da soli o in combinazione, sono stati testati poi *in vivo* in modelli murini di ACC xenotrapiantati con cellule H295R ed SW13. Attraverso l'analisi di high resolution melting (HRM) abbiamo ricercato in 95 ACT la presenza di mutazioni attivanti nei geni *BRAF* (esoni 11 e 15), *H-RAS* (esoni 2 e 3), *N-RAS* (esoni 2 e 3), *K-RAS* (esoni 2 e 3), *CTNNB1* (esone 3), *AXIN2* (esone 7). I campioni aventi curve di melting dubbie o alterate sono stati sottoposti tutti al sequenziamento. Infine, è stata valutata in 68 ACT l'espressione genica di β -catenina, N-caderina ed E-caderina attraverso le tecniche di real-time PCR e di immunohistochimica (IHC).

Risultati. Sia i tessuti corticosurrenali normali che tumorali esprimono VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2. Rispetto ai surreni normali, una significativa over-espressione di VEGF è stata osservata in circa il 65% (12/18) ($P = 0.049$) degli ACC analizzati ed in circa il 61% (20/33) ($P = 0.025$) degli APA. Nella valutazione della vitalità cellulare le cellule SW13 ed H295R rispondono in modo dose-dipendente ai farmaci sorafenib ed everolimus mentre in fluorescenza ed in citofluorimetria è stato osservato un effetto apoptotico. Mediante western, sorafenib induce una completa diminuzione della fosforilazione di Akt, ERK1/2 e P70S6K mentre everolimus, abolisce totalmente la fosforilazione di p-P70S6K. Delle 8 colture primarie sottoposte ai farmaci, 3 carcinomi e 3 adenomi rispondono in modo significativo sia al trattamento con sorafenib che all'everolimus, mentre 2 casi di ACC sono resistenti ad entrambi i farmaci. *In vivo* è stata osservata una significativa riduzione della massa tumorale ed un aumento della sopravvivenza mediana soprattutto nei topi sottoposti al trattamento farmacologico combinato.

Attraverso le indagini in HRM sono state riscontrate alcune alterazioni nei componenti della via del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK: 2 ACC con mutazioni nel gene *BRAF* e 1 APA, 1 CPA e 2 ACC con

mutazioni nel gene *H-RAS*. Per quanto riguarda l'indagine genetica della via del segnale di Wnt/ β -catenina sono state osservate 18 alterazioni nel gene *CTNNB1* (5 APA, 6 CPA, 2 NSA, 5 ACC) ed una sola mutazione nel gene *AXIN2* nelle cellule H295R. In RT-PCR l'espressione di β -catenina è over-espressa in circa 50% degli ACC (12/24) ed in circa il 51% degli ACA (24/47) mentre in IHC circa il 47% degli ACC (7/15) ed il 33% degli ACA (11/33) presenta un notevole accumulo citoplasmatico e/o nucleare di β -catenina. In tutti gli ACT non è stata rilevata l'espressione di E-caderina, mentre per quanto riguarda N-caderina, in RT-PCR circa il 75% degli ACC (18/24) ed il 60% degli ACA (28/47) possiedono una down-regolazione. Risultati simili sono stati ottenuti in IHC in cui il 100% degli ACC (15/15) e il 55% degli ACA (18/33) presentano una down-regolazione di N-caderina.

Conclusioni. I nostri dati sottolineano l'importanza del sistema angiogenico nei tumori corticosurrenali. I nuovi inibitori tirosin-chinasici e di mTOR attualmente usati in alcuni tumori come strategie anti-VEGF potrebbero rappresentare un nuovo strumento terapeutico per i tumori della ghiandola surrenale. L'identificazione quindi di nuovi target molecolari anti-angiogenetici e di target nella via del segnale di Wnt/ β -catenina ha contribuito ad una migliore comprensione ed a un approfondimento della tumorigenesi corticosurrenalica generando le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci mirati (target therapy).

ABSTRACT

Background. The most frequent adrenocortical tumors (ACT) are benign forms defined as adrenocortical adenomas (ACA) with an estimated incidence of about 7.3%. Malignant forms, adrenocortical carcinomas (ACC) are rare endocrine tumors with poor prognosis and incidence of 1-2 cases per million people in the population. Currently ACC treatments are ineffective and substantially are based on the use of mitotane (o,p'DDD) with or without traditional chemotherapeutic agents. Because of dissimilar prognosis of ACA or ACC it is important to differentiate these two forms.

Many tumors stimulate the growth of blood vessels by the angiogenesis process. Recently, vascular endothelial growth factor (VEGF) over-expression in ACC and VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) expression were found on tumor cells; these findings suggest a possible autocrine effect of VEGF for cell growth.

Sorafenib, a multikinase inhibitor, inhibits the phosphorylation of VEGFR-2 and induces *in vivo* tumor growth arrest. Everolimus, a rapamycin derivative, inhibits mTOR, which is involved in cell survival and located downstream to VEGFR-2. It stops production of angiogenic growth factors in several neuroendocrine tumors.

To date few genetic alterations were identified in ACT involving adrenocortical tumorigenesis signaling pathways; in particular the Ras/Raf/MEK/ERK and the Wnt/ β -catenin signaling pathways seem to be often altered. β -catenin constitutive activation is an alteration frequently found in ACT. It is a multifunctional molecule involved in the processes of cell adhesion together with cadherin (E-cadherin and N-cadherin). Cadherins have been implicated in the development of many cancers, but information regarding their expression in the ACT is very limited.

Aim. The objective of this study is: a) to evaluate the expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in normal and tumoral adrenocortical tissues; b) to examine the effect of the two drugs, sorafenib and everolimus, *in vitro* on cellular viability, on apoptosis and on signal pathways of 2 stabilized lines (H295R, SW13) and in ACT primary cultures and *in vivo* in xenografts mouse models; c) to analyze the presence of genetic alterations in key components of the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway (*BRAF*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS* genes) and of Wnt/ β -catenin signaling pathway (*CTNNB1* and *AXIN2* genes) and to investigate the β -catenin expression in relation to the cell adhesion molecules E-cadherin and N-cadherin.

Material and Methods. 24 adrenocortical carcinomas (ACC), 37 aldosterone producing adenoma (APA), 28 cortisol producing adenoma (CPA), 6 non-secreting adenomas (NSA) and 8 normal adrenal gland tissues (NA) were collected. The VEGF and its receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) gene expression was evaluated in 63 ACT by real-time PCR. In cell lines (SW13 and H295R) and in primary ACT cultures, cell viability was observed by incubating sorafenib and everolimus in a range of concentrations from 10 μ M to 0.1 nM by MTT test. By fluorescence microscopy (TUNEL) and flow cytometric analysis (Annexin-V), apoptosis was evaluated; by western blot, the involvement of PI(3)K/Akt/mTOR and in Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways was analyzed. The effects of drugs, alone or in combination, were tested *in vivo* in ACC xenografted models.

By high resolution melting analysis (HRM), mutation analysis was performed on 95 ACT on *BRAF* (exons 11 and 15), *H-RAS* (exons 2 and 3), *N-RAS* (exons 2 and 3), *K-RAS* (exons 2 and 3), *CTNNB1* (exon 3), *AXIN2* (exon 7). Only samples with altered melting curves were sequenced. Finally, by real-time PCR and immunohistochemistry (IHC), β -catenin, N-cadherin and E-cadherin gene expression was evaluated in 68 ACT.

Results. VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 expression was found in both adrenocortical normal and tumoral tissues. Compared to normal adrenal glands, a significant VEGF over-expression was observed in 65% (12/18) ($P = 0.049$) ACC and in 61% (20/33) ($P = 0.025$) APA. In SW13 and H295R cell viability, sorafenib and everolimus showed a dose-dependent response, while by fluorescence (TUNEL) and by flow cytometry (Annexin V) the compounds revealed an apoptotic effect. By western blot, sorafenib induced a complete decrease in Akt, ERK1/2 and p70S6K phosphorylation, while everolimus totally abolished p70S6K phosphorylation. Out of 8 primary cultures, 3 ACC and 3 ACA significantly responded to sorafenib and everolimus treatments. *In vivo* experiment a significant reduction of the tumor mass and an increase in median survival (especially in xenograft subjected to combined treatment) were observed.

In HRM analysis some alterations in key components of the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway were found, i.e. 2 *BRAF* mutations and 4 *H-RAS* mutations. In Wnt/ β -catenin signaling pathway 18 alterations in *CTNNB1* gene (5 APA, 6 CPA, 2 NSA, 5 ACC) and a single mutation in *AXIN2* gene in H295R cells were observed. In RT-PCR β -catenin is over-expressed in approximately 50% of ACC (12/24) and in 51% of ACA (24/47). By IHC a significant accumulation of cytoplasmic and/or nuclear β -catenin has been observed in 47% of ACC (7/15) and 33% of ACA (11/33). In all ACT expression of E-cadherin was not detected. By RT-PCR N-cadherin down-regulation has been found in 75% of ACC (18/24) and in 60% of ACA (28/47). Similar results were obtained by IHC: N-cadherin down-regulation was observed in 100% (15/15) ACC and in 55% (18/33) ACA.

Conclusion. Our data underline the importance of angiogenesis in adrenocortical tumors system. Anti-VEGF strategies, such as new tyrosine kinases and mTOR inhibitors currently used in different tumors, may represent a new therapeutic tool for adrenocortical tumors. The identification of new anti-angiogenic and Wnt/ β -catenin signaling targets has contributed to a better understanding of adrenocortical tumorigenesis and to generate the basis for the development of new targeted drugs (targeted therapy).

INTRODUZIONE

1) Le ghiandole surrenali

Le ghiandole surrenali sono organi di forma piramidale soprarenali e retroperitoneali. Sono formate da uno strato esterno definito corticale, che costituisce circa l'80% di tutta la massa ghiandolare, e da uno strato interno definito midollare. La ghiandola surrenale è perciò essenzialmente formata da due porzioni anatomicamente e funzionalmente distinte (Wood MA et al., 2011).

La **porzione corticale** della ghiandola surrenalica è composta da tre regioni funzionalmente distinte: la zona glomerulosa (ZG), che secerne mineralcorticoidi (aldosterone), la zona fascicolata (ZF), secernente glucocorticoidi (cortisolo) e la zona reticolare (ZR), che secerne steroidi sessuali: androgeni surrenalici, deidroepiandrosterone (DHEA) e DHEA-sulfate. Ogni zona è regolata da diversi fattori circolanti che includono l'angiotensina II (Ang II) ed il potassio (K^+) per la zona glomerulosa, l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) per la zona fascicolata e l'ACTH più altri fattori non ancora determinati per la zona reticolare (**Figura 1**) (Wang T et al., 2012). Ogni zona possiede un diverso pattern di enzimi metabolizzanti steroidi che produce una espressione ormonale diversificata. Purtroppo i meccanismi molecolari alla base dell'espressione zona-specifica non sono ancora perfettamente noti (McNicol AM, 2008).

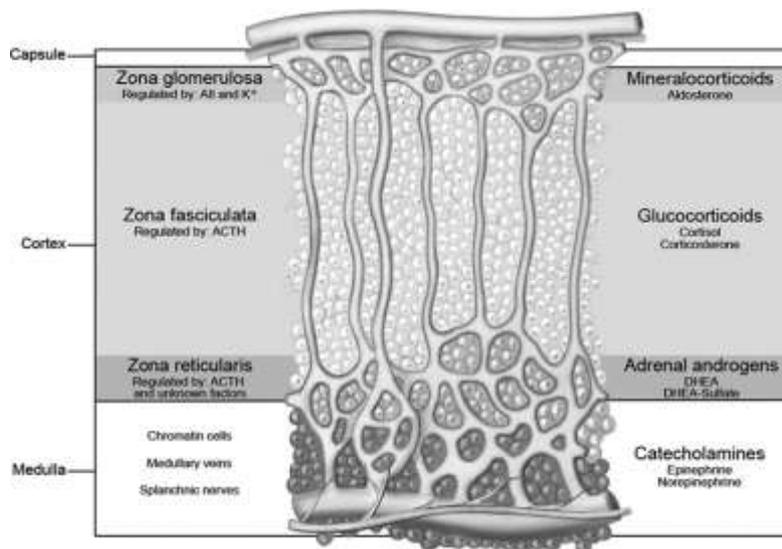


Figura 1. La corteccia surrenalica è suddivisa in tre zone istologicamente e funzionalmente distinte. La zona glomerulosa sintetizza mineralcorticoidi; la zona fascicolata produce glucocorticoidi e la zona reticolare secerne ormoni sessuali surrenalici (Wang T et al., 2012).

Le tre regioni corticosurrenaliche possiedono tutte una diversa distribuzione cellulare ed una importante quantità di mitocondri, distinti in base alla forma delle creste mitocondriali. Le cellule della zona glomerulosa, regione sottile con cellule colonnari distribuite a forma di arco, sono caratterizzate da una notevole quantità di mitocondri e di apparati del Golgi, mentre le cellule della zona fascicolata sono disposte in colonne lineari di cellule poliedriche separate da capillari e possiedono molti accumuli lipidici citoplasmatici, mitocondri con creste vescicolari ed abbondanti reticoli endoplasmatici lisci. La zona reticolare, composta da cellule poliedriche distribuite a forma di grappolo, è caratterizzata dalla presenza di una elevata quantità di lisosomi nel citoplasma (McNicol AM, 2008; Rosol TJ et al., 2001).

La corteccia surrenalica e le gonadi sono i maggiori organi di produzione steroidea. La porzione corticale del surrene è responsabile della produzione di mineralcorticoidi e di glucocorticoidi a partire dal colesterolo, un ormone steroideo, il quale ha un nucleo steroideo formato da 17 atomi di carbonio (**Figura 2**). Il colesterolo è convertito in ormoni steroidei intermedi ed in ormoni maturi attraverso gli enzimi della famiglia del citocromo P-450 presenti nei mitocondri e nel reticolo citoplasmatico liscio. La secrezione ormonale è immediata a causa della solubilità lipidica e della mancanza di un sito di deposito nella corteccia surrenalica (Rosol TJ et al., 2001).

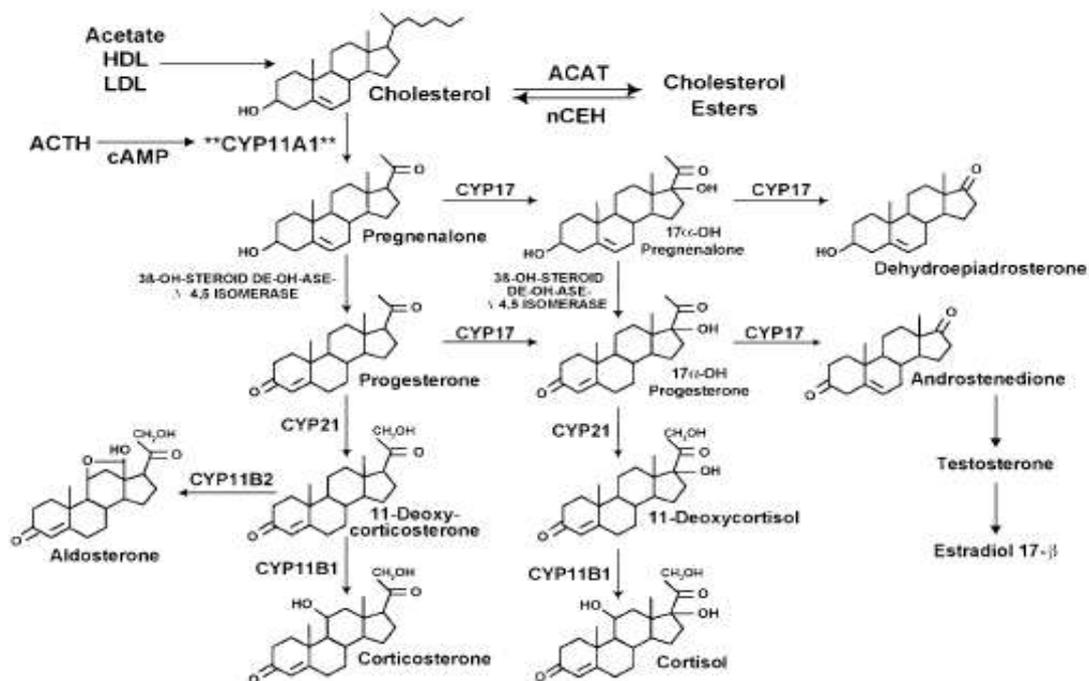


Figura 2. La via di biosintesi degli ormoni steroidei surrenalici umani illustra i tre maggiori prodotti della corteccia surrenalica: aldosterone, cortisolo e androgeni surrenalici (DHEA, DHEA-S) e gli enzimi che sintetizzano gli ormoni steroidei (Rosol TJ et al., 2001).

La **porzione midollare** della ghiandola surrenalica possiede cellule derivate durante l'embriogenesi dalla cresta neurale, mentre la porzione corticale ha origine mesodermica. Le cellule midollari, chiamate cellule cromaffini secernono catecolamine, tra cui epinefrina (80%), norepinefrina (19%) e dopamina (1%). Sono prodotti inoltre altri peptidi quali met-enkefalina, sostanza P, neurotensina, neuropeptide Y e cromogranina A. La secrezione nel sangue di questi ormoni è controllata prevalentemente da stimoli nervosi, in risposta all'acetilcolina ed agli ioni calcio (*McNicol AM, 2008).

2) Ipersurrenalismo ed insufficienza surrenalica

Tre classiche sindromi cliniche sono associate con l'ipersecrezione di steroidi da parte della corteccia surrenalica: l'iperaldosteronismo primario (sindrome di Conn), l'ipercortisolismo (sindrome di Cushing) e l'ipersecrezione di ormoni sessuali (sindrome adrenogenitale) (Beuschlein F et al., 2006). L'insufficienza surrenalica invece è una sindrome clinica conseguente alla distruzione o al non perfetto funzionamento della corteccia surrenalica. L'insufficienza può essere primitiva, dovuta a una disfunzione o distruzione del surrene, o secondaria, cioè dipendente da una distruzione o disfunzione dell'ipofisi o del diencefalo con conseguente disfunzione del surrene (Betterle C et al., manuale AIPAd).

2.1 Iperaldosteronismo primario e Sindrome di Conn

L'iperaldosteronismo primario è la più comune causa di ipertensione secondaria ed è presente in circa l'8-10% dei pazienti con ipertensione (Gomez-Sanchez CE et al., 2010; Cicala MV et al., 2006). L'aldosterone nell'organismo è indispensabile per ripristinare l'omeostasi dei fluidi corporei, il bilancio elettrolitico e la pressione sanguigna. La secrezione di aldosterone dipende da diversi fattori, come l'aumento delle concentrazioni di potassio plasmatico, l'attivazione del sistema renina-angiotensina, dalla concentrazione dell'ormone adrenocorticotropo e dalla diminuzione delle concentrazioni di sodio plasmatico (Bar-Lev A et al., 2012). In particolari condizioni di riduzione di volume sanguigno e quindi di abbassamento di pressione, viene liberata la renina da alcune cellule dell'apparato iuxtaglomerulare, che agisce a sua volta su una proteina plasmatica prodotta dal fegato, l'angiotensinogeno, che si trasforma in angiotensina I. Quest'ultima a livello del polmone si trasforma ad opera dell'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) in angiotensina II, che agisce sulla ghiandola surrenale determinando un aumento della secrezione e della liberazione dell'ormone

aldosterone, promuovendo quindi il riassorbimento di sodio e acqua nei tubuli distali del rene, provocando un successivo aumento della pressione arteriosa (Samavat S et al., 2011).

Nell'iperaldosteronismo primario la secrezione di aldosterone è eccessiva ed indipendente dai normali meccanismi di regolazione. È stato descritto per la prima volta nel 1955 da Jerome Conn che scoprì essere prodotto da adenomi secernenti aldosterone con ipertensione, ipopotassiemia e ipernatriemia (Conn JW, 1955). Oggi, le più comuni cause di iperaldosteronismo primario conosciute sono gli adenomi unilaterali secernenti aldosterone (APA) e le iperplasie surrenaliche bilaterali (IAH; iperaldosteronismo idiopatico), mentre i carcinomi corticosurrenali secernenti mineralcorticoidi sono estremamente rari (Zennaro MC et al., 2011; Choi M et al., 2011).

2.2 Ipercortisolismo e Sindrome di Cushing

La sindrome di Cushing, scoperta da Harvey Williams Cushing nel 1932, è causata da una alterata ed aumentata produzione di cortisolo, dovuta ad un tumore che colpisce la porzione anteriore dell'ipofisi o da un tumore surrenalico in grado di secernere glucocorticoidi in notevole quantità (Ellis H et al., 2012).

Tra i pazienti con la sindrome di Cushing, circa il 15-20% possiede un tumore corticosurrenalico, mentre il rimanente 85% è colpito da un tumore ipofisario in grado di secernere ACTH e di stimolare l'espressione di cortisolo dalle ghiandole surrenali. I tumori corticosurrenali secernenti cortisolo sono equamente suddivisi tra adenomi benigni e carcinomi, sono frequenti durante la quarta o quinta decade di vita e la coesistenza della virilizzazione nelle pazienti donne è comune nei carcinomi. Le donne sono quattro volte più colpite rispetto agli uomini (McNicol AM, 2008). I pazienti possiedono caratteristici segni clinici quali obesità del tronco, strie, aumento di peso, debolezza muscolare, ipertensione, iperglicemia, diabete mellito ed intolleranza al glucosio (Beushchlein F et al., 2006).

2.3 Ipersecrezione di steroidi sessuali e Sindrome adrenogenitale

L'eccessiva produzione di ormoni sessuali steroidei può causare virilizzazione, femminilizzazione o pubertà precoce, in base agli ormoni secreti, all'età o al sesso del paziente. Nel soggetto femminile se venissero prodotti ormoni androgeni a effetto virilizzante si potrebbe sviluppare irsutismo, amenorrea, infertilità ed aumento delle masse muscolari. Negli uomini invece, qualora venissero prodotti estrogeni si potrebbe avere una sindrome femminilizzante con la comparsa di

ginecomastia, atrofia testicolare ed impotenza. Qualora la produzione di questi ormoni avvenisse in giovane età, la pubertà sarebbe stimolata precocemente, con uno sviluppo prematuro dovuto ad una rapida crescita corporea associata alla comparsa di peli pubici ed al viso, acne, ingrossamento dei genitali ed alla manifestazione di tutti i caratteri sessuali secondari (Robbins SL et al., 2005).

Inoltre, i tumori corticosurrenali possono produrre steroidi sessuali, prevalentemente androgeni e comunemente in associazione con la produzione di cortisolo (sindrome mista di Cushing) (Beushchlein F et al., 2006).

2.4 Insufficienza surrenalica e Morbo di Addison

L'insufficienza surrenalica o l'ipofunzione surrenalica può essere causata sia da una patologia surrenalica primitiva (iposurrenalismo primitivo) sia da una ridotta stimolazione dei surreni a causa di un deficit di ACTH (iposurrenalismo secondario). Le tipologie dell'insufficienza surrenalica possono essere classificate nei seguenti gruppi: insufficienza surrenalica primitiva acuta (crisi surrenale), insufficienza surrenalica primitiva cronica (malattia di Addison) ed insufficienza surrenalica secondaria (Robbins SL et al., 2005).

Il morbo di Addison, descritto per la prima volta da Thomas Addison nel 1855 è una patologia molto rara; dati epidemiologici recenti riportano che in Europa vi sia una frequenza tra i 100-140 casi per milione di abitanti, con 6 nuovi casi ogni milione di abitanti per anno. La causa più comune di insufficienza surrenalica primaria è la forma autoimmune che corrisponde al 70-80% dei casi, mentre l'insufficienza surrenalica su base tubercolare colpisce circa il 15-20% dei casi (Betterle C et al., manuale AIPAd). Esistono molte altre cause che possono provocare il morbo di Addison primario, ma che costituiscono nel loro insieme solo il 5% circa di tutti i casi (infezioni fungine, HIV, CMV, sifilide, neoplasie primitive o metastatiche, disordini metabolici, disordini genetici) (*Betterle C et al., 2003; §Betterle C et al., 2011).

3) Tumori corticosurrenali (ACT)

La maggior parte delle masse surrenaliche è clinicamente silente ed è di solito ritrovata come reperto occasionale durante l'esame autoptico o nel corso di indagini strumentali svolte per tutt'altre cause, vengono perciò definite **incidentalomi surrenalici** (Cicala MV et al., 2006; Shirodkar M et al., 2008).

Le neoplasie corticosurrenaliche riscontrate accidentalmente nella routine clinica hanno una prevalenza di 5-7% nelle analisi di imaging addominali e di circa 10% negli esami autoptici (Song JH et al., 2008; Grumbach MM et al., 2003).

Il termine incidentaloma surrenalico è entrato a far parte del lessico medico alla luce dei progressi della diagnostica per immagini, che ha permesso la scoperta di masse surrenaliche in individui asintomatici o in soggetti con una sintomatologia non direttamente correlata ad una patologia surrenalica. Anche i tumori della porzione corticale o midollare del surrene, iperplasie o tumori metastatici come pure patologie non tumorali: ascesso, amiloidosi, sarcoidosi, possono essere scoperte accidentalmente (Robbins SL et al., 2005; Shirodkar M et al., 2008).

I tumori benigni della ghiandola surrenale sono comuni; l'incidenza stimata è del 7,3%, mentre i tumori maligni (carcinomi corticosurrenalici) sono estremamente rari, in quanto sono circa lo 0.02% di tutti i tumori riscontrati annualmente. Poiché le prognosi di adenoma corticosurrenalico (ACA) o di carcinoma (ACC) sono estremamente differenti è importante differenziare queste due tipologie di tumore (Soon PS et al., 2008).

3.1 Adenoma corticosurrenalico (ACA)

Gli adenomi corticosurrenalici rappresentano circa l'80% di tutte le neoplasie surrenaliche. Possono produrre ipersecrezione (ipercortisolismo nella sindrome di Cushing ed eccesso da mineralcorticoidi nella sindrome di Conn) oppure essere non funzionanti (Vezzosi D et al., 2010).

Le forme benigne bilaterali di ACT non sono frequenti e vengono osservate in rare situazioni, come ad esempio la malattia nodulare pigmentata primitiva della corteccia surrenalica (primary pigmented nodular adrenocortical disease, PPNAD) e l'iperplasia macro-nodulare ACTH-indipendente surrenalica (adrenocorticotropic-hormone (ACTH)-independent macronodular adrenocortical disease, AIMAH) (Bourdeau I et al., 2007; Costa MH et al., 2007).

Il tipico adenoma corticosurrenalico è una lesione nodulare ben circoscritta che può misurare fino a 2,5 cm di diametro. Contrariamente agli adenomi funzionanti, che si associano ad atrofia della zona corticale adiacente, gli adenomi non-funzionanti presentano uno spessore normale. Al taglio, gli adenomi possiedono un colore dal giallo al giallo-brunastro, per la presenza di lipidi all'interno delle cellule tumorali (*McNicol AM, 2008; Tissier F, 2010).

Dal punto di vista microscopico, gli adenomi sono composti da cellule simili a quelle di una normale ghiandola surrenalica. I nuclei tendono ad essere piccoli, sebbene possa essere riscontrato un

certo grado di polimorfismo addirittura nelle lesioni benigne (“atipia endocrina”). Il citoplasma delle cellule neoplastiche può essere da eosinofilo a vacuolato, a seconda del loro contenuto lipidico mentre l’attività mitotica è generalmente poco rilevante (Robbins SL et al., 2005).

3.2 Carcinoma corticosurrenalico (ACC)

Il carcinoma corticosurrenalico è una rara neoplasia endocrina, altamente maligna, che rappresenta circa lo 0,02% di tutti i tumori riscontrati annualmente. L’incidenza è di 1-2 casi per milione di persone per anno nella popolazione e possiede una distribuzione bimodale, con una incidenza che prevale nei bambini al di sotto dei 5 anni di età oppure negli adulti durante la quarta o quinta decade della loro vita (Roman S, 2006; Fassnacht M et al., 2009). Il carcinoma colpisce più frequentemente le donne (ratio 1.5/1) e studi retrospettivi che combinano la terapia chirurgica assieme alla terapia medica indicano un tasso di sopravvivenza medio a 5 anni che varia tra il 16 ed il 38% (Tissier F, 2010).

Al taglio, i carcinomi surrenalici sono tipicamente variegati con aree mal definite che contengono all’interno zone necrotiche, emorragiche e cistiche. È spesso presente invasione delle strutture contigue, incluse la vena surrenalica e la vena cava inferiore. Microscopicamente, i carcinomi surrenalici possono essere composti da cellule ben differenziate, simili a quelle osservate negli adenomi, oppure bizzarre e mostruosamente giganti, difficilmente distinguibili da quelle di un carcinoma indifferenziato che ha metastatizzato al surrene. Tra questi estremi si possono osservare tumori con un moderato grado di anaplasia, alcuni composti in prevalenza da cellule fusate (Robbins SL et al., 2005).

I carcinomi extrasurrenalici, in particolare quelli di origine broncogena, possono dare metastasi ai surreni e può essere estremamente difficile differenziarli da tumori surrenalici primitivi. Nei carcinomi corticosurrenalici sono comuni le metastasi tanto per via linfatica ai linfonodi regionali e periaortici, quanto per via ematica ai polmoni e ad altri visceri, come fegato o retroperitoneo; le metastasi ossee sono invece alquanto rare (Beuschlein F et al., 2006; Robbins SL et al., 2005).

3.2.1 Caratteristiche cliniche del carcinoma corticosurrenalico

Gli adenomi benigni mantengono il profilo di espressione degli enzimi steroidei della zona da cui prendono origine mentre la steroidogenesi degli ACC è caratterizzata dalla secrezione di vari

precursori steroidei sebbene la presenza di questi precursori potrebbe non essere associata a specifici sintomi clinici.

Circa il 60% degli ACC è ormonalmente attivo e mostra segni e sintomi clinici che eventualmente contribuiscono ad anticipare la diagnosi di carcinoma (*Fassnacht M et al., 2011). Di questi, il 45-75% dei pazienti con carcinoma funzionante presentano la sindrome di Cushing, i cui sintomi riscontrati sono: atrofia della pelle, debolezza muscolare, iperglicemia, ipertensione e disturbi psichiatrici. Altre forme di ipersecrezione ormonale meno frequenti includono virilizzazione (tumori che producono androgeni), femminilizzazione (tumori secernenti estrogeni) e l'iperaldosteronismo (tumori secernenti aldosterone). Possono essere espressi anche ormoni multipli in un singolo tumore, portando così ad un quadro clinico misto, come ad esempio la sindrome di Cushing associata alla virilizzazione. Nei bambini, vi è la tendenza ad avere una sindrome da eccesso ormonale, e la virilizzazione predomina nei pazienti in questa fase di età (Kirschner LS et al., 2002).

I pazienti che possiedono ACC ormonalmente inattivo, quindi non secernente ormoni, di solito presentano sintomi relativi alla presenza della massa tumorale, come pesantezza addominale, dolore, lombalgia legata all'effetto della massa, debolezza generale, anoressia, calo ponderale, nausea e vomito (Patalano A et al., 2009).

3.2.2 Predisposizione genetica al carcinoma corticosurrenalico

La predisposizione al carcinoma corticosurrenalico è associato ad alcune sindromi familiari di cancro, come ad esempio la sindrome Li-Fraumeni, la sindrome Beckwith-Wiedemann, il complesso di Carney, la sindrome Gardner, la sindrome da neoplasie endocrine multiple (MEN-1) e l'iperplasia surrenalica congenita (**Tabella 1**). Inoltre l'inattivazione di geni oncosoppressori e mutazioni attivanti oncogeni sono sia responsabili di queste sindromi familiari e sia presenti come mutazioni somatiche nei casi di ACC sporadico.

- La **sindrome Li-Fraumeni (LFS)** è prodotta da una mutazione germinale del gene *TP53* (17p13.1) (Li FP et al., 1969). La mutazione viene ereditata in modo autosomico dominante ed è presente in circa il 70% dei soggetti; produce l'inattivazione della proteina p53, che non sarà più in grado di arrestare il ciclo cellulare, riparare il DNA ed innescare il processo di apoptosi in risposta a gravi danni del DNA (Hisada M et al., 1998). L'ACC è presente in circa il 3-4% dei pazienti e si manifesta di solito prima dei 20 anni di età assieme ad altre neoplasie, quali sarcomi del tessuto molle, osteosarcomi, tumori alla mammella ed al cervello, leucemie.

- Nella **sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS)** esiste un difetto dell'imprinting genomico del locus cromosomico 11p15. I geni che appartengono a questa regione sono il fattore di crescita insulinico di tipo 2 (insulin-like growth factor 2, *IGF-2*), l'inibitore chinasi ciclina dipendente 1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, *CDKN1C*, *p57^{kip2}*) e il gene *H19*. I pazienti con questa sindrome hanno una perdita del locus materno con una duplicazione del locus paterno, questo produrrà un'overespressione di *IGF-2* ed una diminuzione di *p57^{kip2}* e *H19* in quanto *IGF-2* è espresso dall'allele paterno e gli altri due geni vengono espressi dall'allele materno (Maher ER et al., 2000). Il 5% dei pazienti con la sindrome di Beckwith-Wiedemann sviluppa ACC ed altri tumori come il neuroblastoma, l'epatoblastoma e il rabdomiosarcoma.
- Il **complesso di Carney (CNC)** è una rara malattia prodotta da mutazioni inattivanti la subunità regolatoria della proteina chinasi A (*PRKARIA*) (Carney JA et al., 1986). I pazienti sviluppano tumori corticosurrenali nodulari pigmentati con ipercortisolismo (PPNAD), anormale pigmentazione della pelle, mixomi cardiaci e altre neoplasie endocrine (Bertherat J et al., 2009).
- La **sindrome di Gardner** è un disordine autosomico dominante che si manifesta con polipi gastrointestinali, osteomi, tumori del tessuto molle, cisti epidermiche e con l'alto rischio di sviluppare il carcinoma corticosurrenalico. L'attivazione della via del segnale di Wnt, che produrrà un accumulo citoplasmatico e nucleare della β -catenina, è implicata nella patogenesi del carcinoma colon-rettale, e si ritiene che questa pathway contribuisca allo sviluppo del carcinoma corticosurrenalico (Jain M et al., 2012).
- La **sindrome di Wermer o da neoplasie endocrine multiple (MEN-1)** è una sindrome autosomica dominante causata da mutazioni attivanti il gene *MEN-1* localizzato nella regione cromosomica 11q13. I pazienti con questa sindrome sviluppano tumori dell'ipofisi, alle paratiroidi, e tumori pancreatici neuroendocrini (Barzon L et al., 2001). Inoltre hanno un rischio maggiore di andare incontro a lipomi, angiomi e tumori corticosurrenali (55%) mentre i carcinomi corticosurrenali sono rari.
- L'**iperplasia surrenalica congenita (CAH)** è una malattia autosomica recessiva causata da una deficienza enzimatica nella via di sintesi del cortisolo. L'enzima 21-idrossilasi, il quale è prodotto dal citocromo P450, famiglia 21, sottofamiglia B (*CYP21B*), è mancante. La perdita di questo enzima comporta una stimolazione compensativa della corteccia surrenalica da parte dell'ormone corticotropo e dell'ormone ACTH con conseguente iperplasia surrenalica,

umentata produzione dei precursori del cortisolo e generazione di alti livelli di ormoni androgeni. Tutti i pazienti affetti da questa patologia possiedono una iperplasia surrenalica, e circa l'82% sviluppa un tumore corticosurrenalico (Merke DP et al., 2005).

Tabella 1. Riassunto delle principali sindromi tumorali familiari associate a tumori corticosurrenalici e i geni/loci cromosomici coinvolti nella tumorigenesi (Soon PS et al., 2008).

Table 1. Summary of hereditary tumor syndromes associated with ACTs			
Hereditary tumor syndrome	Gene (chromosomal locus)	Manifestation of tumor syndrome	Prevalence of ACTs
Li-Fraumeni syndrome	<i>TP53</i> (17p13), <i>hCHK2</i> (22q12.1), 1q23	Soft tissue sarcoma, osteosarcoma, breast cancer, brain tumor, leukemia, ACC	ACC, 3%–4%
Beckwith-Wiedemann syndrome	<i>IGF2</i> , <i>H19</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>KCNQ1</i> (11p15)	Exomphalos, macroglossia, gigantism, ACC, nephroblastoma, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma	ACC, 5%
Carney complex	<i>PRKARIA</i> (17q23-q24) 2p16	Cardiac, endocrine, cutaneous, and neural myxomatous tumors, and pigmented lesions of the skin and mucosa	PPNAD, 90%–100%
Multiple endocrine neoplasia 1	<i>MEN1</i> (11q13)	Parathyroid, pancreatic islet cell, anterior pituitary and ACTs	ACT, 55%; ACC, rare
Congenital adrenal hyperplasia	<i>CYP21B</i> (6p21.3)—most common, <i>CYP11B</i> , <i>CYP17A</i> , <i>HSD3B2</i>	Adrenal hyperplasia, virilization, salt-wasting	Adrenal tumors, 82%; hyperplasia, 100%

Abbreviations: ACA, adrenocortical adenoma; ACC, adrenocortical carcinoma; ACT, adrenocortical tumor; PPNAD, primary pigmented nodular adrenocortical disease.

4) Metodi diagnostici dei tumori corticosurrenalici

4.1 Profilo ormonale (work-up ormonale)

L'attenta indagine ormonale eseguita in fase pre-operatoria è fondamentale per le seguenti motivazioni: (1) per poter stabilire con precisione l'origine corticosurrenalica del tumore; (2) per indicare la corretta entità della lesione (ad esempio, la co-secrezione di cortisolo ed ormoni androgeni, la secrezione di precursori steroidei o estrogeni negli uomini sono indici concreti di malignità); (3) per stabilire la corretta terapia: se un tumore con eccessiva ed autonoma secrezione ormonale di cortisolo non è diagnosticato in partenza, la completa rimozione del tumore potrebbe portare nel tempo ad una grave insufficienza surrenalica; (4) per monitorare la malattia: gli elevati livelli ormonali presenti nelle fasi che precedono la chirurgia possono servire come marker tumorali durante il follow-up (Fassnacht M et al., 2009).

4.2 Metodi di Imaging

Le lesioni più comuni riscontrate nelle analisi di imaging sono gli adenomi non secernenti (circa il 36%-94%) mentre i tumori funzionalmente attivi o i tumori maligni sono meno comuni. Accurate indagini radiologiche sono necessarie per formulare una appropriata diagnosi e per differenziare le neoplasie benigne dalle neoplasie maligne (Low G et al., 2012).

Esistono importanti tecniche di indagine nella caratterizzazione delle masse surrenaliche:

- **Tomografia computerizzata (CT).** Indagine di routine dell'addome e della pelvi, strumento utile impiegato per distinguere adenomi, carcinomi, feocromocitomi ed individuare metastasi (Allolio B et al., 2006). Molto importante per determinare le relazioni con gli organi adiacenti e stabilire i margini di resezione (Lafemina J et al., 2012).
- **Risonanza magnetica nucleare (MRI).** Utilizzata per rilevare il contenuto lipidico di un organo, è un metodo molto sensibile per differenziare l'adenoma dal carcinoma, specialmente per analizzare le piccole lesioni inferiori ai 5 cm (Roman S, 2006).
- **Scintigrafia con iodocolesterolo.** L'utilizzo di ¹³¹I-6-beta-iodo-methyl-norcholesterol (NP-59) ha reso possibile l'identificazione di tumori benigni corticosurrenalici.
- **Positron emission tomography (PET).** Si riscontra un alto assorbimento di [18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose (18F-FDG) da parte dei tumori surrenalici maligni rispetto agli altri tumori (Tenenbaum F et al., 2004).
- **¹¹C-metomidate (MTO)** (marcatore dell'enzima 11β-idrossilasi). La tecnica che si basa sull'utilizzo di tale composto permette la distinzione dei tumori della corticale del surrene da quelli non corticali, ma non distingue le lesioni maligne da quelle benigne (Zettinig G et al., 2004).
- **Ultrasonography (USG).** Tecnica utile per monitorare la crescita di una massa surrenalica nel tempo; con lo sviluppo dell'indagine in tre o quattro dimensioni è possibile osservare la distribuzione dei vasi del tumore e l'infiltrazione ad organi adiacenti.

4.3 Parametri istopatologici e diagnosi differenziale

La diagnosi di tumore corticosurrenalico benigno o maligno è confermata dall'anatomopatologo, attraverso il **punteggio di Weiss (Weiss score)** che varia da 0 a 9 in base a vari criteri come per esempio la morfologia cellulare, la proliferazione e l'invasività (**Tabella 2**).

Questo sistema istopatologico coinvolge nove criteri: tre criteri riguardano la struttura del tumore (bassa percentuale di cellule chiare, necrosi, diffusa architettura del tumore), tre la citologia (alto tasso di mitosi, mitosi atipiche, alto grado nucleare) e tre sono criteri di invasione (sinusoidale, capsulare e venosa). La presenza di uno di questi criteri dà origine ad un punteggio di 1, quindi un valore totale minore o uguale a 2 è tipicamente associato ad un adenoma, mentre un punteggio maggiore o uguale a 3 ad un tumore maligno (Weiss LM, 1984).

Tabella 2. Sistema di punteggio Weiss proposto per eseguire correttamente la diagnosi differenziale tra adenoma e carcinoma corticosurrenalico. La presenza di 3 o più criteri è indice di malignità (Tissier F, 2010).

Histological criteria	Weight of criteria	
	0	1
Nuclear grade ^a	1 and 2	3 and 4
Mitoses	≤5 for 50 fields ×400	≥6 for 50 fields ×400
Atypical mitoses	No	Yes
Clear cells	>25%	≤25%
Diffuse architecture	≤33% surface	>33% surface
Confluent necrosis	No	Yes
Venous invasion	No	Yes
Sinusoidal invasion	No	Yes
Capsular infiltration	No	Yes

^a According to Fuhrman criteria⁷⁰: grade 1 (round nuclei, homogenous, small size, no nucleoli), grade 2 (nuclei slightly irregular, more voluminous, conspicuous nucleoli at x400), grade 3 (irregular nuclei, voluminous nucleoli at x100), grade 4 (idem grade 3 with monstrous cells very irregular nuclei).

Anche se la specificità dello Weiss score è del 96% con una sensibilità del 100%, l'osservazione di alcuni criteri come ad esempio l'architettura complessa, il grado nucleare, l'invasione sinusoidale e l'invasione venosa (angiogenesi) non è però così precisa; esistono delle limitazioni ed una diagnosi accurata dipende notevolmente dall'esperienza dell'anatomopatologo. In questo modo il Weiss score, anche se applicato correttamente, può non essere infallibile. Per ovviare a queste limitazioni, è indispensabile lo sviluppo di nuovi marker molecolari e nuovi strumenti di diagnosi (Soon PS et al., 2008).

La stadiazione McFarlane, modificata da Sullivan e nel 2008 migliorata dall'European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) (**Figura 3 A**) definisce:

- stadio I e II: un tumore localizzato rispettivamente minore o maggiore di 5 cm;
- stadio III: un tumore infiltrante, capace di invadere organi adiacenti, produrre trombi tumorali nella vena cava o nella vena renale, possedere linfonodi positivi;
- stadio IV: un tumore con le caratteristiche dello stadio III in grado di dare metastasi lontane.

La **prognosi** di ACC è infausta ed il fattore prognostico per eccellenza è l'estensione del tumore. La sopravvivenza media a 5 anni varia tra il 37% ed il 47% ma la completa rimozione della massa tumorale e lo stadio del tumore alla diagnosi sono i più importanti fattori prognostici in grado di alterare la sopravvivenza (**Figura 3 B**) (*Fassnacht M et al., 2011).

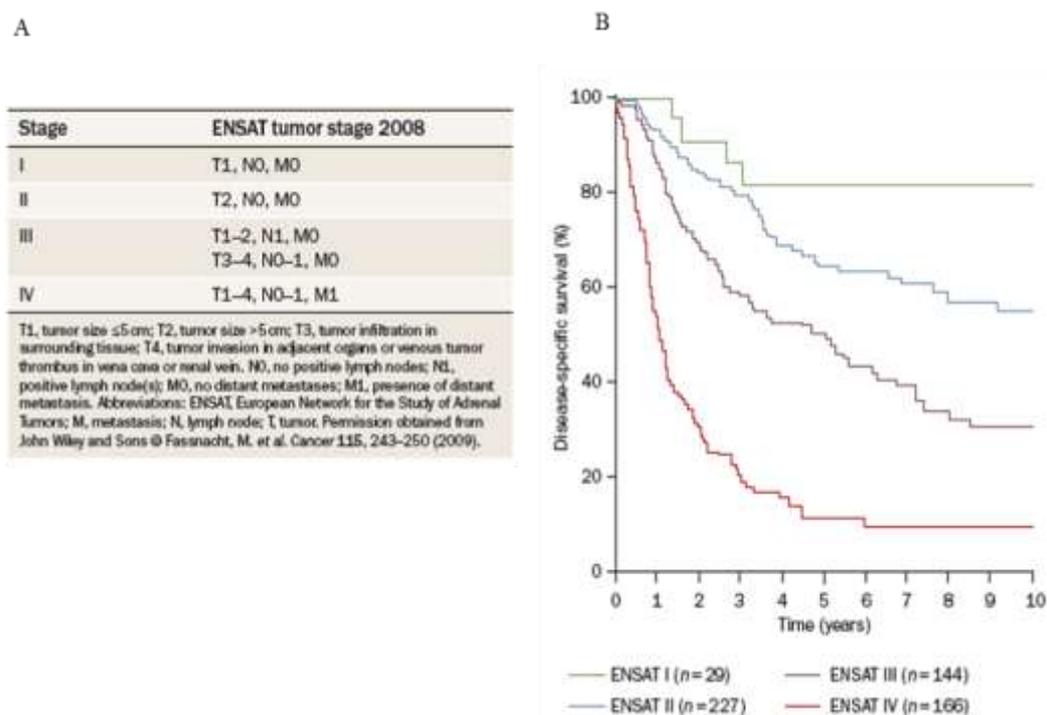


Figura 3. Carcinoma corticosurrenalico (ACC). (A) Classificazione degli stadi I-IV stabiliti dall'European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) nel 2008. (B) Dati di follow-up di 566 pazienti presenti nel registro tedesco dei carcinomi corticosurrenalici che indicano la sopravvivenza libera da malattia calcolata in base allo stadio dell'ACC (*Fassnacht M et al., 2011).

Per migliorare la **diagnosi** di carcinoma corticosurrenalico potrebbero inoltre essere aggiunti marker molecolari (perdita di eterozigotà (LOH) in posizione 17p13 ed elevata espressione di IGF-II) o immunocistochimici (ki67) (Assié G et al., 2010).

L'immunoistochimica della ciclina E o di Ki67, che sono aumentate nei tumori corticosurrenali maligni, potrebbe essere un ulteriore ed efficace strumento di diagnosi (Patalano A et al., 2009).

Per fare una **diagnosi differenziale** di ACC rispetto ad altri tipi di tumore come i carcinomi epatocellulari (HCC), i carcinomi cellulari renali (RCC), i melanomi ed i feocromocitomi si utilizzano nella pratica di immunoistochimica i marcatori melan-A, cromogranina A e sinaptofisina. L'anticorpo D11 invece è fondamentale per la distinzione degli ACT in quanto ha dimostrato immunoreattività per inhibin- α . Immunopositività per SF-1 e DAX-1, fattori nucleari importanti per la steroidogenesi, sono state recentemente riportate in letteratura, ma devono ancora entrare nella pratica diagnostica. Gli ACC possiedono una debole o assente reattività per le citocheratine e sono negativi per l'antigene epiteliale di membrana (EMA); RCC è di solito positivo per entrambi mentre l'HCC può mostrare positività per α -fetoproteina e α 1-antitripsina. I carcinomi corticosurrenali inoltre possono dare immunopositività ai marker neuroendocrini generali come la sinaptofisina, perciò la cromogranina A è l'unico marcatore in grado di discriminare in modo accurato l'ACC dal feocromocitoma (McNicol AM, 2008).

5) Trattamento dei tumori corticosurrenali

5.1 Trattamento chirurgico

La completa **rimozione chirurgica** del tumore e dell'intera ghiandola surrenalica è attualmente l'unica valida soluzione per la cura dei tumori surrenali e del carcinoma, mentre la radioterapia è raramente efficace per controllare la crescita del tumore (Allolio B et al., 2006; Roman S et al., 2006). La completa resezione del tumore è associata ad una migliore prognosi e la rimozione delle metastasi, in particolar modo delle metastasi ossee, è indicata per ridurre il rischio di fratture, o in caso di localizzazione spinale, per ridurre i sintomi neurologici (Libè R et al., 2007).

La chirurgia laparoscopica, ovvero la surrenectomia mini-invasiva, è considerata una valida operazione chirurgica dei tumori benigni di piccole dimensioni (diametro inferiore ai 6 cm), mentre i carcinomi corticosurrenali sono trattati con la chirurgia "open" per ottenere dei buoni margini di resezione, ovviare al rischio di rottura della capsula o di frammentazione e disseminazione del tumore.

5.2 Altre terapie ablativo: terapie radiante, termoablazione con radiofrequenze

L'irradiazione della parte non asportata dal tumore potrebbe prevenire la recidiva ed in pazienti con metastasi ossee, la radioterapia potrebbe essere usata come trattamento palliativo per ridurre il dolore e limitare il rischio di sviluppo di complicazioni come sintomi neurologici e fratture ossee. La "radiofrequency thermal ablation" è una tecnica promettente per i tumori solidi che coinvolgono il fegato, i reni ed i polmoni, e può essere considerata una alternativa alla chirurgia in alcuni pazienti con carcinomi surrenalici metastatici con lesioni minori di 5 cm, ma i potenziali risultati devono sempre essere pesati con le possibili complicazioni (Wood BJ et al., 2003).

5.3 Terapia adiuvante con Mitotane

Dopo la rimozione radicale chirurgica della neoplasia primitiva o quando la completa rimozione del tumore non è possibile o quando la patologia si ripresenta, è raccomandato il trattamento con **o,p'-DDD** (ortho, para', dichloro-, diphenyl-, dichloroethane; o **mitotane**) con o senza i tradizionali agenti chemioterapici (**Figura 4**). Il **mitotane** inibisce l'azione del cortisolo e la sintesi degli steroidi inibendo enzimi steroidogenici (11 β -idrossilasi), inducendo inoltre il clivaggio della catena laterale del colesterolo (Allolio B et al., 2006; Fassnacht M et al., 2009).

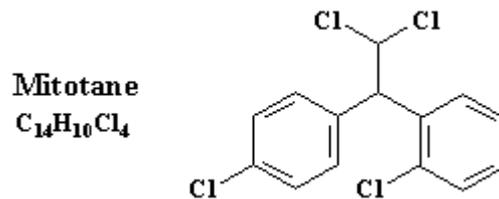


Figura 4. Struttura chimica di o,p'-DDD (ortho, para', dichloro-, diphenyl-, dichloroethane; o mitotane).

L'azione del mitotane è specifica per la corteccia della ghiandola surrenale e su queste cellule possiede un effetto citotossico, producendo una degenerazione focale delle zone fascicolata e reticolare, mentre cambiamenti nella zona glomerulosa sono relativamente lievi. Sfortunatamente, la maggior parte dei trattamenti sopra citati sono inefficaci in un considerevole numero di pazienti. Il mitotane porta ad una completa remissione tumorale in circa il 25% dei casi mentre corregge l'eccesso di secrezione ormonale nella maggioranza dei pazienti.

Il range terapeutico e di tollerabilità per l'organismo varia tra i 14 mg/L e i 20 mg/L ma più dell'80% dei pazienti trattati con mitotane va incontro ad **effetti avversi** come: disturbi gastrointestinali (diarrea, nausea, anoressia), complicazioni nel sistema nervoso centrale (letargia, sonnolenza, atassia, confusione, vertigini), epatotossicità, ipercolesterolemia, insufficienza surrenalica, ginecomastia ed

impotenza negli uomini, diminuzione dell'aggregazione piastrinica e leucopenia (**Tabella 3**) (Patalano A et al., 2009).

Tabella 3. Effetti avversi dovuti al trattamento con mitotane (Allolio B et al., 2006).

Adverse effect	Frequency
Gastrointestinal: nausea, vomiting, diarrhea, anorexia, mucositis	Very common
CNS: lethargy, somnolence, vertigo, ataxia confusion, depression, dizziness, decreased memory, polyneuropathy	Very common, common
Adrenal insufficiency	Very common
Primary hypogonadism in men	Common
Gynecomastia	Common
Skin rash	Common
Autoimmune hepatitis	Rare
Cardiovascular: hypertension	Very rare
Ocular: blurred vision, double vision, toxic retinopathy, cataract, macular edema	Very rare
Hemorrhagic cystitis	Very rare
Increase of hepatic enzymes (in particular γ -GT)	Very common
Increase in hormone binding globulins (CBG, SHBG, TBG, vitamin D binding protein)	Very common
Disturbance of thyroid parameters (interference with binding of T ₄ to TBG, total T ₄ ↓)	Very common
Hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia	Very common
Prolonged bleeding time	
Leucopenia	Common
Thrombocytopenia, anemia	Rare
Hematuria, albuminuria	Very rare
Hepatic microsomal enzyme induction with increased metabolism of glucocorticoids and other steroids and barbiturates, phenytoin, warfarin	Very common, common

GT, Glutamyl transpeptidase; CBG, cortisol-binding globulin; TBG, thyroxin-binding globulin.
^a Modified by the authors based on information published by the European Medicine Agency (EMA; <http://www.emea.eu.int>).

5.4 Chemioterapia citotossica, terapie target e trials clinici

Per il trattamento di alcuni pazienti con ACC vengono utilizzate varie combinazioni di farmaci **chemioterapici citotossici** come: etoposide, doxorubicina e cisplatino (EDP) in combinazione con mitotane, o streptozotocina più mitotane. La maggiore percentuale di risposta (48.5%) è stata osservata con il regime EDP in associazione a basse dosi di mitotane. Con l'associazione mitotane più streptozotocina, meglio tollerata rispetto al precedente schema, si è osservato un tasso di risposta completa o parziale del 36%. Questi risultati hanno portato alla nascita del primo trial di fase III relativo all'ACC, il FIRM-ACT (First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment) (Libè R et al., 2007). Altri agenti citotossici usati, da soli o in combinazione sono: gemcitabina, capecitabina, 5-fluoro-uracile (Wajchenberg et al., 2000).

La maggior parte dei trattamenti sopra citati sono inefficaci in un considerevole numero di pazienti. Il tumore molto spesso è estremamente resistente alla chemioterapia, e questo in parte può essere dovuto all'espressione della glicoproteina-P e dell'enzima glutatione S-transferasi, che giocano un ruolo nella resistenza a vari farmaci. La glicoproteina-P, prodotta dal gene *MDR-1* (multidrug resistance gene 1) è coinvolta nella rimozione dei farmaci dalle cellule tumorali, conferendo resistenza ai farmaci (Kirschner LS, 2006).

Trial con anticorpi contro il recettore di IGF-I, studi sugli inibitori delle tirosine chinasi ed altri composti antiangiogenici sono in corso per identificare nuove opzioni terapeutiche più funzionali per i pazienti che possiedono questa neoplasia maligna. Il trial clinico di fase III in doppio cieco e randomizzato, definito GALACCTIC trial valuta la sostanza OSI-906 (linsitinib), un inibitore sia del recettore IGF-1R sia del recettore per l'insulina in pazienti colpiti da ACC in stadio avanzato o metastatico.

Altri trial sono attualmente in corso: ad esempio studi in fase I che valutano l'azione combinata di due composti: cixutumumab e temsirolimus, inibitori di mTOR; studi in fase II che valutano l'azione del mitotane con o senza cixutumumab, un anticorpo monoclonale contro IGF-1R; e ulteriori trial di fase II con l'obiettivo di valutare bevacizumab, sunitinib e sorafenib come terapia di prima e seconda linea nei pazienti con ACC in stadio avanzato (Lafemina J et al., 2012).

5.5 Nuove strategie terapeutiche

I tumori corticosurrenali benigni (ACA) e maligni (ACC) sono neoplasie altamente eterogenee e con prognosi estremamente diversa. Un importante successo nello studio di queste patologie è la messa a punto di un metodo in grado di distinguere chiaramente tra ACA e ACC basandosi per esempio sulla diversità di trascritti prodotti dal tumore (Assiè G et al., 2010). Le **analisi di trascrittomiche** stanno rilevando grandi diversità di espressione genica (*Ragazzon B et al., 2011; *Assiè G et al., 2012). L'espressione diversificata di alcuni geni coinvolti nella malignità, nella sopravvivenza, e nell'attività ormonale sembrano essere dei buoni candidati per la scoperta di nuovi farmaci target e per la nascita di nuovi marker prognostici e diagnostici (Laurell C et al., 2009; de Reyniès A et al., 2009).

Lo sviluppo di nuove molecole specifiche contro bersagli alterati negli ACT è già iniziato; attualmente sono in corso analisi di svariate molecole alcune sono in grado di inibire i recettori tirosin-chinasici di IGF-II e di EGFR, over-espressi in circa il 75-85% degli ACC; altre sono in grado di colpire i recettori dei fattori di crescita vascolare endoteliale (VEGF) o del fattore di crescita dei fiblasti (FGFR) altamente espressi negli ACC e bersagliare importanti vie del segnale come ad esempio la via di PI(3)K/Akt/mTOR e la via di Wnt/ β -catenina spesso alterate in questi tumori (*Kirschner LS, 2006; §Kirschner LS, 2012).

Nonostante i numerosi progressi fatti negli ultimi anni, il preciso meccanismo patogenetico alla base della tumorigenesi corticosurrenalica è ancora sconosciuto. Pertanto, ulteriori progressi nella comprensione della fisiopatologia surrenalica sono fondamentali per migliorare la diagnosi, la prognosi e per la valutazione di una nuova terapia anti-tumorale.

6) Tumorigenesi ACT sporadici

Importanti progressi nella comprensione della patogenesi degli ACT sporadici sono stati possibili grazie allo studio delle sindromi ereditarie responsabili degli ACC, in quanto le alterazioni genetiche coinvolte in queste sindromi sono riscontrate anche negli ACC sporadici (Herbet M et al., 2009; *Bertherat J. et al., 2009). La progressiva trasformazione di un tessuto normale in un tumore benigno e infine in un carcinoma avviene attraverso l'accumulo di alterazioni genetiche ed epigenetiche. Se l'adenoma corticosurrenale rappresenti una entità separata o sia una parte del processo di progressione tumorale in grado di portare all'ACC è ad oggi ancora una questione aperta (Soon P et al., 2008).

Le analisi di ibridizzazione genomica comparativa (CGH) e le analisi della perdita di eterozigotità (LOH) ci permettono di evidenziare importanti alterazioni genetiche, copie mancanti di DNA cromosomico, perdite di eterozigotità in alcuni locus genetici. Studi di CGH determinano la perdita delle regioni cromosomiche 1p, 17p, 22p, 22q, 2q e 11q in circa il 62% dei pazienti con ACC sporadico (*Fassnacht M et al., 2011; Lafemina J et al., 2012). L'analisi differenziale CGH tra ACA e ACC accentua la chiara differenza tra i due gruppi: negli ACC il numero di difetti genetici è maggiore rispetto agli ACA. Questo dato sottolinea la teoria della progressione "adenoma-to-carcinoma": sono presenti molteplici alterazioni cromosomiche negli ACC e il numero di questi difetti genetici aumenta con l'aumentare della dimensione del tumore (Soon P et al., 2008). Ulteriori studi con marcatori di microsatelliti hanno dimostrato una elevata percentuale di perdita di eterozigotità (LOH) a livello di 11q13 ($\geq 90\%$), 17p13 ($\geq 85\%$) e 2p16 (92%) negli ACC (Libè R et al., 2007; *Bertherat J et al., 2009). Durante lo sviluppo tumorale possono essere implicati anche alcuni cambiamenti epigenetici che possono avere importanti implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche. L'epigenetica si riferisce alle alterazioni dell'espressione genica e non ai cambiamenti della sequenza del DNA. Studi di genome-wide DNA methylation profiling hanno dimostrato che gli ACC sono globalmente ipometilati e il pattern di metilazione permette la distinzione tra tessuti normali, adenomi, carcinomi e carcinomi in stadio avanzato e metastatico (Jain M et al., 2012).

Basandosi sui recenti dati genetici ed epigenetici sono ipotizzabili due modelli concettuali per spiegare l'origine e l'evoluzione delle neoplasie corticosurrenaliche: (1) modello genetico, multistep o clonale e (2) modello di progenitori epigenetici.

- 1) Nel **modello genetico multistep o clonale** la tumorigenesi corticosurrenalica è un processo che si verifica in molti passaggi. L'evento iniziale potrebbe essere lo stimolo alla crescita neoplastica in risposta all'attivazione di fattori del segnale endocrini e paracrini. L'aumento

della proliferazione cellulare aumenterebbe la suscettibilità delle cellule ad andare incontro ad alterazioni di importanti geni oncosoppressori ed oncogeni, accumulando così nella cellula molteplici difetti genetici caratteristici di questi tumori. Questo modello potrebbe perciò spiegare la progressiva sequenza da cellula normale a iperplasia a lesione benigna ed infine a lesione maligna (Bielinska M, et al., 2009).

- 2) **Modello di progenitori epigenetici.** Le alterazioni epigenetiche avvengono nelle cellule tumorali comunemente quanto le mutazioni genetiche. Il termine epigenetico si riferisce a modificazioni non della sequenza del DNA o alterazioni dei fattori associati al DNA, come ad esempio gli istoni, che sono mantenuti durante la divisione cellulare. Sono per esempio modificazioni epigenetiche le acetilazioni, le iper-metilazioni o ipo-metilazioni di geni specifici, le modificazioni cromatiniche, la perdita di imprinting (LOI). Le alterazioni epigenetiche possono essere una conseguenza della progressione tumorale oppure possono precedere la formazione della neoplasia ed aumentare la probabilità del carcinoma quando i difetti genetici sopravvengono. Il primo evento che potrebbe portare alla tumorigenesi è la distruzione del contenuto di cellule progenitori staminali di un tessuto; in questo modo si deteriorerà il normale bilancio tra cellule progenitrici staminali indifferenziate e la loro progenie, arrivando così alla proliferazione incontrollata di progenitori cellulari sensibili all'acquisizione di nuove alterazioni genetiche (Bielinska M, et al., 2009).

La schematizzazione qui riportata non deve essere intesa unilateralmente. I due modelli nella realtà possono operare sinergicamente oppure possono agire a tempi diversi durante lo sviluppo tumorale.

6.1 Geni oncosoppressori e oncogeni coinvolti nella tumorigenesi corticosurrenalica

- Il sistema del **fattore di crescita insulico (IGF-II)** è la principale via del segnale implicata nella crescita surrenalica. Nella normale ghiandola surrenale, sia IGF-I che IGF-II sono promotori della crescita cellulare e delle funzioni differenziative, inducono la steroidogenesi sia *in vitro* che *in vivo* (Kirschner LS, 2002). Come accennato in precedenza, la sindrome di Beckwith-Wiedemann, una malattia congenita caratterizzata dall'alto rischio di sviluppare tumori durante l'infanzia, tra cui l'ACC, è causata da una disomia uniparentale della regione in cui sono presenti i geni IGF-II, p57^{kip2} e H19. La perdita dell'allele materno con la duplicazione dell'allele paterno si traduce con la presenza di una duplice copia di alleli esprimenti IGF-II dando luogo ad una over-espressione di IGF-II (**Figura 5**). Nei carcinomi

sporadici IGF-I non sembra essere iper-espresso, mentre IGF-II è presente in grandi quantità: i suoi alti livelli di espressione sono associati ad un fenotipo più aggressivo (Boulle N et al., 1998). L'iperespressione di IGF-II è di circa il 90% degli ACC contro l'8,5% degli ACA (Gicquel C et al., 1994; Herbet M et al., 2009).

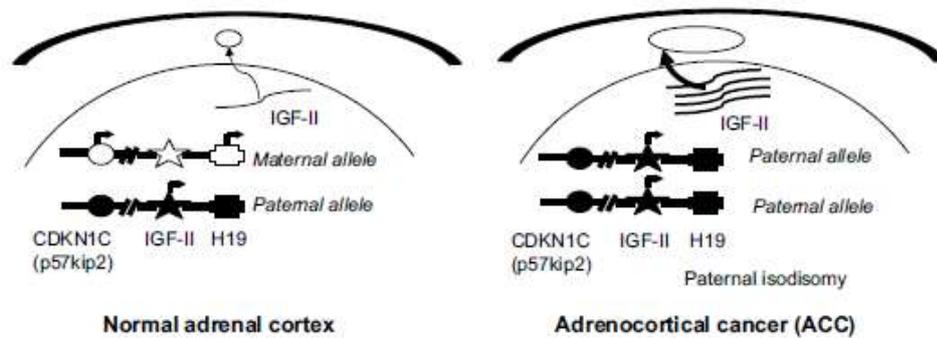


Figura 5. Alterazioni che colpiscono il locus 11p15 e promuovono l'overespressione di IGF-II negli ACC. Il locus 11p15 contiene i geni IGF-II, $p57^{kip2}$ e H19. A sinistra, nel tessuto normale, sono espressi IGF-II dall'allele paterno e $p57^{kip2}$ e H19 dall'allele materno; nell'immagine a destra, si osserva la disomia uniparentale con perdita dell'allele materno che comporta l'overespressione di IGF-II e diminuzione dell'espressione di $p57^{kip2}$ e H19 (*Bertherat J et al., 2009).

- Tra i geni coinvolti nella tumorigenesi surrenalica vi è **TP53**, che produce la proteina p53, la quale possiede un importante ruolo come fattore di trascrizione nella regolazione del ciclo cellulare, causa l'arresto del ciclo e l'apoptosi in risposta ai danni al DNA. Le mutazioni somatiche inattivanti questo oncosoppressore sono localizzate in quattro regioni "hot spot" tra gli esoni 5 e 8 del gene. Il tasso di mutazione di **TP53** negli ACC si aggira attorno al 20-27% dei casi di ACC e tra lo 0 e il 6% negli ACA (Ohgaki H et al., 1998; Reincke M et al., 1994); la perdita di eterozigotà (LOH) al locus 17p13 è dimostrata invece nell'85% dei casi di ACC ma è estremamente rara negli ACA (Lehmann T et al., 2012).

La maggior parte delle mutazioni di p53 coinvolge il dominio che ha la funzione di legare il DNA, mentre meno comunemente le alterazioni colpiscono il dominio di oligomerizzazione. Negli ACC, la mutazione R337H nel dominio di oligomerizzazione produce una sostituzione di una istidina con una arginina al codone 337, alterazione comunemente riscontrata in alcuni bambini del Brasile del Sud colpiti da carcinoma corticosurrenalico. In questi carcinomi, vi è una perdita di eterozigotà (LOH) dell'allele normale wild-type **TP53** ed il mantenimento invece dell'allele R337H mutato (Figueiredo et al., 2006; Ribeiro RC et al., 2001; *Ribeiro RC et al., 2000).

- La famiglia dei **geni Ras** è composta da tre geni (*H-*, *K-* e *N-Ras*) e codifica proteine GTPasi a basso peso molecolare che agiscono nella membrana citoplasmatica passando dalla forma inattiva che lega GDP alla forma attiva che lega GTP. Questo switch molecolare è coinvolto nelle vie di segnalazione che modulano la proliferazione, il differenziamento, la motilità e la morte cellulare (Kirschner LS, 2002). A causa del ruolo fondamentale di queste proteine, la mutazione dei geni *Ras* è presente in molti tumori umani. Yashiro e collaboratori hanno identificato mutazioni attivanti il gene *N-Ras* in circa il 12.5% degli ACC e degli ACA analizzati, mentre non si sono osservate mutazioni in *K-Ras* e *H-Ras* (Yashiro T et al., 1994). Al contrario, in un piccolo gruppo di tumori, Moul e collaboratori non trovano nessuna mutazione nei geni della famiglia *Ras*, come evidenziato in un altro studio di 40 tumori corticosurrenali, analizzati per il gene *K-Ras* (Moul TW et al, 1993; Ocker M et al., 2000). Esistono perciò dati contrastanti nel coinvolgimento dei geni *Ras* nella tumorigenesi corticosurrenalica; ulteriori studi potrebbero fare luce su questa importante famiglia di geni.
- Il **recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR)** è over-espresso negli adenomi e nei carcinomi corticosurrenali. Il segnale veicolato da questo recettore tirosin chinasi è mediato dalle proteine Ras e si può supporre che l'attivazione costitutiva di questa via possa promuovere la tumorigenesi e contribuire alla de-regolazione della crescita cellulare, all'aumento della sopravvivenza, alla migrazione ed all'invasione. Il fattore di crescita epidermico (EGF) non è over-espresso negli ACC, ma al suo recettore può essere legato TGF α , un ligando naturale di EGFR di solito riscontrato negli ACT (Kirschner LS, 2002; Herbet M et al., 2009). In un recente studio di Kotoula e collaboratori (Koutoula V et al., 2009) si osservano negli ACC mutazioni frequenti di EGFR e di alcuni componenti a valle del recettore come ad esempio i geni *BRAF*, *K-RAS* ed *N-RAS* (Bussey KJ et al., 2010)
- Tra le proteine e i peptidi coinvolti nella tumorigenesi troviamo **inhibin e activin**, glicoproteine dimeriche della famiglia TGF β . Activin è una proteina ubiquitaria, mentre inhibin è espressa in particolar modo nelle gonadi, nella corteccia surrenalica e nell'ipofisi. Entrambe le glicoproteine giocano un ruolo importante come fattori paracrini e autocrini, regolatori della crescita e della differenziazione; nei carcinomi si ritrovano alte concentrazioni dei loro recettori. Activin inibisce la proliferazione, induce apoptosi e modula la secrezione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) che induce la secrezione di cortisolo. *In vitro*, il trattamento con activin nelle colture di carcinoma inibisce la steroidogenesi in modo dose dipendente (Roman S, 2006).

6.2 Alterazioni nelle principali vie del segnale

- La cascata di segnali che coinvolge **ACTH-cAMP-Protein Chinasi A (PKA)** è anch'essa implicata nella patogenesi dei tumori surrenalici: il gene della subunità regolatoria R1A della proteina chinasi A (PRKAR1A) molto spesso è mutato e comporta una maggiore attività della stessa proteina chinasi (Gaujoux S et al., 2008). Sono state riscontrate alcune mutazioni attivanti in vari componenti della pathway dell'adenilato ciclasi anche in altri disordini endocrini come l'acromegalia e l'adenoma tossico della tiroide (Bielinska M, et al., 2009).
- Un elevato numero di alterazioni sono presenti anche nella via del segnale di **Wnt/β-catenina**, importante pathway attiva durante lo sviluppo embrionale, avente un ruolo nell'adesione cellulare e nell'attivazione di molteplici fattori di trascrizione (**Figura 6**). Le mutazioni attivanti il gene della β-catenina (gene *CTNNB1*) hanno una frequenza simile (20%) negli adenomi e nei carcinomi ma l'anomala localizzazione della β-catenina all'interno del nucleo e del citoplasma della cellula tumorale è osservata maggiormente negli ACC. L'anormale accumulo citoplasmatico e nucleare della β-catenina è osservato in circa il 38% degli ACA ed in circa l'85% degli ACC (Bielinska M et al., 2009). Questa diversità può essere dovuta a mutazioni in altri componenti della via del segnale di Wnt, i quali possono contribuire alla progressione del carcinoma ed accentuare il fenotipo maligno (*Bertherat J et al., 2009).

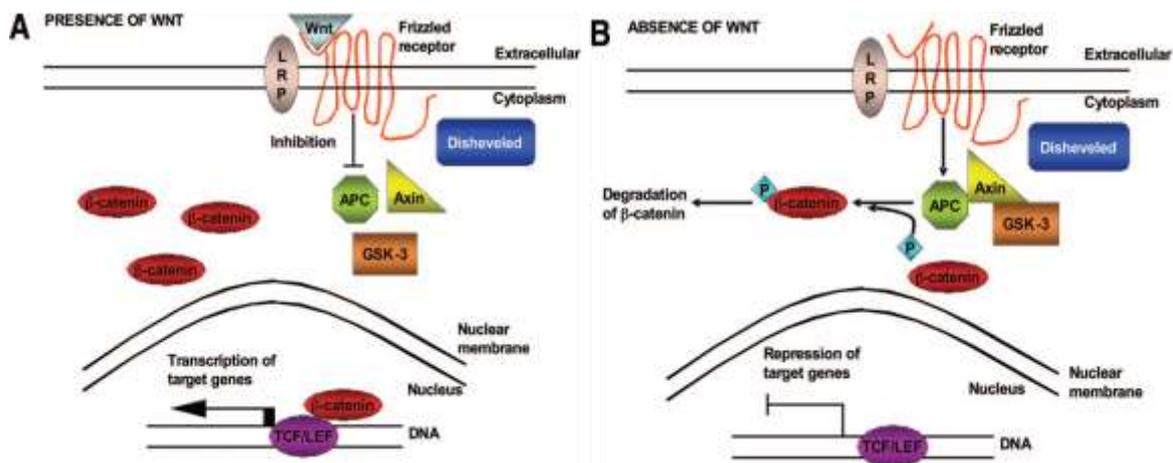


Figura 6. Rappresentazione schematica della via del segnale di Wnt/β-catenina. (A) Wnt/β-catenina signaling pathway in presenza dello stimolo del ligando Wnt: la β-catenina trasloca nel nucleo e attiva alcuni geni target. (B) Wnt β-catenina signaling pathway in assenza del ligando Wnt: la β-catenina è degradata e la trascrizione genica è repressa (Soon PS et al., 2008).

- L'**angiogenesi** è il principale processo per lo sviluppo di molti tumori solidi (Bernini GP et al., 2002). Il profilo angiogenico dei tumori surrenalici può essere monitorato attraverso un fattore angiogenico come il **fattore di crescita vascolare endoteliale** (VEGF), la cui espressione è più elevata nei pazienti colpiti da ACC rispetto ai pazienti affetti da adenomi surrenalici (de Fraipont F et al., 2000; Herbet M et al., 2008; Patalano A et al., 2009). Questa maggiore espressione di VEGF nei carcinomi, con la capacità di sintetizzare nuovi vasi induce una crescita tumorale più aggressiva che può facilmente portare a metastasi (Soon PS et al., 2008). Anche nel siero, i livelli di VEGF sono significativamente più alti nei pazienti con ACC rispetto ai pazienti colpiti da altri tumori surrenalici (Kolomecki K et al., 2001).

7) Angiogenesi

Il processo di formazione dei vasi sanguigni nell'adulto è noto come **angiogenesi** o **neovascolarizzazione**. Nello sviluppo embrionale i vasi ematici si formano per vasculogenesi, durante la quale viene costituita una rete vascolare primitiva a partire dai precursori delle cellule endoteliali detti angioblasti (Robbins SL et al., 2005; Cébe-Suarez S et al., 2006).

L'angiogenesi, dal greco "angeion" vaso, è un processo fondamentale nelle fasi di sviluppo, nel ciclo riproduttivo della donna e nella riparazione tissutale. In queste condizioni la genesi di nuovi capillari è regolata accuratamente mentre un'angiogenesi incontrollata, per eccesso o per difetto è presente in alcune patologie come l'artrite reumatoide, la retinopatia diabetica, nell'infarto e nelle neoplasie (Boldrini M et al., manuale AIOm). In questi casi le cellule endoteliali possono, liberando proteasi che degradano la parete vasale, migrare dai vasi esistenti alla zona interstiziale priva di sangue proliferare e differenziarsi in nuove cellule endoteliali, generando così una circolazione collaterale o un nuovo network vasale. Poiché tale processo avvenga è necessaria l'attivazione di fattori di crescita, citochine, enzimi angiogenici, recettori endoteliali specifici e molecole di adesione (**segnali "on"**). Quando la neovascolarizzazione è sufficiente, questi fattori decrescono oppure aumentano localmente alcuni specifici inibitori angiogenici (**segnali "off"**) (Carmeliet P, 2005).

Nello sviluppo embrionale le diverse cellule endoteliali si formano a partire da quelle staminali (emangioblasti) che vanno incontro a differenziazione in cellule ematopoietiche (precursori delle cellule ematiche) ed angioblasti (processo di vasculogenesi, cioè formazione di vasi sanguigni in spazi tissutali precedentemente privi di struttura vascolare). Negli individui adulti, invece, stimoli fisiologici (condizioni ipossiche o ischemiche) in seguito a cicatrizzazione di ferite e nel ciclo

mestruale portano all'angiogenesi, cioè formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli preesistenti (Robbins SL et al., 2005)

La partecipazione e l'attivazione delle cellule endoteliali al processo di angiogenesi, sia fisiologico che patologico, avvengono quindi a seguito di **ipossia** o **ischemia**. Dalle cellule tumorali ipossiche, dai macrofagi e dalle altre cellule del sistema immunitario, viene prodotto il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) che provoca vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare e rilascio di proteasi, importanti per l'invasione cellulare e il rimodellamento dei tessuti. In aggiunta, il VEGF, può prevenire l'apoptosi delle cellule endoteliali.

L'angiogenesi procede quindi attraverso diverse tappe principali:

- vasodilatazione in risposta all'ossido nitrico (NO) ed aumento della permeabilità dei vasi preesistenti indotta dal VEGF;
- digestione della membrana basale ad opera di metalloproteinasi secrete dalle cellule endoteliali e distruzione dei contatti tra le cellule endoteliali da parte dell'attivatore del plasminogeno;
- migrazione di cellule endoteliali circolanti nella sede di formazione dei nuovi vasi, verso lo stimolo angiogenetico;
- proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali per allungare i vasi e formare il lume;
- secrezione di fattori di crescita da parte delle cellule endoteliali che richiamano le cellule di supporto, i periciti e le cellule muscolari lisce per costruire la membrana basale. In questo stadio finale i vasi sviluppano anche le caratteristiche specifiche proprie del tessuto o organo che devono irrorare (Robbins SL et al., 2005; Boldrini M et al., manuale AIOM).

7.1 Famiglia dei fattori di crescita vascolare endoteliali (VEGF)

La famiglia del fattore di crescita vascolare endoteliale (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) comprende sette glicoproteine secrete: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placental growth factor (PlGF), VEGF-E e VEGF-F (Tammela T et al., 2005). Questi fattori esercitano l'effetto biologico attraverso le interazioni con i loro recettori transmembrana tirosin chinasi che legano il ligando al dominio extracellulare ed in questo modo attivano una cascata di segnali (**Figura 7**) (Cébe-Suarez S et al., 2006).

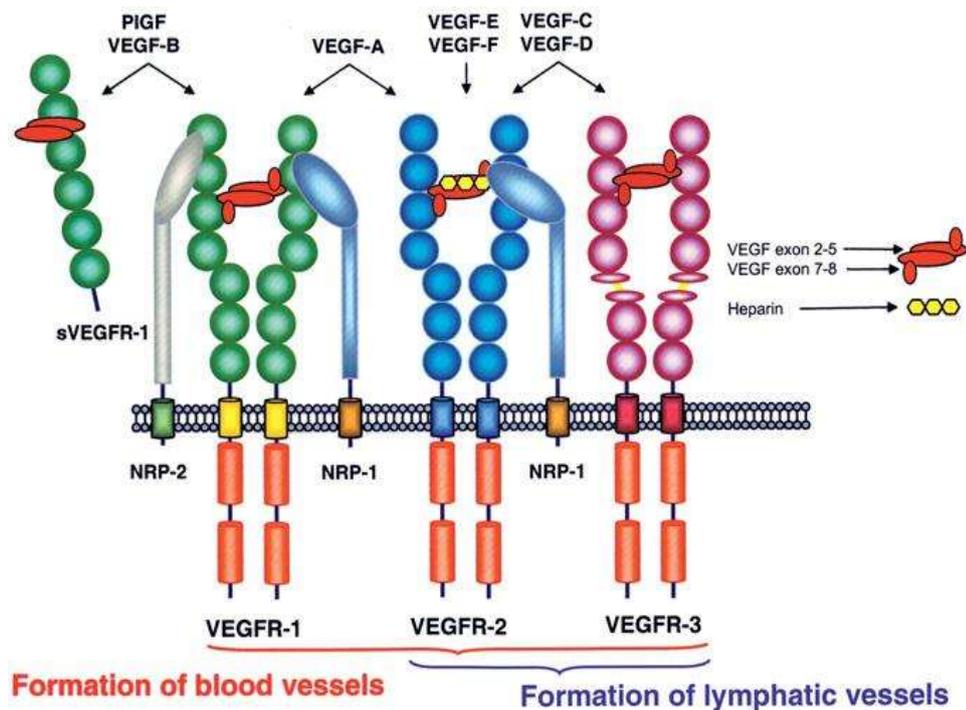


Figura 7. Rappresentazione schematica dell'interazione dei membri della famiglia di VEGF con i recettori VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 e le neurofiline 1 e 2 (Cébe-Suarez S et al., 2006).

- **VEGF-A.** E' il mediatore dell'angiogenesi più conosciuto e studiato; molto spesso è chiamato semplicemente VEGF. Il gene che lo codifica è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, è composto da otto esoni e lo splicing alternativo produce quattro isoforme mature: VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206; la designazione numerica indica il numero di amminoacidi presenti nella molecola. VEGF165 è l'isoforma predominante ed è overespressa da molti tumori solidi, mentre VEGF189 è la molecola più potente per la vascolarizzazione di vari tumori.

VEGF-A agisce attraverso l'interazione con i suoi recettori, che sono: VEGFR-1 e VEGFR-2, espressi selettivamente sulle cellule vascolari endoteliali, ed i recettori neurofiline: NRP-1 e NRP-2, espressi sull'endotelio vascolare e sui neuroni. VEGFR-2 è il miglior recettore responsabile dell'effetto pro-angiogenico di VEGF-A; il loro legame sembra innescare la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali vascolari, la sopravvivenza delle cellule endoteliali vascolari immature ed un aumento della permeabilità vascolare, inducendo quindi l'angiogenesi.

VEGF-A promuove la proliferazione e la formazione di nuovi vasi da parte delle cellule endoteliali, è un potente fattore di sopravvivenza e induce l'espressione di proteine

anti-apoptiche nelle stesse cellule; inoltre causa vasodilatazione per l'induzione dell'enzima ossido nitrico sintasi con produzione di ossido nitrico. Lega recettori sulle cellule staminali ematopoietiche (HSCs), monociti, osteoblasti e neuroni, producendo mobilitazione delle staminali dal midollo osseo, chemoattrazione di monociti e formazione ossea da parte degli osteoblasti. L'espressione di VEGF-A è associata all'angiogenesi ed alla vasculogenesi fisiologica, ossia interessa molti processi come la guarigione tramite cicatrizzazione, l'ovulazione, il mantenimento della pressione sanguigna, le mestruazioni e la gravidanza. VEGF-A è espresso praticamente in tutti i tumori solidi studiati finora e in alcune malattie ematologiche (Otrock ZK et al., 2007; Tammela T et al., 2005).

- **VEGF-B.** Il gene che codifica per VEGF-B è localizzato sul cromosoma 11, ha una lunghezza approssimativa di 4000 pb e contiene otto esoni e sei introni. Dallo splicing alternativo sono prodotti due polipeptidi: VEGF-B167 e VEGF-B186 (Tammela T et al., 2005). I livelli di espressione di VEGF-B non sono indotti dall'ipossia o dal freddo come accade per VEGF-A, ed i meccanismi molecolari che regolano la sua espressione rimangono ad oggi sconosciuti. Anche il ruolo di VEGF-B è sconosciuto, ma si lega al recettore 1 producendo un lieve segnale mitogenico per le cellule endoteliali. È espresso in modo elevato nel muscolo striato, nel miocardio e nel grasso bruno, sembra perciò essere legato al metabolismo energetico cellulare; ha un ruolo nell'angiogenesi infiammatoria e sembra promuovere l'angiogenesi in associazione con le vie del segnale di Akt e dell'ossido nitrico (Cébe-Suarez S et al., 2006).
- **VEGF-C.** Appartiene sia alla famiglia del platelet-derived growth factors (PDGF) sia alla famiglia dei fattori di crescita di VEGF, è un ligando di VEGFR-2 e VEGFR-3. VEGF-C è prodotto a partire da una proteina precursore, che è tagliata ed attivata da pro-proteine secretorie, le convertasi PC5 e PC7. La forma secreta del recettore VEGFR-3 lega le subunità di VEGFR-3 di 31/29 kDa con ponti disolfuro, ma vengono successivamente proteolizzate nell'ambiente extracellulare dalla plasmina e da altre proteasi per generare una proteina omodimerica di 21 kDa con alta affinità sia per VEGFR-2 che per VEGFR-3.

La forma matura di VEGF-C induce la mitosi, la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali; durante lo sviluppo è espressa in regioni dove si formerà il sistema linfatico, inoltre è una sostanza chemiotattica per i macrofagi. Il recettore VEGFR-3 è espresso da una frazione di monociti periferici e da macrofagi tissutali attivati. L'espressione successivamente diminuisce in molti tessuti ma rimane alta nei linfonodi (Takahashi H et al., 2005).

- **VEGF-D.** E' processato nelle parti N-terminale e C-terminale e la forma matura che ne deriva lega ed attiva VEGFR-2 e VEGFR-3 stimolando in questo modo la crescita di cellule endoteliali vascolari e linfatiche. VEGF-D è presente in molti tessuti umani ed è espresso anche in alcuni tumori umani, dove gioca un ruolo nell'angiogenesi tumorale e nella linfangiogenesi (McMahon G, 2000; Tammela T et al., 2005).
- **VEGF-E.** Altro membro della famiglia di VEGF, presenta solo un 20-25% di identità con VEGF-A. Una nuova isoforma di VEGF-E è VEGF-ENZ-7, identificata nel genoma virale del parapoxvirus; questo ligando lega specificatamente e con alta affinità VEGFR-2 provocando un'autofosforilazione nel recettore ed un aumento della concentrazione di Ca^{2+} libero. VEGF-E è quindi un potente fattore angiogenico grazie alla sua attivazione del recettore VEGFR-2 che può stimolare efficacemente il processo angiogenico (Takahashi H et al., 2005).
- **Placental growth factor (PIGF).** È espresso nella placenta, nel cuore e nei polmoni. La sua forma omodimerica lega VEGFR-1 e NRP-1, ma PIGF può anche formare eterodimeri con VEGF. L'attivazione di VEGFR-1 da parte di PIGF o di VEGF-A induce un profilo di espressione genica diverso a causa della fosforilazione di residui tirosinici diversi nel dominio tirosin chinasi del VEGFR-1, mentre una combinazione di questi fattori aumenta VEGF favorendo l'angiogenesi (Cébe-Suarez S et al., 2006; Otrrock ZK et al., 2007).
- **VEGR-F.** E' rappresentato da due proteine chiamate vamin (110 residui) e VR-1 (109 residui) che hanno un 50% di omologia di struttura con VEGF165 e legano selettivamente VEGFR-2 (Otrrock ZK et al., 2007).

7.2 Famiglia dei recettori del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR)

I fattori di crescita vascolari endoteliali esercitano l'effetto biologico attraverso le interazioni con i loro recettori; essi sono recettori transmembrana tirosin chinasi che legano il ligando al dominio extracellulare ed in questo modo attivano una cascata di segnali dopo la dimerizzazione e l'autofosforilazione del recettore tirosin chinasi intracellulare (**Figura 8**).

I recettori identificati finora sono: **VEGFR-1** (Fms-like tyrosine kinase; Flt-1), **VEGFR-2** (kinase insert domain-containing receptor; KDR), **VEGFR-3** (fms-like tyrosine kinase 4; Fl4) e le **neurofiline** (NRP-1 e NRP-2) (Kowanetz M et al., 2006; McMahon G, 2000).

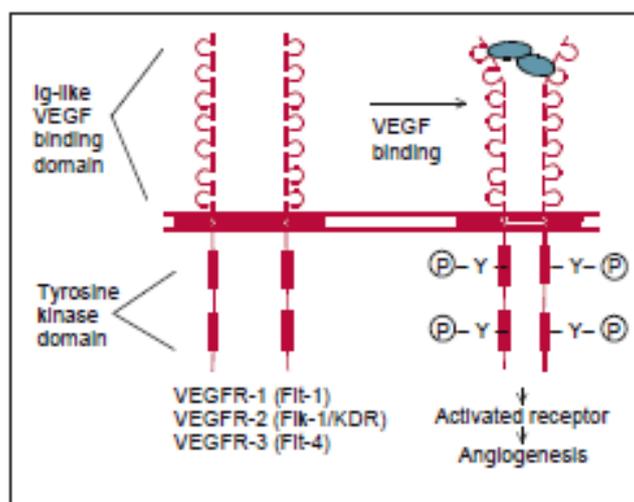


Figura 8. Recettori tirosin chinasi di VEGF. La famiglia dei recettori di VEGF è formata da un dominio extracellulare costituito da sette domini immunoglobulinici che legano VEGF; una porzione transmembrana ed un dominio intracitoplasmatico tirosin chinasi. Due recettori si attivano formando un dimero a causa dell'autofosforilazione dei residui tirosin chinasi del dominio citoplasmatico (McMahon G, 2000).

1. **VEGFR-1** (Fms-like tyrosine kinase; flt-1). Il recettore 1 è composto da sette domini extracellulari omologhi immunoglobulinici (Ig), una singola regione transmembrana e un dominio tirosin chinasi intracellulare. VEGFR-1 lega VEGF-A, VEGF-B e PlGF con alta affinità e la sua espressione è regolata dall'ipossia attraverso la via di HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1). La funzione chiave di VEGFR-1 nell'endotelio vascolare non è la regolazione dell'angiogenesi ma piuttosto il rilascio paracrino di fattori di crescita tessuto-specifici. Il significato di VEGFR-1 nella regolazione dell'angiogenesi è complesso, in alcune circostanze funziona come recettore "esca" che sequestra VEGF impedendo o favorendo successivamente l'interazione con VEGFR-2 (Ferrara N et al., 2005; Lin R et al., 2002; Tammela T et al., 2005).
2. **VEGFR-2** (kinase-insert domain receptor, KDR; fetal liver kinase, Flk-1). Come VEGFR-1, VEGFR-2 possiede una regione extracellulare con sette domini immunoglobulinici, un dominio transmembrana e un dominio tirosin chinasi di circa 70 aminoacidi. All'interno delle cellule VEGFR-2 è prodotta come una proteina di 150 kDa, che successivamente viene glicosilata ed espressa sulla superficie cellulare, pronta a legare VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (Cébe-Suarez S et al., 2006).

La sua attivazione induce la crescita cellulare endoteliale attivando la **via del segnale Ras/Raf/MEK/ERK**, ma promuove anche un aumento della permeabilità vascolare, la migrazione delle cellule endoteliali e la loro sopravvivenza attivando diverse vie del segnale come ad esempio la **via della PI(3)-chinasi/Akt/mTOR (Figura 9)** (Takahashi H et al., 2005).

L'attivazione della PI 3-chinasi contribuisce all'effetto chemiotattico di VEGF ed è fortemente implicata nella sopravvivenza cellulare attraverso una proteina serina/treonina chinasi posta a valle e chiamata Akt. Akt promuove la sopravvivenza cellulare sopprimendo l'attività di alcune proteine proapoptotiche, come la caspasi-9 e inducendo l'espressione di proteine antiapoptotiche, come Bcl-2 e A1 nelle cellule endoteliali (Lin R et al., 2002; Kowanetz M et al., 2006).

VEGFR-2 rappresenta la migliore molecola target per le terapie anti-angiogeniche in quanto è coinvolta nella proliferazione cellulare dell'endotelio e nella migrazione delle sue cellule, ma ha effetto anche sulla permeabilità e sul tono vascolare, attraverso il rilascio di NO dalle cellule endoteliali vascolari; perciò l'inibizione di VEGFR-2 può essere un buon target terapeutico, in grado di aumentare la risposta tumorale diminuendo la vascolarizzazione del tumore (Zhu Z et al., 1999; McMahon G, 2000).

3. **VEGFR-3** (fms-like tyrosine kinase 4, Fl4). Recettore tirosin chinasi che possiede solo sei identici domini immunoglobulinici; nell'uomo lo splicing alternativo del gene VEGFR-3 genera due isoforme che differiscono al C-terminale.

VEGFR-3 lega in particolar modo VEGF-C e VEGF-D, e viene up-regolato nelle cellule endoteliali vascolari in condizioni patologiche come nei tumori vascolari e nei tumori solidi periferici. Bloccare VEGFR-3 in modo significativo vuol dire inibire la linfoangiogenesi e le metastasi ai linfonodi (Zhu Z et al., 1999; Cébe-Suarez S et al., 2006).

4. **Neuropilin NRP-1 e NRP-2**. Sono glicoproteine di superficie di 130-140 kDa che possiedono un ruolo specifico in immunologia e nello sviluppo neuronale, ma sono anche coinvolte nell'angiogenesi.

NRP-1 lega VEGF-A, VEGF-B e PlGF, mentre NRP-2 ha un pattern di espressione simile e lega VEGF-A, VEGF-C e PlGF. NRP-1 agisce come co-recettore, aumenta le interazioni di VEGF-A e VEGFR-2, forma complessi con VEGFR-1 ed *in vivo* incrementa l'angiogenesi del tumore (Otrock ZK et al., 2007; Tammela T et al., 2005).

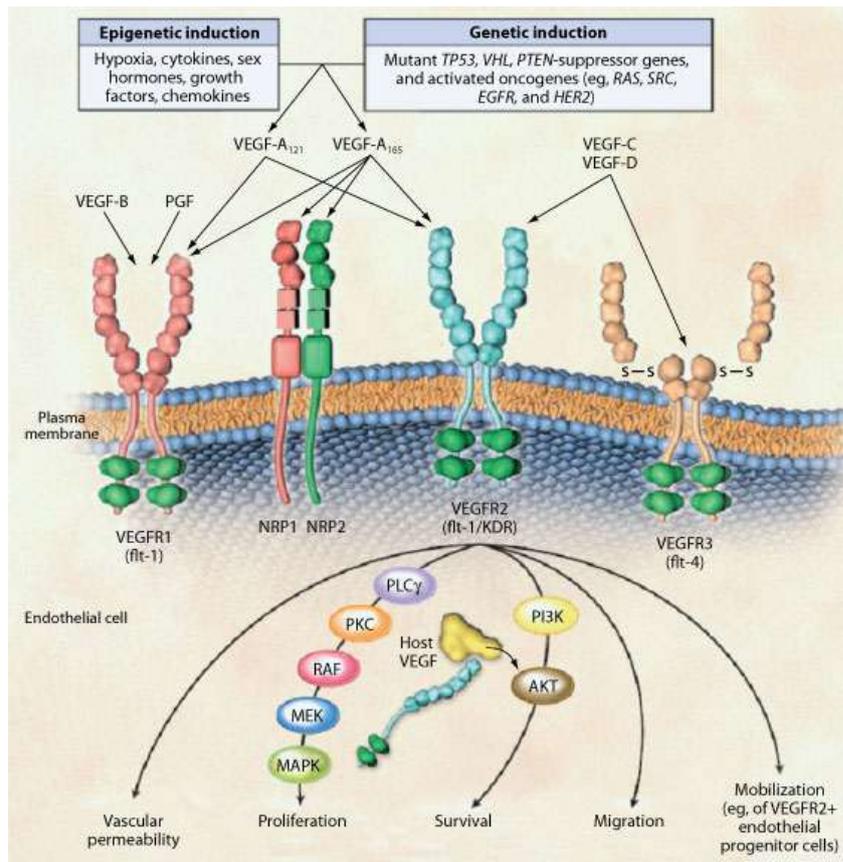


Figura 9. Vie del segnale che coinvolgono VEGFR-2. Molte vie del segnale sono attivate da VEGFR-2 e vengono innescate alcune funzioni cellulari ben precise come: migrazione cellulare, permeabilità vascolare, sopravvivenza e proliferazione delle cellule endoteliali (Kerbel RS et al., 2008).

8) Angiogenesi tumorale

Numerosi tumori stimolano la crescita dei vasi ematici dell'ospite, affidandosi al processo di angiogenesi, fondamentale per procurare le sostanze nutritive alle cellule tumorali, per promuovere la crescita tumorale e successivamente le metastasi (**Figura 10**) (*Folkman J, 2007; Kerbel RS et al., 2008; Stepien HM et al., 2002).

Anche in presenza di anomalie genetiche che alterano la regolazione della crescita e della sopravvivenza delle singole cellule, i tumori non possono superare il diametro o lo spessore di 1-2mm se non vengono vascularizzati. Il limite di 1-2 mm rappresenta la massima distanza attraverso la quale l'ossigeno e le sostanze nutritive possono diffondere dai vasi ematici. Il tumore perciò non riesce ad aumentare di volume senza vascularizzazione a causa della morte cellulare indotta dall'ipossia (Folkman J, 2002; Robbins SL et al., 2005; Stepien HM et al., 2002).

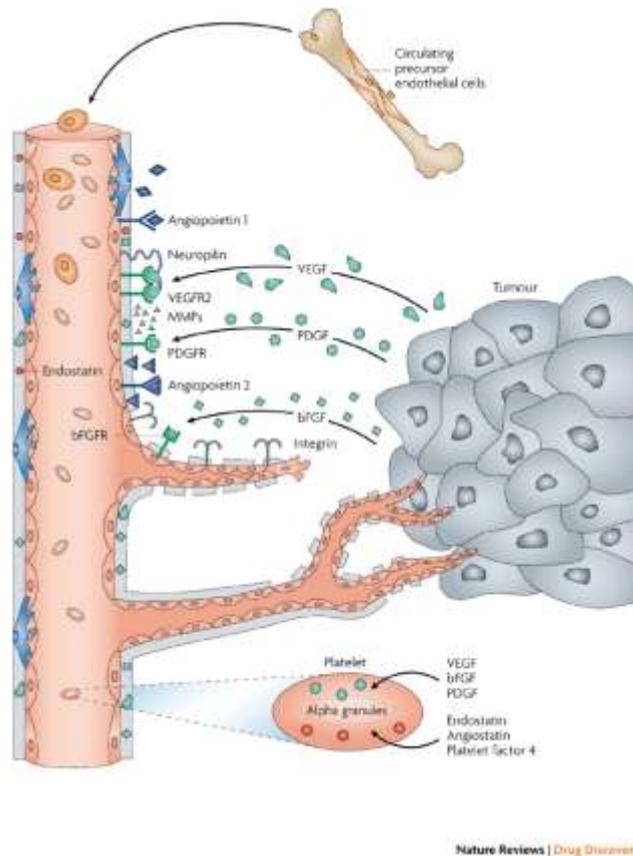


Figura 10. Angiogenesi tumorale. La secrezione di VEGF è stimolata dalle cellule tumorali, dall'ambiente ipossico, dal pH acido e da molti altri fattori. VEGF si lega ai recettori sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, di conseguenza le cellule endoteliali si attivano e producono enzimi e molecole che stimolano la crescita e la proliferazione cellulare. Ulteriori effetti sono la mobilitazione di cellule progenitrici endoteliali dal midollo osseo e l'aumento della permeabilità vascolare (*Folkman J, 2007).

L'angiogenesi tumorale può avvenire per reclutamento di precursori delle cellule endoteliali oppure per gemmazione da capillari già esistenti, come nell'angiogenesi fisiologica (Ferrara N et al., 2005); tuttavia i vasi ematici tumorali differiscono dal normale sistema vascolare per la loro forma tortuosa e irregolare, e poiché inoltre sono permeabili (Bergers G et al., 2003). I vasi sanguigni tumorali non hanno la normale organizzazione in venule, arteriole e capillari, ma:

- presentano caratteristiche tipiche di tutti i tre tipi di vasi;
- hanno un'alterata espressione di antigeni sulla superficie cellulare;
- mancano della connessione con le cellule di supporto e il numero di quest'ultime può essere più elevato o più basso rispetto ai vasi normali (Boldrini M et al., manuale AIOm).

Proprio a causa di questa anomala e caotica struttura, il flusso ematico nei vasi tumorali tende ad essere generalmente irregolare, più lento del normale, spesso con disfunzionalità dei capillari (Stepien HM et al., 2002). Non è presente un apporto nutritivo ottimale per tutte le cellule: un aumento della distanza delle cellule tumorali in crescita dai vasi capillari o un'inefficienza dei nuovi vasi formati può produrre ipossia. L'ipossia induce l'espressione del fattore di crescita endoteliale (VEGF), del suo recettore e aumenta l'infiltrazione dei macrofagi, stimolando ulteriormente la formazione di nuovi vasi perciò l'ipossia nelle aree necrotiche all'interno del tumore rappresenta lo stimolo per una crescita vascolare continua e per la diffusione ed il trasporto delle cellule tumorali nelle sedi di formazione delle metastasi (McMahon G et al., 2005).

Il VEGF agisce anche come fattore di permeabilità vascolare, grazie alla sua capacità di indurre la fenestrazione dei vasi e di aumentare la permeabilità del microcircolo. L'aumento della permeabilità dei vasi sanguigni tumorali nei confronti delle macromolecole circolanti permette la fuoriuscita delle proteine plasmatiche (ad esempio il fibrinogeno ed altre proteine della coagulazione), con la conseguente formazione di uno stroma proangiogenetico (Tammela T et al., 2005).

L'angiogenesi è anche un requisito fondamentale per la formazione delle metastasi: senza l'accesso ai vasi, le cellule tumorali non potrebbero diffondere a distanza (Folkman J, 2002). La metastasi insorge quando le cellule tumorali superano diverse barriere tra cui il sistema vascolare; successivamente devono sopravvivere in circolo per essere trasportate e poter giungere in un letto vascolare distante. Questi processi dipendono dalla capacità di adesione di molecole quali caderine, integrine, selettine. In seguito le cellule devono extravasare e indurre angiogenesi nell'organo bersaglio in modo da formare un nuovo tumore (tumore secondario) (Robbins SL et al., 2005).

Le cellule tumorali non solo producono fattori angiogenetici, ma inducono anche molecole anti-angiogenetiche. La differenza nel bilancio tra i fattori di crescita angiogenici ed i loro inibitori ha un ruolo centrale nello sviluppo del tumore: affinché si abbia l'attivazione angiogenica deve verificarsi, all'interno del microambiente tumorale, un'alterazione dell'equilibrio (o **switch angiogenico**) tra fattori stimolanti ed inibenti a favore della stimolazione (Bergers G et al., 2003).

I più importanti **mediatori stimolanti** il processo angiogenetico sono i fattori di crescita e in particolare il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e il basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), entrambi prodotti da vari tipi di cellule, sia normali che tumorali. Inoltre sono presenti altre sostanze in grado di stimolare l'angiogenesi e tra queste le più studiate sono Trasforming Growth Factor (TGF) alfa o beta, Interleuchina-8 (IL-8), Leptina e Angiogenina, e Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) (McMahon G et al., 2005).

I più studiati **mediatori inibitori** dell'angiogenesi sono Angiostatina e Endostatina, Interferone alfa (INF- α) e Interleuchina-12 (IL-12), Angiopoietina-2, Trombospondina-1 (Turner et al., 2003; Ferrara et al., 2005).

Il profilo angiogenico dei tumori surrenalici può essere monitorato attraverso un fattore angiogenico come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). La maggiore espressione di VEGF in alcuni tumori con la capacità di sintetizzare nuovi vasi induce una crescita tumorale più aggressiva che può facilmente portare a metastasi. Inoltre i recettori di VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2) trovati anch'essi sulle cellule tumorali, suggeriscono un **possibile effetto autocrino e/o paracrino di VEGF** per la crescita cellulare (**Figura 11**) (McMahon G, 2000; Kerbel RS et al., 2008).

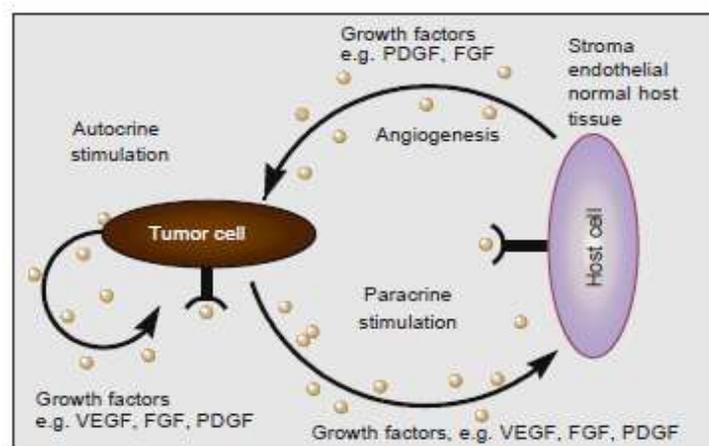


Figura 11. Stimolazione paracrina ed autocrina da parte dei fattori di crescita angiogenetici. VEGF = vascular endothelial growth factor, FGF = fibroblast growth factor; PDGF = platelet-derived growth factor (McMahon G, 2000).

Un potente strumento per bloccare la crescita tumorale può essere una terapia mirata a colpire la vascolarizzazione tumorale; si può intervenire sia sulla costruzione dei nuovi vasi (agenti anti-angiogenetici) che sulla distruzione della vascolarizzazione tumorale. Con un'azione mirata su VEGF e/o sui suoi recettori si potrebbe prevedere di ottenere l'inibizione dell'angiogenesi con conseguenze sulla crescita tumorale (Carmeliet P et al., 2005; Ferrara N et al., 2005; Stepien HM et al., 2002).

8.1 Angiogenesi nei tumori della ghiandola surrenale

Le ghiandole endocrine sono organi molto vascolarizzati, con un epitelio di rivestimento fenestrato che permette il facile trasferimento delle sostanze attraverso la parete permeabile del vaso;

la circolazione sanguigna è indispensabile per la normale funzione endocrina ed il controllo del feedback ormonale (Bernini GP et al., 2002; Turner HE et al., 2003).

Il surrene normale è una struttura altamente vascolarizzata ed esiste una complessa organizzazione tra le diverse zone della corticale e della midollare in quanto in queste aree vengono sintetizzati ormoni diversi che interverranno a loro volta sul metabolismo di altri ormoni. Ogni singola cellula endocrina delle zone glomerulosa, fascicolare e reticolare della corticale del surrene è a diretto contatto con i capillari fenestrati, chiamati sinusoidi, che originano dalle arteriole capsulari. Questa ordinata rete sinusoidale è mantenuta anche a seguito dell'insorgenza di adenomi surrenalici, mentre i carcinomi mostrano una vascolatura disorganizzata, con vasi ampi, sparpagliati e con una rete di microcapillari irregolari (Turner HE et al., 2003; Stepien HM et al., 2002).

L'angiogenesi tumorale sovrviene quando vi è uno sbilanciamento tra fattori di crescita stimolanti ed inibenti i nuovi vasi sanguigni; come affermato in precedenza il profilo angiogenico dei tumori surrenalici può essere monitorato attraverso il fattore angiogenico VEGF, la cui espressione è più alta nei pazienti colpiti da carcinoma rispetto ai pazienti affetti da adenomi surrenalici (de Fraipoint F et al., 2000; Kołomecki K et al., 2000). Anche i livelli di VEGF riscontrati nel siero sono significativamente più alti nei pazienti con ACC rispetto ai pazienti colpiti da adenomi surrenalici (Jurczyńska J et al., 2009; *Kołomecki K et al., 2001). Questa maggiore espressione di VEGF nei carcinomi, con la capacità di sintetizzare nuovi vasi induce una crescita tumorale più aggressiva che può facilmente portare a metastasi (Zhu Z et al., 1999 Salmenkivi K et al., 2003).

8.2 Terapie anti-angiogeniche

Negli ultimi anni la terapia medica dei tumori sta percorrendo fondamentalmente due direzioni: la **chemioterapia**, che rappresenta il cardine del trattamento farmacologico delle neoplasie, basandosi su agenti più attivi e marcatamente meno tossici rispetto a quelli disponibili fino a soli pochi anni fa, e le **terapie biologiche** o "**target oriented**", selettive e mirate a specifiche alterazioni o mutazioni della cellula tumorale. L'anti-angiogenesi si propone di tagliare i rifornimenti al tumore, bloccando l'afflusso di sangue attraverso il quale le cellule neoplastiche si alimentano. È questa la via che appare più densa di risultati: è stato infatti dimostrato un aumento della sopravvivenza media in pazienti affetti da tumore del colon-retto, della mammella, del polmone e del rene in uno stadio anche molto avanzato (Boldrini M et al., manuale AIOm; Zhu Z et al., 1999).

L'inibizione dell'angiogenesi presenta numerosi vantaggi teorici rispetto alla chemioterapia: diverso target biologico, scarsa tossicità sistemica e assenza di resistenza farmacologica. Negli ultimi

anni molti trattamenti chemioterapici sono risultati sempre meno efficaci a causa della resistenza verso il farmaco, ma gli agenti anti-angiogenetici sembrano poter aggirare questo ostacolo perché i loro target non sono le cellule neoplastiche ma i vasi che le alimentano; le cellule endoteliali reclutate dal tumore dai tessuti adiacenti e dal midollo osseo per formare nuovi vasi, a differenza delle cellule tumorali sono geneticamente stabili. Inoltre i vasi tumorali differiscono da quelli normali: i target dei nuovi agenti anti-angiogenici colpiscono solo cellule endoteliali proliferative non interferendo quindi nei normali e fisiologici processi angiogenici (Ferrara N et al., 2005).

8.3 Molecole anti-VEGF

Il bersaglio terapeutico ideale è VEGF; l'inibizione dell'angiogenesi tumorale mediante il blocco dell'attività di VEGF, iper-espresso nella maggioranza dei tumori umani, interferisce con due importanti processi neoplastici:

- **crescita e proliferazione:** il rilascio di VEGF da parte del tumore scatena l'attivazione del processo angiogenico che connette il tumore alla rete vascolare dell'ospite, consentendo alle cellule tumorali di ricevere l'apporto ematico e nutritivo necessario per la proliferazione e la diffusione metastatica (Boldrini M et al., manuale AIOM).
- **resistenza al trattamento citotossico**, sia chemio che radioterapico: la struttura vascolare indotta dal VEGF è caratterizzata da un'elevata permeabilità che aumenta la pressione interstiziale e intratumorale, ostacolando così un'adeguata diffusione degli agenti chemioterapici e creando aree di relativa ipossia non responsive al trattamento radiante (Boldrini M et al., manuale AIOM).

Con un'azione mirata sul VEGF si può prevedere di ottenere l'inibizione dell'angiogenesi, insieme ad altri effetti sulla vascolarizzazione tumorale volti ad inibire la crescita del tumore, senza compromettere la funzione della normale vascolarizzazione dei tessuti sani (Zhu Z et al., 1999).

La trasduzione dei segnali da parte del VEGF può essere inibita puntando tanto sul ligando che sul recettore:

- **Inibizione del ligando.** Gli anticorpi anti-VEGF si legano direttamente a VEGF, eliminando la quota libera in circolo e impedendo che si leghi ai recettori. I vantaggi si basano sulla specificità anticorpale, inibendo VEGF si è in grado di prevenirne l'attività su tutti i recettori con il quale il ligando interagisce (recettori VEGFR-1, VEGFR-2 e il co-recettore neurofilina-

1). Il primo agente anti-angiogenico i cui effetti antitumorali siano stati documentati in studi clinici di fase III, è l'anticorpo monoclonale anti-VEGF umano prodotto nel topo: Bevacizumab (Carmeliet P, 2005; Takahashi H et al., 2005; McMahon G et al., 2005).

- **Azione mirata sui recettori di VEGF.** Esistono gli inibitori dei recettori del VEGF che utilizzano anticorpi per impedire il legame dei recettori con il ligando, oppure che utilizzano piccole molecole che inibiscono la tirosina chinasi intracellulare dei recettori VEGF. Gli inibitori della tirosina chinasi sono composti sintetici, permeabili alle membrane, di piccole dimensioni, disponibili per via orale, che bloccano o competono con il legame dell'ATP e così facendo inibiscono la cascata intracellulare di trasduzione del segnale stimolata da uno o più recettori (Ferrara N et al., 2005).

Il **Sorafenib** (Nexavar, Bayer e Onyx Pharmaceuticals) è un inibitore della chinasi Raf e dell'attività tirosin chinasi del recettore VEGFR-2, in grado di bloccare la proliferazione cellulare e l'angiogenesi in alcuni tumori. Il Sorafenib è stato recentemente approvato dalla Food and Drug Administration per il carcinoma metastatico delle cellule renali ed è attualmente utilizzato in trial clinici di altri tumori (McMahon G et al., 2005; Kowanzetz M et al., 2006).

- **Altri agenti che mirano a VEGF.** Ribozimi, come ad esempio Angiozyme (Ribozyme Pharmaceuticals), un ribozima che taglia in modo selettivo l'mRNA del recettore VEGFR-1 impedendo l'espressione del recettore e quindi inibendo l'angiogenesi (McMahon G et al., 2005). Antisenso anti-VEGF, Veglin è un oligonucleotide complementare (antisense) alla sequenza di RNA messaggero che codifica per il VEGF: impedisce la traduzione in proteina, prevenendo così la produzione di VEGF (Kowanzetz M et al., 2006).

9) Sorafenib

Il farmaco Sorafenib (BAY 43-9006; [N-(3-trifluoromethyl-4-chlorophenyl)-N'-4-(2-methylcarbamoyl pyridin-4-yl)oxyphenyl]urea]) viene sintetizzato da Bayer HealthCare Pharmaceutical e Onyx Pharmaceuticals (**Figura 12**) (Kim A et al., 2009; Wilhelm SM et al., 2004; Dal Lago L et al., 2008).

È il primo farmaco antitumorale somministrabile per via orale, che ha ottenuto nell'ottobre del 2007 l'approvazione dalla Commissione Europea e dalla U.S. Food and Drug Administration per il trattamento dei pazienti affetti da epatocarcinoma (HCC) (*Wilhelm SM et al., 2008).

Il Sorafenib ha dimostrato attività antitumorale in studi clinici di fase II/III che hanno coinvolto pazienti con carcinoma renale ed epatico in stadio avanzato, ma è attualmente impiegato anche in molti modelli preclinici di tumori al colon, seno, ovaio, tiroide, melanoma, carcinomi pancreatici, epatocarcinomi, carcinomi renali in fase avanzata e tumori polmonari non a piccole cellule (Dal Lago L et al., 2008; Kim S et al., 2007; Henderson YC et al., 2008).

Attualmente questo farmaco è registrato in più di 60 paesi, inclusi gli Stati Uniti e l'Unione Europea, per il trattamento dei pazienti con carcinoma renale in fase avanzata (RCC). In Europa è approvato per pazienti che hanno fallito il trattamento con interferone e/o interleuchina-2, o non sono candidabili per questo tipo di cura (*Wilhelm SM et al., 2008).

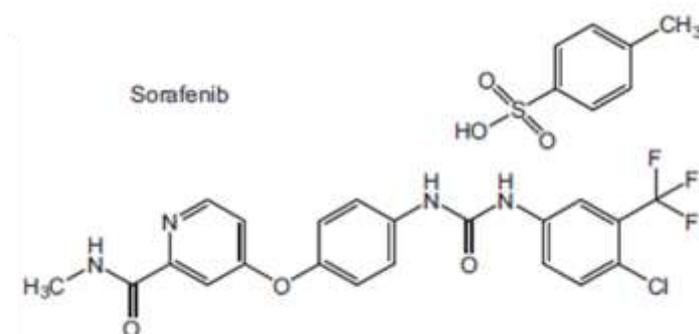


Figura 12. Struttura chimica di Sorafenib (Kim A et al., 2009).

Il Sorafenib è un **inibitore multi-chinasico** di piccole dimensioni ed a basso peso molecolare in grado di interferire con il sito attivo intracellulare dei recettori in genere tirosin-chinasici impedendo l'attivazione del meccanismo di trasduzione del segnale (Rini BI, 2007; Liu L et al., 2006; Kim S et al., 2007).

Ha come bersaglio sia la cellula tumorale che la vascolatura del tumore, è in grado di colpire i componenti di due classi di chinasi note per essere coinvolte nella **proliferazione cellulare** e nell'**angiogenesi** (Figura 13):

- **Proteine trasduttrici del segnale:** inibisce le serine/treonine chinasi di *Raf*, inibendo di conseguenza la via di traduzione del segnale delle MAP Chinasi (mitogen-activated protein kinase) che coinvolge la fosforilazione di MEK ed ERK, bloccando la proliferazione cellulare. Modelli preclinici hanno anche dimostrato che la via Ras/Raf/MEK/ERK ha un ruolo fondamentale nel HCC; di conseguenza, il blocco del segnale attraverso *Raf-1* può offrire notevoli vantaggi terapeutici (Liu L et al., 2006; Kim S et al., 2007; Wilhelm SM et al., 2004; *Wilhelm SM et al., 2008).
- **Recettori dei fattori di crescita,** il farmaco inibisce l'attività di recettori tirosin chinasi come ad esempio: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, FLT-3 e Ret. Bloccando l'attività di questi recettori si può indurre la morte delle cellule tumorali e/o ridurre il processo di angiogenesi (Kim S et al., 2007; Liu L et al., 2006; Wilhelm SM et al., 2004; *Wilhelm SM et al., 2008).

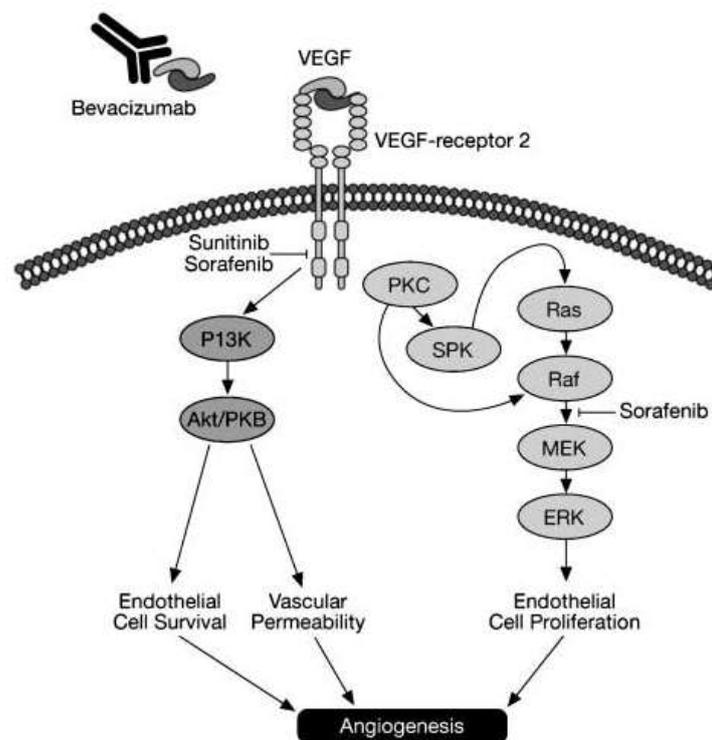


Figura 13. Siti d'azione di Sorafenib. Sorafenib blocca la fosforilazione e l'attivazione del recettore tirosin chinasi VEGFR-2 e la via del segnale delle MAP Chinasi (Ras/Raf/MEK/ERK) inibendo Raf (Rini BI, 2007)

Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che sorafenib contrasta la crescita tumorale e ne distrugge il microcircolo attraverso gli effetti antiproliferativi, antiangiogenici e/o proapoptotici (*Wilhelm SM et al., 2008).

Sorafenib può essere perciò considerato un inibitore della crescita neoplastica, infatti agisce contro i tumori in modo più selettivo rispetto alla chemioterapia, in quanto riconosce alcune proteine che si trovano sulla parete delle cellule tumorali o all'interno della cellula, ovvero blocca i meccanismi con i quali le cellule si riproducono; siccome queste proteine si trovano solo in piccola parte anche sulle cellule sane, ne risulta che l'azione è potenzialmente mirata verso le sole cellule tumorali (Ramakrishnan V et al., 2010; Wang Z et al., 2008).

Le reazioni alla terapia con Sorafenib variano da individuo a individuo (Kim A et al., 2009). Gli effetti collaterali comuni sono: astenia e anoressia, dolore e arrossamento del palmo della mano e della pianta del piede (sindrome mano-piede), eruzioni cutanee, ipertensione, diarrea, dolore o ulcere del cavo orale, nausea e vomito, modificazioni dell'udito, crampi muscolari.

Gli effetti collaterali meno frequenti sono: stitichezza, sanguinamento, modificazioni dell'attività cardiaca, difficoltà respiratorie, dolore di tipo anginoso, ipotensione; temporanea riduzione della produzione di cellule da parte del midollo osseo: leucopenia (diminuzione dei globuli bianchi) e la linfoenia (diminuzione dei linfociti) (Kim A et al., 2009; Dal Lago L et al., 2008).

Sebbene i pazienti con tumori solidi refrattari in stadio avanzato abbiano una prognosi sfavorevole, lo sviluppo clinico degli inibitori chinasi offre speranze per il trattamento futuro di molti tipi di cancro. I molteplici target molecolari del Sorafenib (serina/treonina Raf chinasi e recettori tirosin-chinasi) che agiscono sull'inibizione delle funzioni proliferative, angiogenetiche ed apoptotiche, possono spiegare la sua diffusa attività preclinica e clinica (Wilhelm SM et al., 2004; Berruti A et al., 2012).

Il meccanismo che produce l'attività pro-apoptica del Sorafenib non è ad oggi ben conosciuto, ma è noto che l'attività aumenta significativamente se si affianca il trattamento del farmaco con la classica chemioterapia o con altri inibitori delle vie di traduzione del segnale, come ad esempio **inibitori di mTOR** (mammalian target of rapamycin inhibitor) (Dal Lago L et al., 2008; Wang Z et al., 2008).

10) Everolimus

Il farmaco Everolimus [RAD001; (40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin)] della casa farmaceutica Novartis Pharma è un derivato semisintetico della rapamicina (**Figura 14 B**) (Atkins MB et al., 2009; Houghton PJ, 2010; Agarwala SS et al., 2010).

Everolimus è farmaco somministrabile per via orale recentemente approvato dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) e dall'European Medicines Agency (EMA) per il trattamento dei carcinomi renali (RCC) in fase avanzata dopo il fallimento del trattamento con Sorafenib e Sunitinib (Yuan R et al., 2009).

Everolimus è un macrolide in grado di inibire **mTOR** (mammalian Target Of Rapamicine), un enzima chiave situato a valle di VEGFR-2, coinvolto nella sopravvivenza cellulare, nella trasduzione e nell'attivazione della trascrizione del segnale di proliferazione cellulare trasmesso da molti fattori di crescita; quindi è in grado di bloccare la produzione di fattori pro-angiogenici in molti tumori neuroendocrini (Huang S et al., 2003; Hudes GR, 2009).

La via di trasduzione **PI(3)K/Akt/mTOR** è cruciale per la regolazione della proliferazione cellulare; mTOR viene principalmente attivato dalla via chinasi di PI(3) chinasi attraverso Akt/PKB ed il complesso TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) (**Figura 14 A**) (Atkins MB et al., 2009).

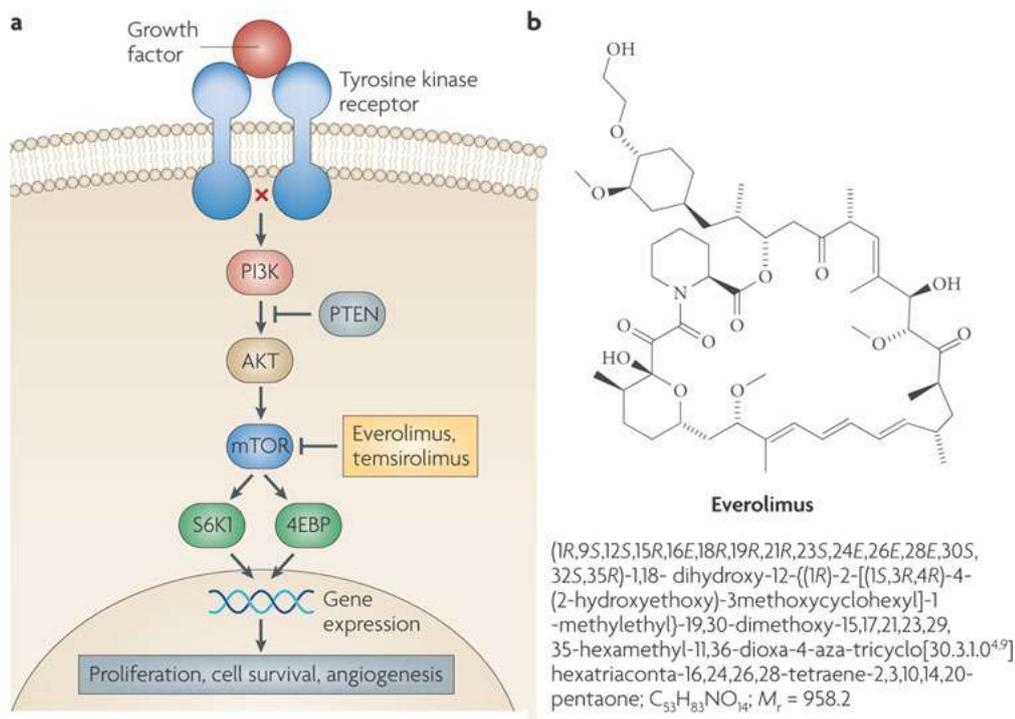
L'alterazione funzionale di vari componenti delle vie di signaling contribuisce al ruolo della via PI(3) chinasi/Akt nello sviluppo dei tumori (Huang S et al., 2003; Hudes GR, 2009; Yuan R et al., 2009). Le neoplasie che presentano un'attivazione costitutiva della via PI(3)K/Akt/mTOR sono molto sensibili agli inibitori di mTOR come Everolimus, farmaco attualmente impiegato in alcuni studi clinici di fase II per vari tipi di tumori, tra i quali i tumori neuroendocrini (NETs) (Agarwala SS et al., 2010; Zitzmann K et al., 2007; De Martino MC et al., 2010).

Il farmaco Everolimus, a livello intracellulare si lega a una proteina citoplasmatica chiamata FKBP12 (FK Binding Protein 12), formando un complesso stabile che inibisce mTOR; viene perciò considerato un potente inibitore di mTOR in quanto produce una inibizione della proliferazione in molte linee cellulari tumorali *in vitro* (ad esempio carcinomi del polmone, del seno, della prostata, del colon, melanoma e glioblastoma) ed *in vivo* in un ampio range di tumori animali (Klumpen HJ, 2010).

Il farmaco Everolimus è studiato come farmaco antitumorale per la sua capacità d'azione:

- diretta sulla cellula tumorale inibendone la crescita e la proliferazione (Huang S et al., 2003; Hudes GR, 2009);

- indiretta inibendo l'angiogenesi con una riduzione della vascolarità tumorale (mediante l'inibizione della produzione di VEGF e della proliferazione delle cellule endoteliali indotta dal VEGF) (Guba M et al., 2002). Il ruolo dell'angiogenesi nel mantenimento della crescita dei tumori solidi è noto e la via di mTOR è implicata nella regolazione della produzione di fattori pro-angiogenici da parte del tumore così come nella modulazione del segnale di VEGF nelle cellule endoteliali (Wang Z et al., 2008; Bader AG et al., 2006; Zattelli MC et al., 2010).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 14. (A) Sito d'azione di Everolimus che interviene bloccando la via del segnale di PI(3)K/Akt/mTOR. (B) Struttura chimica di Everolimus (Atkins MB et al., 2009).

In pazienti che assumono Everolimus si è osservata una bassa incidenza di eventi avversi farmaco-correlati benché i più frequenti siano: ulcerazioni alla bocca, sensazione di debolezza, spossatezza, infiammazione polmonare, diarrea, infiammazione mucosale, vomito e difficoltà respiratorie (Zitzmann K et al., 2007; Klumpen HJ, 2010; Agarwala SS et al., 2010).

A causa dell'importante ruolo che la proteina chinasi mTOR svolge nella regolazione della crescita, nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, l'utilizzo del farmaco Everolimus su mTOR potrebbe rappresentare un nuovo target terapeutico (Yuan R et al., 2009; Bader AG et al., 2006; De Martino MC et al., 2010).

Regolatore fondamentale di questa via del segnale è il **gene Ras**, mutato in circa il 15% dei tumori umani (Davies H et al., 2002). La famiglia dei geni *Ras* è composta da tre membri, denominati *H-RAS*, *K-RAS* ed *N-RAS* e sono geni localizzati rispettivamente a livello dei cromosomi 11p15.5, 12p12.1 e 1p13.2. I geni *Ras* codificano proteine GTPasi a basso peso molecolare che agiscono nella membrana citoplasmatica passando dalla forma inattiva che lega GDP alla forma attiva che lega GTP. Questo switch molecolare è coinvolto nelle vie di segnalazione che modulano la proliferazione, il differenziamento, la motilità e la morte cellulare (Herbet M et al., 2009; Kirschner LS, 2002).

A causa del ruolo fondamentale di queste proteine esse sono state analizzate in un grande numero di tumori, ma per quanto riguarda i tumori corticosurrenali in letteratura sono presenti lavori con dati contrastanti ed ulteriori studi potrebbero fare luce su questa importante famiglia di geni (Libè R et al., 2007). Come evidenziato in precedenza, in uno studio condotto da Yashiro e collaboratori si identificano mutazioni attivanti il gene *N-Ras* in circa il 12.5% degli ACC e degli ACA analizzati, mentre non si osservano mutazioni in *K-Ras* e *H-Ras* (Yashiro T et al., 1994). Lin ed il suo gruppo di ricerca invece riscontrano circa il 46% (6 su 13) degli adenomi con sindrome di Conn possedenti mutazioni del gene *K-Ras*, ma non riscontrano mutazioni nel gene *N-Ras* (Lin SR et al., 1998). Al contrario, in un piccolo gruppo di tumori, Moul e colleghi non trovano nessuna mutazione nei geni della famiglia *Ras*, come evidenziato in un altro studio di 40 tumori corticosurrenali, analizzati per il gene *K-Ras* da Ocker e collaboratori (Moul TW et al., 1993; Ocker M et al., 2000). Recentemente un'analisi di Kotoula ed il suo gruppo di studio, su 35 campioni di ACC, ha osservato mutazioni del gene *K-Ras* solo in un ACC e 2 mutazioni del gene *N-Ras* in uno stesso campione di ACC (Kotoula V et al., 2009).

La famiglia delle **serine/threonine Raf chinasi** comprende *A-RAF*, *B-RAF* e *C-RAF*: quest'ultime hanno un importante ruolo nella via del segnale delle MAP chinasi. Le mutazioni attivanti l'oncogene ***BRAF*** hanno un ruolo centrale nello sviluppo di vari tipi di tumore, ma la sua funzione negli ACT è ancora da chiarire. Le mutazioni attivanti *BRAF* sono comuni nel melanoma, nel carcinoma papillare della tiroide, nei carcinomi del fegato, polmone, mammella, ovaio, colon-retto e nei gliomi (Davies H et al., 2002). La mutazione più frequente del gene *BRAF* è l'alterazione nucleotidica T1799A, che produce una sostituzione amminoacidica di una valina con un acido glutammico (V600E). L'alterazione produce l'attivazione di *BRAF*, generando una proteina con una elevata attività enzimatica e l'attivazione costitutiva di ERK. Questa mutazione induce senescenza in tumori benigni melanocitici, promuove la crescita cellulare e la proliferazione in altri tumori. *BRAF* rappresenta perciò un promettente target per lo sviluppo di terapie anti-tumorali (Cantwell-Dorris ER et al., 2011).

Nei tumori corticosurrenatici le mutazioni del gene *BRAF* potrebbero indurre un fenotipo molto aggressivo ed altamente proliferativo, dando luogo così all'accumulo di ulteriori anomalie genetiche. Finora solo studi a numerosità limitata hanno riscontrato alterazioni del gene *BRAF*; tali eventi perciò devono essere perciò analizzati in modo più dettagliato (Kotoula V et al., 2009; Masi G et al., 2009; Adam P et al., 2010).

12) Via del segnale di Wnt/ β -catenina (Wnt/ β -catenin signaling pathway) nei tumori corticosurrenatici

La via del segnale di Wnt/ β -catenina ha un ruolo fondamentale nella genesi della corteccia surrenalica ed è normalmente attiva durante lo sviluppo embrionale. Regola numerosi processi che promuovono la proliferazione cellulare, l'adesione e la determinazione del destino cellulare (*Berthon A et al., 2012; El Wakil A et al., 2010). Recentemente è stato dimostrato che l'attivazione di questa importante via del segnale è frequente sia nei tumori corticosurrenatici benigni che maligni (*Tissier F et al., 2005; Bonnet S et al., 2011).

Le molecole segnale di questa via sono i membri della famiglia Wnt, i quali legano i recettori Frizzled e LDL-receptor related protein 5 e 6 (LRP 5/6) posti sulla superficie cellulare e danno inizio alla cascata di segnali citoplasmatici.

- In assenza del segnale di Wnt il livello di β -catenina è basso, la quale viene fosforilata al residuo NH_2 terminale dal legame con Glycogen Synthase 3- β (GSK3- β) ed immobilizzata in un complesso formato da Axin e dall'oncosoppressore Adenomatous Polyposis Coli (APC). Successivamente la proteina fosforilata è degradata dal sistema ubiquitina-proteosoma (**Figura 16 A**) (Tadjine M et al., 2008).
- La stimolazione da parte di Wnt porta invece all'inibizione di GSK3- β e alla stabilizzazione della β -catenina nel citoplasma. Se non viene distrutta, la β -catenina trasloca nel nucleo, dove aumenta l'espressione genica interagendo con vari fattori di trascrizione e coattivatori, incluso i membri della famiglia T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF), fattori Smad e SF-1 nelle cellule steroidogeniche. Tra i target di attivazione del complesso TCF/ β -catenina vi sono geni che guidano la proliferazione cellulare (*c-Myc*, *ciclina D1*) e l'angiogenesi (*VEGF*) (**Figura 16 B**) (Gaujoux S et al., 2008; Bonnet S et al., 2011).

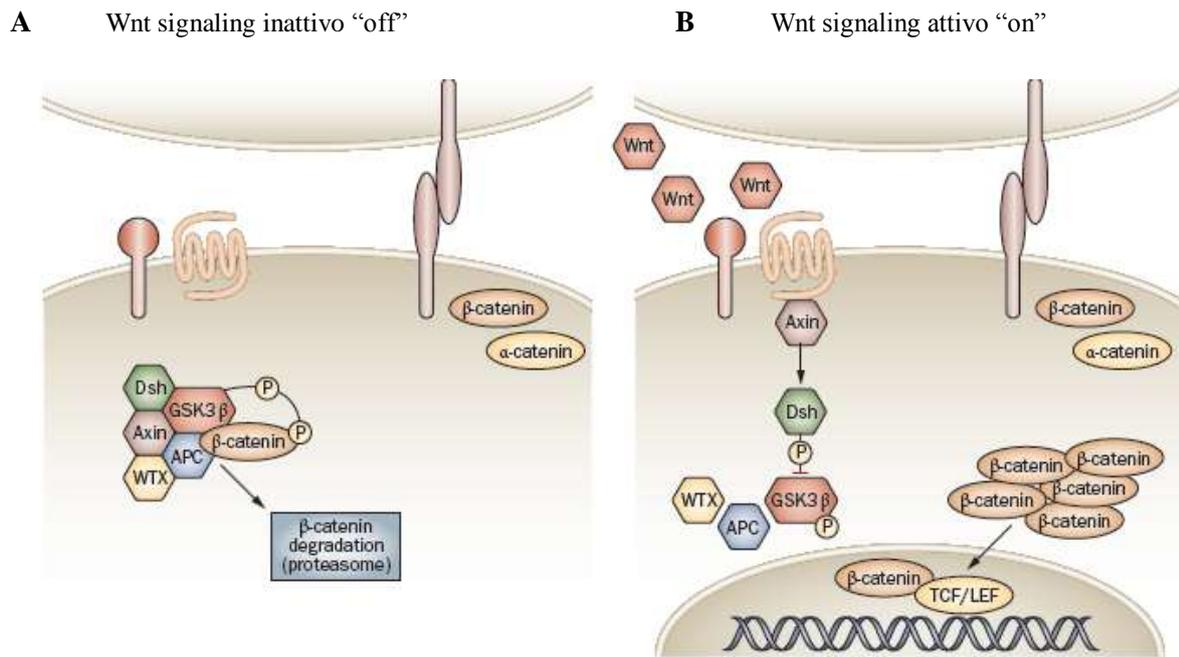


Figura 16. Via del segnale di Wnt/β-catenina (Wnt/β-catenina signaling pathway). (A) In assenza dello stimolo e dell'attivazione della via del segnale la β-catenina è degradata attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma. (B) In presenza dello stimolo di Wnt o in presenza di mutazioni che alterano il sito di degradazione della β-catenina, la proteina è in grado di accumularsi nel citoplasma e di essere traslocata nel nucleo promuovendo la trascrizione genica (*Fassnacht M et al., 2011).

Mutazioni attivati l'oncogene *CTNNB1*, che codifica per la β-catenina, sono eventi comuni nella tumorigenesi surrenalica; in effetti le mutazioni riscontrate nelle forme benigne e maligne degli ACC sono circa il 20% (Mazzuco TL et al., 2012; Masi G et al., 2009).

Come in altri tipi di tumori, le mutazioni colpiscono l'esone 3 del gene *CTNNB1* in specifici residui di serina o treonina o aminoacidi a loro adiacenti, che sono un punto cruciale per la degradazione della β-catenina, producendo così un'attivazione costitutiva della via del segnale di Wnt ed un accumulo citoplasmatico e/o nucleare con un aumento dell'attività trascrizionale (Durand J et al., 2011; §Gaujoux S et al., 2011). Inoltre, l'accumulo nucleare presente in numerosi pazienti con ACC è stato recentemente associato ad un fenotipo più aggressivo ed a una prognosi peggiore: la sopravvivenza media (overall survival) e la sopravvivenza libera da malattia (disease-free survival) sono significativamente più brevi (§Gaujoux S et al., 2011; Ragazzon B et al., 2010).

Anche negli ACC pediatrici sono presenti alterazioni della via del segnale di Wnt/β-catenina ma, anche se associate ad una prognosi peggiore, le mutazioni nei tumori pediatrici sono meno frequenti rispetto alle alterazioni riscontrate negli ACC adulti (Leal LF et al., 2011).

La tecnica immunohistochimica può essere usata per localizzare la proteina e potrebbe essere quindi un marker di attivazione della via del segnale. Quando il sistema non è attivo, la β -catenina è localizzata in prossimità della membrana cellulare, legata in un complesso con le caderine mentre dopo l'attivazione o a causa di un difetto genico e/o strutturale la proteina è visibile nel citoplasma e/o nel nucleo. In alcuni tumori corticosurrenalici è riscontrato un anormale accumulo citoplasmatico e/o nucleare della β -catenina, in particolare nel 40% degli ACA ed in circa l'80% degli ACC (Durand J et al., 2011; Tadjine M et al., 2008).

Nello sviluppo dei tumori corticosurrenalici la β -catenina potrebbe quindi avere un ruolo fondamentale, come inizialmente suggerito dall'effetto di PKF115-584, un inibitore dell'interazione β -catenina/TCF, il quale riduce marcatamente la proliferazione delle cellule H295R (Doghman M et al., 2008). Il gruppo di ricerca di Berthon ha recentemente confermato l'ipotesi in topi transgenici nei quali è costitutivamente attivata l'espressione della β -catenina nella corteccia surrenalica: questa attivazione comporta iperplasia surrenalica e displasia in tutti gli animali transgenici dimostrando perciò il ruolo della costitutiva attivazione di β -catenina come evento iniziale della tumorigenesi surrenalica. Comunque, solo il 30% dei topi transgenici sviluppa il fenotipo maligno dopo circa 17-18 mesi. Questo suggerisce che altre alterazioni geniche devono essere acquisite per giungere alla formazione del carcinoma corticosurrenalico (Berthon A et al., 2010).

Sono state riscontrate mutazioni in altri componenti della via del segnale di Wnt, come ad esempio nei geni *APC* e *AXIN2*; il gene *APC* potrebbe essere un buon candidato ma in uno studio di Gaujoux e collaboratori è riportata la presenza di solo una mutazione silente nell'analisi di 20 ACC (*Gaujoux S et al., 2010). Recentemente un altro gruppo di ricerca ha individuato alterazioni nel gene *AXIN2* in 2 su 20 adenomi (7%), in 1 su 6 ACC (17%) e nelle linee corticosurrenaliche stabili H295R sempre in associazione con l'accumulo proteico citoplasmatico, ma la precisa funzione del gene *AXIN2* rimane ancora da determinare (Chapman A et al., 2011).

12.1 Wnt/ β -catenina signaling pathway ed angiogenesi

La **β -catenina** è il principale componente della via del segnale di Wnt in cui regola numerosi processi di proliferazione e differenziamento cellulare. L'attivazione di questa via del segnale comporta la stabilizzazione della β -catenina citoplasmatica e la sua traslocazione nel nucleo, dove si lega ai fattori: "T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)" promuovendo la trascrizione e l'espressione di alcuni geni target, come ad esempio il **fattore di crescita vascolare endoteliale**

(*VEGF*), *ciclina D-1*, *c-myc*, *fibronectina* ed alcune metalloproteinasi (MMP-7) (**Figura 17**) (Goodwin AM et al., 2002).

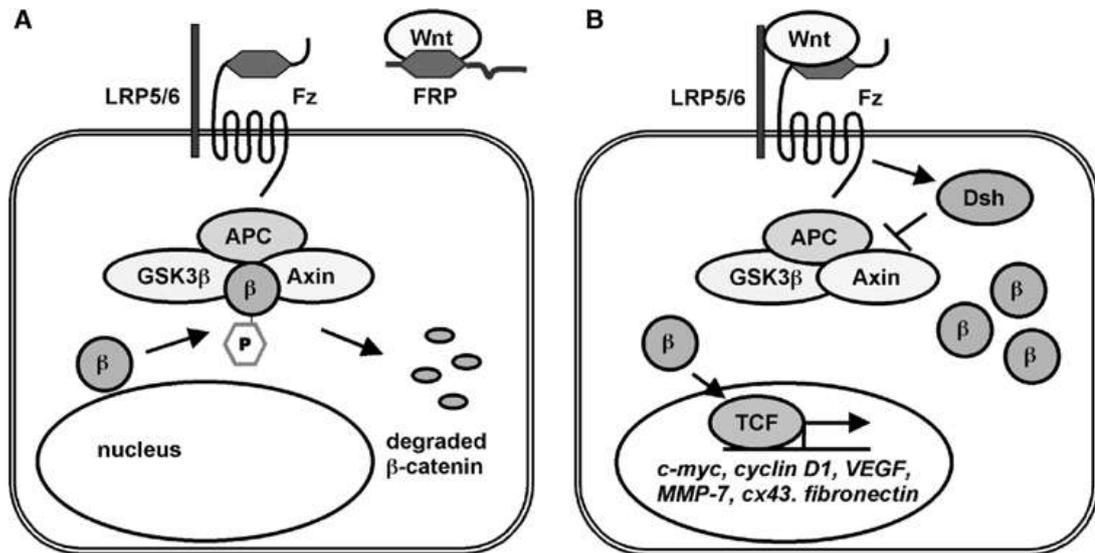


Figura 17. Wnt/β-catenin signaling pathway. (A) In assenza del segnale di Wnt la β-catenina è fosforilata da un complesso formato dalle proteine APC, GSK3-β e Axin; in questo modo la β-catenina fosforilata è rapidamente degradata. (B) Quando Wnt si lega ai recettori Frizzled (Fzd) ed a LDL-receptor related protein 5 e 6 (LRP 5/6), Dsh inattiva il complesso di fosforilazione, la β-catenina si accumula nel citoplasma e successivamente trasloca nel nucleo legandosi a TCF e promuovendo la trascrizione di numerosi geni come ad esempio: *c-myc*, *ciclina-D1*, *cox-2*, *VEGF* (Goodwin AM et al., 2002).

La via del segnale Wnt/β-catenina possiede un importante ruolo anche nella vascolarizzazione e nella formazione di nuovi vasi sanguigni; ciò è supportato dall'identificazione di alcuni geni target di Wnt che codificano per regolatori angiogenici. Tra i principali geni target della via del segnale di Wnt/β-catenina è riscontrato il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), un potente fattore angiogenico associabile all'angiogenesi tumorale ed una prognosi peggiore (Goodwin AM et al., 2002; Ge X et al., 2010; Folkman J, 2002; Dilek FH et al., 2010).

Zhang e collaboratori nel 2001 dimostrarono come l'espressione di VEGF sia modulata dalla β-catenina nei tumori del colon: la β-catenina traslocando nel nucleo si lega a importanti sequenze promotoriali del gene *VEGF* (Zhang X et al., 2001). Easwaran ed il suo gruppo di studio nel 2003 comprovò che la β-catenina è in grado di legarsi a ben 7 sequenze di legame (β-catenina/TCF binding sites) a livello del promotore del gene *VEGF* promuovendo così l'espressione di VEGF (Easwaran V et al., 2003). Sembra quindi esserci una correlazione molto importante tra la via del segnale di Wnt/β-catenina e l'espressione di VEGF, effetto mai verificato nei tumori corticosurrenali (Zhang X et al., 2001; Easwaran V et al., 2003; Dilek FH et al., 2010; Matono H et al., 2011).

12.2 Wnt/ β -catenin signaling pathway ed adesione cellulare

La β -catenina è una **proteina multifunzionale**: può essere associata alle molecole di adesione cellulare (le caderine) a livello della membrana cellulare, mentre la forma citoplasmatica può traslocare nel nucleo ed agire come un importante fattore di trascrizione genico (*Berthon A et al., 2012). Quando associata alle caderine la β -catenina è coinvolta nei processi di **adesione cellula-cellula**; la distruzione di questa interazione è un evento riscontrabile nella progressione maligna di molti tumori epiteliali (Conacci-Sorrell M et al., 2002; Nelson WJ et al., 2004).

I processi di adesione e di interazione cellula-cellula giocano un ruolo molto importante nello sviluppo embrionale, nella differenziazione e nella regolazione dell'architettura tissutale. La distruzione dell'adesione cellula-cellula durante la tumorigenesi è alla base dei processi di invasione e metastasi delle cellule tumorali (Gloushankova NA, 2007).

La maggior parte delle proteine di adesione, chiamate anche CAM (Cell Adhesion Molecules, molecole di adesione cellulare), può essere classificata in quattro principali famiglie: la famiglia delle immunoglobuline CAM, le caderine, le integrine e le selectine. Le caderine e le integrine collegano la superficie cellulare con il citoscheletro attraverso il loro legame con l'actina e i filamenti intermedi. Il nome caderina deriva dalla definizione "proteina di adesione calcio-dipendente". Questa famiglia comprende più di 90 membri che partecipano all'interazione tra cellule svolgendo un ruolo fondamentale nella mobilità cellulare, nella proliferazione e nel differenziamento; inoltre garantiscono l'inibizione della proliferazione cellulare che si verifica quando le cellule normali in coltura si trovano a contatto tra di loro (inibizione da contatto) (Robbins SL et al., 2005).

Le principali molecole responsabili dell'adesione cellulare sono le caderine, proteine transmembrana che in presenza di ioni Ca^{2+} formano le **giunzioni aderenti** associandosi a proteine citoplasmatiche (ad esempio la β -catenina) ed a microfilamenti di actina (Gloushankova NA, 2007).

Le caderine più studiate sono **E-caderina** (epithelial-cadherin, caderina epiteliale), **N-caderina** (neural-cadherin, caderina neuronale) e **P-caderina** (placental-cadherin, caderina placentale). La E-caderina è fondamentale in cellule epiteliali per il processo di adesione cellulare e per l'integrità tissutale mentre la N-caderina, originariamente scoperta nei tessuti neuronali, è espressa in vari tessuti non neuronali, come ad esempio nel muscolo cardiaco, nei testicoli, nel rene e nel fegato (Tsuchiya B et al., 2006).

Le caderine sono molecole proteiche situate nella membrana plasmatica e formate da 3 porzioni: extracellulare, transmembrana ed intracellulare. La porzione extracellulare consiste in 5 domini formati ognuno da 110 aminoacidi; tra questi domini sono presenti 4 importanti siti di legame

con il Ca^{2+} . Il dominio citoplasmatico, altamente conservato, possiede un sito di legame per la p120-catenina ed un sito di legame per la β -catenina, con la quale regola l'adesione cellulare. Le caderine quindi attraverso il legame con molteplici proteine, tra cui β -catenina, plakoglobin e α -catenina, si legano ai filamenti di actina stabilizzando la struttura delle giunzioni aderenti (**Figura 18**) (Gloushankova NA, 2007; Fu Y et al., 2011).

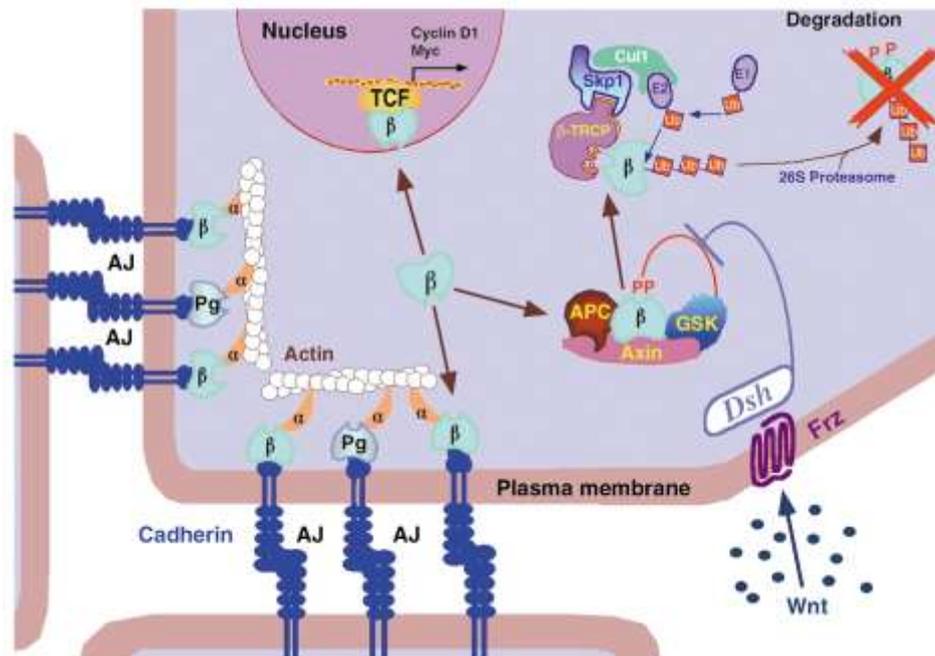


Figura 18. Doppio ruolo della β -catenina nell'adesione cellulare e nell'attivazione dell'attività trascrizionale. β -catenina (β) e plakoglobin (Pg) si legano alle caderine nella membrana cellulare ad attraverso α -catenina (α) sono associate all'actina citoplasmatica per formare giunzioni aderenti (Conacci-Sorrell M et al., 2002).

La diminuzione dell'espressione delle caderine promuove la tumorigenesi rilasciando la β -catenina, legata alla membrana nelle giunzioni aderenti, libera di migrare nel citoplasma ed attivare la via del segnale di Wnt e la trascrizione genica. La β -catenina utilizza lo stesso sito di legame sia per interfacciarsi con le caderine sia per interagire con TCF, fattore di trascrizione nucleare; questo indica perciò che le caderine hanno la funzione di immagazzinamento della β -catenina e quando il livello soglia è oltrepassato la β -catenina può avere il libero accesso al nucleo, legarsi a TCF e dare inizio alla trascrizione. Il distacco della β -catenina dalle caderine però non è sufficiente singolarmente per innescare l'attivazione della via del segnale di Wnt quando il sistema di degradazione è intatto, ma è in grado di amplificare notevolmente il segnale quando la via è già colpita da mutazioni di oncogeni, oncosoppressori o è già attivata in modo anomalo da fattori promuoventi la stessa via di Wnt/ β -catenina (Gottardi CJ et al., 2001; Jeanes A et al., 2008).

Gli studi che valutano l'espressione delle molecole di adesione cellulare della porzione corticale della ghiandola surrenalica e dei tumori corticosurrenalici sono limitati. Tsuchiya e collaboratori nel 2006 dimostrano come nella ghiandola surrenalica normale sia riscontrata l'espressione solo di N-caderina e non di E-caderina nelle porzioni corticale e midollare della ghiandola surrenalica (Tsuchiya B et al., 2006); mentre Khorram-Manesh ed il suo gruppo di studio osserva come vi sia l'assenza dell'espressione della molecola E-caderina in tutti i tessuti surrenalici normali e patologici, sia midollari che corticali, una overespressione di N-caderina nei feocromocitomi maligni ed una down-espressione di N-caderina nei carcinomi corticosurrenalici (Khorram-Manesh A et al., 2002). Ulteriori studi su tumori corticosurrenalici confermano l'assenza dell'espressione della E-caderina (Gupta D et al., 2001; Waldmann J et al., 2008) e la downregolazione di N-caderina negli ACC (Velázquez-Fernández D et al., 2005); il gruppo di ricerca di Yarom osserva invece l'overespressione di N-caderina in un ACC e tenta un trattamento adiuvante con ADH-1 (inibitore di N-caderina) ma con scarsi risultati (Yarom N et al., 2011).

Attualmente, l'elevato accumulo della β -catenina dovuto alla sua dissociazione dalle caderine è un evento frequentemente osservato durante la tumorigenesi di alcuni tumori del colon o di tumori epiteliali della mammella (Mariotti A et al., 2007); può essere perciò ritenuto un promettente target terapeutico nei tumori corticosurrenalici.

12.3 XAV939

Il farmaco XAV939 o 2-(4-Trifluoromethyl)phenyl)-7,8-dihydro-5H-tiopyrano-[4,3-d]pyrimidin-4ol (Sigma) è una piccola molecola inibitore della via del segnale di Wnt/ β -catenina (**Figura 19**) (Karlberg T et al., 2010).

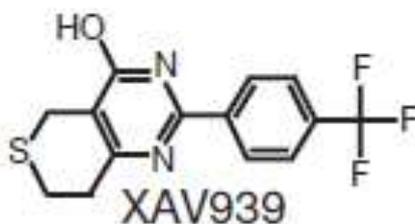


Figura 19. Struttura chimica dello XAV-939 (Huang SM et al., 2009).

È in grado di stimolare la degradazione della β -catenina stabilizzando Axin, un componente del complesso di degradazione proteico. In particolar modo, XAV939 inibisce gli enzimi tankyrase I e tankyrase II poli-ADP-ribosolati (TANKS), due isoforme enzimatiche che interagiscono con il

dominio altamente conservato di axin e stimolano la sua degradazione attraverso la via dell'ubiquitinazione e del proteosoma. Promuovendo la diminuzione dell'accumulo citoplasmatico di β -catenina, XAV939 è in grado di inibire selettivamente la trascrizione mediata dalla β -catenina (Huang SM et al., 2009; Fancy SP et al., 2011).

L'effetto di inibizione degli enzimi tankyrasi I e II con l'induzione della stabilizzazione di Axin2 è stato recentemente studiato in cellule di carcinoma della mammella, in cui si è osservato un blocco della via del segnale di Wnt (Bao R et al., 2012).

Da questi presupposti, l'utilizzo di nuovi farmaci in grado di intervenire sulla via del segnale di Wnt/ β -catenina, potrebbe rappresentare un valido mezzo per giungere a nuove ed efficaci strategie nell'ambito di questi tumori.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è stato quello di ricercare e studiare la presenza di nuovi target molecolari, indagare ed approfondire la patogenesi corticosurrenalica ed individuare nuovi fattori prognostici e terapeutici correlandoli eventualmente con l'aspetto clinico/patologico.

In particolar modo questo studio si focalizza:

- Sull'analisi del **profilo angiogenetico**, valutando l'espressione di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 negli ACT.
- Sulla valutazione degli effetti di **nuovi farmaci**, everolimus e sorafenib, sulla vitalità cellulare, sull'apoptosi e su alcune pathways cellulari in linee stabilizzate (H295R, SW13), in colture primarie di tumori corticosurrenalici ed in modelli murini di ACC.
- Sui meccanismi molecolari alla base della **tumorigenesi corticosurrenalica**, analizzando le alterazioni geniche nei componenti chiave della via del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK (studiando i geni *B-RAF*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*) e nella via del segnale di Wnt/ β -catenina (analizzando i geni *CTNNB1* e *AXIN-2*).
- Sull'indagine dell'**espressione** della **β -catenina** in relazione alle **molecole di adesione cellulare** ed alla modulazione della via del segnale di Wnt/ β -catenina grazie all'utilizzo del farmaco XAV939.

MATERIALI E METODI

1. Raccolta dei tessuti dai pazienti colpiti da tumori alla ghiandola surrenale

Sono stati raccolti 24 carcinomi corticosurrenalici (adrenocortical carcinoma, ACC), 37 adenomi secernenti aldosterone (aldosterone producing adenoma, APA), 28 adenomi secernenti cortisolo (cortisol producing adenoma, CPA) e 6 adenomi non secernenti (non-secreting adenoma, NSA). Inoltre sono stati studiati 8 campioni di surrene normale (normal adrenal, NA) ottenuti da pazienti sottoposti a trapianto renale.

Nei 24 carcinomi, 5 sono allo stadio II mentre gli altri 19 sono allo stadio IV (**Tabella 4**). I 71 adenomi corticosurrenalici analizzati sono stati suddivisi in base alla eccessiva o assente secrezione ormonale (**Tabella 5**).

Dopo l'operazione chirurgica, una porzione di tessuto è riposta in RNA-Later (Pierce-Ambion) e conservata a -20°C per le successive analisi di espressione genica. L'RNA-Later è un reattivo utilizzato per la conservazione di tessuti freschi che permeando rapidamente all'interno dei campioni ne stabilizza e protegge l'RNA. Una parte di tessuto è invece congelata in azoto liquido e conservata a -80°C ; le porzioni rimanenti sono utilizzate per le analisi di immunistochimica, per le colture cellulari primarie e per le estrazioni di acidi nucleici e di proteine.

Tutti i pazienti firmano un consenso informato che li mette a conoscenza dell'utilizzo del tessuto surrenalico per scopi di ricerca e lo studio è approvato dai comitati etici locali.

Tabella 4. Dati clinico-patologici e genetici dei pazienti colpiti da **tumori corticosurrenalici** (N=95).

Parameter	Adrenocortical carcinomas (ACC)	Adrenocortical adenomas (ACA)
	24	71
Female/Male	14/10	45/26
Median age (range)	53 yr (1-80 yr)	49 yr (21-80yr)
Median tumor size (range)	83 mm (40-150 mm)	27 mm (5-60 mm)
<i>β-catenin</i> mutations (percentage of total mutations)	5/24 (20%)	13/71 (18.3%)
Function		
Cortisol-producing	9	25
Cortisol-and androgen-producing	8	3
Aldosterone-producing	-	36
Aldosterone-and cortisol producing	-	1
Testosterone-producing	-	-
Non-functioning	7	6
Tumor stage (ENSAT stage):		
I	-	
II	5	
III	-	
IV	19	

Tabella 5. Dati clinico-patologici e genetici di pazienti colpiti da **adenomi corticosurrenali** (N=71).

Adrenocortical adenomas (ACA)	Aldosterone-producing adenomas (APA)	Cortisol-producing adenomas (CPA)	Non-secreting adenomas (NSA)
	37	28	6
Female/Male	22/15	20/8	3/3
Madian age (range)	48 yr (22-77yr)	48 yr (21-73yr)	57 yr (39-80yr)
Median tumor size (range)	20 mm (10-40 mm)	36 mm (10-60 mm)	43 mm (40-50 mm)
<i>β-catenin</i> mutations (percentage of total mutations)	5/37 (13.5%)	6/28 (21.4%)	2/6 (33.3%)
Function:			
Cortisol-producing	-	25	-
Cortisol-and androgen-producing	-	3	-
Aldosterone-producing	36	-	-
Aldosterone- and cortisol-producing	1	-	-
Testosterone-producing	-	-	-
Non-functioning	-	-	6

2. Estrazione acidi nucleici dai campioni biologici corticosurrenali

2.1 Estrazione DNA

L'estrazione del DNA dal tessuto patologico tumorale è stata eseguita utilizzando il protocollo del kit QIAmp DNA tissue mini Kit (Qiagen). La procedura di purificazione comprende 4 fasi: lisi del campione biologico, assorbimento/legame del DNA alla membrana di silicio contenuta nella colonnina QIAamp, lavaggio e rimozione dei residui contaminanti, eluizione del DNA.

2.2 Estrazione RNA attraverso RNeasy® Mini Kit (Quiagen)

L'estrazione dell'RNA dai campioni tumorali e dalle ghiandole surrenali normali è effettuata utilizzando l'RNeasy® Mini Kit (Quiagen). I campioni, di circa 30 mg, vengono sminuzzati, lisati ed omogeneizzati all'interno di una soluzione altamente denaturante, contenente guanidina-tiocianato,

che permette di inattivare immediatamente le RNasi che potrebbero danneggiare l'RNA. Dopo una centrifugazione di 3' a 14000 rpm il sovrantante è rimosso e viene trasferito in una nuova provetta ed addizionato di un pari volume di etanolo 70% indispensabile per creare le condizioni che favoriscono il legame selettivo dell'RNA. Il tutto viene successivamente posto all'interno di una colonnina (Rnasy Mini spin column). L'RNA è così intrappolato nella colonna che possiede una membrana di silice mentre i contaminanti sono efficacemente eliminati attraverso vari lavaggi con buffer di composizione diversa e successive centrifugazioni. L'RNA viene infine diluito con 30-50 µl di acqua RNase-free e successivamente quantificato attraverso lettura spettrofotometrica.

2.3 Estrazione RNA tramite TRIZOL

L'estrazione dell'RNA dalle cellule corticosurrenalichei tumorali stabilizzate H295R ed SW13 è stata eseguita mediante il TRIZOL (Invitrogen), una soluzione pronta all'uso, utilizzata per l'estrazione di DNA, RNA e proteine da cellule e tessuti. È una soluzione monobasica di fenolo e guanidina/isotiocianato all'interno della quale avviene l'omogeneizzazione del campione, che permette di mantenere l'integrità dell'RNA durante la lisi mentre vengono degradate le varie componenti cellulari. L'aggiunta di cloroformio seguita da una centrifugazione consente la separazione della soluzione in due fasi: una acquosa contenente l'RNA ed una organica contenente invece DNA e proteine. L'RNA viene poi recuperato aggiungendo alla fase acquosa alcol isopropilico.

Procedimento:

-omogeneizzazione: aggiungere 1ml di TRIZOL alle cellule presenti nel fondo del pozzetto ed incubare per 5' a temperatura ambiente in modo da permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Raccogliere in eppendorf da 2 ml.

-separazione delle fasi: aggiungere 0,2 ml di cloroformio ed agitare per 15''. Successivamente incubare per 2-3 minuti a temperatura ambiente e centrifugare ad una velocità di 12000 x g per 15' a 4°C. In questo momento si possono osservare tre fasi: una fase acquosa superiore, una interfase ed una fase organica inferiore. Il volume della fase acquosa è circa il 60% del volume del TRIZOL usato per l'omogeneizzazione. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa mentre il DNA nell'interfase e nella fase organica.

-precipitazione dell'RNA: trasferire la fase acquosa in una nuova provetta ed aggiungere 0,5 ml di alcool isopropilico per ml di TRIZOL di partenza, in questo modo si ottiene la precipitazione

dell'RNA. Incubare i campioni a temperatura ambiente per 10' e successivamente centrifugare i campioni a 12000 x g per 10' a 4°C.

-lavaggio RNA: rimuovere il sovrnatante e lavare il pellet di RNA con 1 ml di etanolo 75%, mescolare poi la miscela utilizzando un vortex e centrifugare a 7500 x g per 5' a 4°C.

-risospensione RNA: eliminare il sovrnatante e lasciare asciugare il pellet all'aria per 5-10', infine risospendere RNA in circa 30-50 µl di H₂O RNase-free.

3. Determinazione concentrazioni acidi nucleici (RNA e DNA) con Nanodrop ND-1000

La concentrazione di RNA e di DNA estratto viene misurata attraverso la lettura della densità ottica (D.O.) alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando uno spettrofotometro. Gli acidi nucleici ottenuti sono analizzati attraverso lo spettrofotometro UV-Visibile NanoDrop® ND-1000 che permette analisi altamente precise dei campioni con una notevole riproducibilità, elimina l'esigenza delle provette e dei vasi capillari, fa diminuire il tempo della misurazione ed inoltre elimina l'esigenza della maggior parte delle diluizioni. Questo strumento sfrutta una tecnologia che si basa sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine; in questo modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche e può essere analizzata in modo semplice e veloce.

Le misurazioni vengono effettuate utilizzando come riferimento (Blank) la stessa soluzione utilizzata per la dissoluzione dei campioni, cioè H₂O RNAsi/DNAsi free. Per valutare la presenza di eventuali contaminanti, viene osservato per ogni campione il rapporto D.O.260nm/ D.O.280nm, calcolato automaticamente dal software. Per determinare la purezza dell'acido nucleico vengono utilizzati i rapporti:

- **Rapporto A260/A280** = indice della contaminazione da proteine. Per il DNA il rapporto deve essere 1.6-1.8 mentre per l'RNA 1.8-2.0, rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine.
- **Rapporto A260/A230** = indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi). Il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi.

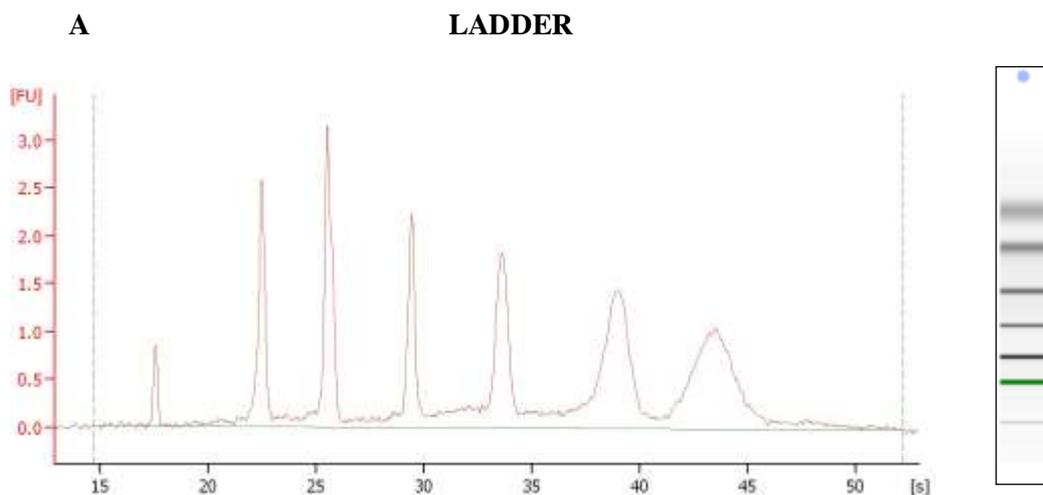
E' possibile utilizzare anche la lunghezza d'onda di 320nm come background: a questa lunghezza d'onda non assorbono né gli acidi nucleici né le proteine quindi l'assorbanza dovrebbe essere 0.

4. Valutazione della qualità dell'RNA mediante Agilent 2100 Bioanalyzer

La purezza e l'integrità dell'RNA viene controllata attraverso l'Agilent 2100 Bioanalyzer. Questi parametri devono essere valutati per poter procedere con i successivi esperimenti di quantificazione in Real-Time PCR. A tale scopo l'RNA viene analizzato con il chip RNA Nano Assay associato allo strumento, il quale consente una rapida caratterizzazione dell'mRNA totale utilizzando microvolumi di campione (circa 1,5 µl).

Procedimento:

Il campione viene caricato in un pozzetto e sotto l'impulso di un campo elettrico, si muove all'interno di piccoli canali riempiti di un polimero, che permette la separazione elettroforetica dei componenti; un intercalante fluorescente consente poi la rivelazione degli stessi ed il software associato allo strumento calcola poi automaticamente la concentrazione totale di RNA e la percentuale di impurità ribosomiali di ogni campione (rapporto 18S/28S). I risultati sono infine mostrati sotto forma di un elettroferogramma e riassunti in una tabella. Solo i campioni che presentavano un rapporto 18S/28S maggiore di 1 e picchi di forma definita sono stati considerati idonei per successive analisi in Real-Time PCR (**Figura 20**).



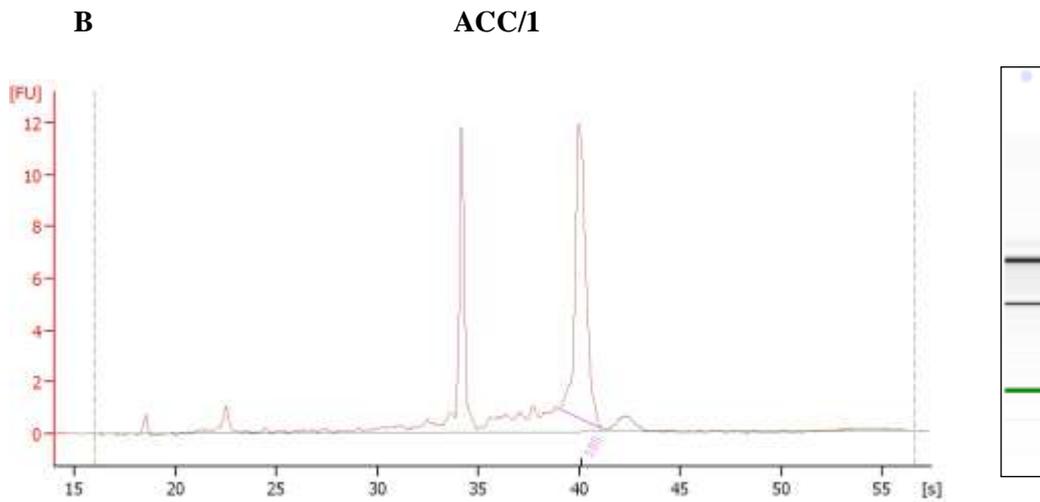


Figura 20. Elettroferogramma del Ladder (A) e di un campione di ACC (B) analizzati all'Agilent. Si può vedere la buona qualità dell'RNA estratto dai picchi e dalle bande ben distinte del 18S e 28S.

5. Trattamento dei campioni di RNA con DNAsi

Al fine di eliminare le possibili contaminazioni di DNA genomico presenti nell'RNA estratto, è effettuata la digestione con Desossiribonucleasi (DNAsi, un enzima che attacca i legami nel DNA), utilizzando il kit TURBO DNase-free (1U/1µg RNA) (Ambion) e successivamente viene eseguita una nuova lettura al NanoDrop per controllare la concentrazione di RNA presente.

Procedimento:

La miscela di reazione, del volume complessivo di 20 µl, è composta da: 2 µl di Buffer 10x TURBO DNase; 1 µl di DNase TURBO (2U/µl); 2 µg di RNA; H₂O (Nuclease-free Water) fino a 20 µl.

La mix di reazione viene incubata a 37°C per 30', temperatura ottimale per l'attività dell'enzima. Successivamente si aggiungono 2 µl di DNase Inactivation Reagent, precedentemente risospeso, si incuba per 2' a temperatura ambiente, dopo aver miscelato il contenuto.

Il Dnase Inactivation Reagent viene utilizzato per la sua capacità di rimuovere sia l'enzima che il buffer di reazione. Si centrifuga poi il tutto a 14000 x g per 1'30'' a temperatura ambiente ed infine si preleva il sovrnatante e lo si trasferisce in una nuova provetta.

Successivamente viene riletta la concentrazione al NanoDrop.

6. Retrotrascrizione RNA (sintesi cDNA)

La trascrizione inversa è la sintesi di DNA a partire da uno stampo di RNA ad opera della DNA polimerasi RNA dipendente, chiamata trascrittasi inversa. È eseguita eseguendo il protocollo del Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

Per poter iniziare la retrotrascrizione, si fa avvenire una reazione di annealing, in cui si associa l'RNA ai primer anchored-oligo(dT)₁₈, primer specifici nel selezionare un piccolo gruppo di RNA poli(A)⁺ (tipico dell'mRNA) all'interno del pool di RNA totale. Successivamente avviene l'allungamento dei prodotti ad opera della DNA polimerasi RNA dipendente. L'enzima si impegna nell'usuale reazione di allungamento della catena in direzione 5'-3', aggiungendo un deossinucleotide per volta grazie al processo di polimerizzazione basato sulla complementarità con lo stampo di mRNA. Il prodotto della reazione è una molecola ibrida, che consiste nel filamento di RNA stampo appaiato con un filamento di DNA complementare. All'estremità dell'mRNA la trascrittasi inversa continua ad agire, formando un prolungamento rivolto all'indietro: usa in questo modo le ultime basi come stampo per la sintesi di un filamento complementare e dà origine a una breve sequenza a forcina. A questo punto l'mRNA viene degradato ed il prodotto finale è un filamento singolo di DNA complementare all'mRNA, chiamato cDNA.

Procedimento:

La sintesi del cDNA è eseguita attraverso l'aggiunta a 1 µg di RNA totale di 1 µl di primer anchored-oligo(dT)₁₈ e di H₂O fino ad un volume finale di 13 µl. Si denatura poi a 65°C per 10' allo scopo di eliminare tutte le strutture secondarie presenti nell'RNA, che potrebbero impedire l'ottimale trascrizione inversa.

I campioni, al termine dei 10' sono tenuti in ghiaccio per almeno 1' e successivamente, fino ad arrivare ad un volume finale di 20 µl si aggiungono: 4 µl di Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X, 8 mM MgCl₂), 0.5 µl Protector RNase inhibitor (20U), 2 µl Deoxynucleotide Mix (1mM), 0.5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (10U).

I campioni a questo punto vengono incubati a 55°C per 30', temperatura in cui avviene la reazione di trascrizione inversa, mentre l'attività esonucleasica è inattivata dal calore a 85°C per 5 minuti. La reazione è arrestata ponendo i campioni in ghiaccio e conservandoli a -20°C.

7. Analisi di espressione genica tramite Real-Time PCR

La **Real-Time Polymerase Chain Reaction** (RT-PCR) è una metodica di quantificazione di acidi nucleici che permette di monitorare allo stesso tempo l'amplificazione ed il rilevamento dell'amplificato. La normale PCR è una tecnica eccezionale dal punto di vista qualitativo ma non è adatta, nella sua configurazione tradizionale, a fornire indicazioni di tipo quantitativo; la real-time PCR invece misura l'amplificazione durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza è influenzata solo minimamente dalle variabili di reazione. La RT-PCR, avendo una strumentazione specifica (un particolare strumento di PCR dotato di un modulo ottico per eccitare i fluorocromi accoppiato ad una fotocamera CCD in grado di raccogliere la fluorescenza di ritorno), permette inoltre la rilevazione e la misurazione dei prodotti di amplificazione passo per passo, simultaneamente all'amplificazione, mediante l'utilizzo di sonde fluorogeniche o di specifici intercalanti fluorescenti del DNA (come il SYBR® Green).

La Real-Time PCR si può realizzare quindi mediante sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse e marcate con molecole fluorescenti, come ad esempio le sonde TaqMan, Molecular Beacons, Scorpion primers, e le sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) oppure con l'utilizzo di molecole fluorescenti intercalanti del DNA (SYBR® Green).

Nelle nostre reazioni in RT-PCR abbiamo utilizzato la tecnica **SYBR® Green**, un intercalante fluorescente simile all'etidio bromuro, che intercalandosi nel solco minore della doppia elica del DNA amplificato prodotto dalla reazione di PCR, incrementa notevolmente la sua fluorescenza, generando un segnale proporzionale al numero di copie presenti nel campione. La rilevazione con SYBR® Green è un approccio semplice ed economico per la quantificazione degli acidi nucleici; presenta però lo svantaggio di legarsi in modo aspecifico a qualsiasi molecola di dsDNA, inclusi i potenziali contaminanti o prodotti aspecifici, come ad esempio i dimeri di primers, causando complicazioni nell'analisi finale dei risultati. È necessario quindi ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici. Un problema che potrebbe presentarsi è l'amplificazione di contaminanti di DNA che non si è riusciti a togliere con tecniche precedenti. Per evitare questo i primer devono essere disegnati in esoni diversi del gene e ancora meglio a cavallo tra due esoni: ciò permette di distinguere il prodotto ottenuto a partire dal trascritto, da quello che può essere stato amplificato accidentalmente a partire da tracce di DNA contaminanti presenti nella preparazione.

La corretta quantificazione mediante Real-Time PCR è effettuata valutando i seguenti parametri: la **linea base della fluorescenza**: permette di escludere la fluorescenza intrinseca della sonda fluorescente e quindi indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di amplificato;

la **linea soglia (threshold)**: viene posizionata in modo da intersecare le curve di amplificazione nella fase esponenziale. Permette di determinare un punto nella curva dove l'espressione dei diversi campioni può venire confrontata sulla base dei corrispondenti cicli soglia; il **ciclo soglia (Ct)**: è specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di reazione in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia. Il ciclo soglia rappresenta quindi il ciclo a partire dal quale la fluorescenza diventa discriminabile rispetto al segnale di fondo.

La Real-time PCR è stata effettuata per i geni *β-actina*, *VEGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, *CDH-1* (E-caderina), *CDH-2* (N-caderina), *CTNNB1* (β-catenina) utilizzando lo strumento ABI-PRISM 7900 (Applied Biosystem). Le sequenze delle coppie di primer per i geni *β-actina*, *VEGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*, sono ottenute attraverso il programma Primer Express (Applied Biosystem) che permette di disegnare primer che possiedono le caratteristiche migliori per l'amplificazione dei nostri geni. I primer per i geni *CDH-1* (E-caderina), *CDH-2* (N-caderina), *CTNNB1* (β-catenina) invece sono stati presi da letteratura ed in particolar modo: *CDH-1* (E-caderina) (Evang JA et al., 2011), *CDH-2* (N-caderina) (Lammens T et al., 2012), *CTNNB1* (β-catenina) (Durand J et al., 2011). Le sequenze di tutti i primer utilizzati in questo studio sono rappresentati nella **tabella 6**.

Tabella 6. Sequenze primer utilizzati per le analisi di Real-time PCR

Gene	Primer sequence	Orientation
<i>β-ACTINA</i>	5' GGGACGACATGGAGAAAATCTG 3'	Forward
	5' CACGCAGCTCATTGTAGAAGGT 3'	Reverse
<i>VEGF</i>	5' GAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCT 3'	Forward
	5' TCAGGGTACTCCTGGAAGATGTG 3'	Reverse
<i>VEGFR-1</i>	5' TCTGGCACCCCTGTAAACCA 3'	Forward
	5' TCCAGGATAAAGGACTCTTCAATTATTG 3'	Reverse
<i>VEGFR-2</i>	5' CACCACTCAAACGTGACATGTA 3'	Forward
	5' CCAACTGCCAATACCAATGGAT 3'	Reverse
<i>CDH-1 (E-Caderina)</i>	5' CATTGCCACATACACTCTCTTCT 3'	Forward
	5' CGGTTACCGTGATCAAAAATCTC 3'	Reverse
<i>CDH-2 (N-Caderima)</i>	5' TCCAGACCCCAATTCAATTAATATTAC 3'	Forward
	5' AAAATCACCATTAAGCCGAGTGA 3'	Reverse
<i>CTNNB1 (β-catenina)</i>	5' CTTGCTCAGGACAAGGAAGC 3'	Forward
	5' CATATGTCGCCACACCTTCA 3'	Reverse

Per determinare le concentrazioni ottimali di lavoro dei primer è stata costruita per ogni gene una **retta di taratura** utilizzando la coppia di primer specifici per l'amplificazione dei geni presenti nei campioni. La pendenza della retta standard costituisce la misura dell'efficienza di amplificazione

della reazione (slope -3.3 e $R^2 = 1$) ed è costruita utilizzando un pool di cDNA a concentrazioni diluite 1:5 (50, 10, 2, 0.4, 0.08 ng/ μ l) ottenuto da campioni di ghiandole surrenali normali e tumorali. Da questo dato possiamo ottenere informazioni sulla concentrazione ottimale dei primer che si possono utilizzare e sulla concentrazione di RNA da impiegare per l'amplificazione (**Figura 21**).

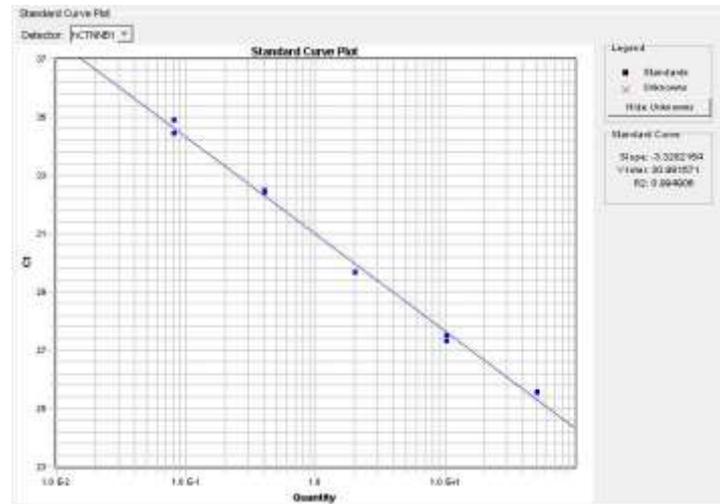


Figura 21. Retta di taratura costruita con la coppia di primer specifici per l'amplificazione del gene *CTNBN1*, utilizzando un pool di cDNA di ghiandole surrenali normali e tumorali.

La buona riuscita dell'analisi viene valutata per ogni reazione attraverso l'analisi delle curve di melting (curve di dissociazione) che forniscono una indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di eventuali dimeri dei primers. Effettuando la derivata prima della curva ($-dF/dT$) si ottiene un picco in corrispondenza della temperatura di melting (**Figura 22**).

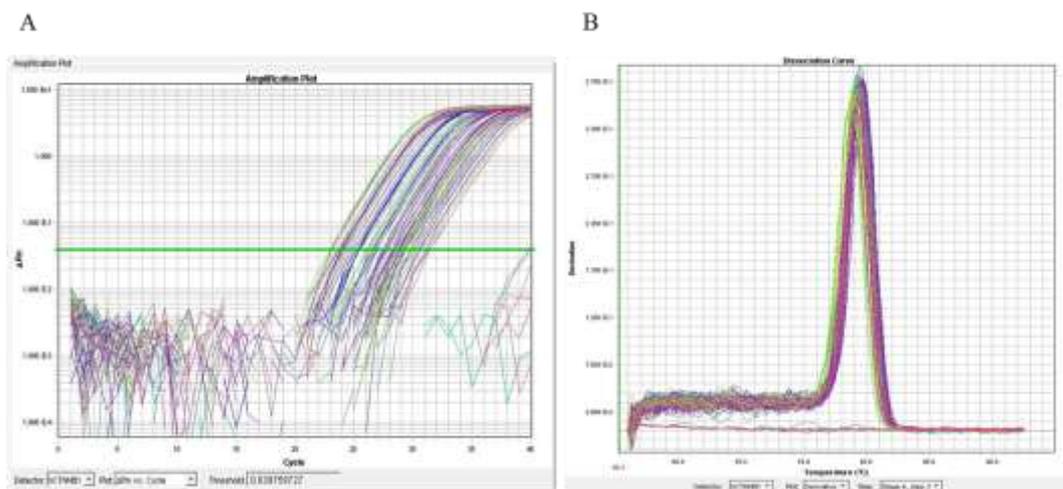


Figura 22. Curva di amplificazione (A) e curva di melting (B) ottenute dall'analisi in Real-Time PCR.

L'analisi delle curve di melting viene eseguita al termine della reazione di amplificazione e prevede una lenta fase di riscaldamento del campione da 60°C fino a 95°C. Quello che accade durante questa fase è una dissociazione del prodotto di PCR con un conseguente abbattimento della fluorescenza. Se all'interno della miscela finale di reazione è presente una sola specie molecolare la diminuzione dei livelli di fluorescenza avverrà in un intervallo di temperatura molto breve, ma se al contrario sono presenti più prodotti, si osserverà un picco di diminuzione delle fluorescenza per ciascun frammento, questo perché per ogni amplicone esiste una temperatura di dissociazione specifica che dipende dalla sua composizione e lunghezza. L'uso del SYBR Green come reporter richiede quindi una precisa ottimizzazione delle condizioni di reazione.

Per ogni campione oltre al gene di interesse vengono valutati uno o più geni **housekeeping**, la cui espressione sia il più possibile stabile e scarsamente influenzabile da parametri esterni (stato patologico, età, sesso...). Noi abbiamo valutato come gene housekeeping la **β -actina** al fine di ottenere una quantificazione relativa e determinare le differenze del livello di espressione degli acidi nucleici.

I valori ottenuti dall'analisi, espressi come valori di **Ct** per ogni gene e campione analizzato, sono stati utilizzati per determinare il valore di ΔCt [$\Delta Ct = Ct$ del gene target – Ct del gene housekeeping (β -actina)]. La differenza in espressione genica tra due categorie di pazienti (soggetti con surrene normale-soggetti con patologia surrenalica) è stata poi calcolata utilizzando l'equazione $2^{-\Delta Ct}$. Abbiamo considerato come **over-espresso** un valore superiore a due volte la media di espressione calcolata nei surreni normali e **down-regolato** un valore a 0.5 volte la media di espressione calcolata nei surreni normali.

Procedimento:

Abbiamo eseguito la Real-Time PCR in un volume totale di 25 μ l per reazione, utilizzando 12.5 μ l di FastStart Universal SYBR Green PCR Master ROX (Roche), 2.5 μ l di primer F 3 μ M, 2.5 μ l di primer R 3 μ M e 2.5 μ l di H₂O e 5 μ l 2ng/ μ l di cDNA.

Le reazioni di amplificazione sono eseguite in triplo sia per gli standard che per i campioni in modo da aumentare la significatività dei dati e viene presa in considerazione la media fra le repliche.

Il ciclo di amplificazione prevede una prima fase di 10' a 95°C per attivare la TaqPolimerasi, e poi una successione di 40 cicli: costituiti da 15'' di denaturazione a 95°C, 30'' di appaiamento a 60°C e 30'' di estensione a 72°C.

8. Analisi di espressione genica tramite tecnica di immunistochemica (IHC)

L'analisi immunistochemica è stata possibile grazie alla collaborazione con il Prof. A. Fassina, del Dipartimento di Medicina, U.O. di Citopatologia e di Patologia Chirurgica dell'Università degli Studi di Padova. L'analisi IHC con gli anticorpi **VEGF** e **VEGFR-2** (Cell Signaling) è eseguita in 10 ACC, 10 APA e 3 CPA. Gli anticorpi primari sono diluiti a 1:400 e 1:50 rispettivamente.

L'analisi con gli anticorpi **E-caderina** (Clone NCH38 Mouse DakoCytomation 1:200), **N-caderina** (clone 6G11 Mouse DakoCytomation 1:100), **β-catenina** (Clone 17C2 Mouse Novocastra 1:100) è effettuata in 10 NA, 15 ACC, 18 APA, 14 CPA.

Come controllo negativo sono impiegati vetrini in cui il passaggio di incubazione con l'anticorpo primario non è effettuato, mentre sono utilizzati come controlli positivi per VEGF e VEGFR-2 rispettivamente tessuti di rene umano normale e tessuti di carcinoma umano del colon.

9. Colture cellulari di linee stabilizzate (H295R e SW13) e colture primarie

9.1 Cellule corticosurrenaliche stabili H295R

La linea cellulare **H295R** deriva da un carcinoma corticosurrenalico umano ed è acquistata dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Le cellule sono coltivate in DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Medium) contenente il 5% di siero (fetal bovin serum, FBS) (Gibco), insulina (5µg/ml), transferrina (10µg/ml), selenio (20mg/ml) ed antibiotici (100µg pen/strep) e incubate a 37°C con 5% di CO₂.

9.2 Cellule stabili SW13

La linea cellulare **SW13** proveniente anch'essa dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) è mantenuta in coltura nel terreno DMEM/F-12 a 37°C con 5% di CO₂ con 10% FBS ed antibiotici 100 U/ml penicillina, e 100 mg/ml streptomina.

9.3 Colture cellulari primarie da tumori corticosurrenalici

Le 8 **colture primarie** derivanti da 5 pazienti con ACC e da 3 pazienti con APA sono trasferite nel terreno DMEM-F12 completo immediatamente dopo l'operazione chirurgica. La disaggregazione meccanica è eseguita con l'utilizzo di forbici e bisturi e il tessuto frammentato è poi incubato per circa 45-50' nel terreno di coltura contenente l'1% di antibiotici e collagenasi (2mg/ml). Le cellule disaggregate vengono pipettate in modo da rompere gli ultimi aggregati ed in seguito sono

filtrate attraverso una garza sterile, piastrate in terreno ricco di siero (10% FBS) e lasciate incubare a 37°C, 5% CO₂ per almeno 48 ore. I reagenti per le colture cellulari sono tutti prodotti dalla ditta Invitrogen.

10. Composti chimici analizzati *in vitro* ed *in vivo*

Il farmaco **Sorafenib** tosylate (Nexavar) è stato gentilmente regalato dalla casa farmaceutica Bayer Corporation, il farmaco **Everolimus** (RAD001) dalla casa farmaceutica Novartis ed il farmaco **XAV939** è stato acquistato dalla ditta Sigma Aldrich. I farmaci sono dissolti in dimetilsolfossido sterile (DMSO) 100% e diluiti in terreno DMEM-F12 alla concentrazione finale desiderata per gli esperimenti.

11. Analisi di proliferazione cellulare (MTT assay)

La vitalità delle cellule e la proliferazione cellulare sono analizzate attraverso un saggio citotossicologico. Si valuta la diminuzione della vitalità delle cellule servendosi dell'agente ossidante cromogeno Thiazolyl Blue Tetrazolium bromide (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT bromide) che possiede un sistema policiclico (C₁₈H₁₆N₅SBr) dotato di un anello tetrazolico. Questo reagente può essere ridotto facilmente a sali di formazano da enzimi, come le succinato deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, presenti all'interno dei mitocondri delle cellule vitali. Solo nelle cellule vitali avviene perciò il taglio dell'anello di tetrazolio dell'MTT con la formazione del sale di formazano. I cristalli insolubili di formazano sono sostanzialmente impermeabili alle membrane cellulari: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula vitale, ma non l'uscita del prodotto correttamente metabolizzato. La reazione è perciò direttamente proporzionale al grado di attività metabolica delle cellule.

La trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, a causa della formazione nelle cellule vitali dei granuli di formazano blu che si formano durante la reazione di riduzione. Nelle cellule morte invece non si formeranno i granuli di formazano, non possedendo enzimi mitocondriali attivi i sali di tetrazolio non saranno metabolizzati ed intrappolati nell'ambiente citoplasmatico, ma resteranno disciolti nel terreno di coltura. Il livello di formazano presente è usato come indice indiretto della densità cellulare, pertanto la lettura allo spettrofotometro è indispensabile per stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali per campione.

Procedimento:

Nelle linee cellulari stabilizzate: le cellule SW13 e H295R ed in alcune colture primarie corticosurrenaliche, è stata osservata la proliferazione cellulare attraverso il saggio colorimetrico MTT incubando le cellule per 24, 48 e 72 ore con sorafenib ed everolimus nel range di concentrazioni da 10 μM a 1 nM e con il farmaco XAV939 nel range di concentrazioni da 100 μM a 1 nM.

Le cellule sono mantenute in coltura con terreno DMEM-F12 contenente 5% FBS e 10% FBS a seconda della coltura di cellule H295R e cellule SW13 e piastrate in piastre da 96-well alla densità di 8×10^3 cell/well per le cellule H295R e di 4×10^3 cell/well per le cellule SW13.

Il terreno completo ricco di FBS è sostituito con terreno DMEM-F12 contenente una quantità di siero molto bassa (circa lo 0,1%), almeno 24 ore prima del trattamento, in modo da sincronizzare il ciclo cellulare di tutte le cellule presenti nel pozzetto. Anche i farmaci alle varie concentrazioni sono diluiti nel terreno di coltura DMEM-F12 0,1% di FBS, eseguendo le prove sempre in quadruplicato per ottenere un dato ripetibile e significativo.

È stata effettuata anche l'associazione dei due farmaci, aggiungendo il farmaco sorafenib 0,1 μM ad una scala di concentrazioni di everolimus da 10 μM a 0,1 nM.

Al termine del trattamento si aggiunge l'MTT fresco (2,5mg/ml in PBS). In ogni pozzetto si tolgono 50 μl di terreno e si aggiungono 50 μl di MTT (Sigma), il tutto è eseguito coprendo la piastra dalla luce diretta in quanto l'MTT è fotosensibile ed incubando a 37°C per circa 3 ore.

Successivamente l'aggiunta di 100 μl di DMSO (SIGMA) è necessaria per arrestare la reazione di riduzione e solubilizzare il formazano prodotti. La lettura della densità ottica è effettuata allo spettrofotometro (VICTOR-Perkin-Elmer) alle lunghezze d'onda di 550-620 nm.

La proliferazione cellulare, ovvero la percentuale di cellule vitali dopo il trattamento con i farmaci è stata calcolata dal valore di assorbanza, utilizzando la seguente formula:

$$(\text{Assorbanza campione trattato} - \text{Assorbanza bianco}) /$$

$$(\text{Assorbanza campione non trattato} - \text{Assorbanza bianco}) \times 100,$$

dove per assorbanza del bianco si riferisce alla sola assorbanza del pozzetto che contiene il terreno addizionato solo alla sostanza MTT.

12. Valutazione della morte cellulare programmata per apoptosi

12.1 Analisi in fluorescenza

Il grado di apoptosi indotto dai farmaci è stato valutato in microscopia a fluorescenza utilizzando il kit della ditta Promega: DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (TUNEL). La tecnica TUNEL è in grado di misurare la frammentazione nucleare del DNA. La morte programmata di una cellula è caratterizzata dalla generazione di frammenti di DNA prodotti da endonucleasi endogene che tagliano il DNA delle cellule apoptotiche in frammenti di circa 180-200 pb. Le endonucleasi endogene, attivate nel corso dell'apoptosi clivano il DNA a doppio filamento nella regione di legame internucleosomale, più accessibile, dando luogo a mono- ed oligonucleosomi. Questi frammenti di DNA possono essere rilevati dopo marcatura con dUTP-fluoresceina che si lega all'estremità 3'-OH libera. Il metodo TUNEL da noi utilizzato è in grado di evidenziare il DNA frammentato presente nelle cellule apoptotiche attraverso l'incorporazione di fluorescein-12-dUTP al terminale 3'-OH del DNA.

- I trattamenti con i farmaci sorafenib 5 μ M e con everolimus 9 μ M sono eseguiti per 24 ore e le cellule sono successivamente fissate sui vetrini, aggiungendo formaldeide al 2% e lasciate incubare a temperatura ambiente per circa 20', prima di applicare il metodo TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick and labeling).

12.1 Analisi in citofluorimetria

L'apoptosi è valutata anche con l'analisi citofluorimetrica utilizzando il kit per l'analisi di apoptosi: Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Bender MedSystems). Il kit si basa sulla capacità dell'Annexina V, coniugata alla molecola fluorescente FITC, di legarsi alla fosfatidilserina (PS) e sulla capacità intercalante nel DNA dello ioduro di propidio (IP).

Durante l'apoptosi le cellule subiscono specifiche modificazioni morfologiche, che portano alla perdita dell'integrità di membrana, alla formazione di corpi apoptotici ed alla successiva morte cellulare. Un cambiamento che avviene nella membrana cellulare durante le prime fasi del processo apoptotico è la traslocazione della fosfatidilserina dal lato interno della membrana a quello esterno. È possibile rilevare la PS utilizzando l'Annexina V marcata, una proteina di 35kD che in presenza di specifiche concentrazioni di calcio è in grado di legarsi con alta affinità alla PS. La colorazione dell'Annexina V utilizzata in combinazione con lo ioduro di propidio che lega gli acidi nucleici, è in grado di discriminare le cellule vive dalle morte in quanto lo ioduro di propidio è impermeabile alla

membrana delle cellule vive. Grazie a questa combinazione possiamo ottenere un profilo dove le cellule vitali risultano negative ad entrambi i marker; quelle nelle prime fasi dell'apoptosi sono positive per l'Annexina e negative per lo ioduro di propidio, mentre quelle in apoptosi più tardiva sono positive per entrambi i marker.

- Le cellule H295R ed SW13 sono incubate overnight con terreno DMEM-F12 contenente lo 0.1% di FBS e trattate con i farmaci sorafenib 5 μ M ed everolimus 9 μ M per 6 ore seguendo le indicazioni del kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection.

13. Analisi ciclo cellulare attraverso la tecnica citofluorimetrica

Il ciclo cellulare è analizzato attraverso la colorazione con lo ioduro di propidio (PI). Le cellule H295R ed SW13 sono piastrate ad una confluenza di circa 1×10^6 e trattate per 24 ore con i farmaci sorafenib 6 μ M e/o everolimus 9 μ M diluiti in terreno DMEM-F12 0.1% FBS. Le cellule sono raccolte dopo tripsinizzazione e risospese in PBS freddo. Successivamente sono fissate in etanolo 70% freddo ed incubate overnight a -20°C . Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono colorate con una soluzione di ioduro di propidio (50 $\mu\text{g/ml}$ PI, 10 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA) (Sigma) ed incubate al buio per 1 ora a 37°C . L'analisi è eseguita in triplicato, utilizzando il citofluorimetro FC500 (Beckman Coulter).

14. Estrazione proteica da cellule e da tessuto

Al termine del trattamento, è stato eliminato il terreno di coltura ed effettuata l'estrazione delle proteine. È stato aggiunto il buffer di lisi (Sabbatini lysis buffer) al pellet di cellule ottenuto dopo tripsinazione, a cui è stato addizionato prima dell'uso un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich) e l'1% di TRITON. Le proteine sono state agitate a bassa temperatura (4°C) per circa 1 ora e successivamente centrifugate a 8000 rpm per 10' 4°C . Il sovrantante è stato trasferito in una nuova provetta ed è stata analizzata la concentrazione proteica. Infine le aliquote sono congelate a -80°C .

15. Quantificazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è determinata attraverso una reazione colorimetrica utilizzando il kit Detergent-Compatible (DC) Assay (Biorad). L'analisi si basa sulla reazione delle proteine ad una soluzione alcalina di rame e tartrato (alkaline copper tartrate solution) ed al reagente Folin. Per arrivare

allo sviluppo del colore devono essere compiuti due passaggi fondamentali: la reazione tra le proteine ed il rame presente nel terreno alcalino, e successivamente la riduzione del reagente Folin da parte della proteina coniugata con il rame. Lo sviluppo del colore è dovuto principalmente agli amminoacidi tirosina e triptofano, ed in parte alla cisteina ed istidina contenuti nelle proteine. Le proteine che effettuano la riduzione del reagente Folin perdendo 1, 2 o 3 atomi di ossigeno, producono una o più specie riducenti che hanno un caratteristico colore blu, con un massimo di assorbanza a 750 nm ed un minimo a 405 nm.

Il colore si sviluppa in 15' e questo permette di eseguire l'analisi in tempi brevi. Le proteine estratte dalle cellule vengono quantificate attraverso la lettura spettrofotometrica della reazione colorimetrica che si sviluppa attraverso uno spettrofotometro (Multiskan EX-Labsystem) alla lunghezza d'onda di 650 nm, interponendo i dati da noi ottenuti ad una retta di taratura costruita utilizzando una scala di concentrazioni note di BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma): 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, 4 µg/µl, 8 µg/µl.

16. Westen blot (Immunoblot)

Tramite Western blot è stato analizzato il coinvolgimento delle due più importanti pathways interessate nella proliferazione cellulare e nell'angiogenesi, cioè la **via di PI(3)K/Akt/mTOR** e la **via di Raf/MEK/ERK**.

Tale tecnica sfrutta prima una elettroforesi denaturante (SDS-PAGE), grazie alla quale le proteine migrano nel gel in base alle loro dimensioni ed alla carica elettrica. Le proteine vengono quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (blotting) e successivamente incubate con un anticorpo specifico (anticorpo primario), a cui segue un anticorpo secondario modificato. Infine l'immunoreattività viene evidenziata con chemiluminiscenza.

Gli **anticorpi primari**, testati su una aliquota proteica di 40 µg sono: anti-Erk1/2, anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-P70S6K, anti-phospho-P70S6K (Thr389), anti-VEGF, anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2, anti-phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) (Cell Signaling Technology) tutti diluiti 1:1000 in TTBS e BSA 5%, tranne l'anticorpo monoclonale anti-β-actina (Sigma-Aldrich) diluito 1:5000.

Gli **anticorpi secondari** sono anti-mouse o anti-rabbit HRP-labeled prodotti in capra (Jackson Immunoresearch laboratories). L'immunoreattività è stata rilevata attraverso la tecnica della chemiluminescenza utilizzando le soluzioni del kit LiteAblot Extend Long Lasting

Chemiluminescent Substrate (EuroClone) e l'intensità delle bande sono quantificate con il software ImageJ software 1.44p.

17. Analisi di Immunoprecipitazione (IP)

Si trattano le cellule H295R ed SW13 con sorafenib 5 μ M per 6 ore. Durante gli ultimi 20 minuti delle 6 ore di incubazione, si stimola con VEGF (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 50 ng/ml. L'immunoprecipitazione è effettuata con l'anticorpo anti-VEGFR2 e con il sistema Protein A/G PLUS Agarose (Santa Cruz Biotechnology) secondo le istruzioni del protocollo. Le membrane sono infine incubate con l'anticorpo anti-phospho-VEGFR-2(Tyr1175) (Cell Signaling Technology).

17.1 Soluzioni utilizzate per estrazione proteica, analisi di western blot ed immunoprecipitazione

Buffer di lisi (Sabbatini lysis buffer):

HEPES (40 mM; pH 7,5); NaCl (120 mM); Sodio pirofosfato (10 mM); Sodio glicerofosfato (10 mM); EDTA (1 mM); Sodio fluoride (50 mM); Sodio ortovanadato (0,5 mM).

Running gel

H₂O 3,3 ml; Tris/HCl 2,5 ml (pH 8,8; 1,5 M); 40% Acrilamide 2,425 ml; Bis-acrilamide 1,675 ml; 20% SDS 0,1 ml; APS 10% 0,050 ml; TEMED 0,012 ml.

Stacking gel

H₂O 2,3 ml; Tris/HCl 1 ml (pH 6,8; 0,5 M); 40% Acrilamide 0,390 ml; Bis-acrilamide 0,210 ml; 20% SDS 0,05 ml; 10% APS 0,025 ml; TEMED 0,010 ml.

Sample Buffer 4X

10% SDS 3,2 ml; Tris-HCl 2 ml (pH 6,8; 0,5 M); β -mercaptoetanolo 10 mM 0,8 ml; 20% v/v Glicerolo 3,2 ml; 0,05% Blu di bromofenolo 0,8 ml; H₂O sterile 6 ml.

Running buffer 10X 1L

30,3 g Trizma base; 144 g Glicina; 10 g SDS 1%. Portare a volume con H₂O sterile.

Blotting buffer 10X 1L

30,3 g Trizma base; 144 g Glicina. Portare a volume con H₂O sterile, dopo aver aggiunto 20% metanolo.

Blocking buffer

Latte in polvere 5% in TBS + Tween-20 0,01%.

TBS stock solution 10X a pH 7,6

Tris Base (PM 121,135) 24,23 g/l 200 mM; NaCl (PM 58,443) 80 g/l 1,37 M. Portare a pH 7,6 con HCl.

TBS + TWEEN-20 0,1% (TTBS)

TBS stock solution 10X (pH 7,6) 100 ml; TWEEN-20 1 ml. Portare a volume di 1L con H₂O sterile.

18. Trattamenti farmacologi *in vivo*

Gli esperimenti *in vivo* sono realizzati in collaborazione con il Prof. A. Rosato afferente al dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche dell'Università di Padova e dell'Istituto Oncologico Veneto IRCCS. Le procedure che coinvolgono gli animali sono in conformità con le linee guida istituzionali, con leggi e politiche nazionali ed internazionali (D.L. 116/92 e successive circolari) ed il protocollo sperimentale è approvato dal Comitato Etico Locale dell'Università di Padova (CEASA).

Sono utilizzati topi femmine SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) e Rag^{-/-}/γ_c^{-/-} di 6-8 settimane in cui è stato indotto il tumore attraverso l'impianto di cellule corticosurrenaliche H295R ed SW13. Per tracciare la crescita tumorale le cellule sono trasfettate con un vettore lentivirale che codifica per il gene reporter luciferasi (Keyaerts M et al., 2008). Le immagini di bioluminescenza (BSI) sono acquisite a diversi intervalli a seguito dell'iniezione cellulare *in vivo* utilizzando il sistema di raccolta immagini IVIS Lumina II Imaging System (Caliper Life Sciences). Dieci minuti prima delle raccolte delle immagini, gli animali sono anestetizzati e subiscono una iniezione di 150 mg/kg di D-luciferina (Caliper Life Sciences) i.p. in PBS. Viene monitorata una costante regione di interesse dell'addome dell'animale ed il segnale di intensità è misurata come radiazione (totale di fotoni per cm² per sr) attraverso il software LivingImage (Caliper Life Sciences).

Per l'induzione del tumore, circa 5 x 10⁶ cellule SW13 per topo e 6 x 10⁶ cellule H295R per topo sono state inoculate sottocutaneamente nel fianco destro dei topi SCID e Rag^{-/-}/γ_c^{-/-}. Il trattamento con i farmaci è iniziato quando il volume medio del tumore raggiunge un range di 40-80 mm³.

Sorafenib ed everolimus, singolarmente o in combinazione, sono stati somministrati ad una dose di 45 e 5 mg/kg rispettivamente, tre volte la settimana mediante una sonda gastrica.

La crescita tumorale e la risposta alla terapia farmacologica è stata monitorata attraverso la bioluminescenza e la sopravvivenza. Gli animali alla fine dell'esperimento sono stati tutti sacrificati e le masse tumorali escisse e conservate per l'istologia.

19. Analisi genetica delle vie del segnale di Raf/Ras/ERK/MEK e di Wnt/ β -catenina

19.1 Analisi High Resolution Melting (HRM)

L'analisi High Resolution Melting (HRM) per la rilevazione di mutazioni genetiche anche a singola base, presenta velocità d'esecuzione, versatilità d'applicazione ed accuratezza dei risultati. È una nuova tecnica di indagine, estremamente rapida e poco costosa se paragonata ad altre tecniche di discriminazione. Ciò che rende versatile questa tecnica è l'utilizzo di fluorofori intercalanti e saturanti il DNA solo in presenza dell'acido nucleico a doppio filamento. Queste sonde devono essere utilizzate ad elevate concentrazioni in modo da saturare il doppio filamento di DNA, senza per questo andare a modificare la temperatura di melting. Dopo l'amplificazione, i campioni vengono sottoposti ad elevate temperature e subiscono una denaturazione progressiva da 70° a 90°C. La variazione dell'emissione di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di melting; questa fluorescenza diminuirà con l'aumentare della temperatura perché il fluoroforo viene rilasciato dal dsDNA (double strand DNA) che si dissocia in ssDNA (single strand DNA) (**Figura 23**).

Ad ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di melting caratteristica, perciò attraverso questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi. Lo strumento possiede un sistema di rilevazione di fluorescenza per l'analisi e la quantificazione dei prodotti di amplificazione ed è collegato ad un computer che, tramite un apposito software, consente di seguire l'andamento della reazione di amplificazione in tempo reale e successivamente di analizzare la curva di melting.

L'HRM presenta numerose applicazioni, come la ricerca di mutazioni, la genotipizzazione di SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), la ricerca della perdita di eterozigotità (LOH), l'analisi di metilazione del DNA e la caratterizzazione degli aplotipi. La maggior applicazione è il gene scanning per la ricerca di alterazioni geniche; i campioni vengono discriminati in base alla sequenza, alle variazioni del contenuto di GC, alla lunghezza dell'amplificato ed alla complementarietà dei filamenti.

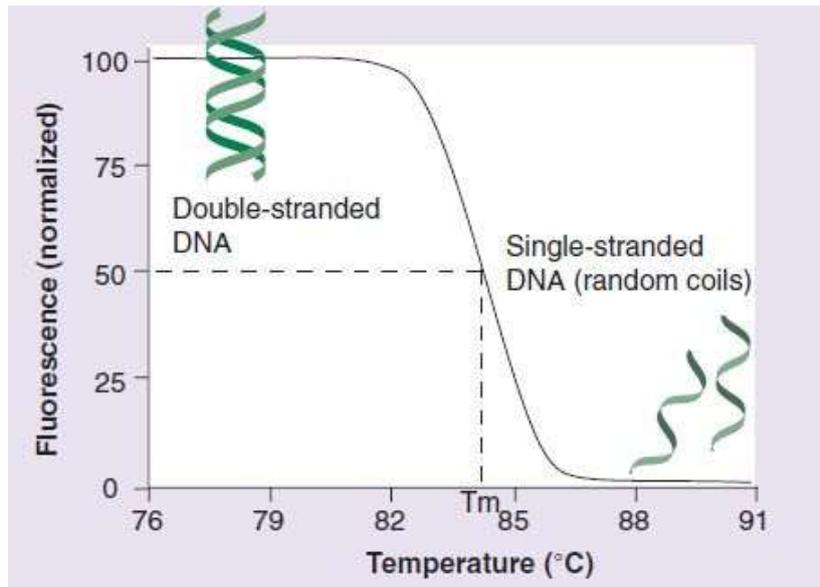


Figura 23. Profilo analisi High Resolution Melting (HRM). Drastica diminuzione della fluorescenza del campione di DNA (dsDNA) a causa della denaturazione progressiva a singolo filamento di DNA (sDNA) ad elevate temperature da 70° a 90° C al termine dell'analisi. T_m = temperatura di melting (Reed GH et al., 2007).

Utilizzando lo strumento Real-Time PCR LightCycler® 480 Roche Diagnostics abbiamo potuto discriminare rapidamente i nostri campioni alterati rispetto ai wild type in base alle diverse curve di melting. In HRM abbiamo valutato la presenza di mutazioni attivanti nei geni *BRAF* (esoni 11 e 15), *H-RAS* (esoni 2 e 3), *N-RAS* (esoni 2 e 3), *K-RAS* (esoni 2 e 3), *CTNNB1* (esone 3), *AXIN-2* (esone 7) in 92 ACT.

Le sequenze dei primer per l'amplificazione dell'esone 3 del gene *CTNNB1* sono state ottenute analizzando accuratamente il lavoro di Taniguchi e collaboratori (Taniguchi K et al., 2010). Per lo studio dell'esone 11 e dell'esone 15 del gene *BRAF*, degli esoni 2-3 del gene *H-RAS*, degli esoni 2-3 del gene *N-RAS*, degli esoni 2-3 del gene *K-RAS* sono stati utilizzate le coppie di primer presenti nello studio di Sadow ed il suo gruppo di ricerca (Sadow PM et al., 2010). I primer per l'esone 7 del gene *AXIN2* sono ottenuti dalla letteratura (Hayes MJ et al., 2008) ma modificati con l'utilizzo del programma Primer Express (Applied Biosystem) per il disegno dei primer. Tutte le sequenze dei primer sono riassunte nella **Tabella 7**.

Tabella 7. Sequenze delle coppie di primer utilizzate per le analisi mutazionali in HRM e le analisi di sequenziamento genico.

Gene	Exon	Primer sequence	Orientation
<i>BRAF</i>	Exon 11	5'-TCTGTTGGCTTGA CT TGA CT T-3'	Sense
		5'-CGAACAGTGAATATTTCCITTTGAT-3'	Antisense
<i>BRAF</i>	Exon 15	5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'	Sense
		5'-AGCATCTCAGGGCCAAAAAT-3'	Antisense
<i>K-RAS</i>	Exon 2	5'-TTAACCTTATGIGTGACATGTTCTAA-3'	Sense
		5'-TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'	Antisense
<i>K-RAS</i>	Exon 3	5'-TTTTTGAAGTAAAAGGTGCACTG-3'	Sense
		5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3'	Antisense
<i>H-RAS</i>	Exon 2	5'-GGCAGGAGACCCTGTAGGAG-3'	Sense
		5'-AGCCCTATCCTGGCTGTG-3'	Antisense
<i>H-RAS</i>	Exon 3	5'-GTCCTCCTGCAGGATTCCTA-3'	Sense
		5'-ATGGCAAACACACACAGGAA-3'	Antisense
<i>N-RAS</i>	Exon 2	5'-CACTAGGGTTTTTCATTTCCATTG-3'	Sense
		5'-TCCTTTAATACAGAATATGGGTAAAGA-3'	Antisense
<i>N-RAS</i>	Exon 3	5'-TTGCATTCCTGTGGTTTTT-3'	Sense
		5'-CCATAATAAAAAGCTCTATCTTCCC-3'	Antisense
<i>CTNNB1</i>	Exon 3	5'-AGTAACATTTCCAATCTACTAATGC-3'	Sense
		5'-CTGACTTTCAGTAAGGCAATG-3'	Antisense
<i>AXIN2</i>	Exon 7	5'-CAAAGCACAAAAAAGGCCTAC-3'	Sense
		5'-AGGGTCCTGGGTGAACAGGT-3'	Antisense

19.2 Purificazione dei prodotti di amplificazione

La purificazione dei prodotti di amplificazione, ottenuti dopo HRM, è necessaria per eliminare sali, proteine, resine e primer. È eseguita mediante le colonnine Amicon Ultra Centrifugal Filter Device (Millipore).

19.3 PCR di sequenza e successiva purificazione

La PCR di sequenza del prodotto purificato è eseguita seguendo il protocollo Big-Dye Terminator. Al termine del ciclo Big-Dye il prodotto viene purificato dai sali, dNTPs e molecole a basso peso molecolare usando colonnine Illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kit (GE Healthcare). L'efficacia di ogni reazione di amplificazione, l'assenza di contaminazioni e/o dimeri di primer vengono verificate attraverso una elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% (P/V) in TAE (1X). Il purificato così ottenuto è pronto per essere processato al sequenziatore automatico (Applied Biosystem).

19.4 Sequenziamento genico

Da un primo screening ottenuto con l'analisi HRM abbiamo successivamente confermato il dato attraverso la metodica del sequenziamento, utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM (Applied Biosystem). Il sequenziatore utilizza il metodo di Sanger che può essere automatizzato mediante l'utilizzo di dispositivi in grado di valutare la separazione delle specie molecolari durante la corsa elettroforetica. All'interno del sequenziatore automatico il campione passa attraverso un capillare che contiene una matrice con la stessa funzione di separazione dei frammenti normalmente svolta dal gel di poliacrilamide.

Vengono utilizzati dideoxynucleotide (ddNTPs) marcati con fluorocromi e l'uso di fluorocromi diversi per le quattro basi permette di separare i prodotti di elongazione mediante una singola elettroforesi capillare. Il rivelatore riconosce i diversi picchi di fluorescenza, ciascuno con emissione a una determinata lunghezza d'onda, generati dai quattro diversi ddNTPs. In questo modo la sequenza nucleotidica del frammento di interesse può essere ricostruita da un computer. Misurazioni successive dell'emissione in fluorescenza producono un elettroferogramma, che può essere interpretato per ottenere la sequenza. La sequenza è rappresentata da una serie di picchi, uno per ogni posizione del nucleotide di interesse. Nel nostro caso, un picco verde è una adenina (A), il blu è una citosina (C), il nero è una guanina (G), e il rosso è una timidina (T). I sequenziatori automatici possono lavorare su frammenti di 200-1000 nucleotidi ed il sequenziamento di un frammento di DNA con 500 basi azotate dura poco più di mezz'ora.

20. Analisi statistica dei risultati

Le differenze di espressione genica, la relazione tra l'espressione genica e i dati clinici e la comparazione del trattamento farmaceutico nelle cellule sono state valutate attraverso il test di Wilcoxon tra due campioni ed attraverso il test Kruskal-Wallis, successivamente è stato eseguito il test di Dunn per il confronto a coppie in caso di $P < 0.05$. La quantificazione delle bande è stata eseguita attraverso il programma ImageJ ed il t-test accoppiato è stato utilizzato per l'analisi statistica. I dati sono tutti rappresentati come media \pm deviazione standard. Per analizzare i dati di vitalità cellulare in seguito al test MTT abbiamo utilizzato il t-test per campioni appaiati. La significatività statistica è stata considerata con $P \leq 0,05$. Negli esperimenti *in vivo* è stato utilizzato il metodo di Kaplan-Meier per stimare le curve di sopravvivenza; la comparazione della sopravvivenza tra i gruppi è avvenuta grazie al test log-rank. Per la valutazione della correlazione tra variabili di espressione genica è stata utilizzata l'analisi non parametrica di Spearman.

RISULTATI

1. Valutazione dell'espressione genica di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 nei tessuti corticosurrenali in RT-PCR ed IHC

Dall'analisi di **real-time PCR** abbiamo osservato che sia i surreni normali (6 NA) che tumorali (63 ACT) esprimono i geni *VEGF*, *VEGFR-1*, *VEGFR-2*. Rispetto alle 6 ghiandole surrenali normali (NA) vi è una over-espressione significativa di VEGF in 12/18 (65%) ($P = 0.049$) carcinomi (ACC) ed in 20/33 (61%) ($P = 0.025$) adenomi secernenti aldosterone (APA).

Non abbiamo invece trovato nessun aumento significativo dell'espressione di VEGF negli adenomi secernenti cortisolo (CPA), benché in 3/12 (25%) ci fosse una espressione elevata (**Figura 24 A**).

Osservando VEGFR-1 e VEGFR-2, abbiamo trovato un aumento dell'espressione dei recettori negli ACC in 8/18 (44%) e in 7/18 (39%), negli APA in 16/33 (48%) e in 9/33 (27%) mentre nei CPA in 4/12 (33%) e in 1/12 (8%), benché questi dati non siano nel complesso statisticamente significativi (**Figura 24 B e C**).

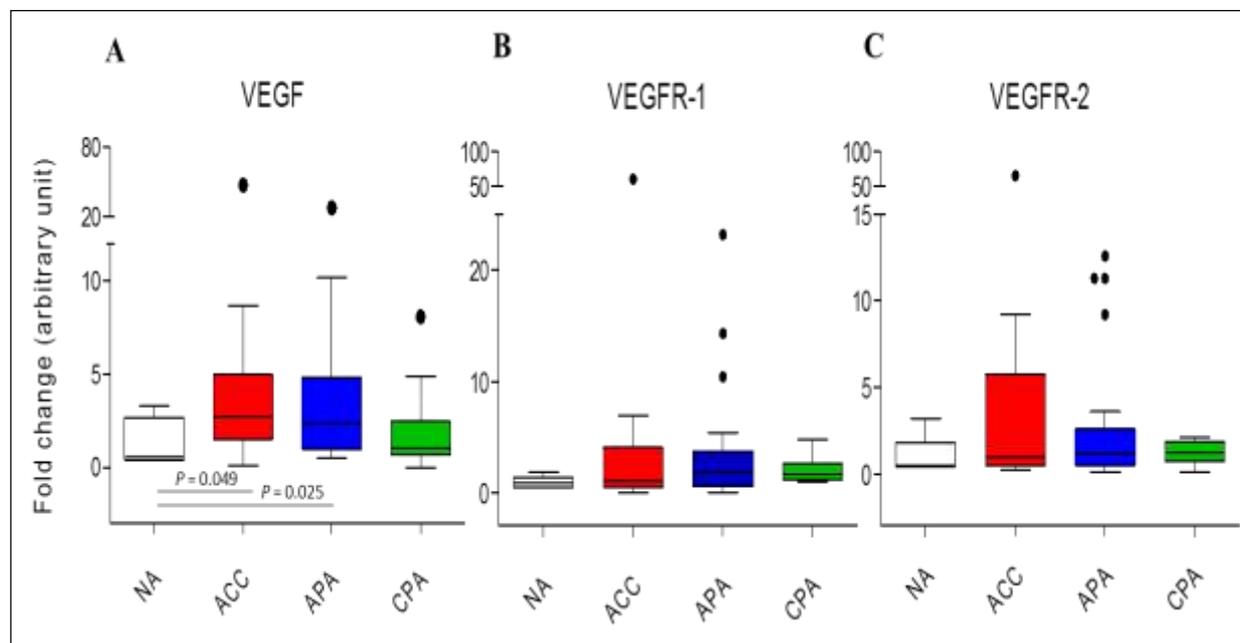


Figura 24. Analisi in Real-Time PCR dell'espressione genica di *VEGF* (A), *VEGFR-1* (B), *VEGFR-2* (C) nei campioni di corticosurrenali normali (NA), nei carcinomi (ACC), negli adenomi secernenti aldosterone (APA) e negli adenomi secernenti cortisolo (CPA).

L'associazione del profilo di espressione con le caratteristiche cliniche degli ACC, come il sesso, lo stadio, l'età di insorgenza, la progressione della malattia e la morte, evidenziano una significativa relazione inversa tra lo stadio della malattia e l'espressione di VEGFR-1 ($P = 0.03$) e VEGFR-2 ($P = 0.02$). Non sono state rilevate altre associazioni significative.

I valori di espressione genica sono stati confermati attraverso l'analisi di **immunoistochimica**, in cui è osservata la presenza delle proteine VEGF e di VEGFR-2 sia nei carcinomi che negli adenomi, con una espressione variabile (**Figura 25**).

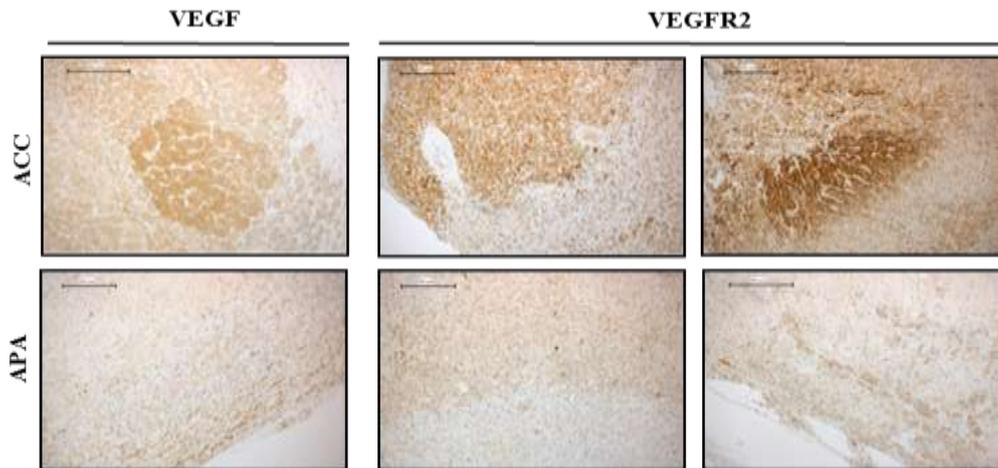


Figura 25. Analisi immunoistochimica di VEGF e di VEGFR-2 in alcuni rappresentativi campioni di adenoma secernente aldosterone (APA) e di carcinoma corticosurrenalico (ACC).

2. Valutazione dell'espressione genica di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 nelle linee cellulari stabilizzate H295R e SW13

Attraverso le tecniche di Real Time-PCR e di western blot abbiamo potuto dimostrare l'espressione di VEGF e dei suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 anche nelle cellule H295R ed SW13 (**Figura 26**).

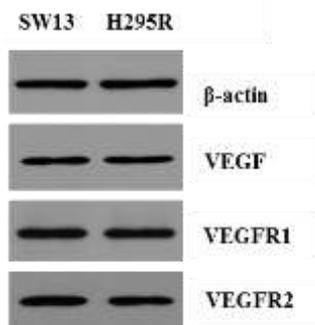


Figura 26. L'analisi in western blot dimostra la presenza di VEGF e dei suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 nelle linee cellulari H295R ed SW13.

3. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus sulla proliferazione cellulare di colture cellulari H295R ed SW13

Nella valutazione della vitalità cellulare le cellule SW13 rispondono a concentrazioni di sorafenib e di everolimus minori rispetto alle cellule H295R. Entrambi i farmaci inducono una diminuzione della vitalità cellulare dose-tempo dipendente.

3.1 Sorafenib: inibizione della proliferazione cellulare

Sorafenib ha maggior efficacia nelle cellule SW13; se si considera il trattamento a 24 ore, infatti si ottiene una diminuzione della vitalità di circa 50 % (IC_{50}) già alla concentrazione di farmaco pari a 0.3 μM nelle SW13, mentre questa diminuzione non è mai stata osservata nel trattamento a 24 ore delle cellule H295R. A 72 ore invece sorafenib produce un effetto simile in entrambe le linee cellulari, raggiungendo una diminuzione della vitalità superiore al 50 % alle concentrazioni tra 0.1 μM e 1 μM (**Figura 27**). L'effetto del farmaco è statisticamente significativo ($P < 0.01$) a tutte le concentrazioni.

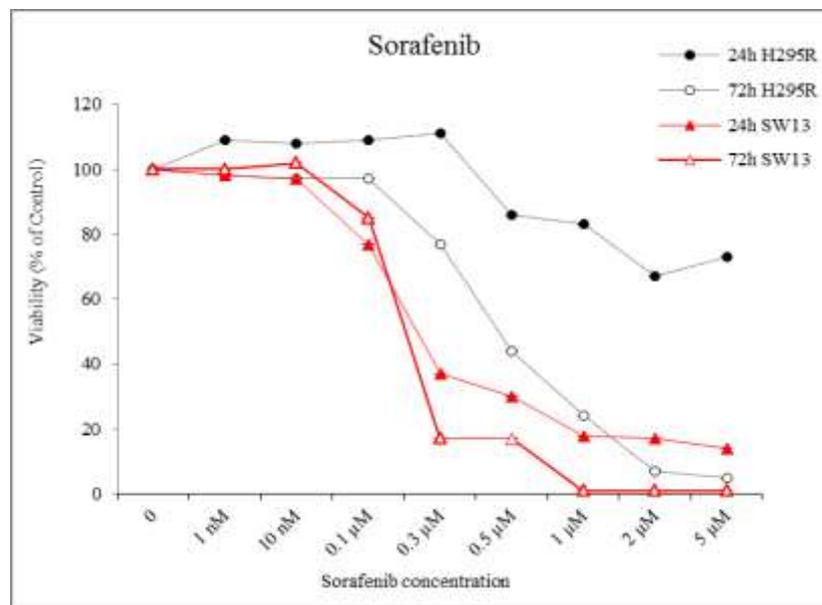


Figura 27. Effetto del farmaco sorafenib sulla vitalità cellulare nelle cellule H295R e SW13 a 24 ed a 72 ore di trattamento.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato. [($P < 0.01$) a tutte le concentrazioni]

3.2 Everolimus: inibizione della proliferazione cellulare

Everolimus produce un effetto in entrambe le linee cellulari già alla concentrazione più bassa utilizzata cioè 1 nM, sia a 24 che a 72 ore. Nelle SW13 a 72 ore di trattamento è presente un effetto costante nella percentuale delle cellule vitali nel range di concentrazioni tra 10 nM e 1 µM. L'effetto del farmaco è statisticamente significativo ($P < 0.01$) a tutte le concentrazioni (**Figura 28**).

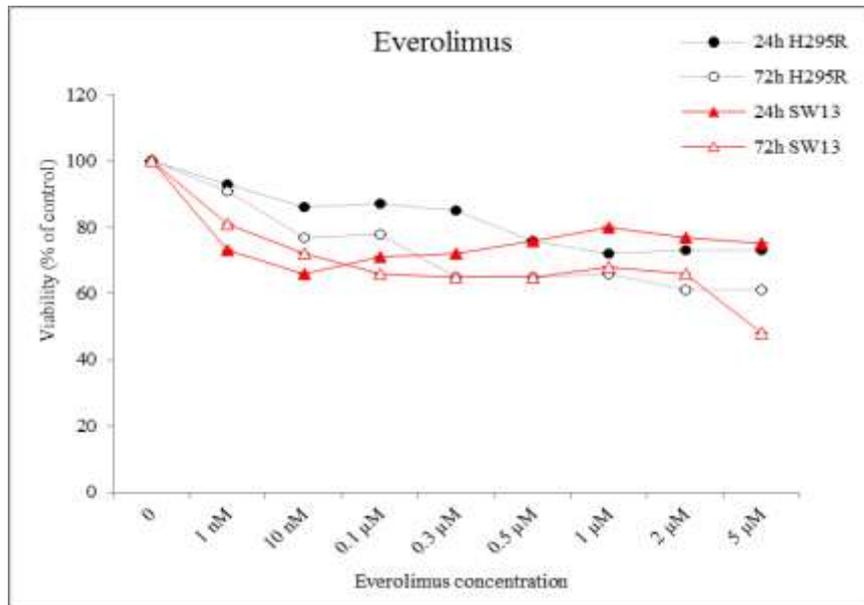


Figura 28. Effetto del farmaco everolimus sulla vitalità cellulare nelle cellule H295R e SW13 a 24 ed a 72 ore di trattamento. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato. [($P < 0.01$) a tutte le concentrazioni]

3.3 Associazione dei due farmaci: Sorafenib ed Everolimus

Sottoponendo le due linee cellulari al trattamento combinato dei due farmaci, aggiungendo nel range di concentrazioni di everolimus da 1 nM a 10 µM una singola concentrazione di sorafenib (0.1 µM) si ottiene una ulteriore diminuzione della vitalità cellulare di circa un 20% nelle cellule SW13. L'effetto della combinazione dei farmaci è statisticamente significativo nelle concentrazioni da 0.3 a 10 µM a 24 ore e da 1 nM a 10 µM a 72 ore di trattamento (**Figura 29 A-B**).

Nella linea cellulare H295R invece l'azione combinata dei due farmaci non ha un effetto significativo, in quanto i valori ottenuti sono imputabili all'azione di un singolo farmaco (**Figura 29 C-D**).

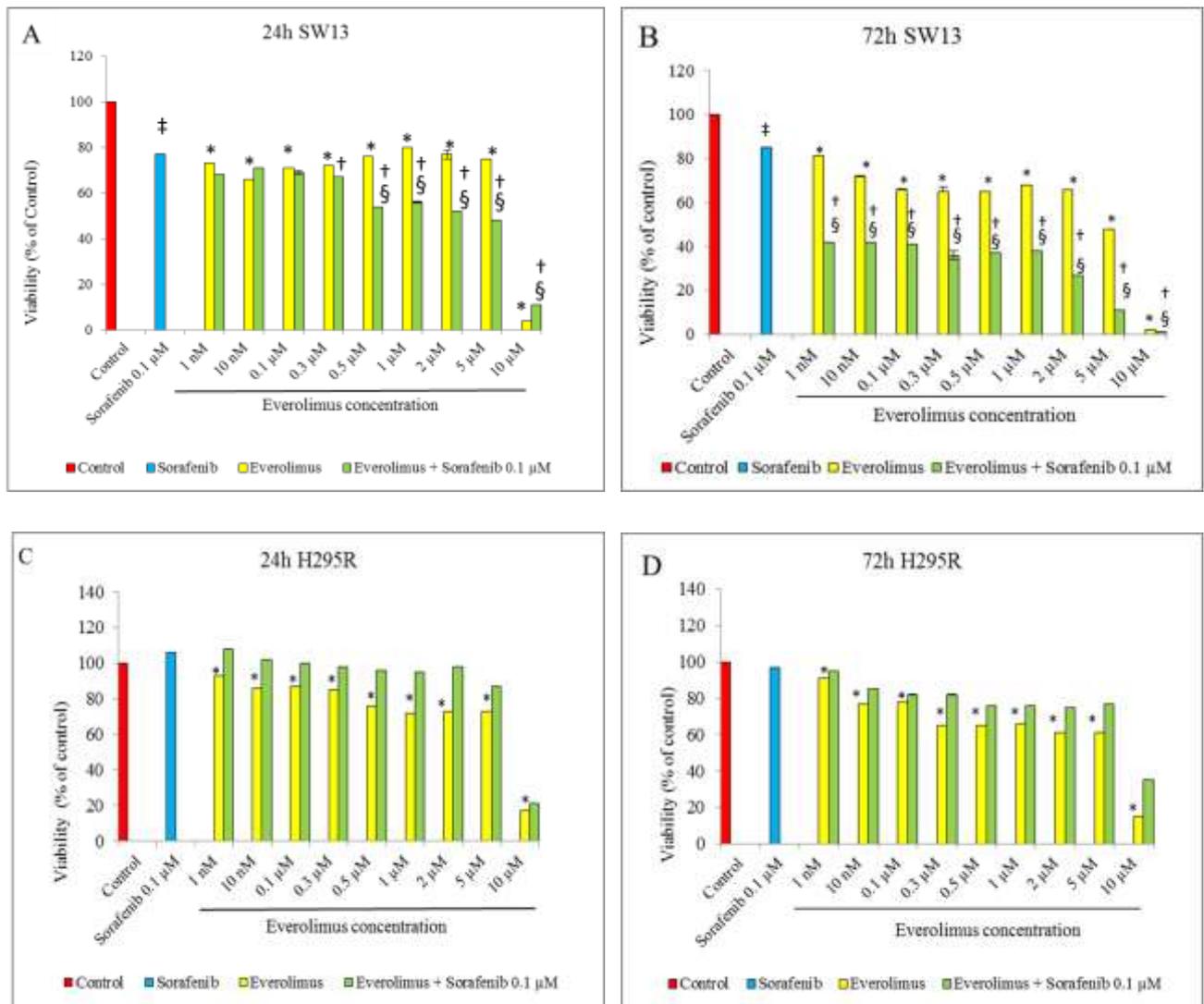


Figura 29. Trattamento combinato dei farmaci: sorafenib 0.1 μM ad una scala di concentrazioni di everolimus da 1 nM a 10 μM. (A) Cellule SW13 a 24 ore di trattamento. (B) Cellule SW13 a 72 ore di trattamento. (C) Cellule H295R a 24 ore di trattamento. (D) Cellule H295R a 72 ore di trattamento. Significatività: ‡ = sorafenib vs controllo, $P < 0.05$; † = everolimus + sorafenib vs sorafenib, $P < 0.05$; * = everolimus vs controllo, $P < 0.05$; § = everolimus + sorafenib vs everolimus $P < 0.05$. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato.

4. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus in colture cellulari primarie surrenaliche

Delle **8 colture primarie** trattate con i farmaci, 3 carcinomi e 3 adenomi rispondono in modo significativo sia al trattamento con il farmaco sorafenib che al farmaco everolimus, mentre 2 casi di ACC sono resistenti ad entrambi i farmaci (**Figura 30 A-B-C**). L'analisi biochimica del profilo proteico di un ACC trattato con sorafenib 5 μM e con everolimus 0.1 μM per 6 ore dimostra una

completa inibizione di p-Akt e di p-P70S6K ed una marcata riduzione in p-ERK nel trattamento con il farmaco sorafenib (Figura 30 D).

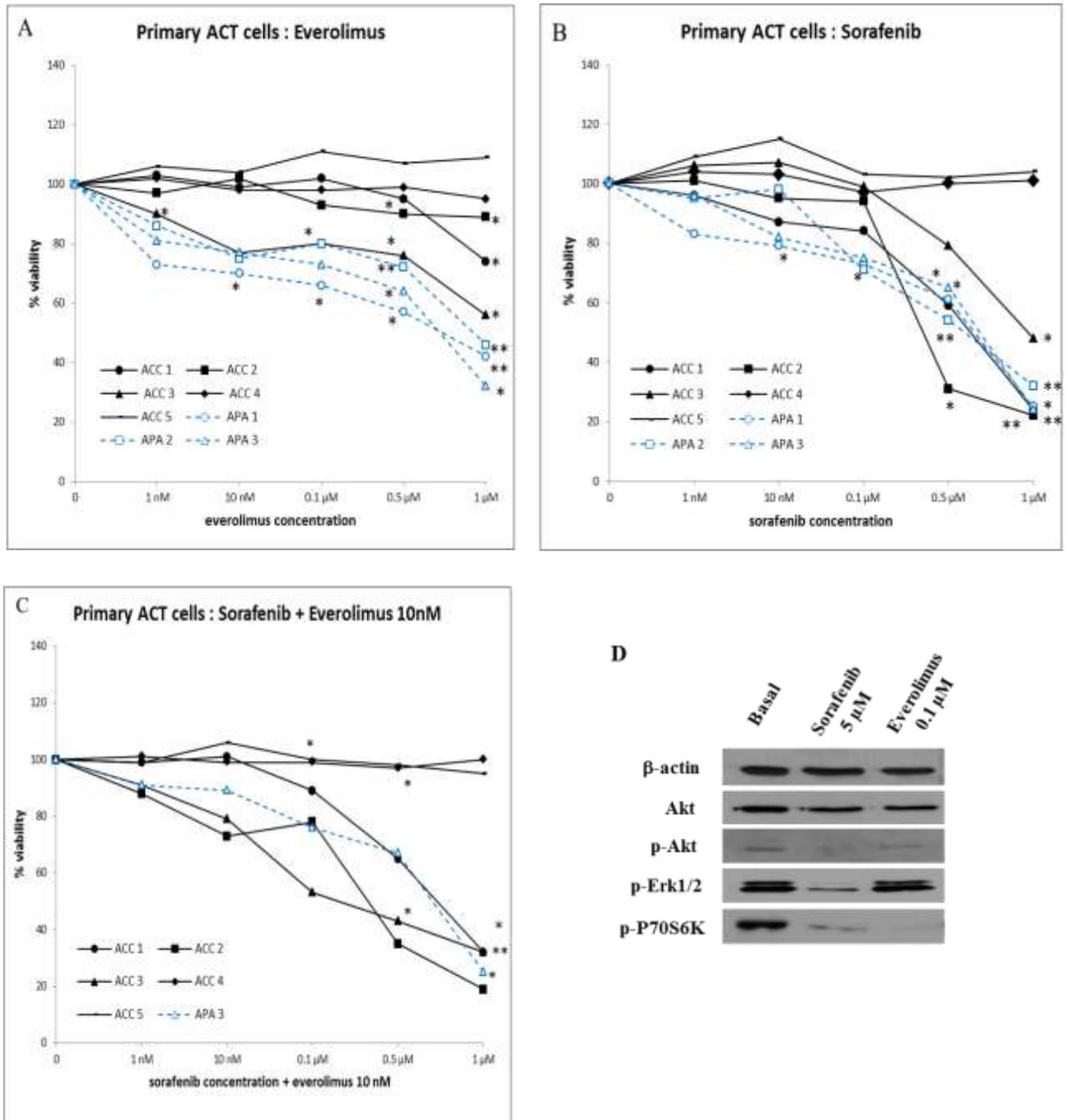


Figura 30. Effetto dei farmaci su colture cellulari primarie corticosurrenali a 24 ore di trattamento. Inibizione della vitalità cellulare da parte del farmaco everolimus (A), sorafenib (B) e del trattamento combinato con i due farmaci (C) in 5 ACC (ACC1-5) e tre APA (APA1-3) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato. (D) Western blot e analisi biochimica del profilo proteico sulle cellule di ACC in coltura trattate con sorafenib 5 μM e con everolimus 0.1 μM per 6 ore; analisi delle proteine Akt, p-Akt, p-ERK1/2, p-P70S6K e β-actina.

5. Valutazione della morte programmata cellulare per apoptosi

5.1 Valutazione apoptosi attraverso il metodo in fluorescenza

In fluorescenza, ma successivamente anche in citofluorimetria abbiamo dimostrato che i due farmaci hanno un effetto apoptotico sulle cellule SW13 nel trattamento a 6 ore, mentre non vi è un effetto così marcato nelle cellule H295R. Attraverso la **metodica TUNEL**, abbiamo osservato come sia presente solo la fluorescenza rossa e non verde nelle cellule di controllo non trattate, mentre dopo trattamento con sorafenib 5 μM e con everolimus 9 μM alcune cellule perdono la fluorescenza rossa per acquisire la fluorescenza verde, grazie all'incorporazione di dUTP-fluoresceina al terminale 3'-OH del DNA frammentato durante i processi di morte cellulare (**Figura 31**).

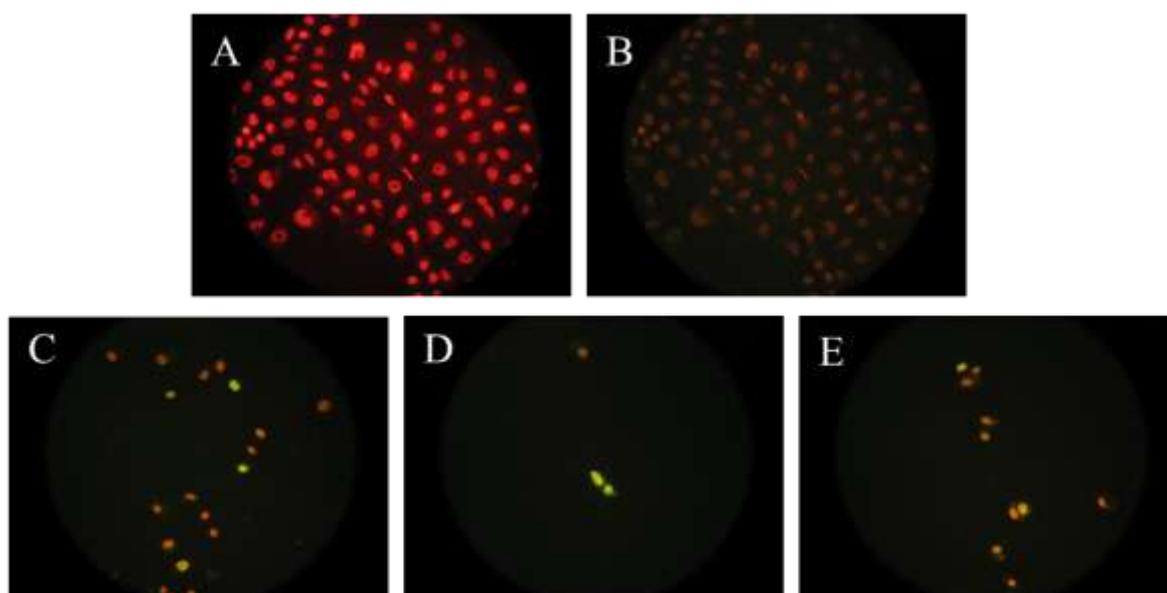


Figura 31. Cellule SW13 sottoposte a microscopia a fluorescenza con il metodo TUNEL. Fluorescenza rossa (A) e verde (B) in condizioni basali (ingrandimento 40X). Trattamento con sorafenib 0,1 μM in fluorescenza verde, (C, ingrandimento 40X) e (D, ingrandimento 63X). Trattamento con everolimus 0,1 μM in fluorescenza verde (E, ingrandimento 40X).

5.2 Valutazione apoptosi attraverso il metodo citofluorimetrico

Analizzando le cellule con la metodica citofluorimetrica che si basa sull'annexina V abbiamo potuto osservare che, rispetto al controllo, costituito da cellule non trattate, nelle **cellule SW13** vi è una riduzione della percentuale di cellule vitali (78% nel controllo non trattato con farmaci, 21% e 29% nei trattamenti rispettivamente con sorafenib 5 μM ed con everolimus 9 μM) ed un aumento della percentuale di cellule in apoptosi precoce e tardiva (14% nel controllo in condizioni basali, 61% e 54% nei trattamenti con sorafenib 5 μM ed con everolimus 9 μM rispettivamente) (**Figura 32 A**).

Nelle **cellule H295R** l'effetto dei due farmaci è presente ma meno marcato: le cellule vitali si riducono passando da un 77% di vitalità nel controllo non trattato, a circa 56% e 69% nei trattamenti con sorafenib 5 μM ed con everolimus 9 μM , mentre la percentuale di cellule in apoptosi aumenta di circa un 15-20% nei trattati (22% nel controllo non trattato con i farmaci, 43% e 30% nei trattamenti con sorafenib 5 μM e con everolimus 9 μM) (**Figura 32 B**).

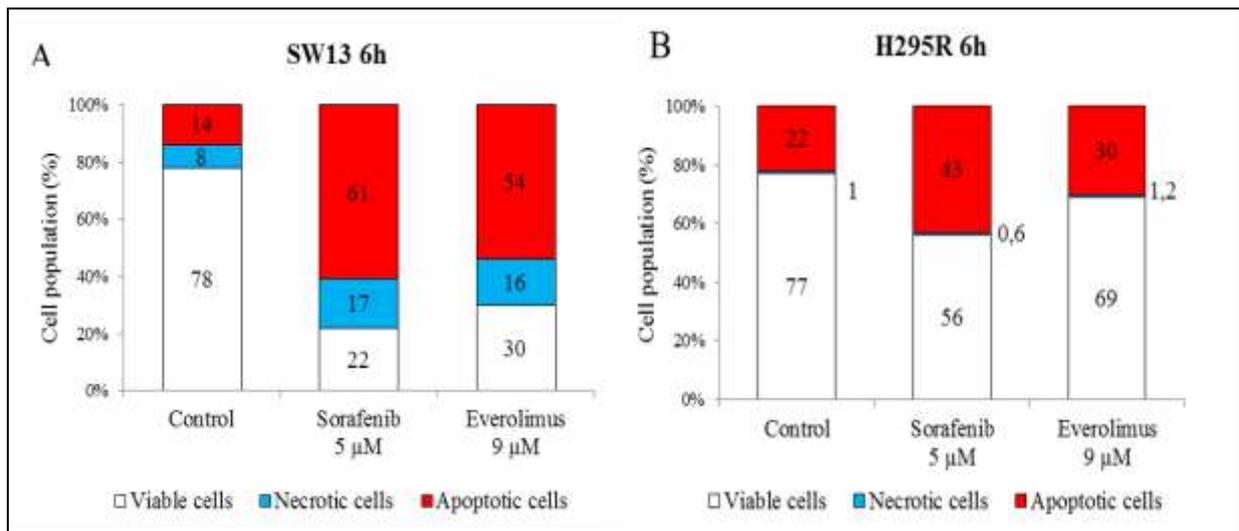


Figura 32. Valutazione dell'apoptosi nelle cellule SW13 e h295R dopo 6 ore di trattamento con i farmaci sorafenib 5 μM ed everolimus 9 μM . Analisi citofluorimetrica per le cellule SW13 (A) e H295R (B). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

6. Valutazione ciclo cellulare attraverso il metodo citofluorimetrico con ioduro di propidio

Dall'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare abbiamo potuto osservare che nelle SW13 trattate con **everolimus 9 μM** sembra esserci un accumulo delle cellule in fase G1 con conseguente diminuzione delle fasi S e G2/M, effetto non riscontrabile nelle cellule H295R.

Con il farmaco **sorafenib 5 μM** riscontriamo un aumento della percentuale di cellule in fase sub-G1 (ritenuta essere la fase apoptotica a causa del legame dello ioduro di propidio a piccoli frammenti di DNA tipici delle cellule in fase apoptotica) e una lieve diminuzione della percentuale di cellule in fase G1 sia nelle cellule H295R che nelle SW13 (**Figura 33 A-B**).

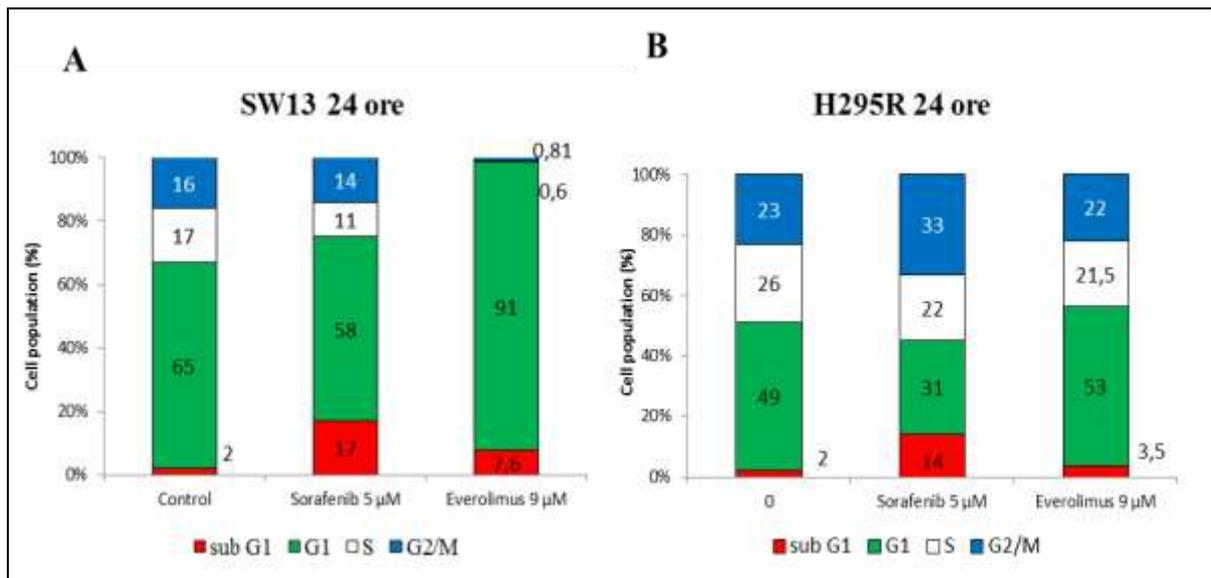


Figura 33. Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare delle cellule SW13 (A) e H295R (B) trattate con i farmaci sorafenib 5 µM ed everolimus 9 µM a 24 ore. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

7. Effetto dei farmaci Sorafenib ed Everolimus *in vitro* sulle pathway intracellulari di PI(3)K/Akt/mTOR e di Raf/MEK/ERK.

Mediante western blot abbiamo valutato l'effetto dei farmaci sull'attivazione/inibizione di alcune fondamentali proteine cellulari coinvolte nelle pathway di PI(3)K/Akt/mTOR e di Raf/MEK/ERK, possibili target di everolimus e sorafenib.

L'analisi di **immunoprecipitazione** ha dimostrato che la fosforilazione di VEGFR-2 indotta dallo stimolo con VEGF è significativamente ridotta dal trattamento con sorafenib sia nelle cellule H295R che nelle SW13 (**Figura 34 A**).

Sorafenib alla concentrazione di 5 µM è in grado di ridurre drasticamente la fosforilazione di ERK1/2, Akt e P70S6K nelle cellule SW13, mentre riduce solo la fosforilazione di ERK1/2 nelle cellule H295R (**Figura 34 B**).

Everolimus inibisce completamente la fosforilazione della proteina P70S6K, posta a valle di mTOR, sia nelle cellule SW13 che nelle H295R, mentre riduce debolmente la fosforilazione di Akt ad alte concentrazioni di farmaco e non ha effetto sulla fosforilazione di ERK1/2 (**Figura 34 C**).

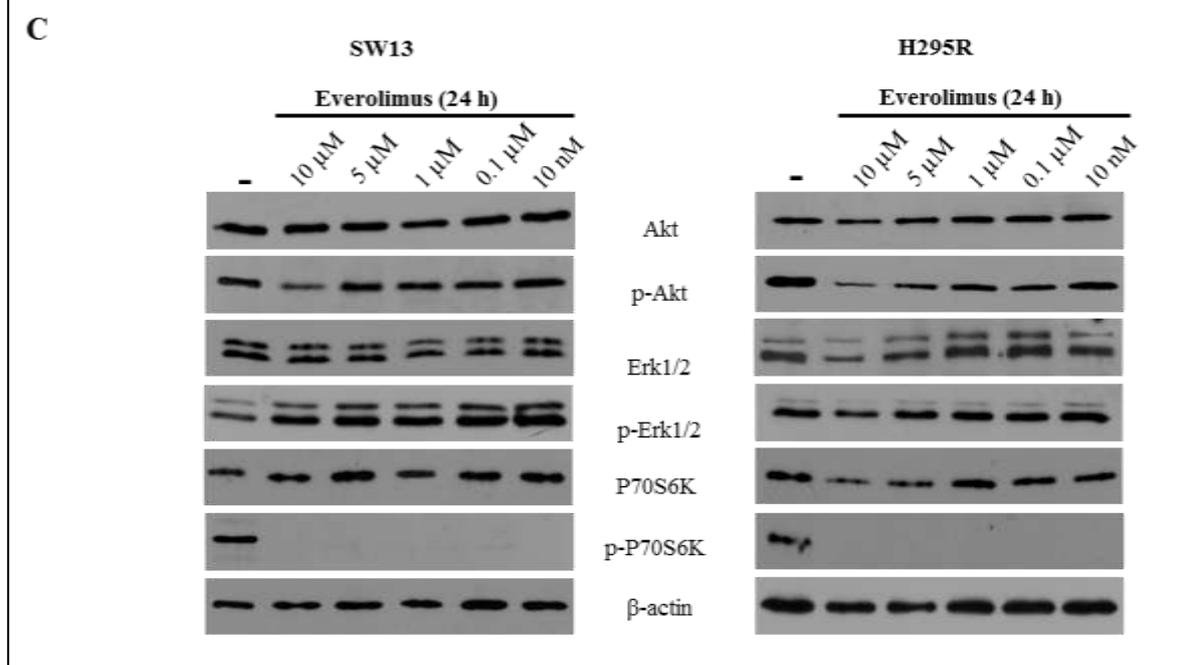
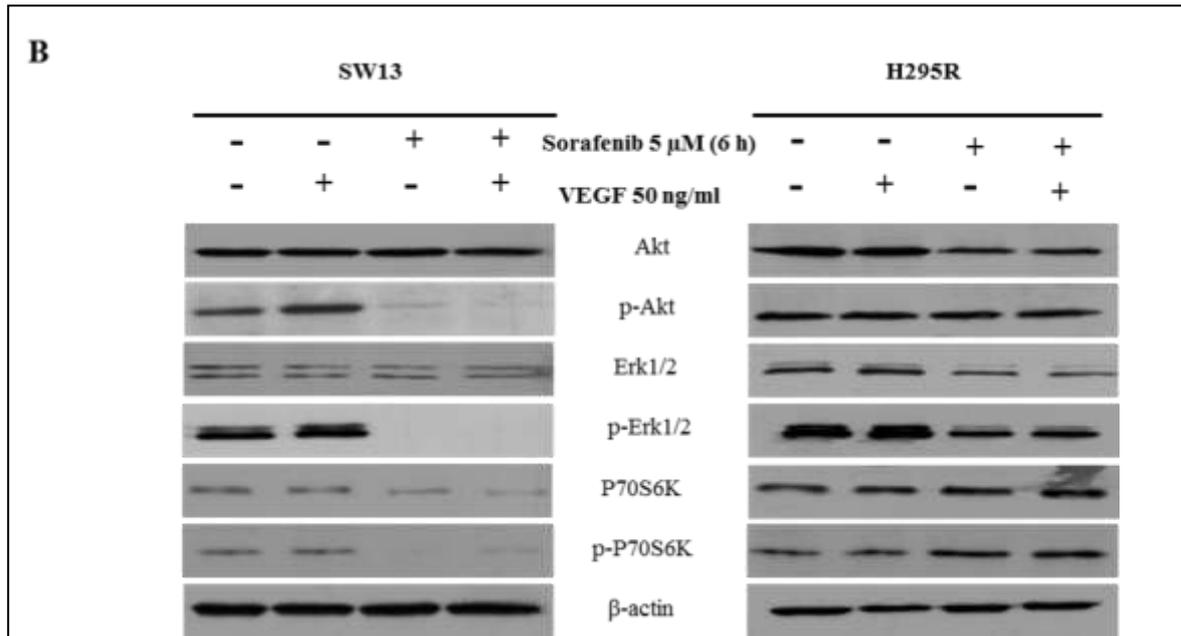
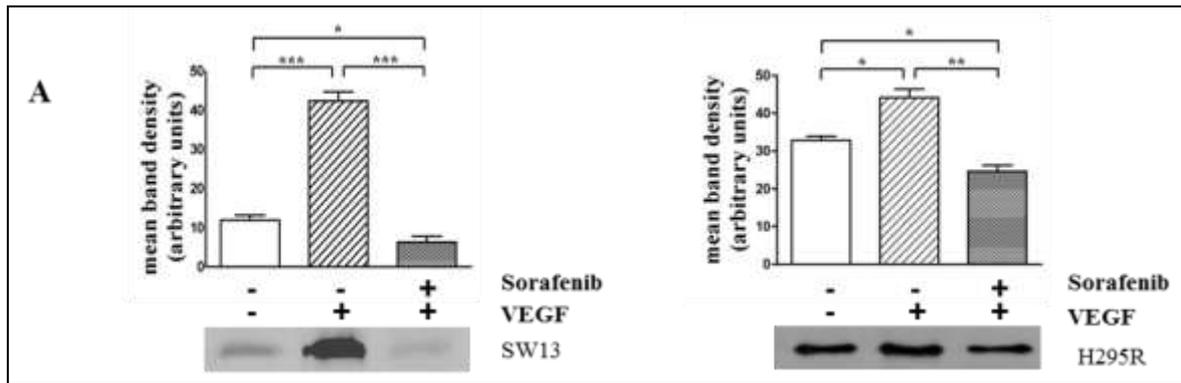


Figura 34. Effetto dei farmaci sulle pathway intracellulari delle cellule H295R ed SW13 trattate con i farmaci sorafenib ed everolimus. (A) Immunoprecipitazione con anti-phospho-VEGFR2 in presenza o in assenza di VEGF e di sorafenib 5 μ M con relative quantificazioni (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (B) Analisi dell'espressione delle proteine: Akt, p-Akt, Erk1/2, p-Erk1/2, P70S6K, p-P70S6K e β -actina in cellule H295R ed SW13 dopo 6 ore di trattamento con o senza sorafenib in presenza o assenza della stimolazione con VEGF. (C) Analisi dell'espressione delle proteine: Akt, p-Akt, Erk1/2, p-Erk1/2, P70S6K, p-P70S6K e β -actina in cellule H295R ed SW13 dopo 24 ore di trattamento a varie concentrazioni di everolimus. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

8. Trattamento farmacologico di Sorafenib ed Everolimus *in vivo*

L'effetto terapeutico *in vivo* dei farmaci sorafenib ed everolimus, singolarmente o in combinazione, è stato valutato in modelli tumorali murini in cui sono state trasfettate cellule tumorali corticosurrenaliche con luciferasi. L'efficacia è stata monitorata attraverso l'analisi di bioluminescenza e della sopravvivenza degli animali xenotrapiantati.

Il **sorafenib** non produce una significativa attività negli xenotrapianti di cellule SW13 o di cellule H295R. La somministrazione di **everolimus** produce una diminuzione della crescita del tumore indotto dalle cellule SW13 ma non è efficace negli xenotrapianti di cellule H295R. La **combinazione dei due farmaci** produce invece un marcato effetto inibitorio sulla crescita tumorale di entrambi gli xenotrapianti in quanto è possibile osservare una significativa riduzione della bioluminescenza media dei tumori presenti nei topi trattati rispetto ai tumori di topi trattati con placebo (**Figura 35 A**).

Analisi statistica: cellule SW13, sorafenib vs placebo ($P = 0.267$), everolimus vs placebo ($P = 0.029$), trattamento combinato vs placebo ($P = 0.011$). Cellule H295R, sorafenib vs placebo ($P = 0.400$), everolimus vs placebo ($P = 0.714$), trattamento combinato vs placebo ($P = 0.024$) (**Figura 35 B**).

Oltre a ridurre la crescita tumorale, il trattamento farmacologico influenza la sopravvivenza media. Attraverso le curve di sopravvivenza di Kaplan-Maier sono state calcolate le mediane degli xenotrapianti con cellule SW13 e cellule H295R trattate con placebo, everolimus, sorafenib, o con il trattamento combinato: le mediane variano rispettivamente da 44, 47, 30, 53 giorni e 53, 63, 48, 70 giorni; indicando quindi una probabile azione sinergica del trattamento combinato (**Figura 35 C**) (**Tabella 8**).

Analisi statistica: cellule SW13, everolimus vs placebo ($P = 0.053$), sorafenib vs placebo ($P = 0.051$), trattamento combinato vs placebo ($P = 0.011$). Cellule H295R, everolimus vs placebo ($P = 0.079$), sorafenib vs placebo ($P = 0.898$), trattamento combinato vs placebo ($P = 0.055$) (**Figura 35 C**).

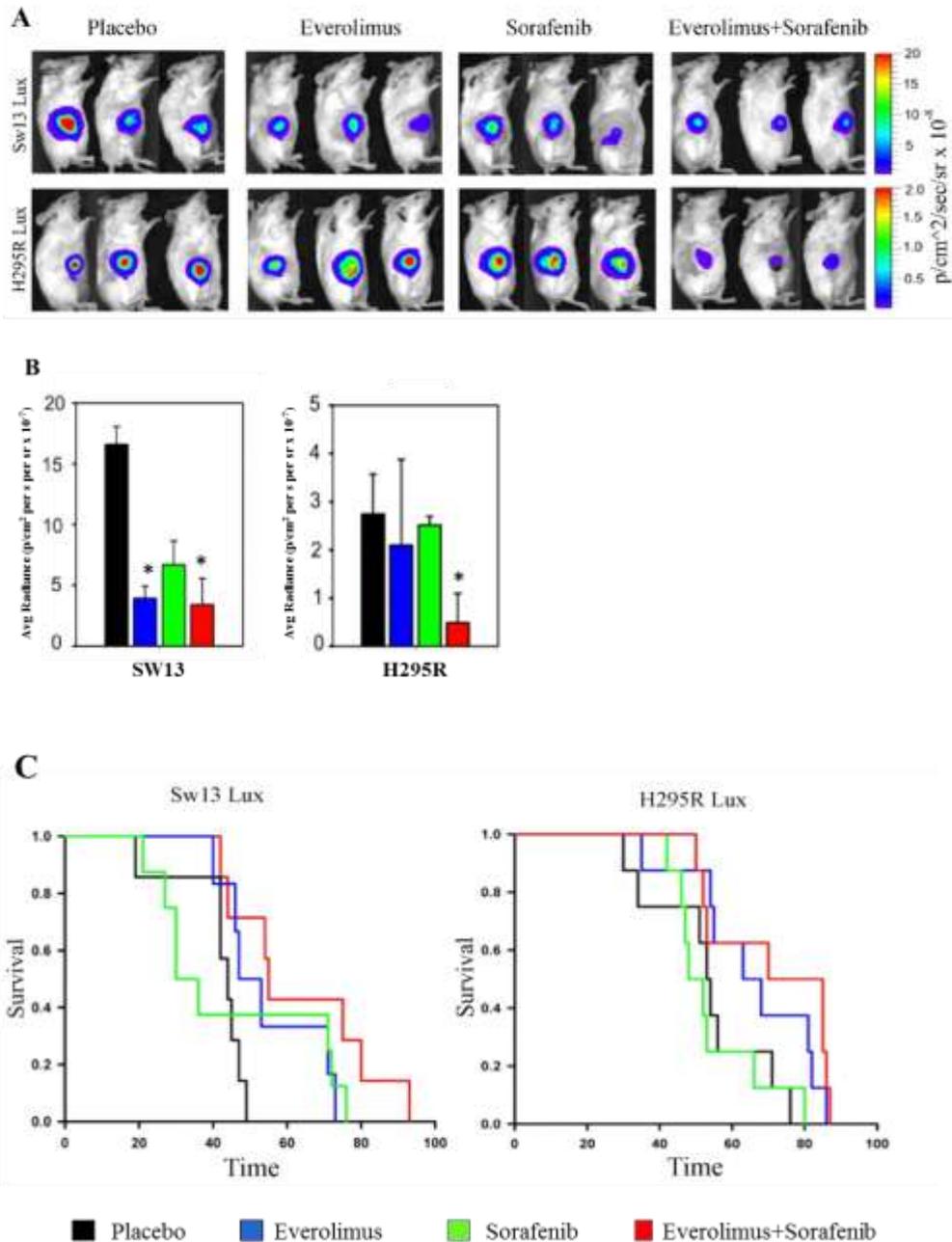


Figura 35. Effetti *in vivo* sulla crescita del tumore e risposta alla terapia farmacologica. (A) Immagini di bioluminescenza di topi trattati o non trattati, affetti da tumori indotti s.c. dall'inoculo di cellule SW13 (pannello superiore) e di cellule H295R (pannello inferiore) trasfettate con luciferasi. Sono stati presi in considerazione tre topi rappresentativi per gruppo dopo 4 settimane dall'inoculo tumorale. (B) Emissione cumulativa dei fotoni dei topi trattati come nella figura A. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori \pm la deviazione standard, dell'emissione di otto topi per gruppo dopo 4 settimane dall'inoculo del tumore. La barra nera rappresenta i topi trattati con placebo, la barra blu i topi trattati con everolimus, la barra verde i topi trattati con sorafenib e la barra rossa i topi trattati con entrambi i farmaci. (C) Curve di sopravvivenza Kaplan-Maier di topi inoculati con cellule SW13 e H295R. Topi trattati con placebo (controlli, $n=8$, linea nera), everolimus ($n=8$, linea blu), sorafenib ($n=8$, linea verde), o la combinazione dei due farmaci ($n=8$, linea rossa).

Tabella 8. Mediane delle sopravvivenze calcolate dalle curve di sopravvivenza Kaplan-Maier del trattamento con i farmaci sorafenib, everolimus e la combinazione dei farmaci (sorafenib+ everolimus) su topi xenotrapiantati con cellule H295R ed SW13.

	SW13	H295R
PLACEBO	44 (days)	53 (days)
EVEROLIMUS	47 (days)	63 (days)
SORAFENIB	30 (days)	48 (days)
EVEROLIMUS + SORAFENIB	53 (days)	70 (days)

9. Analisi genetica delle vie del segnale di Raf/Ras/ERK/MEK e di Wnt/ β -catenina

Attraverso la tecnica di High Resolution Melting (HRM) abbiamo investigato la presenza di alterazioni in alcuni componenti chiave della via del segnale delle MAP Chinasi e nella via del segnale di Wnt/ β -catenina in circa 103 campioni, suddivisi in 8 tessuti corticosurrenali normali (NA) e 95 tumori corticosurrenali, suddivisi a loro volta in 24 ACC e 71 ACA (37APA + 28CPA + 6 NSA).

Analizzando gli hot spot mutazionali del gene **BRAF** situati nell'esone 11 e nell'esone 15 abbiamo identificato 2 diverse alterazioni geniche in 2 campioni di carcinoma corticosurrenalico. L'alterazione genica riscontrata in una donna di 38 anni con un carcinoma non secernente è una mutazione silente (Arg444Arg) che colpisce l'esone 11. La mutazione nell'esone 15 è stata rinvenuta in uomo di 48 anni affetto da carcinoma corticosurrenale, è la comune Val600Glu, alterazione che comporta la sostituzione di una valina con un acido glutammico, riscontrata frequentemente nel melanoma e nel carcinoma papillare della tiroide (**Figura 37**) (**Tabella 9**).

Per quanto riguarda lo studio degli hot spot mutazionali dei geni della **famiglia RAS**, non abbiamo rilevato nessuna alterazione negli esoni 2 e 3 dei geni *N-RAS* e *K-RAS*, mentre nel gene *H-RAS* abbiamo osservato 4 alterazioni in 2 ACC ed in 2 ACA, 2 nell'esone 2 e 2 nell'esone 3. Le alterazioni geniche rinvenute sono His27His e Ala59Ala (**Figura 36 A-B** e **Figura 37**) (**Tabella 9**).

Le alterazioni riscontrate nell'esone 3 del gene **CTNNB1**, gene che codifica per la β -catenina, sono molteplici e coinvolgono 13 adenomi e 5 carcinomi. Quasi tutte le alterazioni, ovvero 14/18 campioni (78%), affliggono l'amminoacido serina situato in posizione 45, punto cruciale per la fosforilazione da parte della proteina GSK3- β e fondamentale per la degradazione della β -catenina attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma. Abbiamo poi osservato 2 delezioni (Ser45 del; Ala43_Glu53del) rispettivamente in un carcinoma ed in un adenoma, e 2 mutazioni composte (Pro44Ala + Ser45Pro) riscontrate in un adenoma secernente aldosterone ed in un adenoma secernente cortisolo, alterazioni che coinvolgono sempre la posizione 45 e l'amminoacido serina (**Figura 36 C** e **Figura 37**) (**Tabella 9**). Riassumendo, abbiamo osservato 5 su 24 ACC (21%) e 13 su 71 ACA (18%) possedenti una mutazione che colpisce l'esone 3 del gene **CTNNB1** ed in totale quindi abbiamo ottenuto 18 campioni mutati su 95 ACT (19%).

Esaminando le linee cellulari stabili **SW13** e **H295R** abbiamo inoltre osservato che le H295R (modello per eccellenza di ACC) possiedono un'alterazione genica a carico dell'esone 3 del gene **CTNNB1**; la mutazione comporta la sostituzione di una serina con una prolina in posizione 45 (Ser45Pro), hot spot mutazionale riscontrato frequentemente alterato negli ACT e nei nostri campioni (**Tabella 9**).

Ricercando la presenza di alterazioni nell'esone 7 del gene **AXIN2** non abbiamo riscontrato alcun alterazione genica in tutti i 103 campioni sani e tumorali. Nelle cellule H295R invece è stata osservata un'importante delezione in omozigosi di 12 paia di basi (Arg671_Pro674del) (**Figura 37**) (**Tabella 9**).

Tabella 9. Riassunto delle alterazioni riscontrate negli ACT e nelle cellule H295R.

Patients age (y)/sex	Histological diagnosis	Functional status	Genetic mutation
38/F	Carcinoma	Non-functioning	<i>BRAF</i> exon 11 c.1332 G>A p. Arg444Arg
48/M	Carcinoma	Non-functioning	<i>BRAF</i> exon 15 c.1799 T>A p. Val600Glu
51/M	Carcinoma	Non-functioning	<i>HRAS</i> exon 2 c. 81 T>C p. His27His
63/F	Carcinoma	Cortisol-producing	<i>HRAS</i> exon 2 c. 81 T>C p. His27His
66/M	Adenoma	Aldosteron-producing	<i>HRAS</i> exon 3 c. 177 C>G p. Ala59Ala
61/F	Adenoma	Cortisol-producing	<i>HRAS</i> exon 3 c. 177 C>G p. Ala59Ala

53/F	Carcinoma	Cortisol-and androgen- producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.107 A>C p. His36Pro
63/F	Carcinoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.101 G>C p. Gly34Ala
66/F	Carcinoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.107 A>C p. His36Pro
34/F	Carcinoma	Cortisol-and androgen- producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.134 C>T p. Ser45Phe
69/F	Carcinoma	Cortisol-and androgen- producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 133 del 3bp p. S45 del
60/M	Adenoma	Non-functioning	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.134 C>T p.Ser45Phe
61/F	Adenoma	Non-functioning	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.133 T>C p. Ser45Pro
66/F	Adenoma	Aldosterone-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 127 del 33bp p. Ala43_Glu53del
48/M	Adenoma	Aldosterone-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 133 T>C + 136 C>G p. Pro44Ala + Ser45Pro
53/M	Adenoma	Aldosterone-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.121 A>G p. Thr41Ala
77/F	Adenoma	Aldosterone-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.133 T>C p. Ser45Pro
22/F	Adenoma	Aldosterone-and cortisol producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 134 C>G p. Ser45Cys
50/M	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.134 C>T p. Ser45Phe
34/F	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.133 T>C p. Ser45Pro
68/M	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.134 C>T p. Ser45Phe
49/M	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 134 C>G p. Ser45Cys
42/F	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c. 133 T>C + 136 C>G p. Pro44Ala + Ser45Pro
73/F	Adenoma	Cortisol-producing	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.134 C>T p. Ser45Phe
H295R cells	ACC cell line	<i>CTNNB1</i> exon 3 c.133 T>C p. Ser45Pro <hr/> <i>AXIN2</i> exon 7 c. 2013_2024del12 p.Arg671_Pro674del	

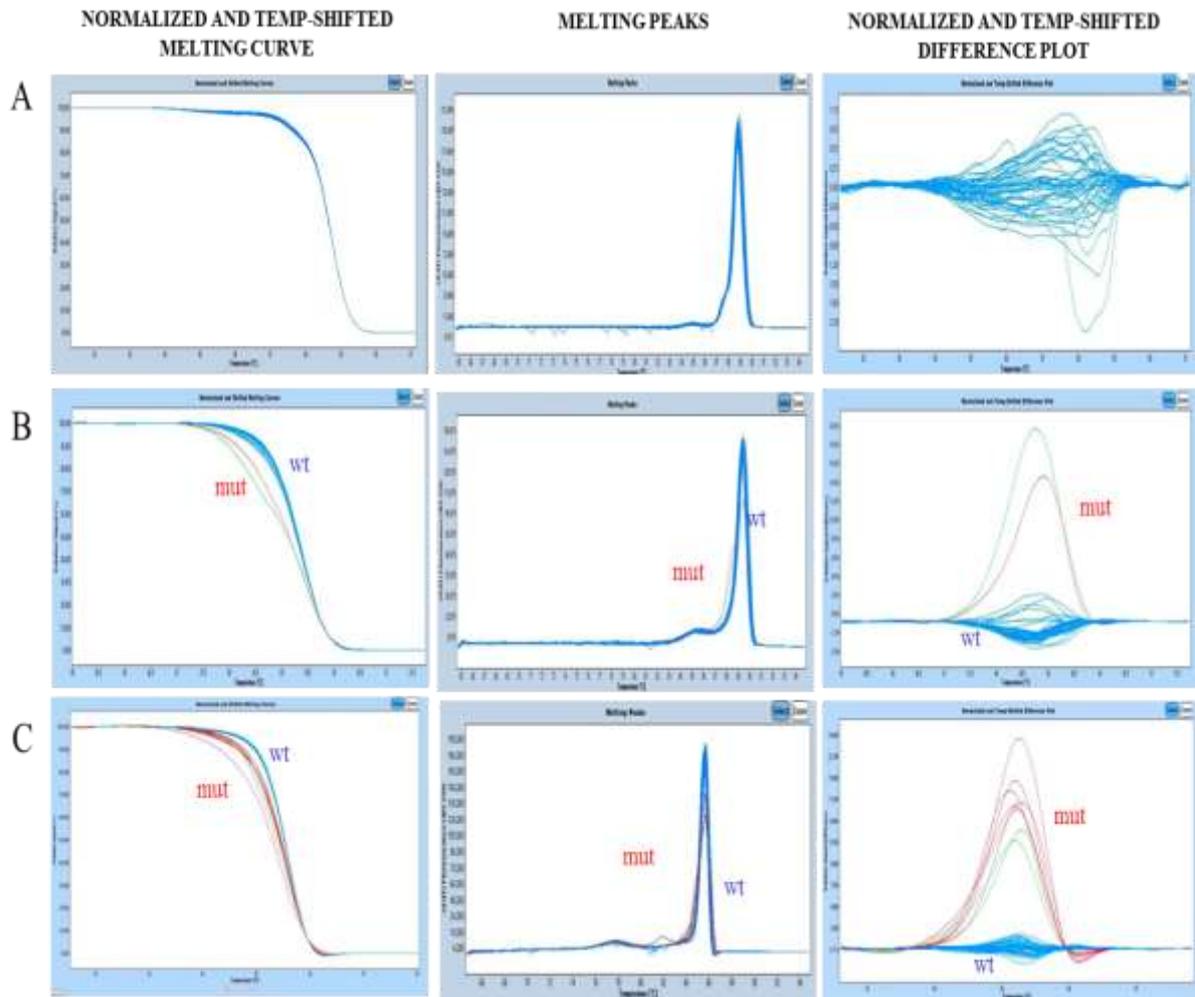


Figura 36. Analisi HRM attraverso le curve di decadimento della fluorescenza (normalized and temp-shifted melting curve), la curva di melting (melting peaks) e la normalizzazione della curva di melting (normalized and temp-shifted difference plot) dei geni *N-RAS*, *H-RAS* e *CTNNB1*.

(A) Studio dell'esone 2 del gene *N-RAS* in cui non sono riscontrate alterazioni geniche, tutti i campioni analizzati hanno lo stesso profilo di decadimento di fluorescenza e un'identica temperatura di melting.

(B) L'indagine dell'esone 2 del gene *H-RAS* evidenzia 2 campioni che differenziano dall'andamento generale dei campioni wild-tipe; la curva di melting e la sua normalizzazione possiedono due campioni con un profilo estremamente diverso dai campioni wild-tipe non mutati.

(C) Indagine dell'esone 3 del gene *CTNNB1* in cui molti campioni hanno una curva di decadimento della fluorescenza che diverge dall'andamento della curva dei campioni wild-tipe; i campioni mutati possiedono perciò una curva di melting e la normalizzazione della stessa estremamente diversa dai campioni wild-tipe.

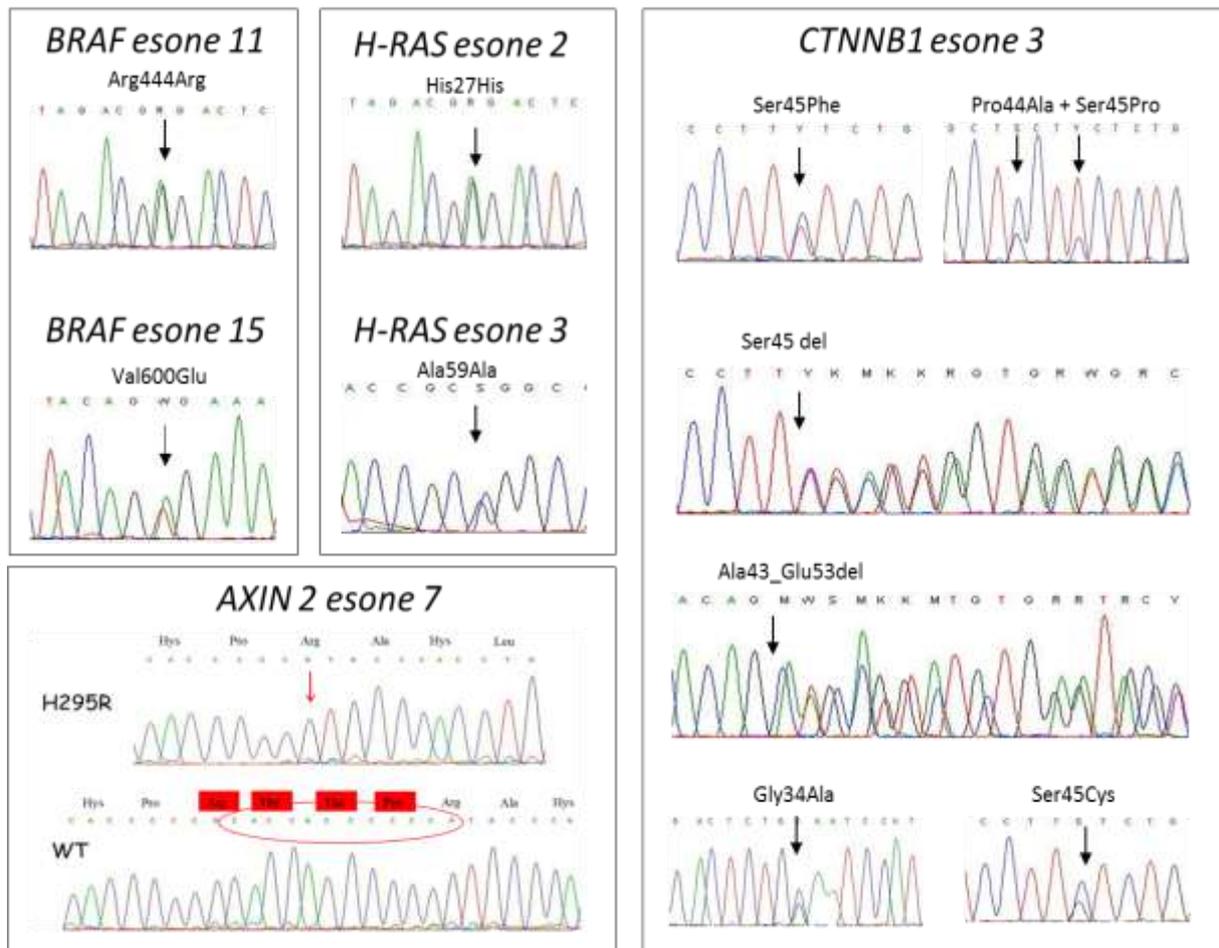


Figura 37. Elettroferogrammi di alcune mutazioni riscontrate in questo studio: alterazioni dei gene *BRAF*, *H-RAS*, *CTNNB1* negli ACT e mutazione nel gene *AXIN2* nelle cellule H295R.

10. Analisi di espressione della via del segnale di Wnt/ β -catenina

10.1 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Real-Time PCR

Attraverso la tecnica di Real-Time PCR abbiamo analizzato l'espressione di β -catenina in 68 tessuti corticosurrenali: suddivisi in 24 ACC, 44 ACA (18 APA + 20 CPA + 6 NSA) e 8 campioni di surrene normale (NA).

Rispetto ai controlli di surrene normale, abbiamo riscontrato una over-espressione di β -catenina in circa il 50% degli ACC (12/24) ed in circa il 48% degli ACA (21/44); una down-regolazione di β -catenina in circa l'8% degli ACC (2/24) ed in circa il 7% degli ACA (3/44). I campioni con una espressione di β -catenina simile al controllo sono circa il 42% degli ACC (10/24) e circa il 45% degli ACA (20/44) (**Figura 38 A-B**).

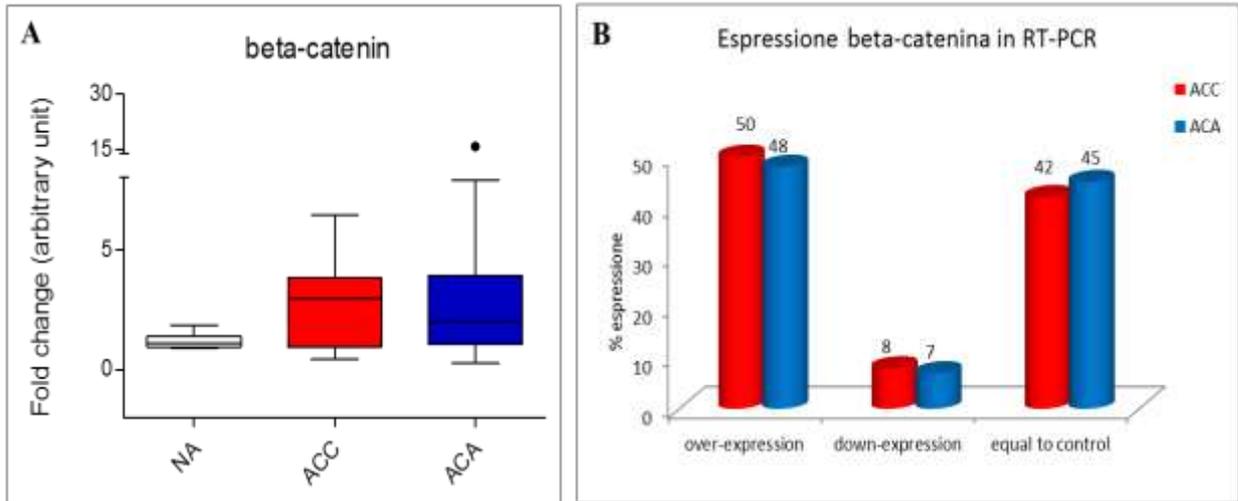


Figura 38. (A) Analisi dell'espressione di β -catenina in real-time PCR dei campioni di surrene normale (NA), dei carcinomi (ACC) e degli adenomi ACA. (B) Rappresentazione schematica del profilo di espressione di β -catenina in 68 campioni di ACT (ACC vs ACA) analizzati.

10.2 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Immunistoichimica (IHC)

I dati derivanti dall'analisi immunistoichimica eseguita su 58 tessuti (10 NA+ 15 ACC + 33 ACA) sono in concordanza con i dati di Real-Time PCR e dimostrano l'overespressione di **β -catenina** in circa il 47% negli ACC (7/15) ed in circa il 33% degli ACA (11/33) (**Figura 39 C-F**). In questi tessuti è stato osservato un intenso accumulo citoplasmatico e/o nucleare di β -catenina, a differenza dei tessuti corticosurrenali normali in cui è osservata una debole espressione della β -catenina localizzata a livello della membrana cellulare (**Figura 39 A-B**).

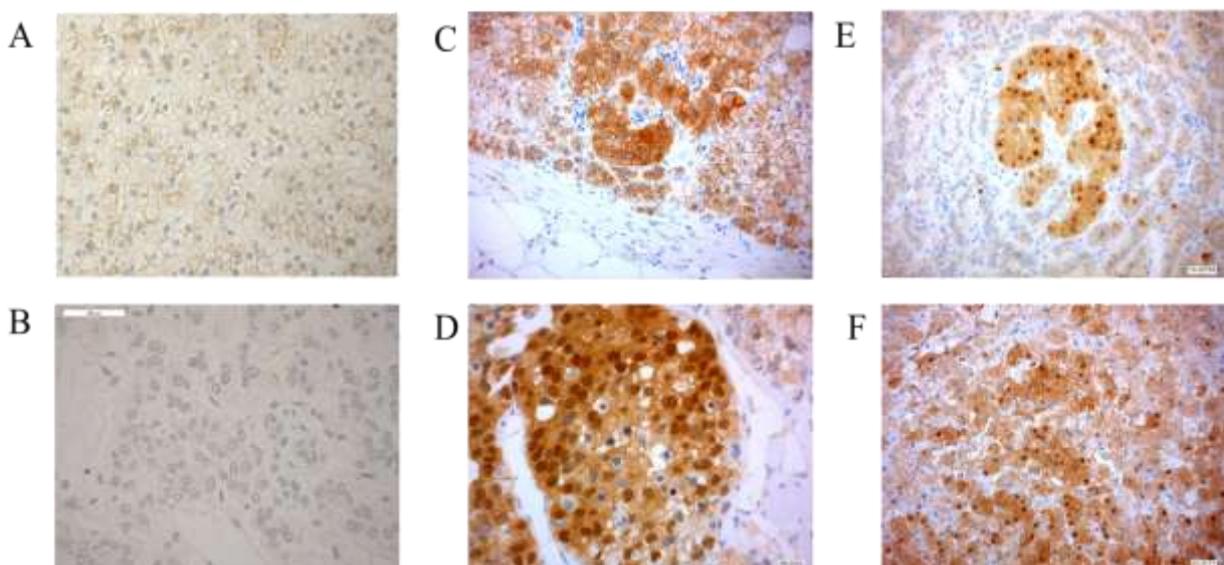


Figura 39. Immagini di immunohistochimica per la β -catenina negli ACT. (A-B) Debole colorazione membranosa di β -catenina senza accumulo citoplasmatico/nucleare in un normale tessuto corticosurrenalico. (C-F) ACT con diffusa localizzazione di β -catenina a livello citoplasmatico/nucleare. (C) ACC-1 privo della mutazione dell'esone 3 del gene *CTNNB1*. (D) ACC-2 con mutazione nel gene *CTNNB1*. (E) CPA-1 con mutazione dell'esone 3 del gene *CTNNB1*. (F) APA-1 con mutazione dell'esone 3 del gene *CTNNB1*.

11. Analisi di espressione delle molecole di adesione cellulare (E-caderina ed N-caderina)

11.1 Analisi di espressione attraverso la tecnica di Real-time PCR

Attraverso la tecnica di Real-Time PCR abbiamo analizzando l'espressione delle molecole di adesione cellulare (E-caderina ed N-caderina) in 68 tessuti corticosurrenalici: suddivisi in 24 ACC, 44 ACA (18 APA + 20 CPA + 6 NSA) e 8 campioni di surrene normale (NA).

L'analisi di Real-Time PCR dimostra la non-espressione di **E-caderina** in tutti i campioni analizzati. Per quanto riguarda il gene **N-caderina** invece, confrontando i risultati dei tessuti tumorali ad un pool di tessuti corticosurrenalici normali, abbiamo osservato una down-regolazione di N-caderina in circa l'83% degli ACC (20/24) ed in circa il 59% degli ACA (26/44) ed una over-espressione di N-caderina in nessun ACC (0/24) ed in circa il 2% degli ACA (1/44). I campioni con una espressione di N-caderina simile al controllo sono circa il 17% degli ACC (4/24) e circa il 39% degli ACA (17/44) (**Figura 40 A-B**).

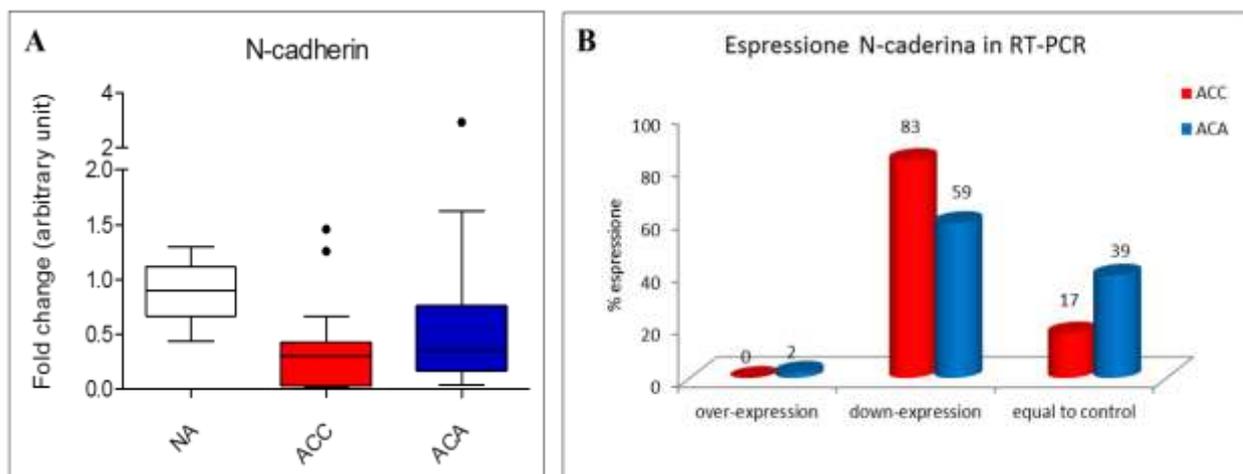


Figura 40. Analisi dell'espressione di N-caderina in real-time PCR dei campioni di surrene normale (NA), dei carcinomi (ACC) e degli adenomi ACA. (B) Rappresentazione schematica del profilo di espressione di N-caderina in 68 campioni di ACT (ACC vs ACA) analizzati.

11.2 Analisi di espressione attraverso la tecnica Immunoistochimica (IHC)

L'analisi IHC di 58 tessuti (10 NA+ 15 ACC + 33 ACA) non ha evidenziato l'espressione di **E-caderina** in nessun ACC (0%), mentre solo 2 adenomi su 33 (6%) hanno mostrato una debole reattività per l'anticorpo E-caderina (**Figura 41 A-B**).

Per quanto riguarda lo studio della proteina **N-caderina** abbiamo potuto osservare che il 100% degli ACC (15/15) ed il 55% degli ACA (18/33) possiedono una down-regolazione di N-caderina. Nei tessuti normali la reattività di N-caderina è rappresentata da una forte colorazione a livello di membrana cellulare, debole in alcuni adenomi e totalmente assente in tutti i casi di carcinoma studiati (**Figura 41 C-E**).

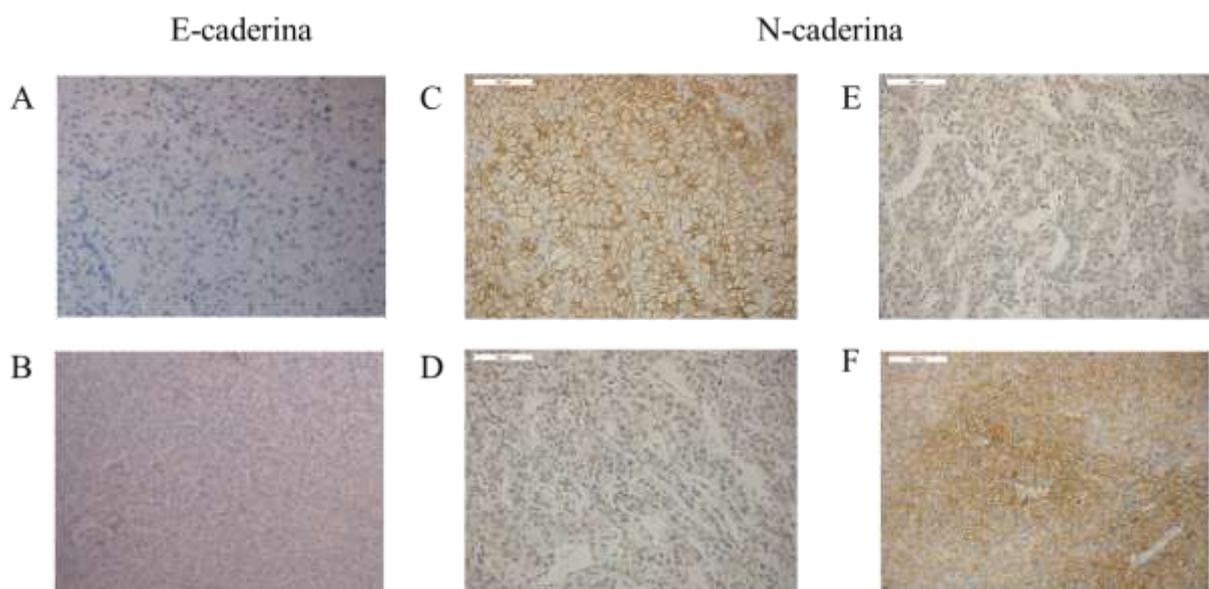


Figura 41. Immagini di immunoistochimica delle molecole di adesione cellulare negli ACT. Espressione di E-caderina in un tessuto corticosurrenalico normale (A) ed in un ACC (B). Espressione di N-caderina a livello della membrana cellulare in un tessuto corticosurrenalico normale (C). Espressione assente di N-caderina in ACC-1 (D). Espressione assente di N-caderina in ACC-2 (E). Bassa espressione di N-caderina in APA-1 (F).

12. Correlazione tra l'espressione genica di β -catenina in rapporto a N-caderina e VEGF

Attraverso l'**analisi non parametrica di Spearman** abbiamo potuto osservare l'esistenza di una correlazione significativa tra due variabili: l'espressione della β -catenina e l'espressione di N-caderina. I valori del coefficiente di correlazione di Spearman possono variare da: -1 (correlazione perfetta negativa tra le variabili) a +1 (correlazione perfetta positiva tra le variabili). Il valore 0 corrisponde invece all'assenza di correlazione.

Nel nostro studio il coefficiente di Spearman corrisponde a $r = 0,6023$ ($P < 0.0001$) indicando una possibile correlazione positiva tra le due variabili di espressione.

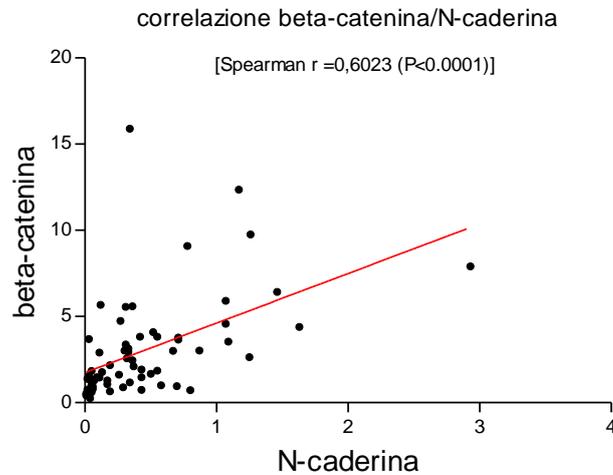


Figura 42. Diagramma di dispersione della correlazione esistente tra l'espressione di N-caderina e β -catenina in 68 ACT [Spearman $r = 0,6023$ ($P < 0.0001$)].

Anche per valutare la correlazione tra l'espressione di β -catenina e di VEGF abbiamo utilizzato l'analisi non parametrica di Spearman, che ha evidenziato la presenza di una correlazione significativa tra le variabili. Il coefficiente di Spearman calcolato corrisponde a $r = 0.4609$ ($P < 0.0001$) indicando una debole correlazione positiva tra VEGF e β -catenina: all'aumentare dell'espressione di β -catenina sembrerebbe esserci un aumento di VEGF; individui con valori elevati di β -catenina avrebbero anche valori elevati di VEGF, ipotesi da verificare con ulteriori studi più approfonditi.

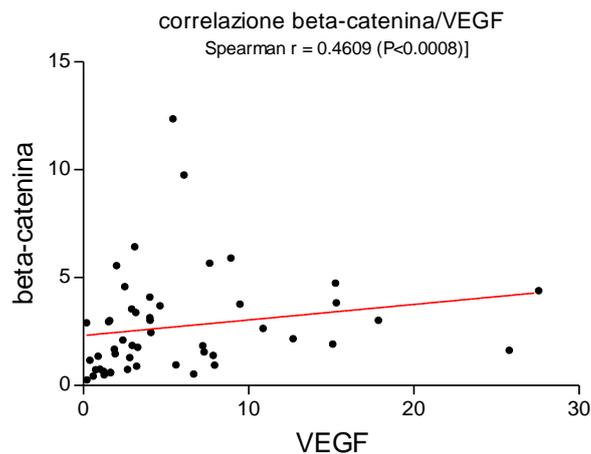


Figura 43. Diagramma di dispersione della correlazione esistente tra l'espressione di VEGF e di β -catenina in 68 ACT [Spearman $r = 0.4609$ ($P < 0.0008$)].

13. Effetto anti-proliferativo di XAV939, farmaco che interagisce nella via del segnale di Wnt/ β -catenina

Dati preliminari nelle cellule H295R ed SW13 trattate con il farmaco XAV939, dimostrano l'efficacia dose dipendente del farmaco. A 24, 48 e 72 ore il farmaco induce un effetto simile e riproducibile che non sembra essere tempo dipendente, tranne alla concentrazione più elevata di 100 μ M nelle cellule H295R. Analizzando le curve a 72 ore di trattamento alle concentrazioni di 1-10-100 μ M si ha una vitalità cellulare rispettivamente di 97, 58 e 30% nelle cellule H295R mentre di 98, 48, 7% nelle cellule SW13.

Il farmaco XAV939 sulle linee **H295R** ed **SW13** sembrerebbe intervenire sulla proliferazione cellulare ed il suo effetto sarà ulteriormente investigato (**Figura 44 A e B**).

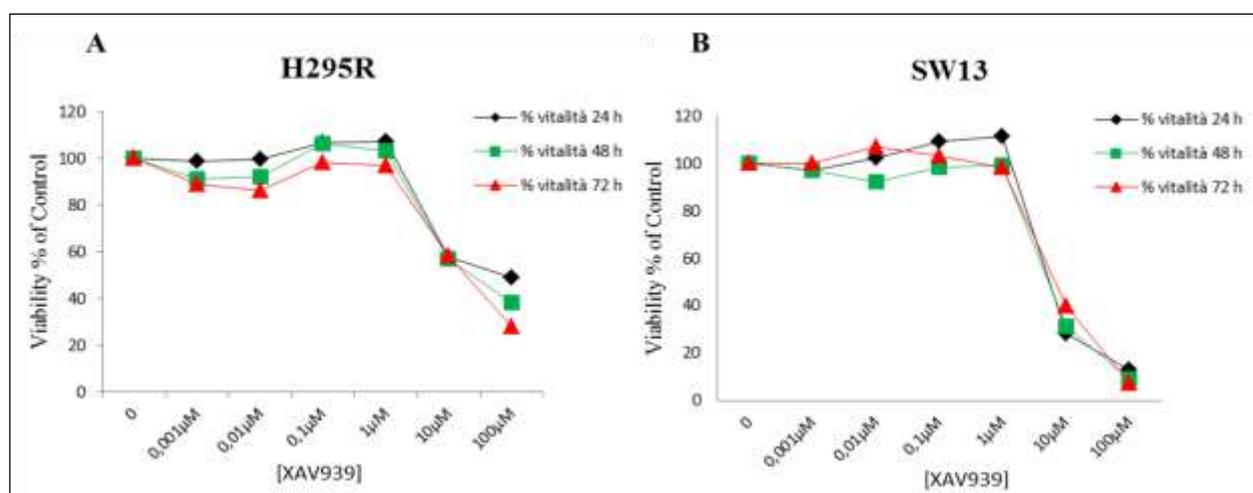


Figura 44. Analisi di proliferazione cellulare delle cellule H295R (A) e delle cellule SW13 (B) trattate con il farmaco XAV939 per 24, 48 e 72 ore. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in quadruplicato. [(P < 0.01) a tutte le concentrazioni].

DISCUSSIONE

Questo studio si è occupato di alcuni aspetti di genetica molecolare dei tumori corticosurrenalici per la valutazione di nuovi target terapeutici nei tumori della ghiandola surrenale, poiché il trattamento attuale basato sull'utilizzo di mitotane (o,p'DDD) in associazione ad agenti chemioterapici e radioterapia risulta essere poco o per nulla efficace. L'analisi dell'espressione di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 ha permesso di valutare il profilo angiogenetico dei tumori corticosurrenalici, per capire quale ruolo queste molecole giocassero nella patogenesi di tale tumore. L'utilizzo di nuovi farmaci, everolimus e sorafenib, ha dimostrato efficacia nel diminuire la vitalità cellulare, nell'aumentare il processo apoptotico e nel modulare due fondamentali pathways cellulari in linee stabilizzate di ACC (H295R, SW13), in colture primarie di tumori corticosurrenalici ed in modelli murini di ACC. L'indagine genetica ha migliorato la conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi corticosurrenalica; analizzando le vie del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK e la via del segnale di Wnt/ β -catenina è stato notato quanto siano frequenti le alterazioni geniche nei componenti chiave della pathway di Wnt/ β -catenina. L'analisi dell'espressione della β -catenina in relazione anche alle molecole di adesione cellulare ha poi sottolineato il coinvolgimento della via di Wnt/ β -catenina nella patogenesi corticosurrenalica.

La ghiandola surrenale è un organo endocrino molto vascolarizzato ed in essa il processo di angiogenesi ha un ruolo estremamente rilevante (Stepien HM et al., 2002; Bernini GP et al., 2002). Una cellula tumorale è in grado sia di produrre VEGF sia di possedere i recettori per questo fattore di crescita, innescando così un meccanismo autocrino che favorisce la crescita, la proliferazione e l'auto-mantenimento delle cellule tumorali (Turner HE et al., 2003). Dati di letteratura, riportano l'aumento dell'espressione di VEGF in tumori che colpiscono la parte midollare della ghiandola surrenalica, riscontrando una relazione tra la maggiore espressione di VEGF, la densità microvascolare e la progressione del tumore verso il feocromocitoma maligno (Zielke A et al., 2002). In uno studio di Kolomecki e collaboratori invece, si dimostra come i livelli di VEGF siano più alti nel siero di pazienti con carcinoma corticosurrenalico rispetto ai pazienti con tumori benigni non secernenti (*Kolomecki K et al., 2001); risultati simili sono stati ottenuti anche dal gruppo di ricerca di de Fraipont nel 2000 (de Fraipont F, 2000). I nostri dati dimostrano che **l'espressione di VEGF e dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2** è presente sia nel surrene normale che nel tessuto tumorale; in particolar modo abbiamo osservato come nei tumori surrenalici l'espressione del gene VEGF e del recettore VEGFR-2 sia notevolmente aumentata in alcuni casi.

I risultati ottenuti sono in linea con quanto presente in letteratura, inoltre le indagini di immunohistochimica ci hanno permesso di confermare il dato di espressione ottenuto in Real Time-PCR: l'espressione di VEGF e del VEGFR-2 è aumentata in alcuni tumori corticosurrenali, in particolar modo nei carcinomi, come affermato anche da in un recente lavoro di Xu e collaboratori (Xu YZ et al., 2011).

Sulla base di questi presupposti, l'utilizzo di un farmaco che intervenga in questa pathway potrebbe portare ad un importante vantaggio sull'interruzione della proliferazione e dell'angiogenesi tumorale. Da letteratura è emerso che il farmaco **sorafenib** è attualmente utilizzato nel trattamento di alcuni tumori (Liu L et al., 2006; Kim S et al., 2007; Wang Z et al., 2008; Henderson YC et al., 2008), dove ha dimostrato potenti effetti antiproliferativi, antiangiogenici e/o proapoptotici. Per tale motivo abbiamo deciso di testare il farmaco sorafenib, sia *in vitro* (nelle linee corticosurrenaliche) che *in vivo* (nei topi xenotrapiantati con cellule SW13 ed H295R). Il farmaco ha come bersaglio sia la cellula tumorale che la vascolatura del tumore. È un inibitore multi-chinasico in grado di colpire i componenti di due classi di chinasi coinvolte nella proliferazione cellulare e nell'angiogenesi: la via Raf/MEK/ERK ed i recettori per i fattori di crescita tirosin chinasi come ad esempio: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-Kit, FLT-3 e Ret (Dal Lago L et al., 2008). Il composto interviene inoltre sulla via di trasduzione del segnale dei recettori di VEGF, in particolar modo sul recettore VEGFR-2, che è risultato maggiormente espresso in alcuni ACC.

In seguito al trattamento delle linee cellulari SW13 e H295R con il farmaco sorafenib abbiamo osservato una diminuzione della vitalità cellulare dose e tempo dipendente, con un effetto più accentuato nelle cellule SW13 (rispondono a concentrazioni più basse di farmaco rispetto alle cellule H295R). Confrontando i nostri dati con quanto ottenuto in altri tumori, le cellule surrenaliche sembrano essere più sensibili a tale farmaco, infatti a 72 ore di trattamento IC50 nelle cellule SW13 è di circa 10 nM di Sorafenib e di circa 500 nM nelle cellule H295R. Nello studio di Handerson e collaboratori (Henderson YC et al., 2008) sul carcinoma papillare della tiroide l'IC50 ha un valore pari a circa 0,1-2,5 μ M, mentre in un altro lavoro che analizza una linea di epatocarcinoma, IC50 per il farmaco sorafenib era di circa 4,5-6,3 μ M (Liu L et al., 2006).

Nel nostro studio abbiamo dimostrato come sorafenib sia in grado di inibire la fosforilazione di VEGFR-2, di AKT e di ERK, come possa influenzare la vitalità cellulare ed aumentare la morte cellulare per necrosi ed apoptosi. Attraverso l'immunoprecipitazione abbiamo inoltre dimostrato come il target di sorafenib nelle nostre due linee cellulari possa essere proprio VEGFR-2: la fosforilazione di VEGFR-2 indotta dallo stimolo con VEGF è significativamente ridotta dal trattamento con il farmaco;

questa azione è riportata in letteratura anche in linee cellulari di carcinoma anaplasico della tiroide (Kim S et al., 2007) ed in alcune linee cellulari di mieloma umano (Ramakrishnan V et al., 2010).

L'effetto di sorafenib è più intenso nelle cellule SW13 rispetto alle H295R. Una possibile spiegazione del diverso effetto potrebbe ricercarsi in un differente profilo di espressione genica tra le due linee cellulari, in particolare per il gene VEGFR-2 che, mentre è espresso a buoni livelli nelle SW13, è quasi assente nelle H295R nonché in un differente background genetico ed epigenetico. La differente espressione per quanto riguarda i geni chiave dell'angiogenesi potrebbe risiedere nella diversa origine delle cellule SW13 e H295R: mentre si ipotizza che le cellule SW13 possano essere di origine metastatica, le cellule H295R sono in grado di produrre ormoni surrenalici se opportunamente stimolate e quindi risultano essere un modello cellulare più attendibile (Rainey WE et al., 2004).

Una valida strategia frequentemente utilizzata nel mondo scientifico soprattutto nella cura di molti tumori resistenti alle terapie convenzionali è la terapia combinata, che mira a potenziare l'effetto di due farmaci possibilmente con effetto sinergico. L'associazione di più farmaci che possiedono target diversi è importante soprattutto per quelle forme tumorali in cui l'aumento della sopravvivenza anche di pochi mesi è considerato un grande passo avanti per la cura del tumore.

Il farmaco **everolimus** è un derivato semisintetico della rapamicina in grado di inibire mTOR (mammalian Target Of Rapamicine), un enzima chiave nella trasduzione e nell'attivazione della trascrizione del segnale di proliferazione cellulare (Zitzmann K et al., 2007; Fasolo A et al., 2008). Agisce sulla via di PI(3)K/Akt/mTOR attivata da molti fattori di crescita, tra i quali anche VEGF (Huang S et al., 2003). Il potenziale anti-angiogenetico e il suo effetto terapeutico è stato riportato in particolar modo in pazienti affetti da carcinoma renale (Guba M et al., 2002). Visto che il target biomolecolare di everolimus non si sovrappone a quello di sorafenib e vista l'efficacia di everolimus dimostrata in altri tipi di neoplasie, abbiamo deciso di affiancare il suo utilizzo all'uso di sorafenib.

A differenza del farmaco sorafenib, everolimus sembra avere un effetto minore nel ridurre la vitalità cellulare, sia nelle H295R che nelle SW13. In particolare sembra possedere un effetto citostatico inibendo di circa il 20-30% la vitalità cellulare in un ampio range di concentrazioni di utilizzo. Everolimus produce quindi una diminuzione di vitalità cellulare sia nelle SW13 che nelle H295R, ma l'effetto nelle SW13 è maggiore. Negli esperimenti di citofluorimetria per la valutazione della modulazione del ciclo cellulare è emerso un aumento della percentuale di cellule in fase G1, con rispettiva diminuzione delle altre fasi del ciclo cellulare. Come riportato da alcuni i lavori, tra cui quello compiuto da Zitzmann e collaboratori, everolimus produce un blocco del ciclo cellulare nella fase G1, che nel nostro caso è stato riscontrato essere più accentuato nelle cellule SW13 rispetto all'effetto più debole ottenuto nelle cellule H295R (Zitzmann K et al., 2007).

Abbiamo inoltre dimostrato grazie alla tecnica di wester blot come everolimus sia in grado di inibire gli effettori posti a valle di mTOR. In particolare inibisce la fosforilazione della chinasi P70S6K, interviene debolmente sulla fosforilazione di AKT, ma non ha effetto sulla fosforilazione di ERK. I dati rispecchiano fedelmente quanto presente in letteratura in cui si evidenzia l'importanza della via del segnale di PI(3)K/Akt/mTOR negli ACT (De Martino et al., 2010) e di come l'inibizione di mTOR da parte di everolimus possa inibire *in vitro* la proliferazione cellulare ed *in vivo* diminuire la crescita tumorale in modelli di ACC (*Doghman et al., 2010).

L'analisi dei due nuovi farmaci in **culture primarie** di ACT ha dimostrato che tutti i casi di adenoma studiati e tre su cinque carcinomi corticosurrenali sono sensibili a questi farmaci. È interessante sottolineare come i due ACC non responsivi possiedano una bassa espressione del recettore VEGFR2 se comparata ai surreni normali.

Il **trattamento farmacologico** con sorafenib ed everolimus eseguito *in vivo* in topi xenotrapiantati con cellule H295R ed SW13 ha dato esiti interessanti. Abbiamo osservato una significativa riduzione della massa tumorale nei topi trattati con la terapia combinata e un significativo aumento della sopravvivenza mediana, in particolar modo nei topi che subiscono lo xenotrapianto di cellule SW13. Oltre a ciò, anche il singolo trattamento con everolimus ha dimostrato efficacia negli xenotrapianti riducendo significativamente la massa tumorale. I dati osservati sono in linea con i risultati ottenuti in esperimenti su altri carcinomi, come ad esempio i carcinomi epatocellulari (Liu L et al., 2006; Huynh H et al., 2009; Wang Z et al., 2008). Il singolo trattamento con sorafenib invece non ha rispecchiato le nostre aspettative, non abbiamo osservato una significativa diminuzione della massa tumorale ed un aumento della sopravvivenza dei topi xenotrapiantati. In un recente studio clinico di fase II condotto da Berruti e collaboratori che utilizza i farmaci sorafenib e paclitaxel si evidenziano risultati analoghi per quanto riguarda l'utilizzo *in vitro* di sorafenib nelle cellule H295R; inoltre lo studio è stato poi interrotto prematuramente a causa dell'inefficacia del trattamento combinato di sorafenib e paclitaxel dovuto alla progressione tumorale in molti pazienti affetti da ACC in fase avanzata (Berruti A et al., 2012).

Concludendo, nella prima parte dello studio, i dati in nostro possesso sottolineano l'importanza dei fattori chiave dell'angiogenesi come VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 nei tumori corticosurrenali. Inoltre l'efficacia ottenuta con il trattamento combinato con sorafenib ed everolimus sia *in vitro* che *in vivo*, apre nuovi orizzonti nell'utilizzo di tali farmaci come valide strategie anti-VEGF ed induce a considerare i 2 composti come un nuovo possibile strumento terapeutico per i tumori della ghiandola surrenale (Mariniello B et al., 2012).

Partendo dall'osservazione dell'attivazione della via del segnale Ras/Raf/MEK/ERK nelle linee cellulari corticosurrenaliche e dalla non totale efficacia di alcuni trattamenti farmacologici in colture primarie *ex-vivo* abbiamo studiato in secondo luogo i meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi corticosurrenalica. Dall'analisi delle alterazioni geniche nei componenti chiave della **via del segnale di Ras/Raf/MEK/ERK** (in particolare i geni *B-RAF*, *H-RAS*, *K-RAS*, *N-RAS*) abbiamo ottenuto una bassa frequenza di mutazioni (1%) suggerendo che le alterazioni che colpiscono questa via del segnale non rappresentano un frequente meccanismo patogenetico di tumorigenesi.

Investigando **la via del segnale di Wnt/ β -catenina** (in particolar modo i geni *CTNNB1* e *AXIN-2*) abbiamo rilevato la presenza di alterazioni nella β -catenina in molti ACT e la sua espressione genica, analizzata con le tecniche di immunohistochimica e di real-time PCR, ha evidenziato una over-espressione di β -catenina in circa il 50% degli ACT con una localizzazione ed un accumulo citoplasmatico e nucleare della proteina. Circa il 21% degli ACC (5/24) e il 18% degli ACA (13/71) analizzati possiedono una mutazione genetica che colpisce il gene *CTNNB1* e i nostri dati sono in linea con quanto riportato in letteratura (*Tissier F et al., 2005; Tadjine M et al., 2008; Gaujoux S et al., 2008; Bonnet S et al., 2011; Mazzuco TL et al., 2012).

Le mutazioni riscontrate in questo studio comportano una costitutiva attivazione della via del segnale in quanto il meccanismo di degradazione della β -catenina è alterato: circa il 78% dei campioni mutati (14/18 ACT) possiede una alterazione a livello dell'amminoacido serina situato in posizione 45, punto fondamentale per la costituzione del complesso di degradazione della proteina attraverso il proteosoma. Non sono state riscontrate mutazioni somatiche del gene *CTNNB1* in tutti i campioni in cui, con le tecniche di Real-Time PCR ed di immunohistochimica, abbiamo rilevato over-espressione di β -catenina; questo sottolinea il fatto che possano essere coinvolti altri componenti della via del segnale di Wnt in grado di stimolare la via del segnale. Per questo motivo abbiamo investigato il **gene AXIN2**, componente chiave assieme alle proteine Glycogen Synthase 3- β (GSK3- β) ed Adenomatous Polyposis Coli (APC) del complesso di degradazione della β -catenina. Abbiamo identificato solo una delezione di 12 paia di basi in omozigosi nella linea cellulare H295R ma nessuna alterazione nei tessuti corticosurrenalici. Questo risultato, seppur in linea con quanto descritto da Champman e collaboratori (Chapman et al., 2011) ci fa presumere che esistano altri geni o altri meccanismi responsabili dell'accumulo citoplasmatico e/o nucleare osservato nella maggior parte dei tumori corticosurrenalici.

Nel nostro studio abbiamo valutato l'espressione della β -catenina in relazione alle **molecole di adesione cellulare** E-caderina ed N-caderina, molecole che formano a livello di membrana un legame con la β -catenina per il mantenimento dell'integrità strutturale e dell'adesione. Nei tumori

corticosteroidi, non abbiamo osservato la presenza di E-caderina, forse essendo una proteina espressa dai tessuti di origine epiteliale, nella porzione corticale della ghiandola surrenalica è sostituita dalla proteina N-caderina. L'espressione di N-caderina a livello di membrana cellulare è elevata nei tessuti surrenalici normali ma nei tessuti tumorali vi è una drastica diminuzione; in circa 84-100% dei carcinomi è apprezzabile una down-regolazione di N-caderina.

Mettendo in relazione l'espressione di β -catenina e di N-caderina abbiamo ottenuto una correlazione statisticamente significativa, ipotizzando quindi che entrambe le molecole possano far parte dell'ambiente tumorale che potrebbe favorire la crescita e/o la costituzione dell'ambiente tumorale. Inoltre l'analisi dell'espressione di β -catenina e di VEGF ha dimostrato una debole correlazione positiva, indicando che in alcuni tumori all'aumentare dell'espressione di β -catenina vi possa essere un aumento dell'espressione di VEGF, target molecolare forse stimolato dalla stessa β -catenina (Zhang X et al., 2001; Easwaran V et al., 2003). Ulteriori studi sono però necessari per dare conferma a questi preliminari dati.

L'utilizzo del farmaco XAV939, un inibitore della via del segnale di Wnt/ β -catenina, produce una diminuzione della vitalità cellulare nelle linee cellulari H295R ed SW13. Questo effetto, seppur da verificare con ulteriori esperimenti più approfonditi, può far ipotizzare che l'utilizzo di nuove molecole che colpiscano questa via del segnale, frequentemente alterata nei tumori corticosteroidi, possa essere un utile strumento per terapie mirate contro nuovi target terapeutici.

In conclusione, l'identificazione quindi di nuovi **target molecolari anti-angiogenetici** e di **target nella via del segnale di Wnt/ β -catenina** ha contribuito ad una migliore comprensione ed a un approfondimento della tumorigenesi corticosteroidica generando le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci mirati (target therapy).

PROSPETTIVE FUTURE

Le prospettive future implicheranno :

- L'induzione dell'over-espressione della proteina N-caderina nelle linee cellulari (H295R ed SW13) attraverso la costruzione di un plasmide, per osservare l'eventuale diminuzione dell'accumulo citoplasmatico e/o nucleare della β -catenina sequestrato a livello di membrana dalle molecole di adesione cellulare (caderine) e per investigare gli effetti di tale overespressione nell'economia cellulare.
- La valutazione dell'effetto di due nuovi farmaci, XAV939 e IWR-1 (Sigma), in grado di stimolare la degradazione della β -catenina, diminuire il suo accumulo citoplasmatico e nucleare ed agire rallentando o bloccando la trascrizione genica di alcuni geni target.
- L'analisi dell'alterazione dell'espressione genica prodotta dai farmaci, prestando maggiore attenzione ai geni coinvolti nei processi di angiogenesi (*VEGF*, *PTTG1*) e di proliferazione cellulare (*ciclina D1*, *c-myc*).
- Lo studio dei possibili meccanismi epigenetici (metilazione di alcune zone promotoriali di geni oncosoppressori, miRNA) alla base dell'alterata espressione della β -catenina e di altri prodotti genici nella via del segnale di Wnt/ β -catenina.

BIBLIOGRAFIA

- **Adam P**, Hahner S, Hartmann M, Heinrich B, Quinkler M, Willenberg HS, Saeger W, Sbiera S, Schull S, Voelker HU, Ströbel P, Allolio B, Fassnacht M. Epidermal growth factor receptor in adrenocortical tumors: analysis of gene sequence, protein expression and correlation with clinical outcome. *Mod Pathol.* 2010 Dec;23(12):1596-604.
- **Agarwala SS**, Case S. Everolimus (RAD001) in the treatment of advanced renal cell carcinoma: a review. *Oncologist.* 2010;15(3):236-45.
- **Allolio B**, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2027-37.
- **Assié G**, Guillaud-Bataille M, Ragazzon B, Bertagna X, Bertherat J, Clauser E. The pathophysiology, diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors revisited by transcriptome analyses. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 May;21(5):325-34.
- ***Assie G**, Giordano TJ, Bertherat J. Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar 31;351(1):111-7.
- **Atkins MB**, Yasothan U, Kirkpatrick P. Everolimus. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jul;8(7):535-6.
- **Bader AG**, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1475-9.
- **Bar-Lev A**, Annes JP. Genetics of adrenocortical disease: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012; 19:159-167.
- **Barzon L**, Pasquali C, Grigoletto C, Pedrazzoli S, Boscaro M, Fallo F. Multiple endocrine neoplasia type 1 and adrenal lesions. *J Urol.* 2001 Jul;166(1):24-7.
- **Bao R**, Christova T, Song S, Angers S, Yan X, Attisano L. Inhibition of tankyrases induces axin stabilization and blocks wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e48670.
- **Bergers G**, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10.
- **Bernini GP**, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iacconi P, Miccoli P, Salvetti A. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov;87(11):4961-5.
- **Berruti A**, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, De Francia S, Volante M, Daffara F, Generali D, Leboulleux S, Perotti P, Baudin E, Papotti M, Terzolo M. Phase II

study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2012 Mar;166(3):451-8.

- **Bertherat J**, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jun;94(6):2085-91.
- ***Bertherat J**, Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;23(2):261-71.
- **Berthon A**, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 31;351(1):87-95.
- ***Berthon A**, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jossineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 15;19(8):1561-76.
- **Betterle C**. Vivere con il Morbo di Addison. Manuale per i pazienti. A cura del Prof. Corrado Betterle in collaborazione con AIPAd (Associazione Italiana Pazienti Addison).
- ***Betterle C**, Zanchetta R. Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS). *Acta Biomed*. 2003 Apr;74(1):9-33.
- §**Betterle C**, Morlin L. Autoimmune Addison's disease. *Endocr Dev*. 2011;20:161-72.
- **Beuschlein F**, Reincke M. Adrenocortical tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov;1088:319-34.
- **Bielinska M**, Parviainen H, Kiiveri S, Heikinheimo M, Wilson DB. Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Vet Pathol*. 2009 Mar;46(2):194-210.
- **Boldrini M**, Smerrieri M, Ceccone S. Consulenza scientifica: prof. Labianca R, prof. Tortora G. Hanno collaborato: Peliccioli D, Tomasini G, Buffoli C, D'Ambrosio G. Dall'ipotesi di Folkman alle terapie anti-VEGF. Angiogenesi, target e nuovi trattamenti. Associazione Italiana di Oncologia medica (AIOM). Intermedia Editore, Healthcare Communication Network.
- **Bonnet S**, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, Libé R, René-Corail F, Audebourg A, Vacher-Lavenu MC, Groussin L, Bertagna X, Dousset B, Bertherat J, Tissier F. Wnt/ β -catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Feb;96(2):E419-26.

- **Boulle N**, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 May;83(5):1713-20.
- **Bourdeau I**, Lampron A, Costa MH, Tadjine M, Lacroix A. Adrenocorticotrophic hormone-independent Cushing's syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007 Jun;14(3):219-25.
- **Bussey KJ**, Demeure MJ. Toward a pathway-centered approach for the treatment of adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2011 Jan;23(1):34-44.
- **Cantwell-Dorris ER**, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):385-94.
- **Carmeliet P**. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
- **Carney JA**, Hruska LS, Beauchamp GD, Gordon H. Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Mayo Clin Proc.* 1986 Mar;61(3):165-72.
- **Cébe-Suarez S**, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Mar;63(5):601-15.
- **Chapman A**, Durand J, Ouadi L, Bourdeau I. Identification of genetic alterations of AXIN2 gene in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Sep;96(9):E1477-81.
- **Choi M**, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerstrom G, Wang W, Carling T, Lifton RP. K+ Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension. *Science.* 2011; 331: 768-772.
- **Cicala MV**, Sartorato P, Mantero F. Incidentally discovered masses in hypertensive patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006 Sep;20(3):451-66.
- **Conacci-Sorrell M**, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):987-91.
- **Conn JW**. Primary Aldosteronism. *J Lab Clin Med.* 1955; 45:661-4.
- **Costa MH**, Lacroix A. Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Nov;51(8):1226-37.
- **Dal Lago L**, D'Hondt V, Awada A. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist.* 2008 Aug;13(8):845-58.
- **Davies H**, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson

R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

- **de Fraipont F**, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM, Feige JJ. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;85(12):4734-41.
- **De Martino MC**, van Koetsveld PM, Pivonello R, Hofland LJ. Role of the mTOR pathway in normal and tumoral adrenal cells. *Neuroendocrinology*. 2010;92 Suppl 1:28-34.
- **de Reyniès A**, Assié G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, René-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1108-15.
- **Dilek FH**, Topak N, Tokyol Ç, Akbulut G, Dilek ON. β -Catenin and its relation to VEGF and cyclin D1 expression in pT3 rectosigmoid cancers. *Turk J Gastroenterol*. 2010 Dec;21(4):365-71.
- **Doghman M**, Cazareth J, Lalli E. The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug;93(8):3222-5.
- ***Doghman M**, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MH, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4666-75.
- **Durand J**, Lampron A, Mazzuco TL, Chapman A, Bourdeau I. Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):E1206-11.
- **Easwaran V**, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, Randazzo F, Gundel R, Warren RS, Escobedo J, Aukerman SL, Taylor RN, Fantl WJ. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res*. 2003 Jun 15;63(12):3145-53.
- **El Wakil A**, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jan 30;332(1-2):32-7.
- **Ellis H**. Harvey Cushing: Cushing's disease. *J Perioper Pract*. 2012 Sep;22(9):298-9.

- **Evang JA**, Berg JP, Casar-Borota O, Lekva T, Kringen MK, Ramm-Pettersen J, Bollerslev J. Reduced levels of E-cadherin correlate with progression of corticotroph pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Dec;75(6):811-8.
- **Fancy SP**, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R, Franklin RJ, Rowitch DH. Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci*. 2011 Jun 26;14(8):1009-16.
- **Fasolo A**, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Nov;17(11):1717-34.
- **Fassnacht M**, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;23(2):273-89.
- ***Fassnacht M**, Libé R, Kroiss M, Allolio B; Medscape. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun;7(6):323-35.
- **Ferrara N**, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
- **Figueiredo BC**, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SB, Boffetta P, Ribeiro RC. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. 2006 Jan;43(1):91-6.
- **Folkman J**. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
- ***Folkman J**. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Apr;6(4):273-86.
- **Fu Y**, Zheng S, An N, Athanasopoulos T, Popplewell L, Liang A, Li K, Hu C, Zhu Y. β -catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int J Cancer*. 2011 Oct 1;129(7):1541-51.
- **Gaujoux S**, Tissier F, Groussin L, Libé R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):4135-40.
- ***Gaujoux S**, Pinson S, Gimenez-Roqueplo AP, Amar L, Ragazzon B, Launay P, Meatchi T, Libé R, Bertagna X, Audebourg A, Zucman-Rossi J, Tissier F, Bertherat J. Inactivation of the APC gene is constant in adrenocortical tumors from patients with familial adenomatous polyposis but not frequent in sporadic adrenocortical cancers. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5133-41.

- **§Gaujoux S**, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libé R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F. β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 15;17(2):328-36.
- **Ge X**, Wang X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2010 Sep 15;3:33.
- **Gicquel C**, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jun;78(6):1444-53.
- **Gloushankova NA**. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Jul;73(7):742-50.
- **Gomez-Sanchez CE**, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone-Producing Adenomas: Mining for Genes. *Hypertension*. 2010; 55:1306-1307.
- **Goodwin AM**, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis*. 2002;5(1-2):1-9.
- **Gottardi CJ**, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):R792-4.
- **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"). *Ann Intern Med*. 2003 Mar 4;138(5):424-9.
- **Guba M**, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2002 Feb;8(2):128-35.
- **Gupta D**, Shidham V, Holden J, Layfield L. Value of topoisomerase II alpha, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001 Sep;9(3):215-21.
- **Hayes MJ**, Thomas D, Emmons A, Giordano TJ, Kleer CG. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4038-44.
- **Henderson YC**, Ahn SH, Kang Y, Clayman GL. Sorafenib potently inhibits papillary thyroid carcinomas harboring RET/PTC1 rearrangement. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4908-14.

- **Herbet M**, Feige JJ, Thomas M. Insights into the role of genetic alterations in adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Mar 5;300(1-2):169-74.
- **Hisada M**, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Apr 15;90(8):606-11.
- **Houghton PJ**. Everolimus. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 1;16(5):1368-72.
- **Huang S**, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2003 Aug;3(4):371-7.
- **Huang SM**, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature.* 2009 Oct 1;461(7264):614-20.
- **Hudes GR**. Targeting mTOR in renal cell carcinoma. *Cancer.* 2009 May 15;115(10 Suppl):2313-20.
- **Huynh H**, Ngo VC, Koong HN, Poon D, Choo SP, Thng CH, Chow P, Ong HS, Chung A, Soo KC. Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug;13(8B):2673-83.
- **Jain M**, Rechache N, Kebebew E. Molecular markers of adrenocortical tumors. *J Surg Oncol.* 2012 Oct 1;106(5):549-56.
- **Jeanes A**, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* 2008 Nov 24;27(55):6920-9.
- **Jurczyńska J**, Stepień T, Lawnicka H, Stepień H, Krupiński R, Kołomecki K, Kuzdak K, Komorowski J. Peripheral blood concentrations of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors (R1 and R2) in patients with adrenal cortex tumours treated by surgery. *Endokrynol Pol.* 2009 Jan-Feb;60(1):9-13.
- **Karlberg T**, Markova N, Johansson I, Hammarström M, Schütz P, Weigelt J, Schüler H. Structural basis for the interaction between tankyrase-2 and a potent Wnt-signaling inhibitor. *J Med Chem.* 2010 Jul 22;53(14):5352-5.
- **Kerbel RS**. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008 May 8;358(19):2039-49.
- **Keyaerts M**, Verschueren J, Bos TJ, Tchouate-Gainkam LO, Peleman C, Breckpot K, Vanhove C, Caveliers V, Bossuyt A, Lahoutte T. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D: -luciferin: effect on intensity, time kinetics and repeatability of photon emission. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008 May;35(5):999-1007.

- **Khorram-Manesh A**, Ahlman H, Jansson S, Nilsson O. N-cadherin expression in adrenal tumors: upregulation in malignant pheochromocytoma and downregulation in adrenocortical carcinoma. *Endocr Pathol.* 2002 Summer;13(2):99-110.
- **Kim A**, Balis FM, Widemann BC. Sorafenib and sunitinib. *Oncologist.* 2009 Aug;14(8):800-5.
- **Kim S**, Yazici YD, Calzada G, Wang ZY, Younes MN, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN. Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jun;6(6):1785-92.
- **Kirschner LS**. Signaling pathways in adrenocortical cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;968:222-39.
- ***Kirschner LS**. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jan;91(1):14-21.
- §**Kirschner LS**. The next generation of therapies for adrenocortical cancers. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Jul;23(7):343-50.
- **Klümpen HJ**, Beijnen JH, Gurney H, Schellens JH. Inhibitors of mTOR. *Oncologist.* 2010;15(12):1262-9.
- **Kolomecki K**, Stepień H, Narebski JM. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor evaluation in blood serum of patients with hormonally active and inactive adrenal gland tumours. *Cytobios.* 2000;101(396):55-64.
- ***Kolomecki K**, Stepień H, Bartos M, Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocr Regul.* 2001 Mar;35(1):9-16.
- **Kotoula V**, Sozopoulos E, Litsiou H, Fanourakis G, Koletsa T, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Mitsiades CS, Wellmann A, Mitsiades N. Mutational analysis of the BRAF, RAS and EGFR genes in human adrenocortical carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Jun;16(2):565-72.
- **Kowanetz M**, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 1;12(17):5018-22.
- **Lafemina J**, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma: past, present, and future. *J Surg Oncol.* 2012 Oct 1;106(5):586-94.
- **Lammens T**, Swerts K, Derycke L, De Craemer A, De Brouwer S, De Preter K, Van Roy N, Vandesompele J, Speleman F, Philippé J, Benoît Y, Beiske K, Bracke M, Laureys G. N-cadherin in neuroblastoma disease: expression and clinical significance. *PLoS One.* 2012;7(2):e31206.

- **Laurell C**, Velázquez-Fernández D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, Höög A, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Larsson C, Nilsson P, Bäckdahl M. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol.* 2009 Jul;161(1):141-52.
- **Leal LF**, Mermejo LM, Ramalho LZ, Martinelli CE Jr, Yunes JA, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Cardinalli IA, Brandalise SR, Moreira AC, Tone LG, Scrideli CA, Castro M, Antonini SR. Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):3106-14.
- **Lehmann T**, Wrzesinski T. The molecular basis of adrenocortical cancer. *Cancer Genet.* 2012 Apr;205(4):131-7.
- **Li FP**, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969 Oct;71(4):747-52.
- **Libè R**, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Mar;14(1):13-28.
- **Lin R**, LeCouter J, Kowalski J, Ferrara N. Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8724-9.
- **Lin SR**, Tsai JH, Yang YC, Lee SC. Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan. *Br J Cancer.* 1998 Apr;77(7):1060-5.
- **Liu L**, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006 Dec 15;66(24):11851-8.
- **Low G**, Dhliwayo H, Lomas DJ. Adrenal neoplasms. *Clin Radiol.* 2012 Oct;67(10):988-1000.
- **Maher ER**, Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest.* 2000 Feb;105(3):247-52.
- **Mariniello B**, Rosato A, Zuccolotto G, Rubin B, Cicala MV, Finco I, Iacobone M, Frigo AC, Fassina A, Pezzani R, Mantero F. Combination of sorafenib and everolimus impacts therapeutically on adrenocortical tumor models. *Endocr Relat Cancer.* 2012 Jul 22;19(4):527-39.
- **Mariotti A**, Perotti A, Sessa C, Rüegg C. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007 Apr;16(4):451-65.
- **Masi G**, Lavezzo E, Iacobone M, Favia G, Palù G, Barzon L. Investigation of BRAF and CTNNB1 activating mutations in adrenocortical tumors. *J Endocrinol Invest.* 2009 Jul;32(7):597-600.

- **Matono H**, Tamiya S, Yokoyama R, Saito T, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M, Oda Y. Abnormalities of the Wnt/ β -catenin signalling pathway induce tumour progression in sporadic desmoid tumours: correlation between β -catenin widespread nuclear expression and VEGF overexpression. *Histopathology*. 2011 Sep;59(3):368-75.
- **Mazzuco TL**, Durand J, Chapman A, Crespigio J, Bourdeau I. Genetic aspects of adrenocortical tumours and hyperplasias. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Jul;77(1):1-10.
- **McMahon G**. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*. 2000;5 Suppl 1:3-10.
- **McNicol AM**. A diagnostic approach to adrenal cortical lesions. *Endocr Pathol*. 2008 Winter;19(4):241-51.
- ***McNicol AM**. Lesions of the adrenal cortex. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Aug;132(8):1263-71.
- **Merke DP**, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36.
- **Moul JW**, Bishoff JT, Theune SM, Chang EH. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. *J Urol*. 1993 Jun;149(6):1389-94.
- **Nelson WJ**, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1483-7.
- **Ocker M**, Sachse R, Rico A, Hensen J. PCR-SSCP analysis of human adrenocortical adenomas: absence of K-ras gene mutations. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(8):513-4.
- **Ohgaki H**, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer*. 1993 May 28;54(3):408-10.
- **Otrock ZK**, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 May-Jun;38(3):258-68.
- **Patalano A**, Brancato V, Mantero F. Adrenocortical cancer treatment. *Horm Res*. 2009 Jan;71 Suppl 1:99-104.
- **Pratilas CA**, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 1;16(13):3329-34.
- **Ragazzon B**, Libé R, Gaujoux S, Assié G, Fratticci A, Launay P, Clauser E, Bertagna X, Tissier F, de Reyniès A, Bertherat J. Transcriptome analysis reveals that p53 and β -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8276-81.

- ***Ragazzon B**, Assié G, Bertherat J. Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Feb 23;18(2):R15-27.
- **Rainey WE**, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Dec 30;228(1-2):23-38.
- **Ramakrishnan V**, Timm M, Haug JL, Kimlinger TK, Wellik LE, Witzig TE, Rajkumar SV, Adjei AA, Kumar S. Sorafenib, a dual Raf kinase/vascular endothelial growth factor receptor inhibitor has significant anti-myeloma activity and synergizes with common anti-myeloma drugs. *Oncogene*. 2010 Feb 25;29(8):1190-202.
- **Reed GH**, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007 Jun;8(6):597-608.
- **Reincke M**, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, Chrousos GP. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Mar;78(3):790-4.
- **Ribeiro RC**, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, DeLacerda L, Sandrini F, Pianovsky MD, Sampaio G, Sandrini R. Adrenocortical tumors in children. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Oct;33(10):1225-34.
- ***Ribeiro RC**, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9330-5.
- **Rini BI**. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1098-106.
- **Robbins SL**, Cotran RS: *Le basi patologiche delle malattie*. 7a edizione (2005); Elsevier; Cap.24 pp.1207-1223.
- **Roman S**. Adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2006 Jan;18(1):36-42.
- **Rosol TJ**, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol*. 2001 Jan-Feb;29(1):41-8.
- **Sadow PM**, Heinrich MC, Corless CL, Fletcher JA, Nosé V. Absence of BRAF, NRAS, KRAS, HRAS mutations, and RET/PTC gene rearrangements distinguishes dominant nodules in Hashimoto thyroiditis from papillary thyroid carcinomas. *Endocr Pathol*. 2010 Jun;21(2):73-9.
- **Salmenkivi K**, Heikkilä P, Liu J, Haglund C, Arola J. VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome. *APMIS*. 2003 Apr;111(4):458-64.
- **Samavat S**, Ahmadpoor P. Aldosterone, Hypertension, and Beyond. *IJKD*. 2011; 5:71-6.

- **Shirodkar M**, Jabbour SA. Endocrine incidentalomas. *Int J Clin Pract.* 2008 Sep;62(9):1423-31.
- **Song JH**, Chaudhry FS, Mayo-Smith WW. The incidental adrenal mass on CT: prevalence of adrenal disease in 1,049 consecutive adrenal masses in patients with no known malignancy. *AJR Am J Roentgenol.* 2008 May;190(5):1163-8.
- **Soon PS**, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist.* 2008 May;13(5):548-61.
- **Stepien HM**, Kołomecki K, Pasięka Z, Komorowski J, Stepień T, Kuzdak K. Angiogenesis of endocrine gland tumours--new molecular targets in diagnostics and therapy. *Eur J Endocrinol.* 2002 Feb;146(2):143-51.
- **Tadjine M**, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 Feb;68(2):264-70.
- **Takahashi H**, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2005 Sep;109(3):227-41.
- **Tammela T**, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 2005 Feb 15;65(3):550-63.
- **Taniguchi K**, Yamada T, Sasaki Y, Kato K. Genetic and epigenetic characteristics of human multiple hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2010 Oct 6;10:530.
- **Tenenbaum F**, Groussin L, Foehrenbach H, Tissier F, Gouya H, Bertherat J, Dousset B, Legmann P, Richard B, Bertagna X. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography as a diagnostic tool for malignancy of adrenocortical tumours? Preliminary results in 13 consecutive patients. *Eur J Endocrinol.* 2004 Jun;150(6):789-92.
- ***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. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7622-7.
- **Tissier F**. Classification of adrenal cortical tumors: what limits for the pathological approach? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Dec;24(6):877-85.
- **Turner HE**, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2003 Oct;24(5):600-32.
- **Tsuchiya B**, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol.* 2006 Jun;69(2):135-45.

- **Velázquez-Fernández D**, Laurell C, Geli J, Höög A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P, Bäckdahl M. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*. 2005 Dec;138(6):1087-94.
- **Vezzosi D**, Bertherat J, Groussin L. Pathogenesis of benign adrenocortical tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010 Dec;24(6):893-905.
- **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. *Cancer*. 2000 Feb 15;88(4):711-36.
- **Waldmann J**, Feldmann G, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Saeger W, Rothmund M, Fendrich V. Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival. *Br J Cancer*. 2008 Dec 2;99(11):1900-7.
- **Wang T**, Rainey WE. Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 31;351(1):58-65.
- **Wang Z**, Zhou J, Fan J, Qiu SJ, Yu Y, Huang XW, Tang ZY. Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5124-30.
- **Weiss LM**. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 1984 Mar;8(3):163-9.
- **Wilhelm SM**, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):7099-109.
- ***Wilhelm SM**, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther*. 2008 Oct;7(10):3129-40.
- **Wood BJ**, Abraham J, Hvizda JL, Alexander HR, Fojo T. Radiofrequency ablation of adrenal tumors and adrenocortical carcinoma metastases. *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3):554-60.
- **Wood MA**, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Apr 10;336(1-2):206-12.
- **Xu YZ**, Zhu Y, Shen ZJ, Sheng JY, He HC, Ma G, Qi YC, Zhao JP, Wu YX, Rui WB, Wei Q, Zhou WL, Xie X, Ning G. Significance of heparanase-1 and vascular endothelial growth

factor in adrenocortical carcinoma angiogenesis: potential for therapy. *Endocrine*. 2011 Dec;40(3):445-51.

- **Yarom N**, Stewart D, Avruch L, Malik R, Wells J, Jonker DJ. ADH-1 in the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma--case report. *Anticancer Res*. 2011 Nov;31(11):3921-5.
- **Yashiro T**, Hara H, Fulton NC, Obara T, Kaplan EL. Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World J Surg*. 1994 Jul-Aug;18(4):455-60; discussion 460-1.
- **Yuan R**, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2009 Oct 27;2:45.
- **Zatelli MC**, Minoia M, Filieri C, Tagliati F, Buratto M, Ambrosio MR, Lapparelli M, Scanarini M, Degli Uberti EC. Effect of everolimus on cell viability in nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Feb;95(2):968-76.
- **Zennaro MC**, Jeunemaitre X. Mutations in KCNJ5 Gene Cause Hyperaldosteronism. *Circ Res*. 2011; 108:1417-1418.
- **Zetting G**, Mitterhauser M, Wadsak W, Becherer A, Pirich C, Vierhapper H, Niederle B, Dudczak R, Kletter K. Positron emission tomography imaging of adrenal masses: (18)F-fluorodeoxyglucose and the 11beta-hydroxylase tracer (11)C-metomidate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Sep;31(9):1224-30.
- **Zhang X**, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6050-4.
- **Zhu Z**, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs*. 1999;17(3):195-212.
- **Zielke A**, Middeke M, Hoffmann S, Colombo-Benkmann M, Barth P, Hassan I, Wunderlich A, Hofbauer LC, Duh QY. VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors. *Surgery*. 2002 Dec;132(6):1056-63.
- **Zitzmann K**, De Toni EN, Brand S, Göke B, Meinecke J, Spöttl G, Meyer HH, Auernhammer CJ. The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology*. 2007;85(1):54-60.